



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie**

**Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie**

**Entwicklung von flussbasierten Chemilumineszenz-Mikroarrays zur  
schnellen Quantifizierung, Lebensfähigkeitsuntersuchung und  
Serotypisierung von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* in  
Kultur-, Wasser- und Urinproben**

**Catharina Kober**

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:** Prof. Dr. Matthias Feige

**Prüfer der Dissertation:** 1. Priv.-Doz. Dr. Michael Seidel

2. Prof. Dr. Reinhard Nießner

Die Dissertation wurde am 09.01.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18.02.2020 angenommen.



**Meiner Familie**





## Vorwort

*Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2015 bis Dezember 2018 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie und Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Nießner und ab April 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Elsner angefertigt. Die Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Kulturunabhängige Detektionssysteme zur schnellen Risikobewertung von anthropogen verursachten aerogenen Legionellenexpositionen“ (Akronym: LegioTyper) durchgeführt und vom BMBF gefördert.*

In besonderer Weise möchte ich hier meinem Doktorvater und Gruppenleiter PD Dr. Michael Seidel danken. In meinen Jahren am Institut konnte ich auf deinen Rat und Rückhalt zählen, in selbstständiger Arbeit meinen Gedanken folgen und auch in stressigen Zeiten konnten wir immer einen Weg der Kommunikation und des Miteinanders finden. Vielen Dank auch für die vielen Möglichkeiten, neue Dinge auszuprobieren und das Projekt so häufig nach außen vertreten zu dürfen, was mir immer großen Spaß gemacht hat.

Auch bei meinem Mentor Prof. Dr. Nießner möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich für die Chance bedanken, an solch einem spannenden Thema arbeiten zu dürfen und die Möglichkeit der vielen Konferenz- und Messebesuche, welche nicht an jedem Lehrstuhl selbstverständlich sind. Und natürlich auch für das Feedback und neue Gedanken, die immer Motivation zur Weiterarbeit gaben.

Der Microarray-Gruppe, aktiven und ehemaligen Mitgliedern, danke ich an dieser Stelle für die herzliche Aufnahme und den regen Austausch zu jeder Zeit in all den Jahren. Besonderer Dank gilt hier Dennis Elsässer, der zu jeder Zeit ein offenes Ohr in allen Krisenlagen und stets gute Ratschläge hatte und mir immer eine wertvolle Unterstützung war. Jonas Bemetz für die Zusammenarbeit im LegioTyper und Jahre des Austausches, lustiger Fahrten, Besuche von Konferenzen und das Durchstehen paralleler Vorträge. Katharina Sollweck für die tolle, spaßige und bunte Büronachbarschaft in meinem letzten Jahr und viele schöne geteilte Mittagessen. Auch Andreas Kunze, Angelika Nistler, Anika Wunderlich und Verena Meyer danke ich recht herzlich für viele gute Gespräche und Rückhalt. Auch meinen

Bachelorstudenten, Forschungspraktikanten und unserer wissenschaftlichen Hilfskraft danke ich für die zuverlässige und nette Zusammenarbeit.

Bei Klemens Thaler und der Werkstatt bedanke ich mich für die Idee und den Bau des Gerätes für die Umsetzung der Viability-haRPA.

Auch bei den weiteren IWC-Kollegen möchte ich mich ganz herzlich für all die Jahre voller wertvoller Gespräche, Kaffeepausen, Grillabenden, erinnerungswürdiger Konferenzen, Wiesn-Besuche und allerlei schöner Momente bedanken, die ich für immer in Erinnerung behalte. Besonderer Dank gilt hier Alexander Rinkenburger und auch Carina Wismeth für die vielen guten Gespräche, immer Gründe herzlich zu lachen, und die Gewissheit, dass wir uns dank persönlichem Paparazzi stets an alles erinnern werden.

Ein besonderer Dank geht natürlich auch an meine Kolleginnen und Kollegen des BMBF-Projektes LegioTyper. Gerade am Konsiliarlabor Legionellen in Dresden habe ich mit Anne und Markus Petzold nicht nur wunderbare und zuverlässige Projektpartner gefunden, sondern auch gute Freunde. Vielen Dank, dass ich mich bei euch immer rückversichern konnte, ich danke euch für drei kreative und produktive Jahre! Und natürlich auch einen großen Dank an Herr Lück, nicht zuletzt für die Woche, die ich in Dresden allen über die Schulter schauen durfte. Doch auch bei den Mitstreiterinnen und Mitstreitern vom LGL und der GWK kann ich mich nur bedanken. Gerade bei Projektmeetings konnte man immer ein sehr nettes und respektvolles Miteinander spüren.

Meinen Freunden aus dem Studium, hier in München und natürlich den Freunden aus Landau gehört an dieser Stelle auch ein großes Dankeschön. Eure Unterstützung und euer Glaube an mich hat mich immer wieder aufgebaut, wenn es mal nicht so lief und stets aufs Neue motiviert.

Auch meiner ganzen Familie in Landau danke ich an dieser Stelle für die Unterstützung über die vergangenen Jahre. Schön, dass ihr immer mitgefiebert und die Daumen gedrückt habt. Ein besonderer und spezieller Dank geht hier an meine Eltern. Ich danke euch für die bedingungslose Unterstützung in jeder Hinsicht, so dass ich meinen Weg gehen konnte ohne zu zweifeln. Es ist schön euch zu haben.

---

Last but not least danke ich meinem lieben Partner Tom. Danke, dass du diese ganzen Jahre mit mir erlebst. Danke, dass du in allen Gefühlslagen und bei allen Erfahrungen, die ich mache, stets an meiner Seite bist, meine Spinnereien akzeptierst und mir einen Rückzugsort geschaffen hast, an dem ich zur Ruhe kommen konnte.

## Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht, andere Teile werden derzeit noch zur Veröffentlichung vorbereitet:

Jonas Bemetz, Catharina Kober, Verena K. Meyer, Reinhard Niessner and Michael Seidel, *Succinylated Jeffamine ED-2003 coated polycarbonate chips for low-cost analytical microarrays*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2019**, 411(10), 1943-1955.

Catharina Kober, Reinhard Niessner and Michael Seidel, *Quantification of viable and non-viable Legionella spp. by heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification (haRPA) on a flow-based chemiluminescence microarray*, *Biosensors and Bioelectronics*, **2018**, 100, 45-55.

## Kurzbeschreibung

In den letzten Jahren hat die steigende Fallzahl an Legionellose-Erkrankungen gezeigt, dass eine innovative, empfindliche und schnelle Methode zum Nachweis von Legionellen in Wasser (z.B. Oberflächen-, Trink- und Prozesswasser) oder klinischen Proben nach wie vor benötigt wird. In den meisten Fällen wird die Legionellose durch die Spezies *Legionella pneumophila* (90 %, *L. pneumophila*) verursacht. Der Goldstandard für den Nachweis von Legionellen in klinischen und Umweltproben stellt hierbei nach wie vor die Kultivierung dar, obwohl diese bis zum Ergebnis bis zu 10 Tage dauert und nur der Nachweis von kultivierbaren *Legionella* spp. möglich ist. Anschließend müssen weitere Verfahren zur differenzierten Quantifizierung und auch Typisierung der erhaltenen Legionellenkolonien angewendet werden.

Die deutsche Trinkwasserverordnung schreibt eine regelmäßige Überwachung des Leitungswassers vor und auf der Grundlage der 42. Bundesimmissionsschutzverordnung (42. BImSchV) müssen seit 2017 Kondensationsrückkühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider registriert und überwacht werden. Daher ist es wichtig, *Legionella* spp. und *L. pneumophila* kulturunabhängig und schnell quantifizieren zu können. Zu diesem Zweck wurde ein Chemilumineszenz-DNA-Mikroarray unter Verwendung der isothermen heterogenen asymmetrischen Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (haRPA) auf der automatisierten durchflussbasierten Analyseplattform MCR 3 etabliert: Die Differenzierung und Quantifizierung von *L. pneumophila* und *Legionella* spp. erfolgt durch Amplifikation der genomischen Sequenzen des *mip*- und *16S rRNA*-Genes. Nachweisgrenzen von 26 genomischen Einheiten (GU)  $\mu\text{L}^{-1}$  für *L. pneumophila* und 87 GU  $\mu\text{L}^{-1}$  für *Legionella* spp. wurden erreicht. Für eine Lebend/tot-Differenzierung, um z.B. Biozideffekte zu überwachen, werden die Proben mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiummonoazid (PMA) behandelt, welcher durch nicht-intakte Zellmembranen in nicht-lebensfähige Mikroorganismen eindringt und in deren DNA interkaliert. Eine nachfolgende Amplifikation durch die haRPA wird somit verhindert und nur der Anteil lebensfähiger Organismen quantifiziert. Mit der so genannten Lebensfähigkeits-haRPA konnten vordefinierte Mischungen an lebensfähigen *Legionella* spp. in einem Bereich zwischen  $10^1$  und  $10^5$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$  mit Wiederfindungsraten zwischen 81 und 133 % gemessen werden. Durch die Kombination von haRPA und Lebensfähigkeits-haRPA ist es möglich, kulturbasierte Methoden zu ersetzen bzw. zu ergänzen und die Überwachung

von technischen Wassersystemen wie Kondensationsrückkühlanlagen und die Effizienzbetrachtung von Bioziden zu verbessern.

Im Falle eines Legionellose-Ausbruchs, der durch die Emission von legionellenhaltigen Aerosolen verursacht wird, ist es von grundlegender Bedeutung, infizierte Patienten schnell mit einer möglichen Ausbruchquelle in Verbindung zu bringen, um weitere Krankheitsfälle zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde auf der Analyseplattform MCR-R ein Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (CL-SMIA) zum Nachweis und zur Serotypisierung von *L. pneumophila* etabliert. Eine schnelle und multiplexe monoklonale Subtypisierung aller Subgruppen von *L. pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 ist mit einem Panel von zehn empfindlichen und selektiven Antikörpern innerhalb von nur 34 min möglich. Bei Anwendungsmessungen konnten 100 % der gemessenen Proben eindeutig der Sg 1 zugeordnet werden, der Test ist somit gängigen kommerziellen Tests ebenbürtig. Darüber hinaus kann mit der gleichen Methode und auf dem gleichen Gerät ein direkter und schneller Vergleich der Urinproben betroffener Patienten mit Umweltwasserproben von mutmaßlichen Ausbruchquellen durchgeführt werden, was bei vielen kommerziellen Tests nicht möglich ist. Zudem ist in vielen Fällen eine Zuordnung zur Pontiac- und Non-Pontiac-Gruppe, sowie die Subtypisierung der Sg 1-Subgruppen in Proben mit höheren Konzentrationen möglich. Der CL-SMIA kann in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden, wie z.B. in der klinischen Diagnostik und der umwelthygienischen Überwachung der Gesundheitsbehörden zur Analyse von Patientenurin- sowie Wasserproben. Dies ermöglicht den schnellen Ausschluss vieler Umweltproben, um sich auf eine geringere Anzahl von Proben bei Ausbruchuntersuchungen für die Genotypisierung konzentrieren zu können.

## Abstract

Within the last years, increasing numbers of legionellosis cases have shown that a sensitive, rapid and innovative method for the detection of *Legionellae* in water (e.g. surface water, drinking water, process water) and patients' urine is still needed. Often legionellosis is caused by the species *Legionella pneumophila* (90%, *L. pneumophila*). The cultivation of clinical and environmental samples still represents the gold standard method for the detection of *Legionella* although it takes up to 10 days for results and only detection of culturable *Legionella* spp. is possible. Subsequently, further methods have to be applied in order to quantify and type obtained *Legionella* colonies.

The drinking water ordinance demands regular monitoring of tap water and based on the 42<sup>nd</sup> Federal Emission Control Act (42. BImSchV) condensation recooling plants, cooling towers and wet separators have to be registered and monitored since 2017. Therefore, it is important to quantify *Legionella* spp. and *L. pneumophila* in a culture-independent and rapid way. A chemiluminescence DNA microarray was established using the isothermal heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification (haRPA) on the automated flow-based analysis platform MCR 3. The differentiation and quantification of *L. pneumophila* and *Legionella* spp. is carried out by amplification of the genomic sequences of *mip* and *16S rRNA* genes, respectively. Detection limits of 26 genomic units (GU)  $\mu\text{L}^{-1}$  for *L. pneumophila* and 87 GU  $\mu\text{L}^{-1}$  for *Legionella* spp. were achieved. For viable/ non-viable-differentiation, for the monitoring of e.g. biocide effects, samples are treated with the DNA-intercalating dye propidium monoazide (PMA), which penetrates in non-intact cell membranes of non-viable microorganisms and intercalates into the DNA, thereby inhibiting subsequent amplification by haRPA. With the so-called viability haRPA, predefined proportions of viable *Legionella* spp. could be measured in a range from  $10^1$  -  $10^5$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$  with recovery rates of 81 to 133%. By the combination of the haRPA and the viability haRPA, it is possible to substitute culture-based methods and improve the monitoring of engineered water systems such as condensation recooling plants and efficiency of biocides in the future.

In case of an outbreak situation caused by emissions of *Legionella*-containing aerosols, it is fundamental to rapidly align infected patients to the outbreak source in order to prevent further infections. For this reason, a chemiluminescence sandwich microarray immunoassay (CL-SMIA) for the detection and serotyping of

*L. pneumophila* was established on the microarray analysis platform MCR-R. A rapid and multiplexed monoclonal subtyping of all subgroups of *L. pneumophila* serogroup (SG) 1 is possible with a panel of ten sensitive and selective antibodies within only 34 min. In application measurements 100% of the measured samples could be clearly assigned to SG 1, which shows comparable results to commercially available kits. Additionally, a direct and rapid comparison of patients' urine samples with environmental water samples of putative outbreak sources can be done with the same method and on the same device. Furthermore, an assignment to Pontiac and Non-Pontiac group is possible in many cases as well as the subtyping of the Sg 1 subgroups in samples with higher concentrations. The CL-SMIA can be applied in various settings such as in clinical diagnostics and environmental hygiene monitoring of the health authorities to analyze patients' urine samples as well as water samples. This allows the rapid exclusion of many environmental samples to focus on a smaller number of samples for genotyping during outbreak investigations.



# Inhaltsverzeichnis

Vorwort .....	i
Veröffentlichungen .....	iv
Kurzbeschreibung .....	v
Abstract .....	vii
Inhaltsverzeichnis .....	ix
1 Einleitung .....	1
2 Theoretische Grundlagen .....	4
2.1 Mikroorganismen in Wasser .....	4
2.1.1 Bakterien .....	4
2.1.2 Legionellen .....	7
2.2 Nachweisverfahren für Legionellen .....	14
2.2.1 Kulturabhängige Nachweisverfahren .....	16
2.2.2 Immunologische Nachweisverfahren .....	19
2.2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden .....	38
2.2.4 Vergleich der Nachweismethoden .....	54
2.3 Anwendung .....	57
2.3.1 Trinkwasser-Verordnung .....	57
2.3.2 Reguläres Monitoring .....	57
2.3.3 Klinische Diagnostik .....	58
2.3.4 Verhalten im Expositionsfall .....	59
3 Ergebnisse und Diskussion .....	61
3.1 Heterogene asymmetrische RPA (haRPA) .....	61
3.1.1 Kalibrierung der haRPA .....	62
3.1.2 Duplexmessungen .....	66
3.1.3 Kombination der haRPA mit einer Anreicherungs- methode .....	71
3.1.4 Fazit .....	75

---

3.2	Lebensfähigkeits-haRPA .....	77
3.2.1	Etablierung der v-haRPA.....	77
3.2.2	Kalibrierung der v-haRPA.....	81
3.2.3	Wiederfindung .....	84
3.2.4	Fazit .....	85
3.3	LegioTyper.....	87
3.3.1	Vergleich der Polycarbonat- und Glas-Oberflächen auf dem MCR 3 ....	88
3.3.2	Etablierung des Demonstrator-Gerätes MCR-R.....	91
3.3.3	Automatisiertes Füllen der Mikroarray-Chips .....	92
3.3.4	Langzeitstabilitätsmessungen .....	93
3.3.5	Analytische Datenevaluierung.....	98
3.3.6	Vergleichende Messungen des CL-SMIA.....	99
3.3.7	Kombination des CL-SMIA mit einer Anreicherungs- methode .....	101
3.3.8	Detektionsantikörper für Sg 2 – 15.....	105
3.3.9	Antikörper-Panel für <i>L. pneumophila</i> Sg 1.....	108
3.3.10	Anwendungsmessungen mit dem LegioTyper-Panel.....	127
3.3.11	Fazit.....	150
3.4	Vergleich der Methoden.....	154
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	156
5	Experimentelle Durchführung .....	163
5.1	Labora- ausstattung und Verbrauchsgüter.....	163
5.1.1	Geräte und Materialien.....	163
5.1.2	Software .....	166
5.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	167
5.1.4	Antikörper.....	171
5.1.5	Kits .....	173
5.1.6	Primer.....	173
5.1.7	Kulturstämme .....	174

---

5.2	Zellkultur.....	175
5.2.1	Bakterien-Plattenkultur .....	175
5.2.2	Herstellung einer Bakterien-Stammsuspension .....	175
5.2.3	Quantifizierung einer Bakterien-Stammsuspension .....	175
5.3	Molekularbiologische Methoden .....	175
5.3.1	DNA-Extraktion .....	175
5.3.2	qPCR .....	176
5.4	Monolithische Adsorptionsfiltration .....	178
5.4.1	Synthese monolithischer Adsorptionsfilter (MAF) .....	178
5.4.2	Funktionalisierung von MAF-Säulen .....	178
5.4.3	MAF-Filtration .....	179
5.4.4	Zentrifugale Ultrafiltration.....	179
5.5	Mikroarray-Experimente .....	180
5.5.1	Herstellung von Glas-Mikroarray-Chips .....	180
5.5.2	Probenvorbereitung der Lebensfähigkeits-haRPA.....	182
5.5.3	haRPA auf dem MCR 3 .....	182
5.5.4	Auswertung.....	185
5.5.5	Herstellung eines Polycarbonat-Mikroarray-Chips.....	185
5.5.6	CL-SMIA auf dem MCR-R .....	188
5.5.7	Auswertung.....	191
6	Anhang.....	192
7	Abkürzungsverzeichnis .....	215
8	Literaturverzeichnis .....	219
9	Eidesstattliche Erklärung.....	257



# 1 Einleitung

Die steigende Zahl an Legionelloseerkrankungen in den letzten Jahren zeigt, dass Legionellen in Süß- und Trinkwassern ein häufiges und nicht selten noch ein unterschätztes Problem darstellen. Legionellen existieren in geringen Konzentrationen in allen wässrigen Umgebungen und können auch in Gartenerde vorkommen. Das bevorzugte Habitat stellen jedoch Biofilme dar, in denen sich die Legionellen in Protozoen, wie z.B. Amöben vermehren und überleben.

Bei der Beprobung von Oberflächen-, Prozess- und Trinkwasser ist der aktuelle Goldstandard für die Detektion von Legionellen die Kulturmethode nach ISO 11731 und DIN EN ISO 11731-2. Diese benötigt nach Beprobung bis zu 10 Tage für ein positives Ergebnis. Die Kultur gibt zudem lediglich eine Aussage über Anwesenheit und Quantität von kultivierbaren *Legionella* spp., es handelt sich somit um eine Summenbestimmung aller lebenden Legionellenspezies. Und gerade in schwierigen Matrices, wie beispielsweise Prozesswasser, ist die Kultur oft schwierig, beispielsweise aufgrund der vielen konkurrierend vorkommenden Mikroorganismen, welche die Kultur überwachsen oder das Wachstum der Legionellen hemmen. Zur weiteren Einordnung der Proben bezüglich Spezies bzw. Serogruppen (Sg) oder auch Lebend/tot-Differenzierung müssen weitere Methoden verwendet werden. Im regulären Monitoring von Trinkwasser oder beispielsweise bei Kühltürmen in industriellen Anlagen hat jedoch gerade der Zeitfaktor dieser Beprobungen einen hohen Stellenwert. Erhöhte Positivbefunde können zur zeitweisen Stilllegung ganzer Anlagen oder Schließung von z.B. Sanitäreanlagen öffentlicher Sportstätten führen. Bei Anlagenbetreibern bedeutet jede Verzögerung in der Produktion jedoch einen finanziellen Nachteil. Doch selbst bei sofortigen Dekontaminationsmaßnahmen zeigt eine weitere Beprobung über die Kulturmethode ihr Ergebnis und die Freigabe der Anlage erst nach 7 bis 10 Tagen. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl an Methoden für die Quantifizierung und den Lebensfähigkeits-Nachweis von Legionellen, jedoch sind diese häufig mit hohem Kosten- und Zeitaufwand verbunden und benötigen nicht selten ein anspruchsvolles Equipment.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung einer schnellen und sensitiven, einfachen isothermen Quantifizierung für Legionellen in verschiedensten Wasserproben. Gearbeitet wurde mit der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA), einer Nukleinsäureamplifikationsmethode bei gleichbleibender Temperatur. Durch

Immobilisierung des *reverse* (REV)-Primers auf der Oberfläche des Glas-Mikroarray-Chips wird eine heterogene Detektion der DNA durch Amplifikation auf der Chip-Oberfläche ermöglicht. Durch Verwendung eines biotinylierten *forward* (FW)-Primers kann eine spätere Detektion über Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase) erfolgen. Durch Intensität der resultierenden Chemilumineszenz kann so eine Quantifizierung der DNA in der Probe erfolgen. Durch Vorbehandlung der Probe vor DNA-Extraktion mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff PMA wurde die Methode zusätzlich durch einen Lebensfähigkeits-Nachweis ergänzt. Durch zwei zeitgleiche Messungen auf demselben Zweikanal-Mikroarray können so simultan die Gesamtbestimmung lebensfähiger und nicht-lebensfähiger Legionellen und auch der Anteil nur lebensfähiger Legionellen in weniger als einer Stunde definiert werden.

In den letzten Jahren kam es zudem weltweit und auch in Deutschland immer wieder zu epidemischen Legionellose-Ausbrüchen, welche durch die Emission von legionellenhaltigen Aerosolen aus Kondensationsrückkühlanlagen in die Umwelt verursacht wurden. Ein bekanntes Beispiel in Deutschland ist der Ausbruch 2013 in Warstein mit mehr als 150 Erkrankten. In einem Ausbruchsfall ist es essentiell, die Ausbruchsquelle und somit den Ursprung der Infektionen schnellstmöglich zu finden, um weitere Infektionsfälle zu vermeiden. Hierbei müssen Proben der infizierten Patienten mit Wasserproben verglichen werden. Auf Grund der Vielzahl an Verdunstungsrückkühlanlagen und Kühltürmen und somit potentiellen Ausbruchsquellen, ist dies ein langwieriger und aufwendiger Prozess. Ein weiteres Problem ist die unterschiedliche Matrix der Proben. Zum einen handelt es sich bei den Proben um Oberflächen-, Trink- und Prozesswasserproben, zum anderen müssen Patientenproben behandelt werden. Somit müssen häufig viele verschiedene zeitaufwendige Methoden zeitgleich verwendet werden, um die Proben direkt miteinander zu vergleichen.

Ziel der Doktorarbeit war hier die Etablierung eines Detektionssystems zur schnellen Risikobewertung von Legionellenexpositionen im Rahmen des BMBF-Projektes „LegioTyper“. Hierfür wurde ein Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (CL-SMIA) als schnelle, einfache und auch sensitive Testmethode entwickelt. Für den CL-SMIA wurden 19 monoklonale und 1 polyklonaler Antikörper (AK) als sensitive Fängerantikörper verwendet, um eine multiplexe Serotypisierung der

*L. pneumophila* Sg 1 Subgruppen und Sg 2 bis 15 in kürzester Zeit zu ermöglichen. Während der Doktorarbeit konnte auf einen neu entwickelten Polycarbonat-Mikroarray und auch eine verbesserte Analyse-Plattform zurückgegriffen werden. Mit Hilfe des CL-SMIAs konnten hier Proben verschiedenster Matrices auf derselben Plattform und demselben Mikroarray-Chip vermessen werden, die Proben sind somit direkt miteinander vergleichbar. Die Methode kann in verschiedensten Bereichen angewendet werden. In der klinischen Diagnostik können Patientenerine ohne weitere Vorbehandlung vermessen werden. Des Weiteren kann sie in der umwelthygienischen Überwachung der Gesundheitsbehörden zur Analyse von Wasserproben verwendet werden. Hier kann ein direkter und schneller Vergleich der Urinproben des Patienten mit Umweltwasserproben von vermeintlichen Ausbruchsquellen durchgeführt werden. Dies ermöglicht es, gerade im Ausbruchsgeschehen viele Umweltproben direkt mit Patienten zu vergleichen. Ohne weitere aufwändige Analysemethoden können Proben von beispielsweise Verdunstungskühlanlagen, welche nicht im Muster mit den Patientenproben übereinstimmen, schnell als Ursache der Epidemie ausgeschlossen werden. Weiterführend kann man sich somit auf eine geringere Anzahl von Proben konzentrieren, welche per Kultur und anderen Methoden (Genotypisierung) ausgewertet werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Mikroorganismen in Wasser

#### 2.1.1 Bakterien

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit Legionellen, also wasserbürtigen Bakterien, gearbeitet. Die deutsche Trinkwasserverordnung (TwVO) regelt in Deutschland die Qualität und Beprobung des deutschen Trinkwassers [1]. Hier werden relevante Bakterien gelistet und wichtige Werte festgelegt, die bei Beprobungen nicht überschritten werden dürfen, ohne weitere Maßnahmen zur Dekontamination ergreifen zu müssen. In Tabelle 1 sind die relevanten Bakterien und die Grenzwerte aufgelistet.

**Tabelle 1: Grenzwerte und Technische Maßnahmenwerte für Indikatorkeime laut deutscher Trinkwasserverordnung (Stand 09.01.2018)[1].**

Mikroorganismus	Grenzwert	Anmerkung
Coliforme Bakterien	0 / 100 mL	Allgemeiner Indikatorkeim
Enterokokken	0 / 100 mL	Fäkalindikator
<i>Escherichia coli</i>	0 / 100 mL	Fäkalindikator
<i>Clostridium perfringens</i> (einschließlich Sporen)	0 / 100 mL	Wenn das Wasser aus Oberflächenwasser stammt oder davon beeinflusst wird
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 / 250 mL	Wenn zur Abgabe in verschlossenen Behältern bestimmt
<i>Legionella</i> spp.	100 / 100 mL	Technischer Maßnahmenwert

In Tabelle 1 finden sich die in Deutschland relevanten Indikatorkeime, welche Aussagen über die Qualität des Trinkwassers zulassen. Häufig werden diese Krankheitserreger durch Fäkaleintrag ins Wasser eingebracht und so weiterverbreitet [2]. Die größten Gefahren bei Aufnahme von Mikroorganismen für den Menschen sind der Eintrag durch Ingestion (gastrointestinal, z.B. *Escherichia coli* (*E.coli*), *Salmonella* spp.), Inhalation bzw. Aspiration (respiratorisch, z.B. Legionellen) und der direkte Kontakt über die Haut (z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)) [3]. Die Verbreitung der Mikroorganismen ist in der heutigen Zeit begünstigt durch den Klimawandel, Urbanisierung und die meist veralteten Wasserleitungen in den Städten. Durch regelmäßige Beprobung und Wasseraufbereitung sollen durch diese Keime



verursachte Krankheitsausbrüche jedoch verhindert werden. Im Weiteren werden die einzelnen Bakterien genauer beleuchtet.

### **Coliforme Keime**

Unter den Begriff coliforme Bakterien fallen mehrere Arten und Gattungen von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, also der Enterobakterien [4]. So gehören in diese Familie beispielsweise Salmonellen, Klebsiellen und auch EHEC-Erreger, aber auch *E. coli*, welche im nächsten Absatz noch einmal separat betrachtet werden. Sie sind eine Gruppe aerober oder fakultativ aerober, gram-negativer, nicht sporenbildender Bakterien [5]. Enterobakterien sind häufig im Darm natürlich vorkommende Bakterien, die für den Menschen durchaus wichtig sind. Sie wandeln in der Regel Laktose innerhalb 48 h bei 35 °C in Gase um [5]. Als fakultativ pathogene Keime sind sie jedoch gefährlich, wenn sie in andere Körperregionen kommen oder von außen eingetragen werden. Obligat pathogene Enterobakterien sind dagegen immer krankheitserregend, da sie im Körper nicht natürlich vorkommen, wie z.B. Salmonellen und EHEC.

### ***Escherichia coli***

*E. coli* ist ein gramnegatives, peritrich begeißeltes Bakterium und gehört zur Familie der Enterobakterien. *E. coli* sind natürlicher Bestandteil einer gesunden, menschlichen und auch tierischen Darmflora und fakultativ pathogen [4]. Aufgrund ihres natürlichen Vorkommens im Darm zählen sie zu den Fäkalindikatoren. Sie gehören mit zu den häufigsten Erregern von Magen-Darm- und auch Harnwegsinfekten und sind für viele nosokomiale Infektionen verantwortlich [6]. *E. coli* können in sechs verschiedene pathogene Gruppen eingeteilt werden [7, 8]: Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Enterotoxische *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Diffuse-adhering *E. coli* (DAEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAaggEC) und Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Aufgrund der vollständigen Entschlüsselung der genetischen Sequenz und dem großen Wissen und Verständnis von *E. coli* wird dieses häufig im Labor verwendet.

### **Enterokokken**

Enterokokken sind grampositive Bakterien der Gattung Enterococcus, welche erst seit kurzer Zeit von der Gattung Streptococcus abgegrenzt werden. Sie sind häufig nicht pathogen für den Menschen [9], es sind jedoch zwölf humanpathogene Arten bekannt,

darunter *E. faecalis* [9]. Heutzutage sind sie der dritthäufigste Erreger nosokomialer Infektionen, wie beispielsweise Endokarditis und Sepsis, mit hoher Letalität, da sie zunehmend gegen eine Vielzahl Antibiotika resistent werden [9-11]. Bekannt sind hier vor allem die Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) [12].

Enterokokken gehören zur Familie der Milchsäurebakterien, welche häufig in Probiotika verwendet werden. Vor allem *E. faecalis* und *E. faecium* werden hier verwendet, um beispielsweise Durchfall, einen hohen Cholesterinspiegel oder das Reizdarmsyndrom zu behandeln [13, 14]. Sie kommen zudem natürlich in vielen Käsesorten vor und werden auch häufig zugesetzt, da sie durch Citratspaltung, lipolytische Aktivität und Proteolyse eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der sensorischen Fähigkeiten spielen. Des Weiteren produzieren sie Enterokine, welche sowohl Lebensmittelverderb verzögern, als auch das Wachstum anderer Pathogene in Lebensmitteln, wie z.B. *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus* hemmen [14, 15].

### ***Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* sind anaerobe Bakterien, die sehr häufig in Lebensmitteln vorkommen, aber auch in Böden oder dem menschlichen und tierischen Darm. Clostridien sind sogenannte Sporenbildner. Unter schlechten Umweltbedingungen bilden sie Dauerformen, in denen sie auch die ungünstigsten Bedingungen überleben. Somit überleben sie beispielsweise auch in zuvor erhitzten Lebensmitteln. Unter günstigeren Bedingungen, beispielsweise unzureichender Kühlung von Speisen, können sie wieder auskeimen [16-19]. Durch Sporenbildung im Darm werden die *Clostridium perfringens*-Enterotoxine (CPE) gebildet, welche resistent gegen Enzymeinwirkung sind und schwere nekrotische Enteritis verursachen [16].

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* gehört zur Familie der *Pseudomonadaceae* und ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium. *P. aeruginosa* führen in Deutschland zu einer erhöhten Krankheitslast [20], jedoch muss in deutschem Trinkwasser nur auf sie getestet werden, sollte das Trinkwasser in verschlossene Behälter abgefüllt werden [1]. Die Bakterien sind eine der häufigsten Ursachen von im Krankenhaus erworbenen Lungenentzündungen, können aber bei Kontakt auch Wund- und Harnwegsinfekte und sogar Sepsis auslösen [6]. Nosokomial erworbene Lungenentzündungen und Sepsis

führen häufig zum Tod, was nicht zuletzt daran liegt, dass die Bakterien häufig multiresistente Erreger sind und viele Antibiotika nicht mehr wirken [21].

## 2.1.2 Legionellen

### 2.1.2.1 Morphologie und Vorkommen

Legionellen sind stäbchenförmige, gramnegative Bakterien mit monotricher Begeißelung und einer Länge von ca. 2 bis 5  $\mu\text{m}$  [22]. Sie kommen in geringer Konzentration in allen natürlichen und auch künstlich geschaffenen Süßwassersystemen, in Böden [23] und Biofilmen [24] vor. Sie vermehren sich bei Temperaturen zwischen 0 und 63 °C, ihr Temperaturoptimum findet sich jedoch zwischen 25 und 45 °C [22]. Freilebende Legionellen sind hierbei auf Grund der von ihnen benötigten Nährstoffe wie L-Cystein und Eisensalze [25] weniger häufig als ihr Vorkommen als intrazelluläre Parasiten von autotrophen Protozoen, beispielsweise in den Gattungen *Acanthamoeba* und *Naegleria*, durch welche sie ihren Energie- und Nährstoffbedarf decken [26, 27].

Bekannt wurden Legionellen durch einen Ausbruch an Lungenentzündungen im Juli 1976 [28, 29]. Bei der American Legion Convention, einem Kriegsveteranentreffen in Philadelphia, erkrankten 182 Personen an der sogenannten Legionärskrankheit, 29 Fälle waren letal [30]. Erst im Jahr 1978 konnte der Erreger des Ausbruches durch die Arbeitsgruppe um Joseph McDade durch Untersuchung und Isolierung des Erregers aus erkranktem Lungengewebe als *Legionella pneumophila* (*Legionella* aufgrund der erkrankten Legionäre, *pneumophila* aufgrund des Befalles der Lunge [28]) identifiziert werden [31, 32].

Es sind zum jetzigen Zeitpunkt etwa 57 verschiedene Legionellen-Arten und mehr als 70 Serogruppen bekannt, welche alle als potentiell humanpathogen eingestuft werden [22] und die sogenannte Legionellose auslösen. Als hochpathogene Spezies wird hier *L. pneumophila* eingestuft, da sie mit über 90 % der Ausbruchsfälle assoziiert wird [33]. Zudem tritt in über 80 % der Erkrankung Sg 1 dieser Spezies auf (s. Abbildung 1) [29]. Eine erhöhte Pathogenität geht des Weiteren von Legionellen aus, welche in Amöben leben [34-36]. Die Virulenz hat hier auch einen nicht minder hohen Stellenwert bei der Pathogenese und Vermehrung in Amöben, da virulente Stämme zu einer höheren Angriffs- und Vermehrungsrate in Amöben neigen [37]. In diesen können sich zum Teil mehrere Hundert Legionellen befinden. Die Legionellen greifen hierbei Rezeptoren an

der Oberfläche an und dringen über Phagozytose in die Amöben ein. In einer Vakuole vermehren sich die Legionellen auf ein Vielfaches und töten abschließend die Wirtszelle, um viele neue Wirte zu befallen [29].

Species	Serogroups	Culture-confirmed cases	
		No.	%
<i>Legionella pneumophila</i>	serogroup 1	3,020	82.9
	serogroup 2	19	0.5
	serogroup 3	101	2.8
	serogroup 4	13	0.4
	serogroup 5	19	0.5
	serogroup 6	42	1.2
	serogroup 7	9	0.2
	serogroup 8	8	0.2
	serogroup 9	5	0.1
	serogroup 10	19	0.5
	serogroup 11	3	0.1
	serogroup 12	1	<0.1
	serogroup 13	2	0.1
	serogroup 14	7	0.2
	serogroup mixed	4	0.1
	non-serogroup 1	7	0.2
serogroup unknown	232	6.4	
<i>L. anisa</i>	NA	2	0.1
<i>L. bozemanii</i>	NA	15	0.4
<i>L. cincinnatiensis</i>	NA	1	<0.1
<i>L. dumoffii</i>	NA	2	0.1
<i>L. longbeachae</i>	NA	35	1.0
<i>L. macaechernii</i>	NA	1	<0.1
<i>L. micdadei</i>	NA	12	0.3
<i>L. saintelensi</i>	NA	1	0.0
<i>L. other species</i>	NA	27	0.7
<i>L. species unknown</i>	NA	38	1.0
Total	NA	3,645	100

Abbildung 1: Berichtete kulturbestätigte Fälle von Legionärskrankheit und *L. pneumophila*-Isolaten nach Spezies und Serogruppen, Europäische Union / Europäischer Wirtschaftsraum, 2011 - 2015 (n = 3645) [38].

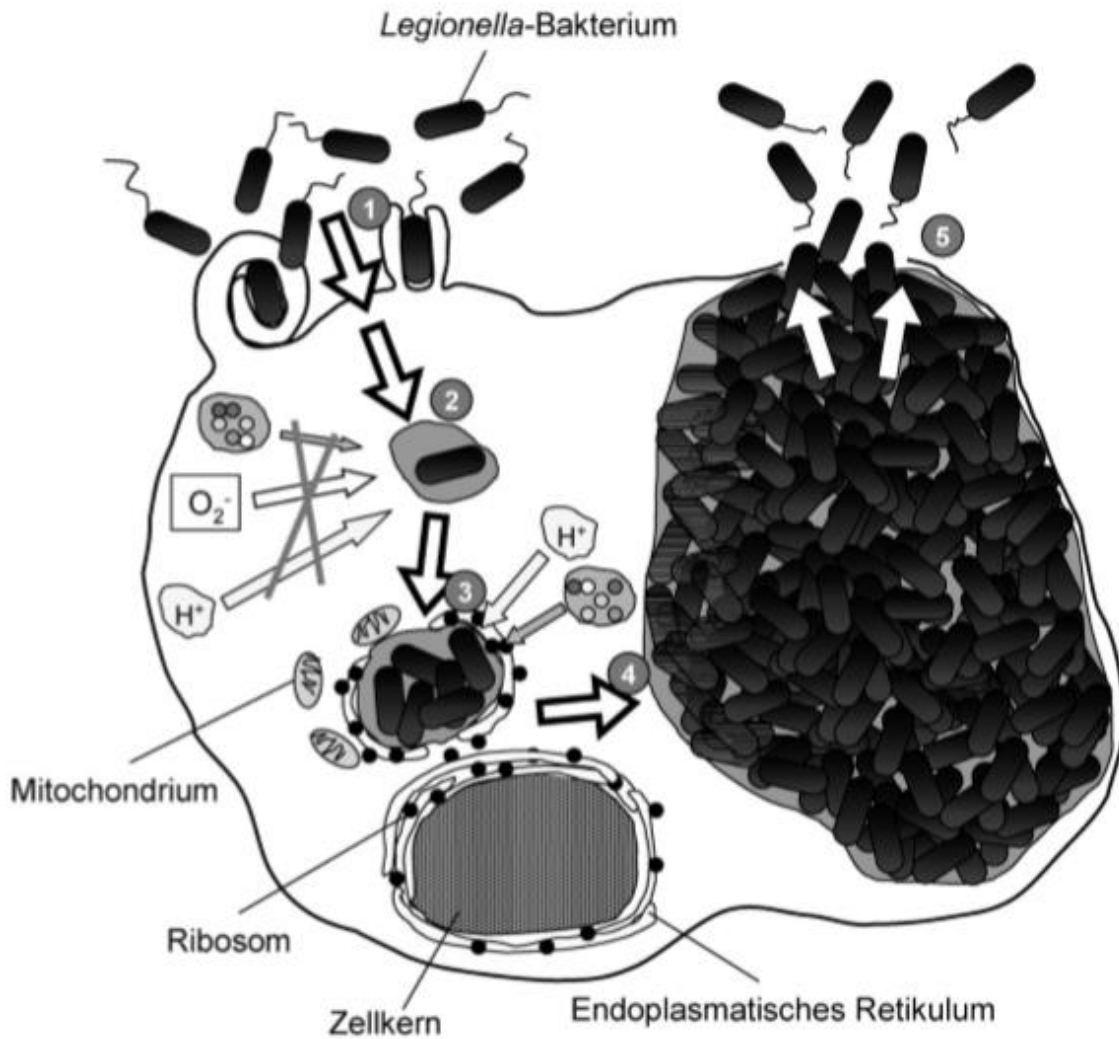
In den letzten Jahren wurden vor allem Verdunstungskühlanlagen und Kühltürme oft mit Legionellose-Ausbrüchen in Verbindung gebracht [39-42]. Potentielle Gefahr der Infektion mit pathogenen Legionellen besteht jedoch bei allen Einrichtungen, Gebäuden, Aufbauten oder Anlagen, welche Wasser potentiell vernebeln und somit feine Aerosole an ihre Umgebungsluft abgeben können. Hierzu zählen neben Kühltürmen auch Heiß- und Kaltwasser-Systeme, also normale Trinkwasserleitungen und auch Pools in Spas und Thermen, Springbrunnen, Vernebler oder Klimaanlage [28, 43]. Selbst Kompost oder Erde zählt zu Infektionsquellen, die Spezies

*L. longbeachae* wird häufig mit dem Vorkommen in Blumenerde assoziiert, und gilt beispielsweise in Australien als häufige Ausbruchsquelle bei Menschen mit Kontakt zu Erde, wie z.B. Gärtnern [44-46]. In Krankenhäusern sind Legionellen häufig Auslöser der sogenannten nosokomialen Legionellose und werden hier vermehrt durch Vernebler, Beatmungsgeräte und –schläuche, o.Ä. übertragen [28]. Des Weiteren können Legionellen in der Form *viable but nonculturable* (VBNC) vorkommen, einer Form ähnlich der Sporenbildung [47]. Diese stellen ein großes Problem dar, da sie lebensfähig und potentiell humanpathogen, jedoch auf Kultur beispielsweise nicht nachweisbar sind, da sie auf dieser nicht wachsen [47, 48]. In den VBNC-Status gehen Legionellen über, sobald sie stärkerem Stress ausgesetzt sind, z.B. bei Nährstoffknappheit, chemischer Desinfektion, UV-Licht oder Hitze, sie können jedoch unter den richtigen Umständen und Bedingungen wiederbelebt werden [49-51].

Legionellen gelten als äußerst widerstandsfähige Mikroorganismen. Eine effektive Vorbeugung der Legionellen-Vermehrung im Trinkwasser-System ist die thermische Desinfektion, also regelmäßige Erhitzung des Wasserreservoirs auf über 60 °C [52]. Eine weitere Variante ist die chemische Desinfektion, bei der oxidative Biozide [53], wie Chlor, und nicht-oxidative Biozide, wie 2,2-Dibrom-2-cyanacetamid, zur Verwendung kommen [52]. Des Weiteren testet beispielsweise die Firma Aqua Concept GmbH seit 2016 den Einsatz des, in Frankreich bereits zugelassenen, biologischen Biozides Biomeba der Firma Amoeba S.A. [54]. Hier wird dem Wasser eine bakteriophage Amöbe zugegeben, welche sich von im Wasser befindlichen Keime wie Legionellen, Pseudomonaden, etc., ernährt.

### 2.1.2.2 Pathogenese, Krankheitsbild und Therapie

Legionellen sind Auslöser der Legionellose. Die Infektion erfolgt in der Regel nach Inhalation pathogener Bioaerosole (kleiner als 5 µm) in die Lunge. Doch nicht in jedem Fall führt eine Inhalation der Pathogene zur Infektion. Wichtige Faktoren sind die Anzahl und auch Virulenzfaktoren der inhalierten Pathogene [37, 55] oder die Assoziation mit Amöben, welche mehrere Hundert Legionellen beinhalten können [56]. Sobald die Legionellen über Aerosol-Inhalation oder auch Aspiration (versehentliches Eintritt von Tröpfchen in die Lunge bei Schlucken von Wasser) in die Lunge aufgenommen wurden, befallen sie, ähnlich wie bei Amöben, die Makrophagen über Phagozytose. Der Infektionszyklus ist in Abbildung 2 dargestellt [56].



**Abbildung 2: Infektionszyklus von *L. pneumophila* im Makrophagen. Die Abbildung wurde dem Bundesgesundheitsblatt entnommen, Artikel „Pathogenese der Legionelleninfektion“ [56].**

Zur Aufnahme in die Makrophage werden von der Legionelle verschiedene Oberflächenproteine verwendet, wie z.B. das MOMP (*major outer membrane proteine*), das Hitzeschockprotein Hsp60 oder das mip-Protein (*major infectivity potentiator protein*) [55, 57]. Auch ein Komponenten-unabhängiges Eindringen über Phagozytose ist möglich (1) [58]. Innerhalb dieser Makrophagen verhindern die Legionellen ihr eigenes Abtöten durch die Makrophagen (*oxidative burst*), indem die Legionellen-Phagosomen über Ansäuerung mit Lysosomen verschmelzen (2). Diese lagern anschließend Wirtszellorganellen an und vermehren sich innerhalb des Phagosoms (3). Während dieses Prozesses finden über Ansäuerung weitere Verschmelzungen mit Lysosomen statt. Die Vermehrung der Legionellen im Phagosom hält an, bis Nährstoffe verbraucht sind und das Phagosom die Wirtszelle fast komplett ausfüllt (4). Die Bakterien gehen in diesem Stadium in ihre virulente Form über, in der sie flagelliert sind und zytotoxisch vorliegen. Nach Lyse des Phagosomes

und der Zellmembran der Wirtszelle können die freigesetzten Bakterien einen neuen Infektionszyklus starten (5) [59-62]. Über eine möglicherweise auftretende Übertragung von Mensch zu Mensch wurde nur einmal berichtet [63], die Legionellose gilt jedoch in der Praxis als nicht übertragbar.

Die Legionellose unterscheidet sich grundsätzlich in zwei verschiedenen Krankheitsverläufen mit unterschiedlichen Schweregraden. Die leichtere Form der Krankheit wird als Pontiac-Fieber bezeichnet [64]. Sie weist grippeähnliche Symptome auf, wird aber auf Grund des eher leichten Krankheitsverlaufes und des Abklingens nach wenigen Tagen meist nicht als solche erkannt, außer bei epidemischem Auftreten [65]. Die Legionärskrankheit, dem schwereren Fall der Legionellose, ist eine atypische Lungenentzündung mit unspezifischen Symptomen, wie beispielsweise Kopfschmerzen, hohem Fieber, trockenem Husten, Durchfall, Verwirrtheit oder auch Nierenversagen [66, 67]. Trotz steigendem Bewusstsein für diese Erkrankung wird die Legionärskrankheit häufig nicht oder nicht richtig diagnostiziert [22]. Für den notwendigen Nachweis werden Sputum, Bronchialsekret oder auch Urin der Patienten untersucht [29]. Jedoch zeigt die Lungenentzündung hier keine Reaktion auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika oder Aminoglykoside, die Behandlung erfolgt über eine Antibiotikatherapie mit Levofloxacin, Clarithromycin oder auch Erythromycin [68-70].

### 2.1.2.3 Epidemiologie

Legionellen sind Auslöser der Legionärskrankheit mit etwa 10 %-iger Letalitätsrate [22]. Am häufigsten sind sie als ein Pneumonie-Erreger im häuslichen und beruflichen Umfeld (ambulant erworben) zu finden. Legionellosen können aber auch im Krankenhaus-Bereich (nosokomial), in Pflegeeinrichtungen oder auf Reisen im In- und Ausland (reise-assoziiert) erworben werden. Die Verteilung ist in Abbildung 3 dargestellt. Legionellen sind auch immer wieder Auslöser größerer Ausbrüche [71]. Hauptauslöser der Krankheit in Europa ist die Spezies *L. pneumophila*, besonders Sg 1 und hier noch einmal separat häufig von Vertretern der Pontiac-Gruppe (z.B. Knoxville, Philadelphia oder Benidorm) [33, 72, 73]. Häufig betrachtete Infektionsquellen sind Verdunstungskühlanlagen [39], aber auch Whirlpools, Leitungssysteme zur Warmwasserverteilung, ö.Ä. [22]. Bekannte Beispiele von Ausbrüchen in Deutschland in den letzten Jahren sind Ulm im Januar 2010 mit 64 Erkrankten [74], Warstein im August/ September 2013 mit 159 Erkrankten [40] oder

auch ein Ausbruch in Bremen November/ Dezember 2015 und Februar/ März 2016 mit insgesamt 43 Erkrankten.

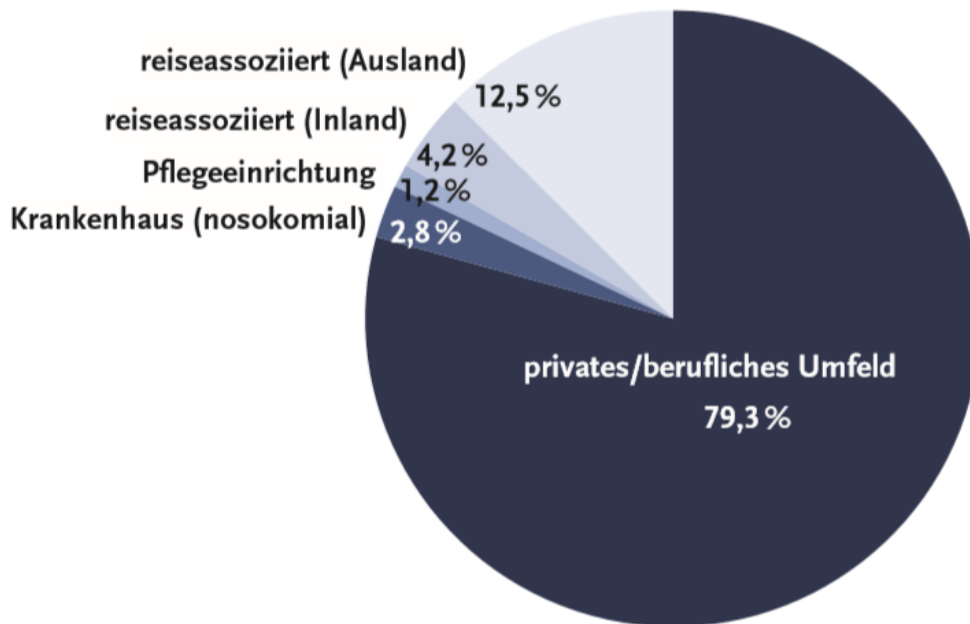


Abbildung 3: An das RKI übermittelte Fälle von Legionärskrankheit bei denen anhand der übermittelten Informationen ein Expositionsort zugeordnet werden konnte (n = 574 Erkrankungsfälle), Deutschland, 2013. Entnommen dem Epidemiologischen Bulletin des RKI [22].

Zur Risikogruppe einer Infektion gehören ältere Menschen (besonders bei weiteren Krankheiten, wie Diabetes o.Ä.), immunsupprimierte Personen oder chronisch lungenerkrankte Personen [39]. Doch auch hoher Alkohol- und Tabakkonsum erhöht das Risiko [28].

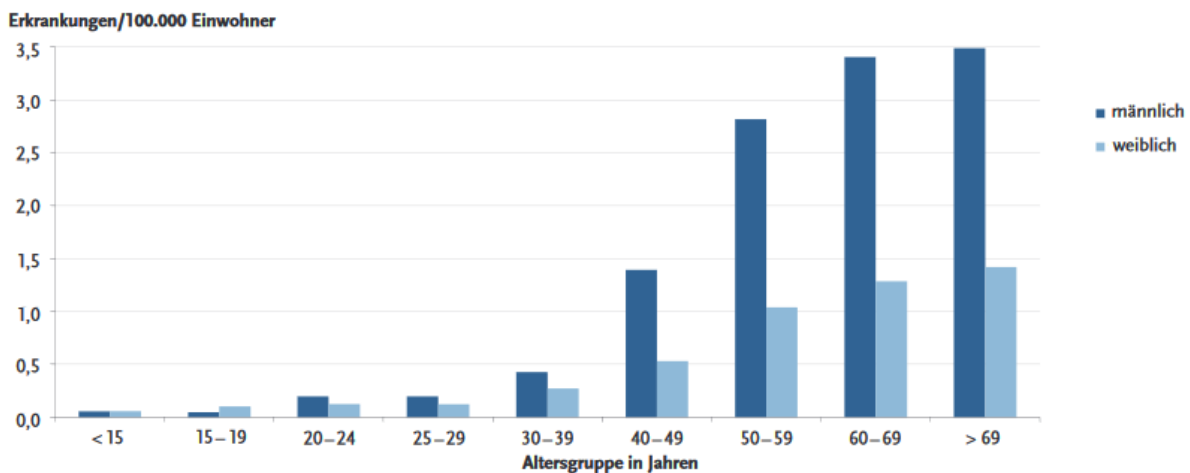
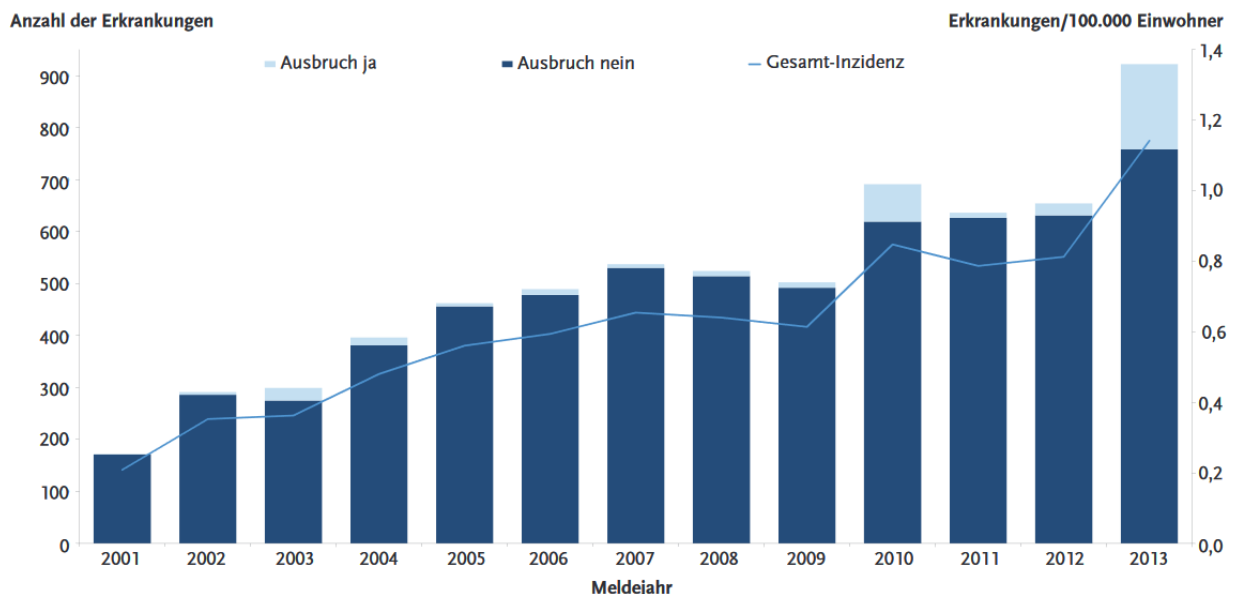


Abbildung 4: Verteilung der an das RKI übermittelten Legionärskrankheits-Fälle pro 100.000 Einwohner, unterteilt in Alter und Geschlecht im Jahr 2013 (n = 920) in Deutschland. Entnommen dem Epidemiologischen Bulletin des RKI [22].



Zudem sind Männer, besonders ab 40 Jahren, etwa dreifach häufiger betroffen als Frauen (s. Abbildung 4) [22, 73], die Ursache hierfür ist jedoch bisher ungeklärt. Kinder erkranken dagegen eher selten. Eine Häufung an Erkrankungen zeigt sich besonders in Sommer- und Herbstmonaten [22], da hier höhere Wassertemperaturen das Wachstum begünstigen.

In Deutschland besteht seit 2001 eine Meldepflicht bei einer diagnostizierten Legionellose-Erkrankung [22]. Die Zahl der gemeldeten Erkrankungen ist in den letzten Jahren stetig angestiegen (s. Abbildung 5). Dies liegt jedoch auch hauptsächlich am steigenden Bewusstsein gegenüber Legionellen und Legionellosen und des Weiteren auch an der steten Verbesserung der Diagnostik. Im Jahre 2013 wurden 922 Fälle (1,1 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern) an Legionellose gemeldet. Schätzungen zufolge liegt die Dunkelziffer der Erkrankungen jedoch um ein Vielfaches höher, die Legionellose ist aufgrund des Krankheitsbildes kaum von anderen Pneumonien zu unterscheiden und kann nur durch gezielte Diagnostik auf Legionellen erkannt werden. Daher bleiben viele Legionärskrankheiten unerkannt [22]. Hochschätzungen des CAPNETZ (Kompetenznetzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien) zufolge, gibt es in Deutschland jährlich zwischen 15.000 und 30.000 Legionellose-Fälle (18 bis 36 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) deutschlandweit, also eine Vielfach höhere Anzahl an Erkrankten. Sie würden somit ca. 4 % aller ambulant erworbenen Pneumonien auslösen [75].



**Abbildung 5: Häufigkeit und Anzahl der dem RKI gemeldeten Fälle von Legionärskrankheit in Deutschland von 2001 bis 2013, Ausbruchs-assozierte Fälle sind gesondert ausgewiesen in hellblau. Entnommen dem Epidemiologischen Bulletin des RKI [22].**

#### 2.1.2.4 Biofilme

Ein bekanntes Problem ist das Vorhandensein von Biofilmen in anthropogenen Süßwasserquellen, in denen sich Legionellen in Protozoen, wie beispielsweise Amöben vermehren und zu Legionellen-Ausbrüchen führen können [24, 76-78]. Biofilme bilden sich unter anderem an Grenzflächen von Wasseroberflächen und bestimmten Materialien, wie beispielsweise Kunststoffen, die häufig in der Sanitärtechnik verwendet werden [79, 80]. Die Ansiedlung wird zudem durch unzureichende Zirkulation, Stagnation des Wassers, Kalkablagerungen oder unzureichende Dekontamination zu großer Wasserreservoirs begünstigt, Kupfer hingegen hemmt die Anlagerung [79-81].

Die Menge der Legionellen in Biofilmen steht in direktem Zusammenhang mit der Menge an Amöben [82], wobei Legionellen sich auch in den Resten toter Amöben vermehren und überleben können [83]. Der Biofilm dient den Legionellen jedoch nicht nur zur Vermehrung, sie schützen sich zudem im Innern des Films vor äußeren Umwelteinflüssen und Bioziden, die zur Desinfektion und Dekontamination verwendet werden [84-88]. Auch gegen Temperaturen werden sie resistenter, wenn sie in Temperatur-toleranten Amöben wachsen [89].

In Sommer- und Herbstmonaten zeigt sich eine Häufung an Legionellose-Erkrankten [22]. Auch in Biofilmen wird in dieser Zeit gerade das Wachstum von *L. pneumophila* begünstigt, das Wachstum anderer Legionellen-Spezies wird in dieser Zeit dagegen inhibiert [90]. Das Vorhandensein von *L. pneumophila* inhibiert zudem anscheinend das Wachstum anderer Spezies durch Produktion eines Tensides (Protein TolC) [91]. Dieses inhibiert das Wachstum anderer Legionellen-Spezies, nicht aber anderer Bakterienpezies. Werden *L. pneumophila* Stressfaktoren, wie z.B. bei der Desinfektion ausgesetzt, so wechseln sie in den VBNC-Status [92-94].

## 2.2 Nachweisverfahren für Legionellen

Heutzutage gibt es eine Vielzahl an entwickelten Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen, die auf den unterschiedlichsten Prinzipien beruhen. Generell kann man die meisten Methoden z.B. in die drei Grundkategorien Kulturmethode, molekularbiologische und immunologische Methoden einteilen. Gängige Vor- und Nachteile sind in Tabelle 2 aufgeführt und werden im weiteren Verlauf ausführlich beschrieben.

**Tabelle 2: Vergleich der Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen.**

Methode	Pro	Contra
<b>Kulturbasiert</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gesetzlich vorgeschrieben</li> <li>• Grundlage nachfolgender Methoden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Anzucht von VBNC möglich</li> <li>• Anspruchsvoll/ schwer zu züchten</li> <li>• Zeitaufwendig</li> <li>• Überwachsen der Platte durch Begleitflora möglich</li> </ul>
<b>Immunologisch</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualitative Diagnostik</li> <li>• Screening-Methode</li> <li>• Schnell, sensitiv und spezifisch</li> <li>• Preisgünstig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Häufig nicht Gerätegebunden</li> </ul>
<b>Molekularbiologisch</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantitatives Monitoring</li> <li>• Schnell, sensitiv und spezifisch</li> <li>• Differenzierung <i>Legionella</i> spp. und <i>L. pneumophila</i></li> <li>• Lebend/tot-Differenzierung</li> <li>• Grundlage von Gutachten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benötigt zusätzliches Equipment</li> <li>• Kostenintensiv</li> <li>• Anspruchsvoll</li> <li>• Geschultes Personal notwendig</li> </ul>

Die **kulturbasierte Methode** ist auch heutzutage noch der Goldstandard im Nachweis von Legionellen. Nach wie vor ist der kulturelle Nachweis gesetzlich verpflichtend. Für viele Nachweismethoden ist die Kultur zudem die Grundlage der weiterführenden Methodik, wie beispielsweise ELISA, Maldi-TOF-MS oder Next-Generation Sequencing (NGS).

Die **immunologischen Nachweisverfahren** beruhen auf der Detektion von oder mittels AKs. Die AK-basierten Methoden dienen meist dem Screening, also dem schnellen Abgleich vieler Proben auf Vorhandensein eines Analyten in der Probe. Es handelt sich demnach um meist qualitative Verfahren. Ein großer Vorteil dieser Methoden ist die schnelle Durchführung, was gerade in der klinischen Diagnostik einen entscheidenden Vorteil bringt. Eine Quantifizierung ist meist schwierig, da der Arbeitsbereich von AK-basierten Methoden häufig keinen breiten Bereich abdeckt. Bei infizierten Patienten ist die Frage nach der Menge an Bakterien im Organismus jedoch unwichtig, da es hier um diagnostische Abklärung geht und einzig und allein die Art der Infektionsquelle von Interesse ist. AK-basierte Methoden sind zudem häufig günstig in der Durchführung, da hier kein zusätzliches Equipment benötigt wird.

**Molekularbiologische Nachweisverfahren** werden in der Regel für den quantitativen Nachweis von Bakterien in einer Probe eingesetzt. Bei den DNA-basierten Methoden

wird in Nukleinsäureamplifikationstests die Menge an genomischer DNA der Proben ermittelt. Im Falle der Legionellen kann hierbei häufig zwischen *Legionella* spp. und *L. pneumophila* differenziert werden, indem unterschiedliche Genbereiche amplifiziert werden. Durch die Behandlung mit DNA-interkalierenden Stoffen kann mit DNA-basierten Methoden zudem eine Lebend/tot-Differenzierung vorgenommen werden. Es können demnach die nicht mehr lebensfähigen Mikroorganismen direkt von den lebenden und den im VBNC-Status lebenden abgetrennt werden. Nachteilig wirken sich bei DNA-basierten Methoden die hohen Kosten aus, da viele der gängigen Nachweisverfahren teils teure Bioreagenzien enthalten und/ oder gerätegebunden sind und auf einer Plattform von geschultem Personal durchgeführt werden müssen.

Im weiteren Verlauf werden die gängigsten Methoden aller drei Bereiche im Detail erklärt.

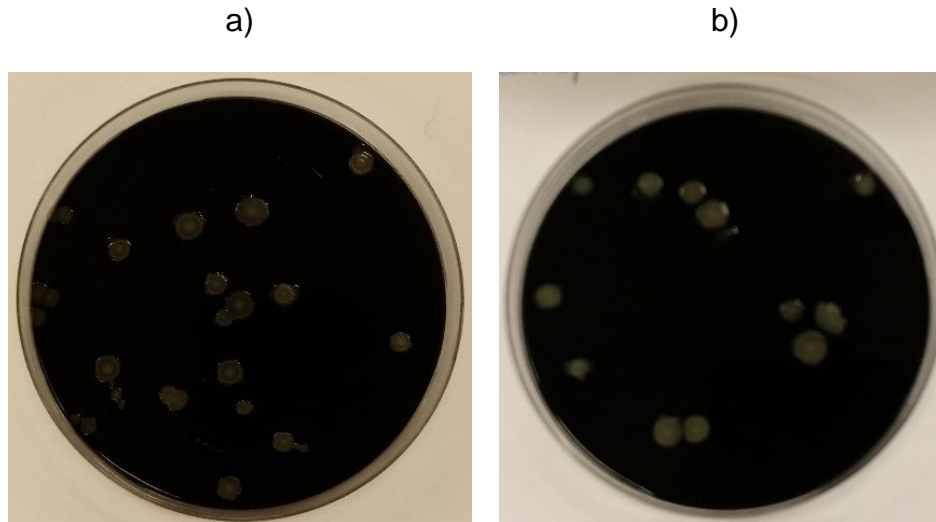
### 2.2.1 Kulturabhängige Nachweisverfahren

Für die Vielzahl verschiedener Mikroorganismen gibt es viele verschiedene Nährmedien, welche zur Detektion und Differenzierung der Mikroorganismen herangezogen werden können. Bakterien zeigen hier, abhängig von dem verwendeten Medium, charakteristische Wachstumsraten, Form, Farbe und eine Vielzahl weiterer Merkmale, an denen sie eindeutig bestimmt und unterschieden werden können.

So gibt es beispielsweise **Flüssigmedien**. Diese sind flüssige Kulturmedien, welche Nährstoffe, Energiequellen, essentielle Mineralien und Puffersubstanzen oder auch Vitamine enthalten, einen leicht alkalischen pH haben und somit den geeigneten Grundbedarf für Bakterienwachstum darstellen [95]. Diese dienen zur Anreicherung vieler Bakterienarten. Zur gezielten Anreicherung dienen hier die **selektiven Flüssignährmedien**. Diesen werden bestimmte Stoffe zugegeben, um bestimmte Bakterienarten gezielt am Wachstum zu hindern. So werden Antibiotika zugegeben, um antibiotikaresistente Keime zu kultivieren, die Zugabe von Polymyxin B hemmt das Wachstum gramnegativer Bakterien, Brillantgrün das Wachstum grampositiver Bakterien [95].

Eine weitere Variante stellen die **Festnährböden** [95] dar, welche durch Zugabe von Agar-Agar einen festen Zustand erreichen und zumeist in Petrischalen angelegt werden. Diese bieten den Vorteil, dass die kultivierten Bakterien voneinander zu unterscheiden sind. Somit lassen sich diese gut auszählen und die Anzahl der

Bakterien in der ursprünglichen Probe somit quantifizieren. Auch hier können verschiedene Inhaltsstoffe der Kultivierung verschiedener Bakterien nützen, so wird beispielsweise Blutagar zur Kultivierung von Streptokokken verwendet [96]. Und auch bei dieser Form der Kultivierung gibt es **selektive Festnährböden**, um gezielt einzelne Bakterienarten zu kultivieren.



**Abbildung 6: a) und b) Legionellenkulturen auf GVPC-Agar inkubiert.**

Auch Legionellen werden auf Selektivmedien kultiviert, beispielsweise BCYE-Nährböden (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) [97], angereichert mit L-Cystein, oder GVPC-Agar. Es wachsen weiße, glänzende, runde Kolonien (siehe Abbildung 6). In Flüssigmedien werden zur Anzucht beispielsweise YEB-Medium verwendet, welche in der Zusammensetzung dem BCYE-Agar sehr ähneln.

Die Kultur gilt beim Nachweis von Legionellen nach wie vor als Referenzmethode bzw. Goldstandard. Der Nachweis im Trinkwasser erfolgt laut der Deutschen Trinkwasserverordnung nach DIN EN ISO 11731-2:2008 (Filtrationsverfahren) und ISO 11731:1998 (Direktansatz) [1, 98]. Beim Direktansatz werden je 0,5 mL-Probe direkt in zwei Selektivmedien (GVCP- oder BCYE-Agar) ausplattiert. Beim Filtrationsverfahren werden üblicherweise 100 mL durch einen 45 µm-Filter filtriert, dieser zur Beseitigung der Begleitflora 5 min mit Säure behandelt und ebenfalls in eine Schale GVPC- oder BCYE-Agar gelegt. Die drei Platten werden bei  $36 \pm 2$  °C zehn Tage inkubiert und anschließend die Legionellen, welche als weiße Kolonien erscheinen, gezählt. Zur Bestätigung werden einzelne Kolonien auf cysteinfreiem Medium kultiviert. Ein Nichtwachsen bestätigt, dass es sich um Legionellen handelt.

Die Kultur dient bei Legionellen nicht nur für die Trinkwasseranalytik, auch Humanproben, wie beispielsweise Sputum, Bronchialaspirat, Bronchioalveolar-Lavage, Pleuraerguss oder Lungengewebe können als Grundlage der Kultivierung dienen [3, 97]. Meist ist die Kultivierung hier die Grundlage weiterer Nachweisverfahren. Allerdings liefert die Kulturmethode häufig falsch-negative oder zu niedrige Ergebnisse für künstliche Wassersysteme [99, 100], was auch bedingt ist durch vorhandene konkurrierende Mikroorganismen, welche das Wachstum hemmen [101]. Ein großes Problem hier sind die Legionellen im VBNC-Status, da sie zwar lebensfähig, aber nicht kultivierbar sind [47], wodurch im Ergebnis zu wenige lebensfähige und pathogene Legionellen erscheinen. Die resultierende Konzentration kann hierbei mehrere Log-Stufen unterhalb der durch andere Methoden ermittelten Konzentration liegen [47, 102].

Eine weitere kulturabhängige Quantifizierungsmethode ist das **Legiolert/Quant-Tray-System** der Firma IDEXX, welches für die Quantifizierung von *L. pneumophila* verwendet werden kann und ein spezielles Enzym nachweist [103]. Hier wird mit Hilfe des Modells der wahrscheinlichsten Zahl (*most probable number*, MPN) gearbeitet. Hierbei wird eine 100 mL-Probe unverdünnt verwendet, mit dem Reagenz vermischt und in das *Tray* gefüllt, in welchem es sich auf 96 Vertiefungen verteilt. Dieses wird mit Hilfe des „QuantiTray Sealer Plus“ versiegelt und 7 Tage bei  $39 \pm 0,5$  °C (Trinkwasser) oder  $37 \pm 0,5$  °C (Nicht-Trinkwasser) inkubiert. Anschließend werden die gefärbten Vertiefungen gezählt und mit Hilfe der MPN-Tabelle auf die Bakterienzahl in der Originalprobe rückgeschlossen. Mit dem 96-Kavitäten-Tray können Bakterien in Menge von 1 bis 2272 Bakterien pro 100 mL erfasst werden. Durch Halbautomatisierung und das Arbeiten ohne Aufkonzentrierung ergibt sich hier eine machbare Menge von 4 Proben pro Minute. Zudem wird keine Bestätigungskontrolle benötigt, anders als bei der Kultur.

Der Test ist für Trinkwasser- und auch Nicht-Trinkwasser-Proben geeignet. Nicht-Trinkwasser-Proben werden jedoch auf Grund möglicher anderer vorhandener Bakterien mit einem speziellen Reagenz vorbehandelt und nur 1 mL der Ausgangslösung in 100 mL steriler Flüssigkeit inkubiert und das Endergebnis für den Wert in 100 mL Ausgangsprobe mit 100 multipliziert. Dieser Test zeigt in Messungen mit Nicht-Trinkwasser eine gute Beständigkeit gegenüber Nicht-Legionellen-Spezies und ist auch bei höheren Konzentrationen noch sehr genau [104]. In Vergleichsmessungen zur Kulturmethode mit Trinkwasserproben konnten mittels Legiolert höhere

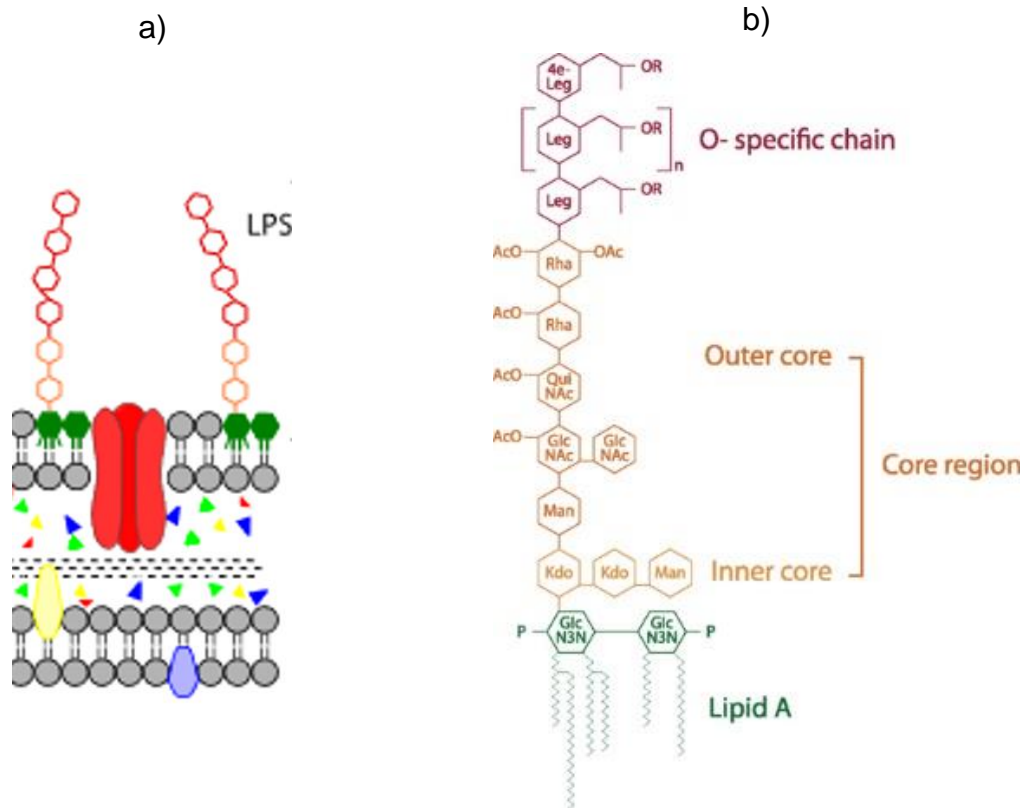
Konzentrationen vermessen werden und eine Spezifität von 96,4 % (2017) [105] bzw. 97,9 % (2018) [106] festgehalten werden. Auch in anderen Testreihen mit Prozesswasser aus Kühltürmen zeigte der Legiolert eine höhere Sensitivität und bessere Anwendbarkeit gegenüber der Kulturmethode und selektive Messung von *L. pneumophila* [107].

### 2.2.2 Immunologische Nachweisverfahren

Immunologische Nachweisverfahren sind eine häufig genutzte Art des Bakteriennachweises [108]. Wichtig ist hierbei die Antigen-Antikörper-Reaktion. Protagonist ist hier der AK, als humorale und zelluläre multifunktionelle Glykoproteine, welche in der Immunabwehr für die Abwehr von Mikroorganismen und Viren gebildet werden. Diese besitzen ein Paratop, welche eine Haftstelle für die Antigene darstellt und sich auf der variablen Domäne der AK befindet. Da diese sehr speziell auf das bindende Antigen angepasst ist, sind diese Reaktionen sehr selektiv und sensitiv. Der komplementäre Part auf der Oberfläche des Antigens ist die antigene Determinante (Epitop). Die Affinität, also Bindungsstärke zwischen AK und Antigen, beruht hier auf der Komplementarität von Epitop und Paratop. Die stärkste Bindung besteht bei homologen Antigenen, also den Original verwendeten Antigenen. Heterologe Antigene, also kreuzreagierende Antigene, haben hierbei eine geringere Affinität. Für immunologische Nachweisverfahren gibt es eine Vielzahl von Anwendungsgebieten, so spielen sie in der klinischen Diagnostik eine große Rolle, aber auch beispielsweise in der Wasseranalytik [109]. Durch immunologische Nachweisverfahren kann eine Vielzahl an Analyten detektiert werden, so können Bakterien über gebildete Metabolite, Proteine oder Polysaccharide erfasst werden [108]. Die Bakterien können aber auch selbst als Antigen wirken. Es gibt hierbei drei Grundarten der Nachweisverfahren. Agglutination und Präzipitation sind direkt nachweisbar, die Immunbindung wird nachträglich sichtbar gemacht [108]. Diese werden im Folgenden genauer erläutert.

Legionellen werden hier häufig als Antigen über spezifische Zellwandstrukturen detektiert, beispielsweise die Lipopolysaccharid-Struktur (LPS). Das LPS ist am äußeren Teil der Außenmembran der Bakterien zu lokalisieren (s. Abbildung 7 a) [110, 111]. Es hat eine einzigartige Struktur und ist daher geeignet in der Anwendung als Zielstruktur in Immunoassays. Des Weiteren ist es nicht nur an der Zellmembran zu finden, sondern auch das wichtigste immunodominante Antigen in Urinen, wodurch

nicht nur Messungen mit Wasserproben ermöglicht werden, sondern auch ein Nachweis in Patientenerinurinen erfolgen kann.



**Abbildung 7: a) Überblick des LPS an der Zellmembran in Legionellen. b) Chemische Struktur des *L. pneumophila*-LPS. Beide Abbildungen wurden einer Veröffentlichung von Shevchuk et al. 2011 entnommen [111].**

Das LPS unterteilt sich hierbei in drei relevante Abschnitte, wie in Abbildung 7 b zu erkennen [111]. Das Lipid A findet sich nahe der Membran, woran sich die Kernregion anschließt. Den äußeren Teil des LPS kennzeichnet die O-Antigen-Struktur [112]. Diese ist teilweise sehr unterschiedlich. Dies wurde auch im sogenannten „Dresden-Panel“ genutzt [113, 114]. Grundlage dieses Panels ist die Tatsache, dass die LPS-Struktur bei *L. pneumophila* eine Unterteilung in 15 Sg und die zehn verschiedenen Sg 1 Subgruppen erlaubt [113-115]. Dadurch können die verschiedenen Sg und Subgruppen durch 98 verschiedene monoklonale Antikörper (mAb) detektiert und auch differenziert werden [116]. Diese Zuteilung nennt man Serotypisierung, da eine Probe einem definierten Serotyp der Spezies *L. pneumophila* zugeordnet werden kann. Die Serotypisierung erlaubt auch den Vergleich verschiedener Proben untereinander. Das Dresden-Panel ist somit fester Bestandteil der epidemiologischen Typisierungsmethoden zum Vergleich klinischer und ökologischer Isolate, da es mit Wasser-, Kultur-, Umwelt oder auch Patientenproben durchgeführt werden kann. Es



geht dabei nicht um die direkte Zuordnung, sondern einen verhältnismäßig schnellen Ausschluss von Umweltproben bei nicht-Übereinstimmung mit dem Panel [114]. Häufig wird die Serotypisierung über einen indirekten ELISA durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.4, Enzymatische Immunsorptionsassay). Hierbei wird eine Mikrotiterplatte mit den Proben beschichtet und anschließend die verschiedenen monoklonalen Antikörper des Panels in jeweils verschiedene Kavitäten gegeben. Bei Vorhandensein der geeigneten LPS-Struktur in der Probe binden die AK und können anschließend kolorimetrisch bestimmt werden. So ergibt sich eine definierte Zusammensetzung, welche über das Dresden-Panel, dargestellt in Abbildung 8, einer Serogruppe zugewiesen werden kann.

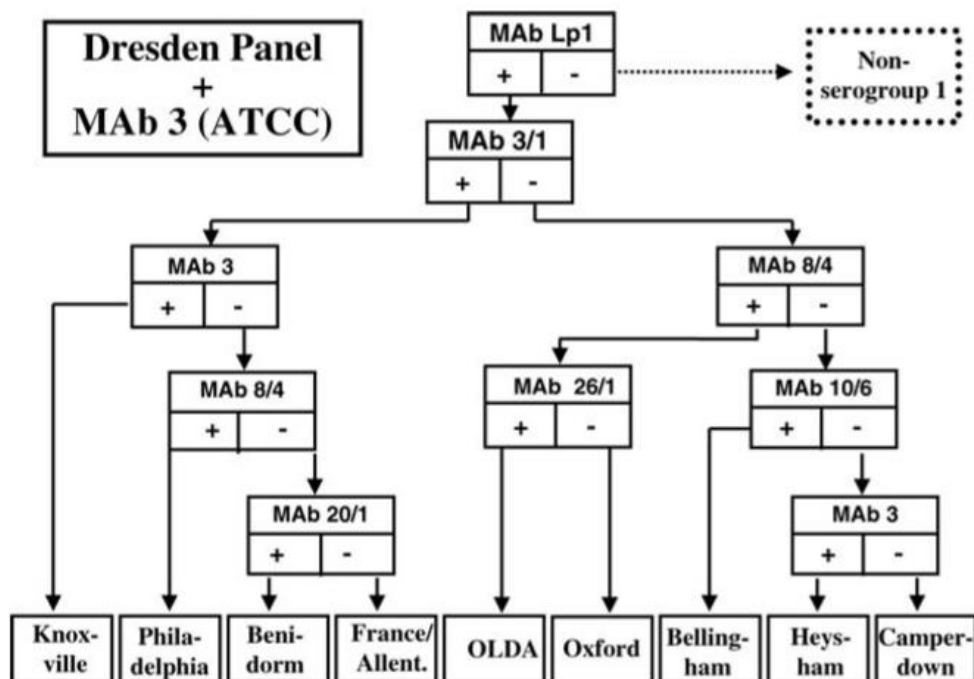


Abbildung 8: Flussdiagramm für die monoklonale Unterteilung der *L. pneumophila* Sg 1 mit dem Dresden Panel. Das Diagramm wurde der Publikation von Helbig et al. entnommen [113].

Das Flussdiagramm, wie hier abgebildet, erlaubt eine Unterteilung der einzelnen Subgruppen von Sg 1. Es wird dabei von oben nach unten gelesen. Durch den mAb Lp 1 wird beispielsweise eine Zuordnung zur Sg 1 im Generellen durchgeführt. Der mAb 3/1 zerteilt die Sg 1 in die pathogenere Pontiac-Gruppe (Subgruppe Knoxville, Philadelphia, Benidorm, Allentown und France) und die Non-Pontiac-Gruppe (Subgruppe OLDA, Oxford, Bellingham, Heysham und Camperdown). Ein positives Ergebnis bei mAb 3/1 und auch mAb 3 teilt die Probe in der Pontiac-Gruppe der Subgruppe Knoxville zu. So kann das Diagramm immer weiter bis zu den einzelnen

Subgruppen gelesen und aufgeteilt werden. Das Ergebnis der Serotypisierung muss daher immer als gesamtes Ergebnis betrachtet werden, als Zusammenspiel der verwendeten AK. Die selektive Betrachtung des Ergebnisses einzelner AK kann zum falschen Ergebnis führen, da beispielsweise mAb 3 ein Hinweis auf Subgruppe Knoxville oder auch Heysham sein kann. Der mAb 3/1 muss zusätzlich betrachtet werden, um eine Aussage über Zugehörigkeit zur Pontiac- oder Non-Pontiac-Gruppe treffen zu können, mAb Lp1 zur Einteilung zur Sg 1. Über weitere monoklonale AK, welche in Abbildung 8 nicht abgebildet sind, ist die Serotypisierung auf die weiteren Serogruppen der Spezies *L. pneumophila* erweiterbar.

### 2.2.2.1 Agglutination

Der Nachweis über Agglutination [108] kann direkt mit Bakterien oder auch über Blutzellen und antigenbeladene Latexpartikel im Immuns Serum durchgeführt werden. Bei der Agglutination kommt es zu einer Zusammenballung der Korpuskeln, wodurch die vorliegende Suspension an Stabilität einbüßt und Sedimentation einsetzt. Diese ist direkt erkennbar. Die Agglutinationstests weisen eine Vielzahl von Bakterien nach, so sind auch die in der Trinkwasserverordnung vorkommenden Mikroorganismen, wie *E. coli* oder *Pseudomonas aeruginosa*, schon seit langer Zeit über Latextests nachweisbar [117, 118]. Auch für den Nachweis von Legionellen gibt es hier z.B. den *Legionella*-Latex-Test der Firma Oxoid [119]. Dieser weist Legionellen in Kulturmedium nach, welches über Patientenproben gewonnen wurde. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe blauer Latexpartikel, welche sichtbare Klümpchen in Anwesenheit bestimmter Zellwandpartikel der Legionellen bilden. Mit Hilfe verschiedener Testreagenzien kann grundsätzlich zwischen *L. pneumophila* Sg 1 und Sg 2 – 14 unterschieden werden. Auch von Thermo Scientific™ gibt es ein ähnliches Kit, das DrySpot™ Latex-Agglutinationstest für den Nachweis von sowohl *L. pneumophila* Sg 1, Sg 2 -14 und *L. longbeachae* 1 und 2, *L. bozemanii* 1 und 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *T. micdadei* und *L. anisa* als Gruppe in Umwelt- und Patientenproben nach Kultur [120, 121]. Von der Firma Pro-Lab Diagnostics Inc. gibt es Agglutinationstests zur Analyse von *L. pneumophila* Sg 1 und Sg 2 – 14 aus Kulturproben [122].

Agglutinationstests weisen eine hohe Empfindlichkeit und große Vielseitigkeit auf, und sind aufgrund der einfachen Anwendung und geringen Kosten sehr beliebt, liefern meist jedoch nur einen qualitativen Nachweis.

### 2.2.2.2 Präzipitation

Bei der Präzipitation [108] werden lösliches Antigen und der AK zusammengefügt, was zur Trübung und schließlich Sedimentation durch Verlust der Löslichkeit des Antigen-Antikörper-Komplexes führt. Die Sedimentation ist ähnlich der Agglutination, jedoch sind hier beide Komponenten zu Beginn löslich und es sind mindestens drei antigene Determinanten für die Präzipitation zur Sedimentation nötig. Eine bekannte Variante der Präzipitation ist die **eindimensionale Immundiffusion nach Oudin** (Ringtest). Durch Zufügen von Agarosegel in die Antikörperlösung präzipitiert der Komplex nach Zugabe der Antigenlösung in einer definierten Region, deren Größe eine quantitative Auswertung ermöglicht. Häufiger wird die **Immundiffusion nach Ouchterlony** verwendet, welche ein- und zweidimensional durchführbar ist. Hier wird nicht im Röhrchen, sondern auf einer leeren Agarosegelplatte gearbeitet. In zwei Stanzlöcher werden Antikörper- und Antigenlösung getrennt voneinander vorgelegt und diffundieren im Gel aufeinander zu bis zur Bildung einer Grenzschicht. Fügt man ein drittes Stanzloch und eine weitere Lösung hinzu wird der Test zweidimensional und erlaubt beispielsweise den Abgleich verschiedener Antigene auf Identität und Nicht-Identität. Diese schnelle und präzise Technik ist sehr beliebt zum Vergleich und der Identifikation von Proteinen und Toxinen [123], wird aber mehr und mehr von Techniken abgelöst, die eine Automatisierung erlauben [124]. Auch für Legionellen gibt es hier Anwendungsmöglichkeiten, welche die qualitative Unterscheidung diverser Legionellenspezies und Serogruppen erlauben [125-127], die Unterscheidung von Legionellen und anderen Spezies [128] bzw. antigene Beziehungen zwischen ihnen [129].

### 2.2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie [130, 131] gehört zu den optischen Messverfahren, bei der Zellen häufig mit DNA-interkalierenden oder Antikörpergekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffen angefärbt werden. Die Suspension der Kultur wird in einen Hüllstrom geleitet, was zu einer Verjüngung des Stromes bis zur Vereinzelung der Zellen führt. Dadurch kann ein Strom einzelner Zellen durch die Messzelle geleitet werden, welche in der Regel aus einer Quarzglass-Durchflussküvette besteht. Um die Stabilität zu gewährleisten ist der Durchflusskanal sehr fein gehalten, so dass einzelne Zellen präzise im Messbereich analysiert werden können. Die Proben werden mittels Anregung der Fluorophore über einen monochromatischen Laserstrahl analysiert,

wobei Emission oder Streuung erfasst und mit einem Photomultiplier ausgelesen werden. Die fluoreszenzbasierte Analyse von Zellen (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) dient der Quantifizierung, der Betrachtung der Heterogenität der Probe und Lebend/tot-Differenzierung, zudem können metabolische Aktivitäten oder Membran-Aktivitäten analysiert werden [132-134].

Zum Nachweis von Legionellen wurden auch hier bereits Fluoreszenz-markierte AK [135, 136] für die Analyse von *Legionella* spp. in Umweltproben, wie Prozesswasser aus Kühltürmen und Leitungswasser, verwendet [136]. Von Fuchslin et al. wurde ein Nachweis von *L. pneumophila* etabliert, welcher eine zweistufige Anreicherung über Filtration (Porengröße 0,45 µm) und immunomagnetische Separation integriert und mit FITC und Alexa-konjugierten AKs in einer Doppelfärbung durchgeführt wird [137]. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 500 Zellen pro Liter innerhalb von 180 min. Dasselbe Verfahren der zweistufigen Anreicherung und Doppelfärbung wird auch bei Keserue et al. zum Nachweis von Legionellen in Leitungswasserproben durchgeführt [138]. Der Prozess dauert hier 120 min, die AK detekieren *L. pneumophila* Sg 1 – 12 mit einer Nachweisgrenze von 50 Zellen pro Liter für die Gesamtmenge an *L. pneumophila* (lebend und membrangeschädigt) und 15 Zellen pro Liter für lebende *L. pneumophila*. Von der Firma rqmicro gibt es hier kommerziell erhältliche Kits zur Detektion lebensfähiger *L. pneumophila* [139]. Das Kit ist für wässrige Lösungen konzipiert und integriert eine Aufkonzentrierung über immunomagnetische Separation. Anwendbar ist es für *L. pneumophila*, *L. pneumophila* Sg 1, Sg 2 – 15 und Sg 1 – 14 in Trink- und Prozesswasser, mit einer Nachweisgrenze von etwa 20 bis 50 Zellen pro Liter in unter 2 h. Das Kit kann auch für den kulturellen Nachweis verwendet werden. In dieser Doktorarbeit wird zur Quantifizierung von kultivierten *L. pneumophila* mit dem kommerziell erhältlichen CyFlow Cube 6 der Firma Sysmex und dem Farbstoff SYTO9 gearbeitet [140].

#### 2.2.2.4 Immunbindung

Bei der Immunbindung [108] ist einer der Partner einer Antikörper-Antigen-Reaktion immobilisiert, es findet eine Bindung an einer Oberfläche statt. Die Immobilisierung erfolgt hierbei durch Adsorption oder kovalente Anbindung an unlöslichen Trägern oder Plastikoberflächen. Da eine normale Immunbindung nicht für das Auge sichtbar ist, müssen die Immunbindungen hier zum Nachweis durch amplifizierende Systeme sichtbar gemacht werden. Mittlerweile gibt es hier eine Vielzahl an Systemen, wie

beispielsweise Lumineszenz, Fluoreszenz, Radioaktivität, Reduktion von Silbersalzen oder enzymatische Farbreaktionen. Die Immunbindung ist auch heute aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Variabilität noch äußerst beliebt. Im Folgenden werden gängige Methoden näher erläutert.

### **Immunochemographischer Assay**

Die Immunochemographischen Assays (ICT), auch bekannt als *Lateral Flow Tests*, sind heute eine gängige Methode [141, 142]. Das Testprinzip beruht hier auf einem Teststäbchen, auf welchem zumeist AK immobilisiert werden. Auf das Stäbchen wird die zu analysierende Probe, häufig Urin, aufgetragen. Durch Zugabe eines Laufmittels bewegt sich der Analyt über das Teststäbchen. Im lateralen Fluss trifft das Antigen auf AK, welche mit kolloidalem Gold markiert sind und formt den Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser wandert weiter in einen Kapillarbereich, in dem Detektionsantikörper immobilisiert sind und binden wiederum an diesen. Durch diese Anbindung kommt es zur Anreicherung und einer sichtbaren Färbung der Testlinie durch die Goldmarkierung. Ungebundener, markierter AK wandert weiter zu einem zweiten Kapillarbereich. Hier binden sie an einen Fängerantikörper, wodurch hier erneut eine Anreicherung stattfindet, welche die sogenannte Kontrolllinie bildet. Für den Antigennachweis für Legionellen in Urin gibt es mittlerweile viele kommerziell erhältliche Testkits. Diese Tests dauern nur ca. 15 min und werden häufig für eine schnelle erste Abklärung in der klinischen Diagnostik verwendet, da das LPS schon nach ein bis drei Tagen nach den ersten Symptomen nachweisbar ist und sich auch noch viele Wochen bis Monate im Urin finden lässt [39, 143]. Kommerziell erhältliche Testkits für Legionellen gibt es die Folgenden:

- BinaxNOW™ *Legionella* Harnantigen-Test von Abbott [144]
- *Legionella* V-Test von Coris BioConcept [145]
- BIONEXIA® *Legionella* von bioMérieux [146]
- Xpect *Legionella* Test von Oxoid [147, 148]
- Uni-Gold *Legionella* Urinary Antigen PLUS von Trinity Biotech [149]
- Immunocatch *Legionella* Sg 1 von EIKEN [150]

All diese Tests geben jedoch lediglich eine rein qualitative Aussage und detektieren häufig nur Sg 1 von *L. pneumophila*. Ausnahme ist hier der Test von Oxoid, welcher Sg 1 und 6 detektiert [147]. Bemängelt wird bei den Tests zudem häufig die geringe Sensitivität und mögliche falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse [151-157].

Auch für Wasserproben sind diese kommerziell erhältlich, so ist beispielsweise das *Legionella Industrial Test Kit* von Lovibond ein Schnellmesstest für *L. pneumophila* Sg 1, der eine zusätzliche Aufkonzentrierung durch Hohlfaser-Filtrationsmodule beinhaltet und einen Nachweis innerhalb von 25 min mit einer Nachweisgrenze von 105 KBE L<sup>-1</sup> liefert [158]. Auch von der Firma Zeller gibt es das Produkt hydrosense für Wasserproben aus Kühltürmen, Spülen, Duschen, u.A. mit vorgeschalteter Aufkonzentrierung, bei dem in 25 min eine ungefähre Quantifizierung von *L. pneumophila* Sg 1 in Form eines Gefahrenindex getroffen werden kann, je nach Kit liegt der LOD bei 10 bis 100 KBE mL<sup>-1</sup> [159].

### Immunfluoreszenz

Bei der Methode der Immunfluoreszenz (IF) [108, 160] wird ein Antigen mit Hilfe eines fluoreszenz-markierten AKs nachgewiesen. Als fluoreszierenden Farbstoff verwendet man hier beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Das zu untersuchende Antigen befindet sich hierbei auf einer Oberfläche. Bei der direkten IF wird der markierte AK direkt auf das Antigen gegeben, bei der indirekten IF wird zuerst ein primärer, unmarkierter, spezifischer AK zugegeben, anschließend ein sekundärer, markierter AK. Durch Anregung mit z.B. im Falle von FITC blauem Licht, wird grünes Licht emittiert und kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

Die Methode ist vielseitig nutzbar und kann für den Nachweis von Legionellen in Patientenproben (z.B. respiratorischen Proben) und auch Trinkwasser verwendet werden [3]. Es gibt hier Kits für die direkte IF zur Detektion von Sg 1. Zudem gibt es Kits für die Detektion von Sg 1 – 6, diese werden aufgrund geringer Spezifität allerdings seltener angewendet [97]. Die Anwendung des Dresden-Panels findet über indirekte IF statt und erlaubt eine genauere Typisierung von Sg 1 [114, 161]. Die IF wird beispielsweise auch mit der Festphasen-Zytometrie (*solid phase cytometry*, SPC) zur Detektion gekoppelt. Hierbei werden Proben durch eine Membran filtriert und über den IF-Assay anschließend gefärbt [102]. Die gefärbten lebensfähigen Organismen werden im Zytometer mit Hilfe des Lasers detektiert. Bei Aurell et al. [162] werden *L. pneumophila* Sg 1 und Sg 2 – 6, 8 – 10 und 12 – 15 in Warmwasser- und Leitungswasserproben mittel IF und anschließender SPC innerhalb von 3 – 4 h quantifiziert. Ein neues System zum immunologischen Nachweis von *L. pneumophila* in Wasserproben, welches eine Filtration inkludiert, gibt es von Párraga-Niño et al.

[163]. Hier wird die Probe über eine Nitrocellulosescheibe in einer Kartusche filtriert, um die Legionellen zu fangen. Diese werden auf dem Filter anschließend mit spezifischen AKs inkubiert, gewaschen und nach Färbung spektroskopisch nachgewiesen.

Von der Firma Quidel gibt es den Sofia *Legionella* FIA zur qualitativen Bestimmung von Sg 1 in Urinproben innerhalb von 15 min, ausgelesen wird das System über das zugehörige Sofia Analyzer System [164-166]. Die Nachweisgrenze wird hier für die Pontiac-Gruppe am Beispiel Knoxville zu  $2,3 \times 10^3$  KBE mL<sup>-1</sup>, für die Non-Pontiac-Gruppe am Beispiel Camperdown zu  $8,4 \times 10^4$  KBE mL<sup>-1</sup> angegeben. Bio-Rad Laboratories bietet das MonoFluo *Legionella* Färbe-Kit, welches für IF-Assays eine gebrauchsfertige Lösung zur Detektion von *L. pneumophila* bietet [167]. Von der Firma Pro-Lab Diagnostics gibt es die *Legionella* Direct Fluorescent Antibody Test Kits zur qualitativen Analyse von *L. pneumophila* Sg 1 und Sg 2 – 14 aus Kulturoisolen klinischer Proben mit FITC-konjugierten AKs [168].

### Enzymatische Immunsorptionsassay

Enzymatische Immunoassays (EIA) oder auch enzymgekoppelte Immunsorptionsassay (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) sind eine Weiterentwicklung des Radioimmunoassays (RIA) und wurden von zwei Arbeitsgruppen zeitgleich entwickelt, Engvall et al. [169] und Van Weemen et al. [170]. Man unterscheidet dabei prinzipiell zwischen vier ELISA-Varianten, dem direkten und indirekten ELISA, dem Sandwich-ELISA und dem kompetitiven ELISA [171]. Ein ELISA untergliedert sich immer in ähnliche Schritte. So wird zuerst die Mikrotiterplatte mit Antigen beschichtet und die Platte im Anschluss geblockt, um unspezifische Anlagerung zu verhindern. Ein (primärer) AK wird zugegeben, der das Antigen bindet. Je nach Assay-Art wird zudem ein sekundärer, enzym-markierter AK zugegeben. Zuletzt wird ein farbloses Reagenz zugefügt, welches durch Anwesenheit des Enzymes gespalten wird und eine Farbreaktion induziert. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu erreichen, wird diese Reaktion nach einer definierten Zeit abgebrochen und die optische Dichte gemessen. Eine Quantifizierung der Probe ist mit vorangegangener Kalibration möglich.

Beim direkten ELISA [172, 173] wird das Antigen direkt auf der Platte aufgetragen. Ein markierter AK wird zugegeben und die enzymatische Farbreaktion kann direkt stattfinden. Aufgrund der wenigen benötigten Schritte ist diese ELISA-Variante sehr

schnell, allerdings muss der spezifische, direkt bindende AK hierbei markiert werden. Beim indirekten ELISA [172, 174] wird ein Schritt mehr benötigt. Der an das Antigen bindende spezifische, primäre AK ist hierbei nicht markiert. Zur Detektion wird ein sekundärer, markierter AK zugegeben. Vorteil hier gegenüber dem direkten ELISA ist, dass auch kostengünstigere, polyklonale AK als sekundäre AK verwendet werden können und bei Anbindung mehrerer sekundärer AK eine leichte Signalverstärkung erreicht werden kann [171].

Beim Sandwich-ELISA [175] werden Fängerantikörper auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Antigene in der zu analysierenden Probe binden an den Fängerantikörper und werden durch einen primären, unmarkierten AK im Sandwich gebunden. Für die Detektion wird zudem ein sekundärer, Enzym-markierter AK zugegeben, welcher an den primären, gebundenen AK bindet.

Beim kompetitiven ELISA [171] wird der AK auf der Oberfläche aufgebracht. Das zu analysierende Antigen wird mit einem primären AK inkubiert, dieser Mischung wird ein zweites, markiertes Antigenkonjugat zugegeben. Dieses konkurriert sozusagen mit dem Antigen um den AK. Je nach Menge des Analyten in der Probe variiert demnach das resultierende Signal, bei großer Menge Analyt in der Probe ist das Farbsignal niedrig, da wenig markiertes Konjugat gebunden hat. Bei niedriger Analytmenge ist das Farbsignal aufgrund hoher Konjugatmenge hoch, das Signal ist indirekt zur Analytmenge. Möglich ist hier zudem die Variante eines indirekt kompetitiven ELISAs, bei dem das zu analysierende Antigen auf der Oberfläche immobilisiert wird. Zur Detektion wird ein primärer AK mit der zu analysierenden Probe inkubiert, bevor ein zweiter, markierter Detektionsantikörper hinzugegeben wird. Auch hier ist das resultierende Signal umgekehrt proportional zur enthaltenen Analytmenge.

Bei der Detektion von Legionellen bietet der ELISA in allen Variationen vielfältige Möglichkeiten, da sowohl LPS im Urin [175], als auch das ganze Bakterium in verschiedensten Proben, wie z.B. Wasserproben [176] oder klinischen Isolaten, nachgewiesen werden kann. Auch das Dresden-Panel findet mit dem indirekten ELISA hier direkte Verwendung, z.B. in der Analytik von Urinen oder auch klinischen Isolaten [113, 114]. Auch hier gibt es kommerziell erhältliche Kits, wie beispielsweise der Binax™ Legionella-Harnantigen-EIA von Abbott für die qualitative Bestimmung von *L. pneumophila* Sg 1 in Urinproben [177]. Ein weiterer kommerziell erhältlicher Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von *L. pneumophila* in Urinproben ist



der RIDASCREEN *Legionella* von der Firma R-Biopharm AG. Der LOD liegt hier bei  $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$  [178]. Auch der Legipid® Legionellen-Schnelltest von EWK Kühltürme, entwickelt von der Firma Biótica Bioquímica Analítica S.L., dient mit integrierter Filtration der Quantifizierung lebensfähiger *Legionella* spp. in 1 L-Kühlwasserproben innerhalb 1 h [179, 180]. Die kolorimetrische Bestimmung kann mittels Photometer der Firma Primelab durchgeführt werden, der Nachweis findet hier in einem Bereich von 60 bis  $10^6 \text{ KBE L}^{-1}$  statt [181].

### 2.2.2.5 Mikrofluidische Immunosensoren

Immunosensoren sind eine Form der Biosensoren, die, ähnlich dem Immunoassay, eine Antikörper-Antigen-Reaktion detektieren. Jedoch findet die Reaktion hier auf der Oberfläche statt, was bedeutet, dass entweder AK oder Antigen fest auf einer Transducer-Oberfläche immobilisiert sind. Als Träger dienen unterschiedlichste Oberflächen, wie Glas oder Gold und auch Polymere, welche aufgrund der Kosten und einfachen Handhabung immer beliebter werden [182, 183]. Bei der Wahl der Oberfläche und auch der Immobilisierung ist es wichtig, dass eine unspezifische Bindung verhindert wird [182, 183]. Die Einteilung geschieht oft über das Detektionsprinzip. So gibt es markierungsfreie Immunosensoren, wie bei der Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR), und auch markierte Systeme, welche z.B. über Fluoreszenz oder auch CL detektiert werden [184]. Im weiteren Verlauf werden SPR und CL-Systeme (hier CL-SMIA) näher erläutert.

### Oberflächenplasmonenresonanz

Bei den Oberflächenplasmonenresonanz-Biosensoren, einer markierungsfreien Detektionsmethode, handelt es sich um optische Sensoren. Hierbei werden beispielsweise AK auf einem Biosensorchip immobilisiert, welcher aus einem Glaschip besteht, beschichtet mit einer Metalloberfläche, meist einer Goldoberfläche [185]. SPR wird dabei durch polarisiertes Licht erzeugt. Wenn dieses auf eine elektrisch leitende Oberfläche an der Schnittstelle zweier Medien trifft, werden Oberflächenplasmonen angeregt [186]. Abhängig von den Oberflächenplasmonen ändert sich je nach Winkel des eingestrahlteten Lichtes die Reflektivität des totalreflektierten Lichtes, welche im Resonanzwinkel ein Minimum erreicht. Das Minimum ist hierbei abhängig vom Brechungsindex des Analyten. Zur Analyse wird eine Probe im Durchfluss an den immobilisierten AK vorbeigeleitet, wodurch die Antigene in der Probe an den AK

anbinden können. Durch die Anbindung der Antigene ändert sich der Brechungsindex an der Oberfläche und somit der Resonanzwinkel [187] des totalreflektierten Lichtes, was am Detektor, z.B. Diodenarray-Detektor, gemessen wird. Die SPR ist eine sehr sensitive Methode, die auch quantitative Analysen ermöglicht. Ein bekanntes Gerät in der SPR-Analyse ist das Biacore®, welches die Echtzeiterfassung biomolekularer Wechselwirkungen erlaubt [185].

In der Analyse von Legionellen gibt es hier, beispielsweise durch Enrico et al. beschrieben, einen kostengünstigen und transportablen Biosensor für die Analyse wässriger Proben [188]. Für die Echtzeit-Analyse sind hier die AK an der Oberfläche zur Anbindung der Analyten, hier *L. pneumophila*, immobilisiert. Oh et al. beschreibt, dass eine Protein G-Schicht auf der Goldschicht aufgebracht ist, an welche AK anbinden können. Während der Analyse bindet das Antigen. Die Nachweisgrenze der Detektion von *L. pneumophila* liegt hier bei  $10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  [189]. Bei Lin et al. wird mit einer geschliffener Glasfaser gearbeitet, welche mit Gold beschichtet ist [190]. Auf dieser bindet 11-Mercaptoundecansäure, welche wiederum mit EDC/NHS aktiviert wird, um AK gegen das Antigen von *L. pneumophila* zu binden. Dieses wird mit LED- und Halogenlichtquellen-Sensorsystem detektiert mit einem LOD von  $10^1$  KBE  $\text{mL}^{-1}$ .

### Andere Biosensoren

Bei Bae et al. wird über bildgebende Ellipsometrie detektiert und das Verfahren zusätzlich über SPR bestätigt [191]. Es werden sukzessiv 11-Mercaptoundecansäure, Protein G und ein AK gegen *L. pneumophila*-Antigene auf einer Goldoberfläche aufgebracht (LOD:  $10^3$  KBE  $\text{mL}^{-1}$ ).

Bei Park et al. wird für die Durchführung des Immunosensors eine Goldelektrode mit einer Zinkoxid-Nanorod-Matrix überzogen und mit einem primären und sekundären AK ein Sandwich-ELISA durchgeführt, der über zyklische Voltametrie ausgewertet wird [192].

Ein Einweg-Immunochip-System wurde von Li et al. für das Screening von *L. pneumophila* entwickelt [193]. Hierbei wurden auf einer Goldoberfläche fluorophor-markierte AK gegen *L. pneumophila* immobilisiert und die Anbindung der Bakterien über elektrochemische Impedanzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

## **Mikroarray-Technologie**

Unter Mikroarrays versteht man in der Regel planare Träger, wie beispielsweise einen Glas-Objektträger. Auf den Mikroarrays sind spezifische Biomoleküle in regelmäßigen Zeilen und Spalten immobilisiert. Die Variation und Bandbreite der Rezeptormoleküle ist sehr vielfältig. So können z.B. AK, Antigene, rekombinante Antigene, Haptene oder auch RNA oder DNA immobilisiert werden, wobei AK und DNA gehäuft verwendet werden [194]. Durch die Immobilisierung an definierten Spots auf der Oberfläche können hier Multiplex-Analysen mit sehr geringem Aufwand durchgeführt werden [194, 195]. Dies bedeutet, dass mit nur einer Messung mehrere Analyten simultan aus einer Probe separiert, detektiert und auch, je nach Assay, quantifiziert werden können. Protein-Mikroarrays dienen häufig dem Hochdurchsatz, es werden dabei (halb-) automatisiert viele Proben in geringer Zeit analysiert [196, 197]. Dabei kann es sich um Multianalyt-Screenings handeln, bei denen positive und negative Ergebnisse überhalb eines Schwellwertes bestimmt werden. Es gibt aber auch quantitative immunoanalytische Protein-Mikroarrays [198].

Die Detektion bei Mikroarray-Messungen erfolgt in der Regel über CL, Fluoreszenz, elektrochemisch oder auch markierungsfrei [194, 199, 200]. Bei der CL, welche auch in dieser Doktorarbeit zur Detektion verwendet wird, wird der Effekt einer chemischen Reaktion genutzt. Hierbei wird durch einen Katalysator wie der Meerrettich-Peroxidase eine Reaktion verursacht, z.B. von Luminol und Wasserstoffperoxid, die Licht bei 425 nm emittiert. Die CL-Reaktion kann punktuell eingesetzt werden, dient aber lediglich zur Endpunkt-Messung, da gerade auf durchflussbasierten Mikroarrays, die Reagenzien vom Chip gespült werden [194]. Im Gegensatz zur Fluoreszenz ist hier keine separate physikalische Anregung (z.B. Laser) notwendig, da die Reaktion in Anwesenheit des geeigneten Katalysators durchgeführt wird. Hierdurch lassen sich sehr kompakte und günstige Systeme für die Point-of-Care-Diagnostik (POC) realisieren [201]. Durch die punktuelle Anregung ausschließlich bei Anwesenheit des Katalysators ist diese Detektionsmethode sensitiver als bspw. Fluoreszenz, bei welcher das Hintergrundrauschen erhöht werden kann [194, 202].

## **Analyse-Plattform**

Die in dieser Arbeit verwendete Analyseplattform ist der Microarray Chip Reader (MCR) der Firma GWK Präzisionstechnik GmbH München. Diese ist eine automatisierte, durchflussbasierte Mikroarray-Analyseplattform für bioanalytische

Multiplex-Assays [203]. Bei der Messung wird der Mikroarray in die Chipeinheit des Gerätes eingelegt und die benötigten Reagenzien in benötigter Reihenfolge diskontinuierlich durch die Flusszelle geleitet, auf der – je nach Anwendung und Assay – spezifische Biomoleküle immobilisiert sind. Gerade im Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie werden auf den Mikroarrays viele Immunoassays in unterschiedlichen Varianten und für eine breite Auswahl an Analyten verwendet. Die Detektion erfolgt über Chemilumineszenz-Reaktion, welche über eine CCD-Kamera aufgenommen wird.

a)



b)



**Abbildung 9: Mikroarray-Analyseplattformen a) MCR 3 und b) MCR-R (Fotos: GWK Präzisionstechnik GmbH München).**

Durch die diskontinuierliche Durchströmung können am MCR auch komplexere Matrices wie Milch [204] oder Urinproben verwendet werden, ohne dass störende Hintergrundsignale verursacht werden. So können mit dem MCR beispielsweise Antibiotika in Milchproben durch einen indirekt kompetitiven Mikroarray-Immunoassay

analysiert werden, indem Antibiotika als Fänger auf der Oberfläche immobilisiert werden [204, 205]. Mit Hilfe eines Sandwich-Mikroarray-Immunoassays können Mikroorganismen oder Toxine aus Realproben durch Immobilisierung der Fängerantikörper vermessen werden [206, 207]. Alternativ zu Immunoassays können mittels DNA-Mikroarrays auch DNA-Proben detektiert und quantifiziert werden [208, 209]. Diese Methode wird bei den molekularbiologischen Nachweismethoden im Verlauf dieser Arbeit noch näher beleuchtet.

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene MCR-Generationen verwendet. Für die Durchführung des DNA-Assays haRPA (siehe Kapitel 2.2.3.4, „Heterogene asymmetrische RPA (haRPA)“) wird der MCR 3 (MCR 3. Generation, s. Abbildung 9 a) verwendet [205]. Dieser hat eine Vielzahl an Spritzenpumpen und Ventilen, welche für die diskontinuierliche Durchströmung angefahren und in verschiedenen Geschwindigkeiten eingestellt werden können. Des Weiteren ist die Chip-Einheit für eine kontrollierte Temperatur während der Messungen beheizbar [210]. Im weiteren Verlauf wurde im Zuge des Projektes LegioTyper der CL-SMIA auf dem MCR-R (MCR „Research“, s. Abbildung 9 b) gearbeitet, welcher eine Weiterentwicklung und Optimierung des MCR 3 darstellt. Hier wurden die zahlreichen Spritzenpumpen in eine vereint und der Aufbau dadurch optimiert und verkleinert. Auch die Flusszellen-Einheit lässt sich bei diesem Gerät vom Fluss unterbrechen, wodurch die Messung der CL-Reaktion (also die Bildaufnahme) vollkommen störungsfrei abläuft. Eine weitere Änderung ist, dass die Flusszelleneinheit hier auf Monochips ausgelegt ist, also Mikroarrays mit einer anstelle zwei Flusszellen.

### **Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (CL-SMIA)**

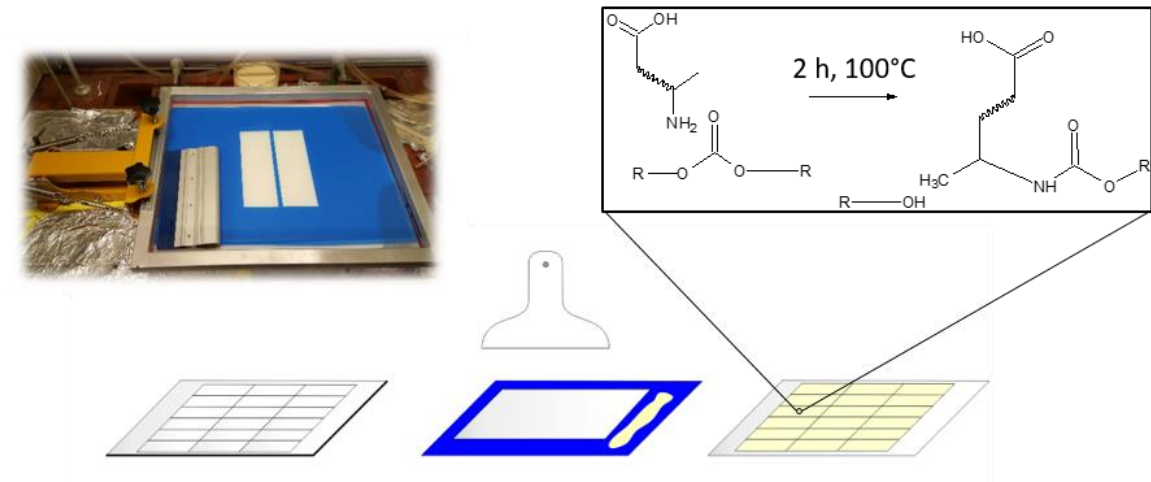
In dieser Arbeit wird der CL-SMIA als Immunoassay verwendet. Zu Beginn der Arbeit wurde hier mit einer Glas-Oberfläche gearbeitet, welche am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie in intensiver Arbeit entwickelt und optimiert wurde [211]. Die Oberflächenchemie ist Kapitel 2.2.3.4 „Heterogene asymmetrische RPA (haRPA)“ zu entnehmen. Auch für die Detektion von Legionellen in einem CL-SMIA wurde diese Oberfläche bereits genutzt und von Wolter et al. und später Wunderlich et al. etabliert und verwendet [206, 210]. Im Verlaufe des LegioTyper-Projektes wurde speziell für diesen Immunoassay eine Polycarbonat-Folie (PC) als Oberfläche für den Mikroarray-Chip für eine schnellere und kosteneffizientere Herstellung entwickelt [183]. Der Prozess, entwickelt von Jonas Bemetz [183, 212], ist in Abbildung 10 dargestellt.

Von der rohen PC-Folie bis zum fertigen Mikroarray werden hier 22 h und 1 Nacht Inkubationszeit benötigt, im Gegenzug zu 66 h und 2 Nächten bei der Glas-Mikroarray-Chip-Herstellung. Die PC-Platte wird zu Beginn mit einem Cutting-Plotter angeritzt (1), wodurch eine Herstellung von 3 x 3 Chips pro Charge vorgegeben wird. Auf die Folie wird anschließend eine Paste von modifiziertem Jeffamine ED-2003 aufgetragen und inkubiert. Das Jeffamine ED-2003, welches zwei Aminogruppen besitzt, wird im Vorfeld mit Bernsteinsäureanhydrid in Toluol umgesetzt, um eine einseitige Carbonsäuregruppe zu funktionalisieren. Somit kann das modifizierte Jeffamine im Inkubationsschritt an die PC-Oberfläche anbinden (2). Dieser Schritt der Aminolyse ist in Abbildung 11 a noch einmal genauer dargestellt. Nach Waschen der Folien in Reinstwasser sind diese auch ohne Voraktivierung der Oberfläche zum Spotten bereit (4). Die Aktivierung der Oberfläche findet direkt auf dem Spot statt, was ein effizienteres Spotting ermöglicht, da die Reagenzien mit den Fängerantikörpern zusammen aufgetragen werden. Wie in Abbildung 11 b zu erkennen, reagieren die Carbonsäuregruppen, welche das modifizierte Jeffamine an der Oberfläche bereitstellt, mit dem EDC zu dem O-Acylharnstoff, einem instabilen Intermediat. Dieses Intermediat reagiert mit NHS zu einem NHS-Ester. Dieser wiederum erlaubt die Anbindung eines primären Amines, welches sich an den Fängerantikörpern befindet. Der Fängerantikörper wird somit durch eine stabile Amidbindung an der PC-Oberfläche fest immobilisiert. Durch die punktuelle Aktivierung der Oberfläche entfällt zudem ein Blocken der gesamten Oberfläche, wie es bei der Herstellung der Glas-Mikroarray-Chips üblich ist. Der Chip wird nach Zusammenfügen mit doppelseitigem Klebeband und POM-Träger (Abbildung 10, 6) lediglich durchspült, um alle Aktivierungsreagenzien zu entfernen und Anbindung an anderer Stelle zu verhindern. Das Assayprinzip des CL-SMIA ist hier mit einem Sandwich-ELISA zu vergleichen. Die Reagenzien, welche zur Durchführung der Messung benötigt werden, werden im diskontinuierlichen Durchfluss über den Mikroarray-Chip geleitet.

## 1) Polycarbonat-Platten (1 mm) anritzen

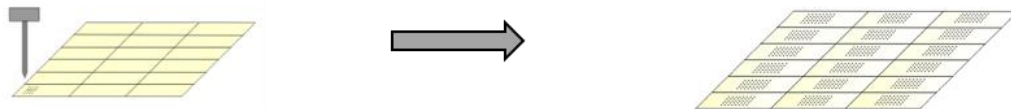


## 2) Siebdruck mit modifiziertem Jeffamine und Inkubation



## 3) PC-Chips waschen und trocknen

## 4) Mikrodosieren von Fängerantikörpern



## 5) Inkubation über Nacht (15 h)

## 6) Zusammenbau des fertigen Mikroarrays mit Flusszelle

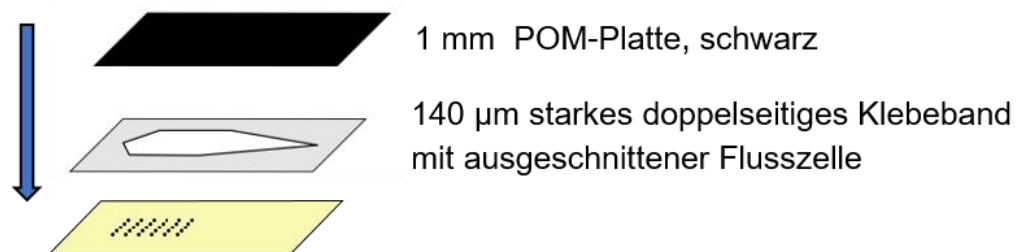
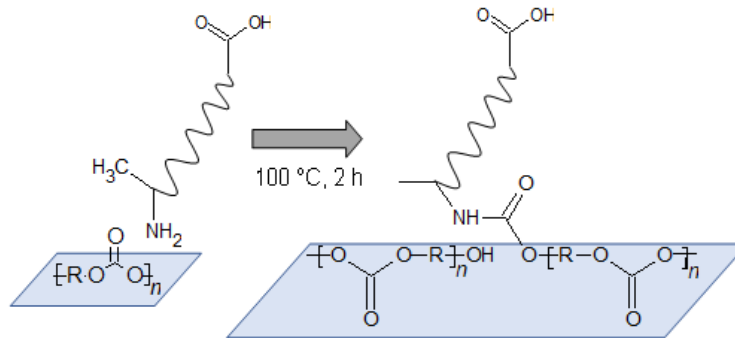


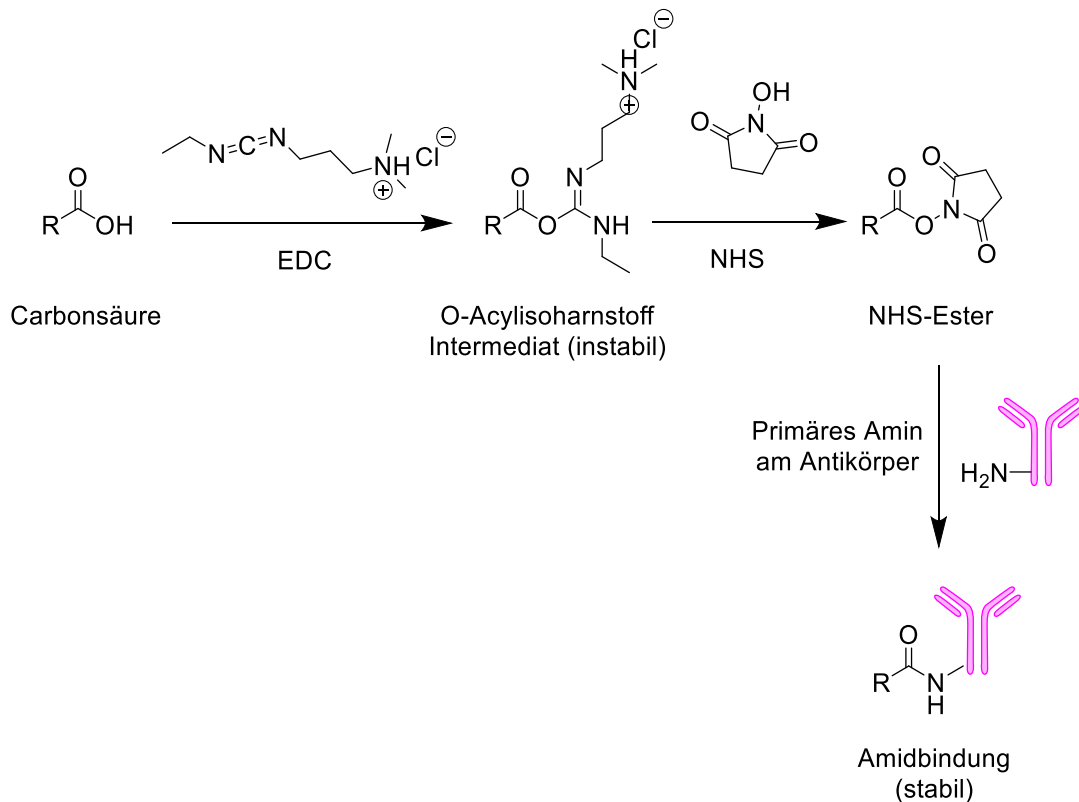
Abbildung 10: Darstellung des Herstellungsprozesses für Mikroarray Chips aus PC. Die Darstellung ist in abgewandelter Form der Doktorarbeit von Jonas Bemetz entnommen und auch in Bemetz et al. zu finden [183, 212].

a)

~~~~~ = Polyether backbone



b)



**Abbildung 11: a) Chemische Darstellung der Beschichtung einer Polycarbonat-Oberfläche mit succinyliertem Jeffamine ED-2003 durch Aminolyse. Die Abbildung ist der Publikation von Bemetz et al. entnommen [183]. b) Chemische Darstellung der Oberflächenaktivierung und Anbindung der Fängerantikörper während des Spotting-Prozesses auf PC-Folien.**

Das Assay-Prinzip ist in Abbildung 12 dargestellt, die monoklonalen Fängerantikörper sind, wie zuvor beschrieben, fest auf der Oberfläche immobilisiert. In einem ersten Schritt wird die Legionellen-haltige Probe durch die Flusszelle geleitet, wobei die Legionellen über ihre LPS-Strukturen an den entsprechenden spezifischen Fängerantikörpern anbinden (A). Durch Spülschritte, welche nach jeder Zugabe erfolgen, werden ungebundene Bestandteile von der Oberfläche gespült. Zur Formung



des Sandwiches wird ein biotinylierter Detektionsantikörper durch die Flusszelle geleitet, welcher an gebundenen Legionellen anbindet (B).

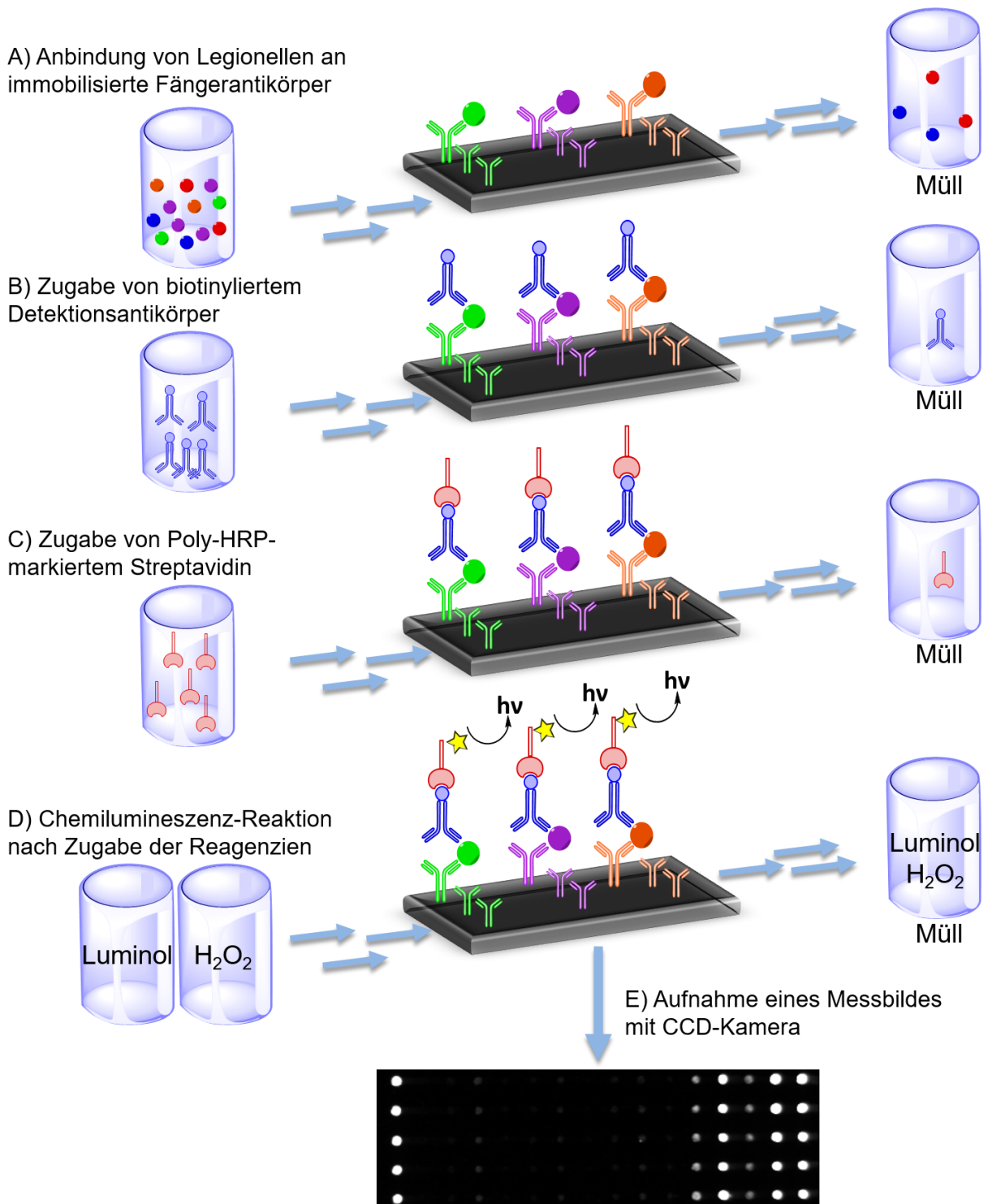
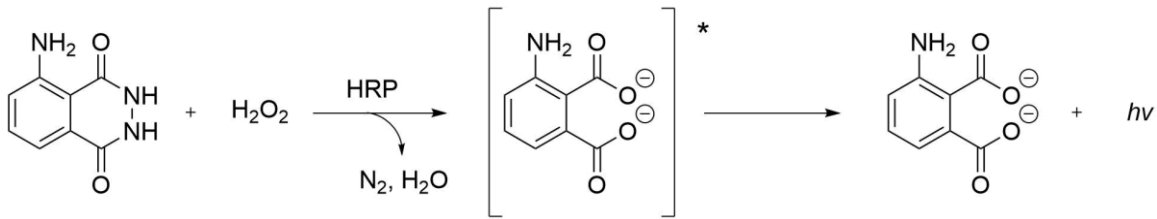


Abbildung 12: Assay-Prinzip des CL-SMIA.

Zur Detektion wird Poly-HRP-Streptavidin zugegeben (C). Bei der anschließenden Zugabe der CL-Reagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid findet eine CL-Reaktion punktgenau an den gebundenen Sandwichen statt (D), da HRP die CL-Reaktion

katalysiert (s. Abbildung 13). Diese wird über eine CCD-Kamera zur späteren Auswertung aufgezeichnet (E).



**Abbildung 13:** HRP-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid.

### 2.2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden

Molekularbiologischen Nachweismethoden werden häufig für den quantitativen Nachweis verwendet. Bei Nukleinsäureamplifikationstests, welche im Folgenden detaillierter erklärt werden, wird dabei die Menge der genomischen DNA in einer Probe ermittelt. Da bei diesen Methoden in der Regel mit DNA oder auch RNA gearbeitet wird, geht allen nachfolgenden Methoden eine DNA- bzw. RNA-Extraktion voraus.

#### 2.2.3.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Eine der beliebtesten und zuverlässigsten Methoden heutzutage für die Detektion und Quantifizierung von Bakterien ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [213]. Die DNA-Amplifikation erfolgt durch ein festes Temperaturprofil, welches aus drei Schritten besteht. Im ersten Schritt, der Denaturierung bei ca. 95 °C, wird der Doppelstrang der DNA-Helix aufgetrennt, so dass im Anschluss zwei komplementäre DNA-Einzelstränge vorliegen. Auf diesen Schritt folgt das sogenannte Annealing bei 50 bis 62 °C. In diesem werden ein FW- und auch ein REV-Primer an die jeweiligen gegenläufigen Einzelstränge angelagert. Bei der Verlängerung der Ketten, der Extension, werden komplementäre Basen (dNTPs) an den Einzelstrang angelagert und der Doppelstrang somit synthetisiert. Syntheserichtung der hitzestabilen Polymerase ist von 5' in 3'-Richtung. Die Temperatur wird hierbei dem Temperaturoptimum der Polymerase, welche verwendet wird, angepasst. Die Dauer dieses Schrittes richtet sich nach der Codierung des Templates. In der Regel werden pro A/T-Basenpaar (bp) 2 s und pro G/C-bp 4 s verwendet, um die Amplifikation des gesamten Templates zu gewährleisten. Der gesamte Zyklus wird beliebig häufig wiederholt, wobei die Anzahl der Amplifikate bei jedem Durchlauf verdoppelt wird, bis eine ausreichende Menge an Nukleinsäure amplifiziert wurde. Die PCR stellt eine

qualitative Analyse dar. Für eine quantitative Analyse der DNA-Probe wird meist eine Echtzeit (real-time PCR, RT-PCR) oder quantitative PCR (qPCR) durchgeführt. Hierbei wird dem Reaktionsgemisch ein Farbstoff beigemischt, der in die doppelsträngige DNA interkaliert. Dieser wird zur Fluoreszenz angeregt und kann detektiert werden. Durch Kalibrierung kann die unbekannte Probe mit der Menge an beinhalteneter DNA korreliert werden.

Auch zur Detektion von Legionellen gibt es heutzutage molekulare Nachweismethoden [99, 214-218]. Häufige Ziele der Primer für *Legionella* spp. sind die Gensequenzen, welche für 16S rRNA und die 5S rRNA codieren [219]. Das 16S rRNA-Gen wird als Summenparameter verwendet, da es eine konservierte Region aller *Legionella* spp. ist [220]. *L. pneumophila* wird häufig über das *mip*-Gen detektiert, da hier Sequenzvariabilitäten zwischen den verschiedenen Spezies zu finden sind [214-217, 221, 222]. Dieses Gen codiert ein 24 kDa großes Protein, welches als essentieller Virulenz-Faktor das Eindringen in Amöben und Makrophagen erleichtert [37]. Es kann somit für den selektiven Nachweis von *L. pneumophila*, der am häufigsten mit Legionellenausbrüchen in Verbindung stehenden Spezies, verwendet werden [33, 55]. *L. pneumophila* wird in der qPCR jedoch auch z.B. über das *dotA*-Gen detektiert [100]. Zudem wird in den letzten Jahren immer häufiger auch Sg 1 von *L. pneumophila* über qPCR nachgewiesen. Hier wird mit der Amplifikation des *wzm*- [217, 218, 223, 224] und des *wzt*-Gens [223] gearbeitet, welche für die O-Antigenstruktur des LPS codieren.

Bei Cao et al. werden in einer Multiplex-PCR für klinische Proben und Umweltproben sechs Serogruppen von *L. pneumophila*, basierend auf *wzm*- und auch *wzt*-Gensequenzen (minimale Menge: 1 ng genomische DNA), differenziert [225]. Von Sánchez-Parra et al. wurde eine PCR in den Bereichen V3 und V5 des 16S rRNA-Gens etabliert, welche die Detektion von *L. pneumophila* in Aerosolen auch in sehr geringen Konzentrationen ermöglicht [226]. Von Templeton et al. wurde eine Multiplex-RT-PCR entwickelt, welche *L. pneumophila* und *Legionella* spp. mit Hilfe verschiedener Sonden in einer Probe detektieren und quantifizieren kann (LOD: je 2,5 KBE mL<sup>-1</sup>) [227].

Die PCR und auch qPCR bietet die Möglichkeit des schnellen Gennachweises und der Quantifizierung von Proben. Die qPCR für die Quantifizierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* wurde zudem in der AFNOR standardisiert [228]. Zum Legionellen-

Nachweis können sowohl Wasser- [229] und Prozesswasserproben [230, 231], als auch klinische Proben verwendet werden, jedoch keine Urinproben, da in ihnen lediglich freies LPS vorhanden ist.

Von Immundiagnostik gibt es das Echtzeit-PCR-Kit MutaPLEX<sup>®</sup> für die qualitative Detektion von *Legionella* spp. und auch *L. pneumophila* in klinischen und auch Umweltproben mit einer Nachweisgrenze von 2 KBE pro PCR-Reaktion [232, 233]. Zur qualitativen Analyse von Sputum mit Echtzeit-PCR kann auch das EliGene<sup>®</sup> *Legionella pneumophila* UNI von Elisabeth Pharma [234]. Auch das R-DiaLeg Kit der Firma Diagenode Diagnostics kann hier zur simultanen Detektion von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* mittels RT-PCR genutzt werden [235]. Die Firma R-Biopharm AG bietet das Kit SureFast<sup>®</sup> *Legionella pneumophila* PLUS zur qualitativen RT-PCR für Wasserproben und einer Nachweisgrenze von unter 5 DNA-Kopien pro Reaktion, anwendbar mit allen gängigen Systemen [236]. Für die Detektion und auch quantitative Bestimmung von *Legionella* spp. in Wasserproben gibt es das mericon Quant *Legionella* spp. Kit von QIAGEN, welches auf der Plattform QIAGEN Rotor-Gene Q mit vorgeschalteter Aufkonzentrierung innerhalb von 73 min Ergebnisse mit einer Nachweisgrenze von 10 DNA-Kopien pro PCR-Reaktion liefert [237].

Zur Quantifizierung von Legionellen in Trinkwasser, welche gesetzlich vorgeschrieben wird und regelmäßig durchgeführt werden muss, gibt es verschiedene Verbundverfahren, also Gesamtsysteme zur Analyse. Diese kombinieren die für die DNA-Analyse notwendige DNA-Extraktion und einen Nukleinsäureamplifikationstest, häufig qPCR. Nachweissysteme, die qPCR verwenden und der Quantifizierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* dienen, wurden gemäß AFNOR NF T90-471 durchgeführt (zur Sicherstellung der Gleichwertigkeit der Ergebnisse verschiedener qPCR-Assays) [228] und auch ISO/TS 12869:2012 bzw. ISO/TS 12869:2019 (Regelung für den Nachweis und die Quantifizierung von *Legionella* spp. und/oder *L. pneumophila* durch Konzentration und genetische Verstärkung mittels Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)) zertifiziert. Solche Systeme sind zur regulären Überprüfung notwendig, um eine gleichbleibende Qualität der Quantifizierung sicher zu stellen. In den letzten Jahren wurden zudem mehrere dieser kommerziellen qPCR-Kits evaluiert [238, 239]. Es gibt hier beispielsweise das iQ-Check-System von BioRad, welches 5 h bis zum Ergebnis der Analyse benötigt [240]. Mit diesem können alle gängigen Wasserproben, gemäß AFNOR, mit einer Nachweisgrenze von 5 GU pro PCR-Reaktion vermessen werden [241]. Das AquaScreen<sup>®</sup> qPCR Detection Kit von Minerva

Biolabs® benötigt 6 h bis zur Fertigstellung der Analyse und ist für Trinkwasser und die Qualitätstestung von Nutz- und Brauchwasser geeignet [242]. Der Nachweis ist möglich, wenn weniger als 500 Mikroorganismen in 1000 L enthalten sind [243]. Mit der GeneDisc® Technologie von Pall® erhält man in 2 h Ergebnisse für klare Wasserproben, in 3 h für komplexe Wasserproben [239, 244]. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 GU pro PCR-Kavität [244]. Mit dem von Bioteccon Diagnostics kommerziell erhältlichen microproof® *Legionella* Quantification LyoKit kann mit entsprechendem zugehörigen DNA-Extraktionskit die Quantifizierung von *Legionella* spp., *L. pneumophila* und *L. pneumophila* Sg 1 getrennt voneinander durchgeführt werden [245]. Der LOD liegt bei 3 GU pro PCR-Reaktion für *Legionella* spp. und bei 5 GU pro PCR-Reaktion für *L. pneumophila*.

### Sequenzbasierte Typisierung

Die sequenzbasierte Typisierung (*sequence-based typing*, SBT) wird heutzutage sehr oft bei der Genotypisierung von Legionellen verwendet. Hierbei werden die sieben Gene *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *momp*, *proA*, und *neuA* über PCR amplifiziert und anschließend sequenziert [114, 246, 247]. Durch die Sequenzierung kann der Sequenztyp (ST) der Proben bestimmt werden und klinische [248] mit Umweltproben verglichen werden [246, 247, 249, 250]. Bei einer erweiterten Form, der Nested-PCR SBT (NPSBT) [251] wird die PCR mehrmals mit Primern durchgeführt, welche erst einen größeren Bereich amplifizieren und anschließend erneut mit den ursprünglichen Primern. Hierbei wird gerade bei klinischen Proben ein besseres und gesicherteres Ergebnis erhalten.

### Pulsed-Field-Gelelektrophorese

Die Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) [252, 253] ist eine Variation der Agarose-Gelelektrophorese. Bei dieser werden zuvor in der PCR amplifizierte Nukleinsäuren mit Hilfe eines elektrischen Stromflusses auf Grundlage der Länge getrennt.

Die PFGE wird häufig in der Genotypisierung zur Analyse der DNA-Sequenz und Identifizierung der Sequenztypen genutzt. Die DNA wird durch Enzyme verdaut und in einem Agarose-Gel getrennt. Durch gezieltes Wechseln des elektrischen Feldes wird hier eine sehr saubere und genaue Trennung der Fragmente erreicht, was eine Unterscheidung verschiedener Sequenztypen erlaubt. Im Ausbruchsgeschehen und

bei der Serotypisierung von Proben wird die PFGE für *L. pneumophila* Sg 1 häufig genutzt [254-256].

### 2.2.3.2 Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden fluoreszenzmarkierte Sonden zum Nachweis von Nukleinsäuren, sowohl DNA als auch RNA, verwendet [257, 258]. Diese binden an definierten Stellen über Hybridisierung an die Nukleinsäuren. Durch den Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe, wie FITC oder Aminomethylcoumarin-Acetat (AMCA) ist eine Multiplex-Bestimmung möglich [259]. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können die Sonden sichtbar gemacht werden und zeigen die räumliche Verteilung der Oligonukleotide und auch die vorhandene Menge in der Probe [260].

Bekannte Sonden zur Detektion sind beispielsweise die LEG705 für *Legionella* spp. und LEGPNE1 für *L. pneumophila* [220, 261]. Diese werden auch von Declerck et al. in Kombination mit dem Farbstoff CY3 verwendet [262]. Diese detektieren ganze Bakterien in verschiedenen Proben (Leitungswasser, Belebtschlamm, etc.) direkt nach Filtration, wobei der Farbstoff eine zu geringe Stabilität zur Quantifizierung zeigte. Bei Buchbinder et al. wurden 100 Proben (klinische und aus Privathaushalten) mit Kultur, PCR und FISH analysiert, wobei sich zeigte, dass FISH eine schnelle, sensitive und spezifische Methode zur Detektion von Legionellen ist, jedoch gegenüber der PCR ein niedrigeres Detektionslimit aufgrund der Fluoreszenz-Mikroskopie besitzt [263]. Whiley et al. zeigten die Möglichkeit der Detektion von Legionellen in Pflanzenerde, was die Anwendbarkeit von der FISH-Methode in Umweltproben zeigt [264].

Ein kommerziell erhältliches Kit für die Analyse über FISH ist von der Firma Vermicon erhältlich, das Scan VIT® *Legionella* für den simultanen Nachweis von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in Trink- und Kühlwasser (kurze Voranreicherung notwendig) [265]. Die Proben werden drei Tage kultiviert und anschließend alle Mikrokulturen untersucht. Dadurch ist eine absolute Quantifizierung der lebenden Mikroorganismen innerhalb von 3 h möglich [266, 267].

### 2.2.3.3 Isotherme Nachweisverfahren

Im Gegensatz zur PCR oder qPCR werden bei isothermen Verfahren keine Temperaturzyklen benötigt. Bei isothermen Verfahren (*isothermal nucleic acid amplification tests*, iNAATs) werden hierfür andere Hilfsmittel, wie z.B. Enzyme,

abseits der Temperaturänderung verwendet [268, 269]. Dadurch wird in diesen Verfahren lediglich ein einfacher Heizblock benötigt und es kann auf aufwendige Geräte verzichtet werden, welche zeitgenau die Temperaturzyklen durchlaufen. Das Ausbleiben des Temperaturzykluses und damit Amplifikation bei gleichbleibender Temperatur ermöglicht eine kontinuierliche Amplifikation, wodurch die Amplifikationsrate steigt und die Assayzeit verringert wird. Dadurch können iNAATs auch in simplen Detektionssystemen realisiert werden [269, 270]. Im Folgenden werden einige isotherme Verfahren erläutert.

### **Multiple Displacement Amplification**

Bei der Multiple Displacement Amplification (MDA) [271] trennt man die DNA-Doppelhelix durch eine häufig alkalische Denaturierung (3 min). Durch Einsatz einer geeigneten Polymerase, wie beispielsweise der  $\phi$ 29-DNA-Polymerase [272], findet die Amplifikation der gesamten genomischen DNA mit einer Rate von 25 bis 50 bp s<sup>-1</sup> und einer Fehlerrate von  $3 \times 10^{-6}$  Basen statt.

### **Schleifen-vermittelte isotherme Amplifikation**

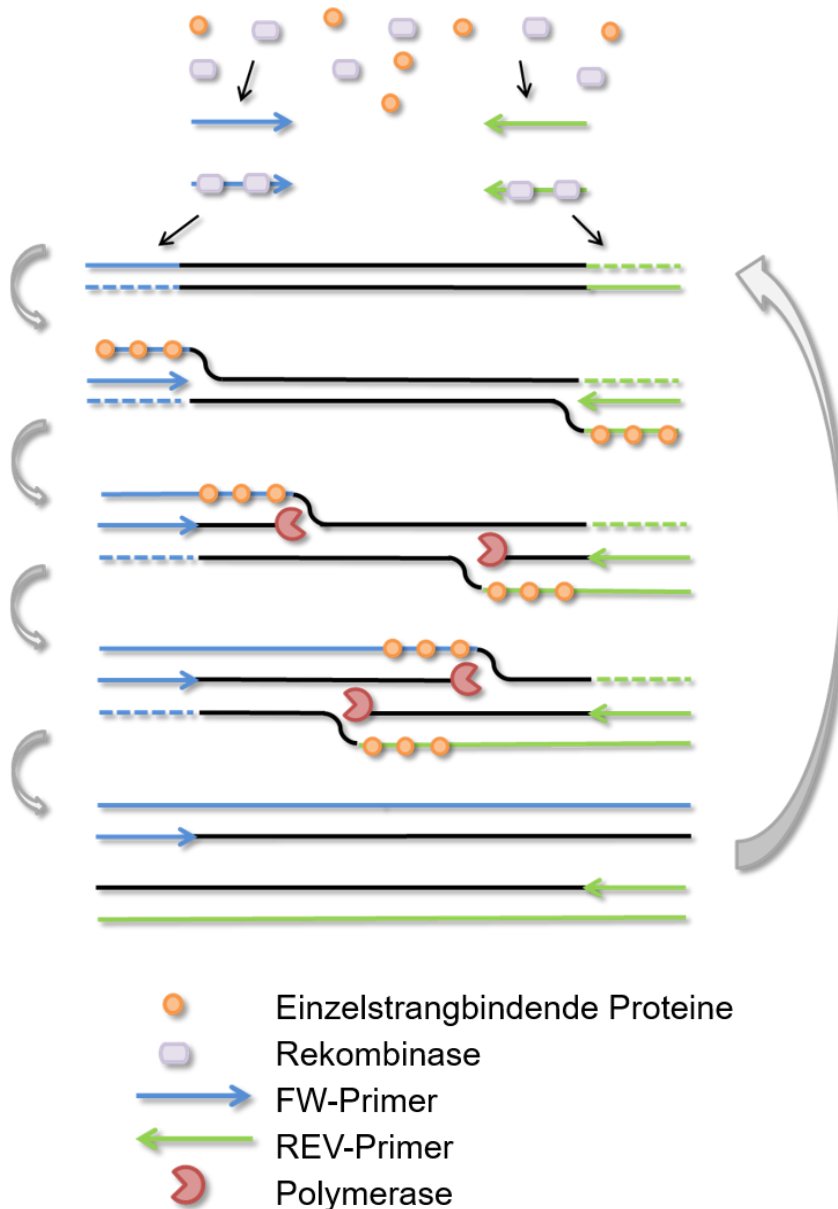
Die Schleifen-vermittelte isotherme Amplifikation (*Loop Mediated Isothermal Amplification*, LAMP) [273] benötigt eine Anzahl von vier bis sechs Primern, welche mit Hilfe einer strangverschiebenden Polymerase an verschiedenen Stellen eine Amplifikation durchführen [274]. Aufgrund der hohen Anzahl an Primern erhöht sich, verglichen mit der PCR, der Aufwand des Primerdesigns. Auch für Legionellen kann diese Methode genutzt werden. So kann *Legionella* spp. detektiert werden, aber auch *L. pneumophila* von anderen Spezies unterschieden werden [275, 276]. Auch auf eine tragbare, für die POC-Diagnostik anwendbare, Plattform konnte diese Methode für den schnellen Nachweis von Legionellen und anderen Pathogenen übertragen werden [277].

### **Helikase-abhängige DNA-Amplifikation**

Bei der Helikase-abhängigen Amplifikation (Helicase-dependent amplification, HDA) kommt zur Trennung der doppelsträngigen DNA das Enzym Helikase, z.B. die UvrD-Helikase, zum Einsatz [278]. Dieses entwindet und spaltet die doppelsträngige DNA. Die Einzelstränge werden anschließend durch einzelstrangbindende Proteine stabilisiert, z.B. durch T4 gp32 [279]. An den freiliegenden Rändern der einzelsträngigen DNA binden sequenzspezifische Primer. Durch eine Polymerase wird

der komplementäre Strang für die doppelsträngige DNA aufgebaut [278]. Diese wird erneut durch die Helikase getrennt, was fortlaufend zur exponentiellen Amplifikation des DNA-Stranges führt.

### Homogene Rekombinase-Polymerase-Amplifikation



**Abbildung 14: Schematischer Ablauf der homogenen RPA. Abbildung nach Piepenburg et al. [280].**

Eine Weiterentwicklung der HDA stellt die von Piepenburg et al. [280] etablierte Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) dar. Auch hier wird die Trennung der DNA-Doppelstränge nicht durch thermisches Schmelzen erreicht, sondern enzymatisch durch Rekombinasen initiiert [281]. Diese bilden Komplexe mit



Oligonukleotiden (hier Primer) zum Scannen doppelsträngiger DNA nach der komplementären Sequenz und erleichtern den Strangaustausch. Das Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Zerfall dieses Komplexes ist sehr wichtig in der RPA [280]. Die Rekombinase, hier T4 uvsX [281], bindet an den Primer in Gegenwart von ATP. Der Rekombinase-Primer-Komplex hydrolysiert aktiv das ATP zu ADP. Nach der Hydrolyse spaltet sich die Rekombinase durch Anwesenheit von ADP ab. Hier unterstützen zusätzlich das Protein T4 usvY [282], ein Binfaktor für die Rekombinase, und ein Crowding Agent (Carbowax20M) zusätzlich den Ablauf. Der abgelöste Einzelstrang der DNA wird durch einzelstrangbindende Proteine, T4 gp32, stabilisiert, wobei die Abstoßung der Primer verhindert wird. Nach Ablösung der Rekombinase aus dem Komplex liegt das 3'-Ende frei zur Anlagerung der Bsu-Polymerase [283] für die Strang-Verlängerung. Dieser Vorgang wird zyklisch zur exponentiellen Vermehrung des Amplifikates wiederholt. Die RPA kann bei Temperaturen zwischen 37 und 42 °C durchgeführt werden und zeigt erste positive Ergebnisse nach ca. 20 min, kann aber auch bis zu 60 min durchgeführt werden [268, 269]. Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Arbeitstemperatur werden bei der RPA mit 30 bis 35 bp längere Primer benötigt, wie beispielsweise bei der PCR (ca. 20 bp). Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt.

#### 2.2.3.4 Genosensoren

Genosensoren sind eine Form der Biosensoren. Es handelt sich hierbei um DNA-basierte Biosensoren. Hierbei werden kurze DNA- oder auch RNA-Stücke als Sonden an einer Oberfläche immobilisiert, um über Hybridisierung Nukleinsäuren aus Proben anzubinden. Die Trägermaterialien sind hier ähnlich den Immunosensoren. Die Detektion erfolgt über unterschiedlichste Prinzipien, markierungsfrei, elektrochemisch, über CL, etc. [194, 199, 284]. Im Folgenden werden verschiedene Genosensoren weiter erläutert.

In der Publikation von Foudeh et al. wird beispielsweise SPR zur Quantifizierung von Legionellen-DNA verwendet [285]. Detektiert wird das *16S rRNA*-Gen, welches an einer Fänger-Sonde an der Oberfläche anbindet. Zur Signal-Verstärkung bindet eine biotinylierte Detektor-Sonde, welche wiederum einen Streptavidin-markierten Quantum-Dot (QD) bindet. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 pM in 450 µL (0,45 Femtomol). Ebenfalls mit Detektion über SPR-Imaging arbeitet Melaine et al. bei der Multiplex-Detektion von *L. pneumophila*, *Salmonella typhimurium* and

*P. aeruginosa* [286]. Hier wird eine Fängersonde auf der Goldoberfläche immobilisiert, welche die 16S-RNA der Zielanalyten bindet. An diese hybridisiert wiederum eine Gold-Nanopartikel-markierte Detektionssonde, welche der Signalverstärkung dienen und einen LOD von  $10 \text{ pg mL}^{-1}$  erreichen.

Miranda-Castro et al. präsentiert einen elektrochemischen Genosensor, um spezifische Sequenzen von *L. pneumophila* zu detektieren [287]. Immobilisiert ist eine thiolierte Haarnadel-DNA, die DNA bindet, welche in einem Hybridisierungs-Sandwich-Assay von einer biotinylierten Signalsohle gebunden wird. Reporter-molekül ist Streptavidin-Alkaliphosphatase. Zur Differentialpuls-Voltametrie-Bestimmung der Aktivität wird 1-Naphtylphosphat zugegeben und nach 2 min zur Dephosphorylierung die Menge an 1-Naphtol bestimmt. Der LOD liegt bei  $340 \text{ pM}$  DNA von *L. pneumophila*. Ein weiterer Genosensor, welcher von Miranda-Castro et al. etabliert wurde, ist eine PCR-basierte semiquantitative Bestimmung von *L. pneumophila*, bei der zuerst ein PCR-Assay mit Amplikon auf dem *16S rRNA*-Gen durchgeführt wird [288]. Das Amplikon hybridisiert sowohl an eine thiolierte Haarnadel-Schleife, immobilisiert auf einer Goldoberfläche, als auch an eine biotinylierte Reporter-Sonde. Der Nachweis erfolgt wie zuvor beschrieben.

Auch bei Rai et al. wird für den Genosensor eine Haarnadel-Ferrocen-Sonde über Thiolierung auf eine Goldelektrode immobilisiert (*electrochemically amplified molecular beacon*, EAMB) [289]. Durch Anbindung der komplementären DNA (21-mer) wird das Elektroden-Potential durch Änderung der Oberflächendichte verändert. Die Nachweisgrenze liegt bei  $23 \text{ fM}$ . Eine weitere, markierungsfreie, Methode von Rai et al. beruht auf einer Aluminiumoxidmembran, deren Poren DNA-Sonden enthalten [290]. Diese ist über einer Platindrahtelektrode aufgebracht. Hybridisiert die Ziel-DNA, so verändert sich dadurch die Leitfähigkeit, welche durch Anwesenheit der Redox-Spezies  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  an der Platinelektrode definiert wird und welche bei Anwesenheit der Ziel-DNA aufgrund geringerer Porengröße verdrängt wird.

### DNA-Mikroarrays

DNA-Mikroarrays werden oft zur quantitativen Analyse von Bakterien und Viren in Wasser, Lebensmitteln oder auch klinischen Proben verwendet, finden aber auch Anwendung in Multiplex-Screening-Verfahren zur Detektion verschiedener Gene [194]. Hierbei werden je nach Art des Mikroarrays DNA, cDNA oder auch RNA, rRNA oder tRNA verwendet [194]. Bei DNA-Mikroarrays ist, im Gegensatz zu vielen

Antikörper-Mikroarrays, eine Probenvorbereitung mittels DNA-/RNA-Extraktion notwendig. Je nach Assay-Variante müssen die DNA/RNA-Fragmente der Proben zusätzlich für die Detektion mit Sonden markiert werden. Zur Quantifizierung der Ergebnisse benötigt man ein Sandwich-Hybridierungsformat mit sowohl Fänger- als auch Detektions-Sonden [194, 291]. Multiplex-DNA-Mikroarray-Systeme sind mittlerweile kommerziell erhältlich, beispielsweise von Affymetrix, Agilent oder auch Rosetta. Bei der Affymetrix GeneChip Technologie beispielsweise findet die DNA-Hybridisierung auf dem Mikroarray statt [292]. Auf der Oberfläche werden hierbei DNA-Einzelstränge immobilisiert. Die extrahierte Proben-RNA wird mit Fluoreszenz-Sonden markiert und auf den Chip gegeben, wo diese an die komplementären Einzelstränge anbindet. Durch Anregung mit einem Laser kann das emittierte Licht gemessen und der Mikroarray ausgelesen werden. Somit können Mikroarrays mit vielen hundert bis tausenden Bereichen hergestellt und bspw. für das Whole Genome Sequencing verwendet oder zur Qualitätskontrolle von Lebensmittel, Umweltproben, in der klinischen Diagnostik, etc. eingesetzt werden [292].

Ein DNA-Mikroarray, der von Xi et al. entwickelt wurde, detektiert *Legionella* spp. und *L. pneumophila* subsp. über das *gyrB*-Gen [293], also die Untereinheit B des Gyrase-Enzyms. Es wurde eine schnelle Oligonukleotid-Mikroarray-Detektionstechnik entwickelt, welche mit über 31 immobilisierte Sonden die verschiedenen Spezies mit hoher Spezifität nachweist ( $\text{LOD}_{L. pneumophila \text{ subsp.}} = 13 \text{ CFU } 100 \text{ mL}^{-1}$ ). Von Petzold et al. wurde im Zuge des Legionellose-Ausbruches in Warstein ein DNA-Mikroarray etabliert, welcher mittels 97 auf einem Glaschip aufgebrachten Sonden, über DNA-Hybridisierung zwischen verschiedenen Stämmen von *L. pneumophila* Sg 1 differenzieren kann [294]. So konnte im Ausbruchsgeschehen zwischen den Sg 1 Knoxville-Stämmen ST 345 (Ausbruchs-Stamm) und dem häufig auftretenden ST 600 unterschieden und die Ausbruchsquelle definiert werden.

Cao et al. haben einen spezifischen DNA-Mikroarray entwickelt, welcher aufgrund der Genom-Unterschiede des O-Antigens des LPS von *L. pneumophila* die 15 verschiedenen Sg detektieren und differenzieren kann [225]. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 ng genomischer DNA bzw.  $0,4 \text{ KBE mL}^{-1}$  bei Wasserproben nach Anreicherung und Kultur. Des Weiteren werden bei Cao et al. 29 Sonden zur Identifizierung von elf pathogenen Legionellen-Spezies und einer nicht-pathogenen Legionellen-Spezies über Oligonukleotid-Mikroarrays verwendet ( $\text{LOD: } 1 \text{ ng genomische DNA bzw. } 13 \text{ KBE } 100 \text{ mL}^{-1} \text{ Kultur}$ ) [295]. Die Gensequenz der Sonden wurde durch

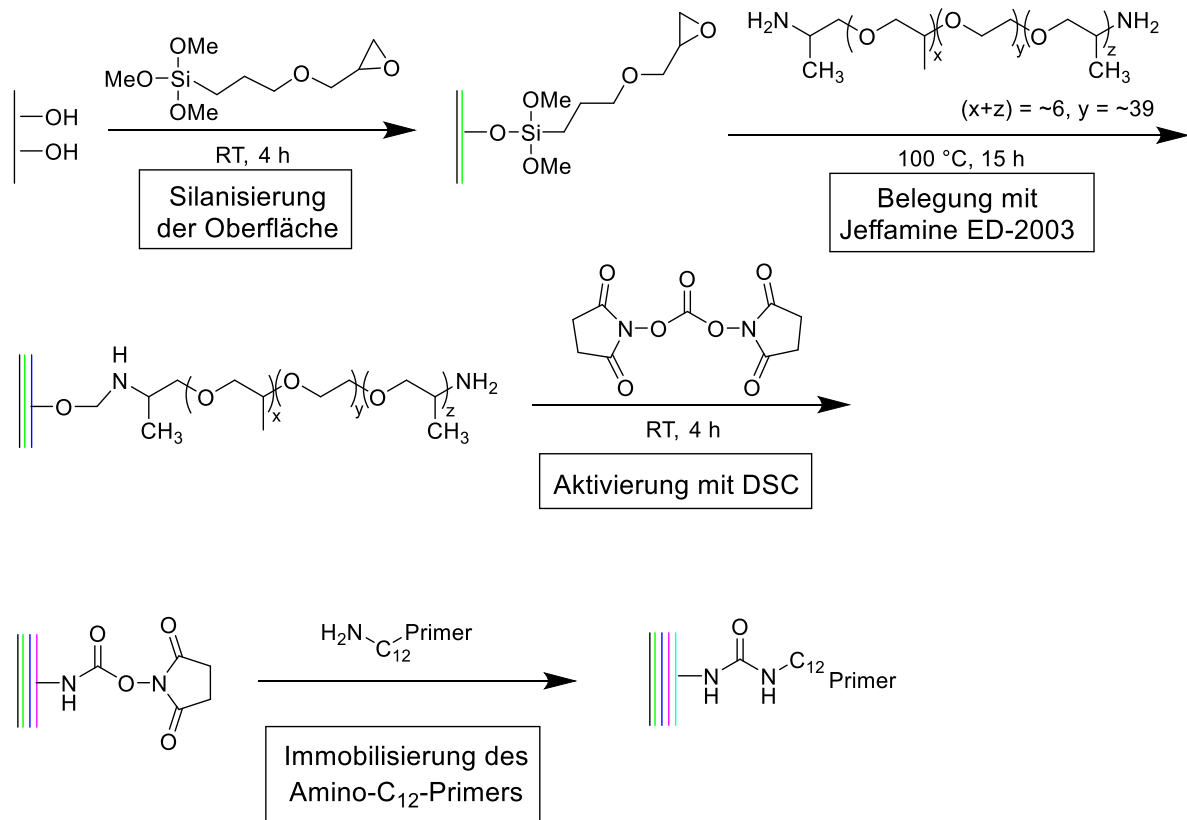
Sequenzierung der 16S – 23S rRNA-Gen *internal transcribed spacer*-Region (ITS) ermittelt. Auch bei Zhou et al. wird die 16S – 23S rRNA ITS-Region und zusätzlich die *gyrB*-Genregion auf dem PCR-basierten DNA-Mikroarray verwendet, um *L. pneumophila* und zehn andere Pathogene mittels 26 spezifischer Sonden zu detektieren und zu quantifizieren (LOD: 0,1 ng DNA bzw.  $10^4$  KBE mL<sup>-1</sup> Kultur) [296]. Von Zak et al. wurde ein DNA-Mikroarray entwickelt, auf welchem, basierend auf dem Array Tube System von Alere Technologies GmbH, 66 Virulenz-Gene identifiziert werden können, sensitiv genug für die Analyse der DNA aus nur einer Kolonie [297]. Die Virulenzgene, spezifisch für *L. pneumophila* Sg 1, codieren Strukturerelemente des Typ IV Sekretionssystemes (T4SS), Effektorproteine und T4SS-unabhängige Faktoren.

### **Heterogene asymmetrische RPA (haRPA)**

Die heterogene RPA wurde von Kersting et al. postuliert [298, 299] und als heterogene asymmetrische RPA (haRPA) von Kunze et al. [208] zur multiplexen Detektion von Bakterien und Viren auf einen Glas-Mikroarray übertragen. Die haRPA, wie bei Kunze et al. [208], wird auch in dieser Doktorarbeit verwendet. Die Primer zur Detektion und Quantifizierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* sind in Kober et al. [209] zu finden. Für die Durchführung des DNA-Assays haRPA wird der MCR 3 (MCR 3. Generation, s. Abbildung 9 a) verwendet.

Hierbei wurde die Oberfläche in einer am Institut für Wasserchemie und Chemischen Balneologie etablierten Methode stufenweise behandelt und aktiviert [211]. Jedoch wird hier anstelle DAPPG das Polyetheramin Jeffamine ED-2003 verwendet. In Abbildung 15 ist der genaue Ablauf dargestellt. Vor Beginn der Oberflächenbehandlung wird die Glas-Oberfläche gereinigt und mit Säuren vorbehandelt. Die freien OH-Gruppen auf der Oberfläche werden in einem nächsten Schritt mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) silanisiert, wodurch eine Epoxygruppe als Endgruppe erscheint. Diese wird in einem weiteren Schritt mit Jeffamine ED-2003 belegt. Das endständige Amin stellt hier eine recht stabile Endgruppe dar, der Chip ist in dieser Form im Exsikkator mehrere Wochen bis Monate lagerbar. Zur Anbindung der DNA-Primer an die modifizierte Oberfläche wird diese direkt vor dem Spotten aktiviert. Durch Verwendung von N,N'-Disuccinimidylcarbonat (DSC) in DMF wird über einen Aktivester der Primer mit Amino-C<sub>12</sub>-Modifikation angebunden. Zur Verhinderung einer unspezifischen Anbindung an der Oberfläche

werden die verbleibenden aktiven Gruppen an der Chip-Oberfläche nach dem Spotting mit TRIS-HCl geblockt.



**Abbildung 15: Chemische Darstellung der Oberflächenaktivierung und Anbindung der DNA-Primer während des Spotting-Prozesses auf Glas-Oberflächen.**

Bei der haRPA wird im Gegensatz zur homogenen RPA nicht nur in der Flüssigphase gearbeitet [208]. Der REV-Primer ist hierbei durch einen Amino- $\text{C}_{12}$ -Tag fest an der Oberfläche immobilisiert, wie es in Abbildung 15 und Abbildung 16 zu erkennen ist. Die Amplifikation findet jedoch ansonsten analog der homogenen RPA statt. Die Amplifikation direkt an der Chip-Oberfläche ist im rechten Teil von Abbildung 16 dargestellt. Der Rekombinase-Primer-Komplex scannt die vorhandene DNA nach der komplementären Sequenz und hilft beim Strangaustausch. Auch hier stabilisieren einzelstrangbindende Proteine den abgelösten DNA-Strang. Nach Amplifikation des Stranges durch die Polymerase kann der FW-Primer mittels Rekombinase-Primer-Komplex angebunden und die Amplifikation auf der Oberfläche vollendet werden. Der verwendete FW-Primer ist zur späteren Detektion hierbei biotinyliert. Zur Erhöhung der Sensitivität des Assays wird zudem mit einem asymmetrischen Primerverhältnis gearbeitet. Dies bewirkt die Bildung eines biotinylierten Amplifikationsproduktes in der Flüssigphase, wie in der linken Hälfte der Abbildung dargestellt. Aufgrund der gleichen

DNA-Sequenz kann dieses zudem am REV-Primer an der Oberfläche anbinden und dort amplifiziert werden. Dies erhöht die Amplifikationsausbeute an der Oberfläche und somit direkt die Sensitivität des Assays. Die Detektion der gebundenen Amplifikate erfolgt über CL, indem zuerst mit Streptavidin konjugiertes HRP zugegeben wird und anschließend die CL-Reagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid über den Chip geleitet werden.

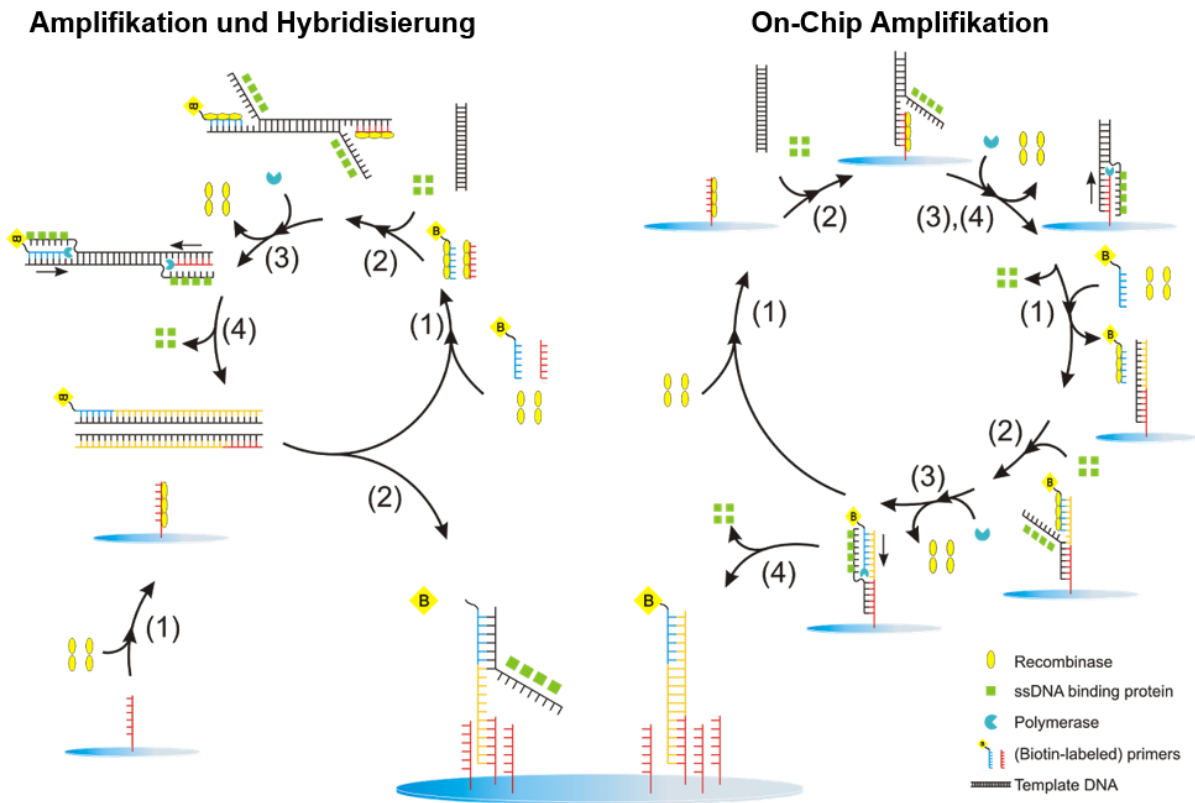


Abbildung 16: Schematische Darstellung der haRPA: Unmarkierter REV-Primer (rot, immobilisiert auf der Mikroarray-Chipoberfläche und in Lösung), Biotin-markierter FW-Primer (blau), Rekombinase (gelb), DNA-Doppelstrang (Schwarz), einzelstrangbindende Proteine (grün), strangversetzende Polymerase (türkis). Abdruck (angepasst) mit Genehmigung von Kunze et al. [208]. Urheberrecht (2019) American Chemical Society.

Wie bereits erwähnt, konnte die haRPA auch für die Detektion von Legionellen etabliert werden. Für die Detektion von *L. pneumophila* konnte hierbei ein Detektionslimit von 26 GU  $\mu\text{L}^{-1}$  erreicht werden [209]. Die Detektion von *Legionella* spp. wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher behandelt.

### 2.2.3.5 Lebensfähigkeits-Nachweis

Mit den DNA-Analysen kann nur die Gesamtzahl an Bakterien in der Probe definiert werden. Somit werden sowohl pathogene Bakterien (dies schließt lebende und solche

im VBNC-Status ein) und nicht mehr lebensfähige Bakterien, deren DNA noch im Wasser vorliegt, in der Summe erfasst. Nach der DNA-Extraktion liegt sämtliche DNA frei vor, daher wird in der DNA-Analyse ein Gesamtbild der vorliegenden DNA wiedergegeben. Es ist jedoch von großer Bedeutung den Anteil an pathogenen Bakterien in einer Probe zu erfahren, da nur pathogene Legionellen für die Infektion mit Legionellose relevant sind. Gerade durch die kulturelle Methode kann dieser Anteil jedoch aufgrund der Legionellen im VBNC-Status nicht richtig abgebildet werden und ist häufig zu niedrig [47]. Die Legionellen im VBNC-Status sind potentiell pathogen, da sie im entsprechenden Milieu und den richtigen Bedingungen wieder reaktiviert werden [49, 300]. Auch für Anlagen- und Kühlturm-Betreiber, sowie Biozidhersteller hat die Anzahl der pathogenen Legionellen ein hohes Interesse, da durch den Abgleich der Gesamtlegionellenzahl und der pathogenen Legionellen beispielsweise der erfolgreiche Gebrauch von Bioziden nach Positivbefund nachgewiesen werden kann.

Im Vergleich zur gängigen DNA-Quantifizierung werden beim Lebensfähigkeits-Nachweis, auch Lebend/tot-Differenzierung genannt, die Proben mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff vorbehandelt [301, 302]. Durch die positive Ladung dringen diese nur in die nicht-intakte Membran nicht-lebensfähiger Legionellen ein und interkalieren in deren doppelsträngige DNA. Häufig werden die Proben mit den photoreaktiven Farbstoffen Ethidiummonoazid (EMA) oder Propidiummonoazid (PMA) behandelt (s. Abbildung 17) [301] und anschließend mit DNA-Analysen, wie der RT-qPCR, analysiert [303-305].

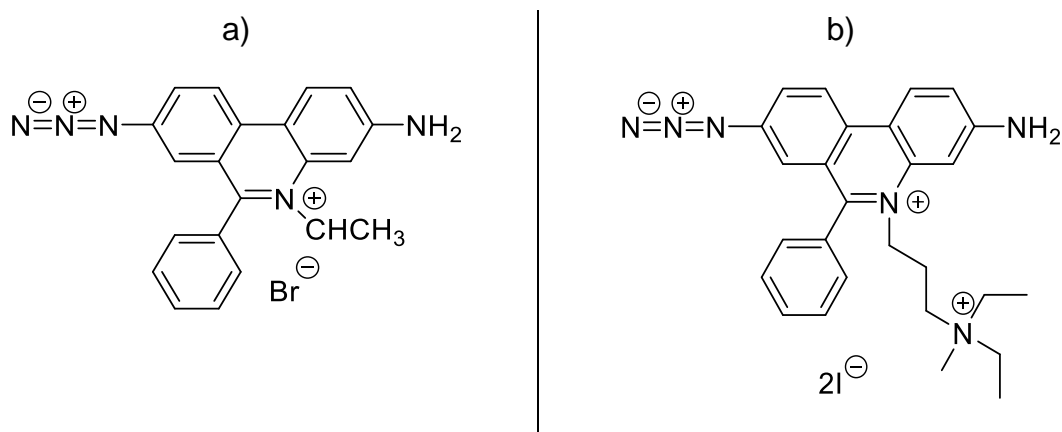
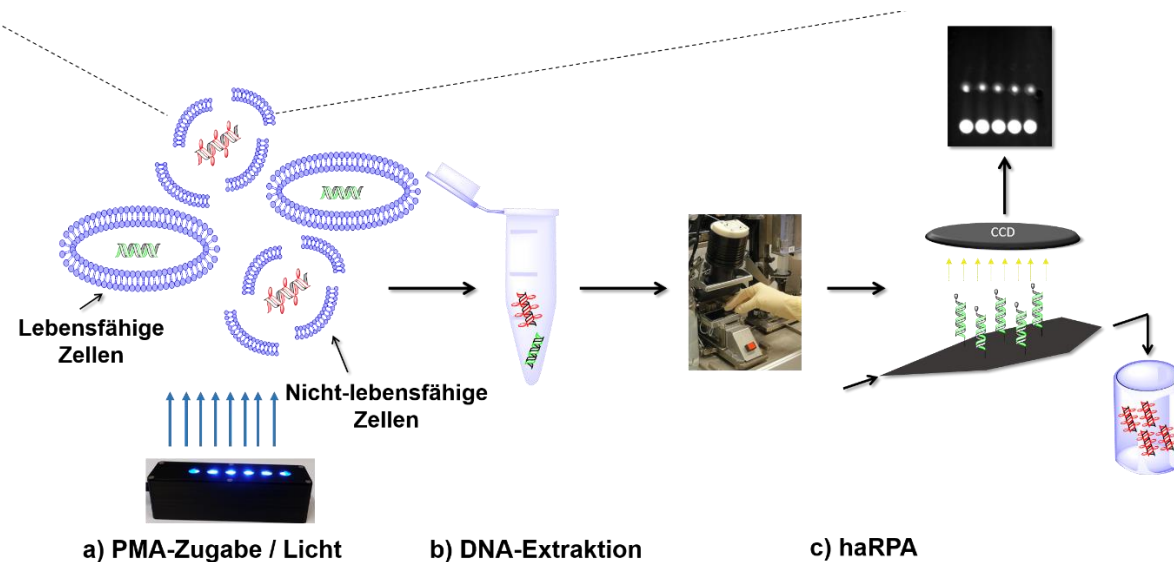
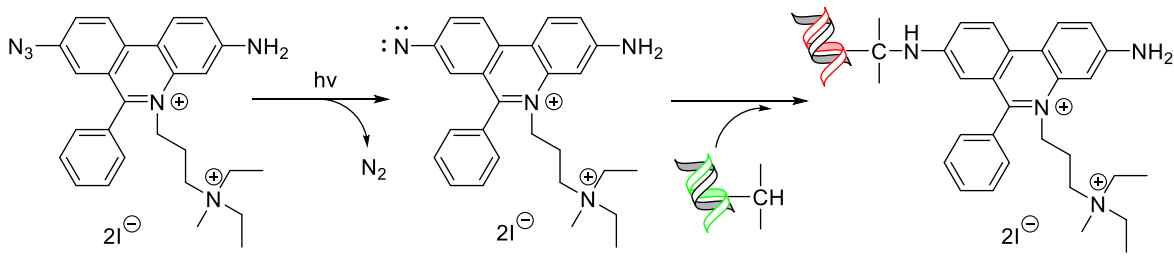


Abbildung 17: Darstellung von a) Ethidiummonoazid (EMA) und b) Propidiummonoazid (PMA)

PMA gilt hierbei als selektiverer Farbstoff, da er eine geringere Membranpermeabilität bei intakten Zellen als EMA aufweist. Ein möglicher Grund ist die zweifach positive Ladung des PMA gegenüber der einfach positiven Ladung des EMA [301, 303]. Hohe Konzentrationen können jedoch dazu führen, dass das PMA auch in lebende Zellen

eindringt [306]. Wie in Abbildung 18 mit PMA dargestellt, werden die Farbstoffe durch Beleuchtung mit blauem Licht ( $\lambda = 460 \text{ nm}$ ) angeregt (Photolyse), wodurch sich Stickstoff an der Azid-Gruppe abspaltet und ein hochreaktives Nitren entsteht [307, 308]. Dieses bindet durch CH-Insertionsreaktion kovalent an die CH-Bindungen der DNA, wodurch eine stabile Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung als kovalente DNA-Modifikation entsteht. Der überschüssige, nicht gebundene Farbstoff wird durch Reaktion mit Wasser oder Zellbestandteilen inaktiviert [309]. Durch diese Modifikation der Farbstoffe in die DNA der nicht mehr lebensfähigen Zellen werden diese bei anschließender Analyse durch Nukleinsäureamplifikationstests nicht mehr in der Gesamtmenge gemessen [301]. Es wird bei diesen Messungen somit nur die DNA lebensfähiger Bakterien quantifiziert, wodurch eine Lebend/tot-Differenzierung stattfindet, meist durch den Zusatz „*viability*“ im Methodennamen gekennzeichnet.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Lebensfähigkeits-haRPA mit chemischer Darstellung der Interkalation des PMAs in die DNA. Abbildung nach Kober et al. [209]**

Die qPCR ist eine bei der Lebend/tot-Differenzierung häufig verwendete Detektionsmethode. So wird bei Delgado-Viscogliosi et al. [305] EMA als Farbstoff in Kombination mit qPCR verwendet, um Warmwasser- und Umweltproben zu vermessen und den Informationsmehrwert der Lebensfähigkeits-Messungen



gegenüber herkömmlichen qPCRs zu zeigen. Bei Chang et al. kommt die EMA-qPCR zum Einsatz bei der Detektion von lebensfähigen Legionellen in Wasserproben aus Spas [310]. Doch auch PMA wird in Kombination mit der qPCR häufig verwendet, wie beispielsweise gezeigt von Yanez et al. bei der Detektion von *L. pneumophila* in Umweltproben [303]. Diese Kombination wurde auch bei Kontchou et al. gewählt. Hier wird in der qPCR das *mip*-Gen zum Nachweis von lebensfähigen *L. pneumophila* verwendet [311].

In vielen Fällen wird betont, dass die Ergebnisse über qPCR ohne PMA-Vorbehandlung einen deutlich höheren Wert ergeben, was die Inhibition der DNA durch den Farbstoff bestätigt, welche den Anteil nicht-lebensfähiger Organismen aus der quantifizierten Menge herausnehmen [312, 313]. Eine häufige Beobachtung ist zudem, dass die Messungen der lebensfähigen Mikroorganismen hier einen höheren Wert ergeben als die Kulturmethode [312, 314]. Dies erklärt sich dadurch, dass die Kulturmethode nicht alle lebensfähigen Mikroorganismen abbildet [94]. Organismen im VBNC-Status werden in der Lebend/tot-Differenzierung jedoch abgebildet, was in der Risikobewertung von Legionellen in Anlagen und Trinkwasser wichtig ist [47, 314].

Auch die PMA-Behandlung direkt auf Membranfiltern und anschließende qPCR ist möglich [315]. Bei Li et al. wird PMA als Vorbehandlung in einem Multiplex-qPCR-Assay zur simultanen Detektion von *L. pneumophila*, *Salmonella typhimurium* und *Staphylococcus aureus* verwendet [316].

Bei Delgado-Viscogliosi kommt zur Quantifizierung und Lebend/tot-Differenzierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* die Epifluoreszenz-Mikroskopie zum Einsatz [317]. AK-basiert und durch den Einsatz eines Lebensfähigkeits-Markers (ChemChromeV6) wird der Anteil der lebenden Organismen in Wasserproben mittels immunologischem Double-Staining (IDS) quantifiziert. In einem anderen Fall wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit der Festphasen-Zytometrie zur Lebend/tot-Differenzierung und der Zählung von VBNC-Zellen (LOD:  $3,4 \times 10^3$  Zellen L<sup>-1</sup>) von Warmwasser-, Kühlturm-, Thermalquellwasser und auch Süßwasserproben kombiniert [102].

Samhan et al. etablierten eine neue Detektionsmethode von lebensfähigen *L. pneumophila* direkt vor Ort in Anlagen [318]. Die Wasserprobe wird über einen Filter geleitet und dort aufkonzentriert. Auf diesem wird sie mit PMA behandelt und der Filter anschließend auf die Echtzeit-Amplifikations-Plattform Gene-Z [319] überführt, wo

ohne weitere Vorbehandlung (DNA-Extraktion oder –Aufreinigung) mittels LAMP eine Direktamplifikation des *16S rRNA*- und *cadA*-Genes stattfindet, welche auch direkt über Gene-Z ausgewertet werden kann. Gene-Z ist hierbei eine kompakte Plattform, bestehend aus einem mikrofluidischen Plastik-Einweg-Chip zur Durchführung der LAMP-Methode [319]. Die Plattform ist direkt über iPod Touch ansteuerbar und auch auslesbar.

In dieser Doktorarbeit wurde die zuvor für Legionellen entwickelte haRPA durch die Lebend/tot-Differenzierung mittels PMA-Behandlung erweitert, die sogenannte Lebensfähigkeits-haRPA oder auch *viability*- oder *v*-haRPA (siehe Abbildung 18) [209]. Die isotherme RPA und Lebend/tot-Differenzierung mittels PMA wurde in dieser Kombination für den Nachweis lebensfähiger Legionellen zuvor nicht realisiert. Hierbei werden die Proben mit PMA inkubiert, mit blauem Licht bestrahlt und die DNA extrahiert. Bei der anschließend durchgeführten haRPA wird dabei nur die DNA der zuvor lebensfähigen Legionellen amplifiziert. Der Ablauf der haRPA wird im Kapitel 2.2.3.4 „Heterogene asymmetrische RPA (haRPA)“ beschrieben.

## 2.2.4 Vergleich der Nachweismethoden

In Tabelle 3 sind die zuvor beschriebenen kommerziellen Verfahren zum Nachweis von Legionellen aufgeführt. Zum Vergleich wurden die Art des Analyten, die Probenmatrix, Dauer und Nachweisgrenze angegeben. Der Goldstandard der Kultur und Nachweisverfahren, welche Kultivierung benötigen, zeigen hier deutlich, dass sie entgegen immunologischer und molekularbiologischer Verfahren den Faktor Zeit einbüßen. Kulturunabhängige Verfahren sind um ein Vielfaches schneller und benötigen teilweise nur wenige Minuten bis zu einem Ergebnis. Verfahren, welche eine sehr kurze Analysezeit benötigen sind häufig rein qualitative Screening-Verfahren. Sie sind ideal geeignet für Ausschlussverfahren, wie sie in der Diagnostik oft benötigt werden. Die quantitativen immunologischen und molekularbiologischen Verfahren benötigen für die Quantifizierung von Wasserproben jeweils eine vorgeschaltete Aufkonzentrierung. Jedoch sind sie hier nichtsdestotrotz eine Alternative zum Goldstandard, da sie trotz Aufkonzentrierung und längerer Analysezeit immer noch einen entscheidenden Zeitvorteil bringen. Zudem wird bei der Kulturmethode häufig der tatsächliche Wert pathogener Legionellen unterschätzt, da Legionellen im VBNC-Statuts nicht erfasst werden [47]. Mit Methoden wie qPCR und auch Mikroarrays können zudem Multiplex-Messungen ermöglicht werden, durch die z.B.

*Legionella* spp., *L. pneumophila* oder auch die Serogruppen von *L. pneumophila* in derselben Probe simultan erfasst und quantifiziert werden können [225, 227].

**Tabelle 3: Vergleich kommerzieller Verfahren zum Nachweis von Legionellen**

| Methoden                                 | Produkt, Hersteller                                              | Analyt                                                           | Probenart                                                 | Dauer                         | NW-Grenze                     | Lit.       |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------|
| <b>Kulturabhängige Nachweisverfahren</b> |                                                                  |                                                                  |                                                           |                               |                               |            |
| Kultur                                   | Plattenkultur, Divers                                            | <i>Legionella</i> spp.                                           | Trink- und Nicht-Trinkwasser, Aerosole<br>Patientenproben | > 7 Tage                      | 1 KBE 100 mL <sup>-1</sup>    | [1, 320]   |
| Kultur                                   | Legiolert, IDEXX                                                 | <i>L. pneumophila</i>                                            | Trink- und Nicht-Trinkwasser                              | > 7 Tage                      | 1 KBE 100 mL <sup>-1</sup>    | [103]      |
| <b>Immunologische Nachweisverfahren</b>  |                                                                  |                                                                  |                                                           |                               |                               |            |
| Agglutinations-test                      | <i>Legionella</i> Latex Test, Oxoid                              | <i>L. pneumophila</i> Sg 1 und Sg 2 – 14                         | Patientenproben nach Kultur                               | 5 min, jedoch Kultur benötigt | Nicht definiert               | [119]      |
| Agglutinations-test                      | DrySpot™ Latex-Agglutinationstest, Thermo Scientific™            | <i>L. pneumophila</i> Sg 1, Sg 2 - 14 und Gruppe anderer Spezies | Umwelt- und Patientenproben nach Kultur                   | 5 min, jedoch Kultur benötigt | Nicht definiert               | [120, 121] |
| Agglutinations-test                      | Prolex™ <i>Legionella</i> Latex, Pro-Lab Diagnostics Inc.        | <i>L. pneumophila</i> Sg 1 und Sg 2 – 14                         | Kulturproben                                              | Nicht definiert               | Nicht definiert               | [122]      |
| FACS                                     | <i>L. pneumophila</i> Sg 1 Kits, rqmicro                         | <i>L. pneumophila</i>                                            | Wässrige Lösungen                                         | 2 h                           | 20 bis 50 Zellen pro Liter    | [139]      |
| ICT                                      | BinaxNOW™ <i>Legionella</i> Harnantigen-Test, Abbott             | <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                       | Patientenurin                                             | ca. 15 min                    | Nicht definiert               | [144]      |
| ICT                                      | <i>Legionella</i> V-Test, Coris BioConcept                       | <i>L. pneumophila</i>                                            | Patientenurin                                             | Nicht definiert               | Nicht definiert               | [145]      |
| ICT                                      | BIONEXIA® <i>Legionella</i> , bioMérieux                         | <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                       | Patientenurin                                             | ca. 15 min                    | Nicht definiert               | [146]      |
| ICT                                      | Xpect <i>Legionella</i> Test, Oxoid                              | <i>L. pneumophila</i> Sg 1 und 6                                 | Patientenurin                                             | 45 min                        | Nicht definiert               | [147, 148] |
| ICT                                      | Uni-Gold <i>Legionella</i> Urinary Antigen PLUS, Trinity Biotech | <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                       | Patientenurin                                             | ca. 15 min                    | Nicht definiert               | [149]      |
| ICT                                      | Immunocatch <i>Legionella</i> Sg 1, EIKEN                        | <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                       | Patientenurin                                             | ca. 15 min                    | Nicht definiert               | [150]      |
| ICT                                      | Lovibond, <i>Legionella</i> Industrial Test Kit                  | <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                       | Wasserproben                                              | 25 min                        | 105 KBE L <sup>-1</sup>       | [158]      |
| ICT                                      | Hydrosense, Zeller                                               | <i>L. pneumophila</i> Sg 1                                       | Wasserproben                                              | 25 min                        | 10 - 100 KBE mL <sup>-1</sup> | [159]      |
| IFA                                      | MonoFluo <i>Legionella</i> Färbe-Kit, Bio-Rad Laboratories       | <i>L. pneumophila</i>                                            | Patientenproben                                           | Nicht definiert               | Nicht definiert               | [167]      |

|     |                                                                                                    |                                          |                                 |                 |                                                                                                                         |               |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| IFA | Sofia <i>Legionella</i> FIA, Quidel                                                                | <i>L. pneumophila</i> Sg 1               | Urinproben                      | 15 min          | Knoxville:<br>2,3 × 10 <sup>3</sup> KBE mL <sup>-1</sup> ,<br>Camperdown:<br>8,4 × 10 <sup>4</sup> KBE mL <sup>-1</sup> | [165,<br>166] |
| IFA | <i>Legionella</i> Direct Fluorescent Antibody Test Kits, Pro-Lab Diagnostics                       | <i>L. pneumophila</i> Sg 1 und Sg 2 – 14 | Kulturisolate klinischer Proben | Nicht definiert | Nicht definiert                                                                                                         | [168]         |
| EIA | Binax™ <i>Legionella</i> -Harnantigen-EIA, Abbott                                                  | <i>L. pneumophila</i> Sg 1               | Urinproben                      | 2,5 h           | Nicht definiert                                                                                                         | [177,<br>321] |
| EIA | RIDASCREEN <i>Legionella</i> , R-Biopharm AG.                                                      | <i>L. pneumophila</i>                    | Urinproben                      | Nicht definiert | 1,5 ng mL <sup>-1</sup>                                                                                                 | [178]         |
| EIA | Legipid® Legionellen Schnelltest, EWK Kühltürme (entwickelt von Biótica Bioquímica Analítica S.L.) | <i>Legionella</i> spp.                   | 1 L-Kühlwasserproben            | 1 h             | 60 bis 10 <sup>6</sup> KBE L <sup>-1</sup>                                                                              | [180,<br>181] |

#### Molekularbiologische Nachweisverfahren

|        |                                                                            |                                                                                    |                                                              |                                   |                                                                                                       |               |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| RT-PCR | MutaPLEX®, Immundoagnostik                                                 | <i>Legionella</i> spp.,<br><i>L. pneumophila</i>                                   | Klinische und Umweltproben                                   | Mehrere Stunden                   | 2 KBE pro PCR-Reaktion                                                                                | [232,<br>233] |
| RT-PCR | EliGene® <i>Legionella pneumophila</i> UNI, Elisabeth Pharma               | <i>Legionella</i> spp.,<br><i>L. pneumophila</i>                                   | Sputum                                                       | Mehrere Stunden                   | 10 Genomische DNA pro PCR-Reaktion                                                                    | [234]         |
| RT-PCR | SureFast® <i>L. pneumophila</i> PLUS, R-Biopharm AG                        | <i>L. pneumophila</i>                                                              | Wasserproben                                                 | Mehrere Stunden                   | < 5 DNA-Kopien pro PCR-Reaktion                                                                       | [236]         |
| RT-PCR | mericon Quant <i>Legionella</i> spp. Kit, QIAGEN                           | <i>Legionella</i> spp.                                                             | Wasserproben                                                 | 73 min                            | 10 DNA-Kopien pro PCR-Reaktion                                                                        | [237]         |
| qPCR   | iQ-Check-System, BioRad                                                    | <i>L. pneumophila</i> ,<br><i>Legionella</i> spp.                                  | Wasserproben                                                 | 5 h                               | 5 GU pro PCR-Reaktion                                                                                 | [240]         |
| qPCR   | AquaScreen® qPCR Detection Kit, Minerva Biolabs®                           | <i>L. pneumophila</i> ,<br><i>Legionella</i> spp.                                  | Trinkwasser und Qualitäts-testung von Nutz- und Brauchwasser | 6 h                               | < 500 Mikroorganismen in 1000 L                                                                       | [242]         |
| qPCR   | GeneDisc® Technologie von Pall®                                            | <i>L. pneumophila</i> ,<br><i>Legionella</i> spp.                                  | Wasserproben                                                 | 2 h - 3 h                         | 5 GU pro PCR-Kavität                                                                                  | [244]         |
| qPCR   | microproof® <i>Legionella</i> Quantification LyoKit, Bioteccon Diagnostics | <i>Legionella</i> spp.,<br><i>L. pneumophila</i> und<br><i>L. pneumophila</i> Sg 1 | Wasser- und Umweltproben                                     | Nicht definiert                   | <i>Legionella</i> spp.:<br>3 GU pro PCR-Reaktion;<br><i>L. pneumophila</i> :<br>5 GU pro PCR-Reaktion | [245]         |
| FISH   | Scan VIT® <i>Legionella</i> . Vermicon                                     | <i>L. pneumophila</i> ,<br><i>Legionella</i> spp.                                  | Trink- und Kühlwasser                                        | 3 Tage für Kultur, Analyse in 3 h | 1 Zelle pro Probenvolumen                                                                             | [265]         |

## 2.3 Anwendung

In der Analytik von Legionellen gibt es verschiedene Bereiche, die unterteilt werden können. Je nach Art der Anwendung kommen dabei verschiedene der zuvor beschriebenen Nachweismethoden zum Einsatz. Als größte Anwendungsgebiete der Legionellenanalytik lassen sich in Deutschland die Trinkwasserverordnung, das Monitoring und auch die klinische Diagnostik nennen. Diese werden nachfolgend näher erläutert.

### 2.3.1 Trinkwasser-Verordnung

Wie schon zuvor erwähnt, sind Legionellen Bestandteil der deutschen Trinkwasser-Verordnung, da sie zu den Indikatorkeimen gehören und zu einer erhöhten Krankheitslast in Deutschland führen [1, 20]. Laut TwVO § 14b müssen jene Wasserversorgungsanlagen beprobt werden, welche Trinkwasser zu einer gewerblichen oder öffentlichen Tätigkeit abgeben, sie eine Einrichtung enthält, die Wasser vernebelt (z.B. Duschen) oder sich eine Großanlage zur Trinkwassererwärmung darin befindet. Im Falle einer gewerblichen, nichtöffentlichen Abgabe des Trinkwassers ist eine dreijährige Beprobung vorgeschrieben. In sämtlichen anderen Fällen ist ein einjähriger Beprobungszyklus Pflicht, wenn nicht anders durch das Gesundheitsamt vorgegeben. Bis 28. Februar 2019 war hier die ISO 11731:1998-05, DIN EN ISO 11731-2:2008-06 verpflichtende Vorschrift zur Beprobung. Seit spätestens 01. März 2019 ist hier jedoch die neue ISO 11731:2017-05 verpflichtend.

### 2.3.2 Reguläres Monitoring

Eine der größten Infektionsquellen stellen nach wie vor Verdunstungsrückkühlanlagen dar [39]. Diese waren jedoch viele Jahre nicht überwachungspflichtig und die Anlagen waren nicht einmal meldungspflichtig. In den letzten Jahren wurden daher, aufgrund der steigenden Zahlen der ans RKI gemeldeten Fälle [22], vermehrt Richtlinien und Verordnungen erlassen. Die VDI-Richtlinien 2047, Blatt 2 und 3, sind beispielsweise für die Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen erlassen worden [322, 323]. Die Richtlinie VDI 4250, Blatt 2, befasst sich dagegen mit der Umweltmedizinischen Bewertung von Bioaerosol-Immissionen und der Risikobewertung von legionellenhaltigen Aerosolen [324]. Auf diese Richtlinien folgte im Juni 2017 eine Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und

Nassabscheidern [98]. Im August 2017 trat zudem die 42. Bundesimmissionsschutzgesetz-Verordnung (42. BImSchV) [325] in Kraft. Diese regelt nun den hygienegerechten Betrieb und die regelmäßige Beprobung und Kontrolle von Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider, welche durch Versprühen oder Verrieselung des Wassers Aerosole in die umgebende Atmosphäre bringen. Die Quantifizierung der Proben findet hier nach wie vor über den gesetzlichen Standard, d.h. die Kultur nach DIN EN ISO 11731-2:2008-06, statt. Im Ausbruchsfalle können weitere Methoden hinzugezogen werden [320], siehe Kapitel 2.3.4.

### 2.3.3 Klinische Diagnostik

Die klinische Diagnostik gilt dem Nachweis einer Infektion bei einem erkrankten Patienten. Die Kultur ist auch hier nach wie vor die Referenzmethode und wird routinemäßig immer ausgeführt [28]. Der Nachweis dauert hier zwei bis vier Tage, die Kultur kann mit Sputum, Bronchoalveolärer Lavage (BAL) oder Material aus Lungenbiopsien durchgeführt werden. Heutzutage gibt es jedoch eine Vielzahl an Methoden, welche den kulturellen Nachweis durch schnellere Ergebnisse verbessern und die erhaltenen Informationen erweitern und ergänzen [97]. Eine sehr häufig verwendete und vor allem sehr schnelle Methode sind die Urintests. Hier wird das Antigen LPS im Urin der Patienten nachgewiesen. Kommerziell erhältlich sind bisher jedoch nur Schnelltests zur Bestimmung der Sg 1 oder 6. Durch Nukleinsäureamplifikation, beispielsweise durch qPCR, kann ein schneller Nachweis der Legionellen erfolgen. Hier kann, je nach amplifizierter Zielsequenz, zwischen *Legionella* spp. und *L. pneumophila* bzw. deren Serogruppen unterschieden werden. Serologische Tests weisen die AK im Blut nach. Diese können allerdings frühestens nach ca. zehn Tagen nachgewiesen werden [97]. Häufig ist ein eindeutiger Titeranstieg jedoch erst nach sechs oder mehr Wochen eindeutig nachzuweisen [39]. Wichtig ist in der Diagnostik aber nicht nur der Nachweis einer Infektion mit Legionellen. Auch eine Aufklärung bezüglich einer Typisierung ist von Bedeutung, da diese auch immer zur Infektionsquelle zurückführt, welche nicht nur im Ausbruchsfall wichtig ist.

Für die Phänotypisierung von Legionellen gibt es, wie bereits beschrieben, das sogenannte Dresden-Panel [113, 114, 116, 326]. Mit Hilfe dieses Panels kann eine Typisierung der verschiedenen Serogruppen von *L. pneumophila* und der Sg 1

Subgruppen durchgeführt werden. Durch den mAb 3/1 kann beispielsweise auch eine Einteilung in die Pontiac-Gruppe erfolgen, welche die pathogenere und im Ausbruchsgeschehen somit relevantere Gruppe darstellt. Hierbei kann sowohl indirekte Immunfluoreszenz, als auch ein indirekter EIA/ELISA verwendet werden. Beide Methoden können mit gezüchtete Kulturen aus sowohl Umweltproben als auch klinischen Proben (häufig des unteren Respirationstraktes, z.B. bronchoalveoläre Lavage (BAL), Sputum) und direkt aus Wasser- und Urinproben infizierter Patienten durchgeführt werden. Auch nach Beginn der Antibiotika-Behandlung kann somit noch eine Typisierung durchgeführt werden, weil das Antigen im Urin noch mehrere Wochen, teilweise bis zu einigen Monaten [143], im Patientenurin nachgewiesen werden kann [97, 161]. Das ist ein großer Vorteil des Antigen-Tests. Des Weiteren kann das Antigen auch nachgewiesen werden, wenn keine Pneumonie auftritt [161]. Proben, die nach Phänotypisierung nicht weiter unterschieden werden können, werden über Genotypisierung weiter differenziert.

Zur Genotypisierung, welche den exakten Abgleich der Patientenproben mit den Ausbruchsquellen erlaubt, wird häufig die SBT [246, 247, 251] oder auch PFGE verwendet [97]. Hierbei kann der exakte Sequenztyp festgestellt werden, wodurch Proben eindeutig miteinander in Verbindung gebracht werden können.

### **2.3.4 Verhalten im Expositionsfall**

In den letzten Jahren kam es zu diversen Legionellose-Ausbrüchen in Deutschland, wie z.B. in Ulm 2010, Warstein 2013, Jülich 2014 und Bremen in 2015/ 2016. Von einem Ausbruch ist prinzipiell bei mehr als zwei infizierten Patienten innerhalb von ein bis zwei Wochen im Einzugsgebiet die Rede. Die zeitnahe Feststellung eines Ausbruchs ist häufig schwierig, da die atypische Pneumonie oft verkannt und anders behandelt wird und eine Meldung an die Gesundheitsämter spät oder gar nicht geschieht [39, 327]. Im Falle eines Ausbruchs wird zu Beginn die Diagnose durch Typisierungs-Abgleich der infizierten Patienten gesichert. Die epidemiologische Typisierung ist hier zwingend, um die Ausbruchsquelle zweifelsfrei festzustellen [74]. Wie bereits erklärt, gibt es für die Typisierung zwei nacheinander folgende Abläufe. Für die Phänotypisierung kommt hier die Typisierung über monoklonale AK zum Einsatz [113]. Proben, welche keine weitere Differenzierung in der Genotypisierung erlauben, werden weiter über SBT durch die Teilstück-Sequenzierung von sieben verschiedenen Genen analysiert [114].

Bei den vergangenen Ausbrüchen in Deutschland gab es jedoch noch keinen allgemein gültigen Katalog über das exakte Vorgehen im Ausbruchsfall. Aus diesem Grund wird im Zusammenhang mit dem LegioTyper-Projekt eine (VDI)-Richtlinie erarbeitet, die VDI-MT 4259 Blatt 1 „Maßnahmenkatalog bei Verdacht auf emissionsbedingte Legionellose-Ausbrüche. Identifizierung und Untersuchung Aerosol-emittierender Umweltquellen im Rahmen von Legionellose-Ausbrüche“. Diese Richtlinie gibt die erforderlichen Schritte im Ausbruchsfalle künftig vor und regelt die Verantwortlichkeiten.



## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Heterogene asymmetrische RPA (haRPA)

In der heutigen Trinkwasseranalytik ist, wie bereits erwähnt, die Kultur noch immer der Goldstandard. In der Routineanalytik und im Monitoring von Wohnhäusern, öffentlichen Einrichtungen oder Verdunstungsrückkühlwerken und Kühltürmen sind jedoch Zeit und Genauigkeit wichtige Faktoren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde aus diesem Grund an neuen Möglichkeiten geforscht, legionellenhaltige Proben schnell und effizient zu quantifizieren und verschiedene weitere Fragestellungen zu beantworten. Zur schnellen Detektion und Quantifizierung wurde hier die haRPA für Legionellen entwickelt, welche *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in Wasserproben detektiert und quantifiziert. Hierzu wurden verschiedene Primer, die auf unterschiedliche Gensequenzen ansprechen, auf der Oberfläche immobilisiert. Zur Unterscheidung zwischen *L. pneumophila* und *Legionella* spp. amplifizieren die Primerpaare zwei Gensequenzen, jeweils eine im *mip*- und *16S rRNA*-Gen [99, 216, 222]. Zur Detektion der Spezies *L. pneumophila* wurde eine Sequenz im *mip*-Gen (*macrophage infectivity potentiator*) gewählt. Dieses findet sich zwar in allen *Legionella* spp., jedoch weist die Spezies *L. pneumophila* deutliche Sequenzunterschiede gegenüber anderen Spezies auf und ist somit gut zu separieren. Die Detektion aller *Legionella* spp. erfolgt über das *16S rRNA*-Gen, welches in allen Legionellen-Spezies konserviert vorliegt und eine simultane Detektion der Spezies ermöglicht. Die Primer für diesen Assay wurden bereits im Rahmen meiner Masterarbeit „Entwicklung eines Chemilumineszenz-DNA-Mikroarray für die isotherme Amplifikation und Detektion von Legionellen in Realproben auf dem MCR 3“ 2015 entwickelt und getestet [328]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Methode weiterentwickelt und mit anderen gängigen Methoden verglichen. Es wurde sich zudem der Fragestellung gewidmet, ob eine simultane Detektion, also eine Duplexmessung, in Anwesenheit beider Gene und beider Primerpaare möglich ist. Da Wasserproben im Vergleich zu ihrem Ausgangsvolumen häufig eine verhältnismäßig geringe Konzentration an Pathogenen aufweisen, wurde der haRPA hier eine Aufkonzentrierung vorgeschaltet, um die Konzentrationen realer Wasserproben in einen messbaren Konzentrationsbereich der haRPA zu bringen. Hierfür wurde eine bereits für Legionellen etablierte Adsorptions-Elutions-Aufkonzentrierungsmethode mit

10 L-Probenvolumen [206] in der Anwendbarkeit für die haRPA getestet und zudem diese Methode auf eine Anreicherung bei pH 7 angepasst und für geringere Probenvolumina optimiert. Gerade in der Routineanalytik sind geringere Volumina für die schnelle und effiziente Handhabung essentiell. Die Probenvorbereitung sollte minimal sein, weswegen eine Anreicherung bei pH 7 vorteilhaft ist.

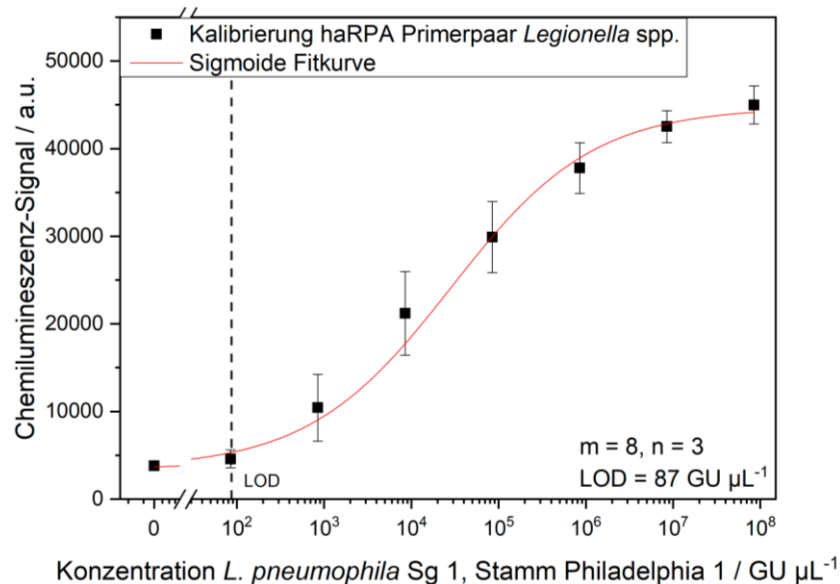
Des Weiteren wurde die haRPA in dieser Doktorarbeit durch die Lebensfähigkeits-haRPA erweitert, welche die Unterscheidung lebensfähiger und nicht-lebensfähiger Legionellen in derselben Probe zulässt. Durch die haRPA wird die Gesamtzahl der Zellen in der Probe, also auch die freie DNA und DNA toter Zellen, ermittelt. Durch die Vorbehandlung mit Propidiummonoazid (PMA) in der Lebensfähigkeits-haRPA wird die Messung dieser DNA verhindert und ausschließlich DNA lebensfähiger Zellen ermittelt. Für Biozid-Hersteller beispielsweise ist die Effizienz ihrer Biozide sehr wichtig. Die Kombinationsmessung haRPA und Lebensfähigkeits-haRPA ermittelt nicht nur die Gesamtzahl an Legionellen in der Probe, sondern auch die Anzahl lebensfähiger Legionellen. Somit kann nach Biozidgebrauch eindeutig die Effizienz der verwendeten Mittel bewiesen werden.

In der Trinkwasserverordnung in Deutschland wird zum momentanen Zeitpunkt (Stand März 2019) lediglich der Nachweis und die Quantifizierung von *Legionella* spp. verlangt. Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde daher ausschließlich mit dem Primerpaar für die Quantifizierung für *Legionella* spp. gearbeitet. Ausgenommen sind die Messungen im Duplex, bei denen mit den Primerpaaren für *Legionella* spp. und *L. pneumophila* gearbeitet wurde. Auf der Chip-Oberfläche wurden jedoch bei allen Messreihen REV-Primer für beide Detektionen immobilisiert. Somit konnten Kreuzreaktivitäten der Primer untereinander und mit den in der Arbeit verwendeten Proben generell ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

### 3.1.1 Kalibrierung der haRPA

In einer vorangegangenen Doktorarbeit zur Entwicklung der haRPA auf dem MCR 3 wurde der Mikroarray-Chip im MCR 3 direkt inkubiert [329]. Es wurde jede Flusszelle einzeln befüllt und 40 min im Gerät inkubiert. Nach Inkubationszeit wurde der Chip durchspült und vermessen. Für die Messung eines Chips mit zwei Flusszellen, wie hier in der Anwendung, wird mit Probenvorbereitung eine Messzeit von knapp 2 h benötigt. Mit Vorbereitung des Gerätes am Morgen und Spülen am Ende des Messtages ergibt

sich hier eine Messung von maximal drei Mikroarrays pro Messtag. In dieser Doktorarbeit wurde daher außerhalb des Gerätes inkubiert. Hierfür wurden beide Flusszellen gleichzeitig befüllt, der Chip versiegelt und 40 min außerhalb des Gerätes im 39 °C-Inkubator inkubiert. Nach 40 min wurden im MCR 3 beide Flusszellen durchspült, um weitere Nukleinsäure-Amplifikation zu verhindern und die Flusszellen einzeln zu vermessen. Durch Staffelung in der Inkubation konnten bis zu zehn Mikroarray-Chips pro Tag vermessen und der Durchsatz der haRPA verdreifacht werden. Der verwendete Stamm, *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1, ist ein Mitglied der hochpathogenen Pontiac-Gruppe und somit häufig Auslöser der Legionellose-Infektion. Die Kalibrierung wurde in Leitungswasser hergestellt. In Abbildung 19 ist die Kalibrierkurve für die Quantifizierung von *Legionella* spp. zu sehen, die Stamm-Suspension wurde in GU  $\mu\text{L}^{-1}$  quantifiziert.



**Abbildung 19: Sigmoidale Auftragung der CL-Signalintensitäten in der Kalibrierung mit dem Primerpaar für die Detektion von *Legionella* spp., durchgeführt mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 [209].**

Die CL-Signalintensitäten wurden gegen die Konzentration der genomischen DNA halblogarithmisch aufgetragen. Wie zu erkennen ist, stieg die CL-Signalintensität überhalb einer Konzentration von  $10^2$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$  an. Bei halblogarithmischer Auftragung ergibt die Kalibrierung einen sigmoidalen Verlauf. Durch das Berechnen des mittleren CL-Signals aus Leerwertmessungen ( $n = 3$ ) addiert mit dreifacher Standardabweichung wurde ein LOD von 87 GU  $\mu\text{L}^{-1}$  bestimmt. Der Arbeitsbereich, hier definiert als der Bereich von 20 % bis 80 % des Signals vom Maximalwert, errechnete sich hier im Bereich von  $2,1 \times 10^3$  bis  $3,8 \times 10^5$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$ .

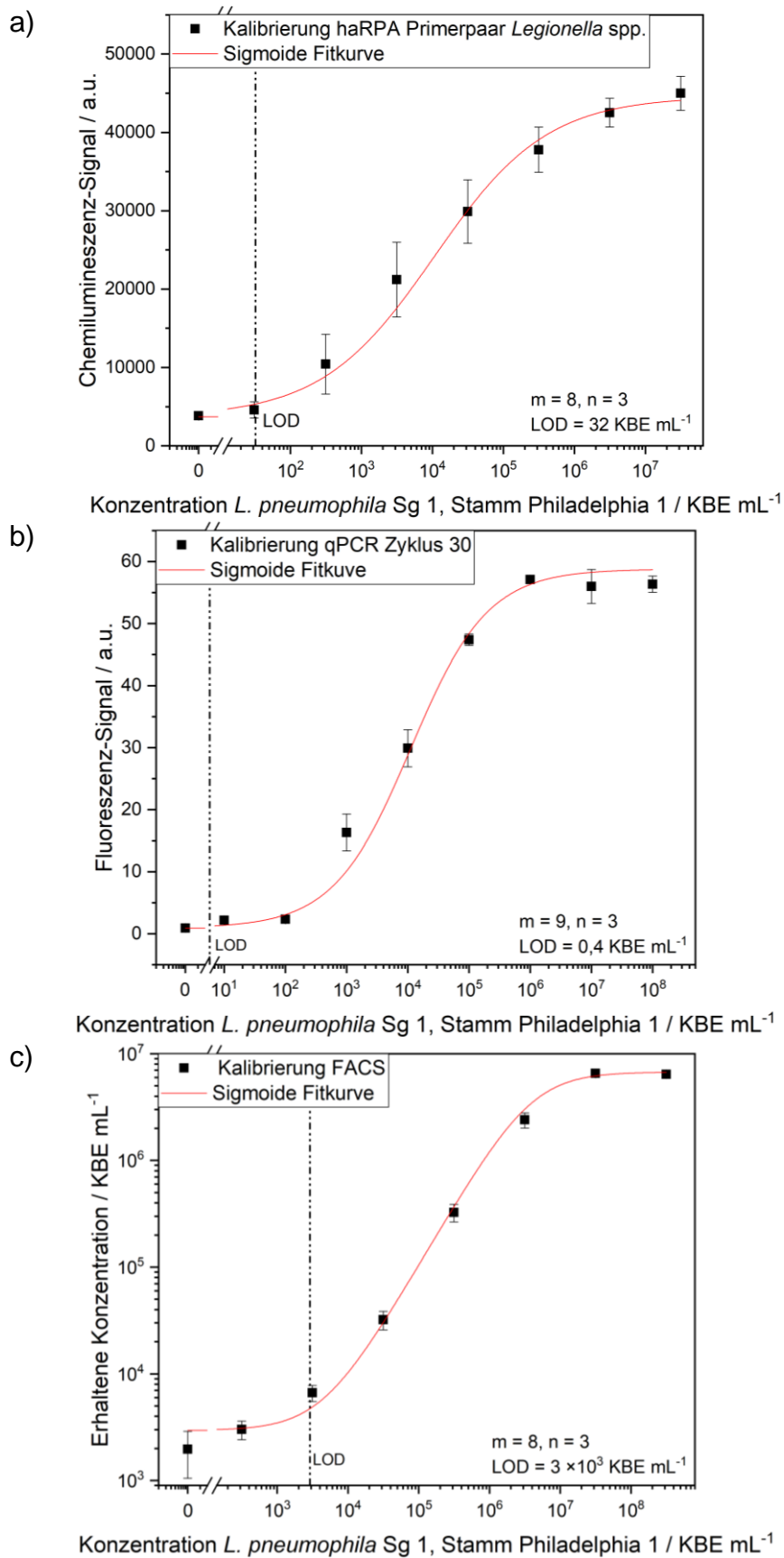


Abbildung 20: Auftragung der Signalintensitäten bzw. koloniebildene Einheiten in der Kalibrierung mit a) haRPA, b) qPCR und c) FACS. Durchgeführt wurden die Messungen mit denselben DNA-Extrakten bzw. aus derselben Stamm-Suspension *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1.

Zum Vergleich mit den Referenzmethoden qPCR und FACS wurde die Stammsuspension in einer weiteren Auftragung (Abbildung 20 a) in KBE mL<sup>-1</sup> quantifiziert und die Messwerte in dieser Skalierung aufgetragen. Die qPCR wurde hier analog zur haRPA mit den gleichen DNA-Extrakten durchgeführt, mit qPCR-Primern aus dem BMBF-Projekt „Path<sub>2</sub>ogenscan“. FACS und Kultur wurden direkt aus der Stammsuspension durchgeführt, welche in Leitungswasser verdünnt wurde. In Abbildung 20 a, b und c sind die Kalibrierkurven der drei verschiedenen Methoden haRPA, qPCR und FACS zum direkten Vergleich untereinander aufgetragen. Das erhaltene Signal bzw. die Menge an Kolonien wurde hierbei immer halblogarithmisch bzw. im Falle von FACS doppellogarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen. Bei der qPCR wurde das Fluoreszenz-Signal bei Zyklus 30 angegeben. Die erhaltenen LODs und Arbeitsbereiche sind in Tabelle 4 angegeben.

**Tabelle 4: Ergebnisse der Vergleichsmessungen mit Referenzanalytik. Angegeben sind LOD und Arbeitsbereich der Messungen mit haRPA, qPCR und FACS.**

| Methode (n = 3) | LOD / KBE mL <sup>-1</sup> | Arbeitsbereich / KBE mL <sup>-1</sup> |
|-----------------|----------------------------|---------------------------------------|
| haRPA           | 32                         | $5,1 \times 10^2 - 2,1 \times 10^5$   |
| qPCR            | 0,4                        | $9,8 \times 10^2 - 1,1 \times 10^5$   |
| FACS            | 2900                       | $8,6 \times 10^5 - 1,8 \times 10^7$   |

Wie man Abbildung 20 erkennen kann, ergab die Auftragung der Signale bei allen drei Methoden einen sigmoiden Verlauf der Signale bzw. Kolonienzahl. Bei der haRPA wurde somit ein LOD von 32 KBE mL<sup>-1</sup> und ein Arbeitsbereich von  $5,1 \times 10^2$  bis  $2,1 \times 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup> bestimmt. Im direkten Vergleich zeigte sich bei der qPCR ein niedrigerer LOD von 0,4 KBE mL<sup>-1</sup>, der Arbeitsbereich erstreckte sich im Bereich von  $9,8 \times 10^2$  bis  $1,1 \times 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>. Beim FACS ergab sich ein LOD von  $2,9 \times 10^3$  KBE mL<sup>-1</sup> und ein Arbeitsbereich von  $8,6 \times 10^5 - 1,8 \times 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>. Die qPCR lag in der Nachweisgrenze etwa zwei Log-Stufen unterhalb der haRPA in einem niedrigeren Bereich, wodurch die qPCR sensitiver ist. Betrachtet man den Arbeitsbereich der Kalibrierungen, so wies die haRPA hier einen breiteren Bereich auf und erlaubt somit Quantifizierung in einem breiteren Spektrum und beginnt bei einer niedrigeren Konzentration. Das FACS wies im Vergleich zur haRPA einen sehr hohen LOD auf, der zwei Log-Stufen oberhalb des LODs der haRPA lag. Auch der Arbeitsbereich lag drei Log-Stufen über dem der haRPA. Gegenüber dem FACS war die haRPA hier um ein Vielfaches sensitiver, zudem war der Arbeitsbereich breiter.

Die geringere Sensitivität der haRPA gegenüber der qPCR lässt sich hier durch die unterschiedliche Durchführungsweise erklären. Bei der haRPA werden 52  $\mu\text{L}$  Reaktionsgemisch, welches 5  $\mu\text{L}$  DNA enthält, in die Flusszelle gegeben. Die Mischung ist somit im Verlaufe der Inkubationszeit über die gesamte Fläche der Flusszelle verteilt. Daher kann nicht dauerhaft gewährleistet werden, dass die benötigten Reagenzien über die gesamte Inkubationszeit örtlich nahe an den immobilisierten Primern vorhanden sind. Hierbei kann es zu Signalverlust kommen. Bei der qPCR findet die Amplifikation homogen verteilt in einer Kavität einer Mikrotiterplatte statt, in der sich die DNA und auch Enzyme durch Diffusion gut verteilen können. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit der Nukleinsäureamplifikation erhöht. Zudem wird jedes Amplifikat erfasst und trägt zur Sensitivitätssteigerung bei. Um die Sensitivität der haRPA zu erhöhen, könnte die Menge an Spots der immobilisierten Primer auf der Chipoberfläche erhöht werden und zudem räumlich über den Chip verteilt werden, so dass DNA und die in der Flüssigphase gebildeten Amplifikate an mehreren Stellen in der Flusszelle an diesen angebinden werden könnten. Eine Verkleinerung der Flusszelle würde hier zu einer gleichzeitigen Verringerung des Probenvolumens führen, wodurch keine Sensitivitätssteigerung erbracht werden könnte.

### 3.1.2 Duplexmessungen

Die bisher gezeigten Messungen wurden im Singleplex durchgeführt, da in der Flüssigphase zur Amplifikation nur ein Primerpaar zugegeben wurde. In der folgenden Machbarkeitsstudie wurden Duplexmessungen durchgeführt. Eine Duplexmessung würde eine gleichzeitige Detektion von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in nur einer Messung ermöglichen. Hierfür wurden der Flüssigphase die Primer für die Detektion sowohl von *Legionella* spp. als auch *L. pneumophila* zugegeben. Wie zuvor beschrieben, wurden die Gensequenzen von zwei verschiedenen Genen parallel amplifiziert. Für die Detektion von *Legionella* spp. wurde eine Sequenz des 16S rRNA-Genes amplifiziert, die in allen Legionellen-Spezies konserviert ist. Für die Detektion der Spezies *L. pneumophila* wurde das *mip*-Gen amplifiziert, welches eine spezifische Sequenz für diese Spezies besitzt. Bei den Duplexmessungen ist es wichtig, dass beide Primerpaare unabhängig von der Anwesenheit des anderen Primerpaares amplifiziert werden. Bei einer Probe, welche *L. pneumophila* enthält, sollte somit an beiden immobilisierten REV-Primern amplifiziert werden, da beide zu amplifizierenden

Gene in der DNA der Probe vorhanden sind. Anders verhält es sich bei einer Probe, welche *Legionella* spp., jedoch eine *non pneumophila*-Spezies, enthält. Hier sollte bei Anwesenheit beider Primerpaare nur am immobilisierten Primerpaar für *Legionella* spp. amplifiziert werden, da hier lediglich die *16S rRNA*-Gensequenz, nicht aber die richtige *mip*-Gensequenz vorliegen sollte.

**Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen der Primer-Mixe (PM) in Duplex-Messungen.**

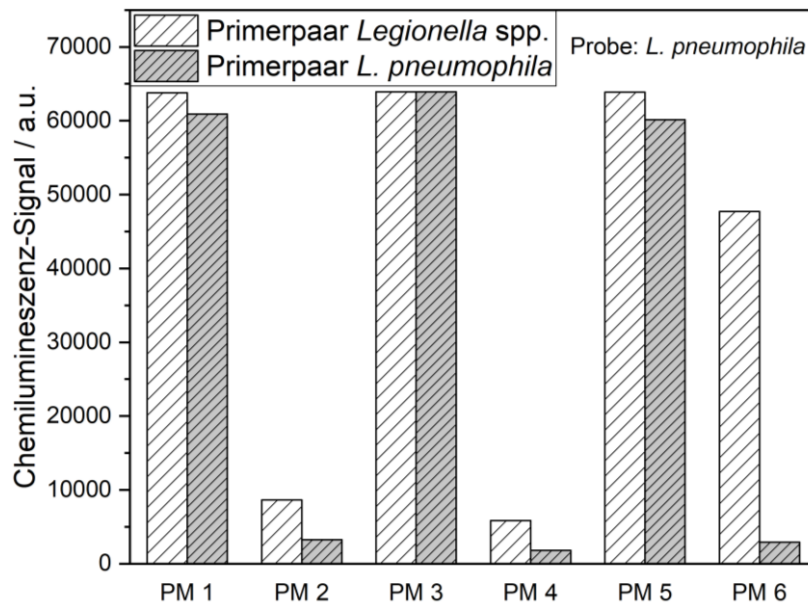
| Gen         | <i>16S rRNA</i> |       | <i>mip</i> |       |
|-------------|-----------------|-------|------------|-------|
| Primer      | FW-bio          | REV   | FW bio     | REV   |
| <b>PM 1</b> | 930 nM          | 93 nM | 930 nM     | 93 nM |
| <b>PM 2</b> | 930 nM          | --    | 930 nM     | --    |
| <b>PM 3</b> | 420 nM          | 42 nM | 420 nM     | 42 nM |
| <b>PM 4</b> | 420 nM          | --    | 420 nM     | --    |
| <b>PM 5</b> | 300 nM          | 30 nM | 300 nM     | 30 nM |
| <b>PM 6</b> | 300 nM          | --    | 300 nM     | --    |

In ersten Messungen wurden verschiedene Primer-Verhältnisse getestet. Hierbei wurden der Flüssigphase jeweils beide biotinylierte FW-Primer zugegeben. Der REV-Primer wurde der Flüssigphase nicht immer zugefügt, somit wurde im Duplex eine heterogene RPA (ohne freien REV-Primer) und eine heterogene asymmetrische RPA (mit freiem REV-Primer) durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen der Primer-Mixe (PM) sind in Tabelle 5 angegeben.

Es sollte gezeigt werden, dass eine simultane Detektion beider Gene in einer Probe möglich ist. Diese Versuche wurden mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 in Einzelmessungen ( $c = 10^5 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ ) durchgeführt. Da die Messung mit einem *pneumophila*-Stamm durchgeführt wurde, ist hier zu erwarten, dass an beiden immobilisierten Primern ein Signal zu erkennen sein sollte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 a dargestellt. Die erhaltenen CL-Signalintensitäten wurden für jeden verwendeten Primer-Mix nebeneinander aufgetragen. Die Signale an beiden immobilisierten REV-Primern wurden dabei getrennt angegeben. Die heterogene Amplifikation ohne freien REV-Primer in der Flüssigphase (PM 2, 4 und 6) erzeugte eine sehr niedrige CL-Signalintensität bei allen gewählten Verhältnissen. PM 2 und 4 zeigten an beiden REV-Primern ein CL-Signal von maximal etwa 16 % des Maximalsignals bei einer Konzentration von  $c = 10^5 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ . Für PM 6 war das CL-

Signal am Primer für *Legionella* spp. zwar von höherer Intensität (88 % des Maximalsignals), zeigte jedoch am Primer für *L. pneumophila* ein sehr geringes Signal (5 % des Maximalsignals). Die Zugabe des freien REV-Primers und Durchführung der RPA als heterogene asymmetrische RPA schien demnach essentiell für eine gute Signalausbeute zu sein. Bei PM 1, 3 und 5 war die CL-Signalintensitäten nahe der Kamerasättigung für beide Primerpaare. Eine simultane Messung in Anwesenheit beider Gene wäre mit allen drei Konzentrationsverhältnissen möglich.

a)



b)

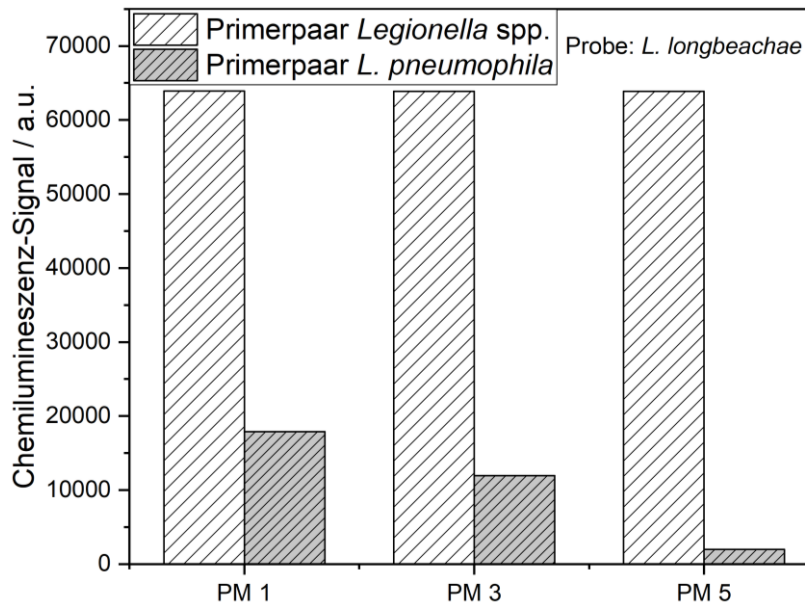


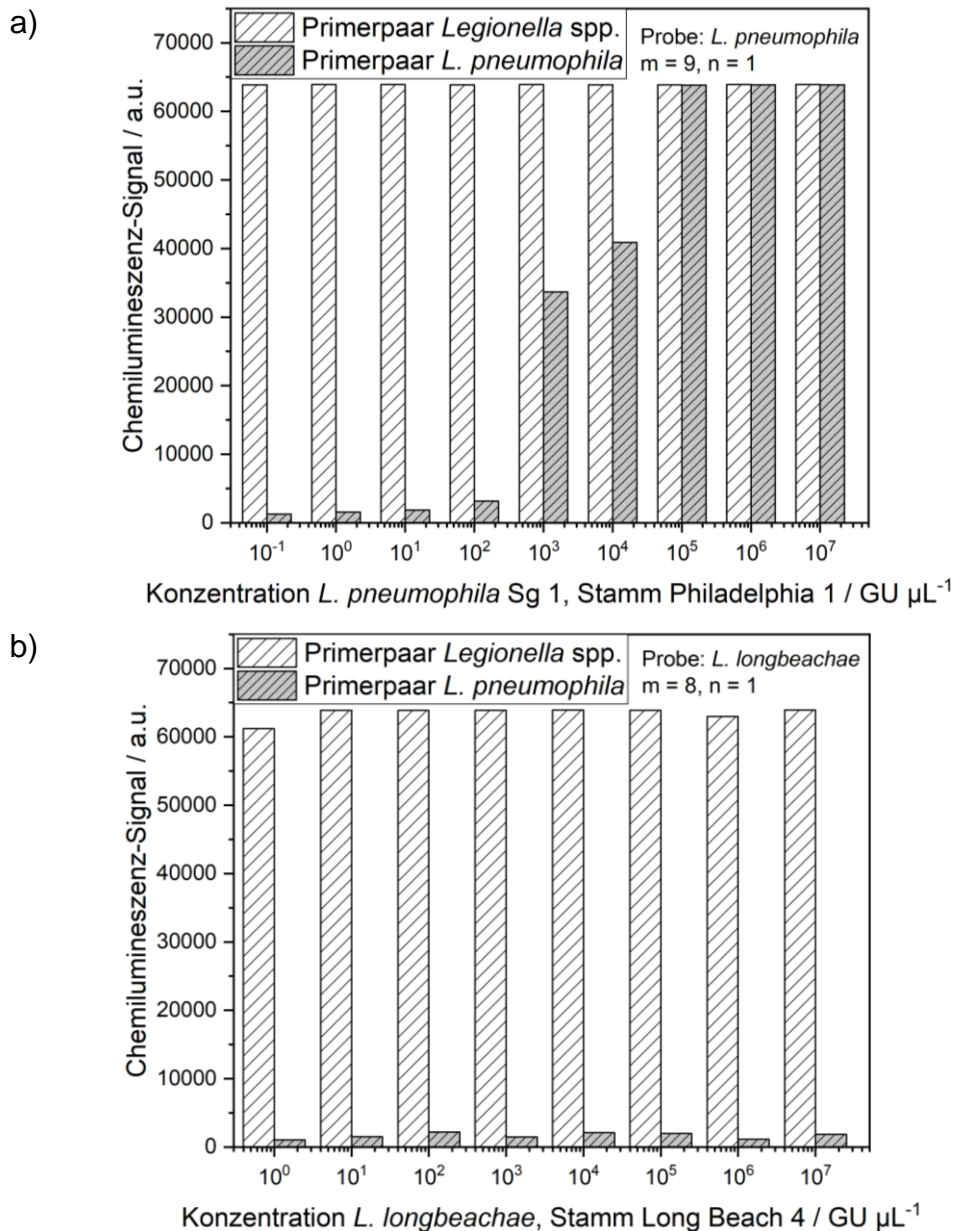
Abbildung 21: Versuchsreihe zur Etablierung von Duplexmessungen, durchgeführt in Einfachmessungen. Getestet wurden 6 verschiedene Primer-Mixe (PM). Die Messungen wurden durchgeführt mit a) *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 ( $c = 10^5 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ ) und b) *L. longbeachae*, Stamm Long Beach 4 ( $c = 10^5 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ ).



Die Versuche mit der *non pneumophila*-Spezies wurden mit *L. longbeachae*, Stamm Long Beach 4 ( $c = 10^5 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ ) durchgeführt. Da hier mit einem *non pneumophila*-Stamm gemessen wurde, ist demnach nicht mit CL-Signal an beiden immobilisierten Primern zu rechnen, sondern lediglich am immobilisierten Primer für die Detektion von *Legionella* spp., da in *non pneumophila*-Stämmen zwar die *16S rRNA*-Gensequenz vorhanden ist, jedoch das *mip*-Gen eine andere genetische Codierung besitzt und somit nicht amplifiziert werden sollte. PM 2, 4 und 6 wurden aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse hier nicht verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 b dargestellt. Für alle drei Primer-Mixe wurden die CL-Signalintensitäten für beide immobilisierten REV-Primer einzeln aufgetragen. Die CL-Signale am immobilisierten Primer für *Legionella* spp. erreichten bei allen drei PM die Kamerasättigung. Eine Amplifikation des *16S rRNA*-Genes am REV-Primer fand somit statt. Jedoch zeigte sich am Primer für das *mip*-Gen, dass bei höheren Primer-Konzentrationen auch an diesem Primer amplifiziert wurde, was zu falsch-positivem Signal führen könnte. Bei einer Konzentration von 930 / 93 nM ergab sich hier ein CL-Signal in Höhe von 33 % des Maximalsignals, bei 420 / 42 nM in Höhe von 22 %. Bei PM 5 war am Primer für die Detektion von *L. pneumophila* eine Signalintensität bei 4 % des Maximalsignals zu messen. Das Primer-Verhältnis 300 / 30 nM von PM 5 wurde somit als geeignet für die Duplexmessungen angesehen.

In einer weiteren Messreihe dieser Machbarkeitsstudie wurde eine komplette Konzentrationsreihe sowohl mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 als auch *L. longbeachae*, Stamm Long Beach 4 vermessen, um das Verhalten des gewählten Primer-Mixes bei steigenden Konzentrationen zu zeigen. Die Ergebnisse der Messungen mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 sind in Abbildung 22 a angegeben. Die CL-Signalintensitäten wurden gegen die steigende Konzentration der Probe aufgeführt. Bei den Signalintensitäten am Primer für die Detektion von *L. pneumophila* ist zu erkennen, dass die Signalintensitäten zu Beginn sehr niedrig waren, bei  $10^0$  und  $10^1 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$  wurden Werte bei ca. 3 % des Maximalsignales gemessen. Ab einer Konzentration von  $10^2 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$  zeigte sich jedoch ein leichter Signalanstieg auf 6 %, bei  $10^4 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$  wurde eine Signalintensität von 76 %, ab  $10^5 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$  war das Plateau in der Kamerasättigung erreicht. Es war hier somit ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Signalintensität zu erkennen. Auch am immobilisierten Primer für die Detektion von *Legionella* spp. zeigte sich CL-Signal, welches bedeutet, dass hier das richtige Gen erkannt und amplifiziert wurde. Die

Signale ließen jedoch keinen konzentrationsabhängigen Anstieg erkennen, da das Signal bei allen Konzentrationen am Maximalsignal der Kamera lag. Das ist vor allem auffällig, da bei denselben Konzentrationen in der Singleplex-Kalibrierung ein sigmoider Zusammenhang der Signalintensitäten festgestellt wurde.



**Abbildung 22: Konzentrationsabhängige Messreihe zur Duplexmessung, durchgeführt in Einfachmessungen. Durchgeführt wurden die Messungen mit Primer-Mix 5 und a) *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 und b) *L. longbeachae*, Stamm Long Beach 4.**

Auch das Primerpaar für das *mip*-Gen resultierte beispielsweise bei einer Konzentration von  $10^3$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$  in einer höheren Signalintensität von 62 % des Maximalsignals, als bei der Kalibrierung in Singleplexmessungen mit höherer Primerkonzentration ( $4.960 \pm 1.700$  a.u.,  $n = 3$ , entspricht  $7,7 \pm 2,7$  % des

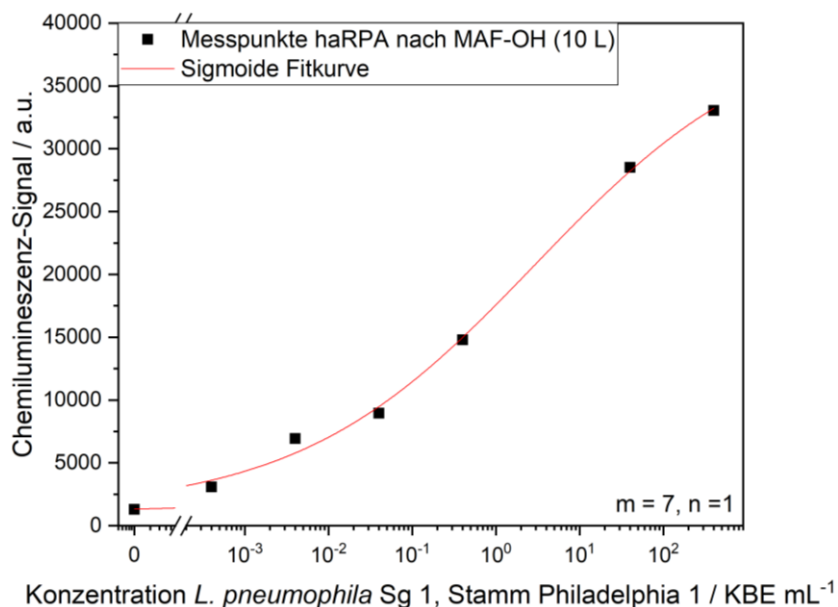
Maximalsignals, Daten hier nicht gezeigt [209]). Es ist anzunehmen, dass die Anwesenheit beider Primerpaare in der Flüssigphase einen Anstieg der Aktivität der Primer bewirkt oder durch die erhöhte Menge an Primern mehr genomische DNA räumlich nahe bei den Primern ist und die Amplifikationsrate dadurch erhöht wird. Dadurch entsteht auch bei geringerer Gesamtkonzentration der einzelnen Primerpaare (jeweils 300/30  $\mu\text{M}$ ) verglichen mit den Singleplex-Messungen (420/42  $\mu\text{M}$ ) eine höhere Signalintensität. Abschließend ist hier zu sagen, dass eine erfolgreiche Detektion in einer Duplexmessung mit einer *L. pneumophila*-Probe möglich wäre, mit der vorliegenden Methode wäre ein Screening möglich. Die Ergebnisse der Messung mit *L. longbeachae*, Stamm Long Beach 4 sind in Abbildung 22 b angegeben. Die Daten wurden analog der Abbildung 22 a aufgetragen. Wie in Abbildung 22 b zu erkennen ist, konnte am Primer für *Legionella* spp. CL-Signal gemessen werden. Dieses zeigte konzentrationsunabhängig eine gleichbleibend hohe Signalintensität am Maximalsignal der Kamera. Am Primer für *L. pneumophila* wurde dagegen ein gleichbleibend niedriges Signal von  $1.663 \pm 442$  a.u. ( $n = 8$ , entspricht  $2,6 \pm 0,7$  % des Maximalsignals) festgestellt. Eine Detektion im Sinne eines Screenings einer *non-pneumophila*-Spezies wäre somit bei Anwesenheit beider Primerpaare möglich.

In der Machbarkeitsstudie wurde somit gezeigt, dass prinzipiell eine Duplexmessung bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Primerpaare möglich ist. In Anwesenheit der DNA eines *pneumophila*-Stammes konnten beide Gene gleichzeitig detektiert werden. Das Signal am Primer für die Detektion für *L. pneumophila* war hierbei sogar konzentrationsabhängig. Auch in Anwesenheit der DNA eines *non-pneumophila*-Stammes konnte eine erfolgreiche Detektion durchgeführt werden. In Anwesenheit beider Primerpaare war hier jedoch lediglich Signalintensität am Primerpaar für *Legionella* spp. messbar. Durch eine Verringerung der Primerkonzentration des Primerpaares für die Detektion von *Legionella* spp. könnte künftig die konzentrationsabhängige Quantifizierung an beiden Primerpaaren in der Duplexmessung ermöglicht werden. Dies konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht mehr realisiert werden.

### 3.1.3 Kombination der haRPA mit einer Anreicherungs-methode

Die Aufkonzentrierung realer Wasserproben ist ein wichtiger Schritt in der Wasseranalytik, da Wasserproben häufig eine geringe Konzentration im Verhältnis

zum Volumen aufweisen und die Keimzahl nicht ohne Aufkonzentrierung ermittelt werden kann. Eine vorgeschaltete Aufkonzentrierung ist somit im regulären Monitoring zwingend notwendig. Auch der haRPA wird hier eine bereits etablierte Anreicherungsmethode für Legionellen vorgeschaltet, welche am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie für die Anwendung mit Legionellen entwickelt und optimiert wurde [206]. Anreicherung mit Hilfe der monolithischen Adsorptionsfiltration (MAF), welche mit Hydroxy-Gruppen (bezeichnet als MAF-OH) funktionalisiert ist, wird normalerweise in Kombination mit einem CL-SMIA verwendet. Im Zuge der Bachelorarbeit von Julia Neumair [330] wurde hier die Kombination mit der haRPA getestet. In einer Machbarkeitsstudie wurden jeweils 10-L-Oberflächenwasserproben des Flusses Würm mit je 1-mL-Proben lebender Legionellen steigender Konzentration angereichert, auf pH 3 angesäuert, über den Monolithen filtriert und auf diesem durch elektrostatische und ionische Wechselwirkung angereichert und festgehalten. Die Legionellen wurden in 20 mL Rinderextraktpuffer (BEG-Puffer, pH 9,5) eluiert und in einem weiteren Schritt mittels zentrifugaler Ultrafiltration (CeUF) auf 2,5 mL eingengt. Die DNA aus 1 mL der erhaltenen Elution wurde extrahiert und am MCR 3 vermessen.



**Abbildung 23: Sigmoide Auftragung der CL-Signalintensitäten in der Messreihe mit dem Primerpaar für die Detektion von *Legionella* spp., durchgeführt mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 nach Anreicherung aus 10 L Oberflächenwasser der Würm mit MAF-OH, filtriert bei pH 3, und CeUF.**

In Abbildung 23 ist das Ergebnis der Messungen angegeben. Die Messungen wurden im Zuge der Machbarkeitsstudie nur als Einfachmessungen gemessen. In der Abbildung wurden die gemessenen CL-Signalintensitäten halblogarithmisch zur Konzentration aufgetragen. Wie zu erkennen ist, ergab sich bei den gemessenen CL-Signalintensitäten hier ein sigmoider Zusammenhang. Die erfolgreiche Anreicherung von Legionellen aus realen Proben und anschließende Vermessung mit der haRPA wurde mit diesem Versuch gezeigt. Im Zuge der Machbarkeitsstudie wurden hier auch reale Proben aus einem Kühlturm (Ort der Probenahme darf aus rechtlichen Gründen nicht genannt werden) aufkonzentriert und vermessen. Die Probe wurde in Dreifachmessungen durchgeführt, hier ergab sich eine CL-Signalintensität von  $18.196 \pm 8.812$  a.u. Bei Korrelation mit der Kalibrierung ergibt sich hier eine Konzentration von  $1,2 \times 10^0 \pm 2,8 \times 10^{-2}$  KBE mL<sup>-1</sup>. Eine erfolgreiche Messung realer Proben mit der Kombination MAF-OH/ CeUF aus 10 L-Proben mit anschließender Vermessung mit der haRPA wurde somit gezeigt.

Die Quantifizierung von Legionellen ist gerade in Proben aus Wasserleitungen, Klärwerken und besonders Kühltürmen und Rückkühlwerken von besonderem Interesse. Aufgrund des großen Probenvolumens von 10 L und der Probenvorbereitung (Ansäuerung) ist diese Anreicherungsmethode für eine schnelle Routineanalytik jedoch nicht geeignet. Da gezeigt werden konnte, dass eine prinzipielle Kombination von MAF und haRPA möglich ist, wurde im weiteren Verlauf eine weitere Variante der MAF getestet. Die MAF-DEAE, welche mit Diethylamingruppen funktionalisiert wird, erlaubt eine Filtration bei neutralem pH für Mikroorganismen [331]. Bei einer Übertragung auf Legionellen, könnte zukünftig eine Anreicherung direkt aus der genommenen Probe möglich sein.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Wendlinger [332] wurden im LegioTyper-Projekt sowohl Probenvolumen als auch Elutionspuffer und diese in Kombination mit dem CL-SMIA getestet und optimiert (siehe Kapitel 3.3.7). Die definierten Parameter wurden für diese Messungen übernommen. Als Probenvolumen wurden daher 1-L-Leitungswasserproben gewählt, um das Gesamtverfahren für die Anwendung im regulären Monitoring durchführbar zu machen. Eluiert wurde auch die MAF-DEAE mit BEG-Puffer, pH 9,5. Die Proben wurden mit jeweils 1 mL einer Legionellenlösung steigender Konzentration angereichert. Auch bei dieser Filtration wurde das Volumen zusätzlich mittels CeUF weiter auf 2 mL eingeeengt. Der Ablauf des Versuches ist Abbildung 24 a zu entnehmen.

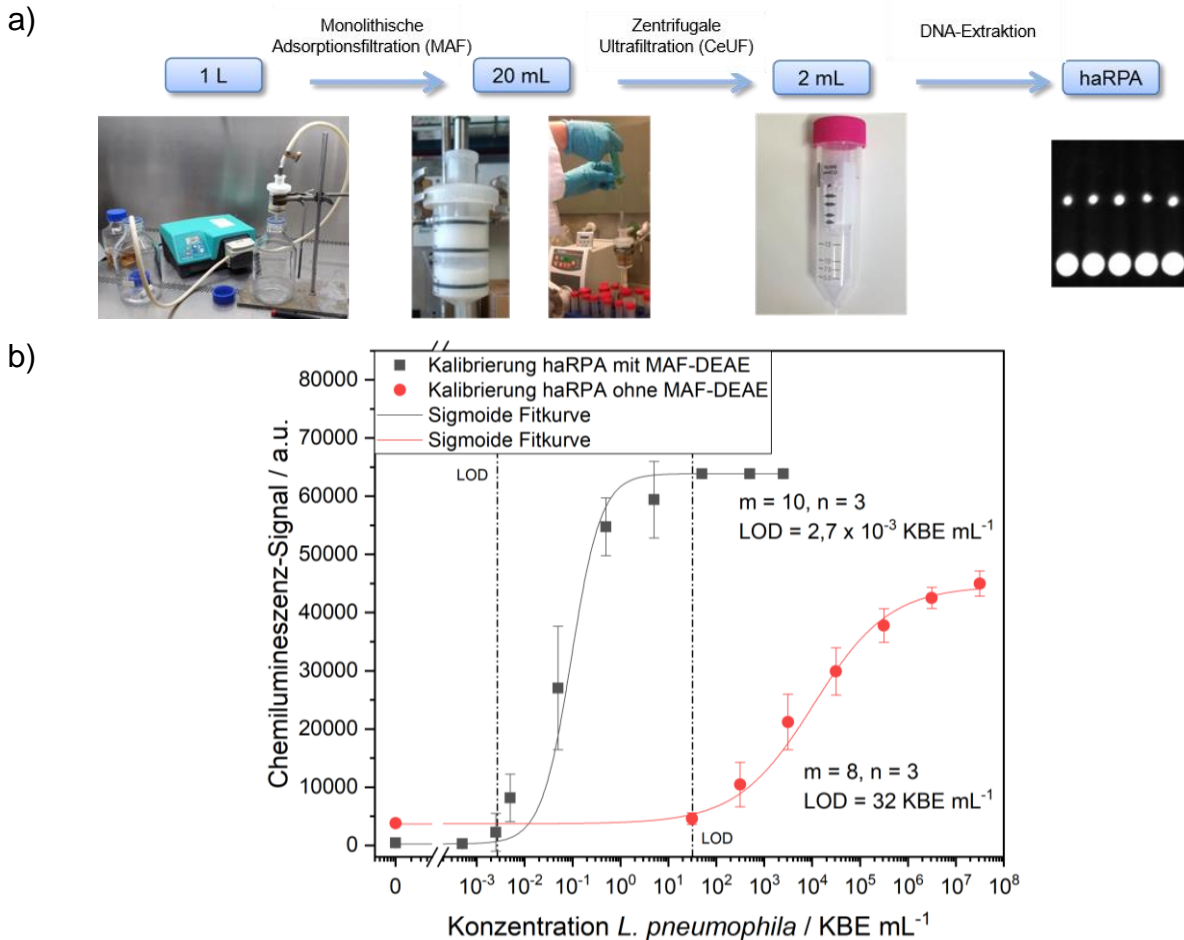


Abbildung 24: a) Ablauf der Anreicherung mit anschließender Messung. Die 1-L-Proben wurden über die MAF-DEAE bei neutralem pH filtriert, und über CeUF weiter eingengt. Nach DNA-Extraktion wurde die Probe mittels haRPA am MCR 3 vermessen. b) Sigmoidale Auftragung der CL-Signalintensitäten in der Kalibrierung ( $n = 3$ ) mit und ohne Anreicherung über MAF-DEAE / CeUF mit dem Primerpaar für die Detektion von *Legionella* spp., durchgeführt mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 für die ursprüngliche Kalibrierung und *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1 nach Anreicherung mit MAF-DEAE und CeUF aus 1 L Leitungswasser.

Die erhaltenen DNA-Extrakte wurden in Dreifachmessungen vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 b angegeben. Die gemessenen CL-Signalintensitäten wurden halblogarithmisch zur Konzentration aufgetragen. Die Messung zeigte einen niedrigen Leerwert von  $407 \pm 106$  a.u. ( $n = 3$ ) und auch bei steigender Konzentration auf  $2,5 \times 10^{-3}$  KBE mL<sup>-1</sup> ein CL-Signal von  $2.255 \pm 3.238$  a.u. ( $n = 3$ ). Im weiteren Verlauf war mit steigender Konzentration ein sigmoider Zusammenhang der CL-Signale in der Kalibrierung zu erkennen, welche ab einer Konzentration von  $5 \times 10^0$  KBE mL<sup>-1</sup> bei einer Signalintensität von  $59.403 \pm 6.555$  a.u. ( $n = 3$ ) in ein Plateau übergang. Der Arbeitsbereich, definiert als der Bereich von 20 % bis 80 % der Signalintensität vom Maximalwert, erstreckte sich von  $3,3 \times 10^{-2}$  bis

$2,4 \times 10^{-1}$  KBE mL<sup>-1</sup>. Gerade im mittleren Bereich der Kalibrierung wiesen die CL-Signalintensitäten zum Teil hohe Schwankungen auf, z.B.  $27.028 \pm 10.620$  a.u. ( $n = 3$ ) bei  $5 \times 10^{-2}$  KBE mL<sup>-1</sup>. Der LOD errechnete sich hier zu  $2,7 \times 10^{-2}$  KBE mL<sup>-1</sup>. Im Vergleich der beiden Kalibrierungen vor und nach Anreicherung fiel jedoch direkt auf, dass es eine Verschiebung der Kalibrierung in einen niedrigeren und somit sensitiveren Bereich gab. Der Arbeitsbereich verschob sich von  $5,1 \times 10^2 - 2,1 \times 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup> um 4 Log-Stufen zu  $3,3 \times 10^{-2} - 2,4 \times 10^{-1}$  KBE mL<sup>-1</sup>. Auch der LOD konnte von 32 KBE mL<sup>-1</sup> um vier Log-Stufen in einen sensitiveren Bereich auf einen Wert von  $3 \times 10^{-3}$  KBE mL<sup>-1</sup> gebracht werden. Die Anreicherung mit MAF-DEAE / CeUF zeigte somit einen deutlichen Anstieg der Sensitivität der haRPA.

Bei der Quantifizierung von Legionellen im Trinkwasser gibt es in Deutschland an dieser Stelle einen vorgegebenen technischen Maßnahmenwert, ab welchem eine amtliche Meldung und Dekontaminationsmaßnahmen gesetzlich verpflichtend sind. Dieser liegt in Deutschland aktuell bei 100 KBE pro 100 mL Trinkwasser. Die Nachweisgrenze der haRPA mit vorheriger Anreicherung läge hier unterhalb dieser wichtigen Grenze und wäre somit zur Anwendung in der Trinkwasser-Kontrolle eine Alternative.

Die Anwendung der haRPA in Kombination mit der MAF-DEAE wurde in dieser Doktorarbeit des Weiteren mit realen Proben getestet. Bei der verwendeten Probe handelt es sich um eine Prozesswasserprobe (Ursprung der Probe aus rechtlichen Gründen nicht genannt). Eine 250-mL-Probe wurde zur Vergleichbarkeit mit der vorher durchgeführten Kalibrierung auf 1 L Gesamtvolumen mit Leitungswasser aufgefüllt und wie zuvor beschrieben aufkonzentriert. Die DNA-Extrakte wurden in einer Dreifachmessung am MCR 3 getestet. Die Werte wurden gemittelt und ergaben eine CL-Signalintensität von  $54.338 \pm 16.566$  a.u. Durch Abgleich mit der Kalibrierung ergab sich hier ein Wert von 1,2 KBE mL<sup>-1</sup>, also 300 KBE in den 250 mL der ursprünglichen Probe. Durch Messung der Probe konnte gezeigt werden, dass auch die Vermessung realer Proben mit der haRPA durch die Verbindung mit der Anreicherung durch MAF-DEAE und CeUF möglich war und eine Anwendung dieser Methode im Einsatz beim regulären Monitoring möglich wäre.

### 3.1.4 Fazit

Im Verlauf dieses gesamten Kapitels konnte gezeigt werden, dass die haRPA eine Methode ist, welche sich mit den gängig verwendeten Methoden durchaus vergleichen

lassen kann. In der Sensitivität liegt sie zwar bezüglich des LODs leicht unterhalb der qPCR, dafür ist der Arbeitsbereich vergleichbar. Gegenüber dem FACS ist die haRPA die sensitivere Methode. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine simultane Detektion des *mip*- und auch des *16S rRNA*-Gens bei Messung einer *pneumophila*-haltigen Probe in Anwesenheit beider Primerpaare möglich ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Primer-Paares zur Detektion von *L. pneumophila* in einer Duplexmessung bei einer *non-pneumophila*-Probe keine Irritationen oder falsch-positiven Ergebnisse bei der Amplifikation des *16S rRNA*-Genes verursacht. Ein Screening wäre im Rahmen einer Duplexmessung somit möglich. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Kombination der haRPA mit einer vorgeschalteten Aufkonzentrierung, um die Methode für das reguläre Monitoring interessanter zu machen. Hierbei konnte die haRPA sowohl in Verbindung mit der MAF-OH aus 10 L-Initialvolumen als auch der MAF-DEAE aus 1 L-Ausgangsvolumen erfolgreich durchgeführt werden. Mit beiden MAF-Variationen konnten zudem reale Proben vermessen werden.



## 3.2 Lebensfähigkeits-haRPA

Die haRPA amplifiziert sämtliche vorhandene genomische DNA in einer Probe. Somit wird auch frei vorliegende DNA und die DNA nicht mehr lebensfähiger Legionellen in der ursprünglichen Probe amplifiziert. Es wird somit eine Gesamtheit an Legionellen in der Probe quantifiziert. In manchen Fällen ist jedoch nur der Anteil lebensfähiger Legionellen in einer Probe von Interesse. So ist es beispielsweise für Biozid-Hersteller von großem Interesse, ob ihr Produkt erfolgreich funktioniert und wie viele Legionellen nach Biozidgebrauch noch lebensfähig sind. Dies ist auch für Anlagenbetreiber nach Positivbefund wichtig, um zu beweisen, dass Desinfektionsmaßnahmen und die Dekontamination erfolgreich waren und die Anlage frei von lebensfähigen Mikroorganismen ist. Zur Erweiterung der hier etablierten haRPA wurde daher die Lebensfähigkeits-haRPA (*viability*-haRPA bzw. v-haRPA) entwickelt. Diese wird zur Detektion und Quantifizierung ausschließlich lebensfähiger und somit pathogener Legionellen verwendet. Hierbei wird die DNA nicht mehr lebensfähiger Legionellen und auch die frei in Suspension vorliegende DNA vor der DNA-Extraktion mit Hilfe eines DNA-interkalierenden Farbstoffes blockiert und bei der anschließenden Inkubationszeit der haRPA somit nicht mehr amplifiziert. Es wird nur der Anteil lebensfähiger Legionellen in der Probe erfasst.

### 3.2.1 Etablierung der v-haRPA

In einer Machbarkeitsstudie wurden lebensfähige und nicht-lebensfähige Legionellen in definierten Verhältnissen vermengt und die Proben vor der DNA-Extraktion mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff PMA vorbehandelt. Anschließend wurde eine normale haRPA durchgeführt (39 °C, 40 min). Wie bisher wurden sowohl REV-Primer für die Detektion für *Legionella* spp., als auch für *L. pneumophila* immobilisiert, um unspezifische Signale zu erkennen. Die Versuche wurden jedoch nur mit dem Primerpaar für *Legionella* spp. durchgeführt. Zu Beginn der Machbarkeitsstudie wurde eine Gesamt-DNA-Konzentration von  $c = 10^8$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$  *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 in Leitungswasser als Ausgangspunkt gewählt. Es wurde hier eine sehr hohe Ausgangskonzentration gewählt, da verglichen zur haRPA ein komplett neues System mit neuem Ausgangsvolumen und Vorbehandlung getestet wurde. Es wurden verschiedene Proben mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen lebensfähiger und nicht-lebensfähiger (hitzeinaktivierter) Legionellen hergestellt.

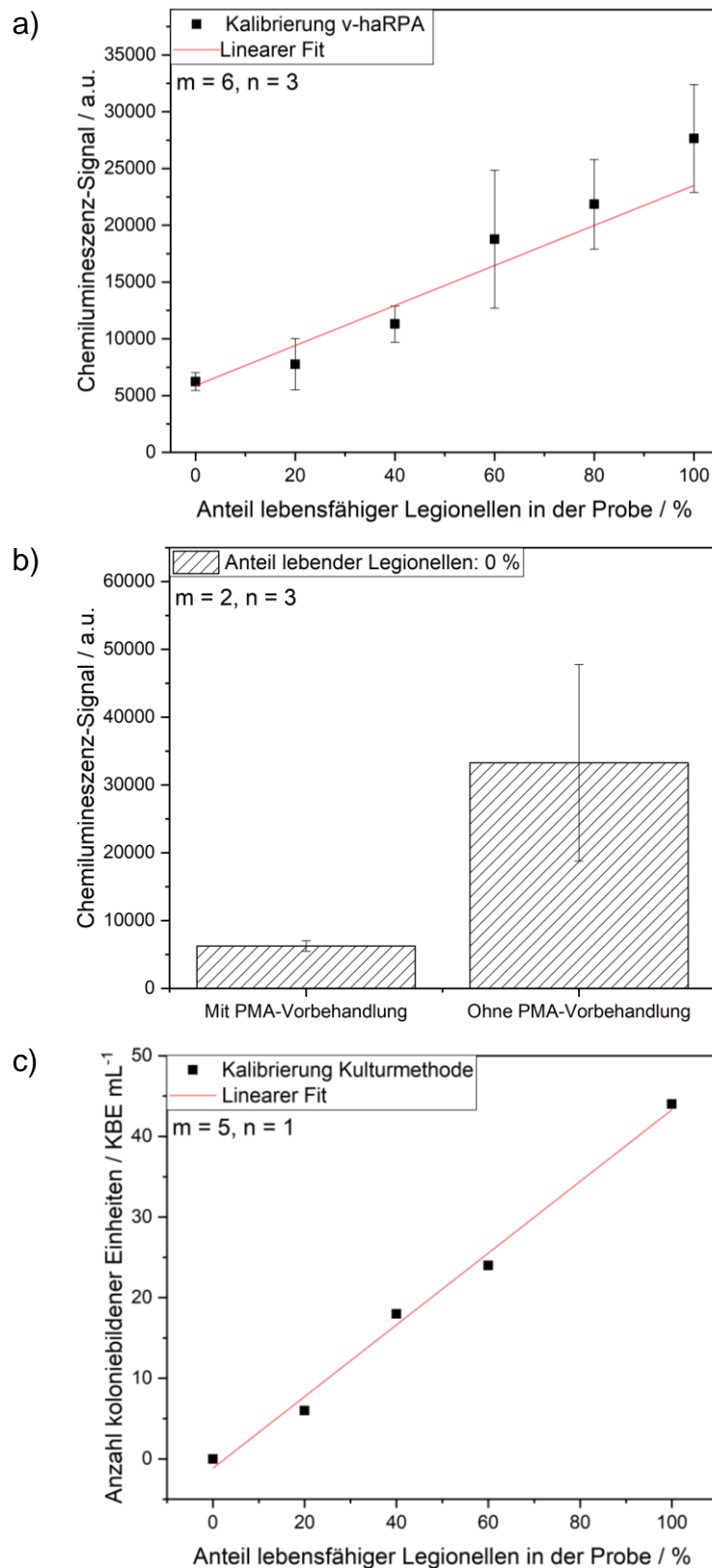


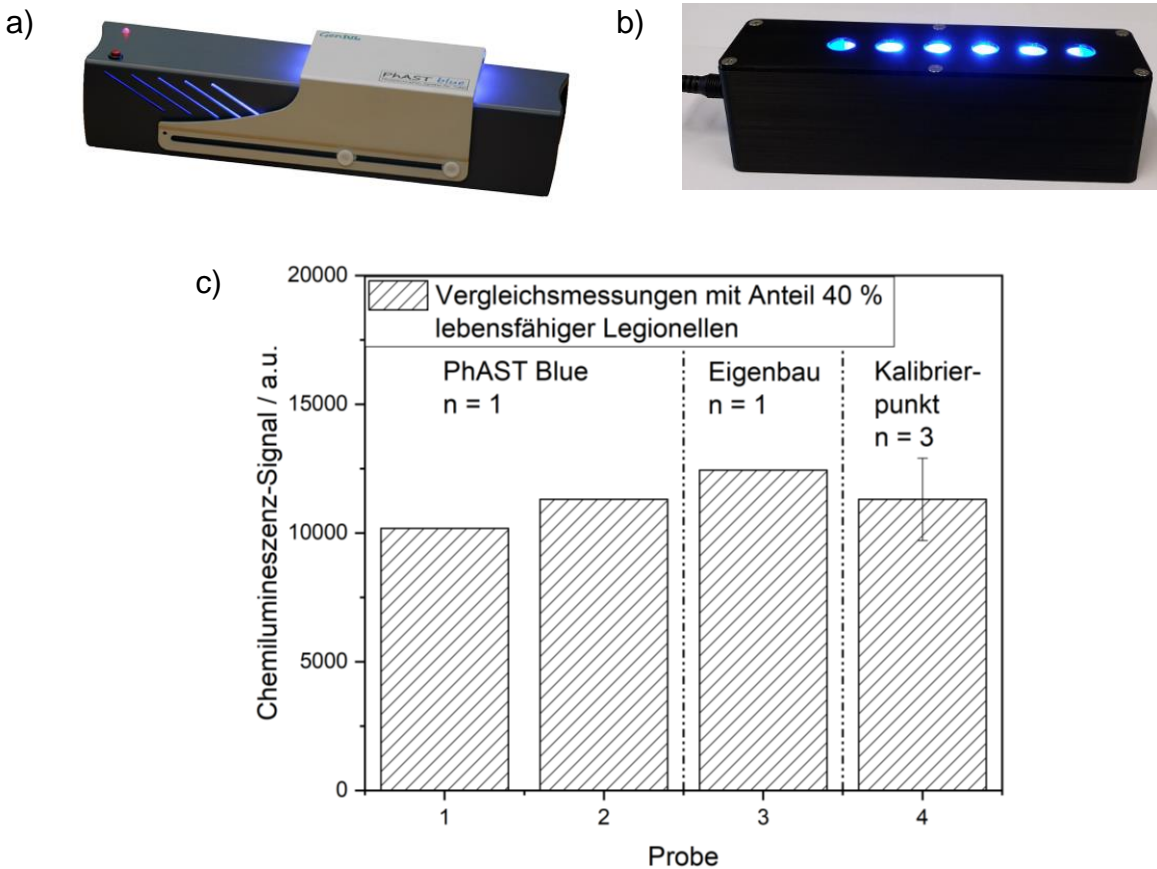
Abbildung 25: Auftragung der CL-Signalintensitäten in der Kalibrierung ( $n = 3$ ) mit dem Primerpaar für die Detektion von *Legionella* spp., durchgeführt mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 ( $c = 10^8$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$ ) nach Vorbehandlung mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff PMA. b) Vergleichende Messung ( $n = 3$ ) einer Probe mit 0 % lebensfähiger Legionellen mit PMA-Vorbehandlung und ohne PMA-Vorbehandlung (normale haRPA). c) Kalibrierung mit Kulturmethode als Referenz.

Hierfür wurden die Mischungsverhältnisse 0, 20, 40, 60, 80 und 100 % lebensfähiger Legionellen in der Probe gewählt. Um dieselbe Gesamtzahl an Legionellen für jede Probe zu erhalten, wurde der gegenteilige Anteil der Probe mit nicht-lebensfähigen, hitzeinaktivierten (80 °C, 30 min) Legionellen aufgefüllt. Auf Grund des geringen Ausgangsvolumens der Probe (51,29 µL Probenvolumen, siehe Kapitel 5.5.2) wurde für diesen Vortest nicht die gängige Extraktionsmethode verwendet, sondern ein am Institut verwendetes Extraktionskit für geringere Probenvolumina (ViralXpress). Zum Schutz der genomischen DNA vor Nukleasen wurden der Extraktion jedoch Proteinasen und RNasen (analog dem zuvor verwendeten GeneJET Kit) zugegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 a angegeben, die CL-Signalintensitäten wurden gegen den prozentualen Anteil lebender Zellen in der Probe aufgetragen. Um die Interkalation des PMA in die Zielsequenz der DNA nicht-lebensfähiger Legionellen zu beweisen, wurden zwei Proben derselben DNA-Gesamtkonzentration mit ausschließlich nicht-lebensfähigen Legionellen mit und ohne PMA-Vorbehandlung vermessen (Abbildung 25 b). Es ist zu erkennen, dass ohne Vorbehandlung eine 4,8-fach höhere CL-Signalintensität erzeugt wird. Wie bei einer herkömmlichen haRPA zeigten die Messungen ohne PMA-Vorbehandlung eine CL-Signalintensität von  $29.744 \pm 13.778$  a.u. ( $n = 3$ ). Bei den Messungen mit PMA-Vorbehandlung hingegen konnte eine CL-Signalintensität von  $6.241 \pm 787$  a.u. ( $n = 3$ ) gemessen werden. Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass das PMA mit der gewünschten DNA-Sequenz interkaliert und eine nachfolgende Amplifikation der DNA auf der Oberfläche im Verlaufe der haRPA inhibiert wird, welches eine verminderte CL-Signalintensität zur Folge hatte.

Als Referenz wurden die Proben der Kalibrierung zudem auf GVPC-Agar kultiviert. Wie in Abbildung 25 c zu erkennen, stieg auch hier mit zunehmendem Anteil lebensfähiger Legionellen in der Probe die Anzahl koloniebildender Einheiten. Durch die steigende Anzahl war ein linearer Zusammenhang festzustellen. Das Ergebnis der Kulturmethode korrelierte mit dem Ergebnis der v-haRPA.

Die Differenzierung lebender und nicht-lebensfähiger Bakterien mit PMA erforderte eine Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge  $\lambda = 470$  nm. Dem kommerziell erhältlichen PhAST Blue von GenIUL (Abbildung 26 a), welcher für diesen Zweck verwendet wird [333, 334], wurde hier eine am Institut entworfene Apparatur gegenübergestellt (Abbildung 26 b). Die Apparatur wurde von Herrn Klemens Thaler

und der hauseigenen Werkstatt angefertigt. Wie in Abbildung 26 c zu erkennen ist, zeigten die CL-Signalintensitäten bei allen Messungen einen vergleichbaren Wert.



**Abbildung 26:** a) PhAST Blue von GenIUL für Lebend/tot-Differenzierung. b) Am Institut entwickeltes und gebautes Gerät zur Lebend/tot-Differenzierung mit der v-haRPA. c) Vergleichsmessungen mit Proben, welche mit beiden Geräten vorbehandelt wurden. Zur Orientierung wurde der zuvor ermittelte Kalibrierpunkt zugefügt. Vermessen wurden Proben mit einem Anteil von 40 % lebensfähigen *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 ( $c = 10^8 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ ).

Zum besseren Vergleich der haRPA und der v-haRPA wurde im weiteren Verlauf die DNA-Extraktion angepasst und das GeneJET Genomic DNA Purification Kit verwendet. Auf Grund der unterschiedlichen Ausgangsvolumina bei haRPA (1 mL) und v-haRPA (51,29  $\mu\text{L}$ ) wurde das Elutionsvolumen für die v-haRPA optimiert. Getestet wurden hierbei die Elutionsvolumina 20, 50, 100 und 200  $\mu\text{L}$ . Gearbeitet wurde mit einer Probenkonzentration von  $c = 10^7 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ . Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 angegeben.

Es ist zu erkennen, dass bei einer Elution mit 20  $\mu\text{L}$  die genomische DNA nicht vollständig von der Extraktionssäule gelöst und ein vermindertes Signal erzeugt wurde.

Die Elutionen mit 50 und 200  $\mu\text{L}$  ergaben ähnliche CL-Signalintensitäten, lagen jedoch unterhalb der Signalintensität von 100  $\mu\text{L}$ . Es liegt nahe, dass bei der Elution mit 50  $\mu\text{L}$  nicht die gesamte genomische DNA von der Extraktionssäule gelöst wurde und die Signalintensität daher vermindert war. In der Elution mit 200  $\mu\text{L}$  könnte die genomische DNA auf Grund des erhöhten Elutionsvolumens zwar vollständig von der Säule gelöst, jedoch gleichzeitig wieder verdünnt worden sein, wodurch das verminderte CL-Signal erklärt wird. In der Elution mit 100  $\mu\text{L}$  wurde die höchste CL-Signalintensität der Messreihe erreicht. Es wird angenommen, dass die genomische DNA vollständig von der Extraktionssäule gelöst wurde und im Gegensatz zu 200  $\mu\text{L}$  Elutionsvolumen nicht verdünnt wurde. Im weiteren Verlauf wurden daher 100  $\mu\text{L}$  in der Elution als optimales Volumen verwendet.

**Tabelle 6: Vergleichsmessungen zum Elutionsvolumen der DNA-Extraktion mit dem GeneJET Genomic DNA Purification Kit für die Anwendung in der v-haRPA. Angegeben sind das verwendete Elutionsvolumen und die CL-Signalintensität. Es wurden Einzelmessungen angefertigt (n = 1).**

| Elutionsvolumen / $\mu\text{L}$ | CL-Signalintensität / a.u. |
|---------------------------------|----------------------------|
| 200                             | 39.321                     |
| 100                             | 47.098                     |
| 50                              | 41.708                     |
| 20                              | 15.999                     |

### 3.2.2 Kalibrierung der v-haRPA

Zur Kalibrierung der Methode wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von  $10^1$  bis  $10^6$   $\text{GU } \mu\text{L}^{-1}$  der Stamm-Suspension lebensfähiger Legionellen in Leitungswasser angefertigt. Gleich der ersten Testreihe wurden für jede Konzentrationsstufe verschiedene Mischungen lebensfähiger und nicht-lebensfähiger Legionellen hergestellt. Die Mischverhältnisse betragen 0, 20, 40, 60, 80 und 100 % lebensfähige Legionellen. Die Probe wurde jeweils mit dem Äquivalent nicht-lebensfähiger, hitzeinaktiver Legionellen aufgefüllt, um die gleiche Gesamtkonzentration genomischer DNA in der Probe zu gewährleisten. Verwendet wurde *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1. Nach Behandlung mit dem Farbstoff PMA wurden die Proben extrahiert und die haRPA durchgeführt. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurden beide Flusszellen zeitgleich befüllt, verklebt und inkubiert (40 min, 39 °C). Auch in dieser Messreihe wurden beide REV-Primer für Detektion von *Legionella* spp. als auch *L. pneumophila* immobilisiert, die Experimente wurden mit dem Primerpaar

für *Legionella* spp. in der Flüssigphase durchgeführt. Die Ergebnisse der Messreihe sind in Abbildung 27 a angegeben.

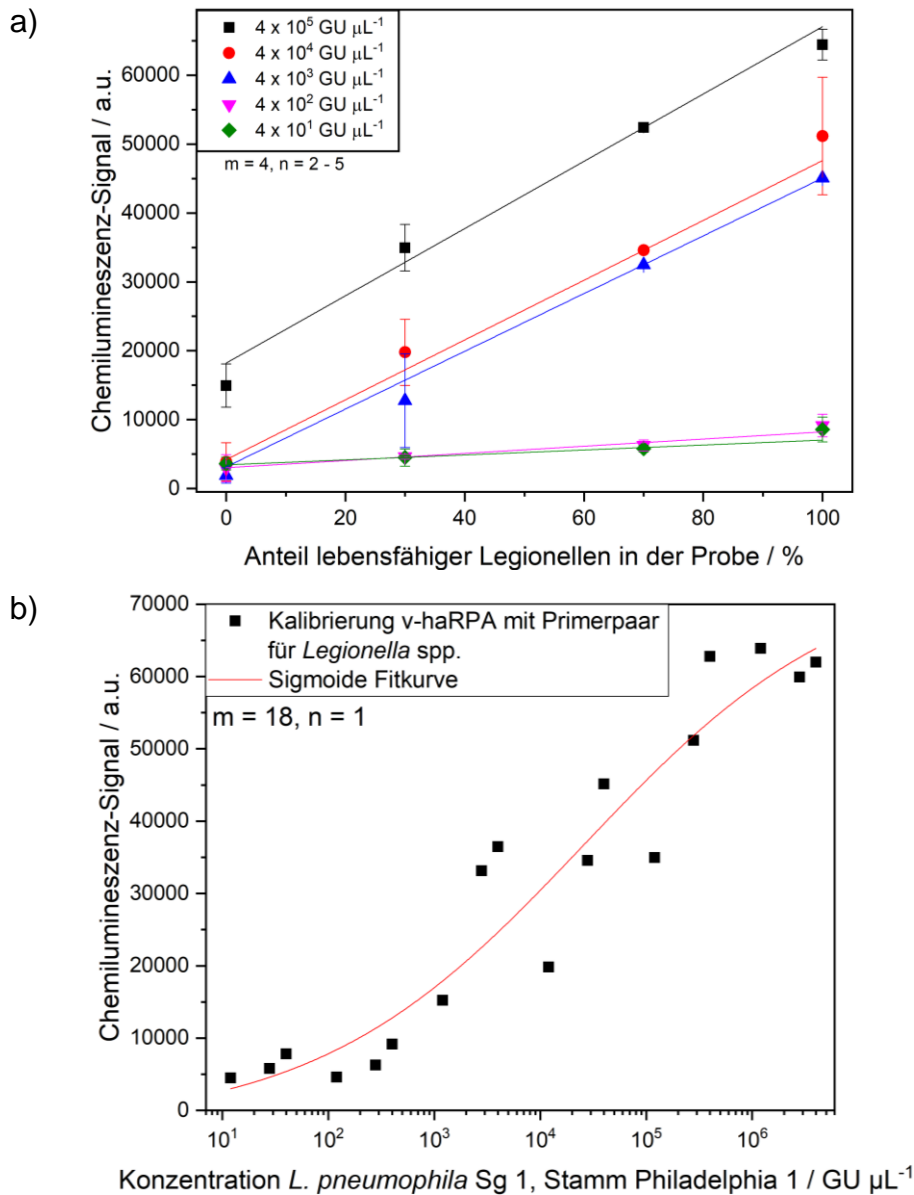


Abbildung 27: a) Kalibrierung der v-haRPA mit dem Primerpaar für die Detektion von *Legionella* spp., durchgeführt mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1, Abbildung nach Kober et al. [209]. Es wurden Einzelmessungen gemacht, die Fehlerbalken ( $n = 3 - 5$ ) sind durch Spot-Varianzen definiert, für  $n = 2$  wurde keine Standardabweichung berechnet. b) Sigmoide Auftragung der CL-Signalintensitäten der Kalibrierung der v-haRPA mit dem Primerpaar für die Detektion von *Legionella* spp., durchgeführt mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1.

In der Abbildung werden lediglich die Daten für den Konzentrationsbereich von  $10^1$  bis  $10^5$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$  dargestellt. In der Messreihe der Gesamtkonzentration von  $10^6$  GU  $\mu\text{L}^{-1}$  wurden, mit Ausnahme der 0 %-Probe, CL-Signalintensitäten ausschließlich im Sättigungsbereich der CCD-Kamera bei etwa 63.000 a.u. gemessen. Aufgrund des

veränderten Ausgangs- und auch Elutionsvolumens gegenüber der haRPA verändert sich in der Messung mit der v-haRPA der Messbereich. Die Kamerasättigung wird in einem niedrigeren Konzentrationsbereich erreicht. In Abbildung 27 a wurden die CL-Signalintensitäten gegen den Anteil der lebensfähigen Legionellen in der Probe aufgetragen. Die Messpunkte der Gesamtkonzentrationen wurden gemeinsam betrachtet und wiesen jeweils einen linearen Zusammenhang auf. Die linearen Gleichungen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Bei den einzelnen linearen Fitgeraden ist zu erkennen, dass die Intensität des CL-Signales mit steigendem Anteil der lebensfähigen Legionellen in der Probe zunehmend stieg. Bei einer Gesamtkonzentration von  $c = 4 \times 10^2 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$  lag das CL-Signal bei einer Intensität von 7 % des Maximalsignals bei 30 % lebensfähigen Legionellen in der Probe und stieg bis zu einer Intensität von 14 % des Maximalsignals bei 100 % lebensfähigen Legionellen an. Zwei Konzentrationsstufen darüber, bei einer Gesamtkonzentration von  $c = 4 \times 10^4 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$ , lag die CL-Signalintensität bei einem Signal von 31 % bei 30 % lebensfähigen Legionellen und stieg bis zu einer Intensität von 80 % bei 100 % lebensfähigen Legionellen an. Des Weiteren fällt auf, dass mit steigender Gesamtkonzentration der Probe auch die Steigung der linearen Fitgerade größer wurde, die CL-Signalintensitäten der 100 %-Proben stiegen zunehmend. So war die Steigung der Probe mit der geringsten Gesamtkonzentration bei einem Wert von 36 a.u., erhöhte sich aber mit erhöhter Gesamtkonzentration der Probe von  $c = 4 \times 10^3 \text{ GU } \mu\text{L}^{-1}$  auf 419 a.u. und erreichte bei der hier höchstgewählten Konzentration einen Wert von 488 a.u.

**Tabelle 7: Auflistung der linearen Gleichungen in der Kalibrierung der v-haRPA. Angegeben sind die verwendete Gesamtkonzentration, die Steigungen der Geraden und der jeweilige y-Achsenabschnitt.**

| Konzentration / $\text{GU } \mu\text{L}^{-1}$ | Steigung / a.u. | y-Achsenabschnitt / a.u. |
|-----------------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| $4 \times 10^5$                               | 488             | 18.208                   |
| $4 \times 10^4$                               | 434             | 4.196                    |
| $4 \times 10^3$                               | 419             | 3.151                    |
| $4 \times 10^2$                               | 52              | 3.019                    |
| $4 \times 10^1$                               | 36              | 3.439                    |

In der Abbildung fällt weiterhin auf, dass das Signal für 0 % lebensfähige Legionellen in den Proben jeweils nicht den Wert der Hintergrundsignalintensität von  $754 \pm 231 \text{ a.u.}$  (entspricht  $1,2 \pm 0,4 \%$  des Maximalsignals, gemittelter

Hintergrundwert von  $m = 10$  Messungen,  $n = 11 - 13$  Spalten mit jeweils 5 Spots) annahm, sondern jeweils erhöht war. Der Wert lag bei einer durchschnittlichen Intensität von 5 % des Maximalsignales, bei der höchsten Gesamtkonzentration sogar bei 23 %. Eine Erklärung hierfür findet sich in der zuvor erwähnten zufälligen Interkalation des Farbstoffes PMA. Trotz des Anteiles von 0 % lebensfähigen Legionellen in den Proben waren auf Grund der Gesamtkonzentration 100 % nicht-lebensfähige Legionellen vorhanden. Auf Grund der willkürlichen Einlagerung des PMAs fand die Interkalation nicht immer in der gewünschten DNA-Sequenz des Amplifikates statt, die DNA-Amplifikation auf der Chip-Oberfläche konnte in diesem Fall stattfinden und es entstand ein niedriges CL-Signal. Mit stark steigender Gesamtkonzentration, wie beispielsweise der hier höchstverwendeten, stieg somit auch die Möglichkeit freier DNA-Sequenz und dementsprechend das CL-Signal. Die Konzentration des PMAs wurde jedoch bewusst nicht erhöht, da eine zu hohe Konzentration an PMA bewirken kann, dass freies PMA auch in die Membran lebender Legionellen eindringt [306] und in deren DNA interkaliert. Für die Quantifizierung realer Proben bedeutet dies jedoch eine Sensitivitätsminderung für den Bereich kleinerer Konzentrationen.

Für den Fall, dass bei einer Quantifizierung lediglich der Anteil pathogener, lebensfähiger Legionellen von Interesse ist und die Gesamtkeimzahl der haRPA nicht benötigt wird, kann die v-haRPA als Einzelmessung durchgeführt werden. Für diesen Fall wurden für jeden prozentualen Anteil jeder Gesamtkonzentration die jeweilige Konzentration an genomischer DNA aus den lebensfähigen Legionellen berechnet und die CL-Signalintensitäten erneut aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 b abgebildet. Es wurden die CL-Signalintensitäten gegen die halblogarithmisch aufgetragene Konzentration an genomischer DNA aufgetragen. Trotz Einfachmessung jedes Messpunktes ließ sich bei dieser Auftragung ein sigmoider Zusammenhang erkennen. Wenn die Gesamtkeimzahl als nicht relevant betrachtet wird, ist eine Quantifizierung der lebensfähigen Legionellen in einer Probe in  $\text{GU } \mu\text{L}^{-1}$  somit auch unabhängig von der haRPA möglich.

### 3.2.3 Wiederfindung

Zur Bestätigung der Methode wurden zudem Wiederfindungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden neue Proben auf dieselbe Weise hergestellt und vermessen. Es wurden Proben verschiedener Gesamtkonzentrationen im mittleren



Konzentrationsbereich der Kalibrierung mit verschiedenen Anteilen lebensfähiger Legionellen gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 angegeben.

**Tabelle 8: Ergebnisse der Wiederfindungsexperimente ( $m = 3$ ,  $n = 3$ ). Aufgeführt sind die Konzentrationen der verwendeten Proben, ihr Anteil an lebensfähigen Legionellen, der Anteil der gefundenen lebensfähigen Legionellen und die durchschnittliche Wiederfindung [209].**

| Konzentration / GU $\mu\text{L}^{-1}$ | Anteil lebensfähiger Legionellen / % | CL-Signalintensität / a.u. | Anteil gefundener, lebensfähiger Legionellen / % | Wiederfindung / % | $\emptyset$ Wiederfindung / % |
|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| $5 \times 10^4$                       | 30                                   | 16.267                     | 26                                               | 88                | $113 \pm 23$                  |
|                                       |                                      | 21.520                     | 39                                               | 131               |                               |
|                                       |                                      | 20.248                     | 36                                               | 121               |                               |
| $5 \times 10^3$                       | 30                                   | 13.809                     | 28                                               | 94                | $96 \pm 9$                    |
|                                       |                                      | 13.275                     | 27                                               | 89                |                               |
|                                       |                                      | 15.223                     | 32                                               | 107               |                               |
| $5 \times 10^2$                       | 70                                   | 6.223                      | 59                                               | 85                | $88 \pm 5$                    |
|                                       |                                      | 6.602                      | 65                                               | 94                |                               |
|                                       |                                      | 6.253                      | 60                                               | 86                |                               |

Wie zu erkennen ist, wurden die erhaltenen CL-Signalintensitäten mit Hilfe der zuvor berechneten linearen Fitgeraden in prozentuale Werte umgerechnet, welche den Anteil an lebensfähigen Legionellen in der Probe definieren. Mit Hilfe des eingesetzten Anteiles und des berechneten Anteiles lebensfähiger Legionellen wurde die Wiederfindung der Probe berechnet. Es konnte hier eine mittlere Wiederfindung zwischen 88 und 133 % erreicht werden.

### 3.2.4 Fazit

Die vorliegende Kalibrierung dieser Methode ist eine Ergänzung und Erweiterung der haRPA-Methode. Beide Methoden stehen in ihren Kalibrierungen in einem Zusammenspiel. Die haRPA beantwortet im regulären Monitoring die Frage nach der Gesamtkeimzahl an Legionellen in einer vorliegenden Probe. Hiermit werden alle Legionellen erfasst, lebensfähige, pathogene (Lebend und VBNC) und auch die nicht-lebensfähigen, nicht-pathogenen. Dies ist für die Risikobewertung von Wasser und künstlichen Wassersystemen wichtig. Nutzt man nun die v-haRPA als ergänzende Messung, so wird daraus der Anteil lebensfähiger Legionellen gefiltert. Man definiert anhand der haRPA die Gesamtkonzentration und kann somit den linearen Fit wählen, den man nutzt, um die v-haRPA auszuwerten. Die Kombination beider Methoden kann somit eine wichtige Fragestellung beantworten, die sich gerade im Monitoring stellt. Im Falle eines Positivbefundes wird eine sofortige Dekontamination gestartet und die

Probenahmestelle erneut beprobt. Die Höhe der Lebend-Keimzahl ist hier nicht nur für Kühlturm- oder Anlagen-Betreiber wichtig, gerade auch für Hersteller von Bioziden und Desinfektionsmitteln stellt sich die Frage, ob eventuell noch vorhandene Legionellen in der Probe durch Biozidgebrauch unschädlich gemacht wurden. Die Wirksamkeit ist von überaus großer Bedeutung. Die Verwendung beider Methoden in Kombination kann an dieser Stelle beides beantworten. Bei alleiniger Verwendung der v-haRPA kann durch sigmoide Auftragung der Anteil lebensfähiger Legionellen in der Probe direkt quantifiziert werden. Im Verlaufe dieses Kapitels konnte eine erfolgreiche Etablierung der v-haRPA gezeigt werden. Zur Bestrahlung mit blauem Licht wurde zudem ein neues Gerät entwickelt, welches erfolgreich getestet werden konnte. Die DNA-Extraktionsmethode konnte der v-haRPA angepasst werden und die v-haRPA schließlich kalibriert werden. Es ergaben sich Wiederfindungswerte zwischen 81 und 133 %.

### 3.3 LegioTyper

Dieses Kapitel der Dissertation befasst sich mit den Arbeiten im BMBF-Projekt LegioTyper. Das Projekt war Teil des BMBF-Programmes „Zivile Sicherheit – Schutz vor biologischen Gefahrenlagen und Pandemien“. Ziel des Projektes war die Etablierung einer schnellen und sensitiven Methode für eine Serotypisierung von *L. pneumophila* Sg 1 – 15 in Wasser-, Luft- und Urinproben für den Ausbruchsfall. Durch Schnellabgleich der Proben auf derselben Plattform und derselben Methode kann somit ein direkter Vergleich der Urine infizierter Patienten mit Wasserproben vermeintlicher Ausbruchsquellen durchgeführt werden. Dies ermöglicht durch die Phänotypisierung einen schnellen Ausschluss vieler Umwelt- und Prozesswasserproben in kurzer Zeit, um sich bei Ausbruchsuntersuchungen mit der spezielleren und aufwendigeren Genotypisierung auf eine geringere Anzahl von Proben konzentrieren zu können. Projektziel, und somit auch Ziel dieser Doktorarbeit war die Entwicklung eines AK-Mikroarrays (CL-SMIA) für die Multiplex-Serotypisierung innerhalb weniger Minuten auf einem neu entwickelten Polycarbonat-Mikroarray und einem neuen Demonstrator-Gerät (MCR-R).

Die verwendeten monoklonalen AK wurden vor Benutzung am IWC vom Konsiliarlabor Legionellen der Technischen Universität Dresden in Vortests mittels indirektem ELISA auf Selektivität, Spezifität und Kreuzreaktivität gegenüber anderen Legionellen-Spezies und anderen Mikroorganismen getestet. In diesem Projekt wurden ausschließlich AK der Klassen IgG2 und IgG3 verwendet.

Am IWC wurden anschließend die meisten weiteren Testungen vorgenommen. Im weiteren Verlauf wurden die monoklonalen AK zuerst zum grundsätzlichen Einsatz auf Polycarbonatoberfläche anstelle der zuvor verwendeten Glas-Oberflächen getestet. Die für das Projekt notwendigen Polycarbonat-Oberflächenmodifizierung von Polycarbonat-Trägern wurde von Jonas Bemetz im Rahmen des Projektes entwickelt und optimiert [183]. In dieser Arbeit wurde die Polycarbonat-Oberfläche als Objektträger für die monoklonalen AK optimiert. Die Messungen wurden auf dem neuen Demonstrator-Gerät MCR-R durchgeführt, welcher im Projekt auch LegioTyper-Messgerät genannt wurde. Hierbei musste das Gerät getestet und der Ablauf der Messungen und des Messprogrammes optimiert werden. Im weiteren Verlauf des Projektes wurden in großen Messreihen die Konzentrationen sämtlicher während der

Messung verwendeten AK justiert und die geeigneten Konzentrationen gefunden. Diese wurden im Zuge der Prinzipstudie abschließend mit realen Proben getestet.

### 3.3.1 Vergleich der Polycarbonat- und Glas-Oberflächen auf dem MCR 3

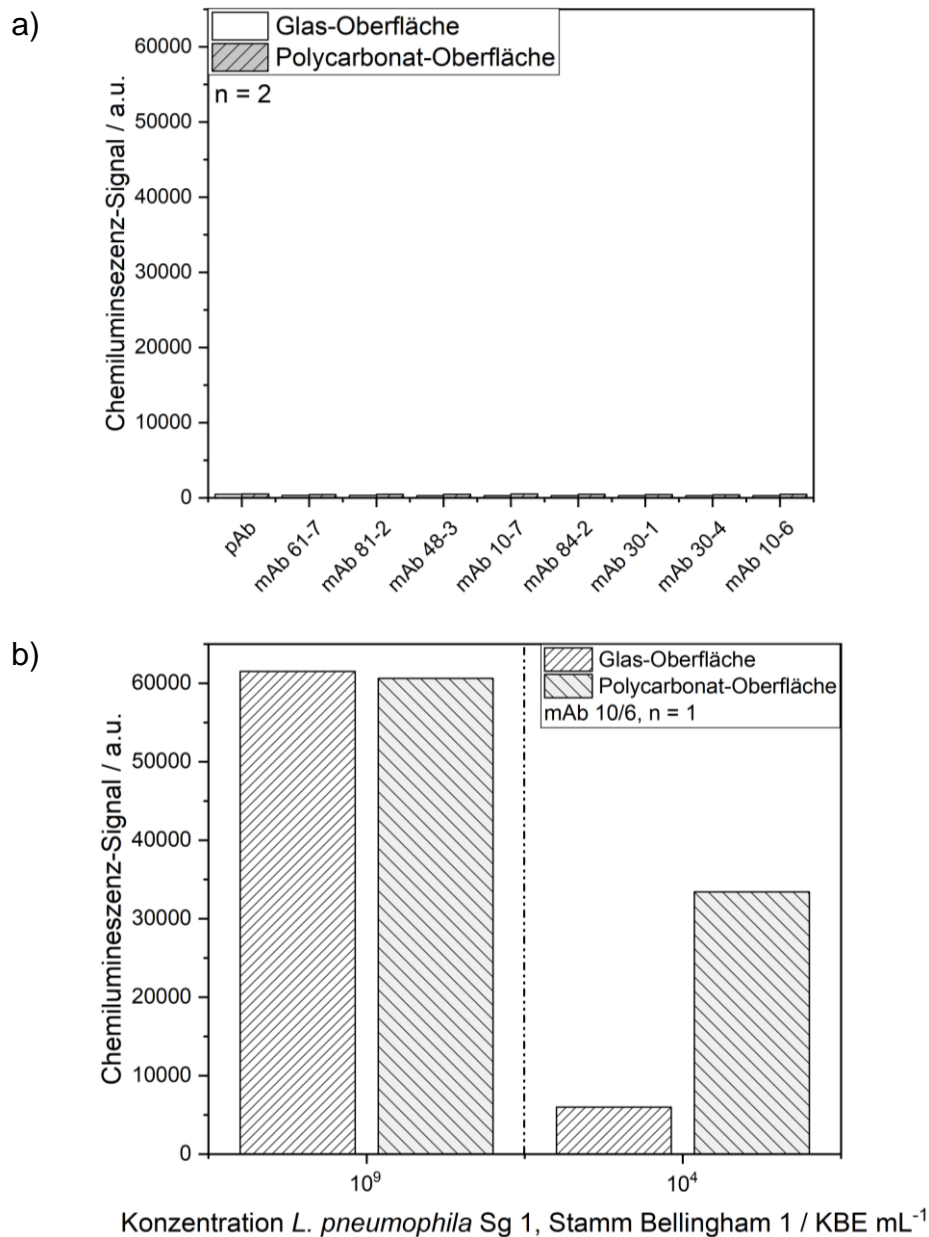
Die ersten Testmessungen wurden auf dem MCR 3 mit einem zuvor von Anika Wunderlich etablierten Programm durchgeführt [206]. Es wurden zunächst erste monoklonale AK, die für das Projekt neu aufgereinigt und getestet wurden, am IWC auf ihre prinzipielle Tauglichkeit zur Verwendung auf Mikroarray-Chips getestet. Die in dieser Testreihe verwendeten AK sind spezifisch für Sg 1. Die genaueren Spezifitäten, welche per ELISA-Testungen ermittelt wurden, sind in Tabelle 9 dargestellt. Ziel der Messreihe waren Vortests zum Verhalten des Hintergrundes auf den verschiedenen Mikroarray-Oberflächen und der neuen AK der Klassen IgG 2 und 3, um eine generelle Tauglichkeit sowohl der monoklonalen AK als auch der Polycarbonat-Chips im Projekt zu testen. Die Vortests wurden noch auf dem alten Testgerät MCR 3 mit etabliertem Messprogramm durchgeführt, um die Anzahl neuer Test-Parameter jeweils gering zu halten. Für diese Testreihe wurden die monoklonalen Fängerantikörper, wie in nachstehender Tabelle angegeben, verwendet.

**Tabelle 9: Verwendete monoklonale Fängerantikörper mit Angaben der Spezifität laut ELISA-Testungen, Konzentration in der Stammlösung und Spotkonzentration.**

| Fängerantikörper | Spezifität laut ELISA                         | Konzentration in Lösung / mg mL <sup>-1</sup> | Konzentration auf dem Spot / mg mL <sup>-1</sup> |
|------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| mAb 30/1         | Olda                                          | 0,97                                          | 0,485                                            |
| mAb 30/4         | Bellingham und andere                         | 1,39                                          | 0,695                                            |
| mAb 10/7         | Non-Pontiac-Gruppe                            | 0,383                                         | 0,1915                                           |
| mAb 10/6         | Bellingham, Sg 1:<br>+ Beni;<br>- Heys / Camp | 1,98                                          | 0,99                                             |
| mAb 84/2         | Olda                                          | 4,54                                          | 2,27                                             |
| mAb 81/2         | Sg 1                                          | 1,9                                           | 0,95                                             |
| mAb 48/3         | Pontiac-Gruppe                                | 0,98                                          | 0,49                                             |

Die Glaschips wurden mit einer am Institut etablierten Methode hergestellt [206]. Die Polycarbonat-Chips wurden wie in Kapitel 5.5.5 hergestellt. Aufgrund der punktuellen Aktivierung der Oberfläche entfiel bei den Polycarbonat-Chips das Blocken der Oberfläche. Jedoch wurden die Chips nach dem Spotten in PBS gewaschen, um evtl. vorhandene Aktivierungsreagenzien und Antikörperlösungen zu entfernen, getrocknet

und zum Mikroarray-Chip verklebt. Gefüllt wurden die Chips mit 1 % BSA-Lösung. Es wurden Leerwertmessungen mit Reinstwasser durchgeführt, um das Hintergrundsignal sowohl der Oberfläche als auch der Fängerantikörper zu testen.



**Abbildung 28:** CL-Signalintensitäten erster Vergleichsmessungen mit Glas- und Polycarbonatoberflächen. Abgebildet sind a) Leerwertmessungen und b) Messungen mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1,  $c = 10^4$  KBE mL<sup>-1</sup> und  $c = 10^9$  KBE mL<sup>-1</sup>.

In Abbildung 28 a sind die Leerwertmessungen abgebildet. Die CL-Signalintensität ist für alle Fängerantikörper nebeneinander aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass der Chip über die gesamte Fläche eine einheitlich niedrige Signalintensität von  $314 \pm 59$  a.u. auf Glas ( $n = 9$  Spotreihen) und  $466 \pm 35$  a.u. auf Polycarbonat ( $n = 9$  Spotreihen) aufwies. Die Polycarbonat-Oberfläche hatte somit bei

Leerwertmessungen kein unspezifisches Signal an den Fängerantikörpern und der Hintergrund wies eine ähnliche Intensität wie die Glas-Oberfläche auf, wodurch beide eine gute Vergleichbarkeit aufzeigten.

Die Vergleichsmessungen wurden mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1, Stamm Philadelphia 1 und Stamm OLDA in zwei verschiedenen Konzentrationen von  $c = 10^4$  KBE mL<sup>-1</sup> und  $c = 10^9$  KBE mL<sup>-1</sup> durchgeführt, um das generelle Verhalten der AK auf Polycarbonat- gegenüber Glas-Oberflächen zu testen. Betrachtet wurde im Speziellen der mAb 10/6, da dieser spezifisch die Subgruppe Bellingham bindet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 b aufgeführt. Die Messungen mit der höheren Konzentration zeigten, dass hier in gleicher Weise viele Legionellen an die immobilisierten Fängerantikörper angebinden werden konnten. Bei beiden verwendeten Oberflächen erreichten die Signalintensitäten die Kamerasättigung. Bei Verwendung der niedrigeren Konzentration war ein Unterschied bei den verschiedenen Oberflächen zu erkennen. Auf der Glas-Oberfläche konnte eine Signalintensität von 5.989 a.u. ( $n = 1$ ) gemessen werden, welche im unteren Intensitätsbereich lag. Auf der Polycarbonat-Oberfläche konnte dagegen eine 5,5-fach höhere Intensität von 33.427 a.u. ( $n = 1$ ) bei gleicher Probenkonzentration nachgewiesen werden. Dies kann daran liegen, dass durch die punktuelle und neue Aktivierung der Oberfläche mehr Fängerantikörper anbinden und somit mehr Legionellen in der Messung angebinden werden können.

**Tabelle 10: CL-Signalintensitäten für Messungen auf Glas- und Polycarbonat-Oberflächen mit verschiedenen Fängerantikörpern. Gemessen wurde mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 und Stamm OLDA, jeweils  $c = 10^4$  KBE mL<sup>-1</sup> ( $n = 1$ ).**

| Fängerantikörper    | Spezifität laut ELISA | Glas     | Polycarbonat |
|---------------------|-----------------------|----------|--------------|
| <b>OLDA</b>         |                       |          |              |
| mAb 10/7            | Non-Pontiac-Gruppe    | 161 a.u. | 4.398 a.u.   |
| mAb 84/2            | OLDA                  | 386 a.u. | 4.811 a.u.   |
| mAb 30/1            | OLDA                  | 100 a.u. | 2.846 a.u.   |
| <b>Philadelphia</b> |                       |          |              |
| 81/2                | Sg 1                  | 290 a.u. | 51.545 a.u.  |
| 48/3                | Pontiac-Gruppe        | 310 a.u. | 38.849 a.u.  |

Derselbe Trend ließ sich auch bei den Messungen mit Subgruppe OLDA und Philadelphia erkennen. Die spezifischen Fängerantikörper und die resultierende CL-Signalintensität bei der Messung mit  $c = 10^4$  KBE mL<sup>-1</sup> ist in Tabelle 10 aufgetragen.

Auch hier wurden deutlich mehr Legionellen an den entsprechenden Fängerantikörpern angebunden. Die Messung resultierte in einer höheren Signalintensität, was die Messungen mit der Subgruppe Bellingham bestätigte. Die Messungen wiesen somit im direkten Vergleich der Polycarbonat-Oberfläche mit der Glas-Oberfläche auf eine höhere Sensitivität bei der Polycarbonat-Oberfläche auf. Im weiteren Verlaufe der Doktorarbeit wurden die Messreihen auf Polycarbonat-Mikroarray-Chips umgestellt, da diese wesentlich einfacher und kostengünstiger in der Herstellung waren.

### 3.3.2 Etablierung des Demonstrator-Gerätes MCR-R

Der MCR 3 wurde durch das neue Demonstrator-Gerät MCR-R ersetzt. Dieses wurde von der Firma GWK Präzisionstechnik GmbH in München gebaut und hat gegenüber den Vorgängermodellen eine verbesserte Fluidik und weitere Optimierungen in der Elektronik und Hardware-Steuerung. An Stelle vieler Spritzenpumpen besitzt der MCR-R lediglich eine Spritzenpumpe, welche alle Reagenzien ansteuern kann. Die AK- und Streptavidin-Spritzen werden in diesem Gerät nun, gleich den CL-Reagenzien, dauerhaft gekühlt. Für diese vier Reagenzien gibt es im neuen Demonstrator zudem eine Kontrolle, welche den Start einer neuen Messung verhindert, sobald nicht mehr genügend Reagenzien für eine vollständige Messung in den Spritzen bzw. Behältern ist. Während der Bildaufnahme am Ende der Messung verschließen sich die Ventile zum Mikroarray-Chip, was zum einen eine Störung der Bildaufnahme durch Flüssigkeit verhindert und zum anderen erlaubt, die Verschlauchung, die Probenschleife und die Spritzenpumpe schon während der Messung zu spülen, ohne die Messung zu stören. Zu Beginn wurde das Messprogramm des MCR 3 für erste Test-Messungen auf den MCR-R übertragen. Zusätzlich wurde ein *Wash*-Programm geschrieben, welches zwischen den Messungen zur verstärkten Spülung der Probenschleife verwendet wird, um eine Probenverschleppung zu verhindern. Hier wurde bei einer Flussrate von  $500 \mu\text{L s}^{-1}$  die Probenschleife, der Probenweg und über den Chip mit jeweils  $2500 \mu\text{L}$  gespült. Bei ersten Messungen konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden. Wie in Abbildung 29 a und b zu erkennen ist, wiesen die Chips keine einheitliche Oberfläche auf und hatten meist einen leuchtenden Hintergrund. Zudem waren die AK-Spots nicht richtig aufgrund unzureichender Durchspülung abzugrenzen. Als ein weiteres Merkmal der unzureichenden Durchspülung war Blasenbildung zu erkennen.

Im bestehenden Programm wurden im weiteren Verlauf die Volumina und Flussraten in mehreren Messreihen optimiert. In Abbildung 29 c ist ein Messbild nach Optimierung zu sehen. Es konnten sowohl Blasen- als auch Schmierbildung verbessert werden und die Signalintensität des Hintergrundes auf  $1.662 \pm 514$  a.u. ( $n = 3$  Spotreihen) reduziert werden, welche mit den Intensitäten der Messungen auf dem MCR 3 ( $664 \pm 33$  a.u.,  $n = 4$  Spotreihen) vergleichbar ist. Der Ablauf des optimierten Messprogrammes ist Tabelle 36 (Kapitel 5.5.6) zu entnehmen.

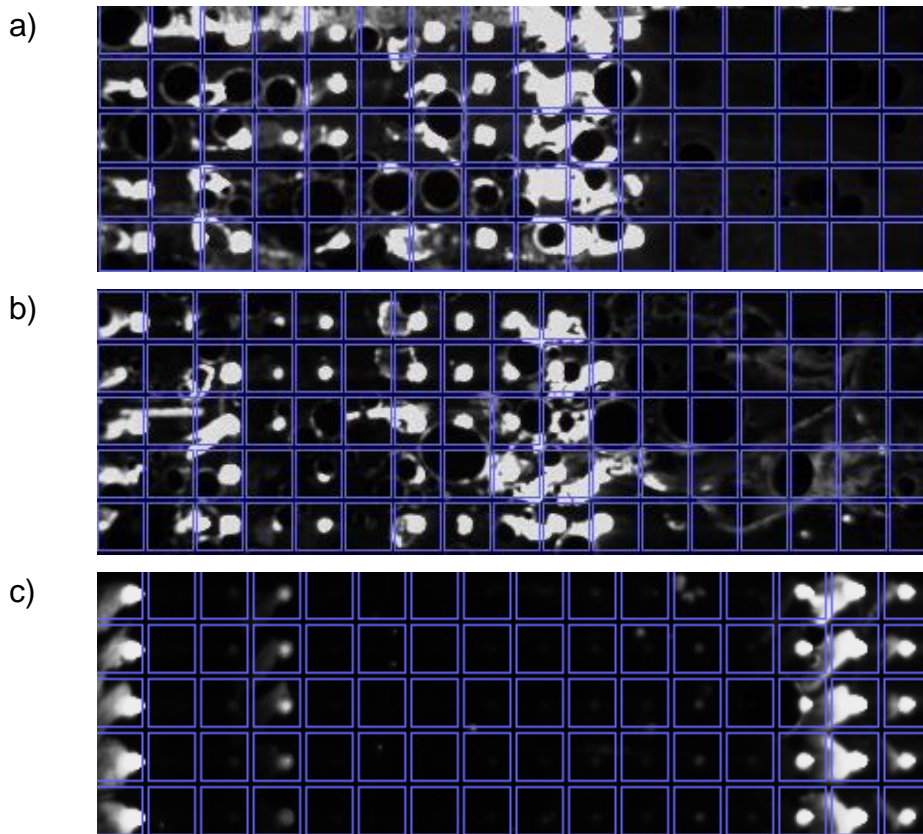


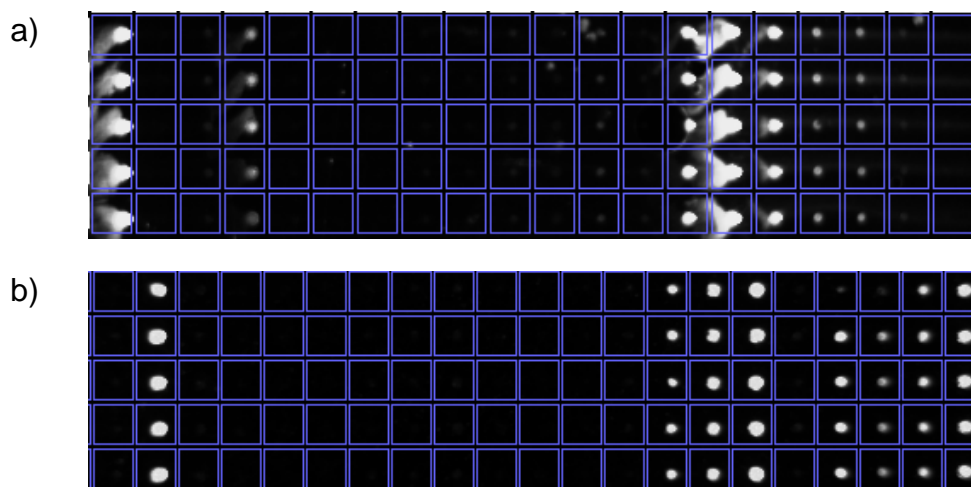
Abbildung 29: Messbilder von Mikroarray-Chips a) + b) vor und c) nach Programmoptimierung am MCR-R.

### 3.3.3 Automatisiertes Füllen der Mikroarray-Chips

Bei der ersten Messreihe mit Polycarbonat-Mikroarray-Chips wurden die fertig gespotteten Chips mit PBS gespült, um freies Aktivierungsreagenz vom Chip zu entfernen. Aufgrund dieses Spülschrittes wurde jedoch die Anhaftung der verwendeten doppelseitigen Klebefolie behindert und der Chip wurde in Folge häufig undicht. Daher wurde auf diesen Schritt verzichtet und die Chips ohne Spülung verklebt und manuell mit 1 % BSA in PBS gefüllt. In nachfolgenden Messungen wurden auf den Messbildern (wie in Abbildung 30 a) jedoch verschwommene Außenkanten sichtbar. Dies lässt den Rückschluss zu, dass durch das manuelle Füllen die Aktivierungsreagenzien und



ungebundene AK lediglich ein Stück im Chip verschoben wurden und dort aufgrund der bisher unbespotteten, freien Fläche erneut eine Aktivierung und Anbindung an die Chipoberfläche erfolgte. Eine manuelle Spülung vor der Füllung wurde nach wenigen Versuchen gleich zu Beginn verworfen, da diese sehr zeitaufwendig war und eine ausreichende Spülung der Oberfläche nicht gewährleistet war. Um eine Zeitersparnis zu erreichen, wurden sowohl ein automatisiertes Spülen als auch Füllen des Mikroarray-Chips am MCR-R eingeführt. Aufgrund des Chipvolumens wurde der Chip zuerst mit 200  $\mu\text{L}$  1 % BSA-Lösung bei einer Flussrate von 200  $\mu\text{L s}^{-1}$  durchspült. Um eine vollständige Füllung zu gewährleisten, wurde der Chip anschließend noch einmal mit 100  $\mu\text{L}$  bei einer niedrigeren Flussrate von 65  $\mu\text{L s}^{-1}$  durchspült.



**Abbildung 30: Messbilder von Mikroarray-Chips a) bei manueller Befüllung und b) automatisierter Befüllung mit 1 % BSA-Lösung.**

Wie in Abbildung 30 b zu erkennen, konnte das Problem der verschwommenen Spotaußenränder aufgrund dieses neuen Spül- und Füllprogrammes vollständig behoben werden und die Spots wiesen scharfe und genaue Außenränder auf. Der Hintergrund weist mit  $1.437 \pm 476$  a.u. ( $n = 10$  Spotreihen) zudem eine niedrige Signalintensität auf. Zur Lagerung wurden die Mikroarray-Chips mit einer Folie versiegelt und im Kühlschrank gelagert.

### 3.3.4 Langzeitstabilitätsmessungen

Bei der Chip-Herstellung wurde zum Blocken und Füllen der Mikroarray-Chips 1 % BSA in PBS verwendet. Bei Lagerung der Chip-Chargen im Kühlschrank wurde deutlich, dass die Chips nach ca. einem Monat an Flüssigkeit verlieren und sich Luftblasen bildeten.

Auf Grund dieser Tatsache wurden die vier folgenden verschiedenen Vergleichslösungen zur Lagerung in Langzeitstabilitätsmessungen getestet:

- I. 1 % BSA mit Zugabe von 0,01 %  $\text{NaN}_3$  in PBS
- II. 0,125 M Sorbitol mit Zugabe von 0,01 %  $\text{NaN}_3$  in PBS
- III. 0,01 % Pluronic F68 in Reinstwasser
- IV. 0,01 % Glycerin in Reinstwasser

Die Mikroarrays wurden zeitgleich hergestellt und sechs Monate bei RT und im Kühlschrank (4 °C) gelagert. Die gelagerten Mikroarray-Chips wurden jeweils nach einem Zeitraum von einer Woche, zwei Wochen, vier Wochen, drei Monaten und sechs Monaten vermessen und die Messdaten verglichen. Diese Messungen wurden in Einfachmessungen durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Mikroarray-Chips nach den verschiedenen Lagerzeiten alle am selben Messtag gemessen werden konnten.

Zur Ermittlung eines Vergleichswertes, der den Grundzustand der Chips darstellt, wurden vor Beginn der Langzeitstabilitätsmessungen drei Chips täglich an vier Tagen ( $n = 12$ ) gemessen. Hier wurden verschiedene Konzentrationen der Positivkontrolle gespottet, um zusätzlich eine geeignete Konzentration zu finden, welche Abweichungen von der Norm schnellstmöglich zeigt. Bei einer Positivkontrollen-Konzentration von  $c = 0,11 \text{ mg mL}^{-1}$  wurden Messwerte von  $58.922 \pm 422 \text{ a.u.}$  ( $n = 12$ ) ermittelt. Bei  $c = 0,055 \text{ mg mL}^{-1}$  zeigte sich eine CL-Signalintensität von  $47.121 \pm 13.232 \text{ a.u.}$  ( $n = 12$ ) und bei  $c = 0,011 \text{ mg mL}^{-1}$  eine CL-Signalintensität von  $19.603 \pm 3.971 \text{ a.u.}$  ( $n = 12$ ).

**Tabelle 11: Interassay-Variationskoeffizienten ( $n = 3$ ) der vier Messtage für die Konzentrationen  $0,11 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,055 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $0,011 \text{ mg mL}^{-1}$  und der daraus resultierende Intraassay-Variationskoeffizient ( $n = 4$ ).**

| CV<br>Messtag              | Interassay-Variationskoeffizient / % |      |      |      | Intraassay-Variations-<br>koeffizient / % |
|----------------------------|--------------------------------------|------|------|------|-------------------------------------------|
|                            | 1                                    | 2    | 3    | 4    |                                           |
| $0,11 \text{ mg mL}^{-1}$  | 0,1                                  | 0,3  | 0,5  | 0,4  | 0,3                                       |
| $0,055 \text{ mg mL}^{-1}$ | 10,2                                 | 25,1 | 4,3  | 11,4 | 11,4                                      |
| $0,011 \text{ mg mL}^{-1}$ | 14,9                                 | 5,2  | 11,4 | 5,6  | 9,3                                       |

In Tabelle 11 sind die Interassay-Variationskoeffizienten der verschiedenen Tage und die Intraassay-Variationskoeffizienten angegeben. Im weiteren Verlauf der Langzeitstabilitätsmessungen wird hier die Konzentration  $c = 0,11 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet, da hier der höchste Grundwert mit dem geringsten Inter- und Intraassay-

Variationskoeffizienten gemessen wurde. Der Einfluss der Lagerflüssigkeit sollte sich durch Schwankungen im Signal der Messungen sehr deutlich zeigen.

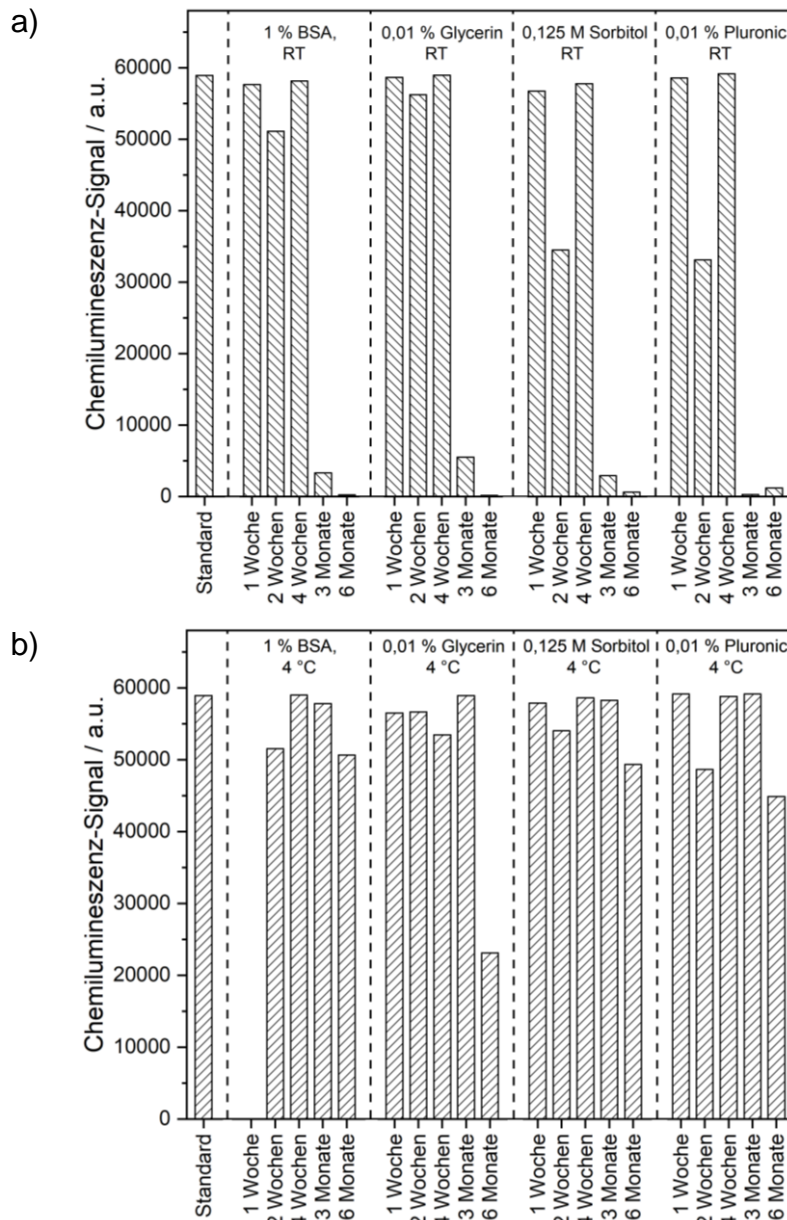
Zu Beginn der Messungen konnte optisch nach einer und auch zwei Wochen Lagerung kaum ein Unterschied zwischen den Mikroarray-Chips bei 4 °C und RT ausgemacht werden, jedoch zeigten sich bereits nach vier Wochen Lagerung bei RT große Luftblasen in den Flusskanälen. Dies macht die AK, welche sich genau in der Luftblase befindet, für Messungen unbrauchbar. Die Anzahl und Größe der Luftblasen wurde erwartungsgemäß bei RT von Monat zu Monat größer, so dass nach drei Monaten bei den Mikroarray-Chips keinerlei Lagerflüssigkeit mehr vorhanden war (Abbildung 31 c, nach sechs Monaten). Die Mikroarray-Chips bei RT waren somit nur zwei Wochen lagerfähig.



**Abbildung 31:** Bilder verschiedener Mikroarray-Chips nach unterschiedlichen Lagerbedingungen und -zeiten: a) 1 % BSA mit Zugabe von 0,01 %  $\text{NaN}_3$  in PBS, 4 °C, 4 Wochen, b) 1 % BSA mit Zugabe von 0,01 %  $\text{NaN}_3$  in PBS, 4 °C, 3 Monate, c) 0,125 M Sorbitol mit Zugabe von 0,01 %  $\text{NaN}_3$  in PBS, RT, 6 Monate.

Bei Mikroarray-Chips, die bei 4 °C gelagert wurden, konnte nach vier Wochen noch kein Flüssigkeitsverlust, außer minimale Verluste an Ein- und Auslasslöchern festgestellt werden (Abbildung 31 a), welche jedoch außerhalb des Spotting-Rasters lagen und die Messung daher nicht beeinträchtigten. Nach drei Monaten war jedoch auch hier ein Auslaufen der Flüssigkeit zu bemerken. Die Mikroarray-Chips verloren die Lagerflüssigkeit immer in Richtung der Ein- und Auslässe (Abbildung 31 b), was dazu führte, dass sich die Fänger-AK trotz Flüssigkeitsverlust noch in der Lagerlösung befanden und stabil waren. Bei einem Panel mit sehr vielen Spotreihen könnte jedoch

trotzdem nach drei Monaten nicht mehr mit einem vollständig einsatzbereiten Panel gearbeitet werden. Dies zeigte, dass die Mikroarray-Chips bei 4 °C unabhängig von der Lagerflüssigkeit ein bis zwei Monate lagerfähig waren. Eine Vermeidung des Auslaufens bzw. Verdunstens der Flüssigkeiten könnte evtl. durch eine Lagerung in feuchter Umgebung vermieden werden, dies konnte im Verlauf der Doktorarbeit nicht mehr gezeigt werden.



**Abbildung 32: CL-Signalintensitäten der Messungen der Langzeitstabilitätsmessungen nach jeweils 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten bei Lagerung in verschiedenen Lagerlösungen bei a) RT und b) 4 °C Lagertemperatur. Zusätzlich ist ein Standardwert angegeben. Die Messungen sind Einfachmessungen (n = 1).**

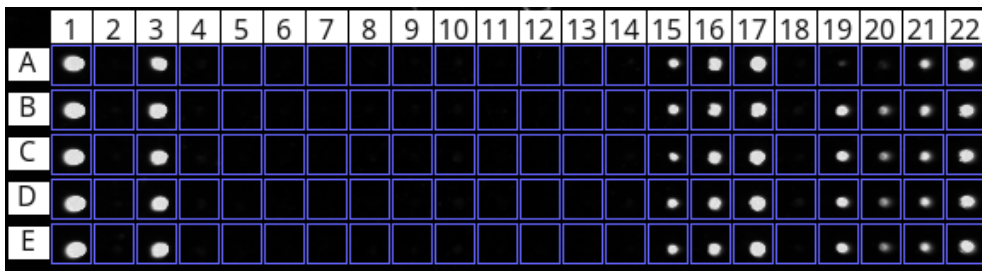
Im weiteren Verlauf wurden die Daten der Messungen bei einer Positivkontrollen-Konzentration von  $c = 0,11 \text{ mg mL}^{-1}$  genauer betrachtet. In Abbildung 32 a sind die Messdaten für die Lagerungen bei RT aufgetragen, bei Abbildung 32 b die Messdaten für die Lagerung bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Beide Abbildungen sind simultan aufgebaut und zeigen die Intensitäten der CL-Signale der verschiedenen Lagerlösungen im Verlauf der Lagerung. Als Orientierung wurde bei beiden Abbildungen der zuvor ermittelte Standardwert von  $58.922 \pm 422 \text{ a.u.}$  zusätzlich angegeben. Die Messungen bei RT zeigten, dass bei Glycerin die stabilsten Messwerte mit dem geringsten Signalunterschied gemessen werden konnten. Betrachtet man die drei Messungen nach einer, zwei und vier Wochen, so konnte hier ein Variationskoeffizient von 3 % für die Lagerflüssigkeit mit Glycerin ermittelt werden. Für die weiteren Lagerflüssigkeiten lagen die Werte bei 7 % für BSA, 27 % bei Sorbitol und 30 % bei Pluronic. Des Weiteren konnte bei den Messungen nach drei und sechs Monaten bei keiner Lagerlösung ein eindeutiges Signal gemessen werden. Bei der Lagerung mit Zugabe von Glycerin ließ sich nach drei Monaten noch eine Signalintensität von etwa 9 % des Maximalsignales feststellen, bei BSA und Sorbitol zeigte sich eine Signalintensität von etwa 6 %, bei Pluronic ein Signal von unter 1 %. Hier war, wie bereits erwähnt, keinerlei Lagerflüssigkeit mehr in den Mikroarray-Chips, wodurch die Fänger-AK eingetrocknet waren. Dies führte zum Aktivitätsverlust, es war kein Signal mehr messbar, da keine Legionellen bzw. Strep-HRP zur Detektion mehr gebunden wurden.

In Abbildung 32 b, welche die Messungen der bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Mikroarray-Chips zeigt, lässt sich erkennen, dass die CL-Signalintensitäten homogenere Werte zeigten, als bei der Lagerung bei RT. Der Wert der Messung nach einer Woche bei Zusatz von BSA war als Ausreißer anzusehen und wurde aus der Abbildung ausgenommen. Bei allen Lagerlösungen konnte auch nach sechs Monaten Lagerung noch eine hohe CL-Signalintensität gemessen werden, welche häufig mit den Werten nach vier Wochen vergleichbar war. Die Abnahme der Lagerflüssigkeiten an Ein- und Auslass hatte hier nicht das gespottete Panel betroffen. Dies wäre bei einem großen Panel jedoch nicht immer gegeben. Die verschiedenen Zusätze zu den Lagerlösungen zeigten jedoch trotz hoher Signalintensitäten gewisse Differenzen im Vergleich untereinander. So war bei einem Zusatz von Glycerin der Variationskoeffizienten mit 30 % ( $n = 5$ ) am höchsten. Die CL-Signalintensität zeigte bei der Messung nach sechs Monaten einen Signalabfall von über 50 % zum vorherigen Durchschnittssignal. Stabilere CL-Signalintensitäten konnten bei Zusatz von BSA

(Variationskoeffizient = 8 %, n = 4) und Pluronic (Variationskoeffizient = 13 %, n = 5) gemessen werden. Die Messungen mit dem Zusatz von Sorbitol konnten hier als stabilstes CL-Signal ermittelt werden. Hier konnte nach sechs Monaten Lagerung noch 84 % des Ausgangssignales gemessen werden mit einem Variationskoeffizienten von 7 % (n = 5) über alle Messungen. Für eine geeignete Langzeitlagerung ist demnach 4 °C und 0,125 M Sorbitol mit Zugabe von 0,01 % NaN<sub>3</sub> in PBS am besten geeignet.

### 3.3.5 Analytische Datenevaluierung

a)



b)

|    | A                                        | B          | C          | D          | E                                                                | F          | G          | H          | I          | J          | K          |
|----|------------------------------------------|------------|------------|------------|------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1  | Date/time: 09.05.2017 15:00              |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 2  | Device ID: MCR-R-D001                    |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 3  | Probe ID: Lpn Bellingham 10 <sup>7</sup> |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 4  | Chip ID: 20170509_19-3                   |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 5  | Result image                             | PGM:       | Lpn        | Bellingham | 10 <sup>7</sup> _20170509_19-3_2017.05.09-15.00.20.pgm           |            |            |            |            |            |            |
| 6  | Result image                             | PNG:       | Lpn        | Bellingham | 10 <sup>7</sup> _20170509_19-3_2017.05.09-15.00.20.png           |            |            |            |            |            |            |
| 7  | Dark frame image                         | PGM:       | Lpn        | Bellingham | 10 <sup>7</sup> _20170509_19-3_2017.05.09-15.00.20_DarkFrame.pgm |            |            |            |            |            |            |
| 8  | Temperatur ok:                           | yes        |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 9  | Clean image:                             | yes        |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 10 |                                          |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 11 |                                          |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 12 | X:                                       | 22         |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 13 | Y:                                       | 5          |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 14 |                                          |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 15 |                                          | 1          | 2          | 3          | 4                                                                | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |
| 16 | A                                        | 59384      | 1553       | 58667      | 2669                                                             | 1210       | 1266       | 1130       | 1423       | 1773       | 3015       |
| 17 | B                                        | 59268      | 2692       | 58844      | 2699                                                             | 1794       | 1308       | 1136       | 1553       | 2123       | 2557       |
| 18 | C                                        | 59442      | 2207       | 59271      | 3634                                                             | 1302       | 1363       | 937        | 1855       | 1673       | 3337       |
| 19 | D                                        | 59538      | 2469       | 59418      | 2575                                                             | 1519       | 1180       | 938        | 1118       | 1715       | 2939       |
| 20 | E                                        | 59487      | 3340       | 59265      | 2674                                                             | 1159       | 808        | 977        | 1820       | 1703       | 2598       |
| 21 |                                          |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 22 | #                                        | Used       | grid       | settings   |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 23 | Spot                                     | size:      | 23         |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |
| 24 |                                          | 1          | 2          | 3          | 4                                                                | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |
| 25 | A                                        | X=049Y=220 | X=074Y=220 | X=099Y=220 | X=124Y=220                                                       | X=149Y=220 | X=174Y=220 | X=199Y=220 | X=224Y=220 | X=249Y=220 | X=274Y=220 |
| 26 | B                                        | X=049Y=246 | X=074Y=246 | X=099Y=246 | X=124Y=246                                                       | X=149Y=246 | X=174Y=246 | X=199Y=246 | X=224Y=246 | X=249Y=246 | X=274Y=246 |
| 27 | C                                        | X=049Y=272 | X=074Y=272 | X=099Y=272 | X=124Y=272                                                       | X=149Y=272 | X=174Y=272 | X=199Y=272 | X=224Y=272 | X=249Y=272 | X=274Y=272 |
| 28 | D                                        | X=049Y=298 | X=074Y=298 | X=099Y=298 | X=124Y=298                                                       | X=149Y=298 | X=174Y=298 | X=199Y=298 | X=224Y=298 | X=249Y=298 | X=274Y=298 |
| 29 | E                                        | X=049Y=324 | X=074Y=324 | X=099Y=324 | X=124Y=324                                                       | X=149Y=324 | X=174Y=324 | X=199Y=324 | X=224Y=324 | X=249Y=324 | X=274Y=324 |
| 30 |                                          |            |            |            |                                                                  |            |            |            |            |            |            |

Abbildung 33: a) Abbildung des Messbildes eines Mikroarray-Chips mit angepasstem Gitter. b) In Excel eingelesene Daten zur Datenevaluierung.

Anders als bei den Vorgänger-Plattformen wurde die Daten-Evaluierung am MCR-R gerätebedingt direkt im Anschluss an die Messung vorgenommen. Dabei konnte mit verschiedenen Parametern direkt das Gitter auf das verwendete Spotting-Muster angepasst werden (s. Abbildung 33 a). Nach Beendigung der Messung wurde vom

Gerät eine rsIt-Datei ausgegeben, welche in Excel eingelesen wurde (s. Abbildung 33 b). Hier wurden pro Spot-Spalte die fünf Einzelwerte ausgegeben, also für jeden Spot einzeln. In den Vorgängermodellen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen ausgegeben. Ausreißer mit mehr als 15 % Abweichung wurden von der Berechnung direkt ausgenommen. Beim neuen Format war es notwendig, für jedes Messbild eine Sichtkontrolle zu machen und die Messwerte bei der Mittelwertberechnung selbst zu überprüfen. Ausreißer mussten somit manuell aus der Berechnung genommen werden. Eine Software, welche die Messbilder des neuen Demonstrators automatisiert auswertet und Ausreißer bewertet ist in Bearbeitung, war im Verlaufe des Projektes jedoch nicht verfügbar.

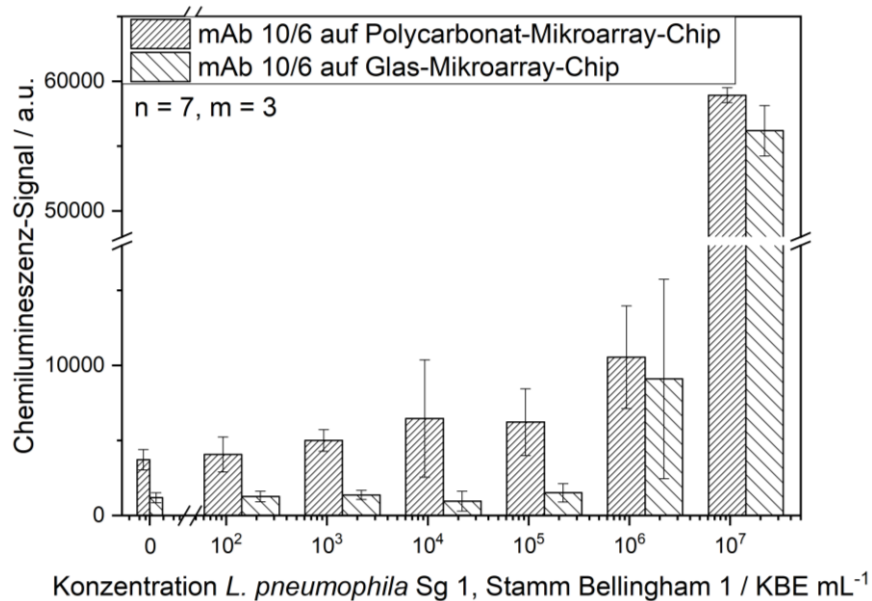
### 3.3.6 Vergleichende Messungen des CL-SMIA

Nach Optimierung der Polycarbonat-Oberflächen und des Messprogrammes am neuen Demonstrator-Gerät MCR-R wurde eine vergleichende Messreihe auf Glas- und Polycarbonat-Oberflächen durchgeführt. Auf beiden Oberflächen wurde der mAb 10/6 als Fängerantikörper in der Konzentration  $c_{\text{mAb 10/6}} = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  aufgebracht. Die Mikroarray-Messungen wurden mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1 durchgeführt. Die Proben wurden auf gleiche Weise hergestellt und in Reinstwasser zur Kalibrierung verdünnt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 abgebildet. Es wurden jeweils Triplikate aller Messpunkte angefertigt. Die CL-Signalintensitäten wurden unter Verwendung unterschiedlicher Legionellen-Konzentrationen aufgetragen.

Wie zu erkennen ist, stiegen die CL-Signalintensitäten auf beiden Mikroarray-Chip-Oberflächen ab einer gewissen Konzentration jeweils an. Der Polycarbonat-Mikroarray-Chip wies hierbei durchschnittlich höhere Signalintensitäten auf, als der Glas-Mikroarray-Chip bei gleicher Konzentration. Die Leerwertmessungen auf Polycarbonat ergaben eine Signalintensität von  $3.718 \pm 677 \text{ a.u.}$ , der Glas-Mikroarray-Chip zeigte hierbei eine Intensität von  $1.193 \pm 330 \text{ a.u.}$ . Die Nachweisgrenze, berechnet durch den Leerwert addiert mit dreifacher Standardabweichung, liegt hierbei für Polycarbonat bei  $5.749 \text{ a.u.}$  und damit mehr als 2,5-fach höher als für Glas ( $2.183 \text{ a.u.}$ ). Bei den Messungen mit dem Polycarbonat-Mikroarray-Chip konnten ab einer Konzentration von  $c = 10^4 \text{ KBE mL}^{-1}$  höhere Signalintensitäten verzeichnet werden, welche jedoch aufgrund der Standardabweichungen nicht signifikant über der Nachweisgrenze liegen (z.B.  $6.219 \pm 2.230 \text{ a.u.}$  für  $c = 10^5 \text{ KBE mL}^{-1}$ ). Auch auf dem Glas-Mikroarray-Chip konnte bis zu einer Konzentration von  $c = 10^5 \text{ KBE mL}^{-1}$  kein



signifikanter Anstieg der Signalintensität gemessen werden, welcher die Nachweisgrenze übersteigt.



**Abbildung 34:** CL-Signalintensitäten der Vergleichsmessungen mit dem Fängerantikörper mAb 10/6 auf Polycarbonat- und Glas-Oberflächen, gemessen mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1 ( $n = 3$ ) [183].

Im Bereich von  $c = 10^6 - 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> wiesen beide Mikroarray-Chipvarianten vergleichbare Intensitätswerte auf. Bei einer Konzentration von  $10^6$  KBE mL<sup>-1</sup> zeigten beide Varianten eine ähnliche mittlere Signalintensität, was auf ähnliche AK-Aktivität auf dem Polycarbonat-Mikroarray-Chip hinweist. Jedoch war die Standardabweichung auf Glas mit 6.647 a.u. etwa doppelt so hoch wie bei Polycarbonat-Mikroarray-Chips mit 3.418 a.u. Dies bestätigte sich auch bei der Maximalkonzentration, wobei hier beide Chip-Varianten in die Sättigung der CCD-Kamera kamen, wodurch die geringe Standardabweichung bei Polycarbonat erklärt ( $58.932 \pm 570$  a.u.) werden konnte. Beim Vergleich der Inter-Assay-Reproduzierbarkeit konnte bei den Polycarbonat-Mikroarray-Chips ein Interassay-Variationskoeffizient von 7,7 % (berechnet über die Varianzen der Triplikate über verschiedene Konzentrationen) verzeichnet werden, wohingegen die Glas-Mikroarray-Chips einen Inter-Assay-Variationskoeffizienten von 30,6 % aufwiesen.

Die Vergleichsmessungen zeigten, dass die Polycarbonat-Oberflächen eine geeignete Alternative gegenüber den Glas-Oberflächen darstellen. Sie wiesen zwar eine höhere Signalintensität bei Leerwertmessungen auf, wodurch die Nachweisgrenze etwa 2,5-fach höher lag, jedoch war der Signalanstieg der Messwerte in einem



vergleichbaren Konzentrationsbereich, wodurch keine Verschlechterung der Sensitivität dieser Methode beim Gebrauch von Polycarbonat-Oberflächen anzunehmen war. Zudem wiesen die Polycarbonat-Mikroarray-Chips eine geringere Abweichung der Messwerte untereinander bei größeren Konzentrationen auf.

Ein großer Vorteil des Polycarbonat-Mikroarray-Chips war die ökonomischere und ökologischere Herstellung. Die Polycarbonat-Chips waren nicht nur eine kostengünstigere Alternative, im Vergleich zur Arbeit mit Glas fiel zudem weit weniger Chemikalien-Müll an. Man benötigte lediglich 150 bis 200 mL Toluol zur Pasten-Herstellung an Stelle von insgesamt ca. 1,5 L Methanol/Ethanol bei der kompletten Herstellung der Glas-Mikroarray-Chips. Auch wurden keine Säuren zur Anätzung der Oberfläche verwendet. Die modifizierte Jeffamine-Paste wurde hier direkt auf die Polycarbonat-Oberflächen aufgetragen und die Reinigung der Platten erfolgte mit Reinstwasser. Der größte Vorteil war jedoch die Zeitersparnis. Bei der Arbeit mit Glas-Objektträgern benötigte man vom rohen Objektträger bis zum fertig verwendbaren Mikroarray-Chip ca. 66 h und auf Grund der Inkubationen über Nacht waren drei Nächte nötig. Die Polycarbonat-Mikroarray-Chips benötigten von der Platte bis zum fertig verwendbaren Chip nur 22 h (eine Nacht). Auf Grund der vorliegenden Messdaten wurde im weiteren Verlauf bei CL-SMIA-Messungen ausschließlich mit Polycarbonat-Mikroarray-Chips gearbeitet.

### 3.3.7 Kombination des CL-SMIA mit einer Anreicherungs-methode

Wie schon bei der haRPA behandelt, ist die Aufkonzentrierung ein essentiell wichtiger Arbeitsschritt in der Vermessung von Wasserproben, um die Konzentration der Legionellen in der Probe in einen messbaren Konzentrationsbereich für die Detektion zu bringen. Für die Methode des CL-SMIA gibt es mit Glas-Oberflächen und Vermessung am MCR 3 bereits eine Methode zur Anreicherung, welche von Wunderlich et al. [206] am IWC etabliert und mit Oberflächenwasser getestet wurde. Hierbei wurde die monolithische Adsorptionsfiltration (MAF) verwendet, bei der die Monolithen mit Hydroxy-Gruppen funktionalisiert wurden. Diese Monolithe wurden als MAF-OH bezeichnet. Bei dieser Anreicherungs-methode wurden 10 L Wasser, angesäuert auf pH 3, mittels Schlauchpumpe über die MAF-OH geleitet. Die Legionellen banden über ionische und elektrostatische Wechselwirkung und wurden mit Rinderextrakt-Puffer (BEG, pH 9,5) wieder in 20 mL Volumen eluiert. Diese wurden abschließend über zentrifugale Ultrafiltration (CeUF) weiter auf 1 mL eingengt.

Im Zuge dieser Arbeit wurde nach einer alternativen Adsorptions-Elutions-Aufkonzentrierungsmethode für Legionellen gesucht, mit welcher Wasserproben ohne Ansäuerung direkt aus einem geringeren Volumen aufkonzentriert werden konnten. Dazu wurde die MAF-DEAE gewählt, bei welcher die Monolithen mit Diethylamingruppen funktionalisiert wurden. Hierdurch können Proben bei neutralem pH filtriert werden, wie bereits für Viren und Bakterien (z.B. *E.coli* und *E.faecalis*) von Dennis Elsässer gezeigt [331]. Die Messreihen mit Legionellen (Daten hier nicht gezeigt) sind Bestandteil der Bachelorarbeit von Lennard Wendlinger [332], welche im Rahmen des LegioTyper-Projektes am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie durchgeführt wurde. Die Messungen in der Bachelorarbeit wurden mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1 in Einfachmessungen durchgeführt. Die Filtration wurde dabei zunächst mit 10 L Ausgangsvolumen mit verschiedenen Elutionspuffern (BEG-Puffer pH 3,0 und 9,5 und HEPES-Puffer) getestet. Hier wurde für den BEG-Puffer pH 9,5 eine Signalintensität von 1 % des Maximalsignales gemessen. Somit verzeichnete der BEG-Puffer pH 9,5 hier ein niedrigeres Leerwert-Signal am Fängerantikörper pAb ( $c = 2,375 \text{ mg mL}^{-1}$ ) im Vergleich zu den anderen Puffern (BEG pH 3,0: 9 % des Maximalsignals; HEPES: 5 % des Maximalsignales). Mit steigender Konzentration war der Anstieg des CL-Signales bei BEG pH 9,5 in einem höheren Intensitätsbereich und lag bei  $c = 1 \times 10^2 \text{ mg mL}^{-1}$  bei 17 % des Maximalsignals, wohingegen die beiden anderen Puffer eine Signalintensität von 8 % aufwiesen. Auch bei einer Konzentration von  $c = 1 \times 10^4 \text{ mg mL}^{-1}$  wurde für den BEG pH 9,5 eine Intensität von 92 % des Maximalsignals verzeichnet, wohingegen der HEPES-Puffer und der BEG pH 3,0 lediglich 70 % bzw. 26 % des Maximalsignales aufwiesen. Aufgrund dieser Daten wurde der BEG-Puffer bei pH 9,5 im direkten Vergleich als optimaler Puffer gewählt.

Der BEG-Puffer pH 9,5 wurde des Weiteren für die Anreicherung aus 1 L Ausgangsvolumen getestet. Die Ergebnisse, wie auch die Ergebnisse der Messreihe mit 10 L Ausgangsvolumen sind in Tabelle 12 angegeben. Hierbei zeigte sich in der Leerwertmessung eine vergleichbar niedrige Signalintensität von 1 % des Maximalsignales. Jedoch wurde bei steigenden Konzentrationen eine konstant höhere Signalintensität verzeichnet als bei den Messungen mit 10 L Ausgangsvolumen ( $c = 1 \times 10^0$ , 1 L Ausgangsvolumen: 9 %, 10 L Ausgangsvolumen: 4 %). Beide erreichen ein Maximalsignal bei 92 % des Maximalsignales. Zudem wurden im Rahmen der Bachelorarbeit diese Messungen mit der bereits etablierten Anreicherung

über MAF-OH mit 10 L Ausgangsvolumen verglichen (s. Tabelle 12). Hierbei zeigte sich ein 13-fach höheres CL-Signal in der Leerwert-Messung. Dieses wurde auch bei Wunderlich et al. verzeichnet. Die prozentualen Signalintensitäten bei steigender Konzentration zeigten sich jedoch als vergleichbar mit der Anreicherung über MAF-DEAE aus 1 L Ausgangsvolumen. Diese vergleichende Messung zeigt, dass die Anreicherung über MAF-DEAE aus 1 L Ausgangsvolumen als geeignete Alternative zur Anreicherung von Legionellen aus Leitungswasserproben in Kombination mit CL-SMIA-Messungen am MCR-R verwendet werden kann.

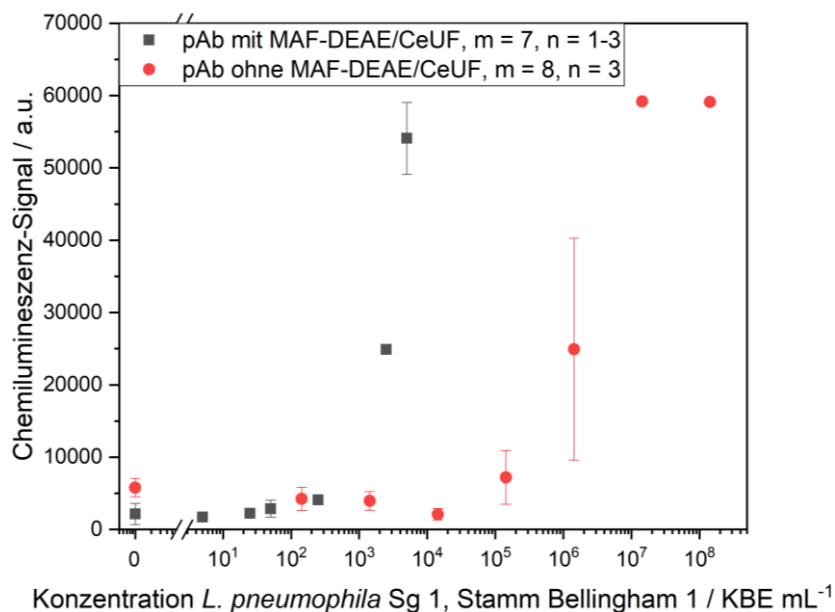
**Tabelle 12: Vergleichende Messungen legionellenhaltiger Proben mit vorgeschalteter Aufkonzentrierung über MAF-DEAE mit 1 L bzw. 10 L Ausgangsvolumen und MAF-OH mit 10 L Ausgangsvolumen. Angegeben sind die prozentualen Signalintensitäten verglichen mit dem Maximalsignal bei verschiedenen Konzentrationen. Die Messungen wurden als Einfachmessungen durchgeführt.**

| Konzentration /<br>KBE mL <sup>-1</sup> | Signalintensität für<br>10 L Ausgangsvolumen<br>MAF-DEAE / % | Signalintensität für<br>1 L Ausgangsvolumen<br>MAF-DEAE / % | Signalintensität für<br>10 L Ausgangsvolumen<br>MAF-OH / % |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Leerwert                                | 1                                                            | 1                                                           | 13                                                         |
| 10 <sup>0</sup>                         | 4                                                            | 9                                                           | 7                                                          |
| 10 <sup>2</sup>                         | 17                                                           | 21                                                          | 21                                                         |
| 10 <sup>4</sup>                         | 92                                                           | 92                                                          | 94                                                         |

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde die Anreicherung mit der MAF-DEAE aus 1 L Ausgangsvolumen mit Leitungswasser in steigenden Konzentrationen erneut durchgeführt, um diese mit Messungen ohne vorgeschaltete Anreicherung zu vergleichen. Die Ergebnisse der Messungen mit dem Fängerantikörper pAb ( $c = 2,375 \text{ mg mL}^{-1}$ ) sind in Abbildung 35 dargestellt. Auf Grund von temporären Schwierigkeiten in der Monolith-Herstellung kurz vor Ende der Doktorarbeit konnten einige Messpunkte nicht in Triplikaten gemessen werden, daher ist dies nur eine vergleichende Messung. In der Abbildung wurden die CL-Signalintensitäten gegen die halblogarithmisch aufgetragene Konzentration der Proben für beide Testreihen aufgetragen.

Bei den Messungen ohne vorgeschaltete Aufkonzentrierung über MAF-DEAE / CeUF stiegen die CL-Signalintensitäten nicht über den Wert der Leerwertmessungen ( $5.795 \pm 1.261 \text{ a.u.}$ ,  $n = 3$ ) bis zu einer Konzentration von  $c = 10^5 \text{ KBE mL}^{-1}$ . Ab hier verzeichnete die Signalintensität einen leichten Anstieg auf  $7.194 \pm 3.700 \text{ a.u.}$  ( $n = 3$ ), der im weiteren Verlauf auf  $24.931 \pm 15.324 \text{ a.u.}$  ( $n = 3$ ) bei einer Konzentration von  $c = 10^6 \text{ KBE mL}^{-1}$  anstieg und bei höheren Konzentrationen in ein Plateau überging.

Die Messsignale zeigten einen sigmoiden Zusammenhang. Betrachtet man die Messungen mit vorgeschalteter Aufkonzentrierung, so sieht man auch hier, dass die ersten Messpunkte unterhalb einer Konzentration von  $c = 5 \times 10^1$  KBE mL<sup>-1</sup> ( $3.088 \pm 957$  a.u.,  $n = 3$ ) eine vergleichbare Signalintensität wie die Leerwertmessung ( $2.885 \pm 280$  a.u.,  $n = 3$ ) aufwiesen. Mit steigender Konzentration stiegen die CL-Signalintensitäten auf 24.877 a.u. ( $n = 1$ ) bei einer Konzentration von  $c = 2,5 \times 10^3$  KBE mL<sup>-1</sup> und erreichten mit  $54.085 \pm 4.959$  a.u. ( $n = 3$ ) bereits bei einer Konzentration von  $c = 5 \times 10^3$  KBE mL<sup>-1</sup> eine Signalintensität nahe des Maximalsignales. Aufgrund der fehlenden Wiederholungen konnten bei den höheren Werten keine Fehlerbalken gezeigt werden. Es ist jedoch erkennbar, dass die Aufkonzentrierung mit der MAF-DEAE hier eine Sensitivitätssteigerung um etwa zwei Log-Stufen in den niedrigeren Bereich hatte. Ein direkter Vergleich der LODs ist aufgrund der unvollständigen Messungen hier nicht möglich, die Messungen müssen dahingehend wiederholt und in dreifacher Ausführung an jedem Messpunkt ausgeführt werden.



**Abbildung 35: Vergleichende Messungen ( $n = 1 - 3$ ) legionellenhaltiger Proben mit und ohne vorgeschaltete Aufkonzentrierung über MAF-DEAE und CeUF aus 1 L Ausgangsvolumen. Als Fängerantikörper wurde der pAb verwendet, gemessen wurde mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1, Standardabweichungen ( $n = 3$ ) sind als Fehlerbalken angegeben.**

Die Aufkonzentrierungsmethode MAF-DEAE/ CeUF wurde auch mit aufgestockten Prozesswasserproben der Konzentration  $c = 5 \times 10^1$  KBE mL<sup>-1</sup> und  $c = 5 \times 10^3$  KBE mL<sup>-1</sup> durchgeführt und zeigten vergleichbare Intensitätswerte. Der

Intensitätswert der niedrigeren Konzentration lag mit einer Signalintensität von 4.491 a.u. ( $n = 1$ ) nur leicht überhalb des Intensitätsbereiches der Vergleichsmessungen ( $3.088 \pm 957$  a.u.,  $n = 3$ ). Dies war auch bei der höher gewählten Konzentration zu erkennen. Hier konnte eine Signalintensität von 49.013 a.u. ( $n = 1$ ) gemessen werden (Vergleichsmessung:  $54.085 \pm 4.959$  a.u.,  $n = 3$ ). Die Aufkonzentrierungsmethode war somit auch bei Prozesswasserproben aus beispielsweise Kühltürmen oder Rückkühlwerken erfolgreich anwendbar.

Mit diesen Testmessungen konnte gezeigt werden, dass die MAF-DEAE, gleich der MAF-OH, für die Anreicherung von Legionellen aus Wasserproben verwendet werden kann. Im Gegenzug zur MAF-OH bietet die MAF-DEAE zudem den Vorteil der Filtration bei neutralem pH, was die Probenvorbereitungszeit verringert. Durch das geringere Ausgangsvolumen wird zudem eine weitere Zeit- und Aufwandsreduktion geschaffen. In der Publikation von Wunderlich et al. zeigte sich jedoch eine Verringerung des LODs von  $4 \times 10^3$  KBE mL<sup>-1</sup> auf 9 KBE mL<sup>-1</sup>, also um etwa drei Log-Stufen in einen niedrigeren Konzentrationsbereich. Bezüglich der Sensitivität scheint somit die Anreicherung von Legionellen mit Hilfe der MAF-OH aus 10 L Ausgangsvolumen geeigneter. Die Messungen von Wunderlich et al. wurden jedoch auf Glas-Mikroarrays und auf der Vorgänger-Plattform MCR 3 durchgeführt. Um zu bestätigen, dass die MAF-OH für die Verwendung mit Polycarbonat-Mikroarrays und auf dem MCR-R die geeignetere Methode für eine höhere Sensitivität ist, müssen die Messungen mit Triplikaten pro Messpunkt wiederholt werden. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr durchgeführt werden.

### 3.3.8 Detektionsantikörper für Sg 2 – 15

Im Rahmen des LegioTyper-Projektes wurde ein kommerziell erhältlicher polyklonaler Detektionsantikörper verwendet, welcher *L. pneumophila* Sg 1 - 15 detektieren sollte. Im Verlauf des ersten Projektjahres wurde dieser an der TUD mittels ELISA-Messungen auf die Detektionsfähigkeit der gesamten Spezies *L. pneumophila* getestet. Dabei wurde deutlich, dass der polyklonale Detektionsantikörper lediglich die Subgruppen der Sg 1 detektiert, jedoch nicht Sg 2 – 15.

Diese Testreihe wurde zudem für den polyklonalen Fängerantikörper durchgeführt. Auch hier wird Sg 1 detektiert, nicht jedoch die Sg 2 – 15. Serogruppen, welche ein strukturell ähnliches LPS wie Sg 1 besitzen (bspw. Sg 6) werden in geringem Maße

detektiert, jedoch ungeeignet für eine Detektion von Sg 2 – 15. Der Fängerantikörper wurde weiterführend ausschließlich für die Detektion der Sg 1 verwendet.

Um in der Detektion alle Sg 1 – 15 detektieren zu können, wurde ein zusätzlicher Detektionsantikörper gesucht. MAb 32/3, ein Fängerantikörper, welcher im Projekt verwendet wurde und Sg 2 – 15 fängt, wurde hierfür biotinyliert und als zusätzlicher Detektionsantikörper verwendet. Eine geeignete Konzentration der beiden Detektionsantikörper in der Mischung wurde in ELISA-Vortests an der TUD ermittelt und anschließend in Mikroarray-Tests weiter getestet und verifiziert. Für diese Messungen wurden verschiedene Fängerantikörper gespottet, welche sowohl zur Detektion von Sg 1 Subgruppen und Sg 2 – 15 geeignet sind. Gespottet wurden die monoklonalen Fängerantikörper mAb 10/6 (Sg 1, Subgruppe Bellingham), mAb 10/7 (Sg 1, Non-Pontiac-Gruppe), mAb 4/7 (Sg 3), mAb 32/3 (Sg 2 – 15) und der polyklonale Fängerantikörper (*L. pneumophila*). Gemessen wurden Leerwert-Messungen (Blank = Reinstwasser), verschiedene Konzentrationen an *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1 als Vertreter für Sg 1 sowie *L. pneumophila* Sg 3, Stamm Bloomington 2 als Vertreter für Sg 2 – 15.

Als Ausgangskonzentration wurden in den ELISA-Tests für den polyklonalen Detektionsantikörper die Konzentration von  $c = 0,001 \text{ mg mL}^{-1}$  und für den biotinylierten mAb 32/3 eine Konzentration von  $c = 0,0075 \text{ mg mL}^{-1}$  in der Mischung ermittelt. Aus Erfahrungen vorangegangener Projekte war bekannt, dass in Mikroarray-Messungen eine etwa zehnfach höhere Konzentration an Detektionsantikörper verwendet werden muss als im ELISA, da hier im Durchfluss gearbeitet wird. Somit ergab sich für die Detektionsantikörper-Mischung eine Richtkonzentration für den polyklonalen Detektionsantikörper von  $c = 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  (entspricht der bisher verwendeten Konzentration in der Einzelverwendung) und  $c = 0,75 \text{ mg mL}^{-1}$  für den biotinylierten mAb 32/3.

In ersten Messungen wurden diese Konzentrationen an Detektionsantikörper gemeinsam in die Lösung gegeben. Eine Leerwert-Messung mit Wasser und auch eine Messung mit Legionellenzugabe (*L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1,  $c = 10^5 \text{ KBE mL}^{-1}$ ) zeigten über den Chip verteilt sehr hohe Hintergrundwerte von  $32.536 \pm 5.072 \text{ a.u.}$  ( $n = 15$  Spotreihen). Die Messung wurde mit der Detektionsantikörper-Mischung auf Glas-Chips wiederholt. Hier wurde Hintergrundsignal von  $3.989 \pm 493 \text{ a.u.}$  ( $n = 10$  Spotreihen) gemessen. Dies konnte

auf eine Interaktion des neu zugefügten biotinylierten mAbs 32/3 mit der Polycarbonat-Oberfläche hinweisen oder mit der Reinheit des AKs zusammenhängen. Im weiteren Verlauf wurde versucht diesen Effekt auf ein Minimum zu reduzieren, um die Signalintensität auf dem Mikroarray-Chip ausschließlich durch gebundene Legionelle zu erzeugen. Zum Test, ob die Interaktion proportional zur AK-Konzentration abnimmt, wurde die Detektionsantikörperlösung 1:10 auf eine Konzentration von  $c = 0,001 \text{ mg mL}^{-1}$  für den pAb und  $c = 0,0075 \text{ mg mL}^{-1}$  für den biotinylierten mAb 32/3 verdünnt. Hier ergab sich bei Leerwertmessungen mit einem Hintergrundsignal von  $14.191 \pm 3.384 \text{ a.u.}$  ( $n = 16$  Spotreihen) eine eindeutige Verringerung der Signalintensität des Hintergrundes. Zur weiteren Verringerung des Hintergrundsignals wurde dem Laufpuffer 0,01 % Pluronic F127 zugegeben, welches den AK stabilisieren und so Interaktion mit der Chip-Oberfläche verhindern sollte. Zusätzlich wurde der polyklonale Detektionsantikörper in der Lösung auf die bisherig verwendete Konzentration von  $c = 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  erhöht, da hier aufgrund vorheriger Messungen nicht von Interaktion mit der Oberfläche ausgegangen wurde. Dabei wurden fünf Leerwert-Messungen durchgeführt, welche im Hintergrund alle eine gleichmäßig niedrige Signalintensität von  $4.838 \pm 1.464 \text{ a.u.}$  zeigten. Das Detergenz Pluronic F127 erzeugte hier also einen positiven Effekt (Reduktion der Signalintensität um ca. 35 %) auf das Hintergrundsignal und stabilisierte den Detektionsantikörper vor Anbindung an der Polycarbonat-Oberfläche.

Aufgrund der vorliegenden Messergebnisse und des hohen Preises des verwendeten biotinylierten mAb 32/3 wurde an diesem Punkt des LegioTyper-Projektes in Abstimmung mit den Projektpartnern entschieden, die Detektion der Sg 1 Subgruppen und Sg 2 – 15 zu trennen und auf verschiedenen Mikroarrays zu testen. Auf diese Weise konnte die hohe Sensitivität des polyklonalen Detektionsantikörpers gegenüber der Sg 1 Subgruppen für einen starken und vor allem kostengünstigen Mikroarray-Chip für Sg 1 genutzt werden. Der Mikroarray-Chip für Sg 2 – 15, für welchen der biotinylierte mAb 32/3 verwendet wird, kann als Zusatzmessung verwendet werden im Falle eines Negativbefundes des Sg 1 Panel-Mikroarray-Chips.

Im Zuge des LegioTyper-Projektes wurde eine große Messreihe zur Konzentrations-Einstellung des Detektionsantikörper mAb 32/3 und der Fängerantikörper für Sg 2 – 15 durchgeführt. Die Daten sind in der Doktorarbeit nicht weiter aufgeführt, da aufgrund des verhältnismäßig schwachen Detektionsantikörpers mAb 32/3 die Detektion der Sg 2 – 15 nur als Gruppenbestimmung möglich ist und dieses im

Rahmen eines Folgeprojektes mit einem besser geeigneten Detektionsantikörper weiter optimiert werden muss, bevor eine Anwendung in realen Messungen möglich ist.

### 3.3.9 Antikörper-Panel für *L. pneumophila* Sg 1

Im weiteren Verlauf der Dissertation wird die Paneleinstellung für Sg 1 behandelt. Die Einstellung der Fängerantikörper war die zentrale Aufgabe bei der Etablierung des LegioTyper-Panels. Es mussten die Spezifitäten jedes einzelnen verwendeten Fängerantikörper in Abhängigkeit der Spotting-Konzentration je AK-Mikroarray definiert werden. Anders als bei den ELISA-Messungen handelt es sich nicht um eine statische Messung in einer Platte, sondern eine Messung im Durchfluss. Hierdurch nimmt die Kinetik zwischen Fängerantikörper und Zielanalyt einen noch größeren Stellenwert ein. Spezifitäten, welche zuvor durch ELISA ermittelt wurden, müssen im flussbasierten dynamischen Prozess in Mikrokanälen nicht zwangsläufig übereinstimmen. Zudem wurde im Mikroarray ein anderes Assay-Prinzip für die Detektion verwendet, es wurde mit einem Sandwich-Immunoassays gearbeitet. Dies bedeutet, dass die monoklonalen AK als Fänger-AK kovalent direkt an der Chip-Oberfläche des Mikroarrays immobilisiert und die legionellenhaltige Probe im Durchfluss zugegeben wurden. Durch Zugabe eines Detektionsantikörpers wurde das namensgebende Sandwich geformt. In den ELISA-Messungen an der TU Dresden wurde ein indirekter ELISA angewendet. Die Proben (klinische und auch Umweltproben, vor oder nach Kultur, sowie Urinproben) wurden dabei zur Inkubation direkt auf die Mikrotiterplatte gegeben. Die monoklonalen AK wurden im Anschluss als primäre AK nach der zu untersuchenden Probe auf die Platte zugefügt. Diese wurden durch einen sekundären AK zur Detektion ergänzt. Im Gegensatz zum CL-SMIA band somit nicht die Probe an den immobilisierten AK, sondern der AK an die aufgetragene Probe. Da somit nicht nur ein anderes Assay-Prinzip, sondern eine andere Methode verwendet wird, können sich veränderte Kreuzreaktivitäten zwischen Fängerantikörper und dem Analyten *L. pneumophila* ergeben. Im Rahmen dieser Dissertation wurden aus diesem Grund neue Spezifitäten für jeden Fängerantikörper ermittelt, welche nur für Messungen auf den verwendeten Mikroarray-Chips Gültigkeit hatten, jedoch von den ermittelten Spezifitäten im ELISA aus oben genannten Gründen teilweise stark abwichen, da beide Methoden nicht direkt miteinander verglichen werden können. Daher wurde ein neues Panel erstellt, das sogenannte LegioTyper-Panel, welches auf



die durchgeführten Messungen am MCR-R abgestimmt wurde. Die Ausgangsdaten und im indirekten ELISA ermittelten Spezifitäten für alle verwendeten Fängerantikörper sind in Tabelle 13 aufgetragen, zur Verfügung gestellt durch die TUD. Die Intensitätsstufen entsprechen einer Einteilung für ELISA-Messungen, wie beispielsweise bei Helbig et al. [116] präsentiert, und sind wie folgt aufgeteilt:

- +++: Sehr starke Reaktion (OD > 1, OD = optische Dichte / Absorption)  
 ++: Starke Reaktion (1 > OD > 0,5)  
 +: Schwache Reaktion (0,5 > OD > 0,2)  
 -: Keine Reaktivität (OD < 0,2)  
 V: Variierende Signalintensitäten für unterschiedliche Stämme

**Tabelle 13: Spezifitäten der monoklonalen Fängerantikörper im ELISA laut Dresden-Panel für alle Subgruppen der Sg 1. Angegeben sind die monoklonalen Fängerantikörper und die Konzentration der AK auf der Platte. +++: Sehr starke Reaktion (OD > 1); ++: Starke Reaktion (1 > OD > 0,5); +: Schwache Reaktion (0,5 > OD > 0,2); - : Keine Reaktivität (OD < 0,2); V: Variierende Signalintensitäten für unterschiedliche Stämme.**

| Fänger-antikörper       | 81/2  | 48/3  | 10/7   | 20/1  | 3      | 10/6  | 84/2  | 30/1  | 30/4  |
|-------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| c / mg mL <sup>-1</sup> | 0,004 | 0,001 | 0,0015 | 0,002 | 0,0015 | 0,003 | 0,003 | 0,001 | 0,006 |
| Philadelphia            | +++   | +++   | -      | -     | -      | -     | +++   | -     | +     |
| Benidorm                | +++   | +++   | -      | +++   | -      | -     | -     | -     | +     |
| Knoxville               | +++   | +++   | V      | +     | +++    | -     | V     | -     | +     |
| France                  | +++   | +++   | -      | -     | -      | -     | -     | -     | V     |
| Allentown               | +++   | +++   | -      | -     | -      | -     | -     | -     | -     |
| Oxford                  | +++   | -     | +      | +     | -      | -     | +++   | -     | +     |
| OLDA                    | ++    | -     | +      | V     | -      | -     | +++   | +++   | +     |
| Heysham                 | ++    | -     | +      | -     | ++     | -     | -     | +     | -     |
| Camperdown              | +++   | -     | +      | -     | -      | -     | -     | ++    | +++   |
| Bellingham              | +++   | -     | +      | ++    | -      | +++   | -     | ++    | ++    |

Im Folgenden wird die Einstellung der Fängerantikörper auf dem Mikroarray ausführlich erklärt und beschrieben. Die verwendeten AK dieser Messreihe waren die neun mAbs 81/2, 20/1, 10/6, 10/7, 3, 48/3, 84/2, 30/1, 30/4 und der pAb. Für die Konzentrationseinstellungen wurden für jeden Fängerantikörper verschiedene Verdünnungen auf dem Mikroarray immobilisiert. Es wurden Verdünnungstufen gewählt, welche eine Verbindung schaffen zwischen den in ELISA-Tests verwendeten,

sehr niedrigen Konzentrationen, bis hin zu den bisher in Mikroarrays verwendeten, eher hohen Konzentrationen. Hierdurch ergab sich für jeden AK eine individuelle Anzahl an Verdünnungsschritten (s. Tabelle 14). Jede AK-Verdünnungsreihe wurde mit allen zehn Subgruppen der Sg 1 getestet, um alle möglichen Analyten der Sg 1 in die Einstellungsmessungen zu integrieren. Für die Testreihe wurden die Konzentrationen  $c = 10^3$ ,  $10^5$  und  $10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> gewählt. Zudem wurde ein Leerwert mit Reinstwasser gemessen.

Für die Auswertung der Messdaten musste im Rahmen des Projektes zudem eine neue Auswertestrategie ermittelt werden. Bei Messreihen für die Ermittlung von Kreuzreaktivitäten werden im ELISA auf Mikrotiterplatten häufig Kalibrierkurven für jeden AK hergestellt und die EC50-Werte, also die Testmittelpunkte, miteinander verglichen. Aufgrund der vielen AK und zu testenden Subgruppen konnten Kalibrierungen auf den Einweg-Mikroarray-Chips aus Zeit- und Kostengründen jedoch nicht durchgeführt werden. Am MCR-R wurden die Signalintensitäten mit einer 16-bit-CCD-Kamera aufgezeichnet. Dies bedeutet eine Auflösung von 16<sup>2</sup> Pixel, wodurch ein maximales Signal von 65.536 a.u. aufgezeichnet werden konnte. Vor Beginn jeder Messung wurde ein Dunkelbild von jedem neuen Chip aufgezeichnet und vom späteren Bild abgezogen, wodurch Schwankungen der Kamera ausgeglichen wurden. Zur Berechnung der somit tatsächlich messbaren Signalintensität eines Chips wurden die Werte der Dunkelbilder von zehn Mikroarray-Chips ausgelesen und ein Mittelwert berechnet ( $1.379 \pm 12$  a.u.,  $n = 10$ ). Dieser Wert wurde vom Maximalsignal der Kamera abgezogen. Somit ergab sich eine maximal zu messendes CL-Signalintensität von 64.157 a.u. Zur Ermittlung des LegioTyper-Panels wurden die CL-Signalintensitäten in einen normierten Wert umgerechnet, welcher den prozentualen Anteil der Signalintensität vom Maximalsignal darstellte. Die verwendete Formel ist nachfolgend angegeben.

$$\text{Norm. Signalwert (\%)} = \frac{\text{CL} - \text{Signalintensität (a.u.)}}{\text{Max. CL} - \text{Signalintensität (a.u.)}} \times 100$$

Zur Einordnung der späteren Messwerte wurde bei der Panel-Einstellung zuerst für alle Antikörperverdünnungen ein Leerwert gemessen. Hierfür wurde eine Messung mit Reinstwasser durchgeführt, um Interaktionen des Detektionsantikörpers mit dem Fängerantikörper ohne Zugabe eines Analyten zu erkennen. Mit Hilfe des Leerwertes und der Standardabweichung, berechnet aus den Spotvarianzen ( $n = 5$ ), wurde ein sogenannter Schwellwert berechnet. Dieser galt hier als Erfassungsgrenze, unterhalb

derer die CL-Signalintensität als „nicht-positiv“ gewertet wurde. Der Schwellwert berechnete sich aus dem Leerwert addiert mit zehnfacher Spotvarianz. Aus diesem Wert wurde ein normierter Signalwert berechnet. In Tabelle 14 sind die ermittelten Werte angegeben.

**Tabelle 14: Verwendete Verdünnungsstufen (c) für jeden Fängerantikörper, ermittelter Schwellwert (SW) als CL-Signalintensität und der jeweilige normierte Wert.**

| pAb                        |              |                   | mAb 81/2                   |              |                   | mAb 48/3                   |              |                   |
|----------------------------|--------------|-------------------|----------------------------|--------------|-------------------|----------------------------|--------------|-------------------|
| c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % | c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % | c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % |
| 0,07                       | 11.468       | 18                | 0,03                       | 1.257        | 2                 | 0,015                      | 868          | 1                 |
| 0,15                       | 3.701        | 6                 | 0,06                       | 580          | 1                 | 0,03                       | 896          | 1                 |
| 0,3                        | 3.951        | 6                 | 0,12                       | 978          | 2                 | 0,06                       | 1.426        | 2                 |
| 0,6                        | 5.117        | 8                 | 0,24                       | 746          | 1                 | 0,12                       | 2.215        | 4                 |
| 1,2                        | 5.692        | 9                 | 0,48                       | 1.437        | 2                 | 0,25                       | 2.242        | 4                 |
| 2,4                        | 4.597        | 7                 | 0,95                       | 2.127        | 3                 | 0,5                        | 1.606        | 3                 |
| mAb 10/7                   |              |                   | mAb 20/1                   |              |                   | mAb 3                      |              |                   |
| c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % | c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % | c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % |
| 0,003                      | 2.645        | 4                 | 0,02                       | 3.069        | 5                 | 0,018                      | 2.422        | 4                 |
| 0,006                      | 1.437        | 2                 | 0,07                       | 2.881        | 5                 | 0,035                      | 2.807        | 4                 |
| 0,011                      | 690          | 1                 | 0,13                       | 4.042        | 6                 | 0,07                       | 3.227        | 5                 |
| 0,024                      | 780          | 1                 | 0,27                       | 3.347        | 5                 | 0,14                       | 3.238        | 5                 |
| 0,05                       | 2.425        | 4                 | 0,54                       | 3.958        | 6                 | 0,28                       | 2.403        | 4                 |
| 0,1                        | 6.034        | 9                 | 1,07                       | 2.951        | 5                 | 0,56                       | 2.626        | 4                 |
| 0,2                        | 9.095        | 14                |                            |              |                   |                            |              |                   |
| mAb 10/6                   |              |                   | mAb 84/2                   |              |                   | mAb 30/1                   |              |                   |
| c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % | c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % | c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % |
| 0,03                       | 1.936        | 3                 | 0,03                       | 1.972        | 3                 | 0,015                      | 3.894        | 6                 |
| 0,06                       | 2.041        | 3                 | 0,28                       | 16.306       | 25                | 0,03                       | 3.374        | 5                 |
| 0,12                       | 2.109        | 3                 | 0,57                       | 13.286       | 21                | 0,06                       | 3.002        | 5                 |
| 0,25                       | 1.748        | 3                 | 1,14                       | 13.324       | 21                | 0,12                       | 6.099        | 10                |
| 0,5                        | 2.757        | 4                 | 2,3                        | 5.221        | 8                 | 0,24                       | 4.689        | 7                 |
| 1                          | 2.130        | 3                 |                            |              |                   |                            |              |                   |
| mAb 30/4                   |              |                   |                            |              |                   |                            |              |                   |
| c /<br>mg mL <sup>-1</sup> | SW /<br>a.u. | Norm.<br>Wert / % |                            |              |                   |                            |              |                   |
| 0,04                       | 8.299        | 13                |                            |              |                   |                            |              |                   |
| 0,09                       | 4.181        | 7                 |                            |              |                   |                            |              |                   |
| 0,17                       | 3.428        | 5                 |                            |              |                   |                            |              |                   |
| 0,35                       | 3.504        | 6                 |                            |              |                   |                            |              |                   |
| 0,7                        | 4.038        | 6                 |                            |              |                   |                            |              |                   |

Zur Einstellung des Panels wurden im weiteren Verlauf zunächst die Messungen der Konzentration  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> ausgewertet. Die weiteren Messwerte wurden an späterer Stelle der Auswertung betrachtet. Die Auswertung wird nachfolgend am

Beispiel von mAb 81/2 exemplarisch aufgeführt (siehe Tabelle 15). Die CL-Signalintensitäten wurden in die normierten Werte überführt und diese wiederum in einen quartären Code übersetzt, um die Intensitäten der Signale besser einordnen und im weiteren Verlauf besser vergleichen zu können. Die Codierung wurde in Abstimmung mit den Projektpartnern des LegioTyper-Projektes definiert, sie trennt die Werte überhalb des Schwellwertes in etwa drei gleich große Bereiche, angelehnt an die Einteilung zuvor im indirekten ELISA [116], und ist wie folgt aufgeteilt:

- I. 0: Kein Signal → Unterhalb des Schwellwertes.
- II. 1: Schwaches Signal → Zwischen Schwellwert und 30 % des Maximalsignales.
- III. 2: Mittelstarkes Signal → Zwischen 30 % und 65 % des Maximalsignales.
- IV. 3: Sehr starkes Signal → Zwischen 65 % und 100 % des Maximalsignales.

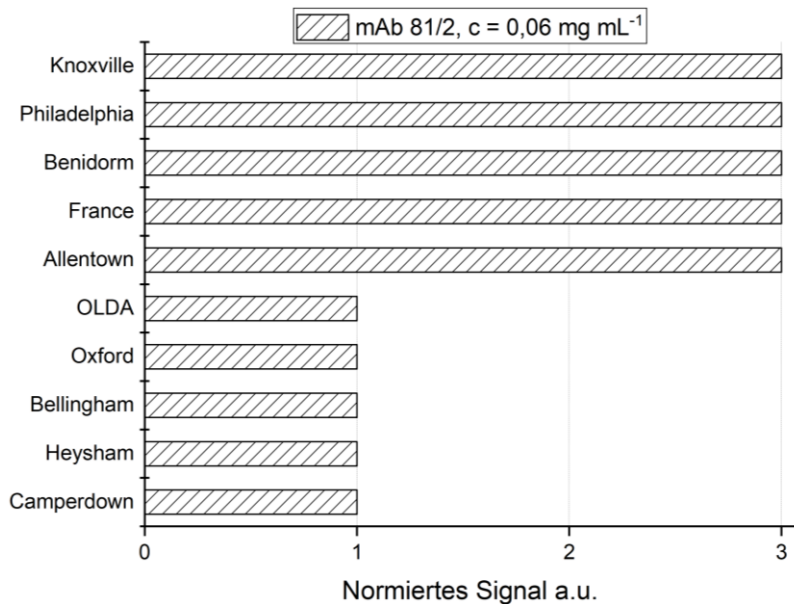
Alle Signale sind in Tabelle 15 angegeben. Die Bewertung der Signalintensitäten erfolgte für jeden Fängerantikörper individuell. Bei der Auswahl der geeigneten Verdünnung wurden jedoch die gewählten Werte aller Fängerantikörper auch im Zusammenspiel betrachtet, um eine Differenzierung von möglichst vielen Subgruppen zu erreichen, ähnlich dem Dresden-Panel. Es wurden dabei die sehr starken und mittelstarken Signale gegeneinander abgeglichen und für jede Verdünnung des Fängerantikörpers die Anwendbarkeit zur Differenzierung im späteren Panel betrachtet. Das auf diese Weise im weiteren Verlauf der Auswertung etablierte Panel stellt eine erste Empfehlung aufgrund der vorliegenden Messdaten dar. Im weiteren Verlauf der Doktorarbeit wurde dieses durch Messungen von Realproben und anderen Proben auf Anwendbarkeit getestet.

Bei **mAb 81/2** zeigten sich bei allen Verdünnungsstufen sehr starke Signale (3) über 75 % des Maximalsignales bei allen Vertretern der Pontiac-Gruppe. Einzig bei der niedrigsten Konzentration von  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  wurde bei Subgruppe France ein mittleres Signal gemessen. Bei den Vertretern der Non-Pontiac-Gruppe ergab sich bei fast allen Messungen kein (0) oder schwaches Signal (1). Lediglich Subgruppe Bellingham zeigte bei den Konzentrationen  $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,24 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $0,95 \text{ mg mL}^{-1}$  ein mittelstarkes Signal (2).

Tabelle 15: Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für mAb 81/2. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| mAb 81/2                            |        |        |        |        |        |        |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CL-Signalintensität / a.u.          |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                           | 58.742 | 59.126 | 58.832 | 58.996 | 59.153 | 59.210 |
| Philadelphia                        | 58.903 | 59.107 | 59.261 | 59.259 | 59.107 | 59.289 |
| Benidorm                            | 58.878 | 58.656 | 58.974 | 59.213 | 58.998 | 59.032 |
| France                              | 31.342 | 58.807 | 59.052 | 58.831 | 59.093 | 59.316 |
| Allentown                           | 58.011 | 58.734 | 59.048 | 58.881 | 59.026 | 59.150 |
| OLDA                                | 1.316  | 2.257  | 6.025  | 5.373  | 3.967  | 3.205  |
| Oxford                              | 1.070  | 1.939  | 6.413  | 12.472 | 11.245 | 1.945  |
| Bellingham                          | 6.191  | 18.671 | 35.325 | 35.495 | 32.928 | 28.470 |
| Heysham                             | 3.238  | 3.347  | 4.203  | 3.207  | 3.574  | 3.105  |
| Camperdown                          | 957    | 847    | 1.282  | 1.246  | 1.266  | 1.325  |
| Normiertes Signal / %               |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                           | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| Philadelphia                        | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| Benidorm                            | 92     | 91     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| France                              | 49     | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| Allentown                           | 90     | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| OLDA                                | 2      | 4      | 9      | 8      | 6      | 5      |
| Oxford                              | 2      | 3      | 10     | 19     | 18     | 3      |
| Bellingham                          | 10     | 29     | 55     | 55     | 51     | 44     |
| Heysham                             | 5      | 5      | 7      | 5      | 6      | 5      |
| Camperdown                          | 1      | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      |
| Intensität / a.u.                   |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                           | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Philadelphia                        | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Benidorm                            | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| France                              | 2      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Allentown                           | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| OLDA                                | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Oxford                              | 0      | 1      | 1      | 1      | 1      | 0      |
| Bellingham                          | 1      | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      |
| Heysham                             | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Camperdown                          | 0      | 1      | 1      | 1      | 0      | 0      |
| Konzentration / mg mL <sup>-1</sup> | 0,03   | 0,06   | 0,12   | 0,24   | 0,48   | 0,95   |

Bei Betrachtung der Codierung über alle gespotteten Konzentrationen (siehe Abbildung 36) fiel auf, dass mit der Konzentration **0,06 mg mL<sup>-1</sup>** der mAb 81/2 zur Detektion der Pontiac-Gruppe geeignet wäre. Diese hatte durchgehend Signale über 90 % der maximalen Signalintensität. Im Gegensatz zu höheren Konzentration wurde hier zudem bei allen Mitgliedern der Non-Pontiac-Gruppe nur schwaches normiertes Signal (1) gemessen, was eine eindeutige Zuordnung zur Pontiac-Gruppe zuließe. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen mit dem mittleren Signal bei Subgruppe Bellingham an dieser Stelle ausgeschlossen.

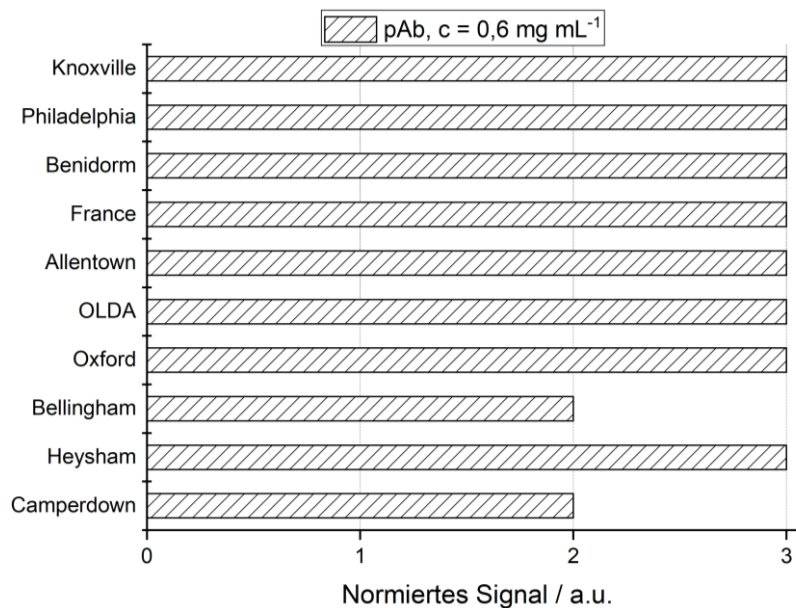


**Abbildung 36: Normierte Signale für den mAb 81/2 bei der Messung mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> bei der gewählten Konzentration  $c = 0,06$  mg mL<sup>-1</sup>.**

Die Tabellen zur Auswertung der geeigneten Fängerantikörperkonzentration bei den Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> sind im Anhang A 1 bis A 9 aufgeführt, werden jedoch einzeln diskutiert.

Bei den Messungen mit dem kommerziell erhältlichen **pAb** (A 1) zeigte die Pontiac-Gruppe bei den vier höchsten Konzentrationen sehr starkes Signal (3), wodurch diese Konzentrationen näher beleuchtet wurden. Bei der Non-Pontiac-Gruppe konnte bei diesen Konzentrationen sehr starkes Signal für Subgruppe OLDA, Oxford und zusätzlich entweder Heysham oder Camperdown und ansonsten mittelstarkes Signal gemessen werden. Bei den zwei niedrigsten Konzentrationen 0,15 mg mL<sup>-1</sup> und 0,07 mg mL<sup>-1</sup> waren die Intensitätsstufen weniger homogen verteilt. So konnte in der niedrigsten Konzentrationsstufe für Subgruppe Philadelphia nur Intensitätsstufe 1 gemessen werden, der Rest der Pontiac-Gruppe zeigte Werte der Intensitätsstufe 3.

Dies war auch bei der nächsthöheren Konzentrationsstufe gegeben, Subgruppe Philadelphia konnte hier die Intensitätsstufe 2 verzeichnen. In der Non-Pontiac-Gruppe konnte bei dieser Konzentrationsstufe ein sehr starkes Signal (3) für OLDA und mittelstarke Signale (2) bei allen anderen Vertretern dieser Gruppe gemessen werden. Die niedrigste Konzentrationsstufe lag bei allen Subgruppen eine Intensitätsstufe niedriger.

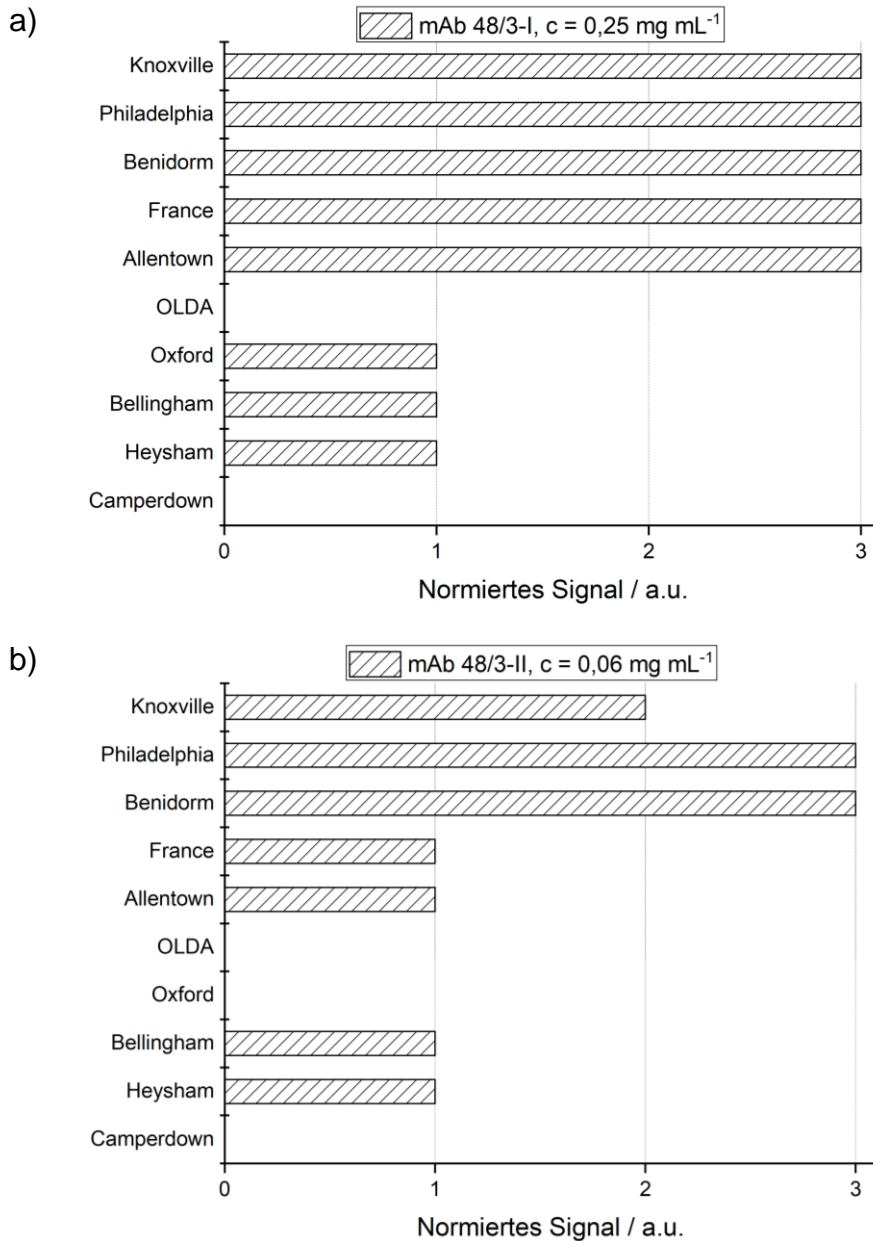


**Abbildung 37:** Normierte Signale für den pAb bei der Messung mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> bei der gewählten Konzentration  $c = 0,06$  mg mL<sup>-1</sup>.

Für den pAb wurde die Konzentration  $c = 0,6$  mg mL<sup>-1</sup> gewählt, welche sehr starkes Signal für die Pontiac-Gruppe, OLDA, Oxford und Heysham zeigte (Abbildung 37). Im Vergleich zu den anderen Konzentrationen konnte bei Intensitätsstufe 3 in der Non-Pontiac-Gruppe die höchsten normierten Werte verzeichnet werden. Die Subgruppen mit mittlerem Signal wurden vorerst nicht als spezifisches Signal geführt, im weiteren Verlauf der Messungen zur Anwendbarkeit wird in der Verwendung der Realproben jedoch weiter getestet, ob sich die Konzentration  $c = 0,6$  mg mL<sup>-1</sup> zur Detektion der gesamten Sg 1 eignet.

Der **mAb 48/3** (A 2) zeigte für die beiden niedrigsten Konzentrationen kein oder nur schwaches Signal, außer in einem Fall Intensitätsstufe 2 bei Benidorm ( $c = 0,03$  mg mL<sup>-1</sup>), jedoch mit Tendenz zur Intensitätsstufe 1 bei zusätzlicher Betrachtung der normierten Werte. Bei der Konzentration  $0,06$  mg mL<sup>-1</sup> stiegen die Intensitätsstufen in der Pontiacgruppe für Philadelphia und auch Benidorm auf Stufe 3, für Knoxville auf Stufe 2. Für die höheren Konzentrationsstufen wiesen alle Mitglieder

der Pontiac-Gruppe Signale der Stufe 2 oder 3 auf. In den zwei höchsten Konzentrationsstufen zeigten sich in der Pontiac-Gruppe ausschließlich Signale der Stufe 3. Betrachtet man diese gleich stark erscheinenden Konzentrationsstufen, so fällt auf, dass die Konzentration  $c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  jedoch höhere normierte Werte für die Pontiac-Gruppe zeigte.



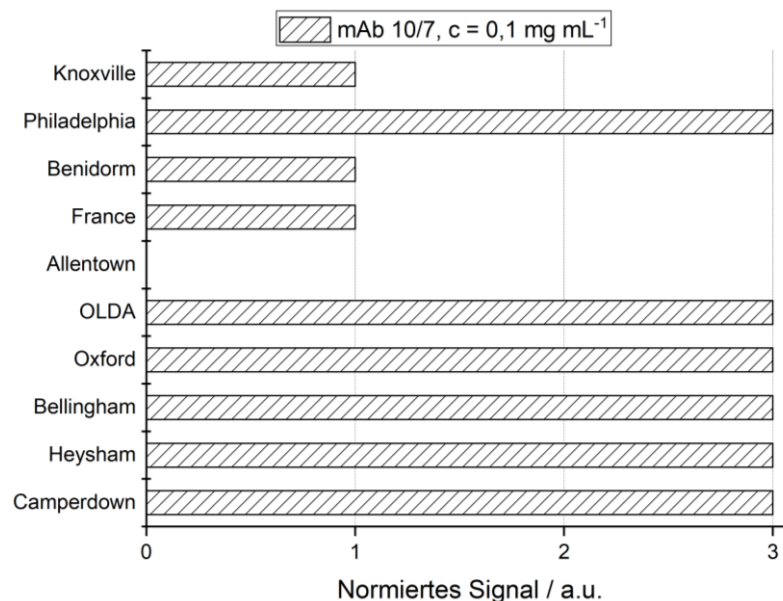
**Abbildung 38: Normierte Signale für den pAb bei der Messung mit  $c = 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$  bei der gewählten Konzentration für a)  $c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  (mAb 48/3-I) und b)  $c = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  (mAb 48/3-II).**

Als erste Konzentration wurde  $c = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt (s. Abbildung 38 b), da bei dieser sehr starkes Signal bei den Subgruppen Benidorm und Philadelphia, ansonsten jedoch nur niedriges oder kein Signal zu erkennen war, was eine selektive und



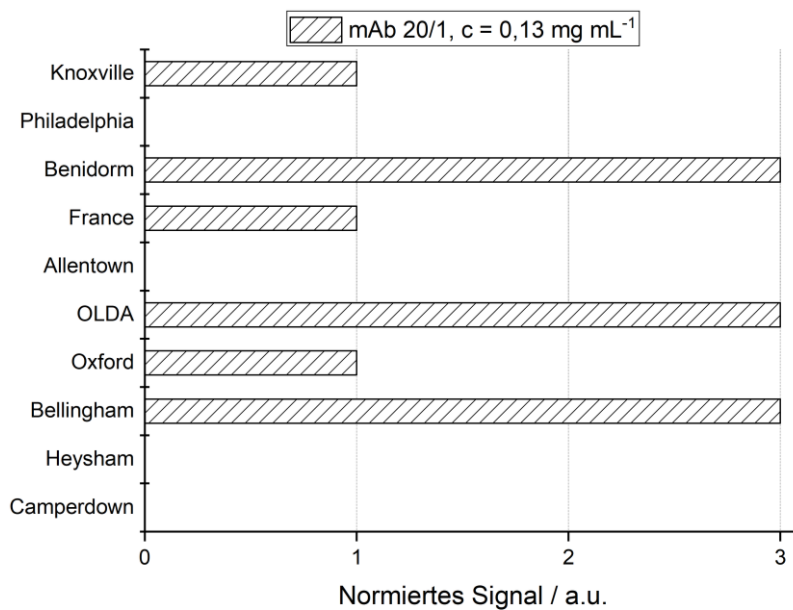
spezifische Detektion beider Subgruppen bedeutete. Das mittlere Signal bei Subgruppe Knoxville konnte zur zusätzlichen Separation dieser Subgruppe dienen. Als zweite Konzentration für den mAb 48/3 wurde  $c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt (siehe Abbildung 38 a), aufgrund der sehr starken Signale für die Pontiac-Gruppe und der höheren normierten Werte verglichen zur gleichwertigen Codierung der höheren Konzentration. Aufgrund der schwachen oder ausbleibenden Signale bei der Non-Pontiac-Gruppe ist diese Konzentration zur Separation der Pontiac-Gruppe geeignet.

Beim **mAb 10/7** (A 3) wurde in den Messungen bei den vier niedrigsten Konzentrationen kein oder nur schwaches (1), maximal mittelstarkes Signal (2, bei OLDA und Bellingham) bei allen Subgruppen gemessen. Die Konzentrationen  $c = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  wiesen durchgehend sehr starkes Signal der Intensitätsstufe 3 bei der Non-Pontiac-Gruppe und kein bis schwaches Signal bei fast der gesamten Pontiac-Gruppe auf. Beide zeigten jedoch bei Subgruppe Philadelphia Intensitätsstufe 2 ( $c = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) oder 3. Auch bei  $c = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  konnte bei der Non-Pontiac-Gruppe Intensitätsstufe 3 verzeichnet werden, diese Konzentrationsstufe zeigte jedoch auch mittelstarkes bis starkes Signal bei den Subgruppen Philadelphia (3), Benidorm und France (beide 2). Für den weiteren Verlauf wurde die Konzentration  $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt, um in Zusammenspiel mit den anderen Fängerantikörpern nicht nur die Non-Pontiac-Gruppe, sondern auch Subgruppe Philadelphia zu detektieren (s. Abbildung 39).



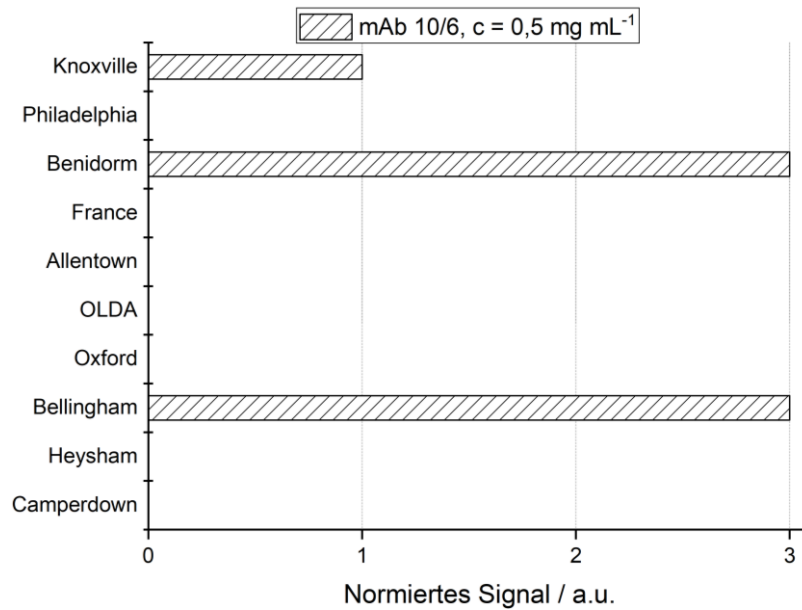
**Abbildung 39:** Normierte Signale für den mAb 10/7 bei der Messung mit  $c = 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$  bei der gewählten Konzentration  $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Bei **mAb 20/1** (A 4) konnte für die zwei niedrigsten Konzentrationen in den meisten Subgruppen kein oder nur schwaches Signal der Intensitätsstufe 0 oder 1 gemessen werden. Subgruppe Bellingham zeigte mittelstarkes oder sehr starkes Signal mit steigender Konzentration des Fängerantikörpers und auch bei Subgruppe Benidorm stieg das Signal bei der höheren Konzentration auf Intensitätsstufe 2. Die Konzentrationen  $c = 0,13 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $c = 0,27 \text{ mg mL}^{-1}$  wiesen Signal der Intensitätsstufe 3 für die Subgruppen Benidorm, OLDA und Bellingham, bei allen weiteren Subgruppen Intensitätsstufe 0 oder 1 auf. Auch die Konzentrationsstufen  $c = 0,54 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $c = 1,07 \text{ mg mL}^{-1}$  zeigten diese Verteilung, jedoch wurde bei OLDA in beiden Fällen nur Intensitätsstufe 2 gemessen. Bei den gleichen Konzentrationen  $c = 0,13 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $c = 0,27 \text{ mg mL}^{-1}$  wurde zur Detektion von Subgruppe Benidorm, OLDA und Bellingham  $c = 0,13 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt, da die Intensitätsstufe 0 hier im Vergleich häufiger auftrat (s. Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Normierte Signale für den mAb 20/1 bei der Messung mit  $c = 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$  bei der gewählten Konzentration  $c = 0,13 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Bei **mAb 10/6** (A 5) zeigte sich bei allen Konzentrationen Signal der Intensitätsstufe 3 bei Subgruppe Bellingham (Ausnahme niedrigste Konzentration: Intensitätsstufe 2). Bei Subgruppe Benidorm der Pontiac-Gruppe konnte Intensitätsstufe 3 gemessen werden (Ausnahme  $c = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ : Intensitätsstufe 2), außer bei der kleinsten Konzentrationsstufe. Die restlichen Subgruppen verzeichneten Intensitätsstufe 0 oder 1 über alle Konzentrationsstufen der Fängerantikörper.



**Abbildung 41:** Normierte Signale für den mAb 10/6 bei der Messung mit  $c = 10^7$  KBE  $\text{mL}^{-1}$  bei der gewählten Konzentration  $c = 0,5$   $\text{mg mL}^{-1}$ .

Von diesen Konzentrationen wurde  $c = 0,5$   $\text{mg mL}^{-1}$  (s. Abbildung 41) zur Detektion von Subgruppe Benidorm in der Pontiac-Gruppe und Bellingham in der Non-Pontiac-Gruppe ausgewählt. Im Vergleich zu den anderen Konzentrationen wurden hier die höchsten normierten Werte in der Intensitätsstufe 3 und bei den anderen Subgruppen Intensitätsstufe 0 (Ausnahme Knoxville: Intensitätsstufe 1) gemessen.

Bei **mAb 84/2** (A 6) wurde in der niedrigsten Konzentration  $c = 0,03$   $\text{mg mL}^{-1}$  bei den Subgruppen OLDA und Oxford Intensitätsstufe 3 und bei Subgruppe Philadelphia 2, bei den weiteren Subgruppen Stufe 0 oder 1 gemessen. Auch bei höheren Konzentrationen zeigten Subgruppe Philadelphia, OLDA und Oxford durchgängig Intensitätsstufe 3. Zudem verzeichnete Subgruppe France Intensitätsstufe 3 und 2 bei  $c = 0,28$   $\text{mg mL}^{-1}$  und  $c = 0,57$   $\text{mg mL}^{-1}$ . Auch beim Rest der Non-Pontiac-Gruppe konnte bei höheren Konzentrationen Intensitätsstufe 2 und 3 gemessen werden, einzige Ausnahme war Heysham bei  $c = 2,3$   $\text{mg mL}^{-1}$  (Intensitätsstufe 1).

Die Konzentration  $c = 0,03$   $\text{mg mL}^{-1}$  wurde zur Separation von OLDA und Oxford aus Sg 1 ausgewählt (s. Abbildung 42 b). Zusätzlich wurde  $c = 0,57$   $\text{mg mL}^{-1}$  gewählt (s. Abbildung 42 a), da Intensitätsstufe 3 für die gesamte Non-Pontiac-Gruppe und Subgruppe Philadelphia gemessen wurde. Zudem zeigte sie Stufe 2 bei France, was aufgrund des hohen normierten Wertes bei der späteren Anwendung zur Separation von dieser Subgruppe genutzt werden kann.

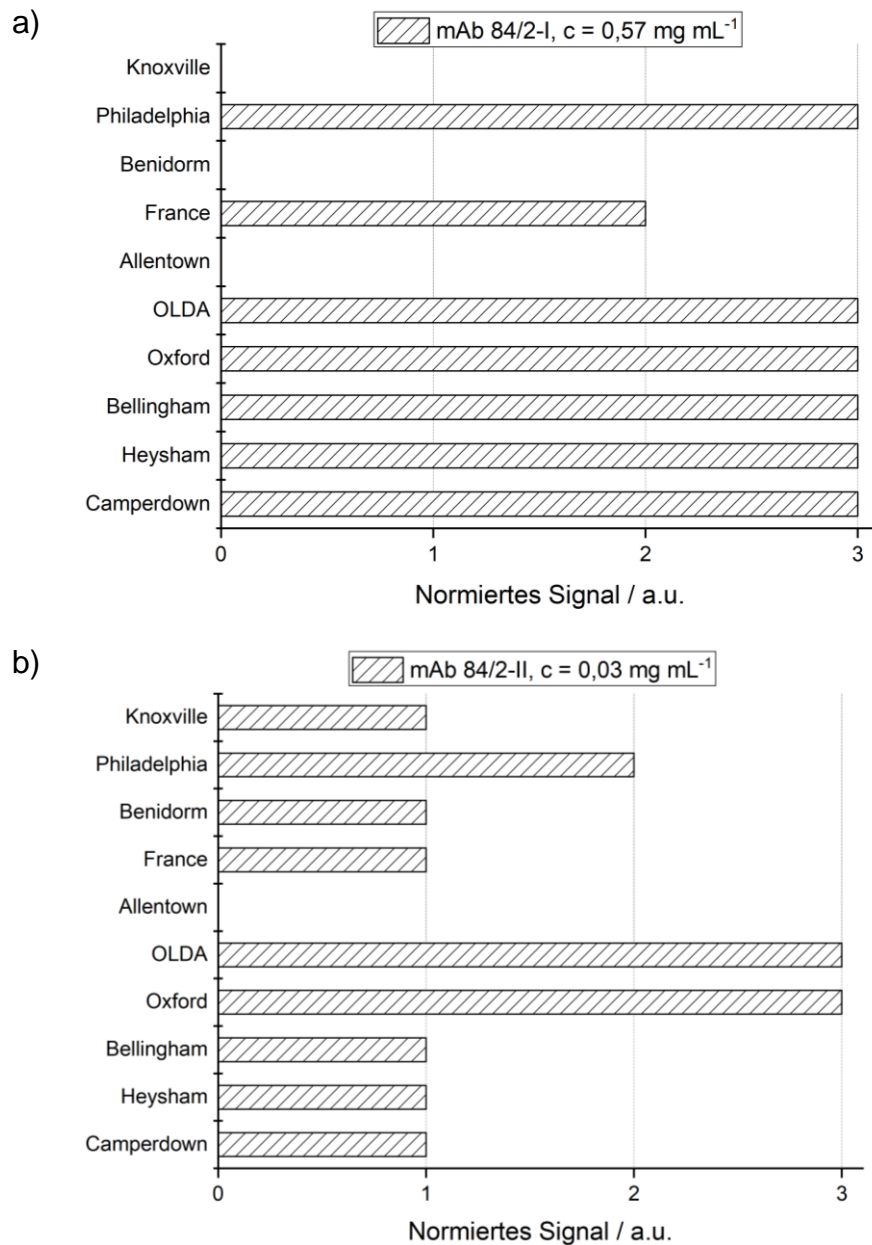
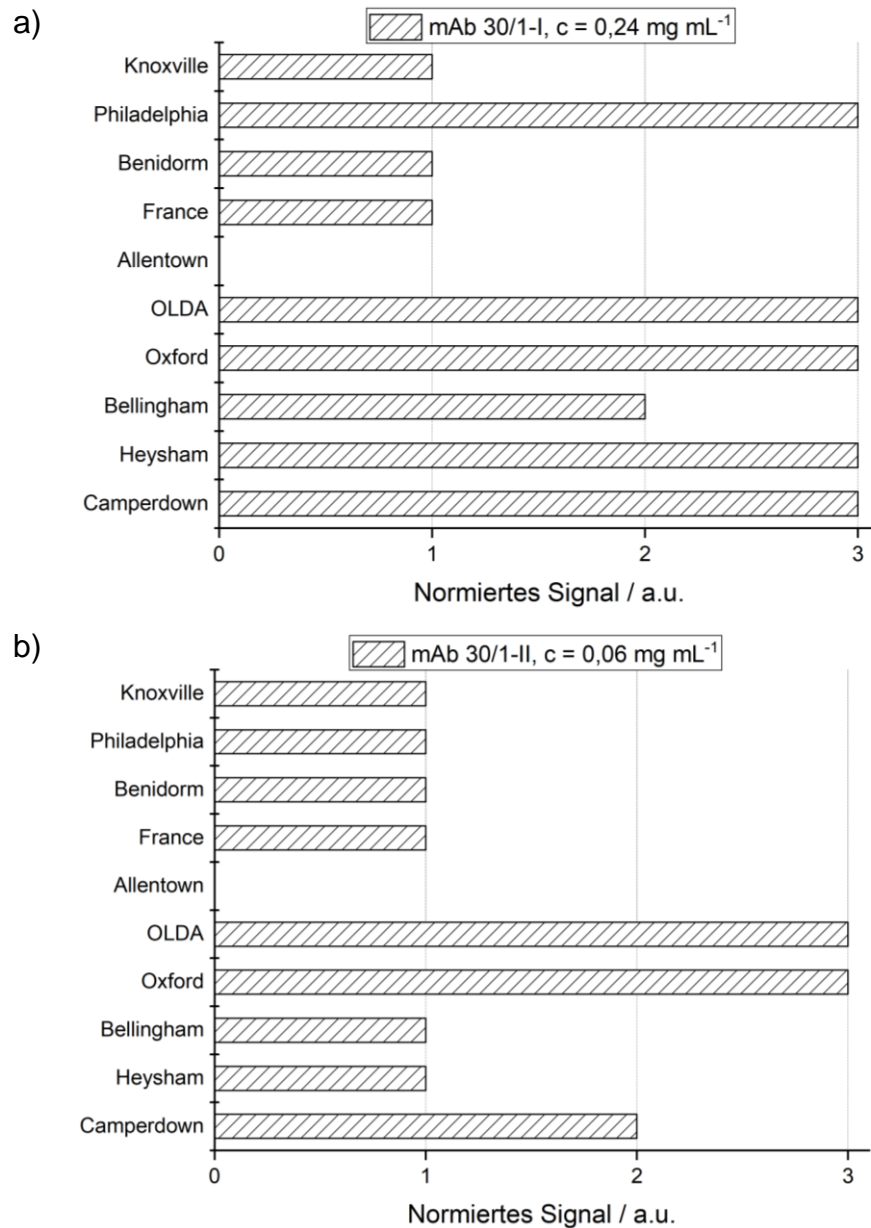


Abbildung 42: Normierte Signale für den mAb 84/2 bei der Messung mit  $c = 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$  bei der gewählten Konzentration für a)  $c = 0,57 \text{ mg mL}^{-1}$  (mAb 84/2-I) und b)  $c = 0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  (mAb 84/2-II).

Bei **mAb 30/1** (A 7) zeigte sich eine sehr unterschiedliche Verteilung der Intensitätsstufen über die Fängerantikörperkonzentrationen. Bei der niedrigsten Konzentration wurde ausschließlich Intensitätsstufe 0 oder 1 gemessen. Subgruppe OLDA und Oxford verzeichneten bei allen weiteren Konzentrationsstufen Intensitätsstufe 3 (Ausnahme  $c = 0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ : Intensitätsstufe 2 bei Oxford). Mit steigender Fängerantikörperkonzentration stieg zudem die Anzahl der Subgruppen mit erhöhter Intensitätsstufe. Bei  $c = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  konnte zusätzlich bei Camperdown Intensitätsstufe 2, bei  $c = 0,12 \text{ mg mL}^{-1}$  Intensitätsstufe 3 bei Camperdown, Heysham

und auch Philadelphia gemessen werden. Die höchste Konzentrationsstufe verzeichnete bei allen Vertretern der Non-Pontiac-Gruppe und auch Subgruppe Philadelphia Intensitätsstufe 3 (Ausnahme Bellingham: Intensitätsstufe 2).

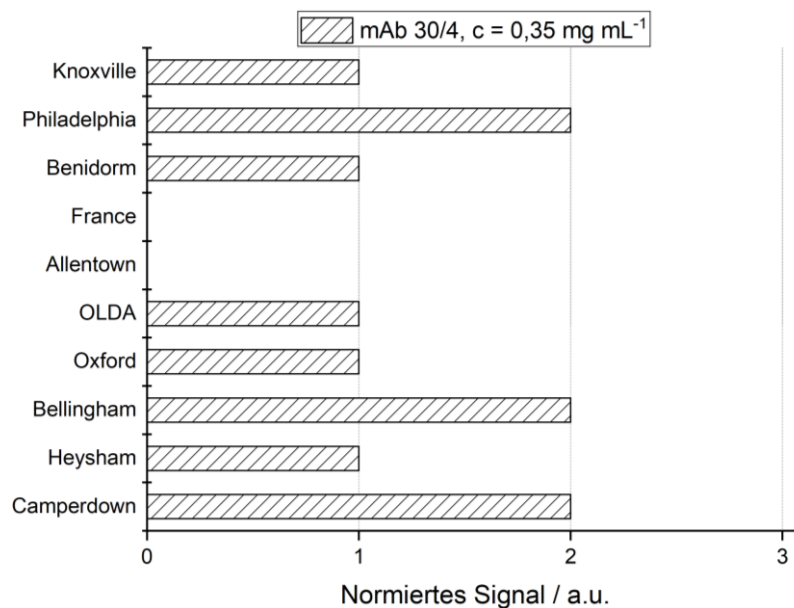


**Abbildung 43:** Normierte Signale für den mAb 30/1 bei der Messung mit  $c = 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$  bei der gewählten Konzentration für a)  $c = 0,24 \text{ mg mL}^{-1}$  (mAb 30/1-I) und b)  $c = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  (mAb 30/1-II).

Es wurde die Konzentration  $c = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt (s. Abbildung 43 b), welche Subgruppe OLDA und Oxford detektierte und zusätzlich Intensitätsstufe 2 bei Subgruppe Camperdown aufwies. Bei den beiden hohen Konzentrationen wurden dieselben Intensitätsstufen bei Subgruppe Philadelphia, OLDA, Oxford, Heysham und Camperdown gemessen, jedoch zeigte Bellingham bei der höchsten Konzentration

Intensitätsstufe 2. Aus diesem Grund wurde  $c = 0,24 \text{ mg mL}^{-1}$  als zusätzliche Fängerantikörperkonzentration gewählt (s. Abbildung 43 a).

**MAb 30/4** (A 8) wies bei keiner Subgruppe Intensitätsstufe 3 auf. Lediglich bei den beiden höchsten Konzentrationen konnte Intensitätsstufe 2 bei Verwendung der Subgruppen Philadelphia, Bellingham und Camperdown gemessen werden. Es wurde der Fängerantikörper mit der Konzentration  $c = 0,35 \text{ mg mL}^{-1}$  auf das Panel gespottet (s. Abbildung 44), um zu testen, ob mit realen Proben wie Urin CL-Signal für diese Subgruppen am Fängerantikörper erscheinen würde.



**Abbildung 44: Normierte Signale für den mAb 30/4 bei der Messung mit  $c = 10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$  bei der gewählten Konzentration  $c = 0,35 \text{ mg mL}^{-1}$ .**

**MAb 3** (A 9) zeigte für die beiden niedrigen Konzentrationen Signale der Intensitätsstufe 0 oder 1, diese stiegen bei Konzentration  $c = 0,07 \text{ mg mL}^{-1}$  auf Intensitätsstufe 2 für Subgruppe Heysham und France und Intensitätsstufe 3 bei den drei höchsten Konzentrationen. Die drei höchsten Konzentrationen hatten fast identische normierte Werte,  $c = 0,14 \text{ mg mL}^{-1}$  wurde ausgewählt aufgrund des höheren Anteils an Intensitätsstufe 0 bei den weiteren Subgruppen.

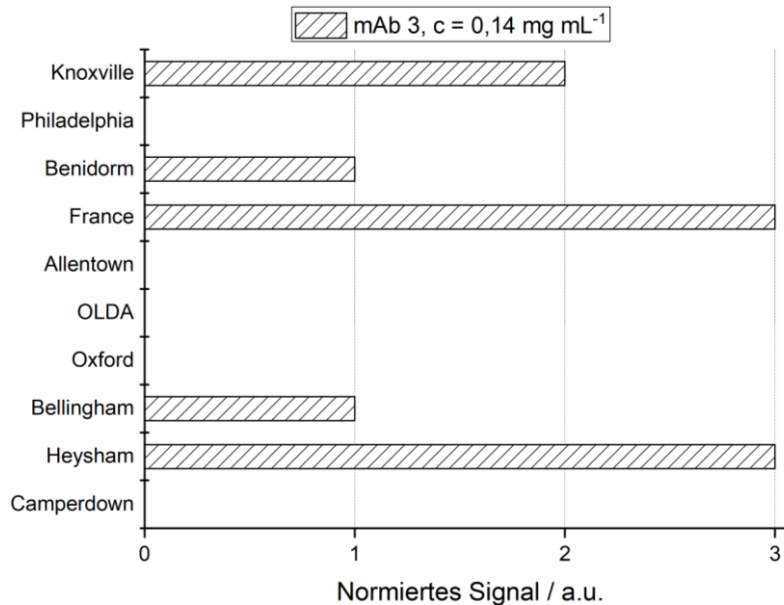
Im Verlaufe des LegioTyper-Projektes wurde der mAb 3 speziell für die Detektion von Subgruppe Knoxville hergestellt, da diese zu den Hauptauslösern von Legionellosen zählt. In den bisherigen Messungen konnten jedoch mit dem verwendeten Stamm keine Signalintensitäten gemessen werden. Aus diesem Grund wurden Messungen mit vier weiteren Knoxville-Stämmen durchgeführt. Verwendet wurden zusätzlich die gut charakterisierten Stämme EUL 22 und EUL 23, zusätzlich L13-435 und L13-438,

um eine Mutation des verwendeten Knoxville 1 auszuschließen. Die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup> und  $c = 10^3$  KBE mL<sup>-1</sup> resultierten in keinem oder niedrigem Signal für alle Konzentrationen des mAb 3. Die Ergebnisse der Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> sind in nachfolgender Tabelle 16 aufgeführt, welche wie Tabelle 15 aufgebaut ist.

**Tabelle 16: Auswertetabelle für die Vergleichsmessungen für mAb 3 mit verschiedenen Knoxville-Stämme im Rahmen der Panel-Einstellungen für Sg 1. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.**

| <b>mAb 3</b>                                  |              |              |             |             |             |             |
|-----------------------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville 1                                   | 4.532        | 4.351        | 4.473       | 4.744       | 4.425       | 4.196       |
| EUL 22                                        | 2.403        | 2.392        | 7.866       | 16.731      | 15.401      | 12.645      |
| EUL 23                                        | 797          | 915          | 941         | 1.115       | 1.241       | 1.530       |
| L13-435                                       | 1.127        | 1.143        | 2.677       | 6.637       | 9.145       | 11.219      |
| L13-438                                       | 855          | 2.185        | 12.419      | 27.202      | 33.362      | 34.695      |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville 1                                   | 7            | 7            | 7           | 7           | 7           | 7           |
| EUL 22                                        | 4            | 4            | 12          | 26          | 24          | 20          |
| EUL 23                                        | 1            | 1            | 2           | 2           | 2           | 2           |
| L13-435                                       | 2            | 2            | 4           | 10          | 14          | 18          |
| L13-438                                       | 1            | 3            | 19          | 42          | 52          | 54          |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville 1                                   | 1            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| EUL 22                                        | 1            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| EUL 23                                        | 0            | 0            | 0           | 1           | 1           | 1           |
| L13-435                                       | 0            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| L13-438                                       | 0            | 1            | 1           | 2           | 2           | 2           |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,018</b> | <b>0,035</b> | <b>0,07</b> | <b>0,14</b> | <b>0,28</b> | <b>0,56</b> |

In Tabelle 16 kann man erkennen, dass auch die Stämme EUL 22, EUL 23 und L13-438 Intensitätsstufe 0 oder 1 bei allen verwendeten Konzentrationen aufwiesen. Lediglich bei L13-438 konnte mit den drei höchsten Konzentrationen Intensitätsstufe 2 gemessen werden. Da die zuvor gewählte Konzentration von  $c = 0,14$  mg mL<sup>-1</sup> hier Stufe 2 zeigte, wurde diese Wahl bestätigt und der mAb 3 unter Vorbehalt für Subgruppe Knoxville mit ins vorläufige Panel eingebaut (s. Abbildung 45).



**Abbildung 45: Normierte Signale für den mAb 3 bei der Messung mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> bei der gewählten Konzentration  $c = 0,14$  mg mL<sup>-1</sup>.**

Gerade in diesen Messungen wurde die Schwierigkeit in der Panel-Einstellung deutlich. Verschiedene Stämme weisen immer wieder leichte Unterschiede in der Struktur des LPS-Antigens an ihrer Oberfläche auf, wodurch sie hin und wieder positiv reagierten und CL-Signal an mAbs erzeugten, an denen sie nicht binden sollten bzw. kein Signal an Antikörpern erzeugten, wo es erwartet wurde. Daher war auch der nachfolgende Test des LegioTyper-Panels mit Realproben essentiell, um solche Unregelmäßigkeiten aufzuzeigen, da freies LPS-Antigen, welches aus Patientenproben isoliert wurde oder auch reale Prozesswasserproben eventuell andere LPS-Strukturen und somit eine andere Signalverteilung zeigten.

Mit den zuvor ausgewählten Fängerantikörperkonzentrationen bei  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, welche in Tabelle 17 zusammenfassend aufgeführt sind, wurde ein LegioTyper-Panel nach dem Vorbild des Dresden-Panels [114, 326] erstellt. Dieses ist in Abbildung 46 dargestellt. Die Bezeichnungen -I und -II, wie beispielsweise beim mAb 48/3, sind hier bei einigen Fängerantikörpern zugefügt, da derselbe AK im Rahmen des Panels in zwei Konzentrationen auf dem Chip immobilisiert wurde. Der Zusatz -I definiert die höher gewählte Konzentration des Fängerantikörpers, -II dementsprechend die niedrigere. Wie auch das Dresden-Panel (s. Kapitel 2.2.2, Abbildung 8) ist dieses Panel von oben nach unten lesbar. Da alle Fängerantikörper auf dem Mikroarray zu einer Multiplex-Messung immobilisiert sind, lässt sich durch das Panel ein Muster definieren. Je nach positivem Signal an bestimmten Fängerantikörpern ergibt sich so



ein anderes, für jede Subgruppe spezifisches Muster. In Abbildung 46 sind die mAbs mit Intensitätsstufe 3 mit schwarzer Umrandung, Intensitätsstufe 2 gestrichelt umrandet dargestellt. Das erstellte Panel war an dieser Stelle eine erste Empfehlung aufgrund der Datenlage und wurde im weiteren Verlauf der Doktorarbeit mit freien Antigenen, Kultur- und Wasserproben und auch Urinen auf Anwendbarkeit getestet.

**Tabelle 17: Gewählte Fängerantikörperkonzentrationen und entsprechende Intensitätsstufen für alle Subgruppen für das LegioTyper-Panel. Die Bezeichnungen -I und -II, angehängt an manche Fängerantikörper, bezeichnen denselben AK, jedoch in verschiedenen Konzentrationen (V: Variierende Signalintensitäten für unterschiedliche Stämme).**

| Fänger-antikörper                   | 84/2-II | 84/2-I | 30/1-II | 30/1-I | 30/4 | 10/6 | 3    |
|-------------------------------------|---------|--------|---------|--------|------|------|------|
| Konzentration / mg mL <sup>-1</sup> | 0,03    | 0,57   | 0,06    | 0,24   | 0,35 | 0,5  | 0,14 |
| Philadelphia                        | 2       | 3      | 1       | 3      | 2    | 1    | 0    |
| Benidorm                            | 1       | 0      | 1       | 1      | 1    | 3    | 1    |
| Knoxville                           | 1       | 0      | 1       | 1      | 1    | 0    | V    |
| France                              | 1       | 2      | 1       | 1      | 0    | 0    | 3    |
| Allentown                           | 0       | 0      | 0       | 0      | 0    | 0    | 0    |
| Oxford                              | 3       | 3      | 0       | 3      | 1    | 0    | 0    |
| OLDA                                | 3       | 3      | 3       | 3      | 1    | 0    | 0    |
| Heysham                             | 1       | 3      | 1       | 3      | 1    | 0    | 3    |
| Camperdown                          | 1       | 3      | 2       | 3      | 2    | 0    | 0    |
| Bellingham                          | 1       | 3      | 2       | 2      | 2    | 3    | 1    |

| Fänger-antikörper                   | 20/1 | 10/7 | 48/3-II | 48/3-I | 81/2 | pAb |
|-------------------------------------|------|------|---------|--------|------|-----|
| Konzentration / mg mL <sup>-1</sup> | 0,13 | 0,1  | 0,06    | 0,25   | 0,06 | 0,6 |
| Philadelphia                        | 0    | 3    | 3       | 3      | 3    | 3   |
| Benidorm                            | 3    | 1    | 3       | 3      | 3    | 3   |
| Knoxville                           | 1    | 1    | 2       | 3      | 3    | 3   |
| France                              | 1    | 1    | 1       | 3      | 3    | 3   |
| Allentown                           | 0    | 0    | 1       | 3      | 3    | 3   |
| Oxford                              | 1    | 3    | 0       | 1      | 1    | 3   |
| OLDA                                | 3    | 3    | 0       | 0      | 1    | 3   |
| Heysham                             | 0    | 3    | 1       | 1      | 1    | 3   |
| Camperdown                          | 0    | 3    | 0       | 0      | 1    | 2   |
| Bellingham                          | 3    | 3    | 1       | 1      | 1    | 2   |

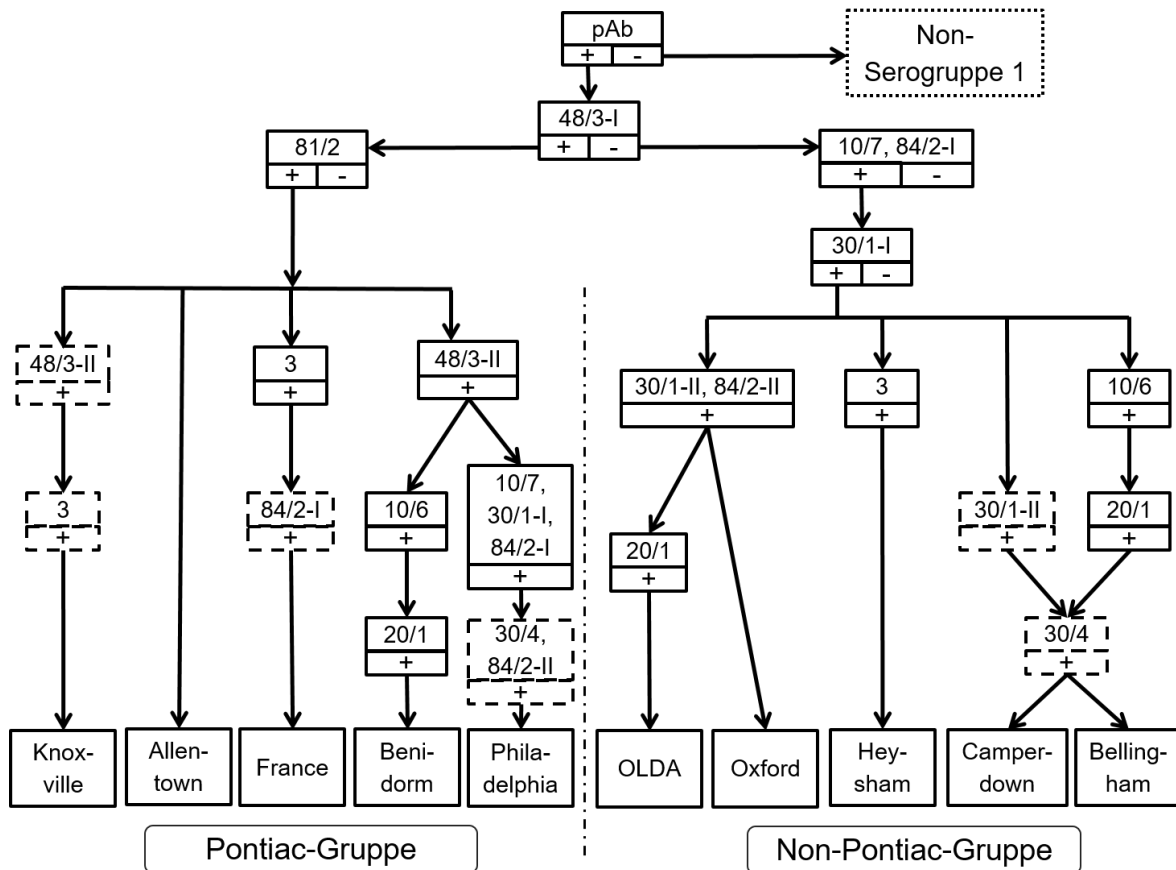


Abbildung 46: Neu entwickeltes LegioTyper-Panel für die Subtypisierung von *L. pneumophila* Sg 1. Die gezeigten, schwarz umrandeten mAbs wurden in der vorhergehenden Messreihe als hohes Signal angezeigt, die gestrichelten als mittleres Signal. Zusätzlich wurden Pontiac- und Non-Pontiac-Gruppe optisch voneinander getrennt.

Betrachtet man die Daten der Messungen mit  $c = 10^5$  KBE  $\text{mL}^{-1}$ , so fällt auf, dass die CL-Signalintensitäten um ein Vielfaches im Bereich von  $c = 10^7$  KBE  $\text{mL}^{-1}$  bis  $c = 10^5$  KBE  $\text{mL}^{-1}$  abfielen. Die Daten werden im Folgenden kurz diskutiert, die zugehörigen Tabellen finden sich im Anhang A 10 bis A 19. An diesen Tabellen sieht man die große Schwierigkeit der Panel-Entwicklung auf dem MCR-R. Die Bindungen der Legionellen an die Fängerantikörper sind stark konzentrationsabhängig. Reale Proben im Ausbruchsgeschehen oder bei Routine-Probenahmen weisen schwankende Konzentrationen auf.

Die Signale am **pAb** zeigten bei  $c = 10^5$  KBE  $\text{mL}^{-1}$  für fast alle Subgruppen Signalintensität 0 oder 1 und sogar für alle Subgruppen bei der niedrigsten Konzentrationsstufe. Die weiteren Konzentrationen wiesen für Subgruppe Benidorm Intensitätsstufe 2 auf. Am **mAb 81/2** konnte für alle Verdünnungsstufen Intensitätsstufe 3 mit Benidorm gemessen werden, jedoch mit allen Mitgliedern der

Non-Pontiac-Gruppe Intensitätsstufe 1 oder 0. Bei  $c = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  konnte Intensitätsstufe 2 für Philadelphia nachgewiesen werden. Die steigenden Konzentrationen zeigten außerdem auch Signale der Intensitätsstufe 2 oder 3 für Knoxville und Allentown. Die Messungen mit **mAb 48/3** ergaben für alle Fängerantikörperkonzentrationen Signale der Intensitätsstufe 0 oder 1. Lediglich bei den drei höchsten Konzentrationen konnten Signale der Stufe 2 oder 3 vermessen werden. **MAb 10/7** wies anstelle der gesamten Non-Pontiac-Gruppe in allen Konzentrationsstufen Signale der Intensitätsstufen 0 oder 1 auf. Auch an **mAb 10/6**, **mAb 30/4** und **mAb 30/1** war dies der Fall. An **mAb 20/1** konnte dies ebenfalls festgestellt werden. Lediglich Subgruppe Benidorm zeigte durchgängig Signale der Intensitätsstufe 3 (Ausnahme niedrigste Konzentration: Intensitätsstufe 1). Mit **mAb 3** konnte für Subgruppe Heysham an den drei höchsten Konzentrationen mittelstarkes oder sehr starkes Signal ermittelt werden. Der **mAb 84/2** zeigte durchgängig Intensitätsstufe 0 oder 1, einzig Subgruppe Philadelphia und OLDA konnten hier Intensitätsstufe 2 verzeichnen (Ausnahme niedrigste Konzentration: 2).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei niedriger eingesetzten Probenkonzentrationen nicht mehr dieselben Spezifitäten wie im entwickelten LegioTyper-Panel auftraten. Zudem wären Kreuzreaktivitäten auch bei sehr hohen Probenkonzentrationen möglich. Das LegioTyper-Panel ist für Konzentrationen um etwa  $10^7 \text{ KBE mL}^{-1}$  optimal geeignet und wurde auch einzig mit den Messdaten dieser Konzentration erstellt. In Konsequenz kann somit die Aussage getroffen werden, dass die Serotypisierung nach Kultur möglich ist. Um deren Gültigkeit und Anwendbarkeit zu zeigen, muss diese mit realen Proben getestet werden. Zudem muss die Anwendbarkeit des Panels für Proben ohne vorherige Kultivierung, wie beispielsweise Urinproben, getestet werden.

### 3.3.10 Anwendungsmessungen mit dem LegioTyper-Panel

Im Folgenden wurde die Anwendbarkeit des neu entwickelten LegioTyper-Panels getestet. Hierfür wurden Kulturproben, freies LPS-Antigen, *pneumphila*- und *non-pneumphila*-Proben, aufgestockte Prozesswasserproben, Patientenerine und aufgestockte Urine, sowie reale Prozesswasserproben vermessen und mit Hilfe des etablierten Panels typisiert. Anders als bei der Panel-Etablierung wurde für die Auswertung der hier gemessenen Proben lediglich ein Schwellwert definiert, der die CL-Signalintensität einer Probe als positiv oder negativ bewertet. Die Einstufung wurde

hier gewählt, da in einer kommerziellen und großflächigeren Anwendung dieses LegioTyper-Panels die Etablierung eines Schwellwertes künftig notwendig ist. Für diese Anwendungstestreihe wurde der Pauschalwert von 10 % des Maximalsignales angenommen, um diesen noch nicht real gemessenen Wert zu simulieren. Zukünftig bedeutet dieser Schwellwert, dass eine Vielzahl „negativer“, und somit „nicht-legionellenhaltiger“ Proben vermessen wurde. Aus diesen Leerwerten wird für jeden Probentyp (z.B. Urin oder Prozesswasser) ein zugehöriger Schwellwert ermittelt, ähnlich dem Schwellwert der Panel-Einstellung, ab welchem CL-Signalintensitäten als „positiv“ und „legionellenhaltig“ bewertet werden. Diese Messreihen konnten im Rahmen des Projektes und der Doktorarbeit bisher nicht durchgeführt werden, da die Etablierung des Panels dieser vorangeht.

Wichtig war bei Messungen mit dem LegioTyper-Panel nicht nur, dass die Fängerantikörper auf legionellenhaltige Proben wie erwartet ansprachen, sondern dass nicht-legionellenhaltige Proben kein falsch-positives Signal erzeugten. Hierfür wurden zwei Reinstwasser- und eine aufkonzentrierte Leitungswasserprobe vermessen. Zudem wurde eine negative Urinprobe analysiert, um die Matrix der Patientenproben zu imitieren. Es konnte gezeigt werden, dass kein Fängerantikörper ein unerwünschtes falsch-positives Signal erzeugte.

Aufgrund eines Softwarefehlers des MCR-Rs, der in dieser Messreihe auftrat, konnten manche Messungen und Messbilder nicht in gewohnter Weise ausgewertet werden. Sie mussten auf optischer Basis ausgewertet werden und die Signalintensitäten ohne Zuhilfenahme der CL-Signalintensitäten kategorisiert werden, da die Daten nicht ausgelesen werden konnten. Der Fehler des Gerätes konnte am Ende der Doktorarbeit seitens GWK behoben werden. Die Messungen konnten jedoch teilweise aufgrund des Endes der LegioTyper-Projektlaufzeit bzw. der Einzigartigkeit der Proben (bspw. bei Patientenuринаn) nicht wiederholt werden. Die Chipbilder wurden für die Kategorisierung mit herkömmlichen Chipbildern verglichen. Proben, welche auf diese Weise ausgewertet wurden, sind in den nachfolgenden Kapiteln entsprechend gekennzeichnet. Zudem wurden Proben betrachtet, welche mit dem vollständigen LegioTyper-Panel im Konsiliarlabor Legionellen an der TUD von Projektpartnern vermessen wurden. Auch diese Messungen sind als solche gekennzeichnet.

Da die realen Proben unterschiedliche Probenmatrices aufwiesen, wurden sie getrennt voneinander betrachtet. Zunächst wurde die Anwendbarkeit des postulierten

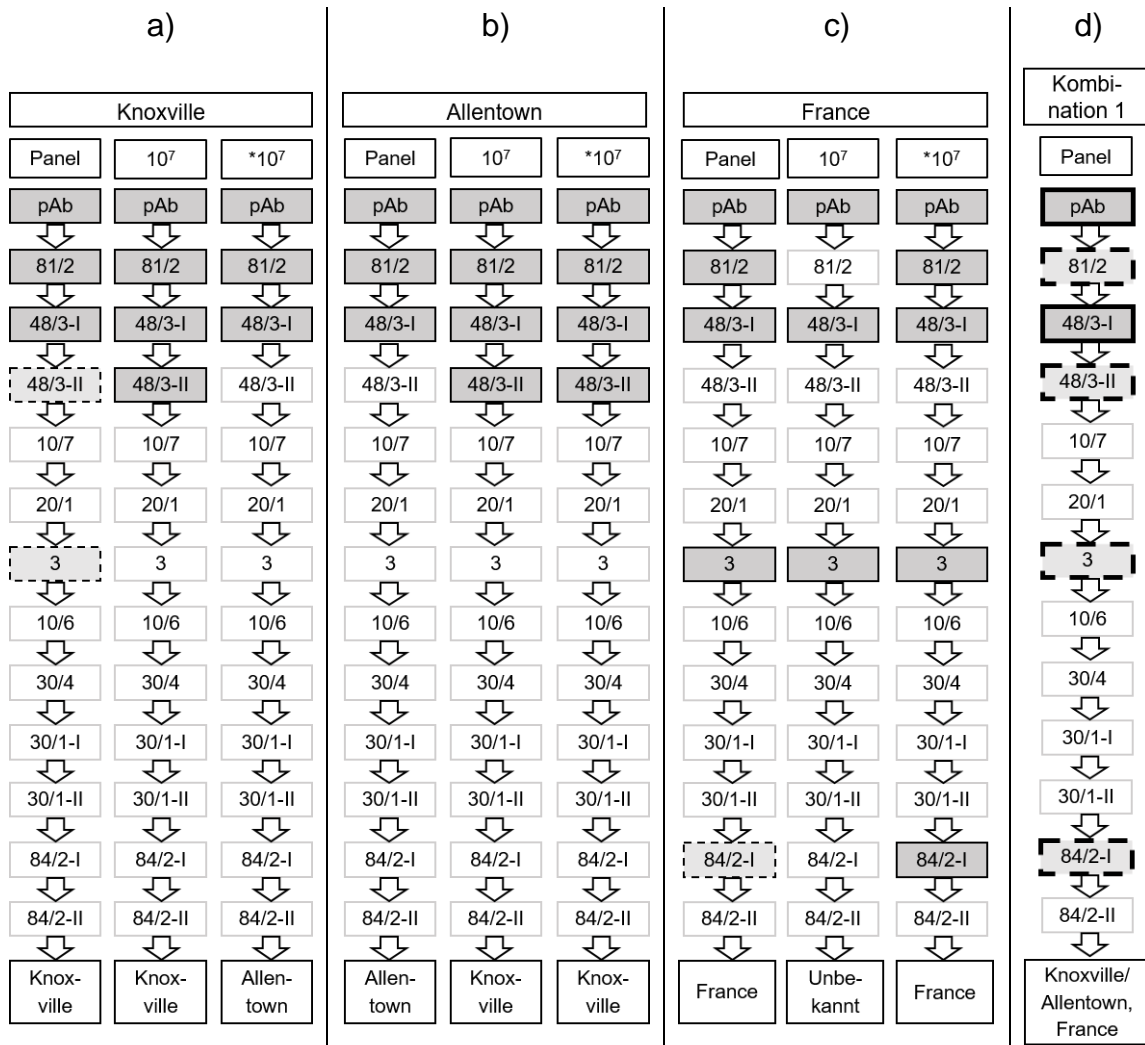
LegioTyper-Panels mit Kulturproben getestet. Die zur Einstellung des Panels verwendeten Kulturproben wurden neu kultiviert, vermessen und das Panel anhand der Ergebnisse korrigiert. Zur einheitlichen Darstellung für alle Messungen wurden alle Fängerantikörper in einem Pfad untereinander, wie im Panel auf den Mikroarray-Chips angeordnet, aufgetragen. Auf diese Weise sind die Messungen aufgrund der einheitlichen Darstellung untereinander besser zu vergleichen. Für jede Subgruppe ist im Panel-Pfad jeweils zuerst dargestellt, welche Fängerantikörper laut LegioTyper-Panel binden sollten. Diese sind schwarz umrandet (sehr starkes Signal, 3) bzw. schwarz gestrichelt umrandet (mittelstarkes Signal, 2) dargestellt. Nebenstehend sind die jeweiligen Messungen aufgetragen. Hier deutet eine schwarze Umrandung an, dass die CL-Signalintensität oberhalb des Schwellwertes liegt. Fängerantikörper mit einem Signal unterhalb des Schwellwertes sind zur optischen Abgrenzung grau umrandet. Zu Beginn jeder Reihe ist jeweils die gemessene Subgruppe benannt. Die Benennung der weiteren Spalten bezieht sich jeweils auf die Konzentration der gemessenen Probe, so bezeichnet „10<sup>7</sup>“ eine Probe der Konzentration  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>. Eine weitere Besonderheit in der Beschriftung markiert die Auswertung bzw. den Messort der Probe. Mit einem Stern („\*“) markierte Messungen wurden, wie obenstehend behandelt, auf optischer Basis ausgewertet. Proben, welche mit zwei Sterne („\*\*“) markiert waren, wurden am Konsiliarlabor Legionellen an der TUD vermessen wurden. Am unteren Ende des Panels wird das Ergebnis der mit dem postulierten LegioTyper-Panel durchgeführten Typisierung angegeben.

### 3.3.10.1 Kulturproben

Im weiteren Verlauf der Ergebnisse der Kulturmessungen werden die Ergebnisse pro Subgruppe besprochen, um einen besseren Überblick zu schaffen.

Vergleicht man bei Subgruppe Knoxville (Abbildung 47 a) die Ergebnisse der beiden Messungen mit dem durch den Pfad des LegioTyper-Panels erwarteten Ergebnis, so ist zu erkennen, dass alle Fängerantikörper, welche im LegioTyper-Panel sehr starkes Signal hatten, auch in diesen Messungen Legionellen gebunden haben. Der mAb 3 zeigte kein Signal, was jedoch so erwartet wurde, da hier derselbe Stamm verwendet wurde wie in der Messreihe der Konzentrationseinstellungen. Der mAb 48/3-II wies nur in einer Messung Signal auf. Diese Messung wäre somit Subgruppe Allentown zuzuordnen und ergibt somit eine falsche Zuordnung. Bei den Messungen mit Subgruppe Allentown (Abbildung 47 b) wurden bei allen Fängerantikörpern

Legionellen gebunden, welche auch im LegioTyper-Panel Signal aufwiesen. Des Weiteren wurden an mAb 48/3-II Legionellen angebunden, dieser zeigte ein positives CL-Signal. Beide Messungen wären im Panel-Abgleich somit fälschlicherweise der Subgruppe Knoxville zuzuordnen.

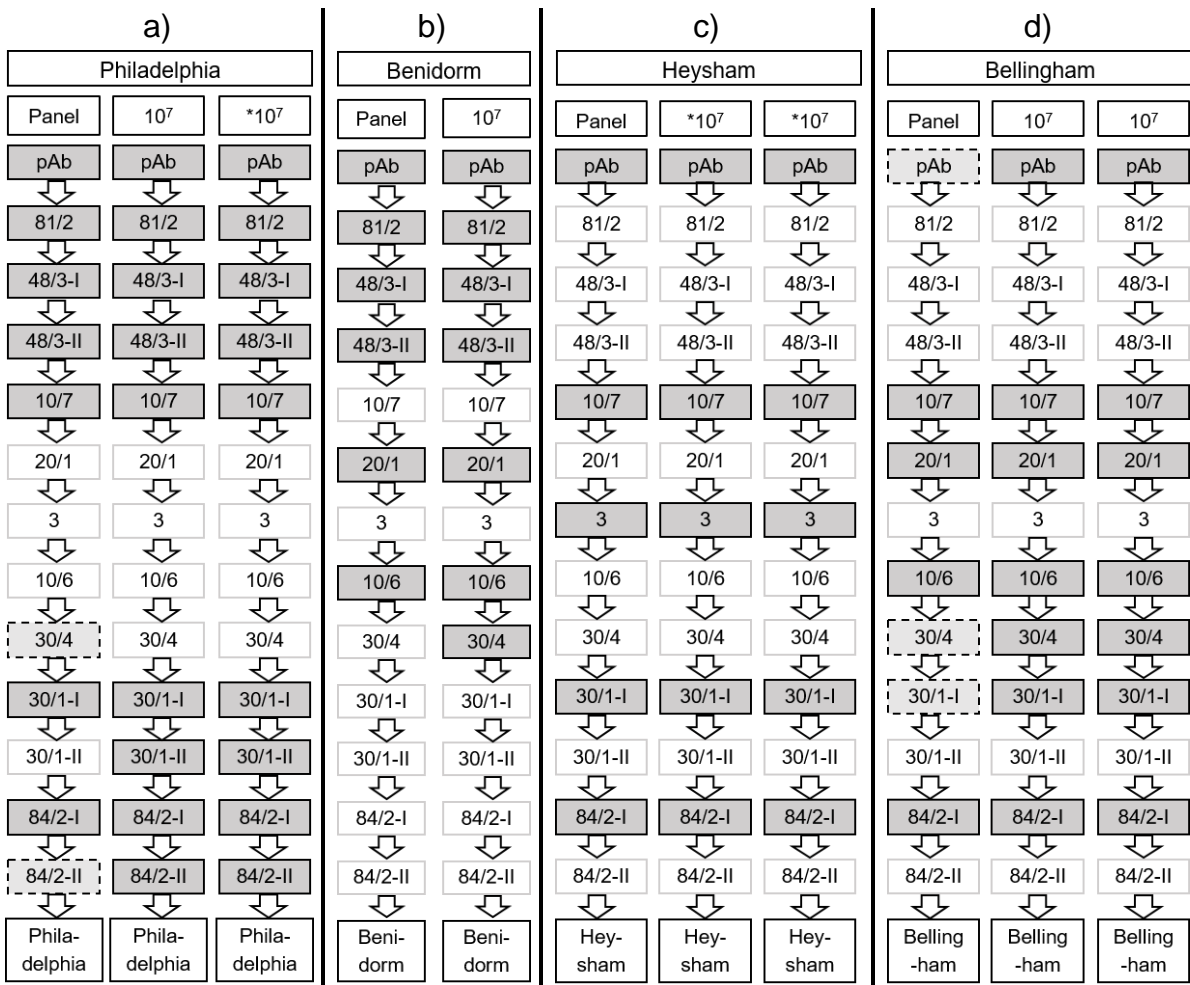


**Abbildung 47: Auswertung der Messung der Kulturproben zu Anwendung des LegioTyper-Panels. Abgebildet sind die Messungen der Subgruppe a) Knoxville, b) Allentown, c) France, jeweils mit zugehörigem Panel-Pfad laut des LegioTyper-Panels und d) der Pfad zur Kombinationsbestimmung 1 der Subgruppen Knoxville, Allentown und France.**

Bei Betrachtung der Subgruppe France (Abbildung 47 c) ist zu sehen, dass eine Messung exakt den Panel-Pfad abbildete, wie er laut Einstellungsmessungen erstellt wurde. In einer weiteren Messung wurden jedoch an die Fängerantikörper mAb 81/2 und 84/2-I keine Legionellen angebunden. Hier wurde das Panel nicht erfüllt und die Probe konnte nicht zugeordnet werden. Eine Betrachtung der Messungen für alle drei Subgruppen zeigte, dass eine Bestimmung der drei Subgruppen in einer sogenannten Kombinationsbestimmung jeweils eine eindeutige Zuordnung ergeben würde (siehe

Abbildung 47 d). Bei positiver CL-Signalintensität am pAb und mAb 48/3-I wäre die Gruppe Knoxville / Allentown / France somit erfüllt. In der Abbildung sind diese daher mit einer dick schwarzen Umrandung dargestellt. Zudem wäre neben Signal an diesen zwei mAbs eine Anbindung zusätzlich optional an mAb 81/2, 48/3-II, mAb 3 und mAb 84/2-I möglich. Diese sind in der Abbildung dick schwarz umrandet, jedoch durch gestrichelte Linie optisch abgetrennt. Um die Kombinationsbestimmung 1 eindeutig zuzuordnen, muss hier jeweils ein optionaler Fängerantikörper zusätzlich zum pAb und mAb 48/3-I Signalintensität über dem Schwellwert zeigen, da sonst auch die Pontiac-Gruppe im Allgemeinen zugeordnet werden könnte (diese Option wird später in diesem Kapitel genauer erläutert). Auch das Signal an mAb 81/2 wurde hier vorerst auch als optional eingetragen, um mit anderen Proben zu testen, ob das Ausbleiben des CL-Signales der Probe bei Subgruppe France eine Ausnahme darstellte.

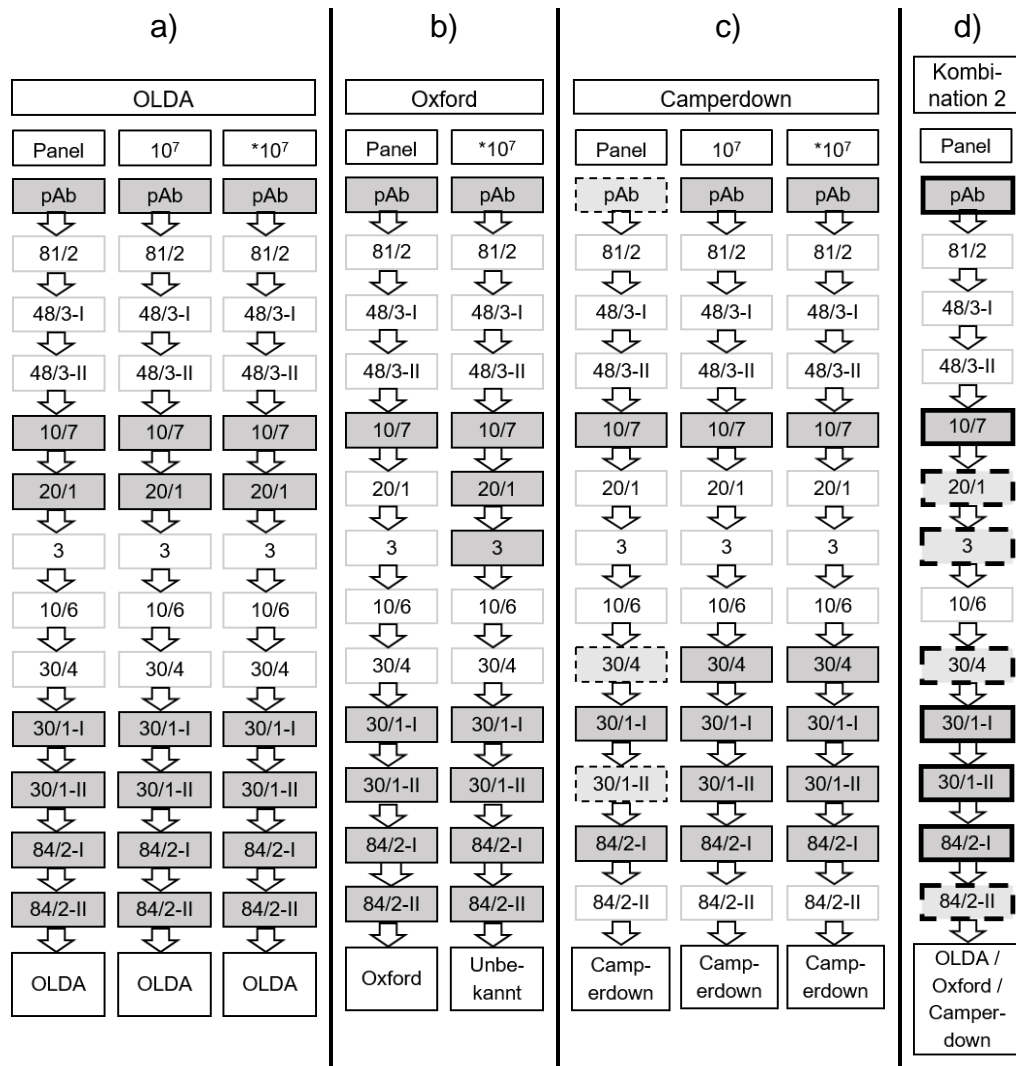
Bei Subgruppe Philadelphia (Abbildung 48 a) waren, wie im Panel auch, CL-Signale bei pAb und den mAbs 81/1, 48/3-I / -II, 10/7, 30/1-I und 84/2- / -II zu erkennen. Der mAb 30/4 zeigte bei beiden Messungen keine Signale, hier konnte jedoch schon bei den Einstellungsmessungen nur ein mittelstarkes Signal festgestellt werden. Des Weiteren ergab sich bei beiden Messungen ein positives Signal bei mAb 30/1-II. Da diese Signale bei beiden Messungen auftraten, wurde in dieser Subgruppe der Panel-Pfad um diesen Fängerantikörper erweitert. In den Messungen der Subgruppe Benidorm (Abbildung 48 b) war hier ein positives Signal an allen Fängerantikörpern des entwickelten LegioTyper-Panels messbar, zusätzlich zeigte sich ein unspezifisches Signal an mAb 30/4. Da jedoch keine weitere Subgruppe der Pontiac-Gruppe eine ähnliche Kombination an Fängerantikörpern aufwies, wie beispielsweise bei der Kombinationsbestimmung von Knoxville, Allentown und France, konnte die Messung hier trotz des unspezifischen Signals an mAb 30/4 eindeutig der Subgruppe Benidorm zugewiesen werden. Die Messungen mit Kulturproben der Subgruppe Heysham (Abbildung 48 c) zeigten eine komplette Übereinstimmung mit dem Panel-Pfad. Derselbe Fall lag auch bei Subgruppe Bellingham vor (Abbildung 48 d). Auch hier wies die Messung eine Übereinstimmung mit dem Pfad auf. Alle vier Messungen konnten der jeweiligen Subgruppe eindeutig zugewiesen werden.



**Abbildung 48: Auswertung der Messung der Kulturproben zu Anwendung des LegioTyper-Panels. Abgebildet sind die Messungen der Subgruppe a) Philadelphia, b) Benidorm, c) Heysham und d) Bellingham, jeweils mit zugehörigem Panel-Pfad laut des LegioTyper-Panels.**

Auch bei Subgruppe OLDA (Abbildung 49 a) konnte bei beiden Messungen eine Übereinstimmung mit dem Pfad des LegioTyper-Panels abgebildet werden, die Probe war der Subgruppe OLDA zuweisbar. Bei Subgruppe Oxford (Abbildung 49 b) konnte neben einem positiven Signal an den Fängerantikörpern des LegioTyper-Panels zudem ein unspezifisches Signal an den zwei Fängerantikörpern mAb 20/1 und 3 gemessen werden, wodurch die Probe hier nicht der Subgruppe Oxford zuzuordnen war. Bei der Subgruppe Camperdown (Abbildung 49 c) war eine Zuordnung zur richtigen Subgruppe bei beiden gemessenen Proben möglich. Der Pfad des LegioTyper-Panels wurde korrekt wiedergegeben.





**Abbildung 49: Auswertung der Messung der Kulturproben zu Anwendung des LegioTyper-Panels. Abgebildet sind die Messungen der Subgruppe a) OLDA, b) Oxford und c) Camperdown, jeweils mit zugehörigem Pfad laut des LegioTyper-Panels.**

Da alle drei Subgruppen einen ähnlichen Pfad aufweisen, wurden auch diese in der Zuordnung kombiniert, um eine falsche Zuordnung zu einer einzelnen Subgruppe zu vermeiden (siehe Abbildung 49 d). Bei positiven CL-Signalintensitäten oberhalb der Schwellwerte von pAb und mAb 10/7, 30/1-I/-II und 84/2-I wäre somit die Kombinationsbestimmung 2 OLDA/ Oxford/ Camperdown erfüllt und die Probe dieser Gruppe exakt zuweisbar. Wie schon bei Kombinationsbestimmung 1 war eine mögliche positive Anbindung an den mAbs 20/1, 3, 30/4 und 84/2-II möglich. Die Kombinationsdetektionen 1 und 2 wurden in ihrer Anwendbarkeit in den Messungen anderer Probenarten gezeigt. Die zugehörigen Daten sind in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

Zusätzlich zur Bestimmung der Subgruppe ist eine Unterscheidung von Sg 1 und auch Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe wichtig, da Sg 1 und besonders die Pontiac-Gruppe der Hauptauslöser bei Legionellose-Ausbrüchen sind. Bei Betrachtung des ursprünglichen LegioTyper-Panels (s. Abbildung 46) sieht man im oberen Bereich, dass der pAb hier spezifisch für Sg 1 ist und als Indikator für die Sg 1 verwendet werden kann. Weiter nach unten gehend liest sich die Unterteilung in Pontiac- bzw. Non-Pontiac-Gruppe. Demnach unterteilt der mAb 48/3-I diese bei positivem Signal über Schwellwert in Pontiac und bei negativem Signal in Non-Pontiac. Diese Einteilung wird durch positives Signal bei mAb 81/2 bekräftigt. Diese beiden Fängerantikörper werden demnach als Indikatoren für die Pontiac-Gruppe gewertet. Positives Signal an einem oder gar an beiden bestätigt die Anwesenheit der Pontiac-Gruppe. Als Indikatoren für Anwesenheit von Mitgliedern der Non-Pontiac-Gruppe werden die Fängerantikörper mAb 10/7 und auch 30/1-I gewertet. Positives Signal an einem oder beiden Fängerantikörpern ist ein Nachweis für die Non-Pontiac-Gruppe. Diese beiden Fängerantikörper sind jedoch auch Teil des postulierten Panel-Pfades für Subgruppe Philadelphia der Pontiac-Gruppe. Dieser Subgruppe fällt hier demnach eine besondere Stellung zu, da sie auch in der separierten Betrachtung der Indikator-Fängerantikörper ihrer Subgruppe zuzuordnen ist. Positives Signal über Schwellwert an allen Indikator-Fängerantikörpern ist somit eine eindeutige Zuordnung zu dieser Subgruppe.

In Abbildung 50 a ist eine separate Auftragung dieser Indikator-Fängerantikörper dargestellt. In der oberen Reihe der Darstellung sind die Messungen der Pontiac-Gruppe dargestellt, in der unteren Reihe die Messungen der Non-Pontiac-Gruppe. Zu Beginn der Reihe wurde markiert, welche Fängerantikörper Signalintensität über dem Schwellwert zeigen sollten. Bei Betrachtung der Messungen der Pontiac-Gruppe sieht man, dass in allen Messungen positives Signal an den Indikator-Fängerantikörper messbar war. Einzige Ausnahme ist eine Messung mit Subgruppe France, hier konnte lediglich Signal an mAb 48/3-I gemessen werden, nicht jedoch an mAb 81/2 (grau markiert). Da beide Fängerantikörper die Zugehörigkeit zur Pontiac-Gruppe anzeigen, war die Zuordnung zu dieser trotzdem möglich. Des Weiteren zeigten die Subgruppen an den mAbs 10/7 und 30/1-I keine unspezifischen Signale. Subgruppe Philadelphia war, wie obenstehend beschrieben, durch positives Signal an allen Fängerantikörper direkt zuweisbar. Eine Zuordnung war somit bei 100 % (n = 9) der Proben möglich. Auch bei der Non-Pontiac-Gruppe war eine hundertprozentige Zuordnung (n = 9) der Proben möglich. Zudem ist in Abbildung 50 b noch einmal eine sehr vereinfachte

Darstellung des Panel-Pfades mit dem pAb abgebildet, welcher als Indikator für Sg 1 gewertet wird. In der Abbildung kann man sehen, dass bei allen getesteten Kulturproben ein positives Signal gemessen wurde. Eine Zuordnung zur Sg 1 war bei jeder Probe, also in 100 % ( $n = 18$ ) der Fälle möglich.

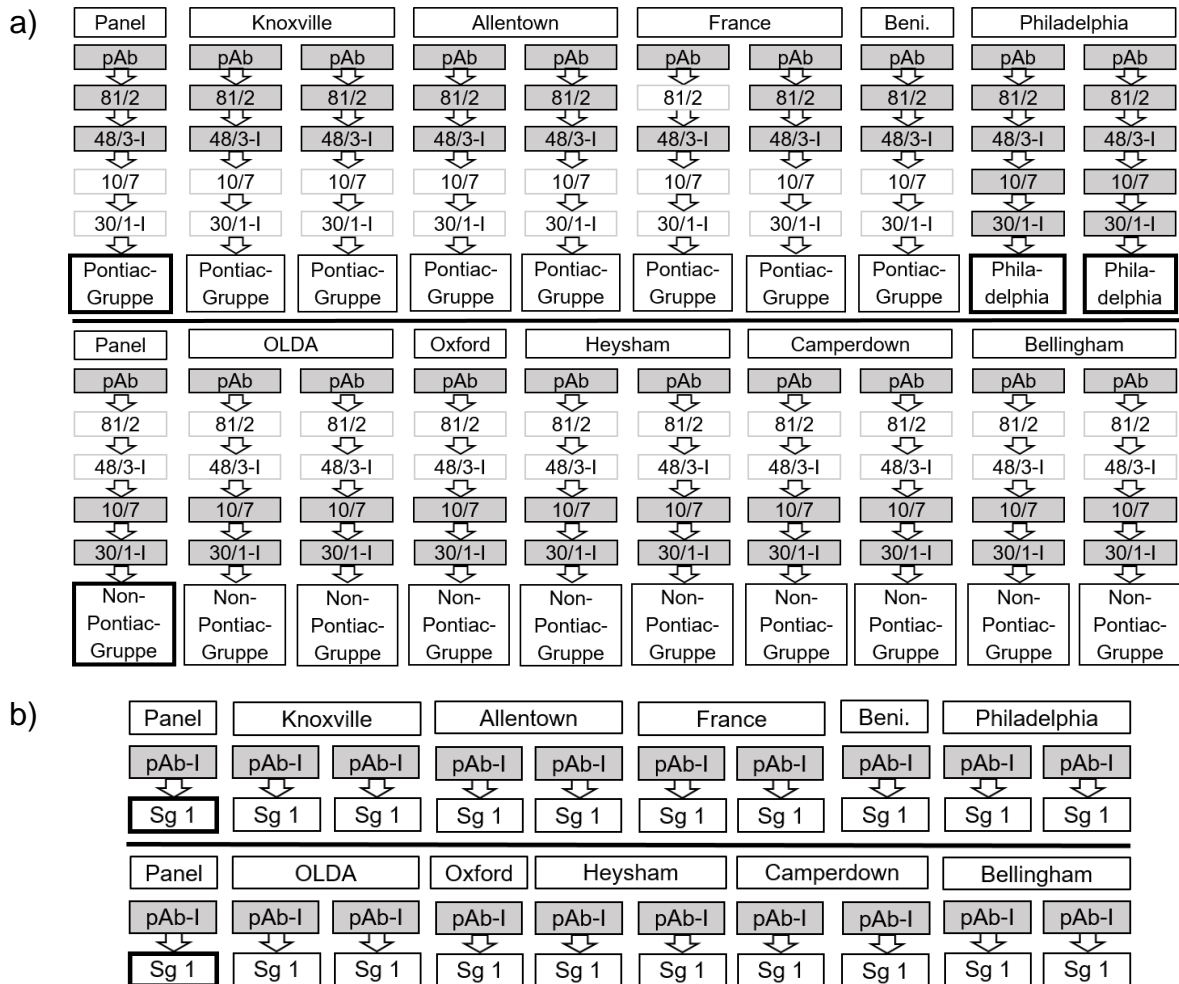


Abbildung 50: a) Auswertung der Messung der Kulturproben zur Pontiac-/ Non-Pontiac-Unterscheidung. b) Auswertung der Messung der Kulturproben zur Sg 1-Zugehörigkeit. Abgebildet sind jeweils alle Messungen der Kulturproben.

Wie bereits vermutet, konnten die CL-Signale der gemessenen Proben nicht immer exakt den im LegioTyper-Panel postulierten Pfad abbilden. Jedoch zeigte sich hier bei den Subgruppen Heysham, Bellingham, OLDA und Camperdown in allen acht Messungen eine Übereinstimmung mit den postulierten Panel-Pfaden. Die Übereinstimmungen sind in Tabelle 18 zusammenfassend aufgelistet. Eine direkte Zuordnung zu einer Subgruppe war, wie zuvor beschrieben, nicht immer möglich. Dies konnte durch die Etablierung der Kombinationsbestimmungen 1 und 2 jedoch behoben

werden. Die Zuordnung zu Sg 1 und zur Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe war in allen durchgeführten Messungen möglich.

**Tabelle 18: Zusammenfassende Tabelle der Kultur-Messungen und den Übereinstimmungen mit dem postulierten Panel-Pfad, der Einteilung in Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe und zu Sg 1.**

| Subgruppe                 | Übereinstimmung mit Panel-Pfad | Übereinstimmung mit Kombi 1 | Übereinstimmung mit Kombi 2 |
|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Knoxville                 | 1 / 2 Messungen                | 6 / 6 Messungen             | -                           |
| Allentown                 | 0 / 2 Messungen                |                             | -                           |
| France                    | 1 / 2 Messungen                |                             | -                           |
| Philadelphia              | 2 / 2 Messungen                | -                           | -                           |
| Benidorm                  | 1 / 1 Messungen                | -                           | -                           |
| Heysham                   | 2 / 2 Messungen                | -                           | -                           |
| Bellingham                | 2 / 2 Messungen                | -                           | -                           |
| OLDA                      | 2 / 2 Messungen                | -                           | 5 / 5 Messungen             |
| Oxford                    | 0 / 1 Messungen                | -                           |                             |
| Camperdown                | 2 / 2 Messungen                | -                           |                             |
| <b>Pontiac-Gruppe</b>     | 9 / 9 Messungen                |                             |                             |
| <b>Non-Pontiac-Gruppe</b> | 9 / 9 Messungen                |                             |                             |
| <b>Sg 1</b>               | 18 / 18 Messungen              |                             |                             |

### 3.3.10.2 Freie Antigenproben

Eine weitere Probenart, die bei dieser Testreihe verwendet wurde, waren freie LPS-Antigene, wie sie beispielsweise in Patientenurinen vorkommen. Bei den Antigenen handelt es sich somit nicht um ganze Legionellen in einer Probe, sondern lediglich die LPS-Strukturen. Die hier verwendeten Antigene wurden vom Konsiliarlabor Legionellen an der TUD freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie wurden teilweise direkt aus Kultur-, teilweise aus kultivierten Patientenproben (z.B. BAL oder auch Sputum) erhalten und die LPS-Struktur nach einer im Konsiliarlabor Legionellen entwickelten Methode isoliert [206]. Die Konzentrationen der Proben wurden in KBE mL<sup>-1</sup> angegeben. Dies bezog sich auf die Konzentration der Ausgangskulturprobe, da das isolierte freie LPS in der finalen Probe nicht direkt quantifizierbar war. Diese Konzentrationsangaben können somit aufgrund der Probenherstellung von der wirklichen LPS-Konzentration abweichen. Die Konzentration in der Probe kann geringer ausfallen als angegeben und eine Panel-Zuordnung somit erschweren. In diesem Kapitel wurden die freien Antigene in Wasser und auch negativem Urin verdünnt und vermessen. Die jeweils verwendete Matrix ist entsprechend

ausgewiesen. Im weiteren Verlauf der Analyse realer Proben wurde ein binärer Code zur Vereinfachung der Auswertung verwendet. Dieser ist im LegioTyper-Projekt fester Bestandteil der späteren Datenauswertung. Die Proben, welche überhalb des Schwellwertes liegen wurden hierbei mit einer „1“ gekennzeichnet, Signalwerte unterhalb des Schwellwertes mit einer „0“. Dadurch ergab sich ein binärer Code, welcher mit dem Panel abgeglichen werden konnte. Zum einfacheren Abgleich wurde hierfür der verwendete Panel-Pfad des angepassten LegioTyper-Panels in den binären Code überführt. Hierbei wurden die Fängerantikörper mit sehr starken Signalen (bisher im Pfad dunkel umrandet) als „1“ und mit mittelstarken Signalen (gestrichelt umrandet) als „V“ für Variabel, ähnlich der Bezeichnung in einem ELISA, bezeichnet. Fängerantikörper, welche für die jeweilige Subgruppe nicht im Panel-Pfad enthalten waren, wurden mit einer „0“ gekennzeichnet.

**Tabelle 19: Binärer Code für die Typisierung aller *L. pneumophila* Sg 1 Subgruppen mit dem LegioTyper-Panel. „0“: Nicht im LegioTyper-Panel-Pfad enthaltene Fängerantikörper, „1“: Fängerantikörper mit sehr starkem Signal im Panel-Pfad, „V“ (Variabel): Fängerantikörper mit mittelstarkem Signal. Die Subgruppen der Kombinationsbestimmungen sind grau dargestellt.**

| Subgruppe     | pAb | 81/2 | 48/3-I | 48/3-II | 10/7 | 20/1 | 3 | 10/6 | 30/4 | 30/1-I | 30/1-II | 84/2-I | 84/2-II |             |
|---------------|-----|------|--------|---------|------|------|---|------|------|--------|---------|--------|---------|-------------|
| Knoxville     | 1   | 1    | 1      | V       | 0    | 0    | V | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Pontiac     |
| Allentown     | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       |             |
| France        | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 1 | 0    | 0    | 0      | 0       | V      | 0       |             |
| Kombination 1 | 1   | V    | 1      | V       | 0    | 0    | V | 0    | 0    | 0      | 0       | V      | 0       |             |
| Philadelphia  | 1   | 1    | 1      | 1       | 1    | 0    | 0 | 0    | V    | 1      | 1       | 1      | V       |             |
| Benidorm      | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 1    | 0 | 1    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       |             |
| Heysham       | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 1 | 0    | 0    | 1      | 0       | 1      | 0       | Non-Pontiac |
| Bellingham    | V   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 0 | 1    | V    | V      | 0       | 1      | 0       |             |
| OLDA          | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       |             |
| Oxford        | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       |             |
| Camperdown    | V   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | V    | 1      | V       | 1      | 0       |             |
| Kombination 2 | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | V    | V | 0    | V    | 1      | 1       | 1      | V       |             |
| Pontiac       | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       |             |
| Non-Pontiac   | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 0       | 0      | 0       |             |
| Sg 1          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       |             |

Die verbesserten Panel-Pfade des vorherigen Kapitel sind in Tabelle 19 in jenem binären Code dargestellt. Die Antigen-Messungen wurden mit diesem abgeglichen. Die einzelnen Subgruppen, welche in die Kombinationsbestimmungen 1 und 2 einfließen wurden hier in grau zusätzlich angegeben, um die Anwendbarkeit der

Kombinationsdetektion zu testen. Die Kombinationsbestimmung wird im Folgenden Kombination 1 / 2 genannt.

Tabelle 20: Typisierung der freien Antigenproben in der Matrix Wasser. Angegeben sind die Fängerantikörper des Panels, der binäre Code der Messung und das Ergebnis der Typisierung. Zusätzlich ist angegeben, ob eine Zuordnung zur Pontiac- (P) oder Non-Pontiac-Gruppe (N-P) und Sg 1 möglich war. Die Ergebnisse sind am Ende der Tabelle zusammengefasst.

| Probe                                | pAb | 81/2 | 48/3-I | 48/3-II | 10/7 | 20/1 | 3 | 10/6 | 30/4 | 30/1-I | 30/1-II | 84/2-I | 84/2-II | Typisierung         | P/N-P     | Sg 1      |
|--------------------------------------|-----|------|--------|---------|------|------|---|------|------|--------|---------|--------|---------|---------------------|-----------|-----------|
| Knox., 10 <sup>7</sup>               | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 1 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1             | Ja        | Ja        |
| Knox., 10 <sup>7</sup>               | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Pontiac | Ja        | Ja        |
| Knox., **10 <sup>7</sup>             | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 1 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 0       | Kombi 1             | Ja        | Ja        |
| Knox., **10 <sup>7</sup> ,<br>ST 182 | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 1 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 1       | --                  | Nein      | Ja        |
| Knox., **10 <sup>7</sup> ,<br>ST 182 | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 1 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 1       | --                  | Nein      | Ja        |
| Knox., **10 <sup>6</sup> ,<br>ST 182 | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| Knox., **10 <sup>6</sup> ,<br>ST 182 | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| Allen., *10 <sup>7</sup>             | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Pontiac | Ja        | Ja        |
| Allen., *10 <sup>7</sup>             | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.   | Ja        | Ja        |
| France, 10 <sup>7</sup>              | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Pontiac | Ja        | Ja        |
| France, *10 <sup>7</sup>             | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Komb 1/<br>Pontiac  | Ja        | Ja        |
| Beni., *10 <sup>7</sup>              | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 1    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Beni.               | Ja        | Ja        |
| Beni., *10 <sup>7</sup>              | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 1    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Beni.               | Ja        | Ja        |
| Phil., *10 <sup>7</sup>              | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 1       | Phil.               | Ja        | Ja        |
| Phil., **10 <sup>7</sup>             | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 1       | Phil.               | Ja        | Ja        |
| OLDA, 10 <sup>7</sup>                | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       | Kombi 2             | Ja        | Ja        |
| OLDA, *10 <sup>7</sup>               | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       | Kombi 2             | Ja        | Ja        |
| OLDA, **10 <sup>7</sup>              | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       | Kombi 2             | Ja        | Ja        |
| Oxford, 10 <sup>7</sup>              | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       | Kombi 2             | Ja        | Ja        |
| Oxford, *10 <sup>7</sup>             | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       | Kombi 2             | Ja        | Ja        |
| Oxford,<br>**10 <sup>7</sup>         | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       | Kombi 2             | Ja        | Ja        |
| Camp., *10 <sup>7</sup>              | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 1    | 1      | 1       | 1      | 0       | Kombi 2/<br>Camp.   | Ja        | Ja        |
| Camp., *10 <sup>7</sup>              | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 1    | 1      | 1       | 1      | 0       | Kombi 2/<br>Camp.   | Ja        | Ja        |
| Camp., **10 <sup>7</sup>             | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 1    | 1      | 1       | 1      | 0       | Kombi 2/<br>Camp.   | Ja        | Ja        |
| Heysham,<br>*10 <sup>7</sup>         | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 1 | 0    | 0    | 1      | 0       | 0      | 0       | Kombi 2/<br>Heysham | Ja        | Ja        |
| Heysham,<br>*10 <sup>7</sup>         | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 1 | 0    | 0    | 1      | 0       | 1      | 0       | Heysham             | Ja        | Ja        |
| Bell., 10 <sup>7</sup>               | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 0 | 1    | 1    | 1      | 0       | 1      | 0       | Bell.               | Ja        | Ja        |
| Bell., *10 <sup>7</sup>              | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 0 | 1    | 1    | 1      | 0       | 1      | 0       | Bell.               | Ja        | Ja        |
| <b>Positives Ergebnis:</b>           |     |      |        |         |      |      |   |      |      |        |         |        |         | <b>23</b>           | <b>24</b> | <b>28</b> |

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Code-basierten Typisierung der freien Antigenproben in der Matrix Wasser dargestellt. Der Code ist für die Proben mit dem Typisierungsergebnis nach Abgleich mit Tabelle 19 einzeln dargestellt. Zusätzlich ist eine Zuordnung zur Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe und Sg 1 angegeben. Bei den ersten drei Proben der Subgruppe Knoxville war die Zuordnung zu Kombination 1 möglich. Eine Probe zeigte jedoch nur positives Signal (1) an den Fängerantikörpern pAb, mAb 81/2 und 48/3-I und war somit der Pontiac-Gruppe zuzuordnen. Zusätzlich wurde hier Sequenztyp ST 182 aus Patientenisolaten vermessen. Beide Proben in der Konzentration  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> konnten in der Typisierung nicht zugewiesen werden. Aufgrund fehlender positiver Signale an mAb 81/2, 48/3-I, 10/7 und auch 30/1-I konnten die Proben weder der Pontiac- noch der Non-Pontiac-Gruppe zugeordnet werden. Durch Signal am pAb konnten beide Proben jedoch der Sg 1 zugeordnet werden. Die Proben der Konzentration  $c = 10^6$  KBE mL<sup>-1</sup> konnten nur in Sg 1 eingeordnet werden, da hier nur Signal am pAb nachweisbar war.

Auch die Messungen der Proben der Subgruppen Allentown und France zeigten eine Zuordnung zur Kombination 1. Jedoch entspricht ein positives Signal an mAb 81/2 und 48/3-I zeitgleich einer Einordnung in die Pontiac-Gruppe. Eine Probe mit Allentown zeigte zusätzlich positives Signal an mAb 48/3-II, wodurch auch eine Typisierung zur Subgruppe Philadelphia denkbar wäre. Eine eindeutige Typisierung zu Kombination 1 war bei allen vier Proben somit nicht möglich. Durch die Gruppenbestimmung mehrerer möglicher Subgruppen bzw. Kombinationen können jedoch andere Subgruppen ausgeschlossen werden.

Bei Subgruppe Benidorm zeigten nicht alle relevanten Fängerantikörper positives Signal, jedoch konnte anhand der Codierung durch positives Signal (1) bei den AK der Pontiac-Gruppe und auch an mAb 20/1 hier die Subgruppe Benidorm in der Typisierung bestimmt werden. Dies war auch bei den Proben der Subgruppe Philadelphia möglich. Ohne vollständige Abbildung der entsprechenden Codierung konnte die Probe hier der Subgruppe Philadelphia zugeordnet werden (durch positives Signal an den Fängerantikörpern der Pontiac-Gruppe und zusätzlich mAb 84/2-I und -II). Beide Beispiele zeigten hier deutlich, dass eine vollständige Abbildung des Panels nicht ausschlaggebend für eine eindeutige Zuordnung ist, solange die Kombination der AK bei keiner weiteren Kombination oder Subgruppe zu finden ist. Aus diesem Grund ist jedoch die verhältnismäßig hohe Anzahl an Fängerantikörpern auf dem LegioTyper-Chip wichtig, um auch bei verringerter Anzahl an positiven

Antikörpern, beispielsweise durch niedrigere LPS-Konzentrationen in der Probe, eine Typisierung durchführen zu können.

Bei den Messungen der Subgruppen OLDA, Oxford und Camperdown, welche der Kombination 2 zugewiesen wurden, konnte in allen Messungen eine eindeutige Zuordnung zu Kombination 2 durchgeführt werden. Subgruppe Camperdown konnte zusätzlich in allen drei Messungen durch vollständige Übereinstimmung der ursprünglichen Codierung als Subgruppe Camperdown typisiert werden. Bei den Proben der Subgruppe Heysham konnte die Typisierung zur Subgruppe Heysham in nur einer von zwei Messungen erfolgen. Hier wurde das Panel durch die Codierung vollständig abgebildet. In der zweiten Probe erfolgt eine Gruppentypisierung zu Subgruppe Heysham und Kombination 2, ähnlich den Allentown-Proben zuvor. Bei Subgruppe Bellingham konnte eine vollständige Übereinstimmung der Codierung mit dem LegioTyper-Panel festgestellt werden, wodurch eine eindeutige Typisierung erfolgte.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Typisierung zu den jeweiligen Panel-Pfaden der Subgruppen bzw. Kombination 1 und Kombination 2 bzw. eine Gruppentypisierung zu mehreren bei 23 von 28 Fällen (82 %) durchgeführt werden konnte. Zudem konnten 86 % ( $n = 28$ ) der Proben der Pontiac- oder Non-Pontiac-Gruppe zugeordnet werden. Des Weiteren konnten 100 % ( $n = 28$ ) der Proben der Sg 1 positiv zugeordnet werden.

In einer weiteren Messreihe wurde die Matrix zur Verdünnung der Antigene verändert. Da die Schnelltypisierung mit dem LegioTyper-Chip künftig für die Anwendung mit Wasserproben und auch Patientenerinen verwendet werden sollte, wurden freie Antigene verschiedener Konzentrationen in einer negativen Urinprobe verdünnt und vermessen, um die Matrix der Patientenerine zu imitieren. Es wurden hier verschiedene Konzentrationen verwendet, um die Auswirkung geringerer LPS-Konzentrationen auf die Typisierung zu testen. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tabelle 21, analog Tabelle 20, dargestellt.

Bei den Messungen zur Subgruppe Allentown konnte bei den Messungen mit den niedrigeren Konzentrationen  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup> und  $c = 10^6$  KBE mL<sup>-1</sup> Signal an pAb und mAb 48/3-I gemessen werden. Somit war die Zuteilung zur Sg 1 und auch zur Pontiac-Gruppe möglich, jedoch keine Typisierung. Die Probe der Konzentration  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> zeigte hier dieselbe Codierung, wie eine Probe mit Allentown in der



Matrix Wasser. Durch Signal an pAb, mAb 81/2 und 48/3-I und -II war eine Gruppenzuordnung zur Kombination 1, aber auch zur Subgruppe Philadelphia möglich.

**Tabelle 21: Typisierung der freien Antigenproben in der Matrix Urin. Angegeben sind die Fängerantikörper des Panels, der binäre Code der Messung und das Ergebnis der Typisierung. Zusätzlich ist angegeben, ob eine Zuordnung zur Pontiac- (P) oder Non-Pontiac-Gruppe (N-P) und Sg 1 möglich war. Die Ergebnisse sind am Ende der Tabelle zusammengefasst.**

| Probe                      | pAb | 81/2 | 48/3-I | 48/3-II | 10/7 | 20/1 | 3 | 10/6 | 30/4 | 30/1-I | 30/1-II | 84/2-I | 84/2-II | Typisierung                     | P/<br>N-P | Sg 1     |
|----------------------------|-----|------|--------|---------|------|------|---|------|------|--------|---------|--------|---------|---------------------------------|-----------|----------|
| Allen.<br>$10^5$           | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                              | Ja        | Ja       |
| Allen.<br>$10^6$           | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                              | Ja        | Ja       |
| Allen.<br>$10^7$           | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.               | Ja        | Ja       |
| Oxford<br>$10^6$           | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 0       | 1      | 1       | Kombi 2/<br>Heysham             | Ja        | Ja       |
| Bell<br>$10^7$             | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 0 | 1    | 1    | 1      | 0       | 1      | 0       | Bell.                           | Ja        | Ja       |
| Heysham<br>$*10^6$         | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 1 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1,<br>Heysham,<br>Kombi 2 | Nein      | Ja       |
| <b>Positives Ergebnis:</b> |     |      |        |         |      |      |   |      |      |        |         |        |         | <b>4</b>                        | <b>5</b>  | <b>6</b> |

Bei der Messung des Antigens der Subgruppe Oxford in der Konzentration  $c = 10^6$  KBE mL<sup>-1</sup> zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die Probe konnte durch die vorliegende Codierung in einer Gruppentypisierung sowohl der Kombination 2, als auch der Subgruppe Heysham zugeordnet werden. Eine Einordnung war zusätzlich zur Non-Pontiac-Gruppe und zu Sg 1 möglich. Die Messungen der Subgruppe Bellingham zeigten eine vollständige Übereinstimmung der Codierung. Eine Typisierung war möglich. Das Antigen der Subgruppe Heysham wurde in der Konzentration  $c = 10^6$  KBE mL<sup>-1</sup> vermessen. Diese konnte durch Signal am pAb und an mAb 3 Sg 1 und in einer Gruppenbestimmung der Kombi 1, Subgruppe Heysham und Kombi 2 zugewiesen werden. Eine Zuteilung zur Pontiac-/ Non-Pontiac-Gruppe konnte nicht erfolgen.

Bei den hier vermessenen Proben konnten 4 von 6 Proben (67 %) typisiert werden. Die Messungen zeigten eine starke Konzentrationsabhängigkeit, wodurch die Typisierung bei geringer Abweichung der Konzentration erschwert wurde. Die Zuordnung zur Pontiac-/Non-Pontiac-Gruppe war jedoch auch hier bei 5 von 6 Proben (83 %), eine Zuordnung zur Sg 1 in 100 % ( $n = 6$ ) der Messungen möglich.

Zudem zeigte sich in den Messungen, dass die Matrix Urin hier keine störenden Signale oder zusätzlich positive Signale an den Fängerantikörpern verursachte. Eine Verringerung der Signale trat hier gehäuft bei Verwendung verminderter Konzentration auf und wird somit durch die geringere Konzentration an LPS-Antigen erklärt. Die Störung der Matrix bei der Anbindung der Antigene an die Fängerantikörper kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

### 3.3.10.3 Patientenurin-Proben

In dieser Messreihe wurden reale Patientenurine von positiv getesteten Legionellose-Patienten vermessen. Die Proben wurden hierbei zum Teil unbehandelt in das LegioTyper-Messsystem injiziert. Aufgrund der Einzigartigkeit jedes Patientenurines und der immer variierenden, nicht im Voraus zu bestimmenden Menge an freiem LPS-Antigen in den Proben, wurden diese zudem teilweise aufkonzentriert (Aufkonzentrierung an der TUD über Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten 5 kDa, 5x = fünffache Aufkonzentrierung, 10x = zehnfache Aufkonzentrierung). Die Proben wurden vom Konsiliarlabor Legionellen der TUD freundlicherweise zur Verfügung gestellt und teilweise auch dort vermessen. Die Proben sind, wie zuvor, entsprechend gekennzeichnet. Die Proben wurden im Voraus an der TUD im Rahmen der klinischen Diagnostik (wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben) typisiert. Dies geschah beispielsweise durch Kultivierung von respiratorischem Material der Patienten, welche anschließend im ELISA entsprechend dem Dresden-Panel typisiert wurde. In anderen Fällen wurde die ELISA-Typisierung direkt mit Urinproben durchgeführt [326]. Hier war jedoch nicht in allen Fällen eine Typisierung aufgrund der niedrigen LPS-Konzentration in menschlichem Urin möglich, die Proben sind entsprechend mit „Unbekannter mAb-Typ“ gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf werden zuerst die Ergebnisse der pur vermessenen Patientenproben diskutiert. Diese sind in Tabelle 22 dargestellt. Der Aufbau der Tabelle entspricht Tabelle 20.

Die pur vermessenen Urine wiesen in den meisten Proben eine zu geringe Konzentration an freien LPS-Antigenen auf, um eine exakte Typisierung durchführen zu können. In allen 19 Proben (100 %) konnte Signal am pAb gemessen werden, wodurch alle Proben zweifelsfrei der Sg 1 zugeordnet werden konnten. Sechs von 19 Proben (32 %) konnten zudem der Pontiac- oder Non-Pontiac-Gruppe durch positives Signal (1) an den entsprechenden Fängerantikörpern mAb 81/2, 48/3-I, 10/7 oder 30/1-I zugeordnet werden. Eine Probe, im ELISA als OLDA typisiert, zeigte Signale an

mAb 10/7 und 84/2-I, was hier eine Gruppentypisierung zu Subgruppe Philadelphia und Kombination 2 (OLDA ist hier Teil der Kombination) zuließ.

**Tabelle 22: Typisierung der Patientenurin-Proben, pur vermessen. Angegeben sind die Fängerantikörper des Panels, der binäre Code der Messung und das Ergebnis der Typisierung. Zusätzlich ist angegeben, ob eine Zuordnung zur Pontiac- (P) oder Non-Pontiac-Gruppe (N-P) und Sg 1 möglich war. Die Ergebnisse sind am Ende der Tabelle zusammengefasst.**

| Probe                      | pAb | 81/2 | 48/3-I | 48/3-II | 10/7 | 20/1 | 3 | 10/6 | 30/4 | 30/1-I | 30/1-II | 84/2-I | 84/2-II | Typi-<br>sierung  | P/<br>N-P | Sg 1      |
|----------------------------|-----|------|--------|---------|------|------|---|------|------|--------|---------|--------|---------|-------------------|-----------|-----------|
| Knox.                      | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Ja        | Ja        |
| Knox.                      | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| Phil.                      | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| Phil.                      | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Ja        | Ja        |
| Phil.                      | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Ja        | Ja        |
| **Phil.                    | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Ja        | Ja        |
| **Phil.                    | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| **Phil.                    | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Ja        | Ja        |
| France/<br>Allen.          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| France/<br>Allen.          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| *France/<br>Allen.         | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| *OLDA                      | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| **OLDA                     | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 0       | Kombi 2/<br>Phil. | Nein      | Ja        |
| Unbek.<br>mAb-Typ          | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Ja        | Ja        |
| Unbek.<br>mAb-Typ          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| Unbek.<br>mAb-Typ          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| Unbek.<br>mAb-Typ          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| **Unbek.<br>mAb-Typ        | 1   | 1    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 1      | 0       | 1      | 1       | Phil.             | Ja        | Ja        |
| **Unbek.<br>mAb-Typ        | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                | Nein      | Ja        |
| <b>Positives Ergebnis:</b> |     |      |        |         |      |      |   |      |      |        |         |        |         | <b>2</b>          | <b>6</b>  | <b>19</b> |

Von den Proben, welche über ELISA nicht zugeordnet werden konnten, konnte eine der Proben der Subgruppe Philadelphia zugeordnet werden. Sie zeigte Signal am 81/2 für die Pontiac-Gruppe und zudem an 30/1-I und 84/2-I und -II. Dies war keine Übereinstimmung mit dem kompletten Panel, ließ jedoch in der Kombination auf Subgruppe Philadelphia schließen. Eine weitere durch ELISA untypisierte Probe konnte durch positives Signal (1) an mAb 48/3-I der Pontiac-Gruppe zugewiesen

werden. Bei den weiteren Proben war nur die Zuteilung zu Pontiac-Gruppe/ Sg 1 durchführbar. Die Konzentration des LPS im Urin war hier für weitere Typisierungen zu gering.

**Tabelle 23: Typisierung der aufkonzentrierten Patientenurin-Proben, Aufkonzentrierung jeweils angegeben. Angegeben sind die Fängerantikörper des Panels, der binäre Code der Messung und das Ergebnis der Typisierung. Zusätzlich ist angegeben, ob eine Zuordnung zur Pontiac- (P) oder Non-Pontiac-Gruppe (N-P) und Sg 1 möglich war. Die Ergebnisse sind am Ende der Tabelle zusammengefasst.**

| Probe                      | pAb | 81/2 | 48/3-I | 48/3-II | 10/7 | 20/1 | 3 | 10/6 | 30/4 | 30/1-I | 30/1-II | 84/2-I | 84/2-II | Typisierung         | P/<br>N-P | Sg 1      |
|----------------------------|-----|------|--------|---------|------|------|---|------|------|--------|---------|--------|---------|---------------------|-----------|-----------|
| Knox. 5x                   | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Pontiac | Ja        | Ja        |
| Phil. 5x                   | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| France/<br>Allen. 5x       | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.   | Ja        | Ja        |
| Phil. 10x                  | 1   | 1    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Ja        | Ja        |
| *Phil. 10x                 | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| **Phil. 10x                | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.   | Ja        | Ja        |
| **Phil. 10x                | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.   | Ja        | Ja        |
| **Phil. 10x                | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Pontiac | Ja        | Ja        |
| **Phil. 10x                | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.   | Ja        | Ja        |
| France/<br>Allen. 10x      | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| **France/<br>Allen. 10x    | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Ja        | Ja        |
| OLDA 10x                   | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| OLDA 10x                   | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| **OLDA<br>10x              | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Nein      | Ja        |
| **Unbek.<br>mAb-Typ<br>10x | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                  | Ja        | Ja        |
| <b>Positives Ergebnis:</b> |     |      |        |         |      |      |   |      |      |        |         |        |         | <b>6</b>            | <b>9</b>  | <b>15</b> |

In Tabelle 23 sind die Messergebnisse der aufkonzentrierten Urinproben dargestellt, der Aufbau gleicht Tabelle 20. Auch bei diesen Proben war durch Signal am pAb eine eindeutige Zuordnung zur Sg 1 in 100 % der Messungen (n = 15) möglich. Des Weiteren konnten neun von 15 Proben (60 %) Pontiac- oder Non-Pontiac-Gruppe zugeordnet werden (durch positives Signal (1) an den Fängerantikörpern mAb 81/2, 48/3-I, 10/7 oder 30/1-I). Bei den fünffach aufkonzentrierten Proben war eine

Gruppentypisierung bei zwei Proben möglich. Eine Probe konnte hierbei durch Signal an pAb, mAB 81/2 und 48/3-I der Kombination 1 und der Pontiac-Gruppe zugewiesen werden. Eine weitere Probe konnte der Kombination 1 und der Subgruppe Philadelphia durch positive Signale (1) an pAb, mAB 81/2 und 48/3-I-II zugeordnet werden. Diese Gruppentypisierung zu Kombination 1 / Philadelphia konnte mit derselben Codierung auch bei drei der zehnfach aufkonzentrierten Proben durchgeführt werden. Eine weitere Probe wies durch positive Signale (1) an pAb, mAB 81/2 und 48/3-I die Codierung für eine Einteilung zu Kombination 1 / Pontiac-Gruppe auf. Die weiteren Proben konnten nicht genau typisiert werden.

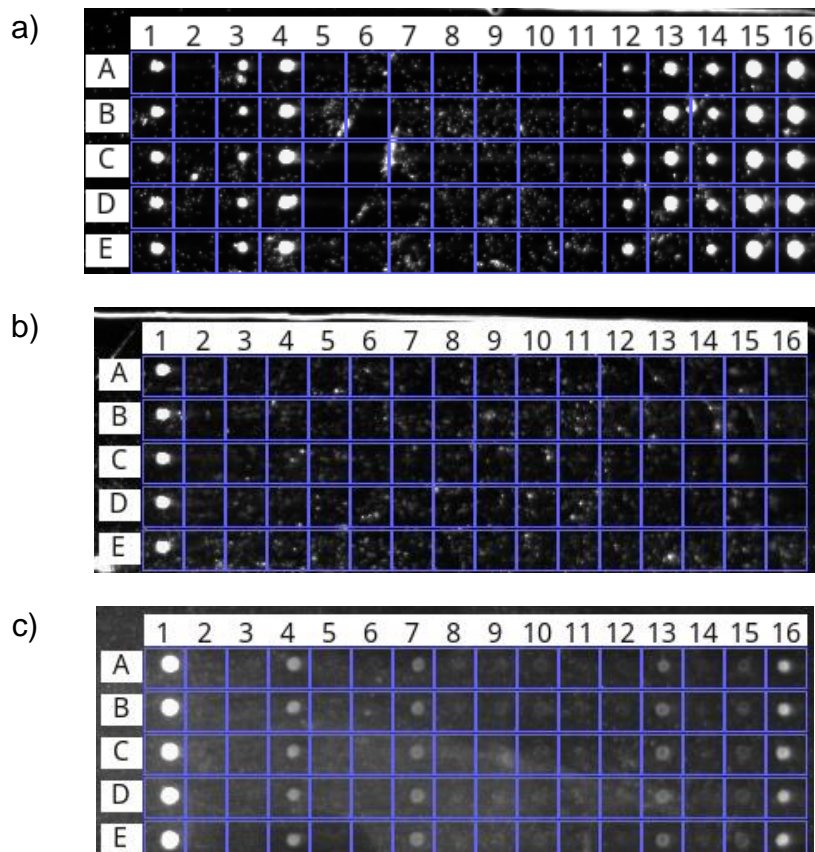
Zusammenfassend kann man sagen, dass die geringe Konzentration an LPS-Antigen in Patientenerinen eine Subtypisierung mit dem LegioTyper-Panel erschwert. Dies kann jedoch auch bei Verwendung des indirekten ELISAs mit dem Dresden-Panel aufgrund von Probenkonzentration oder Matrixeffekten der Fall sein. Die Typisierung erfolgt hier in vielen Fällen aus kultiviertem klinischem Material, wodurch eine hohe Konzentration der Probe vorausgesetzt werden kann. Typisierungen direkt aus Patientenerinen sind auch hier manchmal nicht möglich, wodurch Proben hier teilweise als „Unbekannter mAb-Typ“ benannt waren. In der hier vorliegenden Typisierung mit Hilfe des LegioTyper-Panels konnten acht der insgesamt 34 vermessenen Proben (24 %) in Gruppen typisiert werden. Des Weiteren konnte in 44 % (n = 34) eine Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppen-Zuordnung durch positives Signal (1) an den mAbs 81/2, 48/3-I, 10/7 oder 30/1-I erfolgen. Eine Zuordnung zu Sg 1 war in 100 % (n = 34) der Fälle möglich.

#### **3.3.10.4 Reale Wasserproben**

Im Folgenden wurden reale Wasserproben anhand des angepassten LegioTyper-Panels typisiert und die Anwendbarkeit mit Realproben verifiziert. In realen Wassersystemen finden sich häufig mehrere Subgruppen oder auch Serogruppen gemischt in unterschiedlichen Mengen. Dies stellt eine besondere Herausforderung dar, da eine Zuordnung der AK zu Subgruppen erschwert werden kann. Gerade bei diesen Proben war daher interessant, ob eine Typisierung der Proben, eine Einteilung in Pontiac / Non-Pontiac-Gruppe oder Sg 1 möglich ist.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei realen Wasserproben ist die undefinierte Probenmatrix. Jede Probestelle hat einen anderen Verschmutzungsgrad bzw. weist

eine unterschiedliche Keimbelastung beispielsweise anderer Bakterienarten oder auch Viren auf. Diese können die Messung stören oder beeinflussen. In der Auswertung dieser Proben konnten viele der gemessenen Proben ausgewertet werden. Allerdings mussten auch wenige Messungen verworfen werden, da hier beispielsweise der Hintergrund einen falsch-positiven Befund aller Fängerantikörper ergeben hätte oder die Oberfläche unspezifische Bindungen aufwies. Dies war jedoch nur bei wenigen Proben der Fall. In Abbildung 51 a – c sind Beispiele solcher Messungen aufgeführt.



**Abbildung 51: a) – c) Mikroarray-Chip-Messbilder von Messungen mit realen Wasserproben.**

Am IWC wurden in dieser Messreihe mehrere Proben aufbereitet. Es handelt sich hierbei um Proben, welche mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1 angereichert wurden und zusätzlich um einen Positivbefund eines Kühlturmes (Matrix: Prozesswasser). Diese Proben wurden aus 1 L Initialvolumen über MAF-DEAE und CeUF aufkonzentriert. Des Weiteren wurden Positivbefunde von Wasser eines Krankenhauses (KH) aus 10 L-Initialvolumen über MAF-OH und CeUF aufkonzentriert (Aufkonzentrierung durch S. Mahler und S. Schäfer). Vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) wurden zudem freundlicherweise Messergebnisse zur Verfügung gestellt, welche im Rahmen des LegioTyper-Projektes mit dem LegioTyper-Chip gemessen wurden. Hierbei handelt es sich um

routinemäßige Beprobungen, welche nach DIN EN ISO 11731-2:2008 aufkonzentriert wurden. Diese Proben wurden anonymisiert angegeben.

In Tabelle 24 sind die am IWC vermessenen Proben dargestellt, die Tabelle ist analog zu Tabelle 20 aufgebaut. Auch bei diesen Proben konnten 100 % ( $n = 8$ ) der Proben durch Signal am pAb der Sg 1 zugewiesen werden. Des Weiteren konnten 75 % der Proben hier der Pontiac- oder Non-Pontiac-Gruppe durch die Fängerantikörper mAb 81/2, 48/3-I, 10/7 und 30/1-I zugeordnet werden. Bei den ersten drei Proben war, trotz variierender Anzahl positiver (1) AK, die Typisierung zur Subgruppe Bellingham möglich. Drei Messungen der Krankenhaus-Probe konnten aufgrund des Signales an pAb, mAb 48/3-I, 30/4, 84/2-I (und einmal auch mAb 84/2-II) der Subgruppe Philadelphia zugeordnet werden. Somit war hier bei 75 % ( $n = 8$ ) der Proben eine Typisierung möglich.

**Tabelle 24: Typisierung der am IWC mittels MAF-OH bzw. MAF-DEAE / CeUF aufbereiteter Wasserproben. Angegeben sind die Fängerantikörper des Panels, der binäre Code der Messung und das Ergebnis der Typisierung. Zusätzlich ist angegeben, ob eine Zuordnung zur Pontiac- (P) oder Non-Pontiac-Gruppe (N-P) und Sg 1 möglich war. Die Ergebnisse sind am Ende der Tabelle zusammengefasst.**

| Probe                              | pAb | 81/2 | 48/3-I | 48/3-II | 10/7 | 20/1 | 3 | 10/6 | 30/4 | 30/1-I | 30/1-II | 84/2-I | 84/2-II | Typisierung | P/<br>N-P | Sg 1     |
|------------------------------------|-----|------|--------|---------|------|------|---|------|------|--------|---------|--------|---------|-------------|-----------|----------|
| MAF-DEAE<br>5 x 10 <sup>4</sup>    | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 1 | 1    | 1    | 0      | 0       | 1      | 1       | Bell.       | Ja        | Ja       |
| *MAF-DEAE<br>2,5 x 10 <sup>4</sup> | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 1    | 0 | 1    | 1    | 0      | 0       | 0      | 0       | Bell.       | Ja        | Ja       |
| *MAF-DEAE<br>5 x 10 <sup>5</sup>   | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 0 | 1    | 1    | 1      | 0       | 1      | 0       | Bell.       | Ja        | Ja       |
| MAF-DEAE<br>Real-PW                | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --          | Nein      | Ja       |
| MAF-OH<br>10 L KH                  | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --          | Nein      | Ja       |
| *MAF-OH<br>10 L KH                 | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 1    | 0      | 0       | 1      | 0       | Phil.       | Ja        | Ja       |
| *MAF-OH<br>10 L KH                 | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 1    | 0      | 0       | 1      | 0       | Phil.       | Ja        | Ja       |
| *MAF-OH<br>10 L KH                 | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 1    | 0      | 0       | 1      | 1       | Phil.       | Ja        | Ja       |
| <b>Positives Ergebnis:</b>         |     |      |        |         |      |      |   |      |      |        |         |        |         | <b>6</b>    | <b>6</b>  | <b>8</b> |

In Tabelle 25 sind die Auswertungen der Messungen dargestellt, welche vom LGL mit dem LegioTyper-Chip durchgeführt wurden. Die Tabelle ist analog zu Tabelle 20 aufgebaut. In diesen Messungen konnten alle Proben (100 %,  $n = 20$ ) der Sg 1 durch

Signal am pAb zugeordnet werden. Bei den Fängerantikörpern, welche die Zugehörigkeit zur Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe anzeigen, konnte in 16 von 20 Fällen (80 %) positives Signal (1) ermittelt werden.

**Tabelle 25: Typisierung am LGL vermessener Realproben. Angegeben sind die Fängerantikörper des Panels, der binäre Code der Messung und das Ergebnis der Typisierung. Zusätzlich ist angegeben, ob eine Zuordnung zur Pontiac- (P) oder Non-Pontiac-Gruppe (N-P) und Sg 1 möglich war. Die Ergebnisse sind am Ende der Tabelle zusammengefasst.**

| Probe                      | pAb | 81/2 | 48/3-I | 48/3-II | 10/7 | 20/1 | 3 | 10/6 | 30/4 | 30/1-I | 30/1-II | 84/2-I | 84/2-II | Typisierung                  | P/<br>N-P | Sg 1      |
|----------------------------|-----|------|--------|---------|------|------|---|------|------|--------|---------|--------|---------|------------------------------|-----------|-----------|
| 1                          | 1   | 1    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 1    | 0      | 0       | 0      | 1       | Phil.                        | Ja        | Ja        |
| 2                          | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 1    | 0 | 0    | 1    | 0      | 0       | 0      | 0       | Phil./<br>Beni.              | Ja        | Ja        |
| 3                          | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 1    | 0      | 0       | 0      | 0       | Phil.                        | Ja        | Ja        |
| 4                          | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                           | Ja        | Ja        |
| 5                          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                           | Nein      | Ja        |
| 6                          | 1   | 0    | 0      | 0       | 1    | 1    | 1 | 0    | 0    | 1      | 1       | 1      | 1       | Kombi 2                      | Ja        | Ja        |
| 7                          | 1   | 1    | 0      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                           | Ja        | Ja        |
| 8                          | 1   | 1    | 0      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                           | Ja        | Ja        |
| 9                          | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                           | Nein      | Ja        |
| 10                         | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 1       | Phil.                        | Ja        | Ja        |
| 11                         | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.            | Ja        | Ja        |
| 12                         | 1   | 0    | 1      | 1       | 0    | 1    | 1 | 0    | 1    | 0      | 1       | 1      | 1       | Kombi 1/<br>Phil./<br>Beni.  | Ja        | Ja        |
| 13                         | 1   | 1    | 1      | 1       | 0    | 1    | 0 | 0    | 1    | 0      | 1       | 1      | 1       | Phil./<br>Beni.              | Ja        | Ja        |
| 14                         | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 1    | 0      | 0       | 1      | 0       | Phil.                        | Ja        | Ja        |
| 15                         | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 0       | --                           | Nein      | Ja        |
| 16                         | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 1      | 0       | Kombi 1/<br>Phil.            | Ja        | Ja        |
| 17                         | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 1    | 1 | 1    | 1    | 1      | 0       | 1      | 1       | Kombi 1/<br>Phil./<br>Beni./ | Ja        | Ja        |
| 18                         | 1   | 0    | 0      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                           | Nein      | Ja        |
| 19                         | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 1    | 0 | 0    | 1    | 1      | 0       | 1      | 1       | Phil./<br>Beni.              | Ja        | Ja        |
| 20                         | 1   | 0    | 1      | 0       | 0    | 0    | 0 | 0    | 0    | 0      | 0       | 0      | 0       | --                           | Ja        | Ja        |
| <b>Positives Ergebnis:</b> |     |      |        |         |      |      |   |      |      |        |         |        |         | <b>12</b>                    | <b>16</b> | <b>20</b> |



In der Typisierung konnte Probe 6 durch positives Signal (1) am pAb und mAb 10/7, 20/1, 3, 30/1-I/-II und 84/2-I/-II eindeutig der Kombination 2 zugeordnet werden. Probe 1, 3, 10 und 14 konnten zudem durch ihre, wenn auch untereinander variierende Codierung der Subgruppe Philadelphia zugeordnet werden. Hier zeigte sich erneut, dass eine vollständige Erfüllung der Codierung nicht ausschlaggebend für eine Typisierung war. Probe 2, 13 und 19 zeigten durch ihre Codierung über positive Signale (1) an den Fängerantikörpern der Pontiac-Gruppe und auch weiteren, für diese beiden Subgruppen typischen Fängerantikörper, wie beispielsweise mAb 20/1 (Benidorm) oder auch mAb 30/4 und 84/2-II (Philadelphia) die Anwesenheit von Subgruppe Philadelphia und auch Benidorm. Bei den Proben 11 und 16 zeigte sich positives Signal (1) an den Fängerantikörpern pAb, mAb 48/3-I und 84/2-I, wodurch hier eine Gruppentypisierung von Kombination 1 und Subgruppe Philadelphia erfolgen konnte. In den Proben 17 und 12 konnte die Codierung einer Mischung der Kombination 1, Philadelphia und auch Benidorm zugeordnet werden. Aufgrund der Beschaffenheit realer Proben ist ein Vorhandensein aller typisierten Subgruppen hier auch durchaus möglich. Es konnten somit 12 der 20 Proben (60 %) typisiert oder über Gruppentypisierung zugeordnet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den realen Wasserproben somit bei jeder gemessenen Probe (n = 28) erfolgreich die Sg 1 durch den pAb zugewiesen werden konnte. Zudem konnte bei 22 der insgesamt 28 Wasserproben (79 %) eine Aussage zur Zugehörigkeit zur Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe gemacht werden. Eine Typisierung zu einer Subgruppe ist in realen Wasserproben schwierig, da häufig mehrere Subgruppen oder Serogruppen in einer Probe vorzufinden sind und die Proben nicht einer Subgruppe alleine zuzuordnen sind. Aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen in den Proben, die im Voraus nicht bestimmt wurden, werden teilweise auch nicht alle AK belegt und geben positives Signal ab, was eine vollständige Typisierung zusätzlich erschwert. Dennoch konnten 71 % der Proben (n = 28) einer einzelnen Subgruppe oder einer Gruppe von Subgruppen zugeordnet werden.

#### **3.3.10.5 Non-Sg 1- und Non-*pneumophila*-Proben**

Des Weiteren ist bei der Verwendung des LegioTyper-Panels wichtig, dass Proben, welche nicht zu *L. pneumophila* Sg 1 gehören, kein falsch-positives Signal geben. Hier wurden exemplarisch *L. pneumophila* Sg 6, Stamm Chicago 2, *L. pneumophila* Sg 12,

Stamm 570-CO-H als Vertreter außerhalb der Sg 1 und *L. longbeachae*, *L. bozemanii* und *L. anisa* als Vertreter der *non-pneumophila*-Spezies alle in der Konzentration  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup> verwendet. Kein falsch-positives Signal wurde angezeigt. Die CL-Signalintensitäten lagen unterhalb des Schwellwertes (0) und waren somit negativ. Die Fängerantikörper binden somit ausschließlich *L. pneumophila* Sg 1.

### 3.3.11 Fazit

Im Verlaufe dieses Kapitels wurde eine neue Version des CL-SMIA etabliert. Hierbei wurde der etablierte Glas-Mikroarray durch einen von Jonas Bemetz neu entwickelten Polycarbonat-Mikroarray [212] ausgetauscht. Zudem wurde die optimierte Weiterentwicklung des MCR 3, der MCR-R, hier verwendet. Bei Übertragung des Messprogrammes konnten auftretende Schwierigkeiten, wie z.B. Blasen- und Schlierenbildung, durch Optimierung des Messprogrammes behoben werden. Die Mikroarray-Chips wurden durch automatisiertes Füllen am MCR-R geblockt und für die Lagerung befüllt. Die beiden Mikroarray-Oberflächen Glas und Polycarbonat wurden nach Optimierung der Durchführung des CL-SMIA in einer vergleichenden Testreihe direkt miteinander verglichen und wiesen die Polycarbonat-Oberfläche als geeignete Alternative aus. Beim Vergleich mehrerer Lagerflüssigkeiten zeigte sich 0,125 M Sorbitol mit Zugabe von 0,01 % NaN<sub>3</sub> in PBS bei einer Lagerung über 6 Monate bei 4 °C als am besten geeignet.

Des Weiteren wurde der CL-SMIA mit der Aufkonzentrierung über MAF-DEAE kombiniert und das Ausgangsvolumen auf 1 L reduziert. Hierbei zeigte sich eine Verschiebung der Messwerte in einen niedrigeren und somit sensitiveren Bereich. Die Daten von Wunderlich et al. [206] ließen jedoch darauf schließen, dass die MAF-OH aus 10 L Ausgangsvolumen in der Kombination mit dem CL-SMIA hier besser geeignet scheint.

Zur Etablierung des LegioTyper-Panels wurden die Konzentrationen aller Fängerantikörper der Sg 1 in verschiedenen Konzentrationen gespottet und mit sämtlichen Subgruppen der Sg 1 vermessen. Durch Abgleich der Messungen wurde für jeden Fängerantikörper eine geeignete Konzentration für die Typisierung der einzelnen Subgruppen in einer Messung eingestellt. Somit konnte ein LegioTyper-Panel etabliert werden, welches mit Probenotypen getestet und optimiert wurde.

Diese Testreihen zeigten, dass die Entwicklung des LegioTyper-Panels durchaus erfolgreich war. Die Typisierung laut angepassten Panel-Pfaden ist bei hohen Legionellen-Konzentrationen in den Proben positiv, kann demnach nach Kultivierung erfolgreich durchgeführt werden. Dies ist auch in der klinischen Diagnostik oder im Ausbruchsgeschehen bei der Typisierung über ELISA häufig der Fall, da hier gerade bei klinischen Proben ein besseres Ergebnis nach Kultur erzielt wird. In Tabelle 26 sind alle Ergebnisse der Anwendungsmessungen für das LegioTyper-Panel Sg 1 noch einmal zusammenfassend aufgeführt.

**Tabelle 26: Zusammenfassung der Messergebnisse für den LegioTyper-Chip in der Anwendung mit realen Proben.**

| Probenart                                   | Kultur          | LPS-Antigene    | Wasserproben    | Patientenurine  |
|---------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Typisierung (Panel oder Kombi 1 / 2)</b> | 18 / 18 (100 %) | 27 / 34 (79 %)  | 20 / 28 (71 %)  | 8 / 34 (24 %)   |
| <b>Pontiac- / Non-Pontiac</b>               | 18 / 18 (100 %) | 29 / 34 (85 %)  | 22 / 28 (79 %)  | 15 / 34 (44 %)  |
| <b>Sg 1</b>                                 | 18 / 18 (100 %) | 34 / 34 (100 %) | 28 / 28 (100 %) | 34 / 34 (100 %) |

Bei den Kulturproben konnten daher auch 100 % aller Proben erfolgreich typisiert werden. Bei diesen und auch bei den freien LPS-Antigenen fiel auf, dass nicht immer eine vollständige Erfüllung des Panel-Pfades für eine Typisierung notwendig ist. Hier konnte beispielsweise die Subgruppe Benidorm aufgrund positiver Signale an den mAbs 81/2, 48/3-I für Pontiac-Gruppe und mAb 20/1 zugeordnet werden. MAb 20/1 bindet in der Pontiac-Gruppe spezifisch nur Benidorm. Durch dieses Alleinstellungsmerkmal konnte diese Subgruppe ohne positives Signal an allen im Panel dargestellten Fängerantikörpern zugewiesen werden. Dies macht deutlich, dass die Menge an Fängerantikörpern auf diesem Multiplex-Format für eine erfolgreiche Typisierung wichtig ist. Dadurch können evtl. auch Proben typisiert werden, welche nicht die notwendig hohe Konzentration zur Belegung aller Fängerantikörper haben. Zudem konnten aufgrund der Codierung bei den freien Antigenen teilweise Gruppen von Subgruppen und Kombination 1 / 2 typisiert werden. Die Gruppentypisierung erlaubt zwar keine definierte Zuordnung zu einem Panel-Pfad, jedoch ist hier für das Ausbruchsgeschehen ein großer Mehrwert zu finden. Beim schnellen Abgleich von Umwelt- und Patientenurinproben kann auch eine Gruppenbestimmung einer Wasserprobe zum Ausschluss von dieser als mögliche Ausbruchsquelle dienen. Sie ist somit eine wichtige Aussage. Wenn eine getestete Wasserprobe beispielsweise in

der Gruppentypisierung als Kombination 1 und Subgruppe Philadelphia bestimmt wird und die Patientenprobe weist die Subgruppe OLDA (Teil der Kombination 2) auf, so müsste diese Wasserprobe als mögliche Ausbruchsquelle nicht weitergehend in Betracht gezogen und untersucht werden. Unter Berücksichtigung der Gruppentypisierung konnten somit 79 % der Antigenproben ( $n = 34$ ) typisiert werden.

Bei realen Wasserproben war in 71 % der Fälle eine (Gruppen-) Typisierung möglich. Wasserproben weisen jedoch die Besonderheit auf, dass im Gegensatz zu im Labor hergestellten Kulturproben oder klinischen Proben wirklich eine oder auch mehrere Subgruppen, Serogruppen oder Spezies in einer einzelnen Probe vorhanden sein können. Daher geben die Gruppentypisierungen hier eine Mischung der möglichen beinhalteten Subgruppen an. Bei den Patientenerurinen war eine Typisierung häufig schwierig und war nur bei einer von vier Proben ( $n = 34$ ) möglich. Die LPS-Menge im Urin erlaubte bei vielen Proben keine vollständige Typisierung. Bei einer Erhöhung der Antikörper auf dem Chip, um evtl. mehr LPS-Strukturen binden zu können, müsste eine Neueinstellung des Panels für Urine erfolgen und die Panel-Pfade für Urine neu definiert werden. Dadurch würde zwar eventuell die Sensitivität für Urinproben gesteigert werden, jedoch könnten nicht mehr alle Probenarten mit demselben Mikroarray-Chip vermessen werden, was aktuell ein Vorteil dieser Methode darstellt. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Typisierungsleistung hier wäre eine Optimierung der Aufkonzentrierung der Urine. Wie bereits in Kapitel 3.3.10.3 erwähnt, ist jedoch auch in der Typisierung über indirekten ELISA eine Zuordnung gemäß Dresden-Panel bei Urinproben nicht in allen Fällen möglich. Auch hier müssen klinische Proben teilweise zuvor kultiviert werden, um eine geeignete LPS-Konzentration für die Typisierung zu erreichen. Nach Kultivierung wäre aber auch die Typisierung über das LegioTyper-Panel möglich.

Eine Zuordnung zur Pontiac- bzw. Non-Pontiac-Gruppe konnte in vielen Fällen erfolgen. Durch positives Signal an den Fängerantikörpern mAb 81/2 oder 48/3-I wurden Proben der Pontiac-Gruppe zugewiesen, durch positives Signal an mAb 10/7 oder 30/1-I der Non-Pontiac-Gruppe. So konnten alle Kulturproben (100 %,  $n = 18$ ) und durchschnittlich 85 % ( $n = 34$ ) der aufgestockten freien LPS-Proben zugeordnet werden. Auch in den realen Wasserproben konnte bei 22 der 28 gemessenen Proben, also in 79 % der Fälle, eine solche Zuordnung gemacht werden. Bei den realen Patientenerurinen konnten durchschnittlich 44 % der Proben ( $n = 34$ ) in Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe eingeteilt werden.

Das etablierte LegioTyper-Panel für Sg 1 kann zudem verwendet werden, um eine Schnelleinordnung zur Sg 1 zu machen. Hier konnten 100 % aller gemessenen Proben (n = 114) zugeordnet werden. Durch positives Signal am pAb, welcher sehr sensitiv ist, wurden die Proben der Sg 1 zugewiesen. Möglich wäre hier demnach auch ein schneller, sehr sensitiver Messchip, welcher einzig für die Detektion der Sg 1 verwendet wird. Auch mit den kommerziell erhältlichen Schnelltests (Agglutinationstest, Urintests) erfolgt zum momentanen Zeitpunkt eine allgemeine Zuordnung zur Sg 1. Diese Aussage könnte dieser „minimierte“ Messchip in selber Weise treffen. Die Verwendung aller LegioTyper-Fängerantikörper im Multiplex hätte jedoch den Vorteil, dass in gleicher Messzeit in nur einer Messung zusätzlich in durchschnittlich 77 % der Messungen eine Einteilung in Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe gemacht werden, die mit den Schnelltests nicht möglich ist. Eine Messung mit dem LegioTyper-Chip bringt für Patientenurin-Proben in 44 % der Fälle eine zusätzliche Information. Bei Messungen mit realen Wasserproben gelingt die Zuordnung zur Pontiac / Non-Pontiac-Gruppe in vier von fünf Messungen, was hier einen klaren Vorteil gegenüber den Schnelltests bedeutet, da man in gleicher Messzeit die Chance auf detailliertere Aussagen hat.

Im Falle von Kultur-, Antigen und Wasserproben konnte in durchschnittlich 83 % aller Messungen zudem eine Einteilung zu einer Sg 1 Subgruppe oder Kombination oder auch einer Gruppenbestimmung stattfinden. Das Panel ist somit aussagekräftiger, als die meisten gängigen Schnelltests, wie z.B. Lateral Flow Tests, bei vergleichbarer Dauer (hier: 34 min / Messung). Zudem ist die Typisierung nach Kultivierung der Proben über die angepassten Panel-Pfade möglich, vergleichbar mit der Typisierung über ELISA. Ein weiterer großer Vorteil gegenüber vielen gängigen Schnelltests ist hier, dass mit dem hier entwickelten Schnelltest alle verwendeten Probenarten auf derselben Plattform und den gleichen Mikroarray-Chips gemessen werden können. Die Probenarten sind somit direkt miteinander vergleichbar.

### 3.4 Vergleich der Methoden

Die in dieser Doktorarbeit erarbeiteten Methoden haRPA und CL-SMIA sind komplimentäre Methoden. Der CL-SMIA ist eine AK-basierte Methode aus dem Bereich der Immunologie. Sie dient dazu, das LPS in der Probe zu detektieren, unabhängig davon, ob freies oder zellgebundenes LPS vorhanden ist. Die AK-basierten Methoden dienen meist dem Screening, also dem schnellen Abgleich vieler Proben auf bloßes Vorhandensein eines Analyten in der Probe. Der CL-SMIA erfasst bei Patientenurin-Proben beispielsweise das LPS im Urin. Eine Quantifizierung mit AK-basierten Methoden ist oft schwierig, da der Arbeitsbereich dieser Methoden häufig keinen breiten Bereich abdeckt. Bei infizierten Patienten ist jedoch die diagnostische Abklärung vorrangig und die Art der Infektionsquelle von Interesse. Diese Fragestellung kann mit der hier entwickelten Methode über den LegioTyper-Chip beantwortet werden. Eine Aussage über die Zugehörigkeit zu *L. pneumophila* Sg 1 und somit zur pathogensten Serogruppe dieser Spezies war in allen getesteten Proben möglich. Damit ist der Schnelltest, der innerhalb von 34 min durchgeführt werden kann, mit den bisher kommerziell erhältlichen Urintests, vergleichbar. Diese werden zur Schnellabklärung in der Diagnostik verwendet und detektieren *L. pneumophila* Sg 1. Mit dem CL-SMIA sind hier zudem in vielen Messungen Aussagen über die Zugehörigkeit zur Pontiac- / Non-Pontiac-Gruppe möglich. Doch der entwickelte Schnelltest findet nicht nur in der Diagnostik bei der Vermessung von Patientenurinen Anwendung. Er kann in gleicher Weise auch für Wasser- und Umweltproben eingesetzt werden. So können mit demselben Chip und auf derselben Plattform Umweltproben und Patientenproben vermessen werden. Auch eine Vermessung von Kulturproben ist möglich. Die Ergebnisse können direkt untereinander verglichen werden.

Wie zuvor erwähnt ist das Screening nur zum schnellen Abgleich und der Ermittlung des Analyten geeignet. Gerade in Wasserproben muss jedoch häufig geklärt werden, wie viel des Analyten sich in Proben befindet. So erfordern die 42. BImSchV und auch die Trinkwasserverordnung eine Quantifizierung der Legionellen in Wasserproben. Auch für Gutachten bezüglich möglichen Sanierungsmaßnahmen muss nicht nur das Vorhandensein der Legionellen, sondern auch die Konzentration der bestimmten Kontamination geklärt werden. Für die Quantifizierung der Legionellen in Kultur- und Wasserproben wird meist ein Nukleinsäureamplifikationstest gemacht. Gebräuchlich

sind hier beispielsweise qPCRs. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Quantifizierung mit einer isothermen Nukleinsäureamplifikation durchgeführt. Arbeitsbereich und auch Detektionslimit waren dabei mit der qPCR vergleichbar. Zudem kann die hier verwendete haRPA mit Aufkonzentrierungsmethoden kombiniert werden, was für Umwelt- und Wasserproben zwingend notwendig ist. Ergänzend wurde durch Vorbehandlung mit PMA die v-haRPA etabliert. Mit Hilfe dieser ergänzenden Messung kann nach Quantifizierung der Gesamtmenge an Legionellen der Anteil lebender bzw. lebensfähiger Legionellen ermittelt werden.

Die beiden hier etablierten Methoden sind für vollkommen unterschiedliche Bereiche geeignet und werden in der Legionellenanalytik getrennt voneinander benötigt. Der CL-SMIA erfüllt gerade im Falle einer Legionellenexposition die Anforderung, eine schnelle Antwort auf die Frage zu finden, ob die Probe Legionellen bzw. LPS enthält und in ihr Sg 1 enthalten ist. Dabei können sowohl Urine als auch Wasserproben getestet und direkt miteinander verglichen werden. Im weiteren Verlauf können mit der haRPA die Legionellen in Wasser- und Umweltproben quantifiziert werden. Im Falle der Legionellenexposition können so beispielsweise Rückkühlwerke und Kühltürme beprobt und die Menge an *Leginella* spp. und *L. pneumophila* ermittelt werden. Mittels der v-haRPA kann zudem die Menge der lebenden Legionellen und somit der Beweis einer erfolgreichen Dekontamination erbracht werden. Beide Quantifizierungsmethoden sind somit auch für reguläre Beprobung nützlich. Die hier etablierten Methoden unterscheiden somit sehr im Zweck der Anwendung und auch ihren Aussagen. Für die erfolgreiche Legionellenanalytik ergänzen sich die Methoden jedoch in ihren Aussagen für eine umfassende analytische Bewertung.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Doktorarbeit war die Entwicklung durchflussbasierter Mikroarrays für die Quantifizierung, Lebend/tot-Differenzierung und Serotypisierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* Sg 1 - 15.

Für die Quantifizierung wurden in einer vorangegangenen Masterarbeit zwei Primer-Paare für die Anwendung in der haRPA etabliert. Diese dienen zur Detektion und Quantifizierung von *Legionella* spp. und auch *L. pneumophila*. Die Primerpaare detektieren hierbei Gensequenzen auf dem *mip*-Gen für die Detektion von *L. pneumophila* und dem *16S rRNA*-Gen für die Detektion von *Legionella* spp.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde primär mit dem Primerpaar für *Legionella* spp. gearbeitet, da auch in der deutschen Trinkwasserverordnung zum jetzigen Zeitpunkt nur eine Quantifizierung von Legionellen im Allgemeinen vorgeschrieben ist. Es wurde eine Kalibrierung unter Verwendung dieses Primerpaares mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Philadelphia 1 durchgeführt, welche auch mit den Referenzmethoden qPCR und FACS angefertigt wurden. Hierbei zeigte sich, dass die haRPA mit einem LOD von 30 KBE mL<sup>-1</sup> hier um ein Vielfaches sensitiver als die FACS-Methode ist (2900 KBE mL<sup>-1</sup>), jedoch nicht so sensitiv wie die qPCR (0,4 KBE mL<sup>-1</sup>). Der Arbeitsbereich ist jedoch bei der haRPA breiter wie bei der qPCR und beginnt in einem niedrigeren Konzentrationsbereich. Die haRPA kann somit für die Quantifizierung von Legionellen in Proben als Alternative angesehen werden.

Die Primerpaare wurden auf mögliche Verwendung in Multiplex-Messungen getestet und es konnte gezeigt werden, dass eine simultane Detektion beider Gensequenzen in Anwesenheit beider Primerpaare in einer Duplexmessung möglich ist. Dabei ist es gelungen, in Anwesenheit von *L. pneumophila* in einer Probe das *16S rRNA*-Gen, als auch das *mip*-Gen zu detektieren. Zudem konnte in Anwesenheit von *Legionella* spp. (genauer: *L. longbeachae*), welche nicht der Spezies *L. pneumophila* angehört, ein Signal nur am Primerpaar für die Detektion des *16S rRNA*-Genes detektiert werden. Dies zeigt, dass kein falsch-positives Signal mit dem Primerpaar für *Legionella* spp. gemessen wird, auch in Anwesenheit beider Primerpaare.

Um die Methode der haRPA auch für die Messung realer Wasserproben zugänglich zu machen, wurde sie in Kombination mit der bereits für Legionellen etablierten MAF-OH / CeUF-Aufkonzentrierung aus 10 L-Initialvolumen getestet. Hierbei konnte bei der



Vermessung von Proben steigender Konzentration ein sigmoider Zusammenhang ermittelt werden. Die Anwendung wurde auch in Kombination mit der MAF-DEAE/ CeUF-Aufkonzentrierung getestet, welche die Filtration bei neutralem pH und aus einem geringeren Initialvolumen von 1 L erlaubt. Auch hier war ein sigmoider Zusammenhang der Proben bei steigender Legionellen-Konzentration sichtbar. Im Vergleich der Proben mit und ohne vorherige Aufkonzentrierung konnte eine Verschiebung der Sensitivität um etwa 4-Log-Stufen beobachtet werden, der LOD konnte von 32 KBE mL<sup>-1</sup> auf  $2,7 \times 10^{-3}$  KBE mL<sup>-1</sup> gesenkt werden. Zudem konnte eine Prozesswasserprobe erfolgreich vermessen werden. In Kombination mit der Aufkonzentrierung läge die Detektionsgrenze der haRPA somit unterhalb des technischen Maßnahmenwertes von 100 KBE pro 100 mL der Trinkwasserverordnung in Deutschland und könnte als alternative Quantifizierungsmethode dienen.

Für die dauerhafte Anwendung der haRPA mit realen Wasserproben müsste diese in der Kombination mit der MAF-DEAE erneut kalibriert und die Wiederfindung bestimmt werden. Für eine simultane Detektion und auch Quantifizierung von *L. pneumophila* und *Legionella* spp. wäre eine Anpassung der Primerkonzentrationen im Duplex notwendig. Es konnte in der Doktorarbeit gezeigt werden, dass eine generelle Detektion beider Gene in Anwesenheit beider Primerpaare in Form eines Screenings möglich ist. Für die Quantifizierung der Legionellen in der Probe wäre eine Feinjustage der Primerkonzentrationen jedoch noch notwendig. In der Trinkwasser-Verordnung ist zum jetzigen Zeitpunkt nur eine allgemeine Quantifizierung der Legionellen erforderlich und auch die 42. BImSchV fordert hier nur die Zählung von *Legionella* spp. Mit Hilfe der Multiplex-Quantifizierung wäre es jedoch künftig möglich, in gleicher Zeit und mit Hilfe nur einer Messung nicht nur die Gesamtmenge der Legionellen zu zählen, sondern auch die Menge der pathogensten Spezies *L. pneumophila*.

Im Verlaufe der Doktorarbeit wurde die haRPA zudem zur Lebend/tot-Differenzierung verwendet. Hierbei wurden die Proben vor Extraktion mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff PMA behandelt. Dieser interkaliert in freie DNA in der Probe und auch in die DNA nicht mehr lebensfähiger Zellen und verhindert somit die nachfolgende DNA-Amplifikation und Detektion auf dem Mikroarray. Somit wird bei der sogenannten Lebensfähigkeits-haRPA bzw. v-haRPA ausschließlich der Anteil lebensfähiger Zellen erfasst.

Bei der Etablierung dieser Methode wurde ein am Institut entwickeltes Gerät zur Behandlung mit blauem Licht verwendet. Dieses dient zur Aktivierung der Photoreaktion des PMA. Die Verwendung von PMA wurde in Kombination mit der haRPA getestet, wobei eine finale PMA-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  verwendet und ein geeignetes Elutionsvolumen von 100  $\mu\text{L}$  bei der DNA-Extraktion ermittelt wurde. Die Methode wurde als Zusatzmessung zur ursprünglichen haRPA kalibriert. In dieser wird zuerst die Gesamtmenge an Legionellen in der Probe ermittelt und durch Kombination mit der v-haRPA kann mit Hilfe der Kalibrierung der Anteil lebender Legionellen in der jeweiligen Probe ermittelt werden. In Wiederfindungsexperimenten konnte eine mittlere Wiederfindung zwischen 88 und 133 % erreicht werden.

Eine Auftragung der Probenkonzentration in  $\text{GU } \mu\text{L}^{-1}$  an Stelle des prozentualen Anteiles zeigt zudem, dass auch eine Quantifizierung der lebensfähigen Legionellen in einer Probe alleine unter Verwendung der v-haRPA möglich wäre, da die Signalintensitäten der vermessenen Proben bei steigender Konzentration einen sigmoiden Zusammenhang aufweisen. Zur Quantifizierung direkt aus der Probe ohne vorherige haRPA sollte diese Methode jedoch künftig mit der Aufkonzentrierung über MAF-DEAE kombiniert werden. Zudem müsste eine erneute Kalibrierung in Triplikaten zu Verwendung der v-haRPA als alleinige Messung unabhängig von der haRPA durchgeführt werden.

Die Serotypisierung, welche im Rahmen dieser Doktorarbeit und des LegioTyper-Projektes entwickelt wurde, dient zur künftigen Anwendung im Falle von Legionellenexpositionen. Sie soll einen Schnellabgleich darstellen, mit dem Wasser- und Urinproben direkt miteinander verglichen werden können. Hierbei wurde zu Beginn ein Fängerantikörper-Panel aus 19 monoklonalen und einem polyklonalen AK für die Verwendung in einem CL-SMIA zur Serotypisierung von *L. pneumophila* Sg 1 – 15 erstellt. Für den hier verwendeten CL-SMIA wurde im Projektrahmen von Glas-Mikroarrays auf Polycarbonat-Mikroarrays umgestellt. Die Oberfläche des Mikroarray-Chips wurde von Jonas Bemetz entwickelt. Zudem wurde ein neu entwickeltes Auslesegerät (MCR-R) verwendet, welches eine Weiterentwicklung des MCR 3 darstellt.

In dieser Doktorarbeit wurde zuerst die Polycarbonat-Oberfläche zur Anwendung des CL-SMIA auf dem MCR-R optimiert. Hierbei wurde das Messprogramm dem neuen Gerät angepasst. Durch Optimierung des Programmes konnte Blasenbildung und

Schmierformung verhindert werden. Durch die Entwicklung eines zusätzlichen automatisierten Füllprogrammes konnte die neu etablierte Herstellung des Polycarbonat-Mikroarrays für die Verwendung hier angepasst werden.

Um beide Mikroarray-Oberflächen direkt vergleichen zu können, wurde eine vergleichende Kalibrierung mit beiden Oberflächen durchgeführt. Hierbei wurde der für Subgruppe Bellingham spezifische mAb 10/6 als Fängerantikörper immobilisiert und der CL-SMIA mit *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham 1 durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Polycarbonat-Oberfläche gegenüber der bisher verwendeten Glas-Oberfläche als Alternative verwenden lässt. Es wurde hierbei bei Verwendung von Polycarbonat eine höhere Nachweisgrenze festgestellt, jedoch zeigten beide Chip-Varianten Anstieg der CL-Intensität bei vergleichbaren Probenkonzentrationen mit geringerer Standardabweichung der Werte bei Verwendung von Polycarbonat-Oberflächen. Ein weiterer Vorteil der Polycarbonat-Mikroarray-Chips war zudem die ökologischere und ökonomischere Herstellungsweise. In der Herstellung der Polycarbonat-Oberfläche wurden wesentlich weniger Chemikalien benötigt, was zudem einen großen Kostenvorteil bedeutet. Des Weiteren wurde in der Herstellung dieser Mikroarray-Chips ein Zeitvorteil von 22 h in der Herstellung gegenüber der Glas-Oberflächen (66 h) gewonnen.

In einer Langzeitstabilitätsmessreihe wurden des Weiteren vier verschiedene Lagersubstanzen bei RT und 4 °C getestet und in unterschiedlichen Abständen über sechs Monate vermessen. Eine Lagerung bei 4 °C schien hier optimal und 0,125 M Sorbitol mit Zugabe von 0,01 % NaN<sub>3</sub> in PBS als Füll- und Lagersubstanzen am besten geeignet.

In vorangegangenen Arbeiten wurde der CL-SMIA auf Glas-Oberflächen und mit dem MCR 3 bereits mit einer Aufkonzentrierung mittels MAF-OH und CeUF bei pH 3 aus 10 L Initialvolumen kombiniert. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde der CL-SMIA auf Polycarbonat und dem MCR-R mit der MAF-DEAE und CeUF kombiniert. Dies ermöglicht sowohl eine Aufkonzentrierung bei pH 7 als auch eine Verringerung des Initialvolumens auf 1 L. Die Messreihe mit vorgeschalteter Aufkonzentrierung zeigt eine Verbesserung der Sensitivität, jedoch zeigte sich die Aufkonzentrierung mit der MAF-OH für den CL-SMIA als noch effektiver (s. Wunderlich et al. [206]).

Ein Ziel der Doktorarbeit war auch die Etablierung eines Fängerantikörper-Panels für die Serotypisierung von *L. pneumophila* Sg 1 – 15. Im Verlaufe der Doktorarbeit wurde

durch die Projektpartner an der TUD festgestellt, dass der verwendete Detektionsantikörper lediglich die Subgruppen der Sg 1 adäquat detektiert, nicht jedoch Sg 2 – 15. Zur weiteren Verwendung aller monoklonalen Fängerantikörper in einem vollständigen Panel wurde ein zweiter Detektionsantikörper für Sg 2 – 15 gesucht und dafür der Fängerantikörper mAb 32/3 zur Verwendung als Detektionsantikörper biotinyliert. In weiterführenden Messreihen wurden beide Detektionsantikörper gepoolt und der biotinylierte mAb 32/3 aufgrund erhöhter Hintergrundsignale als geeigneter Detektionsantikörper in einer Mischung ausgeschlossen. An dieser Stelle der Doktorarbeit wurde das Panel für die Subgruppen der Sg 1 von dem Panel für Sg 2 – 15 getrennt, um die Sensitivität des Detektionsantikörpers für Sg 1 zu erhalten.

Die Konzentrationseinstellungen für den Detektionsantikörper mAb 32/3 und die Fängerantikörper für das Panel für Sg 2 - 15 wurden im Rahmen des LegioTyper-Projektes durchgeführt, sind jedoch in der Doktorarbeit nicht aufgeführt, da keine Serotypisierung der einzelnen Serogruppen realisiert werden konnte. Zum jetzigen Zeitpunkt ist hier eine Gruppenbestimmung der Sg 2 – 15 möglich.

Die zentrale Aufgabe der Doktorarbeit war die Einstellung der Fängerantikörperkonzentrationen für die Etablierung des Sg 1-Panels. Der CL-SMIA ist eine Messung im Durchfluss und nicht statisch wie ein ELISA. Zudem wurde nicht wie zuvor im ELISA mit indirektem Assay mit immobilisiertem Antigen, sondern im Sandwich mit immobilisiertem AK detektiert. Daher mussten die Spezifitäten der Fängerantikörper in Abhängigkeit der Spotting-Konzentration mit Gültigkeit für den CL-SMIA gemessen werden. In einer großen Messreihe wurden neun monoklonale und ein polyklonaler Fängerantikörper in fünf bis sieben Verdünnungsstufen auf den Mikroarray aufgetragen. Anschließend wurden die Mikroarrays mit allen zehn Subgruppen der Sg 1 in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Zudem wurde eine Leerwertmessung mit Reinstwasser vermessen, aus der ein Schwellwert berechnet wurde. Bei der Auswertung wurden die CL-Signalintensitäten mit Hilfe des Maximalsignales der verwendeten CCD-Kamera in normierte, prozentuale Werte überführt und diese weiter in einen quartären Code, abhängig vom normierten Wert, umgewandelt. Die Werte wurden für jeden Fängerantikörper und die einzelnen Verdünnungen, jedoch auch in der Gesamtheit betrachtet, um in der Typisierung alle Subgruppen abdecken zu können. Somit konnte das sogenannte LegioTyper-Panel,

nach Vorbild des Dresden-Panels [113], erstellt werden, bei dem eine Detektion jeder Subgruppe der Sg 1 mittels CL-SMIA erfolgte.

Dieses wurde in der Anwendung mit verschiedenen Probentypen, wie Kultur- und Antigenproben, getestet und optimiert. Des Weiteren wurden auch reale Patientenerine von erkrankten Patienten, unbehandelt und aufkonzentriert, und reale Wasserproben vermessen und das LegioTyper-Panel minimal angepasst. Die Messungen zeigten jedoch eine generelle Anwendbarkeit des LegioTyper-Panels.

In 100 % der aller Messungen (n = 114) konnte die Zugehörigkeit zur Sg 1 eindeutig nachgewiesen werden. Dies können zum jetzigen Zeitpunkt viele kommerzielle Urin- und auch Agglutinationstests. Der Mikroarray-Schnelltest ist hier somit in gleicher Weise anwendbar. Im Gegensatz zu Urintests kann hier jedoch unabhängig von der Probenart gemessen werden. Es können sowohl Urin-, als auch reale Wasserproben aber auch kultivierte Proben mit derselben Methode vermessen und direkt verglichen werden. Ein Vorteil der Methode ist hier die größere Aussagekraft des Schnelltestes, welcher gerade einmal 34 min von der Injektion der Probe bis zum finalen Ergebnis benötigt. So kann in mindestens 44 % der Messungen von Patientenerinen und in vier von fünf Messungen der realen Proben eine Aussage zur Pontiac- oder Non-Pontiac-Gruppen-Zugehörigkeit gemacht werden. Bei LPS-angereicherten Proben war dies in mindestens 85 % der Fälle möglich, bei kultivierten Proben sogar in 100 % aller Messungen.

Zusätzlich zu der Pontiac-Gruppenzuteilung war bei den kultivierten Proben in 100 % der Messungen und auch den angereicherten LPS-Proben in 79 % der Messungen eine Typisierung nach den angepassten Panel-Pfaden möglich. Eine Anwendung zur Unterscheidung der Subgruppen Philadelphia, Benidorm, Heysham und auch Bellingham ist gut durchführbar. Für die Subgruppen Knoxville, Allentown und France der Pontiac-Gruppe (Kombination 1) und die Subgruppen OLDA, Oxford, Heysham und Camperdown der Non-Pontiac-Gruppe (Kombination 2) wurde eine Kombinationsbestimmung etabliert. Des Weiteren wurden Proben, welche nicht eindeutig typisiert werden konnten, häufig in Gruppen typisiert. Hierbei wurden Proben nicht einer definierten Subgruppe zugewiesen, sondern zu zwei oder mehreren. Jedoch ist auch die Typisierung zu zwei möglichen Subgruppen in der Aussage ein Mehrwert gegenüber einer einfachen Zuteilung zu Sg 1. In realen Wasserproben war diese Typisierung zu einer Subgruppe / Kombination oder Gruppentypisierung bei

71 % der Proben möglich. Bei Patientenurinen war die Typisierung bei 24 % der vermessenen Proben möglich. Aufgrund der geringen LPS-Menge in Patientenurinen ist eine Typisierung hier jedoch häufig schwierig. Auch unter Verwendung des indirekten ELISA-Test ist dies aus Urinproben jedoch nicht immer möglich. Eine Typisierung wird hier in vielen Fällen erst nach Kultivierung von beispielsweise respiratorischem Material durchgeführt. Auch mit dem LegioTyper-Panel wäre eine vollständige Typisierung nach Kultivierung der Wasser- oder Patientenproben möglich, da die höheren Konzentrationen zu einer hundertprozentigen Übereinstimmung führten.

Um die Methode künftig im Falle einer Legionellenexposition verwenden zu können, muss in künftigen Projekten ein sogenannter Schwellwert entwickelt werden. Dieser gilt als Grenzwert für die Feststellung eines positiven Signales. Zur Etablierung dieses Wertes ist es notwendig, dass viele negative Proben vermessen werden. So zeigt jede Matrix verschiedene Interaktionen mit den Fängerantikörpern und dem Hintergrund, wie in den Anwendungsmessungen mit den realen Proben gezeigt wurde. Daher ist es notwendig, diese Matrices in großer Menge ohne Legionellen zu vermessen, um die Interaktionen der reinen Matrix zu definieren. Mit Hilfe dieser Schwellwerte können spätere Messsignale als positiv oder negativ für die binäre Codierung bewertet werden. Dies ist für die reale Anwendung der Methode essentiell. Zudem muss die Kombination mit der MAF-DEAE für die künftige Anwendung mit realen Wasserproben erneut getestet werden, um eine zweifelsfreie Eignung der Methode zu belegen.

## 5 Experimentelle Durchführung

### 5.1 Laborausstattung und Verbrauchsgüter

#### 5.1.1 Geräte und Materialien

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

Autoklavierbeutel (0384.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Amicon Ultra-15 Zentrifugenfilter (UFC905024, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)

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

Digitaler Schneideplotter, CE6000-40 (Graphtec Corporation, Yokohama, Japan)

Dispenser-Tip (EH 30.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

DNA LoBind Gefäße 0,5 mL, 1,5 mL (0030108035, 0030108051, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Durchflusszytometer (CyFlow<sup>®</sup> Cube6, Sysmex, Bornbach, Deutschland)

Dosierkapillare, Nozzle (Scienon AG, Hamburg, Deutschland)

Einmalspritzen Inkjet<sup>®</sup>, PP/PS, 1 mL, 5 mL und 25 mL (0056.1, 0057.1, 0058.1, 0059.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Einweg Pasteurpipetten, LDPE (EA61.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Färbeschaleneinsatz, für 20 Objektträger, PP (2291.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Färbeschale, TPX (2290.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop, Gemini (Zeiss, Jena, Deutschland)

Graviergerät mit Diamantstift (Proxxon, Niersbach, Deutschland)

GVPC-Selektiv-Agarplatten (1.46710.0020, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)

Heizofen (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Impföse, 2,5 mm (6173.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Inkjet-Drucker SciFLEXARRAYER S1 (Scienon AG, Berlin, Deutschland)

Kanister 10 L (N369.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Kanister 20 L (N370.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Kanülen: Gr. 1, G 20 x 1 1/2" / ø 0,90 x 40 mm, gelb; Gr. 2, G 21 x 1 1/2" / ø 0,80 x 40 mm, grün (Sterican®, bbraun, Melsungen, Deutschland)

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

Klebevorrichtung zur Fertigstellung der Mikroarray-Durchflusszellen (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, München, Deutschland)

Klimakammer HCP 108L (Memmert, Büchenbach, Deutschland)

Kolonienzähler colony counter SC6+ (Stuart, Staffordshire, Großbritannien)

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

Kunststoffträger, POM, schwarz (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, München, Deutschland)

Laserzuschnitt, Zweikanal-Struktur (Marbach Stanzformtechnik, Heilbronn, Deutschland)

Laserzuschnitt, Einkanal-Struktur (Marbach Stanzformtechnik, Heilbronn, Deutschland)

LightCycler480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)

LightCycler Multiwell plate 96 (0472969001, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

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

Marprene Schlauch, ID 6,4 mm (9020064016, Watson Marlow, Cornwall, Großbritannien)

MCR 3 (gwk Präzisionstechnik, München, Deutschland)

MCR-R (gwk Präzisionstechnik, München, Deutschland)

Mikrotiterplatten SciSOURCEPLATE-384-PP (1 CPG-5502, Scienion AG, Berlin, Deutschland)



Mikrotiterplatte, CELLSTAR™ 384 Well PS Cell Culture Microplates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)

Meßpipetten 0,5 - 10 µL, 0 - 100 µL, 100 - 1000 µL, 1 - 5 mL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

PCR-Reaktionsgefäße Multi®-Ultra, 0,2 mL (H560.1, Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland)

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

Petrischalen, Glas (0690.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Petrischalen, PS (N221.2, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

PhASTBlue (GenIUL, Barcelona, Spanien)

pH-Meter Multi 340i (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland)

Polycarbonat-Platten (Modulor, Berlin, Deutschland)

Precision Dispenser Tips, 50 mL (EH38.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

PTFE-Adapter (EH 30.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

PTFE-Siebboden, (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, München, Deutschland)

Pumpdrive 5206 Peristaltikpumpe (Heidolph, Schwabach, Deutschland)

Peristaltikpumpe (Watson Marlow - Sci, Rommerskirchen, Deutschland)

Reaktionsgefäße (Eppendorff, Hamburg, Deutschland)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Bedford, MA, USA)

Rollrandgläser, 5 mL, 10 mL, 25 mL, (X654.1, X655.1, X659.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Rotationsverdampfer, Rotavapor RE 121 (Büchi Labortechnik, Flawil, Schweiz)

Rotilabo-Mini-Zentrifuge "Uni-fuge" (CX73.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Rotilabo®-sealing films (EN82.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Schraubdeckeldose, steril, 120 mL (CEP3.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Schraubdeckeldosen, steril (EA79.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Silikonschlauch Tygon R3607 (Ismatec, Wertheim, Deutschland)

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

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

Siebdrucker, HDT150 (Siebdruckversand, Magdeburg, Deutschland)

Spatel, T-Form, PS (VWR, Ismaning, Deutschland)

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

Standard-Objektträger, Kalk-Natron-Glas, geschnitten, 26 x 76 x 1 mm, +/- 0,1 mm (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Sterile Einwegbecher (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Thermomixer® C (Eppendorff, Hamburg, Deutschland)

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

Ultraschallbad Sonorex RK510S (Bandelin, Berlin, Deutschland)

Vivaspin 20 centrifugal concentrator MWCO 50 kDa (Z614645-12EA, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland)

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

Waage Kern 440-49N (Kern, Balingen, Deutschland)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland)

Waage Mettler PM 4600 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland)

Zentrifuge 5804 R (Eppendorff, Hamburg, Deutschland)

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

Zentrifugenröhrchen, PP, 15 mL und 50 mL (AN77.1, AN79.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

### **5.1.2 Software**

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

ChemDraw Professional 15.0 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA)

EndNote X9 (Thomson Reuters, New York City, NY, USA)

FCS Express 5 Flow Cytometry – RUO (De Novo Software (USA))

Image J 1.49 (Rasband, NIH, Bethesda, USA)

MCRImageAnalyzer (gwk Präzisionstechnik, München, Deutschland)

Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Microsoft Office 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Microsoft Photo Editor 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Microsoft Power Point (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Microsoft Word 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)

Origin 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA)

### 5.1.3 Chemikalien und Reagenzien

#### 5.1.3.1 Chemikalien

1,4 Dioxan, puriss. (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (E6383, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES (H3375, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

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

(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane,  $\geq 98\%$  (440167, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

4-(Dimethylamino)-pyridin, DMAP,  $\geq 99\%$  (522805, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Aceton,  $\geq 99.5\%$  (5025.5, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Agar-Agar (4508.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Agarose NEEO Ultra-Qualität (2267.2, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Bernsteinsäureanhydrid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Bortrifluoriddiethaetherat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

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

Cleaning Solution CUBE (Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Deutschland)

Decontamination Solution CUBE (Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Deutschland)

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

Dimethylaminopyridin (39405-10G, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

D-(+)-Trehalose dihydrate,  $\geq 99\%$  (T9531, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

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

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

Glycin (G8898, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Hellmanex (320.000, Hellma GmbH, Mühlheim, Deutschland)

Isopropanol (6752.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Kaliumchlorid (P017.2, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat (P5655, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Kaliumhydrogenphosphat (04248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

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

Methyl-tert-butylether,  $\geq 99,5\%$  (20249, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

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

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (E6383, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

N, N'-Disuccinimidylcarbonat  $\geq 95,0\%$  (A43720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz,  $\geq 98\%$  (56485, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumazid (S8032, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland)

Natriumchlorid (71381, Fluka, Buchs, Schweiz)

Natriumhydrogenphosphat (T876.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Natriumhydroxid (6771.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Natriumhypochlorit (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

O,O'-Bis(2-aminopropyl) polypropylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropylene glycol, JEFFAMINE® ED-2003 (Jeffamine, Huntsman, USA)

Pluronic F127 (P2443, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland)

Polyglycerol-3-glycidyl-ether (Polypox R9) (UPPC, Mietingen, Deutschland)

Poly-Streptavidin-HRP, 1 mg mL<sup>-1</sup> (Senova, Germany)

Rinderextraktpulver (B4888, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Rinderserumalbumin (BSA) (A3059, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Salzsäure, 37 % (v/v) (84422, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

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

sciClean 8 (C-5283, Scienion AG, Berlin, Deutschland)

Syto9 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

Streptavidin-HRP, 1 mg mL<sup>-1</sup> (BZL04239, Biozol, Eching, Deutschland)

Toluol, puriss. (244511, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Trehalose-D(+) Dihydrat (5151.4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Triethylamin (471283, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Sigma 7-9® (T1378, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Triton-X 100 (X100, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Tween® 20 (P1379, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Wasser, nukleasefrei (03315932001, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

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

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

### 5.1.3.2 Puffer

Für die Herstellung aller Pufferlösungen wurde UV-behandeltes Reinstwasser verwendet.

Casein-Puffer

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Casein                | 5 g        |
| PBS-Konzentrat (50 x) | 100 mL     |
| Reinstwasser          | ad 1000 mL |

Casein-Puffer mit 0,01 % Pluronic F127

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Casein                | 5 g        |
| Pluronic F127         | 0,1 g      |
| PBS-Konzentrat (50 x) | 100 mL     |
| Reinstwasser          | ad 1000 mL |

HEPES-Puffer (pH 7,0)

|                  |           |
|------------------|-----------|
| NaCl (1,5 M)     | 26,28 g   |
| HEPES (0,05 M)   | 3,57 g    |
| HCl (37 % (v/v)) | ad pH 7,0 |
| Reinstwasser     | ad 300 ml |

PBS-Konzentrat (10x)

|                                          |            |
|------------------------------------------|------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (420 mM) | 73,2 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (60 mM)  | 8,2 g      |
| NaCl (900 mM)                            | 52,6 g     |
| Reinstwasser                             | ad 1000 mL |

PBS-Puffer (1x)

|                      |            |
|----------------------|------------|
| PBS-Konzentrat (10x) | 100 mL     |
| Reinstwasser         | ad 1000 mL |

Rinderextrakt-Puffer (pH 9,5)

|               |           |
|---------------|-----------|
| Glycin        | 11,37 g   |
| Rinderextrakt | 9 g       |
| NaOH (32 %)   | ad pH 9,5 |
| Reinstwasser  | ad 300 mL |

Rinderextrakt-Puffer (pH 3)

|                  |           |
|------------------|-----------|
| Glycin           | 11,37 g   |
| Rinderextrakt    | 9 g       |
| HCl (37 % (v/v)) | ad pH 3   |
| Reinstwasser     | ad 300 mL |

Spottingpuffer (AK-Glas-Mikroarray)

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

TRIS-HCl-Puffer (pH 8,5)

|                  |            |
|------------------|------------|
| TRIS (1 M)       | 121,1 g    |
| NaCl (150 mM)    | 8,8 g      |
| HCl (37 % (v/v)) | ad pH 8,5  |
| Reinstwasser     | ad 1000 mL |

**5.1.4 Antikörper**

Anti-Peroxidase Antikörper, produziert in Hase (P 7899, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Detektionsantikörper (Rabbit Anti-*L. pneumophila* biotinyliert, B65057B, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland)

Fängerantikörper (Rabbit Anti-*L. pneumophila*, aufgereinigt, B65051G, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland)

**Sg 1**

mAb 81/2,  $c = 1,9 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 48/3,  $c = 0,98 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 10/7,  $c = 0,383 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 20/1,  $c = 2,14 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 3,  $c = 1,12 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 10/6,  $c = 1,98 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 30/1,  $c = 0,97 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 30/4,  $c = 1,39 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 84/2,  $c = 4,54 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

### **Sg 2 – 15**

mAb 32/3,  $c = 2,2 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 54/2,  $c = 1,28 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 54/3,  $c = 4,85 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 6/1,  $c = 2,13 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 7/4,  $c = 1,21 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 9/2,  $c = 1,16 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 33/1,  $c = 1,53 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 4/7,  $c = 1,22 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

mAb 41/3,  $c = 0,64 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)



mAb 39/4,  $c = 2,15 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

Detektionsantikörper mAb 32/3 biotinyliert,  $c = 1,53 \text{ mg mL}^{-1}$ , produziert in Maus (Technische Universität Dresden, Konsiliarlabor Legionellen, Dresden, Deutschland)

### 5.1.5 Kits

Tabelle 27: Verwendete Kits mit Verwendungszweck, Hersteller und Bestell-Nummer.

| Name                                 | Zweck                               | Hersteller                              | Bestell-Nr. |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|
| GeneJET PCR Purification Kit         | DNA-Aufreinigung nach homogener RPA | ThermoScientific, Waltham, MA, USA      | K0701       |
| GeneJET Genomic DNA Purification Kit | DNA-Extraktion                      | ThermoScientific, Waltham, MA, USA      | K0721       |
| Viral Xpress Kit                     | DNA-Extraktion                      | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland | 3095        |
| TwistAmp exo                         | RPA                                 | TwistDx, Cambridge, UK                  | TAEXO01KIT  |
| LightCycler® 480 SYBR Green I Master | qPCR                                | Roche, Unterhaching, Deutschland        | 4707516001  |

### 5.1.6 Primer

Tabelle 28: Übersicht über die verwendeten haRPA-Primer-Paare (PP) zur Differenzierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila*. Angegeben ist die Primer-Richtung, Start- und Stop-Position in der DNA-Sequenz, Primerlänge, -sequenz, Amplifikatlänge, GC-Gehalt und Molekulargewicht (MW).

| Primer-Paar                  | Primer-Richtung | Start-Stop | Länge Primer / bp | Sequenz                                         | Länge Amplifikat / bp | GC-Gehalt / % | MW / $\text{g mol}^{-1}$ |
|------------------------------|-----------------|------------|-------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| PP für <i>L. spp.</i>        | FW              | 451-484    | 34                | AGGGTTGA<br>TAGGTAAAG<br>AGCTGATTA<br>ACTGGACG  | 393                   | 44,1          | 10625                    |
|                              | REV             | 843-809    | 35                | CATATAACC<br>AACAGCTAG<br>TTGACATCG<br>TTTACAGC |                       | 40            | 10682                    |
| PP für <i>L. pneumophila</i> | FW              | 117-150    | 34                | TGCCGATTT<br>GGGAAAGAA<br>CTTTAAGAAT<br>CAAGGC  | 109                   | 41,2          | 10538                    |
|                              | REV             | 225-192    | 34                | TTCGGTTA<br>AAGCCAATT<br>GAGCGCCA<br>CTCATAGCG  |                       | 50            | 10426                    |

### 5.1.7 Kulturstämme

Tabelle 29: Verwendete Kulturstämme mit Identifikationsnummer.

| Organismus            | Subspezies         | Kulturstamm    | Identifikationsnummer | Serogruppe |
|-----------------------|--------------------|----------------|-----------------------|------------|
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Philadelphia 1 | ATCC 33152            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Knoxville 1    | ATCC 33153            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | EUL 22         | n.a.                  | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | EUL 23         | n.a.                  | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | L13-435        | n.a.                  | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | L13-438        | n.a.                  | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Heysham 1      | ATCC 43107            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Benidorm 030 E | ATCC 43108            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | OLDA           | ATCC 43109            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | France 5811    | ATCC 43112            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Camperdown 1   | ATCC 43113            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Allentown 1    | ATCC 43106            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Oxford 4032 E  | ATCC 43110            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Bellingham 1   | ATCC 43111            | 1          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Togus 1        | ATCC 33154            | 2          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Bloomington 2  | ATCC 33155            | 3          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>fraseri</i>     | Los Angeles 1  | ATCC 33156            | 4          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Portland 1     | LTC-14                | 4          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Cambridge 2    | NCTC 11417            | 5          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>fraseri</i>     | Dallas 1E      | ATCC 33216            | 5          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Chicago 2      | ATCC 33215            | 6          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Chicago 8      | ATCC 33823            | 7          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Concord 3      | ATCC 35096            | 8          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | IN-23-G1-C2    | ATCC 35289            | 9          |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Leiden-1       | ATCC 43183            | 10         |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | 797-PA-H       | ATCC 43130            | 11         |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | 570-CO-H       | ATCC 43290            | 12         |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | 82A3105        | ATCC 43736            | 13         |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | 1169-MN-H      | ATCC 43703            | 14         |
| <i>L. pneumophila</i> | <i>pneumophila</i> | Lansing 3      | ATCC 35251            | 15         |
| <i>L. longbeachae</i> | <i>longbeachae</i> | Long Beach 4   | ATCC 33462            |            |
| <i>L. bozemanii</i>   | <i>bozemanii</i>   | n.a            | n.a.                  |            |
| <i>L. anisa</i>       | <i>anisa</i>       | n.a            | n.a.                  |            |

## 5.2 Zellkultur

### 5.2.1 Bakterien-Plattenkultur

Legionellen-Plattenkulturen wurden auf GVPC-Selektiv-Agar-Platten kultiviert. Auf die Platten wurden unter sterilen Bedingungen 500 µl Bakteriensuspension bzw. eine Pipettenspitze einer Kryokultur gegeben und mit einer sterilen Öse gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Platten über Kopf liegend bei 36 °C 4 – 10 Tage inkubiert.

### 5.2.2 Herstellung einer Bakterien-Stammsuspension

Zur Herstellung einer Stammsuspension wurde eine Legionellen-Plattenkultur gezüchtet. Mit Hilfe einer Öse wurden der Platte unter sterilen Bedingungen mehrere Kolonien entnommen und in autoklaviertem ultrareinem Wasser gelöst. Die Stammsuspension wurde bei 4 °C gelagert.

### 5.2.3 Quantifizierung einer Bakterien-Stammsuspension

Die Konzentration der Stammsuspension wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt. Zum einen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Hierfür wurde je 1 mL der Suspension mit 5 µL Syto 9 (in 1:10 Verdünnung) angefärbt und 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. 850 µL dieser Lösung wurden anschließend mit dem CyFlow® Cube6 vermessen. Es wurden stets Triplikate vermessen. Des Weiteren wurde die Kulturmethode zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Zur Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe der Stammsuspension in Reinstwasser angefertigt und wie in Kapitel 5.2.2 kultiviert. Nach Inkubation wurden alle Platten ausgezählt und unter Bezugnahme der Verdünnungen die Konzentration der Stammlösung berechnet.

## 5.3 Molekularbiologische Methoden

### 5.3.1 DNA-Extraktion

#### 5.3.1.1 Viral Xpress

Zunächst wurden 200 µL Lyse-Puffer in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß vorgelegt und 150 µL der zu extrahierenden Probe zugegeben. Nach Inkubation (5 min, RT) wurden

der Probe 350  $\mu\text{L}$  2-Propanol zur DNA-Fällung zugefügt, diese abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm) und der Überstand verworfen. Nach der Reinigung mit 400  $\mu\text{L}$  Ethanol (70 %, (v/v)) wurde die Probe für 10 min getrocknet. Anschließend wurde die gereinigte Nukleinsäure in 20  $\mu\text{L}$  ultrareinem Wasser (PCR Reinheit) resuspendiert (30 min, 4 °C).

### 5.3.1.2 GeneJET Genomic DNA Purification Kit

Die DNA-Extraktion mit dem GeneJET Genomic DNA Purification Kit wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die spätere Verwendung der genomischen DNA für die haRPA wurde der Stammsuspension 1 mL entnommen und diese abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm). Nach Verwurf des Überstandes wurde das erhaltene Pellet in 180  $\mu\text{L}$  Aufschlusspuffer (*Digestion Solution*) resuspendiert. Durch Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K (30 min, 56 °C) und 20  $\mu\text{L}$  RNase A (10 min, RT) wurden Proteine und RNA in der Lösung entfernt. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Lysepuffer (*Lysis Solution*) wurde die freiliegende genomische DNA mit 400  $\mu\text{L}$  Ethanol (50 %, v/v) gefällt. Diese wurde in Zentrifugationssäulchen überführt und abzentrifugiert (1 min, 6000 rpm). Die isolierte DNA wurde mit 500  $\mu\text{L}$  1. Waschpuffer (*Wash Buffer I*, 1 min, 8000 rpm) und nachfolgend mit 500  $\mu\text{L}$  2. Waschpuffer (*Wash Buffer II*, 1 min, 14000 rpm) gewaschen und trocken zentrifugiert (3 min, 14000 rpm). Es wurde mit 200  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer (*Elution Buffer*) eluiert (2 min, 8000 rpm) und die genomische DNA bis zu weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die v-haRPA wurden 51,29  $\mu\text{L}$  als Probenansatz verwendet. Die Durchführung der DNA-Extraktion erfolgte analog wie zuvor beschrieben. Eluiert wurde hier mit 100  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer.

### 5.3.2 qPCR

Tabelle 30: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes.

| Reagenz            | Volumen / $\mu\text{L}$ |
|--------------------|-------------------------|
| LightCycler480 Mix | 10                      |
| Rev-Primer         | 0,04                    |
| FW-Primer          | 0,04                    |
| PCR-Wasser         | 8,32                    |
| DNA-Probe          | 1,6                     |

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde hier auf dem LightCycler480® System mit dem LightCycler480® SYBR Green Master I qPCR Kit

durchgeführt. Die Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes entsprach dem Protokoll des Herstellers und ist Tabelle 30 zu entnehmen.

**Tabelle 31: Temperaturprogramm der qPCR.**

| Schritt              | Anzahl an Zyklen | Temperatur / °C | Zeit / s | Aufheizrate / °C s <sup>-1</sup> |
|----------------------|------------------|-----------------|----------|----------------------------------|
| <b>Vorinkubation</b> | 1                | 50              | 120      | 4,8                              |
| <b>Denaturierung</b> | 1                | 95              | 600      | 4,8                              |
| <b>Amplifikation</b> | 50               | 95              | 10       | 4,8                              |
|                      |                  | 57              | 60       | 2,5                              |
|                      |                  | 72              | 15       | 4,8                              |
| <b>Schmelzkurve</b>  | 1                | 95              | 5        | 4,8                              |
|                      |                  | 65              | 60       | 2,5                              |
|                      |                  | 97              | -        | -                                |
| <b>Kühlung</b>       | 1                | 40              | 10       | 2,0                              |

Der LightCycler480 Mix, das nukleasefreie Wasser und die Primer wurden für den kompletten Ansatz zu einem Mastermix vermischt. Je Kavität der LightCycler®-Multiwellplatte wurden 18,4 µL des Mastermixes, sowie 1,6 µL der zu quantifizierenden DNA-Probe vermischt. Zur Verzögerung des Reaktionsstartes wurde mit der 96-well-Mikrotiterplatte auf einem gekühlten Metallblock bei vermindertem Umgebungslicht gearbeitet. Nachfolgend ist das verwendete Temperaturprogramm beschrieben (Tabelle 31).

### Konzentrationsbestimmung extrahierter genomischer DNA

Zur Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten genomischen DNA in GU µL<sup>-1</sup> wurde eine qPCR durchgeführt. Die zur Kalibrierung verwendeten Standards umfassten einen Konzentrationsbereich von 10<sup>1</sup> bis 10<sup>8</sup> GU µL<sup>-1</sup>, welcher in ultrareinem Wasser (PCR-Reinheit) verdünnt wurde. Die verwendeten Primer, (siehe Tabelle 32) wurden dem BMBF-Projekt „PATH<sub>2</sub>OGENSCAN“ entnommen. Über Kalibrierung konnte rechnerisch die Konzentration der genomischen DNA ermittelt werden.

**Tabelle 32: Primersequenzen, welche in der qPCR zur Quantifizierung von Legionellen verwendet wurden.**

| Primer         | Sequenz / 5' → 3'       |
|----------------|-------------------------|
| <b>Leg-FW</b>  | 5'-AAGATTAGCCTGCGTCCGAT |
| <b>Leg-REV</b> | 5'-GCTCTTAACCTATCAACCCT |

## 5.4 Monolithische Adsorptionsfiltration

### 5.4.1 Synthese monolithischer Adsorptionsfilter (MAF)

Die Monolithe wurden hier immer in einem Ansatz von neun Monolithen synthetisiert. Zu Beginn wurde das Porogengemisch von 5,65 mL Toluol und 3,77 mL MTBE in einem 15-mL-Zentrifugenröhrchen bei 29 °C im Heizofen temperiert. Zur direkten Verwendung wurden PTFE-Formen und Monomer zeitgleich temperiert. Zur Herstellung des Initiatorgemisches wurde 1350 µL 1,4-Dioxan auf Eis vorgelegt und 150 µL BF<sub>3</sub> Et<sub>2</sub>O zugegeben. Das Initiatorgemisch wurde vor Benutzung aufgetaut und 5 s gevortext. Pro 15-mL-Zentrifugenröhrchen wurde dem Porogengemisch 150 µL Initiatorgemisch zugefügt und die Mischung 20 s gevortext. Anschließend wurde 2,4 mL Monomer in drei 800 µL-Schritten per Viskositätspipette zugefügt und für 1 min am Vortexer intensiv gemischt. Die Mischung wurde zügig in die temperierte PTFE-Form überführt und mit dem zugehörigen Deckel verschlossen. Zur Polymerisation wurde 45 min bei 29 °C inkubiert und der fertige Monolith anschließend vorsichtig aus der Form gelöst und über Nacht in Methanol eingelegt. Am nächsten Tag wurde der Monolith im Abzug aus dem Methanol herausgenommen und getrocknet. Die Monolithe waren in getrocknetem Zustand in sterilen Probenbechern mindestens vier Wochen lagerbar.

### 5.4.2 Funktionalisierung von MAF-Säulen

Nach der Synthese wurden zur weiteren Verwendung die Epoxygruppen an der Oberfläche funktionalisiert. Hierfür wurden in einem Einweg-Dispenser-Gehäuse je ein PTFE-Siebboden, ein O-Ring, drei getrocknete Monolithe und ein PTFE-Adapter (Abbildung 52) zusammengefügt und diese an eine Peristaltikpumpe angeschlossen.

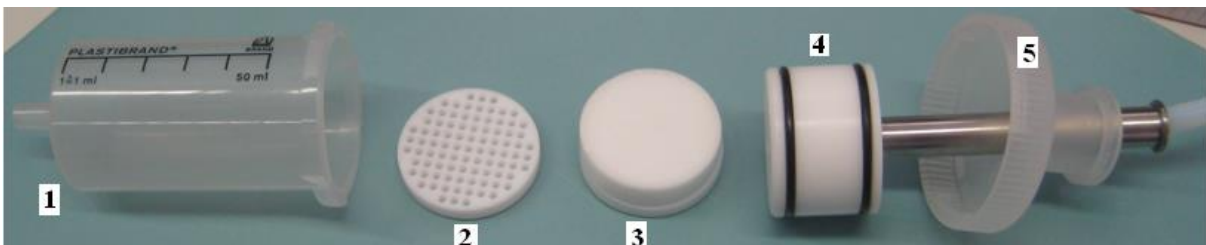


Abbildung 52: Aufbau der Funktionalisierung. 1+5) Einweg-Dispenser-Gehäuse 2) PTFE Siebboden 3) Monolithe 4) PTFE-Adapter

Zur Einstellung der Flussrate und für luftblasenfreien Anschluss wurden die Monolithe zuerst mit ca. 300 - 400 mL Reinstwasser gespült und im direkten Anschluss funktionalisiert. Die Funktionalisierung erfolgte für 3 h bei 60 °C. Hierfür wurde eine Kristallisationsschale unterhalb der Säulen auf einem Heizrührer gestellt und mit der Reaktionslösung gefüllt. Mit Hilfe der Pumpe wurde die jeweilige Lösung nun kontinuierlich mit einer Flussrate von 100 mL min<sup>-1</sup> für 3 h im Zyklus durch die Monolithe gepumpt. Nachfolgende Reaktionslösungen wurden für die entsprechenden MAF-Funktionalisierungen verwendet:

MAF-OH: 0,5 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

MAF-DEAE: 10 % DEA (v/v) in 50 % EtOH (v/v)

Nach dreistündiger Inkubation wurden die Monolithe mit etwa 300 mL Reinstwasser gespült, indem die Reaktionslösung durch Reinstwasser ersetzt wurde und bis zur weiteren Verwendung in sterilen Probenbechern in Reinstwasser bei 4 °C gelagert.

### 5.4.3 MAF-Filtration

Bei der Aufkonzentrierung wurde mit zwei verschiedenen Konditionen filtriert. In der Filtration mit den MAF-OH-Disks wurde ein Ausgangsvolumen von 10 L bei pH 3 verwendet, mit den MAF-DEAE-Disks ein Ausgangsvolumen von 1 L bei neutralem pH. Bei der Filtration wurde ein Aufbau analog der Funktionalisierung, bestehend aus einem Einweg-Dispenser-Gehäuse, einem PTFE-Siebboden, einem O-Ring, einer funktionalisierten MAF und einem PTFE-Adapter verwendet und an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Bei der Filtration mit den MAF-OH-Disks wurden diese zunächst mit ca. 1 L Leitungswasser bei pH 3 bei einer Flussrate von 100 mL min<sup>-1</sup> konditioniert. Bei Filtration mit den MAF-DEAE-Disks wurde dasselbe Protokoll verwendet. Die Konditionierung erfolgte mit Leitungswasser bei neutralem pH. Die Probe wurde in beiden Fällen mit einer Flussrate von etwa 500 mL min<sup>-1</sup> filtriert. Die Elution wurde in drei Inkubationsschritten mit einem Gesamtvolumen von 20 mL Rinderextraktpuffer (*Beef Extract Puffer*, pH 9,5) und einer jeweiligen Inkubationszeit von 2 min durchgeführt.

### 5.4.4 Zentrifugale Ultrafiltration

Zur weiteren Einengung des Probenvolumens auf 2 mL wurde nach MAF-Filtration eine zentrifugale Ultrafiltration (CeUF) nachgeschaltet. Hierbei wurden das Eluat in Zentrifugenfiltern (MWCO 50 kDa) 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand

wurde dem Filter entnommen, mit PBS 1x gespült und auf das gewünschte Probenvolumen aufgefüllt. Die Probe wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 5.5 Mikroarray-Experimente

### 5.5.1 Herstellung von Glas-Mikroarray-Chips

#### Aktivierung und Reinigung der Objektträgeroberflächen

Die Glas-Objektträger wurden vor der Verwendung 30 min in 2 %-iger Hellmanex-Lösung im Ultraschallbad gereinigt. Nach Inkubation in der Spüllösung über Nacht auf dem Orbitalschüttler wurden die Objektträger erneut für 30 min im Ultraschallbad gereinigt und anschließend mit 1 L Reinstwasser gespült. Die Aktivierung der Objektträger erfolgte mit sukzessiver Inkubation für jeweils 1 h in einer Mischung aus Methanol und HCl 37 % (1:1, (v/v)) und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (97 %). Zwischen den Inkubationen wurden die Objektträger mit je 1 L Reinstwasser gespült und abschließend im Stickstoffstrom getrocknet.

#### Silanisierung

Die Silanisierung erfolgte durch dreistündige Inkubation bei regulierter Luftfeuchtigkeit im Inkubator bei RT mit jeweils 600 µl GOPTS in einem Sandwich aus zwei Objektträgern. Nach Inkubation wurden die Objektträger in Ethanol getrennt, gründlich gereinigt und nachfolgend im Ultraschallbad sukzessive mit Ethanol, Methanol und Ethanol gereinigt und abschließend im Stickstoffstrom getrocknet.

#### Belegung mit Jeffamine® ED-2003

Die Belegung der silanisierten Chips erfolgte erneut im Sandwich-Format mit 600 µl Jeffamine® ED-2003 bei 100 °C mit einer Inkubationszeit von 15 h. Die Sandwiches wurden in Reinstwasser getrennt, 15 min im Ultraschallbad in Reinstwasser gereinigt und abschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Die funktionalisierten Mikroarray-Chips wurden unter Stickstoff im Exsikkator gelagert und waren mehrere Monate lagerbar.



### Aktivierung für die Immobilisierung von Oligonukleotiden

Die Mikroarray-Chips wurden mit einem Reaktionsgemisch aus 32 mg DSC, 1,6 mg DMAP, 640  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF und 50  $\mu\text{L}$  TEA aktiviert. Die Reagenzien wurden bis zur leichten Rosafärbung vermischt. Die Inkubation erfolgte mit 600  $\mu\text{L}$  der Lösung im Sandwich-Format bei RT für 4 h im Inkubator. Die Objektträger wurden in Methanol getrennt, 15 min im Ultraschallbad gereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet.

### Immobilisierung von Oligonukleotiden

Die Immobilisierung der Primer erfolgte mit Hilfe eines piezoelektrisch betriebenen Mikrodosierverfahrens („Inkjet droplet-Verfahren“) mit dem SciFLEXARRAYER S1. Die verwendeten Reagenzien wurden vor Beginn des Spottings entgast und steril filtriert, um Blasenbildung und Verstopfung des Systems zu vermeiden. Als Geräteparameter wurde die Luftfeuchtigkeit auf 50 % und die Temperatur auf 25 °C eingestellt. Die Dosierkapillare und das gesamte System wurden zu Beginn des Spottingprozesses mit Hilfe des Programmes *Morning Wash Procedure* gereinigt. Die Bereinigung der Achsenabweichung und die Parameter zur piezoelektrischen Tropfenerzeugung wurden mittels dem Programm *Nozzle Offset* eingestellt. Das Volumen pro Tropfen lag durchschnittlich bei etwa 450  $\mu\text{L}$ . Die aktivierten Mikroarray-Chips wurden mit der bereits aktivierten Oberfläche nach oben in den Spotter eingelegt. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 30  $\mu\text{L}$  der zu spottenden Reagenzien, bzw. den mit 5'-Amino- $\text{C}_{12}$ -Linker modifizierten REV-Primern ( $c = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) befüllt. Pro Spot wurden 84 Tropfen aufgetragen, was einer REV-Primer-Konzentration von etwa 6,0 - 6,75  $\times 10^{-5} \mu\text{mol}$  entsprach. Als Negativkontrolle (*Non-Target-Control*, NTC) wurde nukleasefreies Wasser und als Spottingkontrolle Amino-PEG<sub>2</sub>-Biotin ( $c = 0,005 \text{ mg/mL}$ ) verwendet. Die genaue Spottingreihenfolge ist in Abbildung 53 zu erkennen.

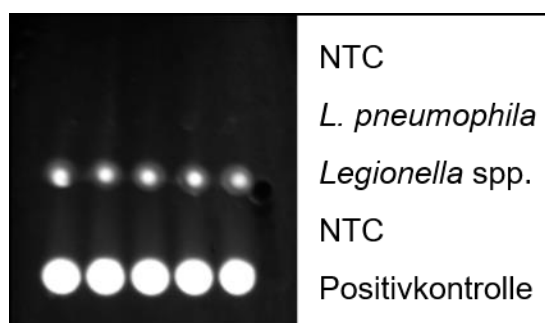


Abbildung 53: Spottingreihenfolge bei der Herstellung eines DNA-Mikroarray-Chips. Es wurde in der Reihenfolge NTC, *L. pneumophila*, *Legionella* spp., NTC und Positivkontrolle gespottet.

Nach dem Spottingprozess wurde die Dosierkapillare mit Hilfe des Programmes *SciClean Wash* gespült (Reinigungslösung *SciClean8*, 1 %, (v/v)). Eine letzte Spülung und Ausbau der Dosierkapillare erfolgte im Programm *Nozzle-Removal-Wash*. Die gespotteten Mikroarrays wurden über Nacht bei 60° C und 55 % Luftfeuchtigkeit im Klimaschrank inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Mikroarray-Chips zum Blocken freier, aktivierter Aminogruppen 15 min in 1 M Tris-HCl (pH 8,5) geschüttelt. Anschließend wurden sie sukzessive in Reinstwasser und Methanol gespült und abschließend im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **Fertigstellung der Mikroarray-Chips**

Zur Verwendung der Mikroarray-Chips im Analysegerät MCR 3 wurde eine dreiteilige Durchflusszelle hergestellt. Hierfür wurde der Glas-Chip mit einer 1 mm starken PE-Folie, welcher zwei Flusszellen mit einem Volumen von jeweils etwa 55 µL vorgibt, und einem PMMA-Träger (26 mm x 76 mm x 2 mm) gekoppelt. Der PMMA-Träger bildete hierbei die Unterseite mit Ein- und Auslauf der Flusszellen. Dieser wurde mit der PE-Folie verklebt. Die Oberseite der Durchflusszelle bildete der DNA-Glas-Chip mit der bespotteten Seite Richtung Träger.

### **5.5.2 Probenvorbereitung der Lebensfähigkeits-haRPA**

Bei der v-haRPA wurde die Probe noch vor DNA-Extraktion mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff PMA inkubiert. Hierfür wurden 1,29 µL PMA in DMSO ( $c = 2000 \mu\text{M}$ ) zu 50 µL der Probenlösung zugefügt, um eine finale Konzentration von 50 µM PMA in Lösung zu erhalten. Die Reaktionslösung wurde 5 min unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend 10 min mit blauem Licht der Wellenlänge  $\lambda = 464 - 476 \text{ nm}$  (sowohl mit dem PhASTBlue von GenIUL und einer hauseigenen Konstruktion) bestrahlt, um die Photoreaktion nach Interkalation des PMA in die DNA zu ermöglichen. Die DNA wurde anschließend analog der haRPA wie in Kapitel 5.3.1.2 beschrieben extrahiert.

### **5.5.3 haRPA auf dem MCR 3**

Die Messungen für die haRPA wurden auf der automatisierten Mikroarray-Analyseplattform MCR 3 durchgeführt. Als Wasch-, Lauf- und Spülpuffer wurde eine 0,5 %-ige (w/v) Caseinlösung in PBS (1x) verwendet. Zur Herstellung des Puffers

wurde dieser bis zum vollständigen Lösen des Caseins erhitzt. Für die Streptavidin-HRP-Detektion wurde eine 0,04 % (v/v) Strep-HRP-Lösung hergestellt. Hierfür wurde 10  $\mu\text{L}$  Strep-HRP ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zu 25 mL des Casein-Puffers zugegeben. Die Lagerung erfolgte für beide Lösungen bei 4 °C. Zu Beginn des Messtages wurden alle Pumpen und Ventile referenziert, alle Schläuche, Ventile und Spritzenpumpen von eventuellen Ablagerungen und Verschmutzungen gereinigt und mit Hilfe eines Waschprogramms mit dem Laufpuffer gespült. Im Lade-Programm wurde die Detektionsspritze mit der Strep-HRP-Lösung gefüllt, die CL-Reagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid angeschlossen und alle Schläuche und Ventile gespült und gefüllt. Zur Gewährleistung eines störfreien Signals wurde vor Beginn der ersten Messung das Messprogramm zweimal ohne Probenzugabe mit einem Spülchip durchgeführt.



**Abbildung 54: Einlegen des Mikroarray-Chips in die Mikroarray-Einheit.**

Vor Beginn der Messung wurde jeweils ein neuer, leerer Mikroarray eingelegt und ein Leerbild aufgenommen („Dark Frame Image“). Dieses wurde von allen anschließend aufgenommenen Messbildern automatisch abgezogen.

Zur Durchführung einer heterogenen asymmetrischen RPA wurden der Flüssigphase unmodifizierter REV-Primer zusätzlich zum biotinylierten FW-Primer im asymmetrischen Verhältnis 1:10 zugegeben, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Reaktionsmischung wurde stets unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Auf Grund der Messung mit Zwei-Kanal-Mikroarray-Chips wurden pro Chip je zwei Reaktionsgemische gleichzeitig hergestellt und beide Flusszellen gleichzeitig befüllt. Hierfür wurden zu Beginn zwei Mastermixe für die simultane Befüllung beider Flusszellen hergestellt, die aus Rehydratationspuffer (TwistAmp-Kit), nukleasefreiem Wasser, und einem Primer-Mix aus biotinyliertem FW- und unmodifizierten REV-Primer bestanden. Biotinylierter FW- und unmodifizierter REV-Primer wurden in einer

Finalkonzentration von 420 nM und 42 nM eingesetzt, soweit nicht anders angegeben. Die Volumina und finalen Konzentrationen sind Tabelle 33 zu entnehmen.

**Tabelle 33: Zusammensetzung der Reaktionsmischung für die haRPA. Angegeben sind Reagenzien, Volumen und die Konzentration im Reaktionsgemisch.**

| Reagenz                  | Volumen / $\mu\text{L}$ | Finale Konzentration | Ansatz                       |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------|
| Rehydratationspuffer     | 59                      |                      | Mastermix für zwei Messungen |
| PCR-Wasser               | 21                      |                      |                              |
| Primer-Mix in PCR-Wasser | 10                      | 420 nM / 42 nM       |                              |
| MgOAc                    | 4                       | 20,74 mM             | Ansatz pro Messung           |
| Genomische DNA-Probe     | 5                       | variierend           |                              |
| <b>Gesamt</b>            | <b>54</b>               |                      |                              |

Jeweils 45  $\mu\text{L}$  des Mastermixes wurden zu einer lyophilisierten Probe des TwistAmp-Kits gegeben. 5  $\mu\text{L}$  der zu messenden DNA-Probe wurden an den inneren Rand des 0,2 mL-Reaktionsgefäßes gegeben. 4  $\mu\text{L}$  Magnesiumacetat, welches zum Starten der Reaktion eingesetzt wurde, wurde in den Deckel des Reaktionsgefäßes gegeben. Zur Verzögerung des Reaktionsstartes wurde das Probengefäß zudem auf einem gekühlten Metallblock gelagert. Zum Starten der Reaktion wurde die Mischung zentrifugiert, 10 s gevortext und erneut zentrifugiert. Jeweils 52  $\mu\text{L}$  der Probe wurden in je einen der Ausläufe der Flusszellen des Mikroarray-Chips injiziert. Der befüllte Mikroarray-Chip wurde mit einer Verschlussfolie versiegelt und im Schüttler bei 39 °C für 40 min inkubiert. Nach Inkubationszeit wurde die Versiegelung entfernt und der Mikroarray-Chip in den MCR 3 eingelegt. Um die DNA-Amplifikation in beiden Flusszellen nach 40 min zeitgleich zu stoppen, wurde der Mikroarray-Chip nach Einlegen des Chips in die Mikroarray-Einheit des MCR 3 (s. Abbildung 54) mit dem Messprogramm *Spülen beider Flusszellen* auf beiden Flusszellen mit je dreimal 1000  $\mu\text{L}$  mit einer Flussrate von 200  $\mu\text{L s}^{-1}$  durchspült. Anschließend wurden die Messprogramme für vordere und hintere Flusszelle wie in Tabelle 34 angegeben, nach dem Assay von Kunze et al., durchgeführt [208]. Der exakte Ablauf des RPA-Programmes mit Angabe der verwendeten Pumpen und Ventile ist Anhang 20 zu entnehmen. Am Ende jeder Messung wurde jeweils ein Bild mit der CCD-Kamera aufgenommen. Zum Beenden des Messtages wurden sämtliche Reagenzien durch Reinstwasser ersetzt, um alle Schläuche und Ventile zu reinigen.

**Tabelle 34: Assayablauf der haRPA. Angegeben sind durchgeführte Schritte, Volumen der Lösung und Flussrate bzw. Dauer.**

| Schritt                                           | Volumen        | Flussrate / Dauer                            |
|---------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------|
| Beheizen der Flußzelle auf 39 °C                  | -              |                                              |
| Spülen (3 x)                                      | 1000 µL        | 200 µL s <sup>-1</sup>                       |
| Detektion mit Strep-HRP                           | 150 µL, 600 µL | 50 µL s <sup>-1</sup> , 2 µL s <sup>-1</sup> |
| Spülen (3 x)                                      | 1000 µL        | 500 µL s <sup>-1</sup>                       |
| Chemilumineszenzreagenzien<br>Luminol und Peroxid | Je 200 µL      | 20 µL s <sup>-1</sup>                        |
| Bildaufnahme mit CCD-Kamera                       | -              | 60 s                                         |
| Spülen des Fluidiksystems                         | 1500 µL        | 500 µL s <sup>-1</sup>                       |
| Spülen (3 x)                                      | 1000 µL        | 68 µL s <sup>-1</sup>                        |

### 5.5.4 Auswertung

Das erhaltene Messbild wurde selbstständig vom MCR-Programm um das zuvor aufgenommene Leerbild bereinigt. Mit Hilfe des MCRIImageAnalyzer wurden die bereinigten Bilder ausgewertet, wobei die jeweils 10 hellsten Pixel eines jeden Spots gemittelt wurden. Hierbei wurden Spots mit einer 15 %-Abweichung vom Mittelwert der fünf Replikate von der Berechnung automatisch ausgeschlossen.

### 5.5.5 Herstellung eines Polycarbonat-Mikroarray-Chips

#### Herstellung des modifizierten Jeffamine® ED-2003

Zur Herstellung der Polycarbonat-Mikroarray-Chips wurde zuerst das kommerziell erwerbliche Jeffamine® ED-2003 im Wasserbad geschmolzen und 80 g in einen Einhals-Rundkolben abgefüllt. Unter Schutzgas-Atmosphäre wurden unter Rühren 140 bis 160 mL Toluol zugegeben, bis das Jeffamine vollständig gelöst war. 3,25 g Bernsteinsäureanhydrid wurden in den Kolben zugegeben und alles über Nacht bei RT gerührt. Das Toluol wurde am Rotationsverdampfer entfernt und zur besseren Streichfähigkeit der Paste 10 – 15 % (v/v) Reinstwasser zugegeben.

#### Schneiden der Polycarbonat-Platten

Die 1 mm starken Polycarbonat-Platten wurden am digitalen Schneideplotter in ein 3 x 3-Chip-Format mit den Maßen 76 mm x 26 mm vorgeschritten. Hierfür wurde eine entsprechende Vorlage im CM3 Programm geöffnet und eine halbe Platte linksbündig und gerade in den Schneideplotter eingesetzt. Auf einer halbierten Platte wurden zwei 3 x 3-Chip-Formate vorgeschritten. Das Schneidmesser des Plotters wurde auf eine

Schnittgeschwindigkeit von  $30 \text{ cm s}^{-1}$  und maximale Schnittstärke von 31 a.u. und 10 Schnittwiederholungen im Einstellungsmodus „2“ eingestellt.

### **Belegung der Platten mit modifiziertem Jeffamine® ED-2003**

Die Polycarbonat-Oberfläche der vorgeschrittenen Mikroarray-Chips wurden im nächsten Schritt mit dem modifizierten Jeffamine® ED-2003 belegt. Mit Hilfe eines Siebdruckers wurde die Paste auf die Platten aufgebracht. Hierbei wurden etwa 4 bis 5 mL der Paste über das vorgegebene Fenster des Siebdruckers verteilt und mit einer Rakel gleichmäßig auf die Platten aufgetragen (Abbildung 55). Die Platten wurden 2 h bei  $100 \text{ °C}$  im Ofen inkubiert und anschließend zweimal 15 min in Reinstwasser im Ultraschallbad gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.



**Abbildung 55: Belegung der PC-Platten mit modifiziertem Jeffamine® ED-2003 mit Hilfe eines Siebdruckers.**

### **Immobilisierung von Antikörpern auf Mikroarrays**

Die Immobilisierung der AK erfolgte mit Hilfe des Mikrokontakt-Spotters BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer von Biorad. Im Gegensatz zum Spotting der DNA-Mikroarray-Chips wurden die Polycarbonat-Mikroarray-Chips nicht vor Beginn des Spottings aktiviert, sondern das Aktivierungsreagenz wurde direkt mit den AKs auf die PC-Platte aufgetragen. Die Platten wurden in einem Stück, also 3 x 3 Chips gespottet. Der Spottingpuffer wurde wie in Tabelle 35 angegeben hergestellt.  $20 \mu\text{L}$  des Spottingpuffer wurde mit  $20 \mu\text{L}$  der entsprechenden Antikörperlösung vermischt. Die Konzentration der Antikörperlösung variierte je nach Anwendung und Messreihe. Die Lösungen wurden für das Spotting luftblasenfrei in eine *384-well-plate* pipettiert. Die Luftfeuchtigkeit im Gerät wurde auf 50 % und die Temperatur auf  $25 \text{ °C}$  eingestellt. Die Nadel wurde zu Beginn des Mikrodosiervorgangs gespült (*Wash Pin*). Im Programm

wurde für jedes Spotting individuell die in der Spottingplatte verwendeten Kavitäten eingestellt und die Anzahl der Mikroarray-Chips und Platzierung der Spots angegeben. Im Gegensatz zur Mikrodosierung der DNA-Mikroarray-Chips wurde hier in den meisten Fällen nur eine Durchflusszelle zu fünf Reihen für die Messungen am MCR-R gespottet. Für die ersten Testmessungen, welche auf dem MCR 3 durchgeführt wurden, wurden zwei Durchflusszellen zu fünf Reihen gespottet. Die Anzahl der Spalten war abhängig von der Versuchsreihe und der Anzahl der verwendeten Antikörper. Als Positivkontrolle wurde ein Anti-Peroxidase-AK, als Negativkontrolle der Spottingpuffer ohne AK verwendet. Nach dem Spotting wurden die gespotteten Platten im Inkubator bei 25 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert.

**Tabelle 35: Zusammensetzung des verwendeten Spottingpuffers im Mikrodosier-Verfahren.**

| Reagenz        | Konzentration nach Einwaage / mg mL <sup>-1</sup> | Volumen im Spottingpuffer / µL | Finale Konzentration in der Antikörperlösung / mg mL <sup>-1</sup> |
|----------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| EDC            | 20                                                | 40                             | 1                                                                  |
| NHS            | 20                                                | 40                             | 1                                                                  |
| Pluronic® F127 | 1                                                 | 8                              | 0,01                                                               |
| Trehalose      | 250                                               | 160                            | 50                                                                 |
| PBS (1x)       | --                                                | 152                            | --                                                                 |

Zur Immobilisierung der AK auf Glas-Mikroarrays wurden die Glas-Oberflächen analog den Mikroarrays für die haRPA silanisiert, hergestellt und auch aktiviert (siehe Kapitel 5.5.1). Die Immobilisierung erfolgte, wie bei PC-Oberflächen, auf dem Mikrokontakt-Spotter BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer. Die Geräteeinstellung entsprachen den oben genannten Parametern. Für die Mikrodosierung wurde der entsprechende AK 1:1 mit Spottingpuffer für Glas-Mikroarrays verdünnt. Als Positivkontrolle wurde ein Anti-Peroxidase-AK (1:1 in Spottingpuffer) verwendet, als Negativkontrolle der Spottingpuffer ohne AK. Die Lösungen wurden luftblasenfrei in eine *384-well-plate* pipettiert. Die Mikrodosierung erfolgte wie obenstehend beschrieben, die hergestellten Mikroarrays wurden bei 25 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert. Zum Blocken der verbliebenen aktivierten Stellen der Glas-Oberfläche wurden die Glas-Träger 15 min in 1 M Tris-HCl (pH 8,5) geschüttelt, anschließend kurz in Methanol und Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

### Fertigstellung der Mikroarray-Chips

Die vorgeschrittenen Chips wurden aus der PC-Platte gebrochen. Die Mikroarray-Chips bestanden aus einer dreiteiligen Durchflusszelle. Diese wurde gefertigt, indem eine 140  $\mu\text{m}$  starke PE-Folie, die dem Chip die benötigte Flusszelle vorgibt, mit einem POM-Träger Träger (26 mm x 76 mm x 1 mm) und dem Polycarbonat-Chip gekoppelt wurde. Der POM-Träger, welcher die Unterseite bildete und Ein- und Auslass vorgab, wurde mit einer doppelseitig klebenden PE-Folie belegt. Auf die Oberseite wurde der AK-Mikroarray-Chip mit der mikrodosierten Seite Richtung Träger geklebt. Die fertigen Mikroarrays wurden zur Lagerung am MCR-R mit 0,1 % BSA in PBS (1 x) gefüllt. Im Programm „Chips füllen“ wurde die Mikroarrays nacheinander in die Mikroarray-Einheit eingelegt und mit der *Wash*-Funktion erst mit 200  $\mu\text{L}$  BSA-Lösung (200  $\mu\text{L s}^{-1}$  Flussrate) durchspült, um sämtliche nicht-gebundenen Reagenzien zu entfernen, und anschließend mit 100  $\mu\text{L}$  BSA-Lösung (65  $\mu\text{L s}^{-1}$  Flussrate), gefüllt. Die gefüllten Mikroarrays wurden mit einer Klebefolie verschlossen und bei 4 °C gelagert.

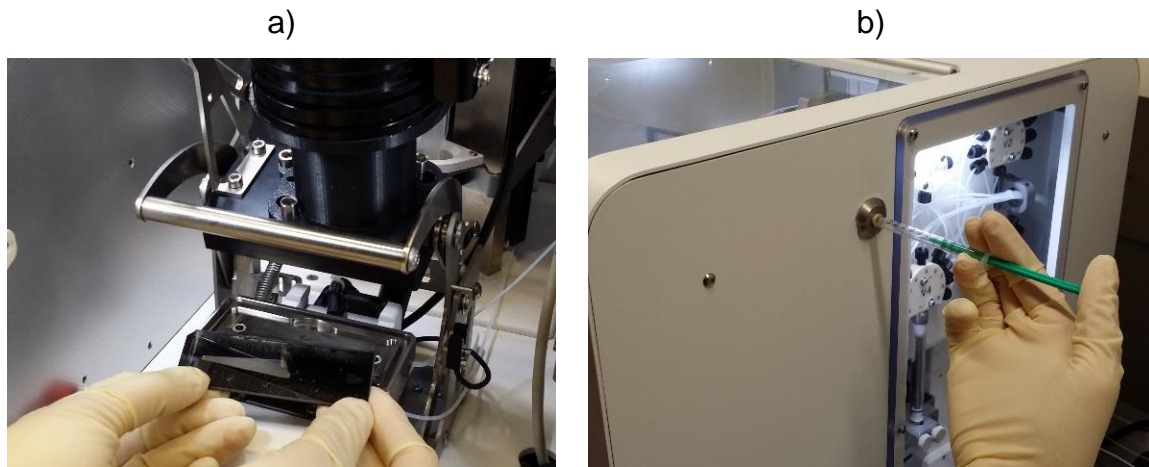
Die Einkanal-Glas-AK-Mikroarrays wurden auf dieselbe Weise fertig gestellt. Die Zweikanal-Glas-AK-Mikroarrays wurden, wie in Kapitel 5.5.1 beschrieben, fertig gestellt. Anschließend wurden sie mit 0,1 % BSA in PBS (1 x) zur Lagerung manuell befüllt, mit einer Klebefolie verschlossen und bei 4 °C gelagert.

### 5.5.6 CL-SMIA auf dem MCR-R

Der Großteil der CL-SMIA-Messungen wurden auf der neuen, verbesserten automatisierten Mikroarray-Analyseplattform MCR-R durchgeführt. Als Wasch-, Lauf- und Spülpuffer wurde eine 0,5 %-ige (w/v) Caseinlösung mit 0,01 % Pluronic F127 in PBS (1 x) verwendet. Der Puffer wurde analog zum Laufpuffer der haRPA hergestellt, jedoch 0,1 g Pluronic F127 zugegeben. Für die poly-HRP-Streptavidin-Detektion wurde eine 0,002 % (v/v) poly-HRP-Streptavidin-Lösung hergestellt. Hierfür wurde 5  $\mu\text{L}$  poly-HRP-Streptavidin-Lösung (1 mg mL<sup>-1</sup>) zu 25 mL des Casein-Puffers (ohne Pluronic F127) zugegeben. Für die Detektionsantikörper-Lösung wurde für Messungen der Sg 1 eine 0,01 % (v/v) Detektionsantikörper-Lösung hergestellt. Hierfür wurden 20  $\mu\text{L}$  des AKs in 10 mL Casein-Puffer (mit Pluronic F127) verdünnt. Die Lagerung aller Lösungen erfolgte bei 4 °C. Zu Beginn des Messtages wurden die Pumpen und Ventile referenziert und die Schläuche, Ventile und Spritzenpumpe von eventuellen Ablagerungen und Verschmutzungen mit Hilfe eines Waschprogramms gereinigt und mit dem Laufpuffer gespült. Im Lade-Programm wurden die



Detektionsspritzen mit Detektionsantikörper und poly-HRP-Streptavidin gefüllt und die CL-Reagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid angeschlossen und alle Schläuche und Ventile gespült und gefüllt.



**Abbildung 56:** a) Einlegen des Chips in die Mikroarray-Einheit des MCR-R. b) Injektion der Probenlösung in die Probenöffnung.

Bei jeder Messung wurde zuerst der zu messende Chip in die Mikroarray-Einheit eingelegt und der richtige Sitz sichergestellt, um Auslaufen zu vermeiden (Abbildung 56 a). Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde analog der haRPA auf dem MCR 3 ein Dunkelbild (*Dark Frame Image*) gemacht, welches später von der Messung abgezogen wurde. Nach Eingabe der Chip- und Proben-ID konnte die Messung auf *Start Measurement* gestartet werden und mit Hilfe einer 1-mL-Spritze 600  $\mu$ L der Probenlösung luftblasenfrei durch die Probenöffnung in die Probenschleife injiziert werden (s. Abbildung 56 b). Der CL-SMIA wurde mit verschiedensten Probematrizes durchgeführt. Diese wurden auf unterschiedliche Weise vor Beginn der Messung aufbereitet. Kulturproben wurden je nach Messreihe in Reinstwasser oder Leitungswasser zur gewünschten Konzentration verdünnt. Patienten-Urinproben wurden unbehandelt oder aufkonzentriert (durch das Konsiliarlabor Legionellen, Dresden) gevortext und Schwebstoffe abzentrifugiert vor Verwendung. Reale Wasserproben wurden unbehandelt verwendet oder über MAF-Filtration aufkonzentriert (s. Kapitel 5.4). Der Ablauf des Programmes ist in Tabelle 36 angegeben. Nach Beendigung einer Messung wurde das Messbild direkt auf dem Bildschirm angezeigt. Hier wurde das Gitter des Mikroarrays nun direkt am Bildschirm sorgfältig eingestellt (x Spalten, y Zeilen, Abstand der Spalten / Zeilen), bis alle Punkte im Mess-Gitter enthalten waren, da dieses nachträglich nicht mehr verändert werden konnte und die Ergebnisse direkt berechnet (*Calculate Results*) und gespeichert (*Store*

*Results*) wurden. Bevor eine neue Messung gestartet werden konnte, musste die Probenöffnung und die Probenschleife mit 25 mL Casein-Puffer oder Reinstwasser gespült werden (*Wash*). Am Ende des Messtages wurde das Gerät dekontaminiert (*Shutdown*). Zur Reinigung wurden die Detektions-Spritzen und CL-Reagenzien-Flaschen mit Reinstwasser gefüllt und zur Dekontamination sukzessive 0,1 %-ige Natriumhypochloritlösung, 0,2 %-ige Natriumthiosulfat-Lösung und Reinstwasser als Spülpuffer angeschlossen. Auch die Probenöffnung / -schleife wurde nacheinander mit den drei Reagenzien dekontaminiert. Sämtliche Schritte waren durch das Programm in einer Zwangsführung vorgegeben und konnten nicht übersprungen werden.

**Tabelle 36: Ablauf des CL-SMIA-Messprogrammes auf dem MCR-R.**

| Schritt                                                    | Volumen     | Flussrate                                                                |
|------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Heizen der Flusszelle auf 35 °C                            | -           |                                                                          |
| Probeninjektion                                            | 600 µL      |                                                                          |
| Spülen der Probe bis zum Einlass                           | 140 µL      | 50 µL s <sup>-1</sup>                                                    |
| Inkubation                                                 | 600 µL      | Stop-flow 1,0 µL s <sup>-1</sup> und 30 s Interaktionszeit; 10 Schleifen |
| Waschschritt                                               | 1500 µL     | 325 µL s <sup>-1</sup> (1 x Probenschleife, 1 x Chip), 2 Schleifen       |
| Spülen des AK bis zum Einlass                              | 115 µL      | 50 µL s <sup>-1</sup>                                                    |
| Biotin-markierter Detektionsantikörper                     | 600 µL      | Stop-flow 2 µL s <sup>-1</sup> und 5 s Interaktionszeit; 10 Schleifen    |
| Waschschritt                                               | 1000 µL     | 325 µL s <sup>-1</sup> (1x Chip), 2 Schleifen                            |
| Spülen des HRP bis zum Einlass                             | 160 µL      | 50 µL s <sup>-1</sup>                                                    |
| HRP-markiertes Streptavidin                                | 600 µL      | 2 µL s <sup>-1</sup>                                                     |
| Waschschritt                                               | 1500 µL     | 325 µL s <sup>-1</sup> (1 x chip), 2 Schleifen                           |
| Chemilumineszenz-Reagenzien Luminol and Wasserstoffperoxid | Je 200 µL   | 100 µL s <sup>-1</sup>                                                   |
| Bildaufnahme mit CCD-Kamera                                | -           | 60 s                                                                     |
| Waschschritt                                               | 3 x 2500 µL | 500 µL s <sup>-1</sup> (Probenschleife, Probenweg und Chip)              |
| <b>Assay-Dauer</b>                                         |             | <b>34 min</b>                                                            |

Einige wenige Messungen zu Beginn der Doktorarbeit, wurden auf der Analyseplattform MCR 3 durchgeführt. Die Reagenzien zur Durchführung sind hier gleich den zuvor genannten am MCR-R. Zu Beginn des Messtages wurden auch am MCR 3 alle Pumpen und Ventile referenziert und Schläuche, Ventile und Spritzenpumpe mit Hilfe eines Waschprogramms gereinigt und mit dem Laufpuffer gespült. Im Load-Programm wurden die Detektionsspritzen mit Detektionsantikörper

und poly-HRP-Streptavidin gefüllt und die CL-Reagenzien Luminol und Wasserstoffperoxid angeschlossen und alle Schläuche und Ventile gespült und gefüllt. Vor Beginn der Messung wurde auch hier ein Dunkelbild (*Dark Frame Image*) gemacht, welches später von der Messung abgezogen wurde. Auch hier wurden für jede Messung 600 µL Probe in das Gerät injiziert, das Messprogramm wurde von Anika Wunderlich übernommen und ist Anhang 21 zu entnehmen. Die wesentlichen Programmschritte sind gleich dem Programm auf dem MCR-R (Tabelle 36), es unterscheiden sich Volumina, Flussraten und angesteuerte Ventile und Pumpen. Zudem dauert die Messung auf dem MCR 3 36 min, auf dem MCR-R 34 min. Zum Beenden des Messtages wurden sämtliche Reagenzien durch Reinstwasser ersetzt, um alle Schläuche und Ventile zu reinigen.

### 5.5.7 Auswertung

Zur weiteren Verwendung der Messbilder von der CCD-Kamera wurde diesen automatisch das *Dark Frame Image* abgezogen. Die Auswertung der Mikroarraybilder des MCR-R erfolgte mit MS Excel. Es wurde das *rs/t*-File in Excel eingelesen und jeweils die zehn hellsten Pixel eines jeden Spots angegeben. Die Werte wurden für jeweils fünf gleiche Replikate gemittelt und „Ausreißer“, welche zu stark in der Helligkeit abwichen, aus der Berechnung ausgeschlossen (siehe Kapitel 3.3.5, „Analytische Datenevaluierung“).

Die Auswertung der Messbilder des MCR 3 erfolgte analog Kapitel 5.5.4.

## 6 Anhang

**Anhang A1:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den pAb. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| pAb                                    |        |        |        |        |        |        |
|----------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CL-Signalintensität / a.u.             |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 58.690 | 58.592 | 58.766 | 58.832 | 58.737 | 58.722 |
| Philadelphia                           | 15.543 | 37.632 | 45.413 | 56.637 | 58.220 | 58.581 |
| Benidorm                               | 58.502 | 58.677 | 58.656 | 58.826 | 59.077 | 59.010 |
| France                                 | 52.106 | 58.211 | 57.666 | 57.444 | 56.311 | 57.438 |
| Allentown                              | 58.644 | 58.708 | 58.929 | 58.716 | 58.978 | 58.996 |
| OLDA                                   | 31.676 | 58.014 | 57.703 | 57.922 | 58.269 | 58.308 |
| Oxford                                 | 14.858 | 29.251 | 41.149 | 43.566 | 43.398 | 49.365 |
| Bellingham                             | 15.395 | 31.524 | 33.677 | 29.442 | 29.734 | 32.378 |
| Heysham                                | 14.259 | 32.519 | 55.191 | 57.360 | 42.432 | 32.766 |
| Camperdown                             | 11.681 | 31.657 | 41.599 | 35.185 | 37.479 | 42.194 |
| Normiertes Signal / %                  |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 91     | 91     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| Philadelphia                           | 24     | 59     | 71     | 88     | 91     | 91     |
| Benidorm                               | 91     | 91     | 91     | 92     | 92     | 92     |
| France                                 | 81     | 91     | 90     | 90     | 88     | 90     |
| Allentown                              | 91     | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| OLDA                                   | 49     | 90     | 90     | 90     | 91     | 91     |
| Oxford                                 | 23     | 46     | 64     | 68     | 68     | 77     |
| Bellingham                             | 24     | 49     | 52     | 46     | 46     | 50     |
| Heysham                                | 22     | 51     | 86     | 89     | 66     | 51     |
| Camperdown                             | 18     | 49     | 65     | 55     | 58     | 66     |
| Intensität / a.u.                      |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Philadelphia                           | 1      | 2      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Benidorm                               | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| France                                 | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Allentown                              | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| OLDA                                   | 2      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Oxford                                 | 1      | 2      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Bellingham                             | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      | 2      |
| Heysham                                | 1      | 2      | 3      | 3      | 3      | 2      |
| Camperdown                             | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      | 3      |
| Konzentration /<br>mg mL <sup>-1</sup> | 0,07   | 0,15   | 0,3    | 0,6    | 1,2    | 2,4    |

**Anhang 2:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für mAb 48/3. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| mAb 48/3                               |        |        |        |        |        |        |
|----------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CL-Signalintensität / a.u.             |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 10.769 | 12.902 | 23.260 | 57.471 | 58.863 | 59.126 |
| Philadelphia                           | 8.207  | 11.406 | 57.906 | 58.912 | 58.938 | 58.911 |
| Benidorm                               | 4.809  | 25.847 | 58.652 | 58.819 | 58.884 | 59.143 |
| France                                 | 5.884  | 5.839  | 9.783  | 33.180 | 56.596 | 50.984 |
| Allentown                              | 2.043  | 3.186  | 9.120  | 35.416 | 56.604 | 48.760 |
| OLDA                                   | 962    | 507    | 847    | 1.561  | 1.910  | 1.308  |
| Oxford                                 | 872    | 883    | 1.265  | 1.792  | 2.432  | 2.405  |
| Bellingham                             | 1.885  | 1.885  | 2.232  | 3.474  | 4.281  | 6.421  |
| Heysham                                | 2.248  | 2.135  | 2.384  | 2.826  | 3.283  | 5.632  |
| Camperdown                             | 683    | 527    | 637    | 916    | 1.031  | 1.343  |
| Normiertes Signal / %                  |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 17     | 20     | 36     | 90     | 92     | 92     |
| Philadelphia                           | 13     | 18     | 90     | 92     | 92     | 92     |
| Benidorm                               | 7      | 40     | 91     | 92     | 92     | 92     |
| France                                 | 9      | 9      | 15     | 52     | 88     | 79     |
| Allentown                              | 3      | 5      | 14     | 55     | 88     | 76     |
| OLDA                                   | 2      | 1      | 1      | 2      | 3      | 2      |
| Oxford                                 | 1      | 1      | 2      | 3      | 4      | 4      |
| Bellingham                             | 3      | 3      | 3      | 5      | 7      | 10     |
| Heysham                                | 4      | 3      | 4      | 4      | 5      | 9      |
| Camperdown                             | 1      | 1      | 1      | 1      | 2      | 2      |
| Intensität / a.u.                      |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 1      | 1      | 2      | 3      | 3      | 3      |
| Philadelphia                           | 1      | 1      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Benidorm                               | 1      | 2      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| France                                 | 1      | 1      | 1      | 2      | 3      | 3      |
| Allentown                              | 1      | 1      | 1      | 2      | 3      | 3      |
| OLDA                                   | 1      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Oxford                                 | 0      | 0      | 0      | 0      | 1      | 1      |
| Bellingham                             | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Heysham                                | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Camperdown                             | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Konzentration /<br>mg mL <sup>-1</sup> | 0,015  | 0,03   | 0,06   | 0,12   | 0,25   | 0,5    |

**Anhang A3:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 10/7. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 10/7</b>                           |              |              |              |              |             |            |            |
|-------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>         |              |              |              |              |             |            |            |
| Knoxville                                 | 9.754        | 9.924        | 9.941        | 10.581       | 9.602       | 9.211      | 9.433      |
| Philadelphia                              | 13.484       | 8.664        | 8.201        | 8.340        | 24.703      | 58.906     | 58.996     |
| Benidorm                                  | 2.793        | 1.532        | 1.246        | 1.180        | 3.655       | 13.320     | 24.333     |
| France                                    | 6.700        | 6.375        | 6.179        | 6.286        | 6.344       | 11.269     | 30.063     |
| Allentown                                 | 2.154        | 2.114        | 1.789        | 1.951        | 1.944       | 2.101      | 2.069      |
| OLDA                                      | 802          | 3.109        | 20.984       | 47.687       | 58.516      | 58.756     | 58.677     |
| Oxford                                    | 819          | 1.268        | 4.994        | 16.017       | 55.498      | 58.617     | 58.594     |
| Bellingham                                | 2.060        | 3.597        | 10.009       | 24.714       | 58.452      | 58.462     | 58.497     |
| Heysham                                   | 2.633        | 2.746        | 4.494        | 10.004       | 57.564      | 58.696     | 58.434     |
| Camperdown                                | 695          | 1.677        | 7.993        | 21.211       | 58.330      | 58.733     | 58.749     |
| <b>Normiertes Signal / %</b>              |              |              |              |              |             |            |            |
| Knoxville                                 | 15           | 15           | 15           | 16           | 15          | 14         | 15         |
| Philadelphia                              | 21           | 14           | 13           | 13           | 39          | 92         | 92         |
| Benidorm                                  | 4            | 2            | 2            | 2            | 6           | 21         | 38         |
| France                                    | 10           | 10           | 10           | 10           | 10          | 18         | 47         |
| Allentown                                 | 3            | 3            | 3            | 3            | 3           | 3          | 3          |
| OLDA                                      | 1            | 5            | 33           | 74           | 91          | 92         | 91         |
| Oxford                                    | 1            | 2            | 8            | 25           | 87          | 91         | 91         |
| Bellingham                                | 3            | 6            | 16           | 39           | 91          | 91         | 91         |
| Heysham                                   | 4            | 4            | 7            | 16           | 90          | 91         | 91         |
| Camperdown                                | 1            | 3            | 12           | 33           | 91          | 92         | 92         |
| <b>Intensität / a.u.</b>                  |              |              |              |              |             |            |            |
| Knoxville                                 | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 1          | 1          |
| Philadelphia                              | 1            | 1            | 1            | 1            | 2           | 3          | 3          |
| Benidorm                                  | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 1          | 2          |
| France                                    | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 1          | 2          |
| Allentown                                 | 0            | 1            | 1            | 1            | 0           | 0          | 0          |
| OLDA                                      | 0            | 1            | 2            | 3            | 3           | 3          | 3          |
| Oxford                                    | 0            | 0            | 1            | 1            | 3           | 3          | 3          |
| Bellingham                                | 0            | 1            | 1            | 2            | 3           | 3          | 3          |
| Heysham                                   | 0            | 1            | 1            | 1            | 3           | 3          | 3          |
| Camperdown                                | 0            | 1            | 1            | 2            | 3           | 3          | 3          |
| <b>Konzentration / mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,003</b> | <b>0,006</b> | <b>0,011</b> | <b>0,024</b> | <b>0,05</b> | <b>0,1</b> | <b>0,2</b> |

**Anhang A4:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 20/1. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| mAb 20/1                               |        |        |        |        |        |        |
|----------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CL-Signalintensität / a.u.             |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 5.732  | 4.940  | 5.701  | 4.938  | 4.719  | 4.672  |
| Philadelphia                           | 3.650  | 3.304  | 3.522  | 2.763  | 3.119  | 3.290  |
| Benidorm                               | 6.124  | 39.152 | 49.237 | 59.130 | 59.215 | 59.033 |
| France                                 | 4.807  | 4.767  | 4.149  | 3.479  | 4.319  | 3.639  |
| Allentown                              | 3.198  | 2.941  | 3.094  | 3.037  | 2.891  | 2.755  |
| OLDA                                   | 4.097  | 10.149 | 56.753 | 57.288 | 36.085 | 25.583 |
| Oxford                                 | 3.011  | 2.871  | 5.859  | 7.883  | 4.281  | 4.471  |
| Bellingham                             | 34.876 | 59.304 | 59.046 | 59.230 | 59.173 | 59.331 |
| Heysham                                | 1.770  | 1.829  | 1.707  | 5.079  | 11.099 | 9.753  |
| Camperdown                             | 929    | 1.050  | 1.982  | 1.406  | 934    | 644    |
| Normiertes Signal / %                  |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 9      | 8      | 9      | 8      | 7      | 7      |
| Philadelphia                           | 6      | 5      | 5      | 4      | 5      | 5      |
| Benidorm                               | 10     | 61     | 77     | 92     | 92     | 92     |
| France                                 | 7      | 7      | 6      | 5      | 7      | 6      |
| Allentown                              | 5      | 5      | 5      | 5      | 5      | 4      |
| OLDA                                   | 6      | 16     | 88     | 89     | 56     | 40     |
| Oxford                                 | 5      | 4      | 9      | 12     | 7      | 7      |
| Bellingham                             | 54     | 92     | 92     | 92     | 92     | 92     |
| Heysham                                | 3      | 3      | 3      | 8      | 17     | 15     |
| Camperdown                             | 1      | 2      | 3      | 2      | 1      | 1      |
| Intensität / a.u.                      |        |        |        |        |        |        |
| Knoxville                              | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Philadelphia                           | 1      | 1      | 0      | 0      | 1      | 1      |
| Benidorm                               | 1      | 2      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| France                                 | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Allentown                              | 1      | 1      | 0      | 0      | 0      | 1      |
| OLDA                                   | 1      | 1      | 3      | 3      | 2      | 2      |
| Oxford                                 | 1      | 0      | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Bellingham                             | 2      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Heysham                                | 0      | 0      | 0      | 1      | 1      | 1      |
| Camperdown                             | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Konzentration /<br>mg mL <sup>-1</sup> | 0,02   | 0,07   | 0,13   | 0,27   | 0,54   | 1,07   |

**Anhang A5:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 10/6. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 10/6</b>                           |             |             |             |             |            |            |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>         |             |             |             |             |            |            |
| Knoxville                                 | 4.282       | 4.434       | 4.192       | 3.950       | 3.804      | 3.642      |
| Philadelphia                              | 2.001       | 1.530       | 1.436       | 1.340       | 1.263      | 1.869      |
| Benidorm                                  | 2.821       | 24.796      | 51.985      | 51.877      | 57.106     | 44.209     |
| France                                    | 2.989       | 2.926       | 2.455       | 2.499       | 2.373      | 2.223      |
| Allentown                                 | 1.998       | 2.299       | 1.936       | 1.831       | 1.860      | 1.765      |
| OLDA                                      | 1.975       | 3.288       | 2.151       | 2.165       | 1.803      | 1.717      |
| Oxford                                    | 1.888       | 1.744       | 1.725       | 1.797       | 1.511      | 1.546      |
| Bellingham                                | 36.603      | 59.370      | 59.177      | 59.262      | 59.095     | 59.108     |
| Heysham                                   | 3.018       | 1.535       | 1.926       | 1.618       | 1.194      | 1.136      |
| Camperdown                                | 1.943       | 680         | 781         | 504         | 337        | 439        |
| <b>Normiertes Signal / %</b>              |             |             |             |             |            |            |
| Knoxville                                 | 7           | 7           | 7           | 6           | 6          | 6          |
| Philadelphia                              | 3           | 2           | 2           | 2           | 2          | 3          |
| Benidorm                                  | 4           | 39          | 81          | 81          | 89         | 69         |
| France                                    | 5           | 5           | 4           | 4           | 4          | 3          |
| Allentown                                 | 3           | 4           | 3           | 3           | 3          | 3          |
| OLDA                                      | 3           | 5           | 3           | 3           | 3          | 3          |
| Oxford                                    | 3           | 3           | 3           | 3           | 2          | 2          |
| Bellingham                                | 57          | 93          | 92          | 92          | 92         | 92         |
| Heysham                                   | 5           | 2           | 3           | 3           | 2          | 2          |
| Camperdown                                | 3           | 1           | 1           | 1           | 1          | 1          |
| <b>Intensität / a.u.</b>                  |             |             |             |             |            |            |
| Knoxville                                 | 1           | 1           | 1           | 1           | 1          | 1          |
| Philadelphia                              | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          | 0          |
| Benidorm                                  | 1           | 2           | 3           | 3           | 3          | 3          |
| France                                    | 1           | 1           | 1           | 1           | 0          | 1          |
| Allentown                                 | 1           | 1           | 0           | 1           | 0          | 0          |
| OLDA                                      | 1           | 1           | 1           | 1           | 0          | 0          |
| Oxford                                    | 0           | 0           | 0           | 1           | 0          | 0          |
| Bellingham                                | 2           | 3           | 3           | 3           | 3          | 3          |
| Heysham                                   | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          | 0          |
| Camperdown                                | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          | 0          |
| <b>Konzentration / mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,03</b> | <b>0,06</b> | <b>0,12</b> | <b>0,25</b> | <b>0,5</b> | <b>1,0</b> |



**Anhang A6:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 84/2. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 84/2</b>                           |             |             |             |             |            |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>         |             |             |             |             |            |
| <b>Knoxville</b>                          | 3.699       | 7.635       | 6.212       | 3.632       | 3.129      |
| <b>Philadelphia</b>                       | 22.262      | 59.315      | 59.306      | 59.253      | 59.327     |
| <b>Benidorm</b>                           | 6.681       | 6.463       | 6.094       | 5.864       | 5.578      |
| <b>France</b>                             | 3.081       | 44.933      | 38.450      | 5.876       | 6.775      |
| <b>Allentown</b>                          | 1.816       | 1.003       | 1.126       | 1.018       | 2.086      |
| <b>OLDA</b>                               | 59.177      | 59.070      | 59.365      | 59.402      | 59.302     |
| <b>Oxford</b>                             | 59.344      | 59.133      | 59.177      | 59.388      | 59.198     |
| <b>Bellingham</b>                         | 5.227       | 58.887      | 49.518      | 37.233      | 26.711     |
| <b>Heysham</b>                            | 4.697       | 44.127      | 57.373      | 46.215      | 13.898     |
| <b>Camperdown</b>                         | 5.545       | 34.429      | 51.300      | 55.399      | 58.171     |
| <b>Normiertes Signal / %</b>              |             |             |             |             |            |
| <b>Knoxville</b>                          | 6           | 12          | 10          | 6           | 5          |
| <b>Philadelphia</b>                       | 35          | 92          | 92          | 92          | 92         |
| <b>Benidorm</b>                           | 10          | 10          | 9           | 9           | 9          |
| <b>France</b>                             | 5           | 70          | 60          | 9           | 11         |
| <b>Allentown</b>                          | 3           | 2           | 2           | 2           | 3          |
| <b>OLDA</b>                               | 92          | 92          | 93          | 93          | 92         |
| <b>Oxford</b>                             | 92          | 92          | 92          | 93          | 92         |
| <b>Bellingham</b>                         | 8           | 92          | 77          | 58          | 42         |
| <b>Heysham</b>                            | 7           | 69          | 89          | 72          | 22         |
| <b>Camperdown</b>                         | 9           | 54          | 80          | 86          | 91         |
| <b>Intensität / a.u.</b>                  |             |             |             |             |            |
| <b>Knoxville</b>                          | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| <b>Philadelphia</b>                       | 2           | 3           | 3           | 3           | 3          |
| <b>Benidorm</b>                           | 1           | 0           | 0           | 0           | 1          |
| <b>France</b>                             | 1           | 3           | 2           | 0           | 1          |
| <b>Allentown</b>                          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| <b>OLDA</b>                               | 3           | 3           | 3           | 3           | 3          |
| <b>Oxford</b>                             | 3           | 3           | 3           | 3           | 3          |
| <b>Bellingham</b>                         | 1           | 3           | 3           | 2           | 2          |
| <b>Heysham</b>                            | 1           | 3           | 3           | 3           | 1          |
| <b>Camperdown</b>                         | 1           | 2           | 3           | 3           | 3          |
| <b>Konzentration / mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,03</b> | <b>0,28</b> | <b>0,57</b> | <b>1,14</b> | <b>2,3</b> |

**Anhang A7:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 30/1. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 30/1</b>                               |              |             |             |             |             |
|-----------------------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 5.549        | 4.846       | 4.787       | 4.894       | 4.543       |
| Philadelphia                                  | 9.709        | 9.578       | 16.992      | 52.656      | 59.464      |
| Benidorm                                      | 7.874        | 7.696       | 8.782       | 7.664       | 7.028       |
| France                                        | 4.858        | 4.809       | 4.515       | 4.039       | 3.926       |
| Allentown                                     | 2.214        | 1.624       | 1.518       | 1.464       | 1.425       |
| OLDA                                          | 7.745        | 54.636      | 59.106      | 59.021      | 59.160      |
| Oxford                                        | 9.334        | 22.221      | 58.824      | 59.088      | 59.024      |
| Bellingham                                    | 5.595        | 5.393       | 5.329       | 6.173       | 20.566      |
| Heysham                                       | 5.471        | 6.319       | 14.903      | 44.619      | 54.497      |
| Camperdown                                    | 6.312        | 7.534       | 20.390      | 51.419      | 59.026      |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 9            | 8           | 7           | 8           | 7           |
| Philadelphia                                  | 15           | 15          | 26          | 82          | 93          |
| Benidorm                                      | 12           | 12          | 14          | 12          | 11          |
| France                                        | 8            | 7           | 7           | 6           | 6           |
| Allentown                                     | 3            | 3           | 2           | 2           | 2           |
| OLDA                                          | 12           | 85          | 92          | 92          | 92          |
| Oxford                                        | 15           | 35          | 92          | 92          | 92          |
| Bellingham                                    | 9            | 8           | 8           | 10          | 32          |
| Heysham                                       | 9            | 10          | 23          | 70          | 85          |
| Camperdown                                    | 10           | 12          | 32          | 80          | 92          |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 1            | 1           | 1           | 0           | 1           |
| Philadelphia                                  | 1            | 1           | 1           | 3           | 3           |
| Benidorm                                      | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| France                                        | 1            | 1           | 1           | 0           | 1           |
| Allentown                                     | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| OLDA                                          | 1            | 3           | 3           | 3           | 3           |
| Oxford                                        | 1            | 2           | 3           | 3           | 3           |
| Bellingham                                    | 1            | 1           | 1           | 1           | 2           |
| Heysham                                       | 1            | 1           | 1           | 3           | 3           |
| Camperdown                                    | 1            | 1           | 2           | 3           | 3           |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,015</b> | <b>0,03</b> | <b>0,06</b> | <b>0,12</b> | <b>0,24</b> |

**Anhang A8:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 30/4. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 30/4</b>                               |             |             |             |             |            |
|-----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 4.472       | 4.283       | 4.200       | 4.631       | 3.955      |
| Philadelphia                                  | 9.262       | 12.570      | 11.208      | 19.545      | 20.977     |
| Benidorm                                      | 6.764       | 7.145       | 7.225       | 11.344      | 12.944     |
| France                                        | 3.617       | 3.819       | 3.468       | 3.335       | 3.491      |
| Allentown                                     | 1.360       | 1.359       | 1.238       | 1.282       | 1.288      |
| OLDA                                          | 2.756       | 2.941       | 4.114       | 7.085       | 5.866      |
| Oxford                                        | 7.394       | 7.036       | 6.867       | 7.573       | 6.748      |
| Bellingham                                    | 4.903       | 4.917       | 6.456       | 21.530      | 32.982     |
| Heysham                                       | 5.287       | 5.505       | 5.522       | 5.205       | 6.344      |
| Camperdown                                    | 6.269       | 6.607       | 11.223      | 23984       | 24.150     |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 7           | 7           | 7           | 7           | 6          |
| Philadelphia                                  | 14          | 20          | 17          | 30          | 33         |
| Benidorm                                      | 11          | 11          | 11          | 18          | 20         |
| France                                        | 6           | 6           | 5           | 5           | 5          |
| Allentown                                     | 2           | 2           | 2           | 2           | 2          |
| OLDA                                          | 4           | 5           | 6           | 11          | 9          |
| Oxford                                        | 12          | 11          | 11          | 12          | 11         |
| Bellingham                                    | 8           | 8           | 10          | 34          | 51         |
| Heysham                                       | 8           | 9           | 9           | 8           | 10         |
| Camperdown                                    | 10          | 10          | 17          | 37          | 38         |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 0           | 1           | 1           | 1           | 0          |
| Philadelphia                                  | 1           | 1           | 1           | 2           | 2          |
| Benidorm                                      | 0           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| France                                        | 0           | 1           | 1           | 0           | 0          |
| Allentown                                     | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| OLDA                                          | 0           | 0           | 1           | 1           | 1          |
| Oxford                                        | 0           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| Bellingham                                    | 0           | 1           | 1           | 2           | 2          |
| Heysham                                       | 0           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| Camperdown                                    | 0           | 1           | 1           | 2           | 2          |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,04</b> | <b>0,09</b> | <b>0,17</b> | <b>0,35</b> | <b>0,7</b> |

**Anhang A9:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 3. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^7$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 3</b>                                  |              |              |             |             |             |             |
|-----------------------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 4.532        | 4.351        | 4.473       | 4.744       | 4.425       | 4.196       |
| Philadelphia                                  | 2.677        | 2.192        | 2.222       | 2.288       | 2.001       | 3.127       |
| Benidorm                                      | 1.571        | 1.791        | 5.700       | 11.659      | 15.791      | 16.563      |
| France                                        | 6.778        | 12.517       | 39.697      | 58.032      | 58.846      | 59.065      |
| Allentown                                     | 2.655        | 2.556        | 2.521       | 2.423       | 2.266       | 2.268       |
| OLDA                                          | 2.460        | 2.254        | 2.323       | 2.135       | 3.659       | 4.314       |
| Oxford                                        | 2.384        | 2.217        | 2.105       | 2.148       | 2.016       | 1.873       |
| Bellingham                                    | 7.157        | 7.250        | 7.384       | 7.284       | 6.678       | 6.302       |
| Heysham                                       | 2.454        | 14.562       | 36.886      | 59.105      | 59.139      | 59.021      |
| Camperdown                                    | 882          | 825          | 781         | 1.254       | 1.260       | 1.458       |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 7            | 7            | 7           | 7           | 7           | 7           |
| Philadelphia                                  | 4            | 3            | 3           | 4           | 3           | 5           |
| Benidorm                                      | 2            | 3            | 9           | 18          | 25          | 26          |
| France                                        | 11           | 20           | 62          | 90          | 92          | 92          |
| Allentown                                     | 4            | 4            | 4           | 4           | 4           | 4           |
| OLDA                                          | 4            | 4            | 4           | 3           | 6           | 7           |
| Oxford                                        | 4            | 3            | 3           | 3           | 3           | 3           |
| Bellingham                                    | 11           | 11           | 12          | 11          | 10          | 10          |
| Heysham                                       | 4            | 23           | 57          | 92          | 92          | 92          |
| Camperdown                                    | 1            | 1            | 1           | 2           | 2           | 2           |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 1            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Philadelphia                                  | 1            | 0            | 0           | 0           | 0           | 1           |
| Benidorm                                      | 0            | 0            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| France                                        | 1            | 1            | 2           | 3           | 3           | 3           |
| Allentown                                     | 1            | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| OLDA                                          | 1            | 0            | 0           | 0           | 1           | 1           |
| Oxford                                        | 0            | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Bellingham                                    | 1            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Heysham                                       | 1            | 1            | 2           | 3           | 3           | 3           |
| Camperdown                                    | 0            | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,018</b> | <b>0,035</b> | <b>0,07</b> | <b>0,14</b> | <b>0,28</b> | <b>0,56</b> |

**Anhang A10:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den pAb. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>pAb</b>                             |             |             |            |            |            |            |
|----------------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>      |             |             |            |            |            |            |
| Knoxville                              | 37.856      | 5.132       | 5.328      | 4.937      | 4.968      | 5.945      |
| Philadelphia                           | 3.567       | 5.045       | 5.969      | 4.789      | 4.626      | 3.767      |
| Benidorm                               | 18.572      | 26.888      | 28.608     | 27.126     | 26.626     | 27.580     |
| France                                 | 4.854       | 2.927       | 2.947      | 2.807      | 2.633      | 3.106      |
| Allentown                              | 2.509       | 3.163       | 3.895      | 3.880      | 3.847      | 3.416      |
| OLDA                                   | 659         | 1.496       | 1.480      | 1.177      | 1.341      | 1.640      |
| Oxford                                 | 763         | 915         | 1.046      | 1.245      | 1.473      | 1.697      |
| Bellingham                             | 783         | 1.492       | 1.516      | 1.817      | 1.572      | 1.863      |
| Heysham                                | 618         | 920         | 1.411      | 1.243      | 853        | 753        |
| Camperdown                             | 1.286       | 2.048       | 2.599      | 2.102      | 1.854      | 2.659      |
| <b>Normiertes Signal / %</b>           |             |             |            |            |            |            |
| Knoxville                              | 6           | 8           | 8          | 8          | 8          | 9          |
| Philadelphia                           | 6           | 8           | 9          | 7          | 7          | 6          |
| Benidorm                               | 29          | 42          | 45         | 42         | 42         | 43         |
| France                                 | 8           | 5           | 5          | 4          | 4          | 5          |
| Allentown                              | 4           | 5           | 6          | 6          | 6          | 5          |
| OLDA                                   | 1           | 2           | 2          | 2          | 2          | 3          |
| Oxford                                 | 1           | 1           | 2          | 2          | 2          | 3          |
| Bellingham                             | 1           | 2           | 2          | 3          | 2          | 3          |
| Heysham                                | 1           | 1           | 2          | 2          | 1          | 1          |
| Camperdown                             | 2           | 3           | 4          | 3          | 3          | 4          |
| <b>Intensität / a.u.</b>               |             |             |            |            |            |            |
| Knoxville                              | 0           | 1           | 1          | 0          | 0          | 1          |
| Philadelphia                           | 0           | 1           | 1          | 0          | 0          | 0          |
| Benidorm                               | 1           | 2           | 2          | 2          | 2          | 2          |
| France                                 | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| Allentown                              | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| OLDA                                   | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| Oxford                                 | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| Bellingham                             | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| Heysham                                | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| Camperdown                             | 0           | 0           | 0          | 0          | 0          | 0          |
| Konzentration /<br>mg mL <sup>-1</sup> | <b>0,07</b> | <b>0,15</b> | <b>0,3</b> | <b>0,6</b> | <b>1,2</b> | <b>2,4</b> |

**Anhang A11:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 81/2. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 81/2</b>                               |             |              |              |              |              |             |
|-----------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |             |              |              |              |              |             |
| Knoxville                                     | 8.384       | 19.111       | 29.564       | 30.967       | 31.461       | 25.695      |
| Philadelphia                                  | 12.277      | 27.945       | 50.512       | 56.401       | 52.690       | 34.201      |
| Benidorm                                      | 43.158      | 58.591       | 58.889       | 58.807       | 59.034       | 58.978      |
| France                                        | 6.986       | 8.797        | 12.888       | 13.438       | 11.839       | 10.048      |
| Allentown                                     | 5.667       | 11.159       | 21.218       | 20.586       | 21.398       | 21.355      |
| OLDA                                          | 387         | 355          | 522          | 471          | 451          | 383         |
| Oxford                                        | 651         | 1.453        | 3.810        | 3.833        | 2.963        | 1.774       |
| Bellingham                                    | 2.295       | 2.608        | 2.846        | 2.893        | 2.851        | 2.961       |
| Heysham                                       | 7.736       | 7.808        | 7.933        | 7.781        | 7.437        | 7.437       |
| Camperdown                                    | 1.103       | 811          | 867          | 883          | 913          | 947         |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |             |              |              |              |              |             |
| Knoxville                                     | 13          | 30           | 46           | 48           | 49           | 40          |
| Philadelphia                                  | 19          | 44           | 79           | 88           | 82           | 53          |
| Benidorm                                      | 67          | 91           | 92           | 92           | 92           | 92          |
| France                                        | 11          | 14           | 20           | 21           | 18           | 16          |
| Allentown                                     | 9           | 17           | 33           | 32           | 33           | 33          |
| OLDA                                          | 1           | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           |
| Oxford                                        | 1           | 2            | 6            | 6            | 5            | 3           |
| Bellingham                                    | 4           | 4            | 4            | 5            | 4            | 5           |
| Heysham                                       | 12          | 12           | 12           | 12           | 12           | 12          |
| Camperdown                                    | 2           | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |             |              |              |              |              |             |
| Knoxville                                     | 1           | 1            | 2            | 2            | 2            | 2           |
| Philadelphia                                  | 1           | 2            | 3            | 3            | 3            | 2           |
| Benidorm                                      | 3           | 3            | 3            | 3            | 3            | 3           |
| France                                        | 1           | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           |
| Allentown                                     | 1           | 1            | 2            | 2            | 2            | 2           |
| OLDA                                          | 0           | 0            | 0            | 0            | 0            | 0           |
| Oxford                                        | 0           | 1            | 1            | 1            | 1            | 0           |
| Bellingham                                    | 1           | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           |
| Heysham                                       | 1           | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           |
| Camperdown                                    | 0           | 1            | 0            | 1            | 0            | 0           |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,03</b> | <b>0,059</b> | <b>0,119</b> | <b>0,238</b> | <b>0,475</b> | <b>0,95</b> |

**Anhang A12:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 48/3. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| mAb 48/3                            |       |       |       |        |        |        |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| CL-Signalintensität / a.u.          |       |       |       |        |        |        |
| Knoxville                           | 6.551 | 6.455 | 6.237 | 6.219  | 7.019  | 9.718  |
| Philadelphia                        | 8.382 | 7.802 | 8.220 | 11.830 | 16.017 | 14.242 |
| Benidorm                            | 989   | 1.811 | 9.959 | 53.860 | 58.166 | 25.957 |
| France                              | 7.561 | 7.515 | 7.271 | 7.406  | 7.592  | 7.017  |
| Allentown                           | 3.310 | 3178  | 3.126 | 3.905  | 5.184  | 10.399 |
| OLDA                                | 313   | 326   | 596   | 1.270  | 1.619  | 1.217  |
| Oxford                              | 655   | 660   | 821   | 1.594  | 2.198  | 1.162  |
| Bellingham                          | 2.485 | 2.432 | 2.630 | 2.993  | 3.414  | 5.655  |
| Heysham                             | 8.321 | 8.182 | 7.906 | 7.210  | 7.251  | 12.022 |
| Camperdown                          | 787   | 789   | 837   | 1.120  | 1.138  | 1.599  |
| Normiertes Signal / %               |       |       |       |        |        |        |
| Knoxville                           | 10    | 10    | 10    | 10     | 11     | 15     |
| Philadelphia                        | 13    | 12    | 13    | 18     | 25     | 22     |
| Benidorm                            | 2     | 3     | 16    | 84     | 91     | 40     |
| France                              | 12    | 12    | 11    | 12     | 12     | 11     |
| Allentown                           | 5     | 5     | 5     | 6      | 8      | 16     |
| OLDA                                | 0     | 1     | 1     | 2      | 3      | 2      |
| Oxford                              | 1     | 1     | 1     | 2      | 3      | 2      |
| Bellingham                          | 4     | 4     | 4     | 5      | 5      | 9      |
| Heysham                             | 13    | 13    | 12    | 11     | 11     | 19     |
| Camperdown                          | 1     | 1     | 1     | 2      | 2      | 2      |
| Intensität / a.u.                   |       |       |       |        |        |        |
| Knoxville                           | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      | 1      |
| Philadelphia                        | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      | 1      |
| Benidorm                            | 1     | 1     | 1     | 3      | 3      | 2      |
| France                              | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      | 1      |
| Allentown                           | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      | 1      |
| OLDA                                | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      |
| Oxford                              | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      |
| Bellingham                          | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      | 1      |
| Heysham                             | 1     | 1     | 1     | 1      | 1      | 1      |
| Camperdown                          | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      |
| Konzentration / mg mL <sup>-1</sup> | 0,015 | 0,031 | 0,061 | 0,123  | 0,245  | 0,49   |

**Anhang A13:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 10/7. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 10/7</b>                               |              |              |              |              |             |            |            |
|-----------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |              |              |              |              |             |            |            |
| Knoxville                                     | 6.920        | 6.922        | 7.005        | 6.880        | 6.583       | 6.054      | 6.154      |
| Philadelphia                                  | 8.738        | 8.695        | 8.752        | 8.660        | 8.545       | 8.207      | 8.789      |
| Benidorm                                      | 658          | 543          | 641          | 569          | 579         | 960        | 1.457      |
| France                                        | 8.211        | 8.292        | 8.439        | 8.421        | 7.842       | 8.043      | 7.652      |
| Allentown                                     | 2.995        | 3.180        | 3.034        | 2.875        | 2.674       | 2.714      | 2.611      |
| OLDA                                          | 385          | 283          | 682          | 1.444        | 5.272       | 10.279     | 11.906     |
| Oxford                                        | 503          | 483          | 506          | 655          | 2.557       | 8.157      | 11.915     |
| Bellingham                                    | 2.662        | 2.526        | 2.647        | 2.663        | 2.660       | 3.695      | 4.327      |
| Heysham                                       | 8.072        | 7.955        | 7.908        | 8.947        | 8.358       | 8.903      | 8.742      |
| Camperdown                                    | 952          | 890          | 872          | 1.072        | 3.166       | 7.177      | 6.703      |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |              |              |              |              |             |            |            |
| Knoxville                                     | 11           | 11           | 11           | 11           | 10          | 9          | 10         |
| Philadelphia                                  | 14           | 14           | 14           | 13           | 13          | 13         | 14         |
| Benidorm                                      | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 1          | 2          |
| France                                        | 13           | 13           | 13           | 13           | 12          | 13         | 12         |
| Allentown                                     | 5            | 5            | 5            | 4            | 4           | 4          | 4          |
| OLDA                                          | 1            | 0            | 1            | 2            | 8           | 16         | 19         |
| Oxford                                        | 1            | 1            | 1            | 1            | 4           | 13         | 19         |
| Bellingham                                    | 4            | 4            | 4            | 4            | 4           | 6          | 7          |
| Heysham                                       | 13           | 12           | 12           | 14           | 13          | 14         | 14         |
| Camperdown                                    | 1            | 1            | 1            | 2            | 5           | 11         | 10         |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |              |              |              |              |             |            |            |
| Knoxville                                     | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 0          | 0          |
| Philadelphia                                  | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 1          | 0          |
| Benidorm                                      | 0            | 0            | 0            | 0            | 0           | 0          | 0          |
| France                                        | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 1          | 0          |
| Allentown                                     | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 0          | 0          |
| OLDA                                          | 0            | 0            | 1            | 1            | 1           | 1          | 1          |
| Oxford                                        | 0            | 0            | 0            | 0            | 1           | 1          | 1          |
| Bellingham                                    | 0            | 1            | 1            | 1            | 1           | 0          | 0          |
| Heysham                                       | 1            | 1            | 1            | 1            | 1           | 1          | 0          |
| Camperdown                                    | 0            | 0            | 1            | 1            | 1           | 1          | 0          |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,003</b> | <b>0,006</b> | <b>0,011</b> | <b>0,024</b> | <b>0,05</b> | <b>0,1</b> | <b>0,2</b> |



**Anhang A14:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 20/1. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 20/1</b>                               |             |             |             |             |             |             |
|-----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |             |             |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 5.362       | 5.140       | 4.392       | 4.059       | 4.189       | 4.403       |
| Philadelphia                                  | 2.135       | 1.963       | 2178        | 1.724       | 1.761       | 1.617       |
| Benidorm                                      | 4.746       | 53.803      | 58.868      | 58.604      | 58.933      | 58.838      |
| France                                        | 4.683       | 4.046       | 4.048       | 4.087       | 3.874       | 3.680       |
| Allentown                                     | 2.506       | 2.401       | 3.207       | 2.643       | 2.345       | 2.497       |
| OLDA                                          | 2.740       | 2.648       | 3.084       | 2.714       | 2.554       | 2.388       |
| Oxford                                        | 2.599       | 2.558       | 6.245       | 5.549       | 6.204       | 6.164       |
| Bellingham                                    | 6.908       | 7.058       | 6.704       | 7.557       | 6.225       | 6.288       |
| Heysham                                       | 1.416       | 1.182       | 1.145       | 1.489       | 1.356       | 1.231       |
| Camperdown                                    | 1.037       | 896         | 832         | 568         | 479         | 469         |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |             |             |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 8           | 8           | 7           | 6           | 7           | 7           |
| Philadelphia                                  | 3           | 3           | 3           | 3           | 3           | 3           |
| Benidorm                                      | 7           | 84          | 92          | 91          | 92          | 92          |
| France                                        | 7           | 6           | 6           | 6           | 6           | 6           |
| Allentown                                     | 4           | 4           | 5           | 4           | 4           | 4           |
| OLDA                                          | 4           | 4           | 5           | 4           | 4           | 4           |
| Oxford                                        | 4           | 4           | 10          | 9           | 10          | 10          |
| Bellingham                                    | 11          | 11          | 10          | 12          | 10          | 10          |
| Heysham                                       | 2           | 2           | 2           | 2           | 2           | 2           |
| Camperdown                                    | 2           | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |             |             |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Philadelphia                                  | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Benidorm                                      | 1           | 3           | 3           | 3           | 3           | 3           |
| France                                        | 1           | 1           | 0           | 1           | 0           | 1           |
| Allentown                                     | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| OLDA                                          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Oxford                                        | 0           | 0           | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Bellingham                                    | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Heysham                                       | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Camperdown                                    | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           | 0           |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,02</b> | <b>0,07</b> | <b>0,13</b> | <b>0,27</b> | <b>0,54</b> | <b>1,07</b> |

**Anhang A15:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 3. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 3</b>                                  |              |              |             |             |             |             |
|-----------------------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 4.341        | 4.285        | 4.222       | 5.216       | 5.446       | 3.779       |
| Philadelphia                                  | 2.251        | 1.658        | 1.539       | 1.358       | 2.148       | 1.359       |
| Benidorm                                      | 1.314        | 1.500        | 1.672       | 3.220       | 5.545       | 8.214       |
| France                                        | 3.416        | 3.261        | 3.145       | 3.103       | 3.120       | 2.831       |
| Allentown                                     | 2.233        | 2.385        | 2.427       | 2.491       | 2.629       | 2.646       |
| OLDA                                          | 2.395        | 2.276        | 2.441       | 2.244       | 2.169       | 2.123       |
| Oxford                                        | 6.082        | 5.775        | 5.575       | 5.500       | 5.010       | 4.292       |
| Bellingham                                    | 5.178        | 5.004        | 4.805       | 4.543       | 5.584       | 7.900       |
| Heysham                                       | 1.722        | 2.584        | 13.876      | 30.080      | 56.504      | 59.069      |
| Camperdown                                    | 999          | 847          | 715         | 490         | 484         | 494         |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 7            | 7            | 7           | 8           | 8           | 6           |
| Philadelphia                                  | 4            | 3            | 2           | 2           | 3           | 2           |
| Benidorm                                      | 2            | 2            | 3           | 5           | 9           | 13          |
| France                                        | 5            | 5            | 5           | 5           | 5           | 4           |
| Allentown                                     | 3            | 4            | 4           | 4           | 4           | 4           |
| OLDA                                          | 4            | 4            | 4           | 3           | 3           | 3           |
| Oxford                                        | 9            | 9            | 9           | 9           | 8           | 7           |
| Bellingham                                    | 8            | 8            | 7           | 7           | 9           | 12          |
| Heysham                                       | 3            | 4            | 22          | 47          | 88          | 92          |
| Camperdown                                    | 2            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |              |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 1            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Philadelphia                                  | 0            | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Benidorm                                      | 0            | 0            | 0           | 0           | 1           | 1           |
| France                                        | 1            | 1            | 0           | 0           | 1           | 1           |
| Allentown                                     | 0            | 0            | 0           | 0           | 1           | 0           |
| OLDA                                          | 0            | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Oxford                                        | 1            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Bellingham                                    | 1            | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Heysham                                       | 0            | 0            | 1           | 2           | 3           | 3           |
| Camperdown                                    | 0            | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,018</b> | <b>0,035</b> | <b>0,07</b> | <b>0,14</b> | <b>0,28</b> | <b>0,56</b> |

**Anhang A16:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 10/6. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| mAb 10/6                            |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CL-Signalintensität / a.u.          |       |       |       |       |       |       |
| Knoxville                           | 3.755 | 3.678 | 3.408 | 3.106 | 2.688 | 2.591 |
| Philadelphia                        | 1.903 | 2.081 | 1.928 | 2.238 | 1.470 | 3.350 |
| Benidorm                            | 998   | 992   | 1.053 | 1.343 | 1.194 | 995   |
| France                              | 2.604 | 2.533 | 2.347 | 2.323 | 2.278 | 2.238 |
| Allentown                           | 2.503 | 2.345 | 2.477 | 1.849 | 1.783 | 1.799 |
| OLDA                                | 2.144 | 2.122 | 2.040 | 2.282 | 3.047 | 3.518 |
| Oxford                              | 4.077 | 4.428 | 4.212 | 4.735 | 4.341 | 4.372 |
| Bellingham                          | 4.911 | 4.492 | 4.485 | 4.268 | 4.366 | 5.530 |
| Heysham                             | 2.913 | 2.843 | 2.958 | 2.877 | 2.339 | 2.563 |
| Camperdown                          | 2.015 | 844   | 742   | 491   | 402   | 714   |
| Normiertes Signal / %               |       |       |       |       |       |       |
| Knoxville                           | 6     | 6     | 5     | 5     | 4     | 4     |
| Philadelphia                        | 3     | 3     | 3     | 3     | 2     | 5     |
| Benidorm                            | 2     | 2     | 2     | 2     | 2     | 2     |
| France                              | 4     | 4     | 4     | 4     | 4     | 3     |
| Allentown                           | 4     | 4     | 4     | 3     | 3     | 3     |
| OLDA                                | 3     | 3     | 3     | 4     | 5     | 5     |
| Oxford                              | 6     | 7     | 7     | 7     | 7     | 7     |
| Bellingham                          | 8     | 7     | 7     | 7     | 7     | 9     |
| Heysham                             | 5     | 4     | 5     | 4     | 4     | 4     |
| Camperdown                          | 3     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Intensität / a.u.                   |       |       |       |       |       |       |
| Knoxville                           | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     |
| Philadelphia                        | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 1     |
| Benidorm                            | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| France                              | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     |
| Allentown                           | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 0     |
| OLDA                                | 1     | 1     | 0     | 1     | 1     | 1     |
| Oxford                              | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Bellingham                          | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Heysham                             | 1     | 1     | 1     | 1     | 0     | 1     |
| Camperdown                          | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| Konzentration / mg mL <sup>-1</sup> | 0,03  | 0,06  | 0,12  | 0,25  | 0,5   | 1,0   |

**Anhang A17:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 84/2. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 84/2</b>                               |             |             |             |             |            |
|-----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 3.648       | 3.336       | 3.249       | 3.160       | 3.150      |
| Philadelphia                                  | 8.804       | 32.281      | 40.835      | 38.261      | 30.661     |
| Benidorm                                      | 6.415       | 6.300       | 5.172       | 5.189       | 5.054      |
| France                                        | 4.526       | 4.736       | 5.120       | 4.950       | 4.007      |
| Allentown                                     | 3.551       | 2.720       | 2.550       | 2.574       | 2.646      |
| OLDA                                          | 15.063      | 20.995      | 19.948      | 2.0289      | 20.093     |
| Oxford                                        | 9.962       | 18.205      | 14.909      | 13.490      | 15.928     |
| Bellingham                                    | 386         | 4.386       | 3.792       | 1.680       | 1.028      |
| Heysham                                       | 4.441       | 41.35       | 3.801       | 3.512       | 3.983      |
| Camperdown                                    | 5.697       | 5.982       | 6.618       | 6.712       | 6.593      |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 6           | 5           | 5           | 5           | 5          |
| Philadelphia                                  | 14          | 50          | 64          | 60          | 48         |
| Benidorm                                      | 10          | 10          | 8           | 8           | 8          |
| France                                        | 7           | 7           | 8           | 8           | 6          |
| Allentown                                     | 6           | 4           | 4           | 4           | 4          |
| OLDA                                          | 23          | 33          | 31          | 32          | 31         |
| Oxford                                        | 16          | 28          | 23          | 21          | 25         |
| Bellingham                                    | 1           | 7           | 6           | 3           | 2          |
| Heysham                                       | 7           | 6           | 6           | 5           | 6          |
| Camperdown                                    | 9           | 9           | 10          | 10          | 10         |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| Philadelphia                                  | 1           | 2           | 2           | 2           | 2          |
| Benidorm                                      | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| France                                        | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| Allentown                                     | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| OLDA                                          | 1           | 2           | 2           | 2           | 2          |
| Oxford                                        | 1           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| Bellingham                                    | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| Heysham                                       | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| Camperdown                                    | 1           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,03</b> | <b>0,28</b> | <b>0,57</b> | <b>1,14</b> | <b>2,3</b> |

**Anhang A18:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 30/1. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 30/1</b>                               |              |             |             |             |             |
|-----------------------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 4.811        | 4.817       | 4.596       | 4.542       | 4.445       |
| Philadelphia                                  | 5.707        | 6.253       | 6.623       | 9.514       | 8.612       |
| Benidorm                                      | 6.931        | 6.488       | 6.679       | 5.734       | 5.802       |
| France                                        | 5.836        | 5.329       | 5.411       | 5.338       | 4.963       |
| Allentown                                     | 3.861        | 3.899       | 4.010       | 4.240       | 4.357       |
| OLDA                                          | 2.939        | 3.612       | 8.437       | 12.711      | 15.795      |
| Oxford                                        | 5.923        | 5.734       | 6.204       | 8.394       | 12.613      |
| Bellingham                                    | 171          | 162         | 219         | 407         | 1.030       |
| Heysham                                       | 4.479        | 4.366       | 4.140       | 4.164       | 4.496       |
| Camperdown                                    | 6.566        | 6.468       | 6.470       | 6.625       | 7.574       |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 7            | 8           | 7           | 7           | 7           |
| Philadelphia                                  | 9            | 10          | 10          | 15          | 13          |
| Benidorm                                      | 11           | 10          | 10          | 9           | 9           |
| France                                        | 9            | 8           | 8           | 8           | 8           |
| Allentown                                     | 6            | 6           | 6           | 7           | 7           |
| OLDA                                          | 5            | 6           | 13          | 20          | 25          |
| Oxford                                        | 9            | 9           | 10          | 13          | 20          |
| Bellingham                                    | 0            | 0           | 0           | 1           | 2           |
| Heysham                                       | 7            | 7           | 6           | 6           | 7           |
| Camperdown                                    | 10           | 10          | 10          | 10          | 12          |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |              |             |             |             |             |
| Knoxville                                     | 1            | 1           | 1           | 0           | 0           |
| Philadelphia                                  | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Benidorm                                      | 1            | 1           | 1           | 0           | 1           |
| France                                        | 1            | 1           | 1           | 0           | 1           |
| Allentown                                     | 0            | 1           | 1           | 0           | 0           |
| OLDA                                          | 0            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Oxford                                        | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Bellingham                                    | 0            | 0           | 0           | 0           | 0           |
| Heysham                                       | 1            | 1           | 1           | 0           | 0           |
| Camperdown                                    | 1            | 1           | 1           | 1           | 1           |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,015</b> | <b>0,03</b> | <b>0,06</b> | <b>0,12</b> | <b>0,24</b> |

**Anhang A19:** Auswertetabelle für die Konzentrationseinstellungen der Panel-Einstellungen für Sg 1 für den mAb 30/4. Angegeben sind die Konzentrationen des Fängerantikörpers, die erhaltenen CL-Signalintensitäten für die Messungen mit  $c = 10^5$  KBE mL<sup>-1</sup>, die daraus ermittelten normierten Werte und die resultierenden Intensitätswerte.

| <b>mAb 30/4</b>                               |             |             |             |             |            |
|-----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>CL-Signalintensität / a.u.</b>             |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 4.065       | 3.824       | 4.458       | 3.730       | 3.733      |
| Philadelphia                                  | 11.591      | 12.380      | 11.892      | 9.963       | 10.198     |
| Benidorm                                      | 7.013       | 7.492       | 6.270       | 6.315       | 6.265      |
| France                                        | 5.859       | 6.525       | 8.086       | 7.165       | 4.421      |
| Allentown                                     | 6.029       | 10.082      | 5.183       | 3.184       | 4.170      |
| OLDA                                          | 2.906       | 2.646       | 2.813       | 2.773       | 2.730      |
| Oxford                                        | 6.206       | 6.294       | 6.284       | 6.021       | 6.159      |
| Bellingham                                    | 359         | 545         | 1.112       | 1.350       | 1.051      |
| Heysham                                       | 4.448       | 4.113       | 3.781       | 3.569       | 4.397      |
| Camperdown                                    | 6.143       | 5.985       | 6.403       | 5.953       | 5.818      |
| <b>Normiertes Signal / %</b>                  |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 6           | 6           | 7           | 6           | 6          |
| Philadelphia                                  | 18          | 19          | 19          | 16          | 16         |
| Benidorm                                      | 11          | 12          | 10          | 10          | 10         |
| France                                        | 9           | 10          | 13          | 11          | 7          |
| Allentown                                     | 9           | 16          | 8           | 5           | 7          |
| OLDA                                          | 5           | 4           | 4           | 4           | 4          |
| Oxford                                        | 10          | 10          | 10          | 9           | 10         |
| Bellingham                                    | 1           | 1           | 2           | 2           | 2          |
| Heysham                                       | 7           | 6           | 6           | 6           | 7          |
| Camperdown                                    | 10          | 9           | 10          | 9           | 9          |
| <b>Intensität / a.u.</b>                      |             |             |             |             |            |
| Knoxville                                     | 0           | 0           | 1           | 1           | 0          |
| Philadelphia                                  | 1           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| Benidorm                                      | 0           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| France                                        | 0           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| Allentown                                     | 0           | 1           | 1           | 0           | 1          |
| OLDA                                          | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| Oxford                                        | 0           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| Bellingham                                    | 0           | 0           | 0           | 0           | 0          |
| Heysham                                       | 0           | 0           | 1           | 1           | 1          |
| Camperdown                                    | 0           | 1           | 1           | 1           | 1          |
| <b>Konzentration /<br/>mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>0,04</b> | <b>0,09</b> | <b>0,17</b> | <b>0,35</b> | <b>0,7</b> |

**Anhang 20: Messprogramm der haRPA am MCR 3, nach Andreas Kunze [329].**

| RPA-Programm                                                                                                              | Erläuterungen                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Block start                                                                                                               |                                                                                                                                   |
| Referenz-Check für alle Pumpen und Ventile                                                                                | Referenzcheck für alle Pumpen und Ventile (P0,P1 nicht)                                                                           |
| Block end                                                                                                                 |                                                                                                                                   |
| Block start                                                                                                               |                                                                                                                                   |
| T39 °C<br>V6, Pos 1<br>V7, pos 4<br>V5, pos 6<br>Message Zugabe; confirm<br>V4, Pos 1<br>Wait 10 s                        | Beheizen der Flusszelle<br>Probenweg<br><br>Einlegen des Chips<br>Flusszelle: V4, Pos 1 = hinten;<br>V4, Pos 2 = vorne            |
| Block end                                                                                                                 |                                                                                                                                   |
| Block start                                                                                                               |                                                                                                                                   |
| T37 °C<br>V2, Pos 2<br>Pump 4, Intake 1000 µl, 500 µl/s<br>V2, Pos 4<br>V5, Pos 4<br>Pump 4, Dispense, 1000 µl, 200 µl/s  | Spülen der Flusszelle                                                                                                             |
| Block end: loop 3                                                                                                         | 3 mal wiederholen                                                                                                                 |
| Block start                                                                                                               |                                                                                                                                   |
| T 37 °C<br>V5, Pos 5<br>Pump 0, Dispense 150 µl, 50 µl/s<br>Pump 0, Dispense 600 µl, 2 µl/s                               | Detektion mit SA-HRP                                                                                                              |
| Block end                                                                                                                 |                                                                                                                                   |
| Block start                                                                                                               |                                                                                                                                   |
| T 37 °C<br>V2, Pos 2<br>Pump 4, Intake 1000 µl, 500 µl/s<br>V2, Pos 4<br>V5, Pos 4<br>Pump 4, Dispense, 1000 µl, 200 µl/s | Spülschritt nach Detektion<br>Flusszelle beheizt<br>Weg zu P0<br>SA-HRP Totvolumen zum Chip:<br>136.46 µL<br><br>SA-HRP über Chip |
| Block end: loop 3                                                                                                         | 3 mal wiederholen                                                                                                                 |
| Block start                                                                                                               |                                                                                                                                   |
| T 35 °C<br>V3, Pos 5<br>Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s<br>V3, Pos 6<br>Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s                   | Mischen der CL-Reagenzien<br><br>Luminol<br><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                     |

|                                                                                                                                                            |                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| V3, Pos 5<br>Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s<br>V3, Pos 6<br>Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s<br>V3, Pos 3<br>V5, Pos 3<br>Pump 3, Dispense, 400µl, 20 µl/s | Luminol<br><br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br><br>Abgabe H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Luminol-Gemisch |
| Block end                                                                                                                                                  |                                                                                                            |
| Block start                                                                                                                                                |                                                                                                            |
| Camera, Exposure 60 s, front channel<br>Buzzer Duration 2000                                                                                               | Aufnehmen des Messbildes<br>Kamera 60 s; vorne/ hinten                                                     |
| Block end                                                                                                                                                  |                                                                                                            |
| Block start                                                                                                                                                |                                                                                                            |
| V2, Pos 2<br>Pump 4, Intake 1500 µl; 500 µl/s<br>V2, Pos 4<br>V5, Pos 4<br>Pump 4, Dispense, 1500 µl, 500 µl/s                                             | Spülen des gesamten Fluidiksystems nach<br>der Messung                                                     |
| Block end                                                                                                                                                  |                                                                                                            |
| Block start                                                                                                                                                |                                                                                                            |
| V1, Pos 3<br>Pump 5, Intake 1000 µl; 68 µl/s<br>V1, Pos 5<br>V6, Pos 1<br>V7, Pos 4<br>V5, Pos 6<br>Pump 5, Dispense, 1000 µl, 68 µl/s                     |                                                                                                            |
| Block end; loops 3                                                                                                                                         |                                                                                                            |
| Block start                                                                                                                                                |                                                                                                            |
| Message; Messung beendet; confirm                                                                                                                          |                                                                                                            |
| Block end                                                                                                                                                  |                                                                                                            |



**Anhang 21: Messprogramm des CL-SMIA am MCR 3, nach Anika Wunderlich [206, 335].**

| CL-SMIA Messprogramm                                                                                                                                                       | Erläuterungen                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Block start                                                                                                                                                                |                                                                                        |
| T 35 °C<br>V6, Pos 4                                                                                                                                                       | Beheizen der Flusszelle<br>Probenweg                                                   |
| V7, Pos 4<br>V5, Pos 6<br>Message Probe eingespritzt; Confirm<br>V6, Pos 1<br>V4, Pos 1                                                                                    | 600 µL Probenvolumen injizieren<br><br>FZ hinten                                       |
| V1, Pos 3<br>Pump 5, Intake 750 µL, 68 µL s <sup>-1</sup><br>V1, Pos 5                                                                                                     | Laufpuffer schiebt nach                                                                |
| Pump 5, Dispense 150 µL, 50 µL s <sup>-1</sup>                                                                                                                             | Totvolumen bis zum Chip                                                                |
| Block start<br>Pump 5, Dispense 600 µL, 0,5 µL s <sup>-1</sup><br>Wait 30 s<br>Block end, Loops 10<br>Block end                                                            | Stop-Flow für Probe, 60 µL Inkremente<br>30 s Interaktionszeit für Probe mit Fänger-AK |
| Block start<br>V2, Pos 2<br>Pump 4, Intake 2000 µL, 500 µL s <sup>-1</sup><br>V2, Pos 4<br>V5, Pos 4<br>Pump 4, Dispense 2000 µL, 100 µL s <sup>-1</sup><br>Block end      | Spülschritt<br><br>Laufpuffer aufziehen<br><br>Laufpuffer abgeben                      |
| Block start<br>V5, Pos 1<br>V4, Pos 1<br>Pump 1, Dispense 150 µL, 50 µL s <sup>-1</sup>                                                                                    | Detektions-AK                                                                          |
| Block start<br>Pump 1, Dispense 60 µL, 2 µL s <sup>-1</sup><br>Wait 5 sec<br>Block end, Loops 10                                                                           |                                                                                        |
| V1, Pos 3<br>Pump 5, Intake 1000 µL, 68 µL s <sup>-1</sup><br>V1, Pos 6<br>V5, Pos 2<br>V4, Pos 1<br>Pump 5, Dispense 1000 µL, 20 µL s <sup>-1</sup><br>Block end, Loops 2 | Laufpuffer schiebt nach<br><br>Laufpuffer spült langsam nach                           |
| Block start<br>T 35 °C<br>V5, Pos 5                                                                                                                                        | Beheizen der Flusszelle                                                                |
| Pump 0, Dispense 150 µL, 50 µL s <sup>-1</sup><br>Pump 0, Dispense 600 µL, 2 µL s <sup>-1</sup>                                                                            | Strep-HRP Totvolumen zum Chip<br>Strep-HRP über Chip                                   |
| Block start<br>V2, Pos 2                                                                                                                                                   | Spülschritt                                                                            |

|                                                                                                    |                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Pump 4, Intake 2000 $\mu\text{L}$ , 500 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>V2, Pos 4<br>V5, Pos 4             | Laufpuffer aufziehen                            |
| Pump 4, Dispense 2000 $\mu\text{L}$ , 100 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>Block end                        | Laufpuffer abgeben                              |
| Block start<br>V3, Pos 5                                                                           |                                                 |
| Pump 3, Intake 100 $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>V3, Pos 6                           | $\text{H}_2\text{O}_2$                          |
| Pump 3, Intake 100 $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>V3, Pos 5                           | Luminol                                         |
| Pump 3, Intake 100 $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>V3, Pos 6                           | $\text{H}_2\text{O}_2$                          |
| Pump 3, Intake 100 $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>V3, Pos 3<br>V5, Pos 3              | Luminol                                         |
| Pump 3, Dispense 400 $\mu\text{L}$ , 20 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>Block end                          | Abgabe $\text{H}_2\text{O}_2$ / Luminol-Gemisch |
| Block start                                                                                        |                                                 |
| Camera, Exposure 60 s, front channel<br>Buzzer Duration 2000<br>Block end                          | Bild-Aufnahme 60 s                              |
| Block start<br>V2, Pos 2                                                                           | Spülschritt                                     |
| Pump 4, Intake 1500 $\mu\text{L}$ , 500 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>V2, Pos 4<br>V5, Pos 4             | Laufpuffer aufziehen                            |
| Pump 4, Dispense 1500 $\mu\text{L}$ , 500 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>Block end                        | Laufpuffer abgeben                              |
| Block start<br>V1, Pos 3                                                                           | Spülschritt                                     |
| Pump 5, Intake 1000 $\mu\text{L}$ , 68 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>V1, Pos 5<br>V6, Pos 1<br>V5, Pos 6 | Laufpuffer aufziehen                            |
| Pump 5, Dispense, 1000 $\mu\text{L}$ , 68 $\mu\text{L s}^{-1}$<br>Block end, 3 loops               | Laufpuffer im kompletten System                 |
| Block start                                                                                        |                                                 |
| Block end                                                                                          |                                                 |

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                |                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| AK             | Antikörper                                                                      |
| A/T            | Adenin/Thymin                                                                   |
| a.u.           | Arbitrary unit                                                                  |
| BAL            | Bronchoalveoläre Lavage                                                         |
| BCYE-Agar      | Buffered Charcoal Yeast Extract agar                                            |
| Bp             | <i>base pair</i> , Basenpaar                                                    |
| C.             | <i>Clostridium</i>                                                              |
| CCD            | Charge-coupled device (ladungsgekoppeltes Bauteil)                              |
| CL-SMIA        | Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay                                |
| DAPPG          | Polypropylenglycoldiamin                                                        |
| DEAE           | Diethylaminoethanol                                                             |
| dNTP           | desoxynukleosidtriphosphat                                                      |
| DMAP           | 4-(Dimethylamino)-pyridin                                                       |
| DMF            | Dimethylformamid                                                                |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                                                          |
| DSC            | <i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat                                             |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                                         |
| EDC            | <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide<br>Hydrochlorid |
| EIA            | Enzymatischer Immunoassay                                                       |
| ELISA          | Enzyme-linked immunosorbent assay<br>(Enzym-gekoppelter Immunabsorptionstest)   |
| FITC           | Fluoresceinisothiocyanat                                                        |
| FW             | Forward                                                                         |
| G/C            | Guanin/Cytosin                                                                  |
| GOPTS          | 3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan                                               |

|           |                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| GU        | <i>Genomic Unit</i> , genomische Einheit                                                      |
| GVPC-Agar | Glycin-Vancomycin-Polymyxin-Cycloheximid Agar                                                 |
| gyrB      | Untereinheit B des Gyrase Enzyms                                                              |
| haRPA     | Heterogene asymmetrische Rekombinase Polymerase Amplifikation                                 |
| HDA       | Helikase-abhängige Amplifikation                                                              |
| HEPES     | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                                         |
| HRP       | Meerrettich-Peroxidase, <i>horseradish peroxidase</i>                                         |
| iNAAT     | <i>isothermal nucleic acid amplification test</i> , isotherme Nukleinsäureamplifikations-Test |
| IF        | Immunofluoreszenz                                                                             |
| ITS       | <i>internal transcribed spacer</i>                                                            |
| KBE       | Koloniebildende Einheit                                                                       |
| L.        | <i>Legionella</i>                                                                             |
| LAMP      | <i>Loop Mediated Isothermal Amplification</i> , Schleifen-vermittelte isotherme Amplifikation |
| LPS       | Lipopolysaccharid                                                                             |
| mAb       | Monoklonaler Antikörper                                                                       |
| MAF       | Monolithische Adsorptions Filtration                                                          |
| MCR       | Microarray chip reader<br>(Münchner Mikroarray-Auslesegerät)                                  |
| MDA       | Multiple Displacement Amplification                                                           |
| min       | Minuten                                                                                       |
| mip       | macrophage infectivity potentiator                                                            |
| mL        | Milliliter                                                                                    |
| MPN       | <i>most probable number</i>                                                                   |
| MW        | Mittelwert                                                                                    |
| NHS       | <i>N-Hydroxysuccinimid</i>                                                                    |

---

|                      |                                                                    |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| nM                   | nmol L <sup>-1</sup>                                               |
| NTC                  | <i>Non Target Control</i> (Negativkontrolle)                       |
| pAb                  | Polyklonaler Antikörper                                            |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                      |
| PBS                  | Phosphate buffered saline (Phosphat-Kochsalz-Puffer)               |
| PC                   | Polycarbonat                                                       |
| PCR                  | Polymerase-chain-reaction (Polymerasekettenreaktion)               |
| PEG                  | Polyethylenglycoldiglycidylether                                   |
| pM                   | Pikomol pro Liter                                                  |
| PM                   | Primer-Mix                                                         |
| PMMA                 | Polymethylmethacrylat                                              |
| POC                  | Point-of-Care                                                      |
| POM                  | Polyoxymethylen                                                    |
| PP                   | Primer-Paar                                                        |
| REM                  | Rasterelektronenmikroskopie                                        |
| REV                  | Reverse                                                            |
| RNA                  | Ribonukleinsäure                                                   |
| RPA                  | Rekombinase-Polymerase-Amplifikation                               |
| rpm                  | Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)                      |
| rRNA                 | Ribosomale Ribonukleinsäure                                        |
| RT                   | Raumtemperatur                                                     |
| SG                   | Serogruppe                                                         |
| SPR                  | <i>surface plasmon resonance</i> ,<br>Oberflächenplasmonenresonanz |
| ST                   | Stamm                                                              |
| T4SS                 | Typ IV Sekretionssystem                                            |
| TRIS                 | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                    |

|                   |                                                                  |
|-------------------|------------------------------------------------------------------|
| (v/v), (w/v)      | Volumen pro Volumen, Masse pro Volumen                           |
| v-haRPA           | Lebensfähigkeits-haRPA (Lebend/tot-Differenzierung)              |
| YEB-Flüssigmedium | Gepuffertes Hefeextrakt-Medium ( <i>buffered yeast extract</i> ) |

## 8 Literaturverzeichnis

1. Bundesministerium für Gesundheit, *Trinkwasserverordnung*. **2018**, Bundesgesetzblatt.
2. Seidel, M.; Jurzik, L.; Brettar, I.; Höfle, M. G. and Griebler, C., *Microbial and viral pathogens in freshwater: current research aspects studied in Germany*. Environmental Earth Sciences, **2016**, 75(20), 1384.
3. WHO, *Guidelines for drinking water quality, third edition*. Eigenverlag, Genf, **2004**, 1.
4. Umweltbundesamt, *Coliforme Bakterien im Trinkwasser - Empfehlung zur Risikoabschätzung und Maßnahmen bei systemischer Kontamination – Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Bundesministeriums für Gesundheit beim Umweltbundesamt*. Bundesgesundheitsblatt, **2009**, 52, 474-482.
5. Turco, R. F., *Coliform bacteria*. In: *Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties*. Eds. Weaver, R. W.; Angle, S.; Bottomley, P.; Bezdicek, D.; Smith, S.; Tabatabai, A.; Wollum, A.. Soil Science Society of America, Madison, WI, **1994**, 5, 145-158.
6. Bereket, W.; Hemalatha, K.; Getenet, B.; Wondwossen, T.; Solomon, A.; Zeynudin, A. and Kannan, S., *Update on bacterial nosocomial infections*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, **2012**, 16(8), 1039-1044.
7. Nataro, J. P. and Kaper, J. B., *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, **1998**, 11(1), 142-201.
8. Kaper, J. B.; Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T., *Pathogenic Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, **2004**, 2(2), 123-140.
9. Murray, B. E., *The life and times of the Enterococcus*. Clinical Microbiology Reviews, **1990**, 3(1), 46-65.

10. Teixeira, L. M. and Merquior, V. L. C., *Enterococcus*. In: *Molecular typing in bacterial infections*. Eds. de Filippis, I.; McKee, M. L., Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, 17-26.
11. DiazGranados, C. A.; Zimmer, S. M.; Klein, M. and Jernigan, J. A., *Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis*. *Clinical Infectious Diseases*, **2005**, 41(3), 327-333.
12. Schouten, M. A.; Hoogkamp-Korstanje, J. A. A.; Meis, J. F. G.; Voss, A. and the European, V. R. E. Study Group, *Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **2000**, 19(11), 816-822.
13. Franz, C. M. A. P.; Huch, M.; Abriouel, H.; Holzapfel, W. and Gálvez, A., *Enterococci as probiotics and their implications in food safety*. *International Journal of Food Microbiology*, **2011**, 151(2), 125-140.
14. Foulquié Moreno, M. R.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E. and De Vuyst, L., *The role and application of enterococci in food and health*. *International Journal of Food Microbiology*, **2006**, 106(1), 1-24.
15. Giraffa, G., *Functionality of enterococci in dairy products*. *International Journal of Food Microbiology*, **2003**, 88(2), 215-222.
16. Brynestad, S. and Granum, P. E., *Clostridium perfringens and foodborne infections*. *International Journal of Food Microbiology*, **2002**, 74(3), 195-202.
17. Labbe, R.; Juneja, V. K. and Blaschek, H. P., *CLOSTRIDIUM | Clostridium perfringens*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Eds. Batt, C. A.; Tortorello, M. L., Academic Press, Oxford, **2014**, 463-467.
18. Petit, L.; Gibert, M. and Popoff, M. R., *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. *Trends in Microbiology*, **1999**, 7(3), 104-110.
19. Messelhäuser, U. and Pudich, U., *Erkrankung durch Clostridium perfringens in Lebensmitteln*. unter [https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/clostridium\\_perfringens/index.htm](https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/hygiene/bakterien/clostridium_perfringens/index.htm) (23.03.2019).



20. Völker, S.; Schreiber, C. and Kistemann, T., *Drinking water quality in household supply infrastructure—A survey of the current situation in Germany*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, **2010**, 213(3), 204-209.
21. Obritsch, M. D.; Fish, D. N.; MacLaren, R. and Jung, R., *Nosocomial infections due to multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: Epidemiology and treatment options*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, **2005**, 25(10), 1353-1364.
22. Robert Koch-Institut, *Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland, Legionärskrankheit in Deutschland (2001 bis 2013)*. Epidemiologisches Bulletin, **2015**, 13, 96-110.
23. van Heijnsbergen, E.; de Roda Husman, A. M.; Lodder, W. J.; Bouwknegt, M.; Docters van Leeuwen, A. E.; Bruin, J. P.; Euser, S. M.; den Boer, J. W. and Schalk, J. A., *Viable Legionella pneumophila bacteria in natural soil and rainwater puddles*. Journal of Applied Microbiology, **2014**, 117(3), 882-890.
24. Abdel-Nour, M.; Duncan, C.; Low, D. E. and Guyard, C., *Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences, **2013**, 14(11), 21660-21675.
25. Tesh, M. J. and Miller, R. D., *Amino acid requirements for Legionella pneumophila growth*. Journal of Clinical Microbiology, **1981**, 13(5), 865-869.
26. Newsome, A. L.; Baker, R. L.; Miller, R. D. and Arnold, R. R., *Interactions between Naegleria fowleri and Legionella pneumophila*. Infection and Immunity, **1985**, 50(2), 449-452.
27. Rowbotham, T. J., *Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae*. Journal of Clinical Pathology, **1980**, 33(12), 1179-1183.
28. Bartram, J.; Chartier, Y.; Lee, J. V.; Pond, K. and Surman-Lee, S., *Legionella and the prevention of Legionellosis*. World Health Organization, Schweiz, **2007**.

29. Fields, B. S.; Benson, R. F. and Besser, R. E., *Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation*. Clinical Microbiology Reviews, **2002**, 15(3), 506-526.
30. Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Orenstein, W.; Parkin, W. E.; Beecham, H. J.; Sharrar, R. G.; Harris, J.; Mallison, G. F.; Martin, S. M.; McDade, J. E.; Shepard, C. C. and Brachman, P. S., *Legionnaires' Disease*. New England Journal of Medicine, **1977**, 297(22), 1189-1197.
31. Brenner, D. J.; Steigerwalt, A. G. and McDade, J. E., *Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium: Legionella pneumophila, genus novum, species nova, of the Family Legionellaceae, familia nova*. Annals of Internal Medicine, **1979**, 90(4), 656-658.
32. McDade, J. E.; Shepard, C. C.; Fraser, D. W.; Tsai, T. R.; Redus, M. A. and Dowdle, W. R., *Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease*. The New England Journal of Medicine, **1977**, 297(22), 1197-1203.
33. Edelstein, P. H. and Lück, C., *Legionella*. In: *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*. Eds. Jorgensen, J. H.; Pfaller, M. A.; Carroll, K. C.; Funke, G.; Landry, M. L.; Richter, S. S.; Warnock, D. W., American Society of Microbiology, Washington D.C., **2015**.
34. Cirillo, J. D.; Cirillo, S. L. G.; Yan, L.; Bermudez, L. E.; Falkow, S. and Tompkins, L. S., *Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of Legionella pneumophila*. Infection and Immunity, **1999**, 67(9), 4427-4434.
35. Cirillo, J. D.; Falkow, S. and Tompkins, L. S., *Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion*. Infection and Immunity, **1994**, 62(8), 3254-3261.
36. Barbaree, J. M.; Fields, B. S.; Feeley, J. C.; Gorman, G. W. and Martin, W. T., *Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of Legionella pneumophila*. Applied and Environmental Microbiology, **1986**, 51(2), 422-424.

37. Cianciotto, N. P. and Fields, B. S., *Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **1992**, 89(11), 5188-5191.
38. Beauté, J., on behalf of the European Legionnaires' Disease Surveillance Network, *Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015*. Eurosurveillance, **2017**, 22(27),1-8.
39. Robert Koch-Institut, *RKI-Ratgeber Legionellose* Epidemiologisches Bulletin, **2019**, 36, 377-386.
40. Maisa, A.; Brockmann, A.; Renken, F.; Lück, C.; Pleischl, S.; Exner, M.; Daniels-Haardt, I. and Jurke, A., *Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August-September 2013*. Eurosurveillance, **2015**, 20(46), 1-9.
41. Paranjape, K.; Bedard, E.; Whyte, L. G.; Ronholm, J.; Prevost, M. and Faucher, S. P., *Presence of Legionella spp. in cooling towers: the role of microbial diversity, Pseudomonas, and continuous chlorine application*. Water Research, **2019**, 169.
42. Garcia-Fulgueiras, A.; Navarro, C.; Fenoll, D.; Garcia, J.; Gonzalez-Diego, P.; Jimenez-Bunuales, T.; Rodriguez, M.; Lopez, R.; Pacheco, F.; Ruiz, J.; Segovia, M.; Balandron, B. and Pelaz, C., *Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain*. Emerging Infectious Diseases, **2003**, 9(8), 915-921.
43. O'Loughlin, R. E.; Kightlinger, L.; Werpy, M. C.; Brown, E.; Stevens, V.; Hepper, C.; Keane, T.; Benson, R. F.; Fields, B. S. and Moore, M. R., *Restaurant outbreak of Legionnaires' disease associated with a decorative fountain: an environmental and case-control study*. BMC Infectious Diseases, **2007**, 7(93), 1-9.
44. Ruehleemann, S. A. and Crawford, G. R., *Panic in the potting shed. The association between Legionella longbeachae serogroup 1 and potting soils in Australia*. The Medical Journal of Australia, **1996**, 164(1), 36-38.
45. Steele, T. W., *Legionnaires' disease in South Australia, 1979-1988*. The Medical Journal of Australia, **1989**, 151(6), 322-328.

46. Lindsay, D. S.; Brown, A. W.; Brown, D. J.; Pravinkumar, S. J.; Anderson, E. and Edwards, G. F., *Legionella longbeachae* serogroup 1 infections linked to potting compost. *Journal of Medical Microbiology*, **2012**, 61(2), 218-222.
47. Kirschner, A. K. T., *Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for?* *Water Research*, **2016**, 93, 276-288.
48. Oliver, J. D., *The Public Health significance of viable but nonculturable bacteria*. In: *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Eds. Colwell, R. R.; Grimes, D. J.. Springer US, Boston, MA, **2000**, 277-300.
49. Alleron, L.; Merlet, N.; Lacombe, C. and Frere, J., *Long-term survival of Legionella pneumophila in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment*. *Current Microbiology*, **2008**, 57(5), 497-502.
50. Ducret, A.; Chabalier, M. and Dukan, S., *Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*, **2014**, 14(3), 1-10.
51. Garcia, M. T.; Jones, S.; Pelaz, C.; Millar, R. D. and Abu Kwaik, Y., *Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection*. *Environmental Microbiology*, **2007**, 9(5), 1267-1277.
52. Kim, B. R.; Anderson, J. E.; Mueller, S. A.; Gaines, W. A. and Kendall, A. M., *Literature review—efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems*. *Water Research*, **2002**, 36(18), 4433-4444.
53. Domingue, E. L.; Tyndall, R. L.; Mayberry, W. R. and Pancorbo, O. C., *Effects of three oxidizing biocides on Legionella pneumophila serogroup 1*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1988**, 54(3), 741-747.
54. Aqua Concept GmbH, *Biomeba - Das erste biologische Biozid für Verdunstungskühlanlagen*. unter <https://www.aqua-concept-gmbh.eu/de/leistungen/industriewasser/biomeba/?lang=de> (16.12.2019).
55. Cianciotto, N. P., *Pathogenicity of Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, **2001**, 291(5), 331-343.

56. Flieger, A.; Banerji, S.; Broich, M.; Rydzewski, K. and Shadrach, W. S., Pathogenese der Legionelleninfektion. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz, **2003**, 46, 694-699.
57. Heuner, K.; Steinert, M.; Dietrich, C.; Köhler, R.; Hacker, J. and Fischer, G., *Function and expression of Legionella pneumophila surface factors*. In: *Legionella*. Eds. Marre, R.; Kwaik, Y. A.; Bartlett, C.; Cianciotto, N. P.; Fields, B. S.; Frosch, M.; Hacker, J.; Lück, P. C., American Society of Microbiology, **2002**.
58. Northoff, H.; Faigle, M.; Weissgerber, P. and Neumeister, B., *Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of Legionella pneumophila by human cells*. FEMS Microbiology Letters, **2003**, 219(2), 173-179.
59. Horwitz, M. A., *Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) in human monocytes*. The Journal of Experimental Medicine, **1983**, 158(4), 1319-1331.
60. Swanson, M. S. and Hammer, B. K., *Legionella pneumophila pathogenesis: A fateful journey from Amoebae to macrophages*. Annual Review of Microbiology, **2000**, 54(1), 567-613.
61. Sturgill-Koszycki, S. and Swanson, M. S., *Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles*. The Journal of Experimental Medicine, **2000**, 192(9), 1261-1272.
62. Molmeret, M. and Abu Kwaik, Y., *How does Legionella pneumophila exit the host cell?* Trends in Microbiology, **2002**, 10(6), 258-260.
63. Correia, A. M.; Ferreira, J. S.; Borges, V.; Nunes, A.; Gomes, B.; Capucho, R.; Gonçalves, J.; Antunes, D. M.; Almeida, S.; Mendes, A.; Guerreiro, M.; Sampaio, D. A.; Vieira, L.; Machado, J.; Simões, M. J.; Gonçalves, P. and Gomes, J. P., *Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease*. The New England Journal of Medicine, **2016**, 374(5), 497-498.
64. Kaufmann, A. F.; Patton, C. M.; Anderson, D. C.; Feeley, J. C.; Bennett, J. V.; McDade, J. E.; Potter, M. E.; Skaliy, P.; Newhouse, V. F.; Gregg, M. B. and Brachman, P. S., *Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (Legionella pneumophila) and*

*demonstration of its mode of transmission*. American Journal of Epidemiology, **1981**, 114(3), 337-347.

65. Mangione, E. J.; Remis, R. S.; Tait, K. A.; McGee, H. B.; Gorman, G. W.; Wentworth, B. B.; Baron, P. A.; Hightower, A. W.; Barbaree, J. M. and Broome, c. V., *An Outbreak of Pontiac Fever Related to Whirlpool Use, Michigan 1982*. Journal of the American Medical Association, **1985**, 253(4), 535-539.

66. Stout, J. E. and Yu, V. L., *Legionellosis*. The New England Journal of Medicine, **1997**, 337(10), 682-687.

67. Mulazimoglu, L. and Yu, V. L., *Can Legionnaires' disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review*. Chest, **2001**, 120(4), 1049-1053.

68. Yu, V. L.; Greenberg, R. N.; Zadeikis, N.; Stout, J. E.; Khashab, M. M.; Olson, W. H. and Tennenberg, A. M., *Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired Legionellosis*. Chest, **2004**, 125(6), 2135-2139.

69. Hamedani, B.; Ali, J.; Hafeez, S.; Bachand, R.; Dawood, G.; Quereshi, S.; Raza, R. and Yab, Z., *The safety and efficacy of clarithromycin in patients with Legionella pneumonia*. Chest, **1991**, 100(6), 1503-1506.

70. Horwitz, M. A. and Silverstein, S. C., *Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria (Legionella pneumophila) in human monocytes is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin*. The Journal of Clinical Investigation, **1983**, 71(1), 15-26.

71. Phin, N.; Parry-Ford, F.; Harrison, T.; Stagg, H. R.; Zhang, N.; Kumar, K.; Lortholary, O.; Zumla, A. and Abubakar, I., *Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease*. The Lancet Infectious Diseases, **2014**, 14(10), 1011-1021.

72. Lück, P. C. and Steinert, M., *Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Legionella-Infektion*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, **2006**, 49(5), 439-449.

73. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), *Surveillance report Legionnaires' disease in Europe 2015*. unter <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Legionnaires-disease-europe-2015.pdf> (21.03.2019).

74. von Baum, H.; Härter, G.; Essig, A.; Lück, C.; Gonser, T.; Embacher, A. and Brockmann, S., *Preliminary report: outbreak of Legionnaires' disease in the cities of Ulm and Neu-Ulm in Germany, December 2009 - January 2010*. *Eurosurveillance*, **2010**, 15(4), 1-2.
75. von Baum, H.; Ewig, S.; Marre, R.; Suttorp, N.; Gonschior, S.; Welte, T. and Luck, C., *Community-acquired Legionella pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia*. *Clinical Infectious Diseases*, **2008**, 46(9), 1356-1364.
76. Rowbotham, T. J., *Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae*. *Journal of Clinical Pathology*, **1983**, 36(9), 978-986.
77. Barker, J.; Lambert, P. A. and Brown, M. R., *Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, **1993**, 61(8), 3503-3510.
78. Valster, R. M.; Wullings, B. A. and van der Kooij, D., *Detection of protozoan hosts for Legionella pneumophila in engineered water systems by using a biofilm batch test*. *Applied and Environmental Microbiology*, **2010**, 76(21), 7144-7153.
79. Rogers, J.; Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Lee, J. V. and Keevil, C. W., *Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1994**, 60(5), 1585-1592.
80. Moritz, M. M.; Flemming, H. C. and Wingender, J., *Integration of Pseudomonas aeruginosa and Legionella pneumophila in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **2010**, 213(3), 190-197.
81. Kruse, E.-B.; Wehner, A. and Wisplinghoff, H., *Prevalence and distribution of Legionella spp in potable water systems in Germany, risk factors associated with contamination, and effectiveness of thermal disinfection*. *American Journal of Infection Control*, **2016**, 44(4), 470-474.

82. Liu, R.; Yu, Z.; Guo, H.; Liu, M.; Zhang, H. and Yang, M., *Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms*. Science of the Total Environment, **2012**, 435-436, 124-131.
83. Temmerman, R.; Vervaeren, H.; Noseda, B.; Boon, N. and Verstraete, W., *Necrotrophic growth of Legionella pneumophila*. Applied and Environmental Microbiology, **2006**, 72(6), 4323-4328.
84. Emtiazi, F.; Schwartz, T.; Marten, S. M.; Krolla-Sidenstein, P. and Obst, U., *Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration*. Water Research, **2004**, 38(5), 1197-1206.
85. Atlas, R. M., *Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control*. Environmental Microbiology, **1999**, 1(4), 283-293.
86. Hoffman, P. S., *Invasion of eukaryotic cells by Legionella pneumophila: A common strategy for all hosts?* The Canadian Journal of Infectious Diseases, **1997**, 8(3), 139-146.
87. Donlan, R. M.; Forster, T.; Murga, R.; Brown, E.; Lucas, C.; Carpenter, J. and Fields, B., *Legionella pneumophila associated with the protozoan Hartmannella vermiformis in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants*. Biofouling, **2005**, 21(1), 1-7.
88. Thomas, V.; Bouchez, T.; Nicolas, V.; Robert, S.; Loret, J. F. and Levi, Y., *Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence*. Journal of Applied Microbiology, **2004**, 97(5), 950-963.
89. Storey, M. V.; Winiecka-Krusnell, J.; Ashbolt, N. J. and Stenstrom, T. A., *The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, **2004**, 36(9), 656-662.
90. Wéry, N.; Bru-Adan, V.; Minervini, C.; Delgènes, J.-P.; Garrelly, L. and Godon, J.-J., *Dynamics of Legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a cooling tower facility*. Applied and Environmental Microbiology, **2008**, 74(10), 3030-3037.



91. Stewart, C. R.; Burnside, D. M. and Cianciotto, N. P., *The surfactant of Legionella pneumophila is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other Legionella species*. Journal of Bacteriology, **2011**, 193(21), 5971-5984.
92. Wingender, J. and Flemming, H.-C., *Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, **2011**, 214(6), 417-423.
93. Gao, M. S.; Wilks, S.; Azevedo, N. F.; Vieira, M. J. and Keevil, C. W., *Incorporation of natural uncultivable Legionella pneumophila into potable water biofilms provides a protective niche against chlorination stress*. Biofouling, **2009**, 25(4), 335-341.
94. Schrammel, B.; Cervero-Aragó, S.; Dietersdorfer, E.; Walochnik, J.; Lück, C.; Sommer, R. and Kirschner, A., *Differential development of Legionella sub-populations during short- and long-term starvation*. Water Research, **2018**, 141, 417-427.
95. Messelhäuser, U., *Kapitel 2 Kultivierungsverfahren für Bakterien* In: *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik-Grundlegende Methoden und Anwendungen*. Eds. Busch, U. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2010**.
96. Wegner, D. L.; Witte, D. L. and Schrantz, R. D., *Insensitivity of Rapid Antigen Detection Methods and Single Blood Agar Plate Culture for Diagnosing Streptococcal Pharyngitis*. Journal of the American Medical Association, **1992**, 267(5), 695-697.
97. Bundesamt für Gesundheit BAG, *Legionellen und Legionellose BAG-/BLV-Empfehlungen*. Bundesamt für Gesundheit BAG, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV, Schweiz, **2018**, 1-115.
98. Umweltbundesamt, *Empfehlung des Umweltbundesamtes Systemische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung -Probennahme, Untersuchungsgang und Angabe des Ergebnisses*. unter [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/421/dokumente/twk\\_08\\_1-0-18\\_endfassung\\_uba-empfehlung\\_systemische\\_untersuchung\\_legionellen.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/421/dokumente/twk_08_1-0-18_endfassung_uba-empfehlung_systemische_untersuchung_legionellen.pdf) (21.05.2019).

99. Wellinghausen, N.; Frost, C. and Marre, R., *Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR*. Applied and Environmental Microbiology, **2001**, 67(9), 3985-3993.
100. Yáñez, M. A.; Carrasco-Serrano, C.; Barberá, V. M. and Catalán, V., *Quantitative detection of Legionella pneumophila in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene*. Applied and Environmental Microbiology, **2005**, 71(7), 3433-3441.
101. Bonetta, S.; Bonetta, S.; Ferretti, E.; Balocco, F. and Carraro, E., *Evaluation of Legionella pneumophila contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods*. Journal of Applied Microbiology, **2010**, 108(5), 1576-1583.
102. Parthuisot, N.; Binet, M.; Tournon-Bodilis, A.; Pougard, C.; Lebaron, P. and Baudart, J., *Total and viable Legionella pneumophila cells in hot and natural waters as measured by immunofluorescence-based assays and solid-phase cytometry*. Applied and Environmental Microbiology, **2011**, 77(17), 6225-6232.
103. IDEXX Technologies, *Legiolert*. unter <https://www.idexx.de/de/water/water-products-services/legiolert/> (11.09.2019).
104. Rech, M. M.; Swalla, B. M. and Dobranic, J. K., *Evaluation of Legiolert for quantification of Legionella pneumophila from non-potable water*. Current Microbiology, **2018**, 75(10), 1282-1289.
105. Sartory, D. P.; Spies, K.; Lange, B.; Schneider, S. and Langer, B., *Evaluation of a most probable number method for the enumeration of Legionella pneumophila from potable and related water samples*. Letters in Applied Microbiology, **2017**, 64(4), 271-275.
106. Spies, K.; Pleischl, S.; Lange, B.; Langer, B.; Hübner, I.; Jurzik, L.; Luden, K. and Exner, M., *Comparison of the Legiolert™/Quanti-Tray® MPN test for the enumeration of Legionella pneumophila from potable water samples with the German regulatory requirements methods ISO 11731-2 and ISO 11731*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, **2018**, 221(7), 1047-1053.

107. Barrette, I., *Comparison of Legiolert and a Conventional Culture Method for Detection of Legionella pneumophila from Cooling Towers in Québec*. Journal of AOAC International, **2019**, 102(4), 1235-1240.
108. Lottspeich, F. and Zorbas, H., *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2012**.
109. Monji, N. and Hoffman, A. S., *A novel immunoassay system and bioseparation process based on thermal phase separating polymers*. Applied Biochemistry and Biotechnology, **1987**, 14(2), 107-120.
110. Petzold, M.; Thürmer, A.; Menzel, S.; Mouton, J. W.; Heuner, K. and Lück, C., *A structural comparison of lipopolysaccharide biosynthesis loci of Legionella pneumophila serogroup 1 strains*. BMC Microbiology, **2013**, 13(198), 1-11.
111. Shevchuk, O.; Jager, J. and Steinert, M., *Virulence properties of the legionella pneumophila cell envelope*. Frontiers in Microbiology, **2011**, 2(74), 1-12.
112. Kooistra, O.; Lüneberg, E.; Knirel, Y. A.; Frosch, M. and Zähringer, U., *N-Methylation in polylegionaminic acid is associated with the phase-variable epitope of Legionella pneumophila serogroup 1 lipopolysaccharide*. European Journal of Biochemistry, **2002**, 269(2), 560-572.
113. Helbig, J.; Bernander, S.; Castellani Pastoris, M.; Etienne, J.; Gaia, V.; Lauwers, S.; Lindsay, D.; Lück, P.; Marques, T.; Mentula, S.; Peeters, M.; Pelaz, C.; Struelens, M.; Uldum, S.; Wewalka, G. and Harrison, T., *Pan-european study on culture-proven Legionnaires' disease: Distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **2002**, 21(10), 710-716.
114. Lück, C.; Fry, N. K.; Helbig, J. H.; Jarraud, S. and Harrison, T. G., *Typing Methods for Legionella*. In: *Legionella: Methods and Protocols*. Eds. Buchrieser, C.; Hilbi, H., Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, 119-148.
115. Ciesielski, C. A.; Blaser, M. J. and Wang, W. L., *Serogroup specificity of Legionella pneumophila is related to lipopolysaccharide characteristics*. Infection and Immunity, **1986**, 51(2), 397-404.

116. Helbig, J. H.; Kurtz, J. B.; Pastoris, M. C.; Pelaz, C. and Luck, P. C., *Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups*. Journal of Molecular Biology, **1997**, 35(11), 2841-2845.
117. March, S. B. and Ratnam, S., *Latex agglutination test for detection of Escherichia coli serotype O157*. Journal of Clinical Microbiology, **1989**, 27(7), 1675-1677.
118. Griese, M. and Starosta, V., *Agglutination of Pseudomonas aeruginosa by Surfactant Protein D*. Pediatric Pulmonology, **2005**, 40(5), 378-384.
119. Oxoid Limited, *Legionella Latex Test*. unter <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/X5058C-DE.pdf> (05.06.2019).
120. Thermo Scientific™, *DrySpot™ Latex-Agglutinationstest für Legionellen-Spezies* unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0220M> (29.11.2019).
121. Oxoid Limited, *DrySpot Legionella Latex Test*. unter <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/X5782B-DE.pdf> (29.11.2019).
122. Pro-Lab Diagnostics, *Prolex™ Legionella Latex*. unter <https://pro-lab.com/products/clinical-microbiology/bacteriology/prolex-latex-agglutination-kits-and-reagents/legionella-dfa/> (02.12.2019).
123. Bjorn, M. J.; Vasil, M. L.; Sadoff, J. C. and Iglewski, B. H., *Incidence of exotoxin production by Pseudomonas species*. Infection and Immunity, **1977**, 16(1), 362-366.
124. Holdenrieder, S. and Stieber, P., *Intercellular Adhesion Molecule*. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Eds. Gressner, A. M.; Arndt, T., Springer, Heidelberg, Berlin, **2019**, 1260-1261.
125. Thacker, W. L.; Plikaytis, B. B. and Wilkinson, H. W., *Identification of 22 Legionella species and 33 serogroups with the slide agglutination test*. Journal of Clinical Microbiology, **1985**, 21(5), 779-782.

126. Thacker, W. L.; Wilkinson, H. W. and Benson, R. F., *Comparison of slide agglutination test and direct immunofluorescence assay for identification of Legionella isolates*. Journal of Clinical Microbiology, **1983**, 18(5), 1113-1118.
127. Soriano, F.; Aguilar, L. and Gómez Garcés, J. L., *Simple immunodiffusion test for detecting antibodies against Legionella pneumophila serotype 1*. Journal of Clinical Microbiology, **1982**, 15(2), 330-331.
128. Wilkinson, H. W. and Fikes, B. J., *Slide agglutination test for serogrouping Legionella pneumophila and atypical Legionella-like organisms*. Journal of Clinical Microbiology, **1980**, 11(1), 99-101.
129. Orrison, L. H.; Bibb, W. F.; Cherry, W. B. and Thacker, L., *Determination of antigenic relationships among legionellae and non-legionellae by direct fluorescent-antibody and immunodiffusion tests*. Journal of Clinical Microbiology, **1983**, 17(2), 332-337.
130. Picot, J.; Guerin, C. L.; Le Van Kim, C. and Boulanger, C. M., *Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation*. Cytotechnology, **2012**, 64(2), 109-130.
131. Givan, A. L., *Flow Cytometry: An Introduction*. In: *Flow Cytometry Protocols*. Eds. Hawley, T. S.; Hawley, R. G., Humana Press, Totowa, NJ, **2011**, 1-29.
132. Jepras, R. I.; Carter, J.; Pearson, S. C.; Paul, F. E. and Wilkinson, M. J., *Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, **1995**, 61(7), 2696-2701.
133. Davey, H. M., *Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology*. Applied and Environmental Microbiology, **2011**, 77(16), 5571-5576.
134. Berney, M.; Vital, M.; Hülshoff, I.; Weilenmann, H.-U.; Egli, T. and Hammes, F., *Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water*. Water Research, **2008**, 42(14), 4010-4018.
135. Ingram, M.; Cleary, T. J.; Price, B. J.; Price, R. L. and Castro, A., *Rapid detection of Legionella pneumophila by flow cytometry*. Cytometry, **1982**, 3(2), 134-137.

136. Tyndall, R. L.; Hand, R. E., Jr.; Mann, R. C.; Evans, C. and Jernigan, R., *Application of flow cytometry to detection and characterization of Legionella spp.* Applied and Environmental Microbiology, **1985**, 49(4), 852-857.
137. Föchslin, H. P.; Kötzsch, S.; Keserue, H.-A. and Egli, T., *Rapid and quantitative detection of Legionella pneumophila applying immunomagnetic separation and flow cytometry.* Cytometry Part A, **2010**, 77(3), 264-274.
138. Keserue, H.-A.; Baumgartner, A.; Felleisen, R. and Egli, T., *Rapid detection of total and viable Legionella pneumophila in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry.* Microbial Biotechnology, **2012**, 5(6), 753-763.
139. rqmicro, *Legionella pneumophila SG1 Kits.* unter <https://www.rqmicro.com/de/produkte/l-p-sg1-kit/> (29.11.2019).
140. Sysmex, *CyFlow Cube 6.* unter <https://www.sysmex.de/produkte/cyflow-cube-6-3017.html> (01.12.2019).
141. Bahadir, E. B. and Sezgintürk, M. K., *Lateral flow assays: Principles, designs and labels.* Trends in Analytical Chemistry, **2016**, 82, 286-306.
142. Sajid, M.; Kawde, A.-N. and Daud, M., *Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review.* Journal of Saudi Chemical Society, **2015**, 19(6), 689-705.
143. Sopena, N.; Sabria, M.; Pedro-Botet, M. L.; Reynaga, E.; Garcia-Nunez, M.; Dominguez, J. and Matas, L., *Factors related to persistence of Legionella urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease.* European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **2002**, 21(12), 845-848.
144. Alere, *Alere BinaxNOW Legionella Harnantigen Test.* unter <http://www.alere.com/de/home/product-details/binaxnow-legionella.html> (07.06.2019).
145. BioConcept, C., *Legionella V-Test.* unter <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/Legionella.php> (07.06.2019).
146. Badoux, P.; Euser, S. M.; Bruin, J. P.; Mulder, P. P. G. and Yzerman, E. P. F., *Evaluation of the bioNexia Legionella test, including impact of incubation time*

*extension, for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(6), 1733-1737.*

147. Oxoid, *XPECT Legionella Test.* unter [http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=R24680](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=R24680) (07.06.2019).

148. Diederer, B. M. W.; Bruin, J. P.; Scopes, E.; Peeters, M. F. and Ijzerman, E. P. F., *Evaluation of the Oxoid Xpect Legionella test kit for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(7), 2272-2274.*

149. Biotech, T., *Uni-Gold™ Legionella urinary antigen PLUS.* unter <https://www.trinitybiotech.com/products/uni-gold-legionella-urinary-antigen-plus/> (07.06.2019).

150. Arai, M.; Manome, I.; Ikedo, M.; Fujisaki, M.; Tateda, K. and Yamaguchi, K., *Evaluation of Dipstick 'Eiken' Legionella for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 urinary antigen using the immunochromatographical method. Journal of the Association for Rapid Method and Automation in Microbiology, 2005, 16(1), 29-35.*

151. Svarrer, C. W.; Luck, C.; Elverdal, P. L. and Uldum, S. A., *Immunochromatic kits Xpect Legionella and BinaxNOW Legionella for detection of Legionella pneumophila urinary antigen have low sensitivities for the diagnosis of Legionnaires' disease. Journal of Medical Microbiology, 2012, 61(2), 213-217.*

152. Como, J.; Moffa, M. A.; Bhanot, N.; Min, Z.; Cole, K. S.; Kuzyck, J. and Walsh, T. L., *Potential false-positive urine Legionella enzyme immunoassay test results. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2019, 38(7), 1377-1382.*

153. Miyata, J.; Huh, J. Y.; Ito, Y.; Kobuchi, T.; Kusukawa, K. and Hayashi, H., *Can we truly rely on the urinary antigen test for the diagnosis? Legionella case report. Journal of General and Family Medicine, 2017, 18(3), 139-143.*

154. Helbig, J. H.; Uldum, S. A.; Luck, P. C. and Harrison, T. G., *Detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary*

*Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA*. Journal of Medical Microbiology, **2001**, 50(6), 509-516.

155. Bailleul, E.; Magerman, K.; Mewis, A.; Peeters, V.; Rummens, J. L. and Cartuyvels, R., *False-positive result with BinaxNOW Legionella Antigen immunochromatographic (ICT) assay: response to Helbig et al. (2001)*. Journal of Medical Microbiology, **2004**, 53(2), 173.

156. Bruin, J. P.; Peeters, M. F.; Ijzerman, E. P. and Diederens, B. M., *Evaluation of Legionella V-Test for the detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **2010**, 29(7), 899-900.

157. Helbig, J. H.; Uldum, S. A.; Bernander, S.; Lück, P. C.; Wewalka, G.; Abraham, B.; Gaia, V. and Harrison, T. G., *Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires' disease*. Journal of Clinical Microbiology, **2003**, 41(2), 838-840.

158. Tintometer GmbH, *Lovibond Legionella industrial test kit* unter <https://www.lovibond.com/de/PW/Wasseranalytik/Produkte/Test-Kits/Standard-Test-Kits/Legionellen-Test-Kits/LegionellaIndustrial-Test-Kit> (11.09.2019).

159. Zeller, *hydrosense*. unter <https://hydrosense-legionella.com/> (02.12.2019).

160. Tollrian, C., *Immunhistochemische Färbung und Immunfluoreszenz*. unter [www.fb06.fh-muenchen.de/fb/index.php/download.html?f\\_id=6074](http://www.fb06.fh-muenchen.de/fb/index.php/download.html?f_id=6074) (07.06.2019).

161. Lück, P. C.; Helbig, J. H. and Schuppler, M., *Epidemiology and laboratory diagnosis of Legionella infections*. Laboratoriums Medizin, **2002**, 26(3-4), 174-182.

162. Aurell, H.; Catala, P.; Farge, P.; Wallet, F.; Le Brun, M.; Helbig, J. H.; Jarraud, S. and Lebaron, P., *Rapid detection and enumeration of Legionella pneumophila in hot water systems by solid-phase cytometry*. Applied and Environmental Microbiology, **2004**, 70(3), 1651-1657.

163. Párraga-Niño, N.; Quero, S.; Ventós-Alfonso, A.; Uria, N.; Castillo-Fernandez, O.; Ezenarro, J. J.; Muñoz, F.-X.; Garcia-Nuñez, M. and Sabrià, M., *New system for*



*the detection of Legionella pneumophila in water samples*. Talanta, **2018**, 189, 324-331.

164. Congestrì, F.; Crepaldi, E.; Gagliardi, M.; Pedna, M. F. and Sambri, V., *Comparative evaluation of the Novel bioNexia Legionella test with the BinaxNOW Legionella card assay and the Sofia Legionella FIA assay for detection of Legionella pneumophila (serogroup 1) antigen in urine samples*. Journal of Clinical Microbiology, **2016**, 54(4), 1164-1166.

165. Beraud, L.; Gervasoni, K.; Freydiere, A. M.; Descours, G.; Ranc, A. G.; Vandenesch, F.; Lina, G.; Gaia, V. and Jarraud, S., *Comparison of Sofia Legionella FIA and BinaxNOW® Legionella urinary antigen card in two national reference centers*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **2015**, 34(9), 1803-1807.

166. Quidel, *Sofia Legionella FIA*. unter <https://www.quidel.com/immunoassays/rapid-legionella-tests/sofia-legionella-fia> (02.12.2019).

167. Bio-Rad Laboratories, *MonoFluo Legionella* unter [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/cdg/literature/J-113\\_Legionella.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/cdg/literature/J-113_Legionella.pdf) (14.09.2019).

168. Pro-Lab Diagnostics, *Legionella direct fluorescent antibody test kits*. unter <https://pro-lab.com/products/clinical-microbiology/bacteriology/legionella-direct-fluorescent-antibody-test-kits/> (02.12.2019).

169. Engvall, E. and Perlmann, P., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, **1971**, 8(9), 871-874.

170. Van Weemen, B. K. and Schuurs, A. H. W. M., *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. FEBS Letters, **1971**, 15(3), 232-236.

171. David Kitz Kramer, E. K., *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. unter <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1246/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/> (26.09.2019).

172. Bibb, W. F.; Arnow, P. M.; Thacker, L. and McKinney, R. M., *Detection of soluble Legionella pneumophila antigens in serum and urine specimens by enzyme-linked*

*immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies*. Journal of Clinical Microbiology, **1984**, 20(3), 478-482.

173. Sathapatayavongs, B.; Kohler, R. B.; Wheat, L. J.; White, A.; Winn, W. C., Jr.; Girod, J. C. and Edelstein, P. H., *Rapid diagnosis of Legionnaires' disease by urinary antigen detection. Comparison of ELISA and radioimmunoassay*. The American Journal of Medicine, **1982**, 72(4), 576-582.

174. Wreghitt, T. G.; Nagington, J. and Gray, J., *An ELISA test for the detection of antibodies to Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Pathology, **1982**, 35(6), 657-660.

175. Berdal, B. P.; Farshy, C. E. and Feeley, J. C., *Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay*. Journal of Clinical Microbiology, **1979**, 9(5), 575-578.

176. Blanco, S.; Prat, C.; Sánchez, M. D.; Ferrer, D.; Pellicer, T.; Haba, L.; Latorre, I.; Vilaplana, C.; Ausina, V. and Domínguez, J., *Evaluation of a Legionella urinary antigen enzyme immunoassay for rapid detection of Legionella pneumophila in water samples*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, **2008**, 211(1), 168-171.

177. Abbott, *Binax™ Legionella-Harnantigen-EIA*. unter <https://www.alere.com/de/home/product-details/binaxnow-legionella-urinary-antigen-eia.html> (20.09.2019).

178. R-Biopharm AG, *RIDASCREEN® Legionella*. unter [https://clinical.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/3/2016/12/C8001-RIDASCREEN-Legionella\\_lang-2016-03-12\\_DE-1.pdf](https://clinical.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/3/2016/12/C8001-RIDASCREEN-Legionella_lang-2016-03-12_DE-1.pdf) (02.12.2019).

179. Albalat, G. R.; Broch, B. B. and Bono, M. J., *Method modification of the Legipid® Legionella fast detection test kit*. Journal of AOAC International, **2014**, 97(5), 1403-1409.

180. EWK Kühltürme, *Legipid® Legionellen-Schnelltest*. unter <https://ewk-kuehlturm.de/legipid/> (02.12.2019).

181. Primelab, *Legionellentest*. unter <https://primelab.org/de/legionellentest.html> (02.12.2019).

182. Bange, A.; Halsall, H. B. and Heineman, W. R., *Microfluidic immunosensor systems*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 20(12), 2488-2503.
183. Bemetz, J.; Kober, C.; Meyer, V. K.; Niessner, R. and Seidel, M., *Succinylated Jeffamine ED-2003 coated polycarbonate chips for low-cost analytical microarrays*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2019**, 411(10), 1943-1955.
184. Aizawa, M., *Immunosensors for clinical analysis*. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Eds. Spiegel, H. E., Elsevier, Amsterdam, **1994**, 31, 247-275.
185. Meyer, H., *Surface Plasmon Resonance – Biosensoren in der Proteomanalyse und der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung*. *BIOspektrum Sonderausgabe*, 8. Jahrgang, 532-535.
186. GE Healthcare LifeSciences, *Surface plasmon resonance*. unter <https://www.gelifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/surface-plasmon-resonance/surface-plasmon-resonance> (15.09.2019).
187. Piliarik, M.; Vaisocherova, H. and Homola, J., *Surface plasmon resonance biosensing*. *Methods in Molecular Biology*, **2009**, 503, 65-88.
188. Enrico, D. L.; Manera, M. G.; Montagna, G.; Cimaglia, F.; Chiesa, M.; Poltronieri, P.; Santino, A. and Rella, R., *SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples*. *Optics Communications*, **2013**, 294, 420-426.
189. Oh, B.-K.; Kim, Y.-K.; Lee, W.; Bae, Y. M.; Lee, W. H. and Choi, J.-W., *Immunosensor for detection of Legionella pneumophila using surface plasmon resonance*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2003**, 18(5), 605-611.
190. Lin, H.-Y.; Tsao, Y.-C.; Tsai, W.-H.; Yang, Y.-W.; Yan, T.-R. and Sheu, B.-C., *Development and application of side-polished fiber immunosensor based on surface plasmon resonance for the detection of Legionella pneumophila with halogens light and 850nm-LED*. *Sensors and Actuators A: Physical*, **2007**, 138(2), 299-305.
191. Bae, Y. M.; Oh, B.-K.; Lee, W.; Lee, W. H. and Choi, J.-W., *Immunosensor for detection of Legionella pneumophila based on imaging ellipsometry*. *Materials Science and Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, **2004**, 24(1), 61-64.

192. Park, J.; You, X.; Jang, Y.; Nam, Y.; Kim, M. J.; Min, N. K. and Pak, J. J., *ZnO nanorod matrix based electrochemical immunosensors for sensitivity enhanced detection of Legionella pneumophila*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2014**, 200, 173-180.
193. Li, N.; Brahmendra, A.; Veloso, A. J.; Prashar, A.; Cheng, X. R.; Hung, V. W. S.; Guyard, C.; Terebiznik, M. and Kerman, K., *Disposable immunochips for the detection of Legionella pneumophila using electrochemical impedance spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, **2012**, 84(8), 3485-3488.
194. Seidel, M. and Niessner, R., *Automated analytical microarrays: a critical review*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391(5), 1521-1544.
195. Seidel, M. and Niessner, R., *Chemiluminescence microarrays in analytical chemistry: a critical review*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406(23), 5589-5612.
196. Haab, B. B.; Dunham, M. J. and Brown, P. O., *Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions*. *Genome Biology*, **2001**, 2(2), research0004.1–research0004.13.
197. MacBeath, G. and Schreiber, S. L., *Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination*. *Science*, **2000**, 289(5485), 1760-1763.
198. Rapkiewicz, A.; Espina, V.; Zujewski, J. A.; Lebowitz, P. F.; Filie, A.; Wulfkuhle, J.; Camphausen, K.; Petricoin III, E. F.; Liotta, L. A. and Abati, A., *The needle in the haystack: Application of breast fine-needle aspirate samples to quantitative protein microarray technology*. *Cancer Cytopathology*, **2007**, 111(3), 173-184.
199. Fan, A.; Cao, Z.; Li, H.; Kai, M. and Lu, J., *Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses*. *Analytical Sciences*, **2009**, 25(5), 587-597.
200. Marquette, C. A.; Corgier, B. P. and Blum, L. J., *Recent advances in multiplex immunoassays*. *Bioanalysis*, **2012**, 4(8), 927-936.
201. Marquette, C. A.; Bouteille, F.; Corgier, B. P.; Degiuli, A. and Blum, L. J., *Disposable screen-printed chemiluminescent biochips for the simultaneous*

*determination of four point-of-care relevant proteins*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2009**, 393(4), 1191-1198.

202. Roda, A.; Guardigli, M.; Michelini, E.; Mirasoli, M. and Pasini, P., *Peer reviewed: Analytical bioluminescence and chemiluminescence*. Analytical Chemistry, **2003**, 75(21), 462 A-470 A.

203. Kloth, K.; Niessner, R. and Seidel, M., *Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays*. Biosensors and Bioelectronics, **2009**, 24(7), 2106-2112.

204. Meyer, V. K.; Meloni, D.; Olivo, F.; Märtlbauer, E.; Dietrich, R.; Niessner, R. and Seidel, M., *Validation procedure for multiplex antibiotic immunoassays using flow-based chemiluminescence microarrays*. In: *Small Molecule Microarrays: Methods and Protocols*. Eds. Uttamchandani, M.; Yao, S. Q., Springer, New York, **2017**, 195-212.

205. Kloth, K.; Rye-Johnsen, M.; Didier, A.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Niessner, R. and Seidel, M., *A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk*. Analyst, **2009**, 134(7), 1433-1439.

206. Wunderlich, A.; Torggler, C.; Elsässer, D.; Lück, C.; Niessner, R. and Seidel, M., *Rapid quantification method for Legionella pneumophila in surface water*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2016**, 408(9), 2203-2213.

207. Nistler, A.; Niessner, R. and Seidel, M., *Magnetic nanocomposites: versatile tool for the combination of immunomagnetic separation with flow-based chemiluminescence immuno chip for rapid biosensing of Staphylococcal enterotoxin B in milk*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2019**, 411(19), 4951-4961.

208. Kunze, A.; Dilcher, M.; Abd El Wahed, A.; Hufert, F.; Niessner, R. and Seidel, M., *On-Chip isothermal nucleic acid amplification on flow-based chemiluminescence microarray analysis platform for the detection of viruses and bacteria*. Analytical Chemistry, **2016**, 88(1), 898-905.

209. Kober, C.; Niessner, R. and Seidel, M., *Quantification of viable and non-viable Legionella spp. by heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification (haRPA) on a flow-based chemiluminescence microarray*. Biosensors and Bioelectronics, **2018**, 100, 49-55.

210. Wolter, A.; Niessner, R. and Seidel, M., *Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Legionella pneumophila in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system*. Analytical Chemistry, **2008**, 80(15), 5854-5863.
211. Wolter, A.; Niessner, R. and Seidel, M., *Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays*. Analytical Chemistry, **2007**, 79(12), 4529-4537.
212. Bemetz, J. A., *Folienbasierter Mikroreaktor für die NMR-relaxometrische online-Charakterisierung magnetischer Nanopartikel und flussbasierte Mikroarrays*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2019.
213. Lorenz, T. C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. Journal of Visualized Experiments, **2012**, 63, e3998.
214. Reischl, U.; Linde, H. J.; Lehn, N.; Landt, O.; Barratt, K. and Wellinghausen, N., *Direct detection and differentiation of Legionella spp. and Legionella pneumophila in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis*. Journal of Clinical Microbiology, **2002**, 40(10), 3814-3817.
215. Mahbubani, M. H.; Bej, A. K.; Miller, R.; Haff, L.; DiCesare, J. and Atlas, R. M., *Detection of Legionella with polymerase chain reaction and gene probe methods*. Molecular and Cellular Probes, **1990**, 4(3), 175-187.
216. Stølhaug, A. and Bergh, K., *Identification and differentiation of Legionella pneumophila and Legionella spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing*. Applied and Environmental Microbiology, **2006**, 72(9), 6394-6398.
217. Collins, S.; Jorgensen, F.; Willis, C. and Walker, J., *Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of Legionella in environmental samples*. Journal of Applied Microbiology, **2015**, 119(4), 1158-1169.
218. Benitez, A. J. and Winchell, J. M., *Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Legionella species, Legionella pneumophila, and Legionella pneumophila serogroup 1*. Journal of Clinical Microbiology, **2013**, 51(1), 348-351.

219. Diederer, B. M. W.; de Jong, C. M. A.; Marmouk, F.; Kluytmans, J. A. J. W.; Peeters, M. F. and Van der Zee, A., *Evaluation of real-time PCR for the early detection of Legionella pneumophila DNA in serum samples*. Journal of Clinical Microbiology, **2007**, 56(1), 94-101.
220. Manz, W.; Amann, R.; Szewzyk, R.; Szewzyk, U.; Stenström, T.-A.; Hutzler, P. and Schleifer, K.-H., *In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy*. Microbiology, **1995**, 141(1), 29-39.
221. Shen, S.-M.; Chou, M.-Y.; Hsu, B.-M.; Ji, W.-T.; Hsu, T.-K.; Tsai, H.-F.; Huang, Y.-L.; Chiu, Y.-C.; Kao, E.-S.; Kao, P.-M. and Fan, C.-W., *Assessment of Legionella pneumophila in recreational spring water with quantitative PCR (Taqman) assay*. Pathogens and Global Health, **2015**, 109(5), 236-241.
222. Wilson, D. A.; Yen-Lieberman, B.; Reischl, U.; Gordon, S. M. and Procop, G. W., *Detection of Legionella pneumophila by real-time PCR for the mip gene*. Journal of Clinical Microbiology, **2003**, 41(7), 3327-3330.
223. Mérault, N.; Rusniok, C.; Jarraud, S.; Gomez-Valero, L.; Cazalet, C.; Marin, M.; Brachet, E.; Aegerter, P.; Gaillard, J. L.; Etienne, J.; Herrmann, J. L.; Lawrence, C. and Buchrieser, C., *Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of Legionella pneumophila serogroup 1 in water and clinical samples*. Applied and Environmental Microbiology, **2011**, 77(5), 1708-1717.
224. Mentasti, M.; Kese, D.; Echahidi, F.; Uldum, S. A.; Afshar, B.; David, S.; Mrazek, J.; De Mendonça, R.; Harrison, T. G. and Chalker, V. J., *Design and validation of a qPCR assay for accurate detection and initial serogrouping of Legionella pneumophila in clinical specimens by the ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI)*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **2015**, 34(7), 1387-1393.
225. Cao, B.; Yao, F.; Liu, X.; Feng, L. and Wang, L., *Development of a DNA microarray method for detection and identification of all 15 distinct O-antigen forms of Legionella pneumophila*. Applied and Environmental Microbiology, **2013**, 79(21), 6647-6654.

226. Sánchez-Parra, B.; Núñez, A. and Moreno, D. A., *Preventing legionellosis outbreaks by a quick detection of airborne Legionella pneumophila*. Environmental Research, **2019**, 171, 546-549.
227. Templeton, K. E.; Scheltinga, S. A.; Sillekens, P.; Crielaard, J. W.; van Dam, A. P.; Goossens, H. and Claas, E. C. J., *Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of Legionella pneumophila and other Legionella species*. Journal of Clinical Microbiology, **2003**, 41(9), 4016-4021.
228. AFNOR (Association française de normalisation), *Validation protocol for commercial methods of detection and quantification of Legionella and Legionella pneumophila by concentration and gene amplification by polymerase chain reaction (PCR)*. AFNOR, NF T90-471, **2013**.
229. Behets, J.; Declerck, P.; Delaedt, Y.; Creemers, B. and Ollevier, F., *Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Legionella pneumophila in water samples*. Journal of Microbiological Methods, **2007**, 68(1), 137-144.
230. Levi, K.; Smedley, J. and Towner, K. J., *Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of Legionella pneumophila in hospital and environmental water samples*. Clinical Microbiology and Infection, **2003**, 9(7), 754-758.
231. Joly, P.; Falconnet, P. A.; Andre, J.; Weill, N.; Reyrolle, M.; Vandenesch, F.; Maurin, M.; Etienne, J. and Jarraud, S., *Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation*. Applied and Environmental Microbiology, **2006**, 72(4), 2801-2808.
232. Immundiagnostik, *MutaPLEX® Legionella pneumophila real time PCR kit*. unter [http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/KG196432\\_96\\_MutaPLEX\\_Legionella\\_pneumophila.pdf](http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/KG196432_96_MutaPLEX_Legionella_pneumophila.pdf) (03.12.2019).
233. Immundiagnostik, *MutaPLEX® Legionella species real time PCR kit*. unter [http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/KG191932\\_96\\_MutaPLEX\\_Legionella\\_spec.pdf](http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/KG191932_96_MutaPLEX_Legionella_spec.pdf) (03.12.2019).



234. Elisabeth Pharmacon, *EliGene<sup>®</sup> Legionella pneumophila UNI*. unter <https://www.elisabeth.cz/en/product-eligene-legionella-pneumophila-uni-en.html> (03.12.2019).
235. Diagenode Diagnostics, *R-DiaLeg<sup>TM</sup> Legionella pneumophila / spp.* unter <https://www.diagenodediagnostics.com/products/r-dia-leg> (03.12.2019).
236. R-Biopharm AG, *SureFast<sup>®</sup> Legionella pneumophila PLUS*. unter <https://food.r-biopharm.com/de/produkte/sureaqua-legionella-pneumophila-plus-2/> (03.12.2019).
237. Qiagen, *mericon Quant Legionella spp. Kit*. unter <https://www.qiagen.com/at/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr/qpcr-assays-and-instruments/food-safety-testing/mericon-quant-legionella-spp-kit/#orderinginformation> (03.12.2019).
238. Baume, M.; Garrelly, L.; Facon, J. P.; Bouton, S.; Fraisse, P. O.; Yardin, C.; Reyrolle, M. and Jarraud, S., *The characterization and certification of a quantitative reference material for Legionella detection and quantification by qPCR*. Journal of Applied Microbiology, **2013**, 114(6), 1725-1733.
239. Lee, J. V.; Lai, S.; Exner, M.; Lenz, J.; Gaia, V.; Casati, S.; Hartemann, P.; Lück, C.; Pangon, B.; Ricci, M. L.; Scaturro, M.; Fontana, S.; Sabria, M.; Sánchez, I.; Assaf, S. and Surman-Lee, S., *An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems*. Journal of Applied Microbiology, **2011**, 110(4), 1032-1044.
240. Bio-Rad Laboratories, *iQ-Check Legionella Real-Time PCR-Kits*. unter <https://www.bio-rad.com/de-de/product/iq-check-legionella-real-time-pcr-kits?ID=LS5I7MLPT> (11.09.2019).
241. AdGène laboratoire *Renewal study for iQ-Check<sup>®</sup> Legionella spp. for the detection and enumeration of Legionella in sanitary hot water and cooling towers*. unter: [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BRD-07-16-12-07\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-BRD-07-16-12-07_en.pdf) (11.09.2019).
242. Minerva Biolabs, *AquaScreen qPCR Detection Kits*. unter <https://www.minerva-biolabs.com/produkte/wasserdiagnostik/aquascreen-qpcr-detection-kits/> (11.09.2019).

243. Minerva Biolabs, Catalogue. [https://www.minerva-biolabs.com/wp-content/uploads/MB\\_Katalog\\_2016-17.pdf](https://www.minerva-biolabs.com/wp-content/uploads/MB_Katalog_2016-17.pdf) (11.09.2019).
244. Pall Corporation, *GeneDisc® Technologies*. unter <https://shop.pall.com/us/en/food-beverage/quality-control/environmental-monitoring/genedisc-technologies-zidh3ltp0tl> (11.09.2019).
245. BIOTECON Diagnostics, *Legionella Quantification LyoKit*. unter [https://www.bc-diagnostics.com/downloads/products/marketing/BIOTECON-Diagnostics\\_Product-Sheet\\_Legionella\\_Quantification\\_LyoKit.pdf](https://www.bc-diagnostics.com/downloads/products/marketing/BIOTECON-Diagnostics_Product-Sheet_Legionella_Quantification_LyoKit.pdf) (11.09.2019).
246. Gaia, V.; Fry, N. K.; Afshar, B.; Luck, P. C.; Meugnier, H.; Etienne, J.; Peduzzi, R. and Harrison, T. G., *Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology, **2005**, 43(5), 2047-2052.
247. Ratzow, S.; Gaia, V.; Helbig, J. H.; Fry, N. K. and Luck, P. C., *Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing Legionella pneumophila serogroup 1 strains*. Journal of Clinical Microbiology, **2007**, 45(6), 1965-1968.
248. Quero, S.; Párraga-Niño, N.; Sabria, M.; Barrabeig, I.; Sala, M. R.; Jané, M.; Mateu, L.; Sopena, N.; Pedro-Botet, M. L. and Garcia-Nuñez, M., *Legionella SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool*. Scientific Reports, **2019**, 9 (623), 1-6.
249. Gaia, V.; Fry, N. K.; Harrison, T. G. and Peduzzi, R., *Sequence-based typing of Legionella pneumophila serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation*. Journal of Clinical Microbiology, **2003**, 41(7), 2932-2939.
250. Coscollá, M. and González-Candelas, F., *Direct sequencing of Legionella pneumophila from respiratory samples for sequence-based typing analysis*. Journal of Clinical Microbiology, **2009**, 47(9), 2901-2905.
251. Ginevra, C.; Lopez, M.; Forey, F.; Reyrolle, M.; Meugnier, H.; Vandenesch, F.; Etienne, J.; Jarraud, S. and Molmeret, M., *Evaluation of a nested-PCR-derived*

- sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease*. Journal of Clinical Microbiology, **2009**, 47(4), 981-987.
252. Sharma-Kuinkel, B. K.; Rude, T. H. and Fowler, V. G., Jr., *Pulse field gel electrophoresis*. Methods in Molecular Biology, **2016**, 1373, 117-130.
253. Schwartz, D. C. and Cantor, C. R., *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. Cell, **1984**, 37(1), 67-75.
254. Zhou, H.; Ren, H.; Zhu, B.; Kan, B.; Xu, J. and Shao, Z., *Optimization of pulsed-field gel electrophoresis for Legionella pneumophila subtyping*. Applied and Environmental Microbiology, **2010**, 76(5), 1334-1340.
255. Boccia, S.; Stenico, A.; Amore, R.; Moroder, L.; Orsini, M.; Romano-Spica, V. and Ricciardi, G., *Molecular epidemiology of Legionella pneumophila environmental isolates representing nine different serogroups determined by automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis*. Epidemiology and Infection, **2005**, 133(6), 1097-1105.
256. Fry, N. K.; Alexiou-Daniel, S.; Bangsberg, J. M.; Bernander, S.; Pastoris, M. C.; Etienne, J.; Forsblom, B.; Gaia, V.; Helbig, J. H.; Lindsay, D.; Löck, P. C.; Pelaz, C.; Uldum, S. A. and Harrison, T. G., *A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of Legionella pneumophila serogroup 1: results of a pan-European study*. Clinical Microbiology and Infection, **1999**, 5(8), 462-477.
257. Bauman, J. G.; Wiegant, J.; Borst, P. and van Duijn, P., *A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA*. Experimental Cell Research, **1980**, 128(2), 485-490.
258. Levsky, J. M. and Singer, R. H., *Fluorescence in situ hybridization: past, present and future*. Journal of Cell Science, **2003**, 116(14), 2833-2838.
259. Nederlof, P. M.; van der Flier, S.; Wiegant, J.; Raap, A. K.; Tanke, H. J.; Ploem, J. S. and van der Ploeg, M., *Multiple fluorescence in situ hybridization*. Cytometry, **1990**, 11(1), 126-131.

260. Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, *Bericht der Expertenkommission Legionellen*. (Stand 22.05.2015) unter: [https://www.umwelt.nrw.de/fileadmin/redaktion/PDFs/umwelt/legionellen\\_expertenkommission.pdf](https://www.umwelt.nrw.de/fileadmin/redaktion/PDFs/umwelt/legionellen_expertenkommission.pdf) (21.11.2019).
261. Grimm, D.; Merkert, H.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H.; Hacker, J. and Brand, B. C., *Specific detection of Legionella pneumophila: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe*. Applied and Environmental Microbiology, **1998**, 64(7), 2686-2690.
262. Declerck, P.; Verelst, L.; Duvivier, L.; Van Damme, A. and Ollevier, F., *A detection method for Legionella spp in (cooling) water: fluorescent in situ hybridisation (FISH) on whole bacteria*. Water Science and Technology, **2003**, 47(3), 143-146.
263. Buchbinder, S.; Trebesius, K. and Heesemann, J., *Evaluation of detection of Legionella spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture*. International Journal of Medical Microbiology, **2002**, 292(3), 241-245.
264. Whiley, H.; Taylor, M. and Bentham, R., *Detection of Legionella species in potting mixes using fluorescent in situ hybridisation (FISH)*. Journal of Microbiological Methods, **2011**, 86(3), 304-309.
265. Vermicon, *Scan VIT<sup>®</sup> Legionella*. unter <https://www.vermicon.com/de/produkte/scanvit-wasser/test-kit-quantitative-analyse-legionellen/> (21.11.2019).
266. Gruas, C.; Alvarez, I.; Lara, C.; García, C. B.; Savva, D. and Arruga, M. V., *Identification of Legionella spp. in environmental water samples by ScanVIT-Legionella<sup>™</sup> method in Spain*. Indian Journal of Microbiology, **2013**, 53(2), 142-148.
267. Bargellini, A.; Marchesi, I.; Leoni, E.; Mansi, A.; Cristino, S.; Marcelloni, A. M. and Borella, P., *Inter-laboratory validation of a rapid assay for the detection and quantification of Legionella spp. in water samples*. Letters in Applied Microbiology, **2010**, 51(4), 421-427.
268. Gill, P. and Ghaemi, A., *Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review*. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, **2008**, 27(3), 224-243.

269. Asiello, P. J. and Baeumner, A. J., *Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review*. Lab on a Chip, **2011**, 11(8), 1420-1430.
270. Craw, P. and Balachandran, W., *Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review*. Lab on a Chip, **2012**, 12(14), 2469-2486.
271. Luthra, R. and Medeiros, L. J., *Isothermal multiple displacement amplification: a highly reliable approach for generating unlimited high molecular weight genomic DNA from clinical specimens*. The Journal of Molecular Diagnostics, **2004**, 6(1), 236-242.
272. Spits, C.; Le Caignec, C.; De Rycke, M.; Van Haute, L.; Van Steirteghem, A.; Liebaers, I. and Sermon, K., *Whole-genome multiple displacement amplification from single cells*. Nature Protocols, **2006**, 1(4), 1965-1970.
273. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N. and Hase, T., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic Acids Research, **2000**, 28(12), e63.
274. Nagamine, K.; Hase, T. and Notomi, T., *Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers*. Molecular and Cellular Probes, **2002**, 16(3), 223-229.
275. Lu, X.; Mo, Z. Y.; Zhao, H. B.; Yan, H. and Shi, L., *LAMP-based method for a rapid identification of Legionella spp. and Legionella pneumophila*. Applied Microbiology and Biotechnology, **2011**, 92(1), 179-187.
276. Lu, Q. F.; Zheng, W.; Luo, P.; Wu, Z. H.; Li, H. and Shen, J. G., *Establishment of loop-mediated isothermal amplification method for detection of Legionella pneumophila*. Journal of Zhejiang University. Medical sciences, **2010**, 39(3), 305-310.
277. Chen, Z.; Yang, T.; Yang, H. W.; Li, T. T.; Nie, L. B.; Mou, X. B.; Deng, Y.; He, N. Y.; Li, Z. Y.; Wang, L. J. and Li, S., *A portable multi-channel turbidity system for rapid detection of pathogens by loop-mediated isothermal amplification*. Journal of Biomedical Nanotechnology, **2018**, 14(1), 198-205.
278. Vincent, M.; Xu, Y. and Kong, H., *Helicase-dependent isothermal DNA amplification*. EMBO Reports, **2004**, 5(8), 795-800.

279. Casas-Finet, J. R. and Karpel, R. L., *Bacteriophage T4 gene 32 protein: modulation of protein-nucleic acid and protein-protein association by structural domains*. *Biochemistry*, **1993**, 32(37), 9735-9744.
280. Piepenburg, O.; Williams, C. H.; Stemple, D. L. and Armes, N. A., *DNA detection using recombination proteins*. *PLOS Biology*, **2006**, 4(7), e204, 1115-1121.
281. Formosa, T. and Alberts, B. M., *Purification and characterization of the T4 bacteriophage uvsX protein*. *Journal of Biological Chemistry*, **1986**, 261(13), 6107-6118.
282. Yonesaki, T.; Ryo, Y.; Minagawa, T. and Takahashi, H., *Purification and some of the functions of the products of bacteriophage T4 recombination genes, uvsX and uvsY*. *European Journal of Biochemistry*, **1985**, 148(1), 127-134.
283. Okazaki, T. and Kornberg, A., *Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid: XV. Purification and properties of a polymerase from Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, **1964**, 239(1), 259-268.
284. Drummond, T. G.; Hill, M. G. and Barton, J. K., *Electrochemical DNA sensors*. *Nature Biotechnology*, **2003**, 21(10), 1192-1199.
285. Foudeh, A. M.; Daoud, J. T.; Faucher, S. P.; Veres, T. and Tabrizian, M., *Sub-femtomole detection of 16s rRNA from Legionella pneumophila using surface plasmon resonance imaging*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2014**, 52, 129-135.
286. Melaine, F.; Saad, M.; Faucher, S. and Tabrizian, M., *Selective and high dynamic range assay format for multiplex detection of pathogenic Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, and Legionella pneumophila RNAs using surface plasmon resonance imaging*. *Analytical Chemistry*, **2017**, 89(14), 7802-7807.
287. Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, P.; Lobo-Castañón, M. J. and Miranda-Ordieres, A. J., *Hairpin-DNA probe for enzyme-amplified electrochemical detection of Legionella pneumophila*. *Analytical Chemistry*, **2007**, 79(11), 4050-4055.
288. Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J. and Tuñón-Blanco, P., *PCR-coupled electrochemical sensing of Legionella pneumophila*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24(8), 2390-2396.

289. Rai, V.; Nyine, Y. T.; Hapuarachchi, H. C.; Yap, H. M.; Ng, L. C. and Toh, C.-S., *Electrochemically amplified molecular beacon biosensor for ultrasensitive DNA sequence-specific detection of Legionella sp.* Biosensors and Bioelectronics, **2012**, 2(1), 133-140.
290. Rai, V.; Deng, J. and Toh, C.-S., *Electrochemical nanoporous alumina membrane-based label-free DNA biosensor for the detection of Legionella sp.* Talanta, **2012**, 98, 112-117.
291. Bodrossy, L., *Diagnostic oligonucleotide microarrays for microbiology.* In: *A Beginner's Guide to Microarrays.* Eds. Blalock, E. M., Springer US, Boston, MA, **2003**, 43-91.
292. Dalma-Weiszhausz, D. D.; Warrington, J.; Tanimoto, E. Y. and Miyada, C. G., *The affymetrix GeneChip platform: an overview.* Methods in Enzymology, **2006**, 410, 3-28.
293. Xi, D. Y.; Dou, Y.; Ren, W.; Yang, S.; Feng, L.; Cao, B. Y. and Wang, L., *A gyrB oligonucleotide microarray for the specific detection of pathogenic Legionella and three Legionella pneumophila subsp.* Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, **2017**, 110(12), 1515-1525.
294. Petzold, M.; Ehricht, R.; Slickers, P.; Pleischl, S.; Brockmann, A.; Exner, M.; Monecke, S. and Lück, C., *Rapid genotyping of Legionella pneumophila serogroup 1 strains by a novel DNA microarray-based assay during the outbreak investigation in Warstein, Germany 2013.* International Journal of Hygiene and Environmental Health, **2017**, 220(4), 673-678.
295. Cao, B.; Liu, X.; Yu, X.; Chen, M.; Feng, L. and Wang, L., *A new oligonucleotide microarray for detection of pathogenic and non-pathogenic Legionella spp.* PLOS ONE, **2014**, 9(12), e113863.
296. Zhou, G.; Wen, S.; Liu, Y.; Li, R.; Zhong, X.; Feng, L.; Wang, L. and Cao, B., *Development of a DNA microarray for detection and identification of Legionella pneumophila and ten other pathogens in drinking water.* International Journal of Food Microbiology, **2011**, 145(1), 293-300.

297. Zak, M.; Zaborowski, P.; Baczewska-Rej, M.; Zasada, A. A.; Matuszewska, R. and Krogulska, B., *Development of a miniaturized DNA microarray for identification of 66 virulence genes of Legionella pneumophila*. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, **2011**, 65, 838-848.
298. Kersting, S.; Rausch, V.; Bier, F. F. and von Nickisch-Roseneck, M., *Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens*. *Microchimica Acta*, **2014**, 181(13-14), 1715-1723.
299. Kersting, S.; Rausch, V.; Bier, F. F. and von Nickisch-Roseneck, M., *Rapid detection of Plasmodium falciparum with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis*. *Malaria Journal*, **2014**, 13(1), 99.
300. Steinert, M.; Emödy, L.; Amann, R. and Hacker, J., *Resuscitation of viable but nonculturable Legionella pneumophila Philadelphia JR32 by Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1997**, 63(5), 2047-2053.
301. Nocker, A.; Cheung, C. Y. and Camper, A. K., *Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells*. *Journal of Microbiological Methods*, **2006**, 67(2), 310-320.
302. Prevost, B.; Goulet, M.; Lucas, F. S.; Joyeux, M.; Moulin, L. and Wurtzer, S., *Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes*. *Water Research*, **2016**, 91, 68-76.
303. Yanez, M. A.; Nocker, A.; Soria-Soria, E.; Murtula, R.; Martinez, L. and Catalan, V., *Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR*. *Journal of Microbiological Methods*, **2011**, 85(2), 124-130.
304. Chang, B.; Taguri, T.; Sugiyama, K.; Amemura-Maekawa, J.; Kura, F. and Watanabe, H., *Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable Legionella cells*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **2010**, 63(2), 119-123.



305. Delgado-Viscogliosi, P.; Solignac, L. and Delattre, J.-M., *Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable Legionella pneumophila cells in environmental water samples*. Applied and Environmental Microbiology, **2009**, 75(11), 3502-3512.
306. Fittipaldi, M.; Nocker, A. and Codony, F., *Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification*. Journal of Microbiological Methods, **2012**, 91(2), 276-289.
307. Gritsan, N., Platz, M., *Photochemistry of azides: The azide/nitrene*. In: *Organic Azides*. Eds. Bräse, S.; Banert, K., John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, **2010**, 311-372.
308. DeTraglia, M. C.; Brand, J. S. and Tometsko, A. M., *Characterization of azidobenzamides as photoaffinity labels for trypsin*. Journal of Biological Chemistry, **1978**, 253(6), 1846-1852.
309. Kell, D. B.; Kaprelyants, A. S.; Weichart, D. H.; Harwood, C. R. and Barer, M. R., *Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues*. Antonie Van Leeuwenhoek, **1998**, 73(2), 169-187.
310. Chang, B.; Sugiyama, K.; Taguri, T.; Amemura-Maekawa, J.; Kura, F. and Watanabe, H., *Specific detection of viable Legionella cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR*. Applied and Environmental Microbiology, **2009**, 75(1), 147-153.
311. Kontchou, J. A. and Nocker, A., *Optimization of viability qPCR for selective detection of membrane-intact Legionella pneumophila*. Journal of Microbiological Methods, **2019**, 156, 68-76.
312. Ditommaso, S.; Ricciardi, E.; Giacomuzzi, M.; Arauco Rivera, S. R.; Ceccarelli, A. and Zotti, C. M., *Overestimation of the Legionella spp. load in environmental samples by quantitative real-time PCR: pretreatment with propidium monoazide as a tool for the assessment of an association between Legionella concentration and sanitary risk*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, **2014**, 80(4), 260-266.
313. Scaturro, M.; Fontana, S.; Dell'eva, I.; Helfer, F.; Marchio, M.; Stefanetti, M. V.; Cavallaro, M.; Miglietta, M.; Montagna, M. T.; De Giglio, O.; Cuna, T.; Chetti, L.; Sabattini, M. A. B.; Carlotti, M.; Viggiani, M.; Stenico, A.; Romanin, E.; Bonanni, E.;

Ottaviano, C.; Franzin, L.; Avanzini, C.; Demarie, V.; Corbella, M.; Cambieri, P.; Marone, P.; Rota, M. C.; Bella, A. and Ricci, M. L., *A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect Legionella in water samples*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, **2016**, 85(3), 283-288.

314. Lizana, X.; López, A.; Benito, S.; Agustí, G.; Ríos, M.; Piqué, N.; Marqués, A. M. and Codony, F., *Viability qPCR, a new tool for Legionella risk management*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, **2017**, 220(8), 1318-1324.

315. Bonetta, S.; Pignata, C.; Bonetta, S.; Meucci, L.; Giacosa, D.; Marino, E.; Gilli, G. and Carraro, E., *Viability of Legionella pneumophila in water samples: A comparison of propidium monoazide (PMA) treatment on membrane filters and in liquid*. International Journal of Environmental Research and Public Health, **2017**, 14(5), 467-474.

316. Li, H.; Xin, H. and Li, S. F. Y., *Multiplex PMA-qPCR assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable Legionella pneumophila, Salmonella typhimurium, and Staphylococcus aureus in environmental waters*. Environmental Science and Technology, **2015**, 49(24), 14249-14256.

317. Delgado-Viscogliosi, P.; Simonart, T.; Parent, V.; Marchand, G.; Dobbelaere, M.; Pierlot, E.; Pierzo, V.; Menard-Szczebara, F.; Gaudard-Ferveur, E.; Delabre, K. and Delattre, J. M., *Rapid method for enumeration of viable Legionella pneumophila and other Legionella spp. in Water*. Applied and Environmental Microbiology, **2005**, 71(7), 4086-4096.

318. Samhan, F. A.; Stedtfeld, T. M.; Waseem, H.; Williams, M. R.; Stedtfeld, R. D. and Hashsham, S. A., *On-filter direct amplification of Legionella pneumophila for rapid assessment of its abundance and viability*. Water Research, **2017**, 121, 162-170.

319. Stedtfeld, R. D.; Turlousse, D. M.; Seyrig, G.; Stedtfeld, T. M.; Kronlein, M.; Price, S.; Ahmad, F.; Gulari, E.; Tiedje, J. M. and Hashsham, S. A., *Gene-Z: a device for point of care genetic testing using a smartphone*. Lab on a Chip, **2012**, 12(8), 1454-1462.

320. Umweltbundesamt, *Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern*. Umweltbundesamt, **2017**.
321. Kazandjian, D.; Chiew, R. and Gilbert, G. L., *Rapid diagnosis of Legionella pneumophila serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test*. Journal of Clinical Microbiology, **1997**, 35(4), 954-956.
322. Verein Deutscher Ingenieure, *VDI 2047 Blatt 2: Rückkühlwerke - Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen (VDI-Kühlturmregeln)*. Verein Deutscher Ingenieure - Gesellschaft Bauen und Gebäudetechnik, **2019**.
323. Verein Deutscher Ingenieure, *VDI 2047 Blatt 3: Rückkühlwerke - Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen - Kühltürme über 200 MW Kühlleistung (VDI-Kühlturmregeln)*. Verein Deutscher Ingenieure - Gesellschaft Energie und Umwelt, **2018**.
324. Verein Deutscher Ingenieure, *VDI 4250 Blatt 2: Bioaerosole und biologische Agenzien - Umweltmedizinische Bewertung von Bioaerosol-Immissionen - Risikobeurteilung von legionellenhaltigen Aerosolen*. Verein Deutscher Ingenieure - VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) – Normenausschuss, **2015**.
325. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, *Zweiundvierzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über Verdunstungskühlanlagen, Kühltürme und Nassabscheider - 42.BImSchV)*. Bundesregierung - Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, **2017**.
326. Helbig, J. H.; Jacobs, E. and Lück, C., *Legionella pneumophila urinary antigen subtyping using monoclonal antibodies as a tool for epidemiological investigations*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **2012**, 31(7), 1673-1677.
327. Exner, M. B., Ansgar; Lück, Christian; Rösing, Claudia; Pleischl, Stefan; Koch, Christoph; Walger, P. *Ausbruchmanagement des Legionellenausbruches in Warstein 2013- Charakterisierung, Lehren und Konsequenzen aus hygienisch-medizinischer Sicht*, unter: [https://www.umwelt.nrw.de/fileadmin/redaktion/PDFs/umwelt/legionellen\\_warstein\\_ausbruchmanagement.pdf](https://www.umwelt.nrw.de/fileadmin/redaktion/PDFs/umwelt/legionellen_warstein_ausbruchmanagement.pdf) (18.07.2019), 2015.

328. Kober, C., *Entwicklung eines Chemilumineszenz-Mikroarrays für die isothermale Amplifikation und Detektion von Legionellen auf dem MCR 3*. Masterarbeit, Technische Universität München, 2015.
329. Kunze, A., *Aufkonzentrierung und Detektion viraler und bakterieller Pathogene in Trinkwasser*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2016.
330. Neumair, J., *Isotherme Amplifikation und Lebend/Tot-Differenzierung von lebenden Legionellen in Realproben auf dem MCR 3*. Bachelorarbeit, Technische Universität München, 2016.
331. Elsässer, D., *Verbundverfahren zur schnellen Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren für das Inline-Monitoring von Trink- und Rohwasser*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2017.
332. Wendlinger, L., *Etablierung einer schnellen Aufkonzentrierungsmethode mit MAF-DEAE für Legionella pneumophila*. Bachelorarbeit, Technische Universität München, 2018.
333. Ho, J.; Seidel, M.; Niessner, R.; Eggers, J. and Tiehm, A., *Long amplicon (LA)-qPCR for the discrimination of infectious and noninfectious phix174 bacteriophages after UV inactivation*. Water Research, **2016**, 103, 141-148.
334. Ho, J., *Molekularbiologische Lebend/tot-Unterscheidung bei Viren und Bakterien nach Desinfektionsverfahren*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2017.
335. Wunderlich, A., *Antikörper-Mikroarrays zur Analyse von Legionella pneumophila in Wasser und anderen pathogenen Mikroorganismen in Lebensmittel*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2017.

---

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne sonstige Hilfe erstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe. Alle direkt oder indirekt aus fremden Arbeiten übernommenen Inhalte, Daten, Graphen, Konzepte etc., wurden als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass keine unzulässige Hilfe Dritter in Anspruch genommen wurde, sowie die Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

---