

## Schlussbericht

BMBF-Verbundprojekt: LEBENSMITTELVERSORGUNG UND ANALYTIK

Akronym: LEVERA

Teilvorhaben: Schnellkonzentrierung und Multiplex-Mikroarray-Analyse von Mikroorganismen und Toxinen

Förderkennzeichen: 13N12613

Laufzeit des Vorhabens: 15.4.2013 – 14.7.2016

Ausführende Stelle:

Technische Universität München

Department für Chemie

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (TUM-IWC)

## Inhaltsverzeichnis:

I.	Kurzdarstellung	-3-
I.1.	Aufgabenstellung	-3-
I.2.	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	-3-
I.3.	Planung und Ablauf des Vorhabens	-3-
I.4.	Wissenschaftlicher und technischer Stand vor Projektbeginn	-5-
I.5.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	-8-
II.	Eingehende Darstellung	-9-
II.1.	Durchführung und erzielttes Ergebnis	-9-
II.1.1.	Arbeitspaket 1.4.1. Validierung der Antikörper mittels Mikroarrays	-9-
II.1.2.	Arbeitspaket 2. Verfahren der Probenvorbereitung	-16-
II.1.3.	Arbeitspaket 3: Immunchemische Nachweisverfahren	-33-
II.1.4.	Arbeitspaket 5. Validierung und Laborvergleichsuntersuchungen	-51-
II.1.5.	Arbeitspaket 6. Praxistests der entwickelten Testmuster	-51-
II.1.6.	Literaturverzeichnis	-54-
II.1.7.	Fazit	-57-
II.2.	Zahlenmäßiger Nachweis	-58-
II.3.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	-58-
II.4.	Voraussichtlicher Nutzen	-59-
II.5.	Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	-60-
II.6.	Erfolge und geplante Veröffentlichungen	-60-

## **I. Kurzdarstellung**

### **I.1. Aufgabenstellung**

Die Qualitätskontrolle von Lebensmitteln spielt eine wichtige Rolle für den Gesundheitsschutz der Bevölkerung und die damit verbundene Risikoregulierung. Die Zeit vom Auftreten einer mikrobiell bedingten Gefahr bis zur Identifizierung des Krankheitserregers und der Ermittlung seiner Ausbreitung in der Lebensmittelwarenkette ist hierbei ein entscheidender Aspekt. Das Gesamtziel des Projektes LEVERA ist die Bereitstellung einer universell einsetzbaren Schnelldiagnostik und Schnellidentifizierung von pathogenen Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln. Im Teilprojektvorhaben der IWC-TUM wurde an einer dezentral einsetzbaren Analysenplattform (MCR 3) für multiplexfähige Schnellnachweissysteme zur Quantifizierung von diversen pathogenen Mikroorganismen und Toxinen in Lebensmitteln geforscht. Die pathogenen Mikroorganismen und Toxine kommen nur in geringen Konzentrationen in Lebensmitteln vor, weswegen die Aufkonzentrierungsverfahren mit dem Detektionsverfahren kombiniert werden müssen. Um den Zeitfaktor für das Analyseergebnis zu reduzieren, wurde somit an einem effizienten Schnellaufkonzentrierungsverfahren, der monolithischen Immunoextraktion, gearbeitet. Auf diese Weise konnte die langwierige Anreicherung über eine Zellkultur ersetzt werden und die Aufkonzentrierung direkt mit dem Schnelldetektionsverfahren kombiniert werden.

### **I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Das BMBF-Verbundprojekt „Lebensmittelversorgung und Analytik“ (LEVERA) wurde im Rahmen des BMBF-Programms „Forschung für die zivile Sicherheit“ im Themenfeld „Sicherung der Lebensmittel und Lebensmittelwarenketten“ durchgeführt. Der Projekttitel des BMBF-Teilprojekts an der IWC-TUM war: Schnellaufkonzentrierung und Multiplex-Mikroarray-Analyse von Mikroorganismen und Toxinen. Deutsche Projektpartner waren die Professur für Milchwissenschaften, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität, München und die R-Biopharm AG, Darmstadt. Die Projektkoordinatorenschaft hatte Prof. Usleber von der Justus-Liebig-Universität, Gießen.

### **I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Gegenstand des vorliegenden Schlussberichtes sind die erfolgten Arbeiten des Verbundpartners IWC-TUM, die sich in das BMBF Verbundprojekt LEVERA eingliedern.

Das IWC-TUM bearbeitete im Projekt LEVERA folgende Punkte des Gesamtprojektvorhabens:

- Entwicklung eines Immunoextraktionsverfahrens zur schnellen Separation und Anreicherung von Bakterien und mikrobiellen Toxinen.

- Entwicklung eines schnellen Multiplex-Analyseverfahrens für pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmittel.
- Optimierung und Validierung sowie on-site Tests der entwickelten immunchemischen Verfahren.

Die Aufgaben des Teilprojektes gliederten sich wie folgt:

Arbeitspaket 1: Antikörper gegen bakterielle Antigene

Arbeitspaket 1.4.1. Validierung der Antikörper mittels Mikroarrays

- Screening der einzelnen Antikörper für die im Projekt definierten Mikroorganismen zum Einsatz als Fänger- und Detektionsantikörper für Sandwich-Mikroarray-Immunoassays.
- Vergleich des Einsatzes von lebenden und hitzeinaktivierten Mikroorganismen auf der Mikroarray-Analyse-Plattform MCR 3 SLT.
- Testung der Kreuzreaktivität der Antikörper.

Arbeitspaket 2: Verfahren zur Probenvorbereitung

Arbeitspaket 2.1. Probenaufschluss (IWC-TUM, R-BIO)

Arbeitspaket 2.2. Immunchemische Verfahren

2.2.1. Monolithische Immunoextraktion

- Anreicherung von *Bacillus cereus* über die monolithische Immunoextraktion
- Aufbau der automatischen Immunoextraktions-Anlage (Auto-MIE)

2.2.2. Immunomagnetische Separation

Arbeitspaket 2.3. Physikalische und Chemische Verfahren (IWC-TUM, R-BIO)

Arbeitspaket 2.4. Einwegartikel zur Probenvorbereitung (IWC-TUM, R-BIO)

Arbeitspaket 3: Immunchemische Nachweisverfahren

Arbeitspaket 3.1. Mikroarray-Chip-Funktionsmuster

Arbeitspaket 3.2. F&E Technikum Produktionsverfahren

Arbeitspaket 3.3. Mikroarray Geräteadaption

Arbeitspaket 5: Validierung und Laborvergleichsuntersuchungen

Arbeitspaket 6: Praxistests der entwickelten Testmuster

Das Projekt war auf 3 Jahre angelegt. In regelmäßigen Halbjahresabständen wurden Statustreffen durchgeführt, die jeweils abwechselnd bei den einzelnen Kooperationspartnern abgehalten wurden. Hier berichtete jeder Partner über den aktuellen Stand der Forschung und die Entwicklung im Projekt. Zudem wurde das weitere Vorgehen abgesprochen. Vorort wurden jeweils Entwicklungsarbeiten demonstriert. Es erfolgte stets eine enge Abstimmung der geplanten Experimente zwischen der IWC-TUM, JLU, LMU und R-BIO, sodass am Ende des Projektes jeder Kooperationspartner auf demselben Kenntnisstand war. Die an der JLU und LMU produzierten monoklonalen und polyklonalen Antikörper, Seren und Bakterienstämme wurden der IWC-TUM im Rahmen des Projektes kontinuierlich zur Verfügung gestellt. Die Geräte MCR 3 SLT zur Messung von Antikörper-Mikroarrays und der Mikroarraydosierroboter sciFLEXARRAYER S1 zur Herstellung von Antikörpermikroarrays wurde zu Anfang des Projektes gekauft. Somit konnte zeitnah das Antikörper-Screening durchgeführt und die Antikörper-Mikroarrays zum Nachweis von Bakterien und Toxinen erarbeitet werden. Auch hier erfolgte ein reger Austausch der geplanten Experimente und erzielten Ergebnisse. Die automatische monolithische Immunoextraktionsanlage (Auto-MIE) wurde in ihrer Gesamtheit am IWC-TUM konzipiert und mit Hilfe der institutseigenen mechanischen Werkstatt konstruiert und gebaut und im Anschluss im Labor auf Funktionalität getestet.

#### **I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand vor Projektbeginn**

##### I.4.1. Stand von Wissenschaft und Technik

###### I.4.1.1. Schnellaufkonzentrierungsverfahren

Ziel des Aufkonzentrierungsverfahrens ist, die Bakterienzellen schnellstmöglich in einen Konzentrationsbereich zu überführen, in dem ein Analyseverfahren in der Lage ist, die Mikroorganismen zu quantifizieren. Hierbei kann die Analysezeit im Vergleich zum Kultivierungsverfahren auf wenige Stunden verkürzt werden. Die üblichen Nachweisgrenzen liegen bei Immunoassays bei  $10^4$ - $10^5$  Zellen/mL und bei PCR-basierten Methoden um ein bis zwei Zehnerpotenzen darunter. Zusätzlich muss jedoch die Lebensmittelmatrix entfernt werden. Verschiedene Separations- und Konzentrationsmethoden sind in dem Artikel von Stevens & Jaykus ausführlich beschrieben (Stevens et al., 2004). Es wird generell zwischen selektiven und nicht-selektiven Aufkonzentrierungsmethoden unterschieden. Es kann beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration größenabhängig aufkonzentriert werden (Agoston et al., 2009; Fujikawa et al., 2008; D`Urso et al., 2009). Eine selektive Anreicherung kann durch Biorezeptoren wie z.B. Antikörper, Lektine oder Phagen erreicht werden (Stewart et al., 2012; Walcher et al., 2012; Horak et al., 2012). Diese Biorezeptoren sind hierbei kovalent an die Partikel oder dem Filtermaterial immobilisiert. Die immunomagnetische Separation verwendet magnetische Nano- oder Mikropartikel. Hierbei werden die Antikörper an die Mikroorganismen in der Lebensmittelprobe gebunden und anschließenden mit den angebondenen Magnetpartikeln durch ein magnetisches Feld von der Matrix separiert (Safarik et al., 1999; Olsvik et al., 1994, Pappert et al., 2010). Diese Methode eignet sich sehr gut für geringe Probenvolumina. Bei größeren Probenvolumina erhöhen sich jedoch die Inkubationszeiten und die Konzentration an erforderlichen Magnetpartikeln. Approdu et al. zeigten die magnetische Separation mit einer Fällungsreaktion und einer Dichtegradientenzentrifugation. *Staphylokokkus aureus* wurde mit PCR

nachgewiesen (Aprodu et al., 2011). All diese Methoden erreichten nur geringe Aufkonzentrierungsfaktoren (maximal 15) und enthielten zudem viele einzelne manuelle Prozessschritte. Die Immunfiltration oder Immunaффinitätschromatographie ist eine andere selektive Konzentrierungsmethode (Arvidsson et al., 2002; Jungbauer et al., 2008; Brewster et al., 2003; Dainiak et al., 2005). Spezifische Antikörper binden an einem Trägermaterial in einer Säule das Antigen, während alle anderen Probenbestandteile im Durchlauf verbleiben. Man erhält nach der Elution eine reine und konzentrierte Antigenlösung. Die monolithische Immunfiltration zeigte sich hinsichtlich hoher Aufkonzentrierungsfaktoren, Selektivität und Schnelligkeit als eine leistungsstarke Schnellaufkonzentrierungsmethode (Ott et al., 2011). Es wurde dabei ein makroporöses Epoxy polymer in Säulen einpolymerisiert. Flüssige Proben werden mit hohen Flussraten aber dennoch geringem Rückdruck durch die monolithische Säule geleitet, welche ausschließlich Makroporen mit einer Größe von ca. 21  $\mu\text{m}$  enthalten (Peskoller et al., 2009). Durch Anpassung der Säulendurchmesser und Länge der Monolithen konnten Kapazität, Durchflussgeschwindigkeit und Konzentrierungsfaktoren eingestellt werden. Die Ankopplung von Antikörpern gelangte mit hoher Ausbeute, sodass eine effiziente Konzentrierungs- und Separationsmethode zur Verfügung steht (Ott et al., 2011).

#### I.4.1.2. Quantitative Schnelldachweisverfahren für Mikroorganismen in Lebensmittel

Der schnelle bioanalytische Nachweis von Bakterien in Lebensmitteln basiert auf spezifischen Biomarkern wie zum Beispiel intrazellulären Nukleinsäuresequenzen (genomische DNA, 16S rRNA) oder membranständigen Antigenstrukturen wie Membranproteine oder Lipopolysaccharide. Neben der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von Ercolinia et al., 2003 setzte sich die quantitative Polymerase-Ketten-Kettenreaktion (qPCR) durch (McKillip et al., 2004). Das genetische Material wird hier durch selektive Primer amplifiziert und mittels der entsprechenden Fluoreszenz-Sonde der Anstieg an DNA quantifiziert. Es können Bakterien bis zu einer Konzentration von  $10^3$ - $10^4$  Zellen/mL in einer Lebensmittelmatrix nachgewiesen werden. Dies entspricht pro qPCR-Ansatz 10 - 100 Kopien der genomischen DNA (Malorny et al., 2003). Es muss jedoch eine Lyse der Bakterien sowie eine DNA-Extraktion durchgeführt werden. Mit Hilfe von Immunoassays kann dagegen ein direkter quantitativer Nachweis von Bakterien erfolgen. Der Analyt wird hierbei in einem Sandwich-Testformat bestehend aus immobilisierten Fänger- und markierten Detektionsantikörpern untersucht. Als Analyseplattform können ELISA-Testformate auf Mikrotiterplatten, elektrochemische und optische Biosensoren oder Teststreifen verwendet werden (Meyer et al., 2011; Patel et al., 2002; Swaminathan et al., 1994). Der Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmittel war dabei meist nicht sensitiv genug, weswegen Kultivierungsmethoden zur Anreicherung mit den Analysenverfahren kombiniert wurden. Für die schnelle Quantifizierung von Krankheitserregern sind Multiplex-Analysenverfahren im Bereich der Lebensmittelsicherheit von großem Interesse, weil hinsichtlich der Vielzahl an möglichen Keimen die parallele Quantifizierung zu einer Zeit- und Kostenersparnis führt. Sowohl Antikörper-basierte Testverfahren als auch molekularbiologische Assays wurden auf Mikroarray-Plattformen parallelisiert. Multiplex-Sandwich-Immunoassays wurden mittels Chemilumineszenz (Magliulo et al., 2007; Wolter et al., 2008; Huelseweh et al., 2006), Fluoreszenz (Gehring et al., 2006) oder Elektroanalytik (Elsholz et al. 2006) ausgelesen. Neben der Multiplex-qPCR wurden zudem DNA-Mikroarrays zu molekularbiologischen Quantifizierung

von Mikroorganismen eingesetzt. Aktuell ist die Multiplex-Fähigkeit einer PCR der limitierende Faktor für beide Schnellnachweisverfahren (Klein et al., 2002). Treten unterschiedliche Konzentrationen an genomischen DNA-Sequenzen auf, ist die Effizienz der PCR nicht für jeden Mikroorganismus identisch. Dies führt zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze. Die Quantifizierung über DNA-Mikroarrays erfolgte z.B. nach einer Stopped-PCR (Donhauser et al., 2009). Im Gegensatz zu einer Endpunkt-PCR, korreliert im dynamischen Bereich der PCR die eingesetzte DNA mit der amplifizierten DNA, so dass bis zu 35 Kopien/mL an Bakterien-DNA quantifiziert werden konnten (Donhauser et al., 2011). In diesen Versuchen wurde für *E.coli* O157:H7, *Salmonella enterica* und *Campylobacter jejuni* eine separate PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Einzelstrang-Trennung mittels magnetischen Nanopartikeln zusammengeführt. Dies wurde erreicht, indem die Primer jeweils eine endständige Markierung von Biotin (Fängerstrang) und Digoxigenin (Detektionsstrang) enthielten. Durch Inkubation mit Streptavidin-markierten magnetischen Nanopartikeln erfolgte die Strangtrennung auf magnetischen Säulen. Die parallele Quantifizierung der amplifizierten Detektionsstränge einzelner Mikroorganismen erfolgte auf dem DNA-Mikroarray-Chip-Reader (MCR 3). Für die parallele Amplifizierung einer Vielzahl an genomischer DNA kann sich eine on-Chip-PCR eignen. Für DNA-Mikroarrays wurde gezeigt, dass durch immobilisierte Primer auf einem Mikroarray-Chip je DNA-Spot eine getrennte PCR-Reaktion durchgeführt werden kann (Andresen et al., 2009; Pemov et al., 2005).

#### I.4.2. Bisherige Arbeiten des Antragstellers

Das IWC-TUM besitzt bereits eine langjährige Erfahrung im Bereich der Bioanalytik und insbesondere in Schnellaufkonzentrierungsverfahren und Schnellanalyseverfahren für mikrobielle Fragestellungen. Bei den Aufkonzentrierungsverfahren wurde mit der Crossflow-Filtration (Peskoller et al., 2009a), immunomagnetischer Separation (Pappert et al., 2010) und monolithischer Affinitätsfiltration (Ott et al., 2011; Peskoller et al.; 2009b) gearbeitet. Auch die Multiplex-Mikroarray-Analyse wurde bereits mit immunochemischen (Volter et al., 2008; Karsunke et al., 2009) und molekularbiologischen (Donhauser et al., 2009; Donhauser et al., 2011) Analyseverfahren auf der Grundlage eines Chemilumineszenz-Durchfluss-Mikroarrays angewendet. Es wurden hierbei unter der Leitung von PD Dr. Michael Seidel und Prof. Dr. Reinhard Niessner neue Geräte und Prozesse für den schnellen Nachweis von pathogenen Mikroorganismen entwickelt. Im Rahmen des BMBF-Projektes PATH2OGENSCAN wurde ein DNA-Mikroarray für wasserassoziierte pathogene Bakterien, Viren und Protozoen sowie deren Indikatorkeime entwickelt. Hierzu wurde die automatisierte Mikroarray-Ausleseplattform MCR 3 (Kloth et al., 2009) für Chemilumineszenz-DNA-Mikroarrays verwendet. Die Firma GWK Präzisionstechnik GmbH hat im Rahmen dieses Projektes eine Temperatur-geregelte Mikroarray-Flusszellenaufnahme gebaut. Ihre Funktionalität konnte bereits gezeigt werden. In diesem Projekt wurde je Mikroorganismus eine separate PCR durchgeführt, die amplifizierte DNA gepoolt und nach Einzelstrangtrennung vereinigt. Am MCR für DNA-Mikroarrays wurden die PCR-Amplifikate anschließend quantifiziert. Dieses Verfahren wurde für die pathogenen Mikroorganismen *E.coli* O157:H7, *Salmonella enterica* und *Campylobacter jejuni* sowie für enteropathogene Viren (Norovirus, Adenovirus) und Bakteriophagen (MS2) gezeigt. Ein Nachteil molekularbiologischer Methoden ist

jedoch die aufwändige Probenvorbereitung und die anschließende PCR. Antikörper-basierten Methoden ermöglichen eine einfachere und schnellere Automatisierung, da die Bakterien-Konzentrate direkt z.B. auf dem MCR 3 prozessiert werden können. Jedoch sind für viele pathogene Mikroorganismen keine kommerziellen Antikörper verfügbar. Zudem sind diese Antikörper für Mikroarrays nur sehr selten anwendbar, da ihre Kreuzreaktivität zu anderen wichtigen Mikroorganismen im Bereich der Lebensmittelsicherheit noch nicht ausreichend getestet wurde. Daher ist die Produktion von hoch selektiven und sensitiven Antikörpern um pathogene Mikroorganismen in Lebensmitteln zu bestimmen essentiell. Dies sollte in diesem Projektvorhaben bearbeitet werden.

Am IWC-TUM wurde bereits das erste Funktionsmuster von dem MCR 3 für die Anwendung Antibiotika in Milch in einem AIF-ZUTECH Projekt entwickelt. Dieses MCR 3-System wurde zwischen 2010 - 2015 für die Anwendung Antibiotika in Milch an R-Biopharm AG auslizenziert. Der MPR Bayern setzt aktuell diese Anwendung weiter fort. In einem abgeschlossenen AIF-Projekt (SaBc) hat die IWC-TUM an einem automatischen Aufkonzentrierungs- und Nachweisverfahren für *S. aureus* und *B. cereus* gearbeitet. Es wurde auf dem MCR 3 ein Sandwich-Mikroarray-Immunoassay aufgebaut, der automatisch prozessiert wurde. Dieses Wissen floss in das Projektvorhaben LEVERA ein, um schnellstmöglich neue Ergebnisse erzielen zu können. In dem AIF-Projekt SaBc konnte gezeigt werden, dass eine temperierbare Flusszelle auf 30 °C eine schnellere und sensitivere Detektion von *S. aureus* am MCR 3 ermöglichte. Für das LEVERA-Projektvorhaben wurde aus diesem Grund der MCR 3 SLT mit integrierter Heizfunktion von der GWK Präzisionstechnik GmbH beschafft.

#### I.4.3. Schutzrechte und Schutzrechtanmeldungen

Es lagen keine Schutzrechte vor, die diesem Projektvorhaben entgegenstanden.

#### I.4.4. Literaturzitate

Siehe II.1.6.

### I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Neben den Kooperationspartnern im Projekt LEVERA ergab sich durch das Projekt eine Vielzahl an neuen Kontakten, die zum Teil in neue Forschungsvorhaben mündeten. Hierbei sind aus wissenschaftlicher Sicht folgende Kollegen zu erwähnen:

Prof. Dr. Brigitte Dorner (Robert Koch Institut Berlin)

Dr. Anna Charlotte Schulz (Division of Food Microbiology, National Food Institute, DTU-Food, Technical University of Denmark, National Food Institute)

Dr. Fedor Brovko (M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov, Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences, Director of Group of Immunochemistry).

Prof. Dr. Stefan Dübel (Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, TU Braunschweig)

Dr. Bärbel Niederwörmeier (Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien, ABC Schutz, Munster)

Mit folgenden Unternehmen konnte im Rahmen des Projekts LEVERA ein erster Kontakt im Bereich Mikroarray-Analyse und Immunextraktion entweder aufgebaut oder intensiviert werden.

Scienion AG (Dr. Holger Eickhoff)  
GWK Präzisionstechnik GmbH (Christian Heese)  
Omni Life Science GmbH (Hendrik Jürgens)  
Agrobiogen GmbH (Dr. habil. Matthias Leiser)  
Milchprüfing Bayern e.V. (Dr. Christian Baumgartner)

## **II. Eingehende Darstellung**

### **II.1. Durchführung und erzielttes Ergebnis**

#### **II.1.1. Arbeitspaket 1.4.1. Validierung der Antikörper mittels Mikroarrays**

Es wurde ein Mikroarray zur schnellen Charakterisierung von Antikörpern gegen bakterielle Antigene auf dem MCR 3 SLT etabliert. Auf diese Weise konnten diejenigen Antikörper mit der höchsten Bindeeffizienz und der geringsten Kreuzreaktivität für die Anwendung auf der flussbasierten Mikroarray-Plattform MCR 3 SLT identifiziert werden. Die in Hasen oder Mäusen produzierten Antikörper wurden über einen indirekten Chemilumineszenz(CL)-Mikroarray-Immunoassay getestet. Dazu wurden sowohl inaktivierte als auch lebende Mikroorganismen über ein Mikrodosierverfahren auf Epoxy-aktivierte PEG-beschichtete Glasträger immobilisiert. Anschließend wurde der entsprechende Antikörper mit dem immobilisierten Mikroorganismus auf dem Chip inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen sekundären Detektionsantikörper, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war (Abbildung 1). Mittels Wasserstoffperoxid und Luminol wurde dann ein Chemilumineszenz-Signal generiert und auf der Mikroarray-Analyse-Plattform MCR 3 SLT ausgelesen. Es wurden folgende Mikroorganismen der LEVERA Projektpartner vom Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig Universität Gießen verwendet:

- *Klebsiella pneumoniae* ssp. DSM 30104, Konzentration:  $3,8 \times 10^9$  KBE/mL (Koloniebildende Einheit/mL)
- *Cronobacter sakazakii* (DB) 39a-2003, Serogruppe (SG) O7,  $5 \times 10^9$  KBE/mL

Auf dem MCR 3 SLT wurde ein Messprotokoll geschrieben und optimiert, damit die einzelnen Proben und Reagenzien (Seren, HRP-markierter Sekundärantikörper, Chemilumineszenz-Reagenzien) automatisch prozessiert werden konnten. Eine Messung dauerte 10 min.

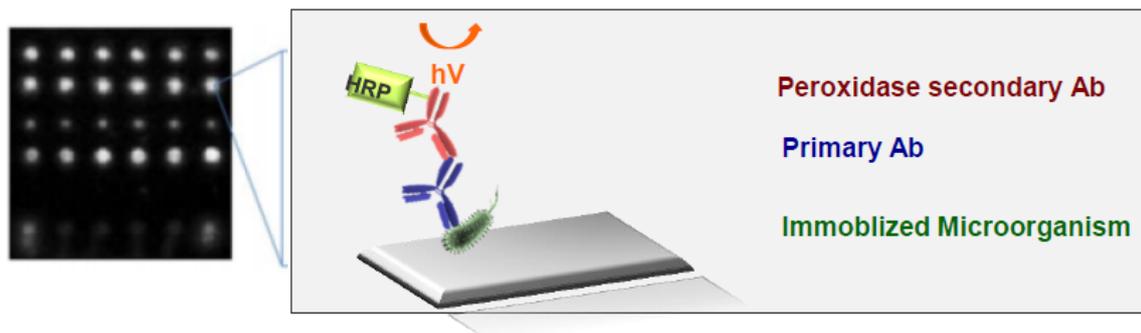


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Antikörper-Screenings auf dem Mikroarray.

Mit diesem Protokoll wurden Hasenserum des Projektpartners der Justus-Liebig-Universität-Gießen, die polyklonale Antikörper gegen *Cronobacter sakazakii* SG O7 und *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* enthielten, getestet. Es wurde Folgendes auf dem Epoxy-aktivierten PEG-beschichteten Glasträger immobilisiert: (1) Lebende Mikroorganismen, (2) deren hitzeinaktivierter Überstand, (3) deren Präzipitat und (4) eine Mischung aus Präzipitat und Überstand. Es wurden jeweils die Seren zweier immunisierter Hasen nach einer Immunisierungszeit von 0, 4, 8, 12 und 17 Wochen getestet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Seren von verschiedenen Hasen 0, 4, 8, 12, 17 Wochen nach der Immunisierung mit *Cronobacter sakazakii* SG O7 und *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*.

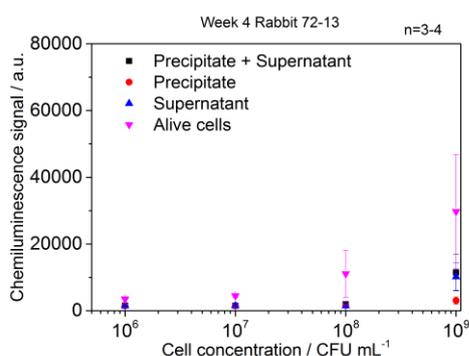
Serum	Hase	Wochen
Anti- <i>Cronobacter</i>	K-74-13	0, 4, 8, 12, 17
Anti- <i>Cronobacter</i>	K-75-13	0, 4, 8, 12, 17
Anti- <i>Klebsiella</i>	K-72-13	0, 4, 8, 12, 17
Anti- <i>Klebsiella</i>	K-73-13	0, 4, 8, 12, 17

Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (Hase 72-13)

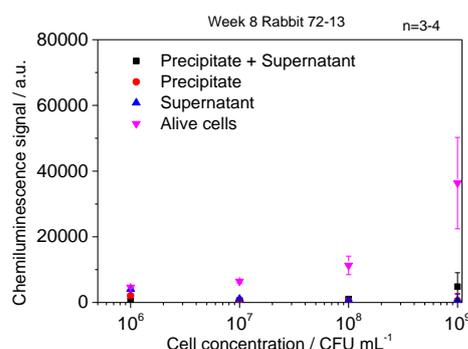
Mit einem Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass die Antikörper jeweils nach 4 und 8 Wochen für lebende *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*-Bakterien höhere Signale zeigten (Abbildung 2 a und b). Ab 8 Wochen nach der Immunisierung wurden die Signale der inaktivierten Bakterien höher. Die Seren 12 und 17 Wochen nach der Immunisierung zeigten jeweils die höchsten Chemilumineszenz-Signale (Abbildung 2 c und d). Es zeigte sich auch, dass der Überstand im Vergleich zum

Präzipitat stets höhere Chemilumineszenz-Signale ergab. Die Antikörper 17 Wochen nach der Immunisierung der Hasen zeigten die höchsten Chemilumineszenz-Signale. Eine Verdünnung des Serums von 1:500 zeigte ein Sättigungssignal am MCR 3 SLT. Somit sind diese Antikörper sehr gut für die Antikörper-Mikroarrays geeignet.

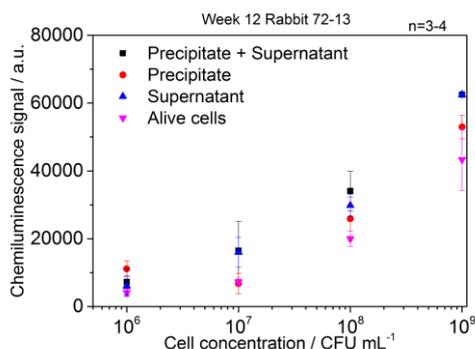
2 a) Woche 4



2 b) Woche 8



2 c) Woche 12



2 d) Woche 17

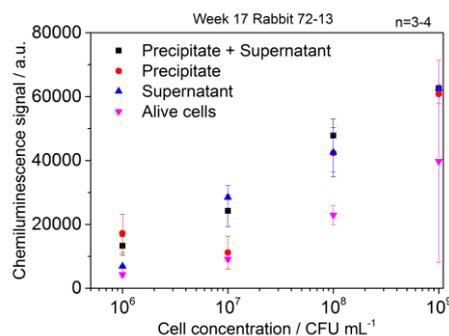


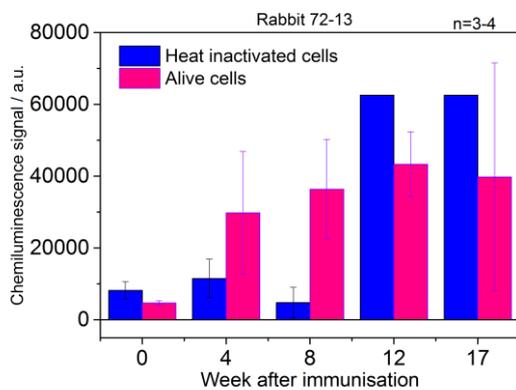
Abbildung 2: Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*. Es wurde das Hasenserum 72-13 in Woche 4 (Abbildung 2 a), Woche 8 (Abbildung 2 b), Woche 12 (Abbildung 2 c) und Woche 17 (Abbildung 2 d) nach der Immunisierung verwendet. Verschiedene Konzentrationen (10<sup>6</sup> -10<sup>9</sup> KBE/mL) lebender *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*-Bakterien sowie der hitzeinaktivierte Zellüberstand und das Präzipitat wurden auf dem Glaträger immobilisiert.

Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* (Hase 72-13, Hase 73-13)

12 und 17 nach Immunisierung konnte bei beiden immunisierten Hasen eine Steigerung der Chemilumineszenz-Signale festgestellt werden. Hierbei zeigten die hitzeinaktivierten Zellen deutlich höhere Chemilumineszenz-Signale als die lebenden Zellen (Abbildung 3). Die Antikörper gegen *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*

des immunisierten Hasen 72-13 sind aufgrund der höheren Chemilumineszenz-Signale besser geeignet als die Antikörper des Hasen 73-13.

### 3 a) Hase 72-13



### 3 b) Hase 73-13

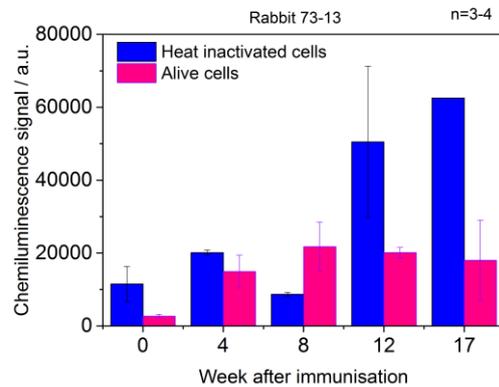
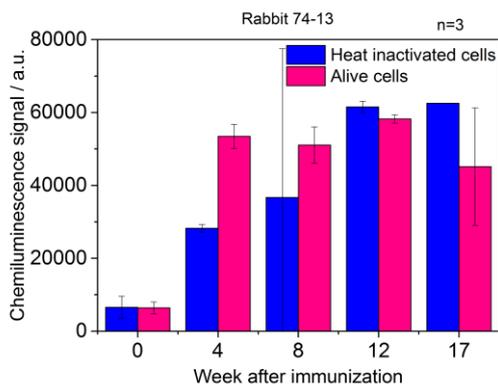


Abbildung 3: Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*. Es wurden Hasenserum der Hasen 72-13 (Abbildung 3a) und 73-13 (Abbildung 3b) in den Wochen 0, 4, 8, 17 nach der Immunisierung untersucht. Lebende und hitzeinaktivierte *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*-Bakterien (Konzentration:  $10^9$  KBE/mL) wurden direkt auf dem Glaträger immobilisiert.

### Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Cronobacter sakazakii* SG O7 (Hase 74-13 und 75-13)

Mit einem Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Cronobacter sakazakii* SG O7 konnte gezeigt werden, dass die Antikörper jeweils nach 4 und 8 Wochen für lebende *Cronobacter sakazakii* SG O7-Bakterien höhere Chemilumineszenz-Signale als zu Beginn der Immunisierung entwickelten (Abbildung 4). In der Woche 12 und 17 nach der Immunisierung wurden die Signale der inaktivierten Bakterien höher. Die Hasenserum 73-13 und 75-13 zeigten 12 und 17 Wochen nach der Immunisierung jeweils die höchsten Chemilumineszenz-Signale. Für beide Hasenserum konnten 17 Wochen nach der Immunisierung vergleichbare Chemilumineszenz-Signale erzielt werden.

#### 4 a) Hase 74-13



#### 4 b) Hase 75-13

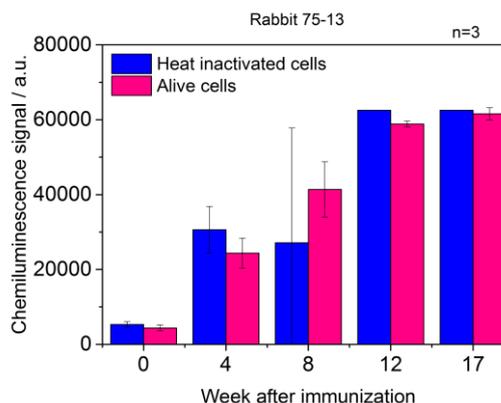


Abbildung 4: Screening der polyklonalen Antikörper gegen *Cronobacter sakazakii* SG O7. Es wurden die Hasenserum 74-13 (4 a) und 75-13 (4 b) in den Wochen 4, 8, 12, 17 nach der Immunisierung verwendet. Lebende und hitzeinaktivierte *Cronobacter sakazakii* SG O7-Bakterien wurden in einer Konzentration von  $10^9$  KBE/mL auf dem Glaträger immobilisiert.

Um die am besten geeigneten Antikörper für die Detektion von *Cronobacter sakazakii* SG O7 zu ermitteln, wurden die Nachweisgrenzen (LOD) und Quantifizierungsgrenzen (LOQ) beider Hasenserum jeweils 17 Wochen nach der Immunisierung verglichen. Wie in Tabelle 2 und 3 zu erkennen ist, zeigte der Hase 75-13 sowohl für lebende als auch hitzeinaktivierte *Cronobacter sakazakii* SG O7-Zellen niedrigere Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen als der Hase 74-13. Dies bedeutet, dass mit den polyklonalen Antikörpern im Hasenserum 75-13 niedrigere Konzentrationen an *Cronobacter sakazakii* SG O7 quantifiziert werden können. Das Hasenserum 75-13 in Woche 17 nach der Immunisierung ist somit am besten geeignet.

Tabelle 2: Werte der Nachweisgrenzen und Quantifizierungsgrenzen für das Hasenserum 74-13 in Woche 17 nach der Immunisierung.

Woche	LOD, lebende Zellen (KBE/mL)	LOD, hitzeinaktivierte Zellen (KBE/mL)	LOQ, lebende Zellen (KBE/mL)	LOQ, hitzeinaktivierte Zellen (KBE/mL)
17	$2,2 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^7$

Tabelle 3: Werte der Nachweisgrenzen und Quantifizierungsgrenzen für das Hasenserum 75-13 in Woche 17 nach der Immunisierung.

Woche	LOD, lebende Zellen (KBE/mL)	LOD, hitzeinaktivierte Zellen (KBE/mL)	LOQ, lebende Zellen (KBE/mL)	LOQ, hitzeinaktivierte Zellen (KBE/mL)
17	$5,6 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$

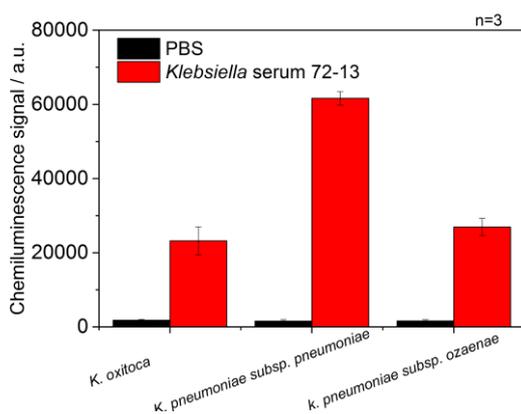
### Testung der Kreuzreaktivität

*Klebsiella*- und *Cronobacter*-Serum wurden auf Kreuzreaktivität getestet, um sicher zu gehen, dass die enthaltenen Antikörper in den jeweiligen Seren nur den entsprechenden Mikroorganismus erkennen. Hierbei wurden verschiedenen Serotypen von *Cronobacter sakazakii* und *Klebsiella pneumoniae* getestet.

Es wurden verschiedene *Klebsiella*-Subspezies auf dem aktivierten Glasträger immobilisiert und sowohl das *Klebsiella*-Serum 72-13 als auch das *Cronobacter*-Serum 75-13 getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass die *Klebsiella*-Antikörper alle drei Subspezies von *Klebsiella pneumoniae* erkannten (Abbildung 5 a). Das *Klebsiella*-Serum 72-13, das spezifisch auf *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* reagiert, zeigte zu *Klebsiella oxitoca* eine Kreuzreaktivität von 40,3 % und zu *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae* eine Kreuzreaktivität von 48,4 % (Tabelle 4). Es konnte zudem eine Kreuzreaktivität der *Cronobacter*-Antikörper von 6,9 % - 14,4 % mit den *Klebsiella*-Zellen festgestellt werden (Abbildung 5 b, Tabelle 4).

5 a)



5 b)

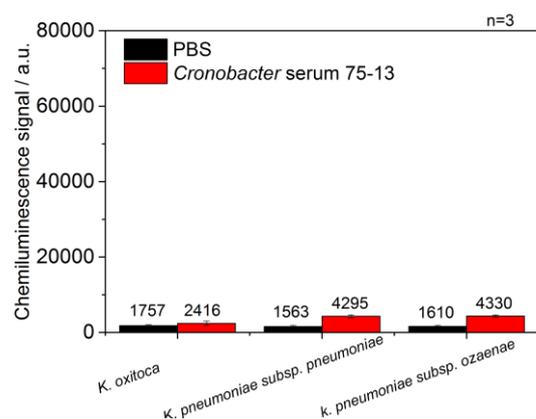


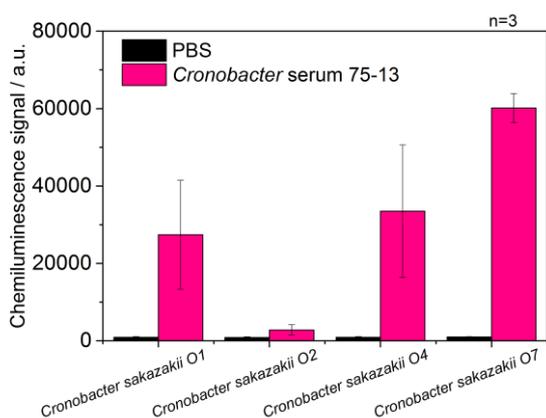
Abbildung 5: Kreuzreaktivität zwischen *Klebsiella*-Antikörpern (5 a) und *Cronobacter*-Antikörpern (5 b) mit verschiedenen Subspezies von *Klebsiella pneumoniae*.

Tabelle 4: Kreuzreaktivitäten des *Cronobacter*-Serums 75-13 und des *Klebsiella*-Serums 72-13 mit *Klebsiella*-Zellen.

<i>Klebsiella</i> -Antigen	<i>Cronobacter</i> -Serum 75-13	<i>Klebsiella</i> -Serum 72-13
<i>K. oxitoca</i>	9,7 %	40,3 %
<i>K. pneumoniae</i> <i>ssp. pneumoniae</i>	6,9 %	-
<i>K. pneumoniae</i> <i>ssp. ozaeane</i>	14,4 %	48,4 %

Verschiedene *Cronobacter*-Zellen wurden auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert und sowohl das *Klebsiella*-Serum 72-13 als auch das *Cronobacter*-Serum 75-13 getestet. Auch die *Cronobacter*-Antikörper im *Cronobacter*-Serum 75-13 erkannten alle vier Subspezies der *Cronobacter*-Bakterien, wobei *Cronobacter sakazakii* SG O2 ein niedrigeres Chemilumineszenz-Signal zeigte als die anderen Serogruppen (Abbildung 6 a). Das *Cronobacter*-Serum 75-13, das spezifisch auf *Cronobacter sakazakii* SG O7 reagiert, zeigte zu den Serogruppen O1, O2 und O4 jeweils eine Kreuzreaktivität von 46,7 %, 8,3 % und 50 %. Eine Kreuzreaktivität der *Klebsiella*-Antikörper im *Klebsiella*-Serum 72-13 mit den *Cronobacter*-Zellen wurde nachgewiesen (Abbildung 6 b). Die exakten Werte sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

6 a)



6 b)

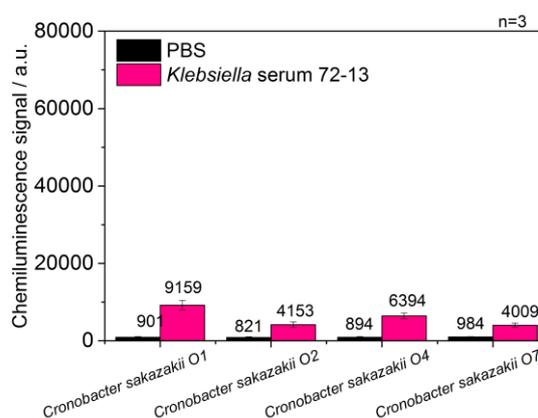


Abbildung 6: Kreuzreaktivität zwischen *Klebsiella*- und *Cronobacter*-Antikörpern mit verschiedenen Subspezies von *Cronobacter sakazakii*.

Tabelle 5: Messungen zur Testung der Kreuzreaktivitäten des *Cronobacter*-Serums 75-13 und des *Klebsiella*-Serums 72-13 mit *Cronobacter*-Zellen.

<i>Cronobacter sakazakii</i> -Antigen	<i>Cronobacter</i> -Serum 75-13	<i>Klebsiella</i> -Serum 72-13
SG O1	46,7 %	32,7 %
SG O2	8,3 %	83,1 %
SG O4	50 %	21,3 %
SG O7	-	6,6 %

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass auf dem MCR 3 SLT ein schnelles Antikörper-Screening möglich ist und somit geeignete Antikörper für Durchfluss-Mikroarray-Anwendungen gefunden werden konnten.

## II.1.2. Arbeitspaket 2. Verfahren der Probenvorbereitung

In dem Arbeitspaket 2 wurde sowohl an der Immunomagnetischen Separation (IMS) als auch der monolithischen Immunoextraktion (MIE) geforscht. Ziel war es, direkt aus Lebensmitteln wie beispielsweise Milch, lebende Bakterien anzureichern und sie dem MCR 3 SLT zur Analyse weiterzuleiten.

### Arbeitspaket 2.1. Probenaufschluss

In Zusammenarbeit mit der R-Biopharm AG sollten Probenaufschlussverfahren etabliert werden, um Lebensmittelproben (z.B. Milch) aufzuschließen. Im Rahmen des LEVERA Projektes hat sich gezeigt, dass Verfahren wie beispielsweise Ultraturax, Kugelmöhlen oder Lyse nicht notwendig sind, um Antigene effizient aufzuschließen. Die immunchemischen Verfahren (monolithische Immunoextraktion und Immunomagnetische Separation), die im Arbeitspaket 2.2. näher erläutert werden, waren sehr gut zur schnellen und effizienten Probenvorbereitung geeignet. Zudem konnte die Probenvorbereitung direkt mit der Analyse am MCR 3 SLT gekoppelt werden. Die Lebensmittelproben (z.B. Säuglingsnahrung, Milch) konnten auch direkt am MCR 3 SLT vermessen werden. Somit war der Probenaufschluss nicht zwingend erforderlich. Der Fokus der Forschung wurde auf die Immunomagnetische Separation und monolithische Immunoextraktion gelegt.

## Arbeitspaket 2.2. Immunchemische Verfahren

### 2.2.1. Monolithische Immunoextraktion (MIE)

Die monolithische Immunoextraktion zur schnellen Aufkonzentrierung von Mikroorganismen (Analyt) und gleichzeitigen Abtrennung von Matrixbestandteilen wurde an der monolithischen Affinitätssäule (Abbildung 7) mit immobilisierten Analyt-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Der Analyt wurde durch den immobilisierten Antikörper auf der Säule abgefangen und von der Matrix abgetrennt. Mit Hilfe eines geeigneten Elutionspuffers konnte der Analyt von der Säule in ein geringes Volumen eluiert werden. Es erfolgte somit eine Aufkonzentrierung des Analyten.

7a)

7b)

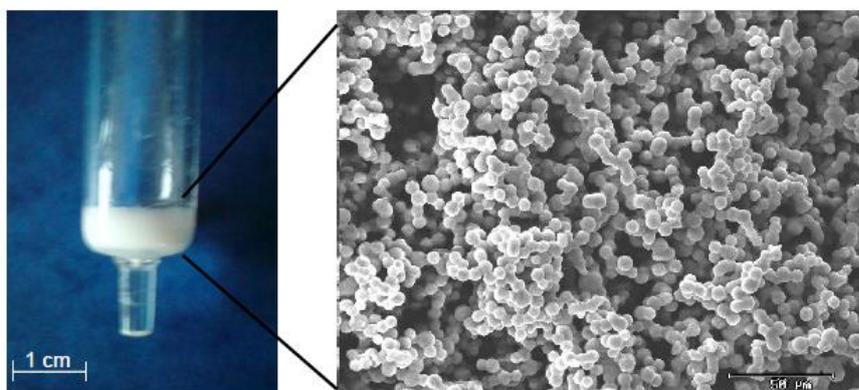
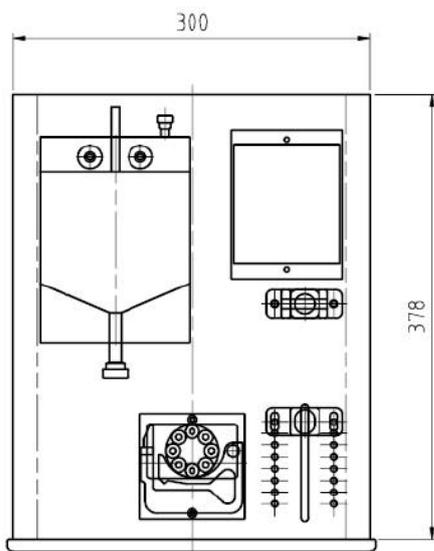


Abbildung 7: Monolithische Säule (7 a), REM-Aufnahme einer monolithischen Säule mit 500-facher Vergrößerung (7 b).

Für die Aufkonzentrierung mittels monolithischer Säulen wurde eine Apparatur zur Aufkonzentrierung geplant und von der institutseigenen Werkstatt aufgebaut (Abbildung 8). Somit konnte eine einfache und schnelle automatische Filtration erzielt werden.

8 a)



8 b)



Abbildung 8: Konstruktionszeichnung der Aufkonzentrierungsapparatur (Abbildung 8 a); beschriftete Aufnahme der Aufkonzentrierungsapparatur (Abbildung 8 b): 1. Sterilbeutel mit Probe, 2. Peristaltikpumpe, 3. Steuerungselement, 4. monolithische Affinitätssäule mit PTFE-Fitting, 5. Spritze zur Vorwärtselution, 6. Auslass zum Auffangen des Eluats (vorwärts), 7. Sterilbeutel mit Durchlauf.

#### Monolithische Immunoextraktion von *Bacillus cereus*-Sporen

Die Aufkonzentrierung der *Bacillus cereus*-Sporen in 100 ml PBS und Milch erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C im lebenden Zustand. Es wurden verschiedenen Konzentration der *B. cereus*-Sporen in Milch oder PBS ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  *Bacillus cereus*-Sporen/mL) eingesetzt und mittels monolithischer Immunoextraktion (MIE) aufkonzentriert. Die monolithischen Säulen wurden mit den spezifischen Antikörpern gegen *Bacillus cereus* funktionalisiert. Die verschiedenen Proben (eingesetzte Probe, Durchläufe und Eluate) wurden aufgefangen und quantifiziert. Die Quantifizierung der Durchläufe und Eluate erfolgte mittels Kulturverfahren.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Aufkonzentrierung sowohl in Milch als auch Phosphat-Puffer (PBS) in größeren Volumina von 100 ml möglich ist (Abbildung 9). Es konnten für verschiedene Konzentrationen an *Bacillus cereus*-Sporen gezeigt werden, dass *Bacillus cereus*-Sporen im Eluat wiedergefunden werden konnten. Lediglich ein geringer Anteil der *Bacillus cereus*-Sporen wurde im Durchfluss detektiert (Wiederfindungsrate: 20 %). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Anreicherung von *Bacillus cereus*-Sporen in 100 ml Milch und PBS möglich ist.

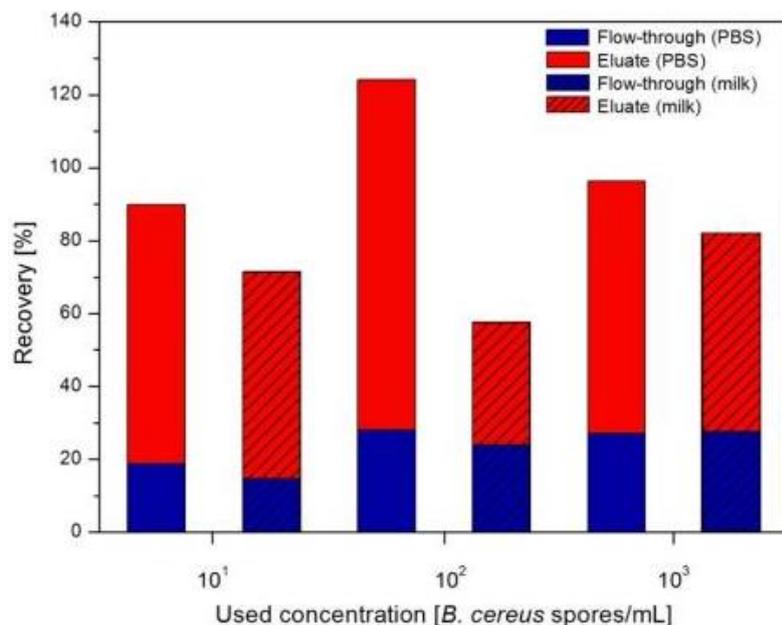


Abbildung 9: Quantifizierung mittels Kultivierung: Wiederfindungen in Durchlauf und Eluat ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  *Bacillus cereus*-Sporen /mL), Flussrate: 7 mL/min.

#### Entwicklung eines MCR 3 SLT Assays für die Detektion von *Bacillus cereus*-Sporen

Für die sensitive Detektion und Quantifizierung der *Bacillus cereus*-Sporen wurde ein Programm am MCR 3 SLT geschrieben und optimiert. Es wurden verschiedene Konzentrationen an *Bacillus cereus*-Sporen ( $10^2$ - $10^7$  *Bacillus cereus*-Sporen/ml) vermessen und Messprogramme mit einer Flussgeschwindigkeit der Probe von 1,0  $\mu$ L/s und 2,0  $\mu$ L/s getestet (Abbildung 10). Für die Kalibrierkurve mit *Bacillus cereus*-Sporen wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,0  $\mu$ L/s eine Nachweisgrenze von  $2 \times 10^5$  *Bacillus cereus*-Sporen/mL erreicht. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,0  $\mu$ L/s wurde eine Nachweisgrenze von  $1 \times 10^3$  *Bacillus cereus*-Sporen/mL erreicht. Die sensitive Detektion von *Bacillus cereus* am MCR 3 SLT konnte somit erfolgreich gezeigt werden.

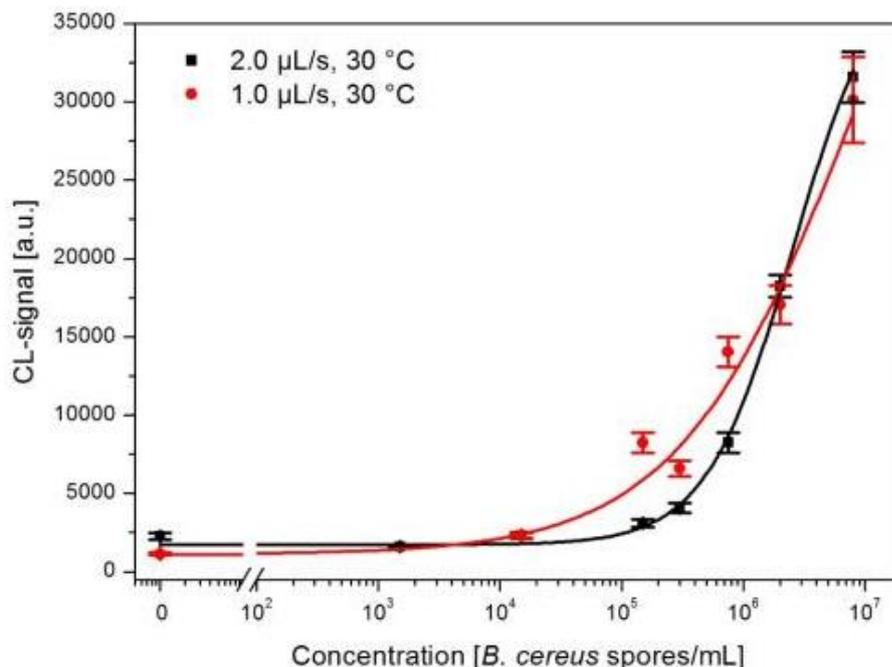


Abbildung 10: Detektion von *Bacillus cereus*-Sporen mittels Antikörper-Mikroarrays bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,0 µL/s und 2,0 µL/s und einer Temperatur von 30 °C.

### Kombination der monolithischen Immunoextraktion und dem Mikroarray-Assay am MCR 3 SLT

Um die Aufkonzentrierung von Mikroorganismen mit einer sensitiven Detektionsmethode direkt zu verknüpfen, wurde eine abschließende Kombination aus monolithischer Immunextraktion und Antikörper-Mikroarrays durchgeführt. Dazu wurden lebende *B. cereus*-Sporen in 100 ml Magermilchproben mit verschiedenen Sporenkonzentrationen ( $10^4$  oder  $10^5$  *Bacillus cereus*-Sporen/mL) über die monolithische Immunoextraktion aufkonzentriert. Erstmals wurde die neue Aufkonzentrierungsapparatur für die monolithische Immunoextraktion verwendet. Die Proben und Eluate wurden nach der Inaktivierung durch Autoklavieren am MCR 3 SLT mit dem optimierten MCR 3 SLT-Programm gemessen.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, zeigten die Messungen am MCR 3 SLT nach der Aufkonzentrierung Signalerhöhungen für die Konzentration von  $10^4$  und  $10^5$  *Bacillus cereus*-Sporen/mL. Dies entsprach in beiden Fällen einer Signalerhöhung um den Faktor 4 bzw. 6. Es konnte somit erfolgreich gezeigt werden, dass diese Pathogene in 100 ml Milch mittels Immunoextraktion mit guter Effizienz angereichert und eluiert werden konnten. Die Aufkonzentrierung für *Bacillus cereus*-Sporen in 100 mL Milch war somit erfolgreich.

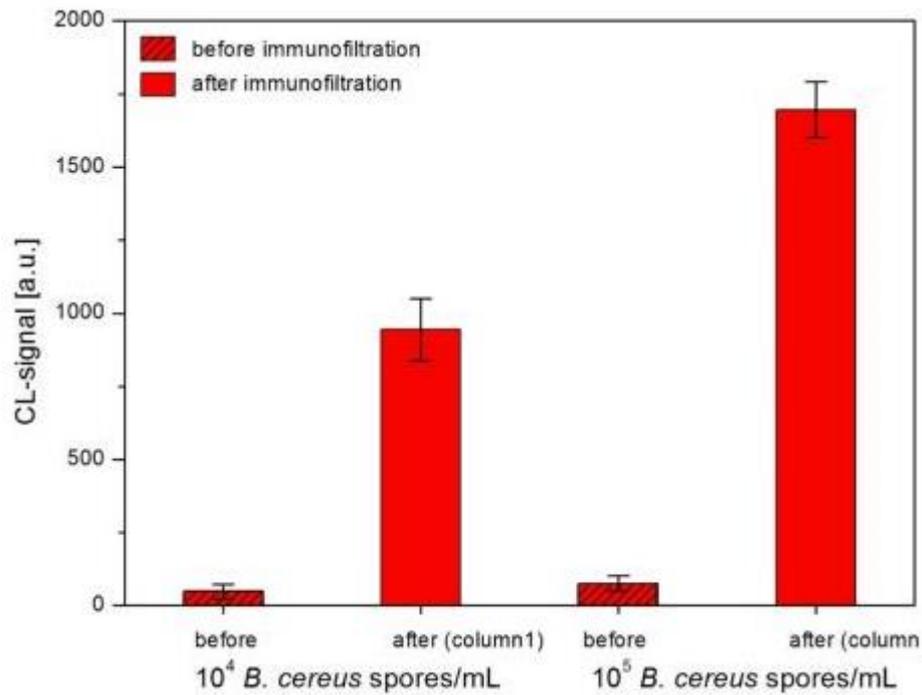
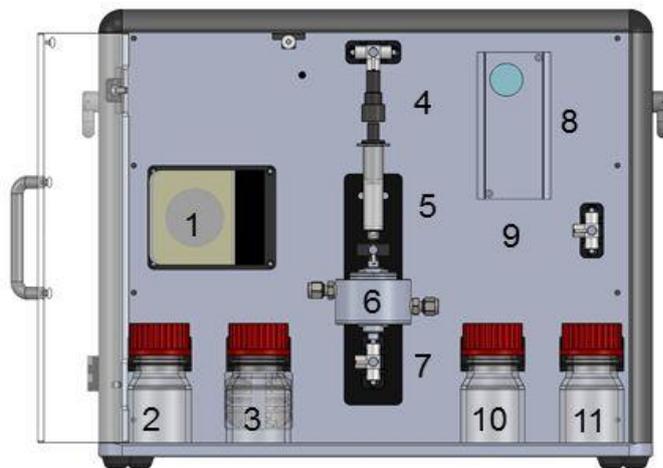


Abbildung 11: Aufkonzentrierung von Milchproben zur Detektion von *Bacillus cereus*-Sporen und Nachweis mit Antikörper-Mikroarrays. Die Abbildung zeigt die Chemilumineszenz-Signale vor und nach der Aufkonzentrierung von *Bacillus cereus*-Sporen in 100 mL Magermilch.

## Aufbau der automatischen monolithischen Immunoextraktionsanlage (Auto-MIE)

Aufbauend auf den Erkenntnissen der Versuche mit *Bacillus cereus*-Sporen wurde eine automatische monolithische Immunoextraktionsanlage (Auto-MIE) konstruiert und von der hauseigenen Werkstatt aufgebaut.

12 a)



12 b)



Abbildung 12: Schematische Darstellung der automatischen monolithischen Immunoextraktionsanlage (Auto-MIE) (12 a), Aufnahme der Auto-MIE (12 b).

Folgende Komponenten beinhaltet die Auto-MIE:

- 1.) Schlauchpumpe für kontinuierliche Auftragung der Milchprobe
- 2.) Probenbehälter
- 3.) Waschpuffer
- 4.) T-Ventil
- 5.) Spritze mit Monolith (oben und unten Verbindung und Abdichtung zum T-Ventil)
- 6.) Miniautoklav zur Hitzeinaktivierung des Eluats
- 7.) T-Ventil
- 8.) Spritzenpumpe zur Auftragung des Elutionspuffers
- 9.) T-Ventil
- 10.) Elutionspuffer
- 11.) Spülpuffer



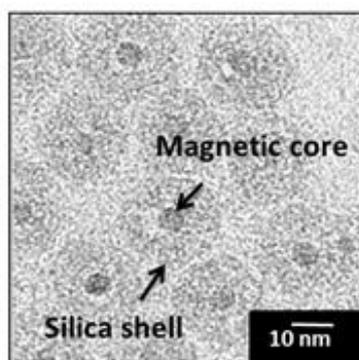
## 2.2.2. Immunomagnetische Separation

In diesem Teilarbeitspaket wurde an der immunomagnetischen Separation mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln gearbeitet. Nach Funktionalisierung dieser Nanopartikel mit den geeigneten Antikörpern gegen Pathogene und Mikroorganismen besteht somit die Möglichkeit, diese schnell und effizient über einen Magneten aufzukonzentrieren und gleichzeitig die Lebensmittelmatrix abzutrennen. Der erste Schritt ist hierbei die Synthese von geeigneten Nanopartikeln. Es wurde hierbei mit zwei verschiedenen Nanopartikelsystemen gearbeitet. Zum einen wurden Oleat-Nanopartikel verwendet, die mit einem starken Magneten und einer Stahlsäule separiert werden konnten. Zum anderen wurden Nanopartikel-Cluster synthetisiert, die aufgrund der höheren Magnetisierung lediglich einen Permanentmagneten zur schnellen Separation benötigten.

### Immunomagnetische Separation von *Cronobacter turicensis* mit magnetischen Oleat-Nanopartikeln

Es wurden verschiedene magnetische Nanopartikel (Oleat-Nanopartikel und Nanopartikel-Cluster) synthetisiert und deren Synthese optimiert. Dynamic Light Scattering (DLS)-Messungen und Transmissionselektronenmikroskop (TEM)-Messungen zur Größenbestimmung zeigten eine monodisperse Verteilung der Oleat-Nanopartikel (Abbildung 13 a). Über Messungen an einem SQUID-Magnetometer wurde die magnetische Sättigung der Nanopartikel bestimmt. (Abbildung 13 b) Die Oleat-Nanopartikel zeigten eine magnetische Sättigung von 23 emu/g. Die Nanopartikel-Cluster zeigten dagegen eine höhere magnetische Sättigung von 30 emu/g.

14 a)



14 b)

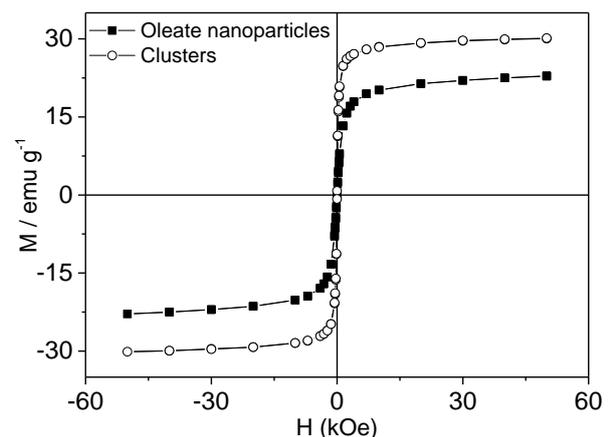


Abbildung 14: TEM-Aufnahme der Oleat-Nanopartikel (14 a); magnetische Sättigungskurven der Oleat-Nanopartikel und Nanopartikel-Cluster (14 b).

Die Oleat-Nanopartikel wurden vollständig charakterisiert, mittels entsprechender Oberflächenchemie mit freien Thiolgruppen funktionalisiert und an Antikörper gegen *Cronobacter turicensis* gekoppelt. Die Nanopartikel konnten somit erfolgreich für die

Separation und Anreicherung von *Cronobacter turicensis* mit Hilfe einer Stahlsäule und zwei starken Permanentmagneten eingesetzt werden (Abbildung 15 a). Hierzu wurde eine Apparatur zur immunomagnetischen Separation entworfen und von der hauseigenen Werkstatt aufgebaut (Abbildung 15 b). Die Detektion erfolgte mit einem Sandwich-ELISA (Abbildung 16).

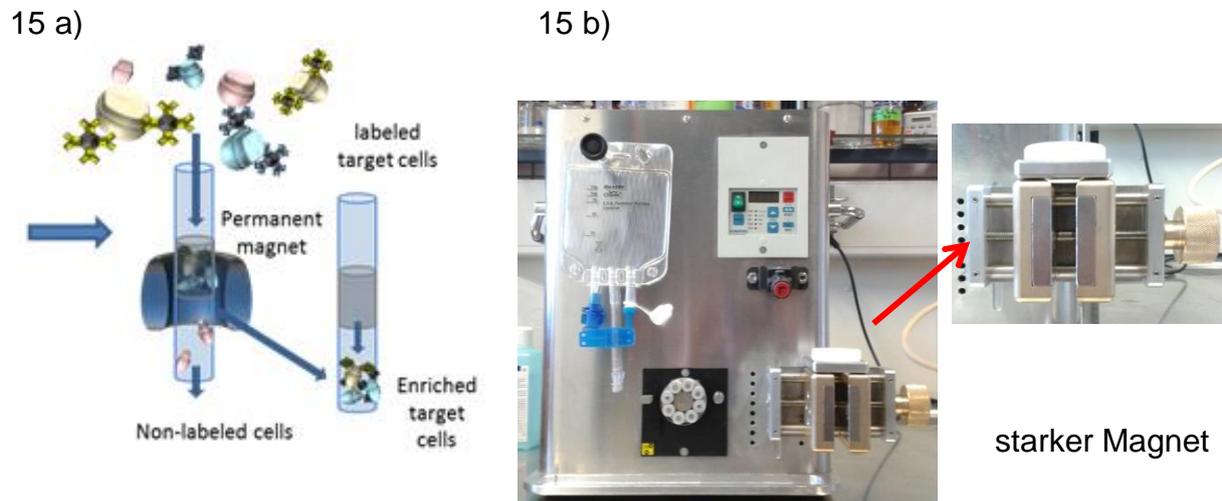


Abbildung 15: Schematische Darstellung der immunomagnetischen Separation (15 a), Abbildung der Apparatur zur immunomagnetischen Separation (15 b).

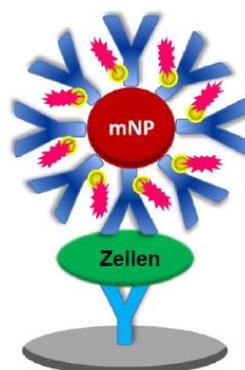


Abbildung 16: Prinzip des zur Quantifizierung verwendeten Sandwich-ELISAs.

Nach Funktionalisierung der Oleat-Nanopartikel mit Antikörper gegen *Cronobacter turicensis* wurde den Proben eine definierte Konzentration von *Cronobacter turicensis*-Bakterien zugesetzt. Anschließend wurde eine immunomagnetische Separation der *Cronobacter turicensis*-Bakterien mit den Oleat-Nanopartikeln durchgeführt. Der Nachweis der Bakterien erfolgte durch einen Sandwich-ELISA.

Es konnte mittels immunomagnetischer Separation eine erfolgreiche Aufkonzentrierung von *Cronobacter turicensis*-Bakterien ( $10^6$  und  $10^7$  Zellen/mL), erreicht werden. (Abbildung 17 und 18). Die Separationszeit betrug hierbei 10 min. Dabei konnten die Signalintensitäten des Sandwich-ELISAs durch die Anwendung der immunomagnetischen Separation um den Faktor 12 für eine Konzentration von

$10^6$  KBE/mL *Cronobacter turicensis*-Bakterienzellen beziehungsweise um den Faktor 1,7 für eine Konzentration von  $10^7$  KBE/mL *Cronobacter turicensis*-Bakterienzellen erhöht werden. Die Nachweisgrenze lag bei  $6,6 \times 10^5$  KBE/mL.

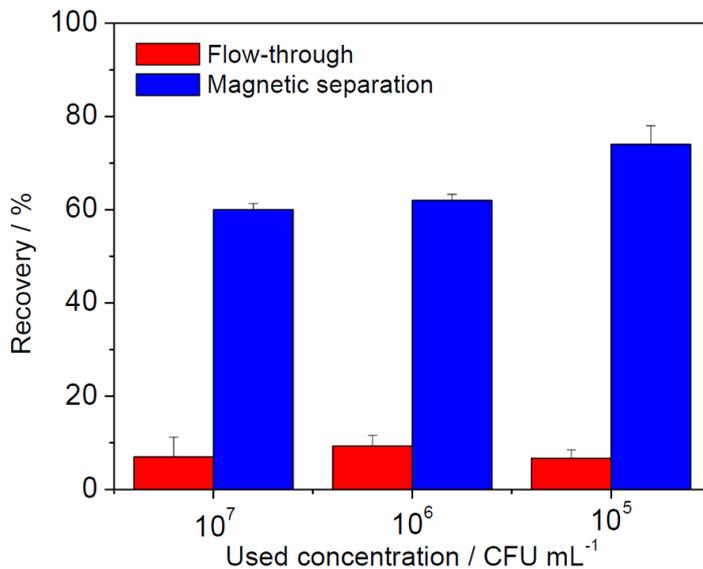


Abbildung 17: Detektion von *Cronobacter turicensis*-Zellen (Konzentration:  $10^5$ ,  $10^6$ ;  $10^7$  KBE/mL *Cronobacter turicensis*) vor und nach der Aufkonzentrierung mittels immunomagnetischer Separation.

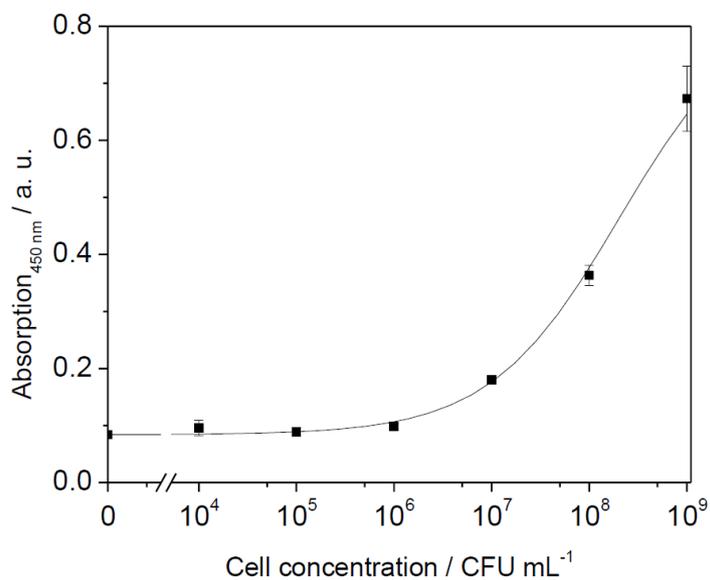


Abbildung 18: Kalibrierkurve für *Cronobacter turicensis* nach immunomagnetischer Separation

## Immunomagnetische Separation von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) mit magnetischen Nanopartikel-Clustern

Um eine einfache und effiziente immunomagnetische Separation von Mikroorganismen und Toxinen zu gewährleisten, wurden magnetische Nanopartikel-Cluster entwickelt. Diese Nanopartikel-Cluster ermöglichten eine einfache, effiziente und schnelle immunomagnetische Separation unter Verwendung eines Permanentmagneten. Somit ist die Verwendung von teuren und apparaturaufwändigen Stahlsäulen obsolet. Die magnetischen Nanopartikel-Cluster wurden mit einem biotinylierten Detektionsantikörper gegen SEB funktionalisiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten in Lebensmittelmatrix (z.B. Milch) wurden die Nanopartikel-Cluster und das über den biotinylierten Antikörper gebundene SEB mit einem Permanentmagneten angezogen. Die überschüssige Milchmatrix konnte somit schnell und effizient entfernt werden (Abbildung 19). Im anschließenden Schritt wurden die Nanopartikel in einem kleinen Volumen resuspendiert und im Sandwich-ELISA detektiert.

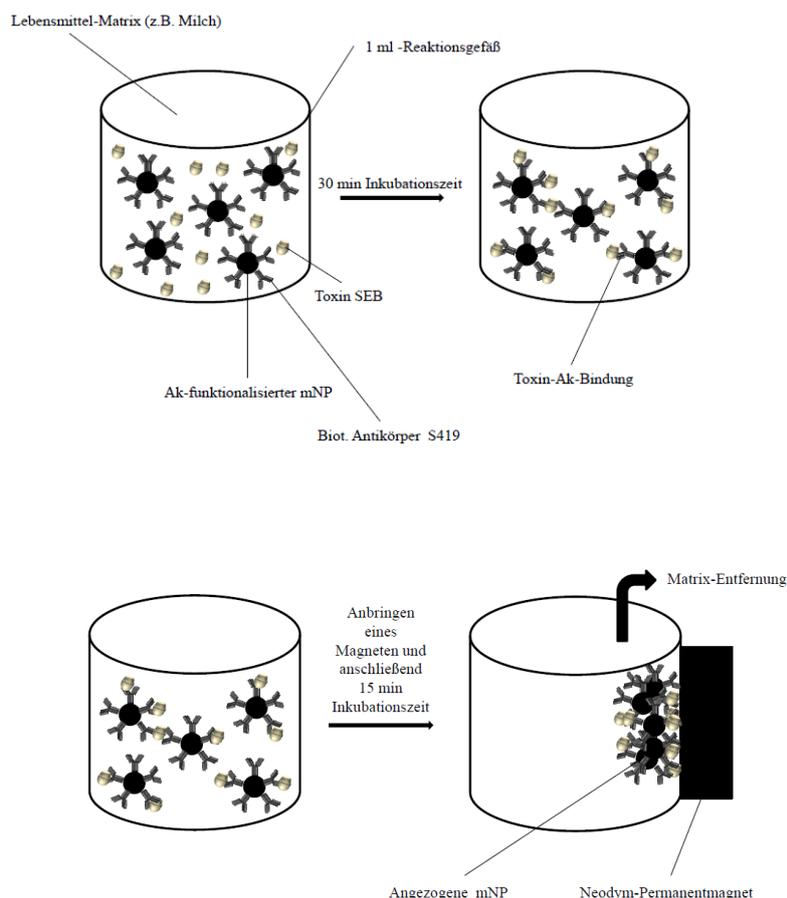
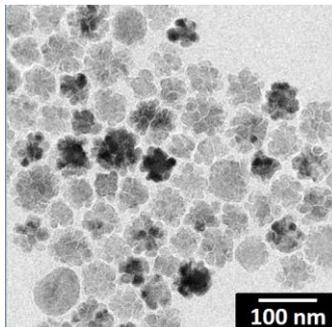


Abbildung 19: Schematische Darstellung der immunomagnetischen Separation mit einem Permanentmagneten

Neue Nanopartikel-Cluster wurden mit Hilfe von mesoporösen Silicapartikeln hergestellt und die Synthese optimiert. TEM Aufnahmen zeigten eine blumenförmige Morphologie der Nanopartikel-Cluster und eine Größenverteilung von 50 bis 100 nm

(Abbildung 20 a). Diese Nanopartikel-Cluster mit einer magnetischen Sättigung von 30 emu/g wurden mit Epoxygruppen funktionalisiert, um direkt spezifische Antikörper gegen SEB zu koppeln.

20 a)



20 b)

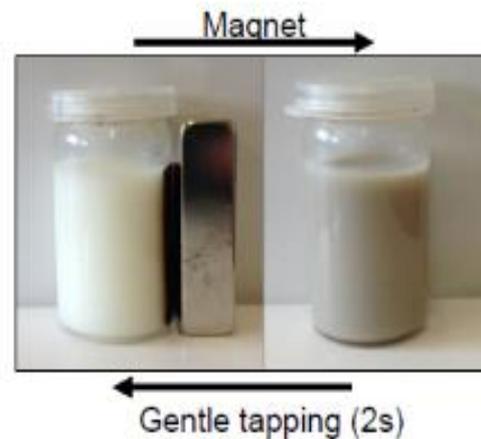


Abbildung 20: TEM-Aufnahme der Nanopartikel-Cluster (20 a), magnetische Separation der Nanopartikel-Cluster in 15 ml Milch mit einem Permanentmagneten (20 b).

Es wurde die Anreicherung und Separation von Toxinen in Lebensmittelmatrix (Milch) mit einer Kombination von immunomagnetischer Separation (IMS) und Sandwich-ELISA getestet. Hierzu wurden anti-SEB Antikörper an magnetische Nanopartikel-Cluster gekoppelt. Milchproben wurden verschiedene Konzentrationen von SEB zugesetzt und eine immunomagnetische Separation durchgeführt. Die Konzentration an SEB wurde mittels eines Sandwich-Immunoassays quantifiziert (Abbildung 21). Die Nachweisgrenze konnte nach erfolgter immunomagnetischer Separation von 0,04  $\mu\text{g/L}$  auf 0,02  $\mu\text{g/L}$  gesenkt werden. Die immunomagnetische Separation konnte somit für die Detektion von SEB in Lebensmitteln erfolgreich mit einem Sandwich-ELISA kombiniert werden.

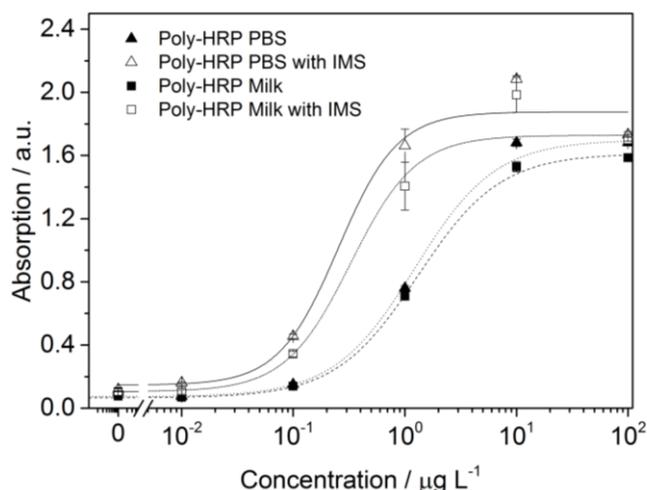
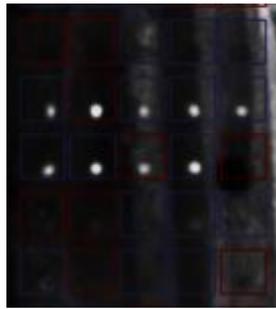


Abbildung 21: Kalibrierkurve zum Nachweis von SEB mit einem Sandwich-ELISA mit Hilfe von Antikörper-funktionalisierten magnetischen Nanopartikel-Clustern in PBS und Milch.

Zusätzlich wurde an einem Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (SMIA) mit magnetischen Nanopartikel-Clustern zum Nachweis von SEB am MCR 3 SLT gearbeitet. Hierzu wurden verschiedene anti-SEB Fängerantikörper auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert. Die Antikörper-funktionalisierten magnetischen Nanopartikel-Cluster wurden mit SEB inkubiert, magnetisch separiert und am MCR 3 SLT vermessen. Es wurden verschiedene biotinylierte Detektionsantikörper der Projektpartner getestet. Dabei wurden verschiedenen Parameter des MCR 3 SLT-Programms optimiert (z.B. Waschzyklus, Inkubationszeit, Temperatur, Enzymkonzentration). Es konnte gezeigt werden, dass die höchsten Chemilumineszenz-Signale am MCR 3 SLT mit dem biotinylierten Detektionsantikörper mAB 1D6 (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU, München) und dem polyklonalen Fängerantikörper von R-Biopharm AG erreicht wurden (Abbildung 22, 23). Prinzipiell ist der Einsatz von Antikörper-funktionalisierten magnetischen Nanopartikel-Cluster für einen Mikroarray-Assay auf dem MCR 3 SLT möglich. Es konnte innerhalb dieses Projektes zum ersten Mal gezeigt werden, dass magnetische Nanopartikel-Cluster in der flussbasierten Mikroarray- Plattform MCR 3 SLT erfolgreich eingesetzt werden können.



- 1 neg
- 2 pAb anti-SEB (R-Biopharm)
- 3 pAb anti-SEB (R-Biopharm)
- 4 Polyclonal Antiserum (LMU)
- 5 mAb 1D6 (LMU)

Abbildung 22: Spottingschema und Chemilumineszenz-Signale für MCR 3 SLT-Messungen mit diversen anti-SEB Antikörpern der Projektpartner.

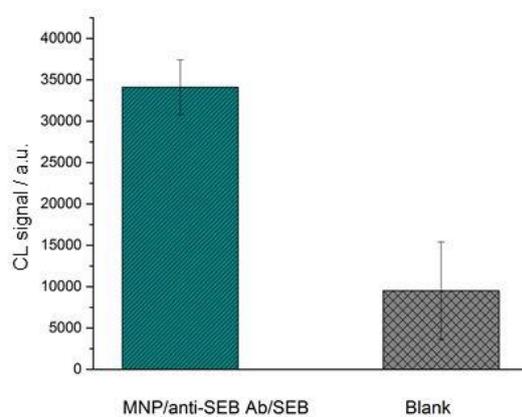


Abbildung 23: MCR 3 SLT-Messung mit biotinylierten mAB 1D6 anti-SEB Detektionsantikörper-funktionalisierten magnetischen Nanopartikel-Clustern. Als Fängerantikörper wurde der polyklonale anti-SEB -Antikörper von R-Biopharm AG auf dem Glasträger immobilisiert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl die immunomagnetische Separation als auch die monolithische Immunoextraktion funktionieren.

### Arbeitspaket 2.3. Physikalisch und chemische Verfahren

In diesem Arbeitspaket sollten mit physikalisch-chemischen Verfahren Zelltrümmer und andere Partikel abgetrennt werden, die den SMIA stören könnten. Es sollten optimierte Protokolle zusammen mit R-Biopharm AG entwickelt werden, welche in der Routine leicht anwendbar sind und eine möglichst hohe Wiederfindung erzielen.

Am IWC-TUM wurde an einer automatischen magnetischen Separationsmethode gearbeitet, um große Volumina von Lebensmitteln (Milch) von dem Analyten zu separieren. Es wurde hierzu eine Apparatur bestehend aus Vorratsbehälter, Pumpe, Permanentmagnet und Probenschleife aus Teflon-Schläuchen konstruiert. Eine Verknüpfung an ein Dreiwegeventil ermöglichte nach der magnetischen Separation und Entfernung des Permanentmagneten eine schnelle Elution in kleine Volumina von 1 mL Puffer (Abbildung 24). Es wurde neben der manuellen Separation sowohl eine Peristaltikpumpe als auch eine Spritzenpumpe mit verschiedenen Flussgeschwindigkeiten getestet.

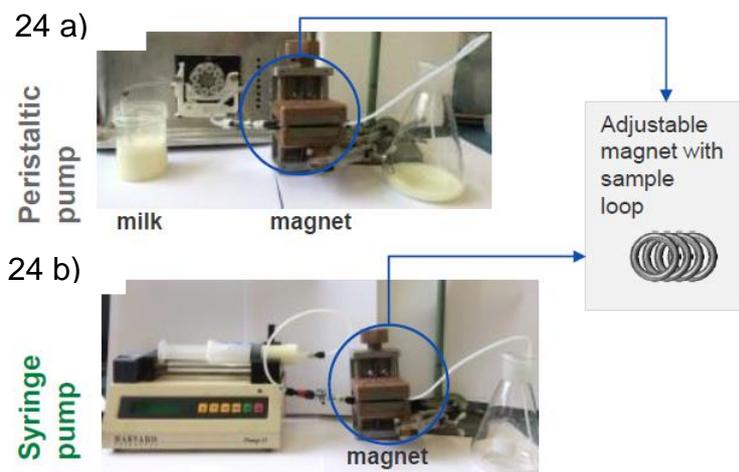


Abbildung 24: Konstruktion der automatischen magnetischen Separation von Nanopartikel-Clustern mit einer Schlauchpumpe (24a) und einer Spritzenpumpe (25 b).

Um die Wiederfindung der Nanopartikel-Cluster nach der Separation zu berechnen, wurde der Eisengehalt der Nanopartikel-Cluster vor und nach magnetischer Separation mit ICP-MS-Messungen bestimmt (Abbildung 25). Mit der manuellen Separationsmethode konnte eine sehr gute Wiederfindung der Nanopartikel-Cluster von 86 % erzielt werden. Durch Verwendung der Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 0,85 mL/ min konnte eine Wiederfindung von 67 % der Nanopartikel-Cluster erzielt werden. Dies zeigte das beste Ergebnis für die automatische magnetische Separation. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine automatische magnetische Separation von Nanopartikel-Clustern in großen Volumina an Lebensmitteln (100 mL Milch) prinzipiell möglich ist. Diese Separationsmethode könnte somit zur schnellen immunomagnetischen Separation eingesetzt werden.

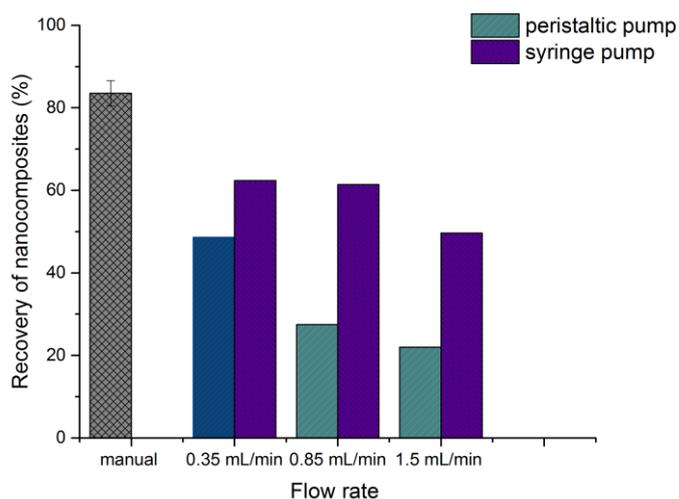


Abbildung 25: Wiederfindungen von 5 mg magnetischen Nanopartikel-Clustern in 100 mL Milch. Es wurde die manuelle sowie die automatische Separation mit einer Spritzen- und Peristaltikpumpe bei verschiedenen Flussraten getestet. Die Messung der Wiederfindung erfolgte mittels ICP-MS.

#### Arbeitspaket 2.4. Einwegartikel zur Probenvorbereitung

Ursprünglich wurden für die monolithische Immunoextraktion (MIE) wiederverwertbare Glassäulen verwendet. Die Glassäulen sind jedoch mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Um kostengünstige Einwegartikel zur Probenvorbereitung zu entwickeln, wurde ein Konzept mit Einweg-Kunststoffspritzen erarbeitet, in die einzelne MIE-Disks eingelegt werden können (Abbildung 26). Das Konzept wurde erfolgreich auf Funktionalität getestet und kann so zukünftig für die auto-MIE eingesetzt werden.



Abbildung 26: Monolithische Säule als Einwegartikel

### **II.1.3. Arbeitspaket 3. Immunchemische Nachweisverfahren**

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, funktionierende Antikörper-Mikroarray-Chips für die Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen und Toxinen herzustellen und auf dem MCR 3 SLT Sandwich-Mikroarray-Immunoassays (SMIA) für diese Analyte zu etablieren. Im Gegensatz zu den klassischen immunologischen Systemen wie dem Sandwich-ELISA, bietet der MCR 3 SLT als ein automatisiertes mikrofluidisches System, die Möglichkeit zu einer schnellen, sensitiven und parallelen Identifizierung und Quantifizierung von verschiedenen Analyten aus einer einzigen Probe.

#### **Arbeitspaket 3.1. Mikroarray-Chip Funktionsmuster**

##### **3.1.1. Antikörper-Mikroarray-Chips**

Der Ink-Jet Mikrodosierroboter von Scienion wurde gekauft und aufgebaut. Die Funktionsmuster der Antikörper-Mikroarray-Chips wurden erfolgreich hergestellt.

##### **3.1.2. Entwicklung eines regenerierbaren SMIA**

Es sollte in diesem Arbeitspaket ein regenerierbarer SMIA am MCR 3 SLT mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln entwickelt werden. Die Regenerierbarkeit hat den Vorteil, dass jeder Antikörper-Mikroarray kalibriert werden kann. Es könnten somit robustere Daten, einfachere Handhabbarkeit bei der Automatisierung der Analyse und eine Kostenreduktion erreicht werden. Da Sandwich-Immunoassays beim Ablösen des Antigens und des Detektionsantikörpers ihre Aktivität verlieren, sind diese für gewöhnlich nicht regenerierbar. Die schematische Darstellung des Assayprinzipes ist in Abbildung 27 gezeigt. Eine Regenerierbarkeit sollte erreicht werden, indem das komplette Sandwich-Konstrukt vom Mikroarray-Chip abgelöst wird. In diesem Vorhaben wurden magnetische Nanopartikel eingesetzt. Um eine Dekodierung der Sandwich-Konstrukte zu erreichen, wurden Nanopartikel-Cluster (siehe Arbeitspaket 2) verwendet. Die Nanopartikel-Cluster wurden mit anti-SEB-Antikörper zur Bindung von SEB sowie mit anti-Fluoreszein-Antikörper zur Bindung an die Mikroarray-Chip-Oberfläche funktionalisiert. Hierzu wurde auf der Mikroarray-Chip-Oberfläche Fluoreszein immobilisiert. Auf diese Weise konnten die Nanopartikel-Cluster über den konjugierten anti-SEB-Fängerantikörper das Toxin in Lösung abfangen und gleichzeitig über den ebenfalls konjugierten anti-Fluoreszein-Antikörper an das immobilisierte Fluoreszein auf dem Mikroarray-Chip haften. Mit einem biotinylierten anti-SEB-Detektionsantikörper, der wiederum an SEB bindet, konnte die gewünschte Chemilumineszenz-Reaktion erfolgen. Nach einem Regenerierungsschritt mit Glycin-Puffer (pH 3) wurde der SMIA regeneriert. Die Sandwich-Konstrukte wurden vollständig dekodiert und der SMIA stand für eine erneute Messung zur Verfügung.

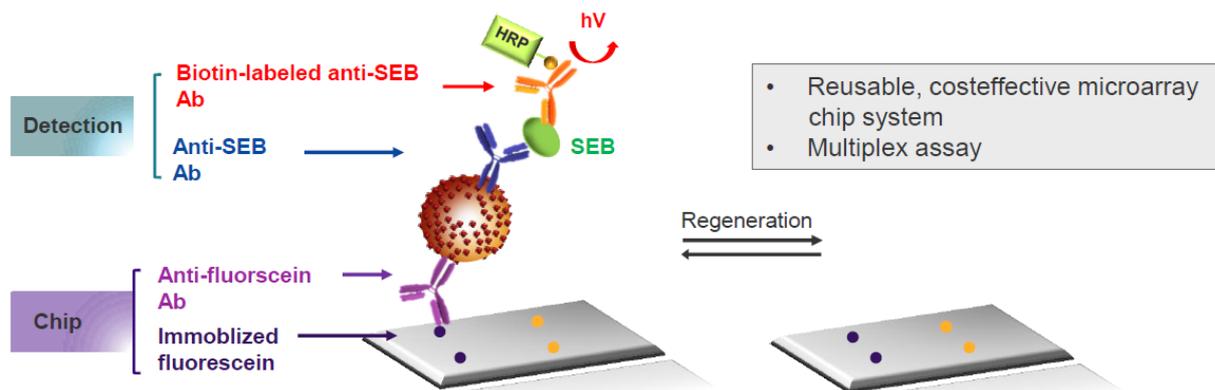


Abbildung 27: Schematische Darstellung des regenerierbaren SMIA.

Zunächst wurde die Immobilisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein auf der Mikroarray-Chip-Oberfläche getestet. Hierbei wurde Fluorescein in verschiedenen Konzentrationen auf die Epoxy-behandelte Glasoberfläche der Mikroarray-Chips immobilisiert. Es wurde ein MCR 3 SLT-Programm geschrieben. Im nächsten Schritt wurde die Regeneration mit dem immobilisierten Fluorescein und dem Antikörperpaar anti-Fluorescein-Antikörper und anti-Ziege-HRP-Antikörper am MCR 3 SLT getestet. Hiermit sollte gezeigt werden, ob die Regeneration am MCR 3 SLT prinzipiell möglich ist. Der Aufbau des Mikroarray-Immunoassays ist in Abbildung 28 gezeigt.

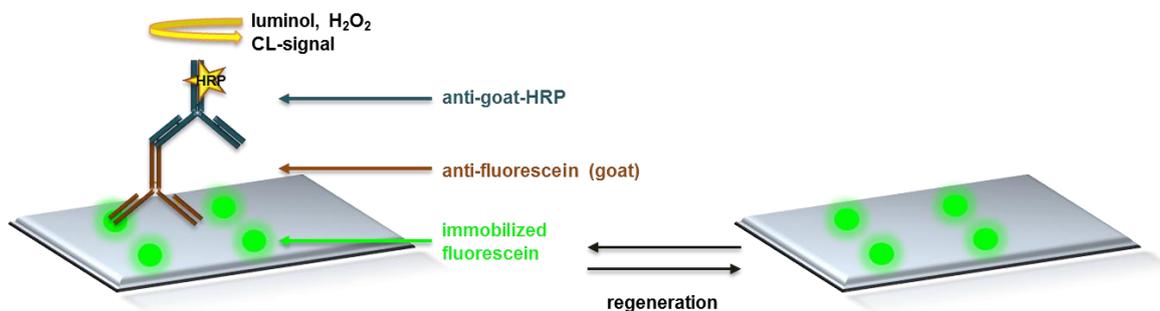
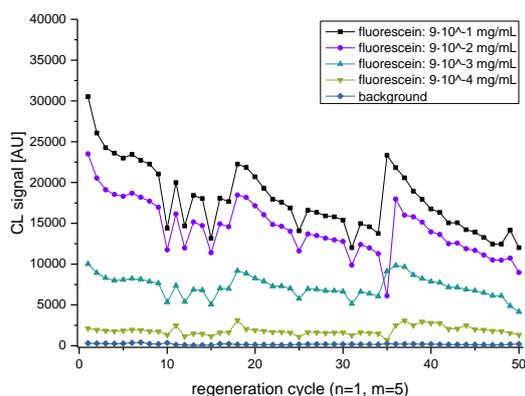


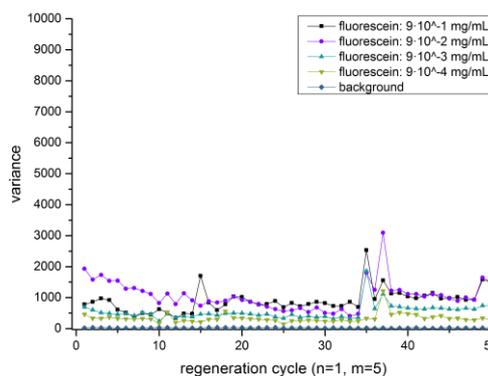
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Regenerierung des SMIA.

Abbildung 29 a zeigt, dass der Mikroarray-Immunoassay 50-mal erfolgreich regeneriert werden konnte. Aufgrund der konstanten Chemilumineszenz-Signalentwicklung, der geringen Varianz und der Entwicklung eines deutlichen Chemilumineszenz-Signales im Vergleich zum Hintergrundrauschen, erwies sich die Fluorescein-Konzentration von  $9 \times 10^{-3}$  mg/mL Fluorescein als sehr gut geeignet. Eine höhere Konzentration des immobilisierten Fluoreszeins führte dagegen zu einer stärkeren Varianz der Signale (Abbildung 29 b). Wie in Abbildung 29 c zu erkennen ist, war das Regenerationssignal jeweils im Bereich des Hintergrundsignals. Es konnte eine erfolgreiche Regeneration nach 50 Zyklen gezeigt werden.

29 a)



29 b)



29 c)

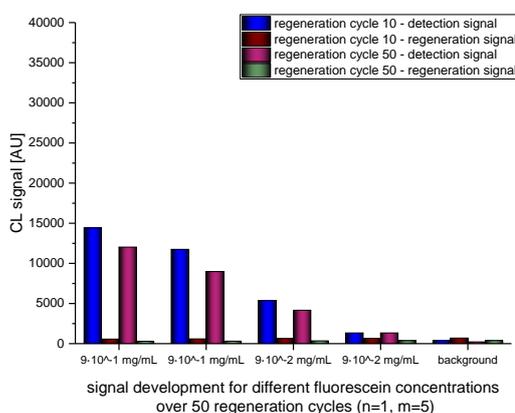


Abbildung 29: Regenerierbarer SMIA mit  $0,5 \mu\text{g/mL}$  anti-Fluoreszein-Antikörper und  $5 \mu\text{g/mL}$  anti-Ziege-HRP-Antikörper am MCR 3 SLT mit 50 Regenerierungszyklen. Es wurden jeweils verschiedene Konzentrationen des auf dem Glaträger immobilisierten Fluoreszeins vermessen (29 a); Vergleich der Varianzen nach 50 Regenerierungszyklen des SMIA (29 b), Vergleich der Regenerations- und Detektionssignale des SMIA nach 10 und 50 Regenerationszyklen (29 c).

Im nächsten Schritt wurde der regenerierbare SMIA für die Detektion von SEB etabliert. Mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs wurde zunächst ein geeignetes Antikörperpaar für die Detektion von SEB getestet. Es wurde anschließend ein SMIA basierend auf magnetischen Nanopartikel-Clustern am MCR 3 SLT etabliert. Nach Funktionalisierung der Antikörper auf den Nanopartikel-Clustern wurden diese in einer mit SEB aufgestockten Probelösung inkubiert, immunomagnetisch separiert und in den Mikroarray-Chip direkt injiziert. Für die Messungen wurde ein geeignetes MCR 3 SLT-Programm geschrieben, optimiert und etabliert. Die Mikroarray-Chips wurden mit dem etablierten MCR 3 SLT-Programm vermessen. Es ist eine deutliche Chemilumineszenz-Signalentwicklung im Vergleich zum Hintergrundsignal zu erkennen (Abbildung 30 und 31). Die Negativkontrolle zeigte wie gewünscht keine

Signalentwicklung. Das Prinzip des SMIA mit magnetischen Nanopartikel-Clustern zur Detektion von SEB konnte somit erfolgreich am MCR 3 SLT gezeigt werden.

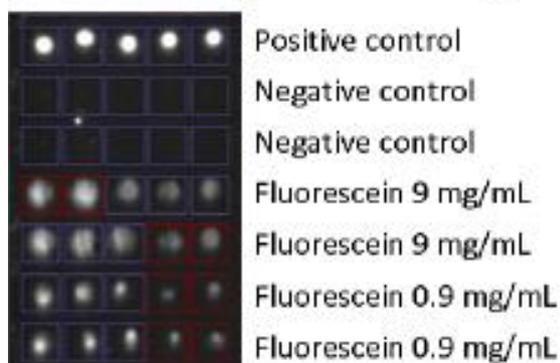


Abbildung 30: Spotting-Schema des SMIA mit magnetischen Nanopartikel-Clustern zur Detektion von SEB.

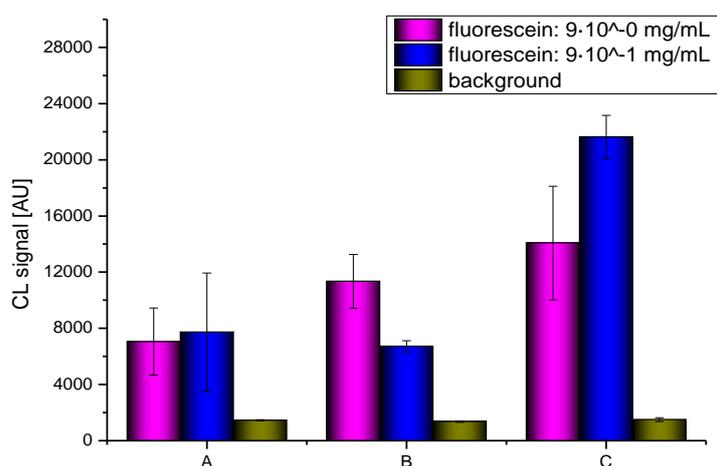


Abbildung 31: Chemilumineszenz-Signale des SMIA mit magnetischen Nanopartikel-Clustern zur Detektion von  $1000 \mu\text{g/L}$  SEB am Beispiel von drei Messungen (A-C),  $n=3$ .

Im letzten Schritt wurde die Regenerierbarkeit des Sandwich-Mikroarray-Immunoassays basierend auf magnetischen Nanopartikel-Clustern zur Detektion von SEB getestet. Hierzu wurde ein Programm am MCR 3 SLT für die Regeneration der Mikroarray-Chips geschrieben und die Parameter (z.B. Waschzyklen, Inkubationszeit, Antikörperkonzentration und Enzymkonzentration) für eine optimale Detektion von SEB optimiert. Um die Regeneration der Mikroarray-Chips als Prinzipstudie zu zeigen, wurde die Nanopartikel-Cluster-Antikörper-SEB-Probenlösung direkt in die Flusszelle des Mikroarray-Chips injiziert, inkubiert und mit dem geeigneten Programm am MCR 3 SLT vermessen (Abbildung 32 a). Anschließend wurde das etablierte Regenerationsprogramm am MCR 3 SLT durchlaufen. Nach der Regeneration mit einem Glycin-Puffer (pH 3) ist deutlich zu erkennen, dass die vorher vorhandenen Chemilumineszenz-Spots auf dem Mikroarray-

Chip nicht mehr sichtbar sind (Abbildung 32 b). Somit konnte also das Sandwich-Konstrukt mit dem Regenerationsprogramm erfolgreich dekodiert werden. Anschließend wurde der Mikroarray-Chip wieder verwendet, mit frischer Probelösung befüllt und erneut vermessen. Es zeigten sich erneut deutliche Chemilumineszenz-Signale für SEB (Abbildung 32 c). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass prinzipiell der regenerierbare SMIA mit magnetischen Nanopartikel-Clustern möglich ist.

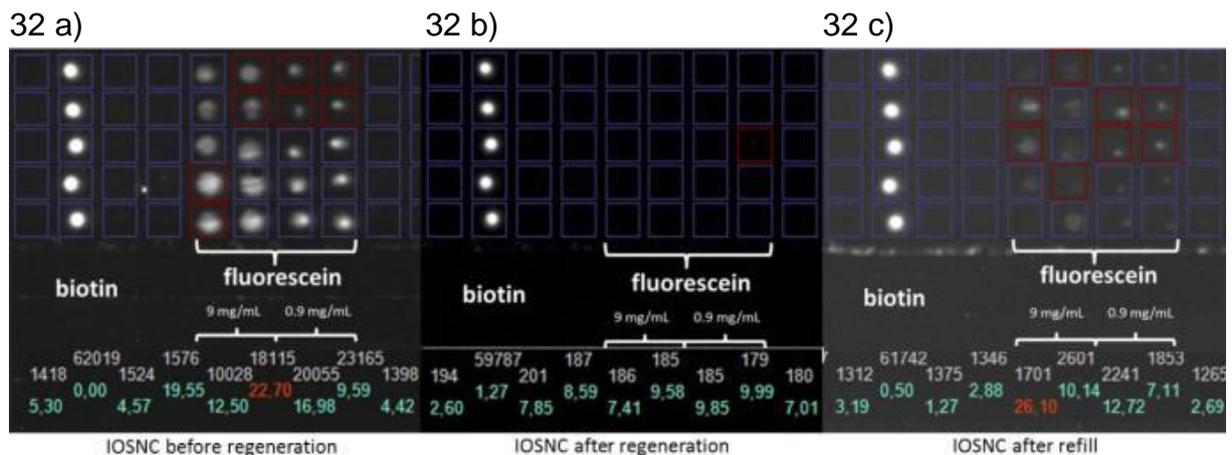


Abbildung 32: Chemilumineszenz-Signaleentwicklung des regenerierbaren SMIA basierend auf magnetischen Nanopartikel-Clustern zur Detektion von SEB vor Regeneration (32 a), nach Regeneration (32 b) sowie nach Wiederverwendung des Mikroarray-Chips (32 c).

### 3.1.3. Charakterisierung der erarbeiteten SMIAs

Für die Charakterisierung der Antikörper-Mikroarrays wurden die Fänger- und Detektionsantikörper der Projektpartner verwendet. Der schematische Aufbau des Mikroarrays ist in Abbildung 33 exemplarisch gezeigt.

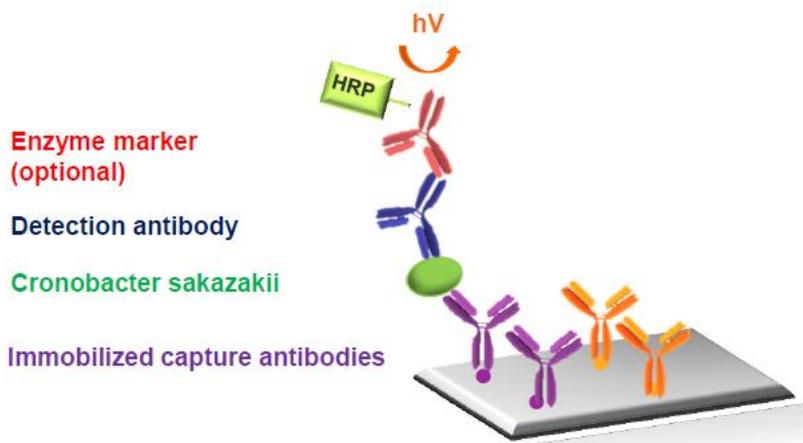
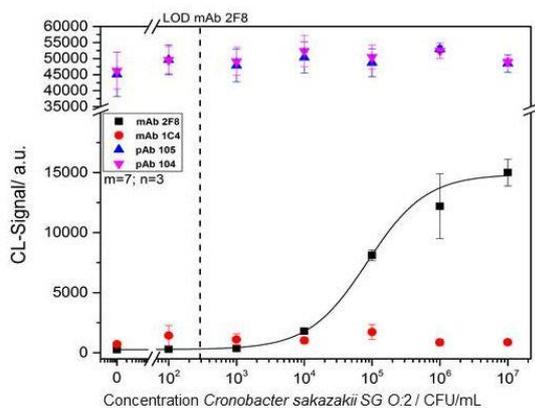


Abbildung 33. Schematischer Aufbau des Antikörper-Mikroarrays auf dem MCR 3 SLT am Beispiel von *Cronobacter sakazakii*.

## Cronobacter sakazakii SG O7

Für die sensitive Detektion von *Cronobacter sakazakii* wurde ein MCR 3 SLT-Programm etabliert und optimiert. Die Stämme des *Cronobacter sakazakii* SG O2, DB 255/5-05 und SG O1, MHI 21001 wurden für die Messungen am MCR 3 SLT verwendet. Zunächst sollte das sensitivste Antikörperpaar für *Cronobacter sakazakii* mit dem Mikroarray-Assay am MCR 3 SLT gefunden werden. Es wurden hierzu verschiedene Kombinationen an Fänger- und Detektionsantikörperpaaren von den Projektpartnern der LMU München (LMU) und Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) am MCR 3 SLT getestet. Zum Vergleich wurden jeweils Kalibrierkurven erstellt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Detektion von *Cronobacter sakazakii* mit einem Antikörper-Mikroarray auf dem MCR 3 SLT sehr gut möglich ist. Das sensitivste Antikörperpaar für *Cronobacter sakazakii* SG O2 besteht aus dem polyklonalem Detektionsantikörper (pAB) 105 der JLU, Gießen, und dem monoklonalen Fängerantikörper mAB 2F8 der LMU, München, mit einer Nachweisgrenze von  $2,9 \times 10^2$  KBE/mL (Abbildung 34 a, Tabelle 6). Der biotinylierte Detektionsantikörper mAB 2F8 zeigte eine höhere Nachweisgrenze von  $4,7 \times 10^4$  KBE/mL (Abbildung 34 b, Tabelle 6). Für *Cronobacter sakazakii* SG O1 konnte der Antikörper mAB 1C4 der LMU, München sowohl als Fängerantikörper und in der biotinylierten Form auch als Detektionsantikörper eingesetzt werden (Abbildung 35, Tabelle 6).

34 a) pAB 105 (JLU, Gießen)



34 b) mAB 2F8 (LMU München)

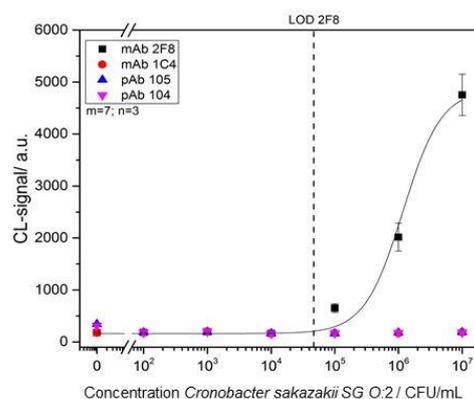


Abbildung 34: SMIA-Kalibrierkurven für die Detektion von *Cronobacter sakazakii* SG O2 mit dem Fängerantikörper mAB 2F8 und den verschiedenen Detektionsantikörpern: pAB 105 (34 a) und mAB 2F8-Biotin (34 b).

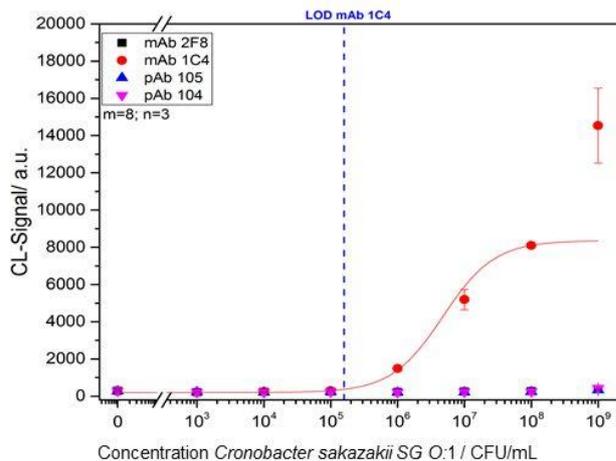


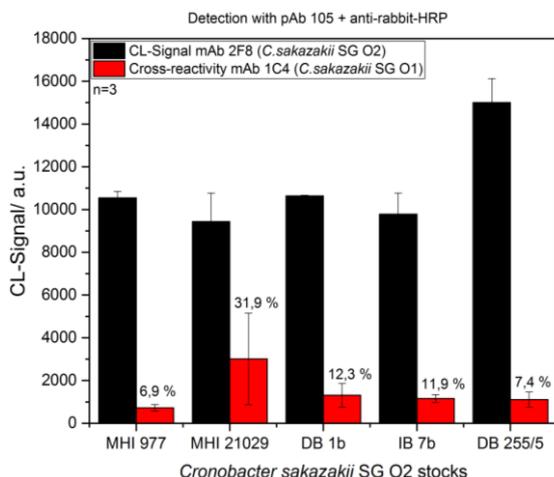
Abbildung 35: SMIA-Kalibrierkurven für die Detektion von *Cronobacter sakazakii* SG O1 mit dem Fängerantikörper mAb 1C4 und dem Detektionsantikörper mAb 1C4-Biotin.

Tabelle 6: Arbeitsbereiche und Nachweisgrenzen der Antikörper-Mikroarrays zur Detektion von *Cronobacter sakazakii* SG O1 und SG O2 mit verschiedenen Antikörperpaar-Kombinationen.

Fängerantikörper	Detektionsantikörper	Arbeitsbereich (KBE/mL)	Nachweisgrenze (KBE/mL)
mAb 2F8 (SG O2)	pAb 105	$2,1 \times 10^4 - 3,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^2$
mAb 2F8 (SG O2)	mAb 2F8 (biotin)	$4,5 \times 10^5 - 3,1 \times 10^6$	$4,7 \times 10^4$
mAb 1C4 (SG O1)	mAb 1C4 (biotin)	$1,4 \times 10^6 - 1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$

Um eine Kreuzreaktivität auszuschließen, wurde mit dem optimierten Mikroarray-Setup die Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers mAb 1C4, der spezifisch auf *Cronobacter sakazakii* SG O1 reagiert, mit der *Cronobacter sakazakii* SG O2 getestet. Es wurden verschiedene *Cronobacter*-Isolate SG O2 der Projektpartner (MHI 977, MHI 21029, DB 1b, IB 7b) getestet. Wie die Abbildung 36 a zeigt, konnte mit dem polyklonalen Antikörper Detektionsantikörper pAB105 eine Kreuzreaktivität von 6,9 – 31,9 % gefunden werden. Eine Detektion mit mAb 2F8-Biotin zeigte dagegen nur eine geringe Kreuzreaktivität von 2.3 % - 9,7 % (Abbildung 36 b).

36 a)



36 b)

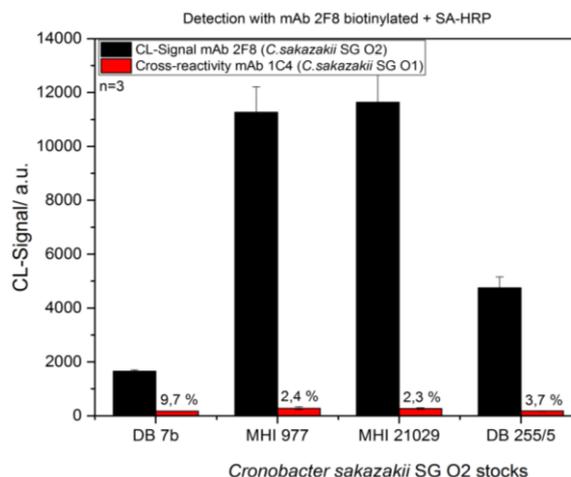


Abbildung 36: Kreuzreaktivität von mAb 1C4 mit *Cronobacter sakazakii* SG O2 mit dem Detektionsantikörper pAb 105 (36 a) und mAb 2F8-Biotin (36 b).

Zudem wurde auch die Kreuzreaktivität von dem monoklonalen Antikörper mAb 2 F8, der spezifisch auf Serogruppe O2 reagiert, mit *Cronobacter sakazakii* SG O2 getestet. Hierzu wurden die Stämme MHI 2104 und MHI 21001 der *Cronobacter sakazakii* SG O1 getestet. Es konnte gezeigt werden, dass nur eine sehr leichte Kreuzreaktivität von 2,6 - 4,2 % mit dem Antikörper-Mikroarray nachgewiesen wurde (Abbildung 37).

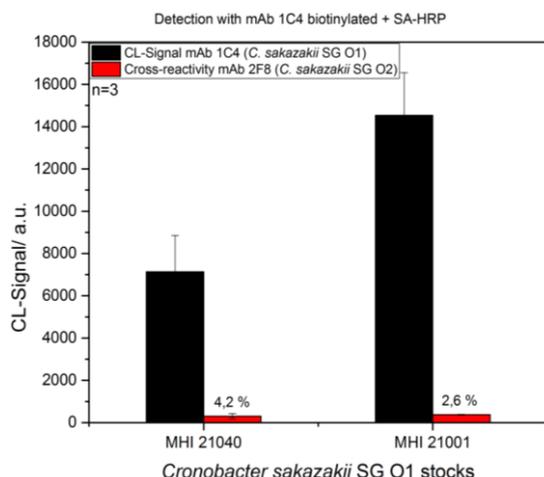


Abbildung 37: Kreuzreaktivität von mAb 2F8 mit *Cronobacter sakazakii* SG O1 mit dem Detektionsantikörper mAb 1C4-Biotin.

### Cronobacter turicensis

Für die Detektion von *Cronobacter turicensis* wurde ein MCR 3 SLT-Programm geschrieben und optimiert. Es wurden sowohl lebende *Cronobacter turicensis*-Zellen sowie das Filtrat der Zellen in verschiedenen Konzentrationen zur Messung der Kalibrierkurven verwendet. Hierbei konnte nach Erstellung von Kalibrierkurven für lebende *Cronobacter turicensis*-Zellen eine Nachweisgrenze von  $4,9 \times 10^5$  KBE/mL erzielt werden (Abbildung 38, Tabelle 7). Durch Verwendung des *Cronobacter turicensis*-Zellfiltrates konnte die Nachweisgrenze erfolgreich auf  $2,8 \times 10^5$  KBE/mL gesenkt werden (Abbildung 38, Tabelle 7).

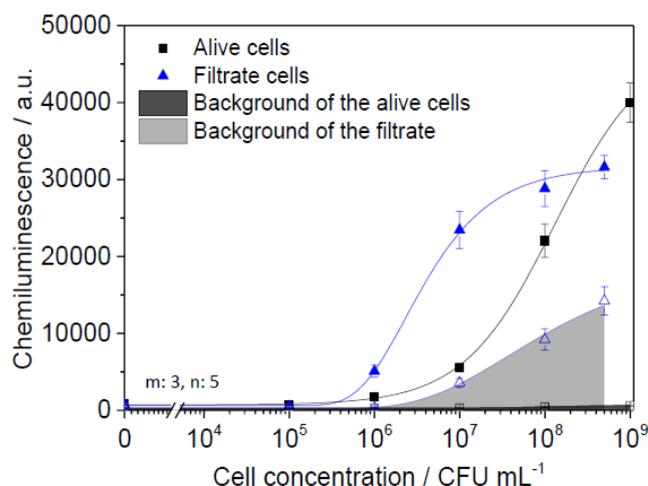


Abbildung 38: Kalibrierkurven des Antikörper-Mikroarrays für die Detektion von lebenden *Cronobacter turicensis*-Zellen sowie *Cronobacter turicensis*-Zellfiltrat am MCR 3 SLT.

Tabelle 7: Arbeitsbereiche und Nachweisgrenzen der Antikörper-Mikroarrays zur Detektion von lebenden *Cronobacter turicensis*-Zellen und deren Zellfiltrat.

<i>Cronobacter turicensis</i>	Arbeitsbereich (KBE/mL)	Nachweisgrenze (KBE/mL)
lebend	$2,4 \times 10^7 - 7,2 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$
Filtrat (30kDa)	$1,3 \times 10^6 - 6,7 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$

### Yersinia enterocolitica

Für die sensitive Detektion von *Yersinia enterocolitica* wurde ein MCR 3 SLT-Programm geschrieben und optimiert. Die Stämme der Serogruppe O3 DSM 11502 wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet (Konzentration:  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  KBE/mL), um das sensitivste Antikörperpaar am MCR 3 SLT herauszufinden. Es wurden verschiedene Kombinationen von Fänger- und Detektionsantikörper der JLU, Gießen, und LMU, München getestet. Abbildung 39 zeigt, dass der Fängerantikörper mAB 1F3 der LMU, München mit einer Erhöhung der *Yersinia enterocolitica*-Konzentration auch eine Steigerung des Chemilumineszenz-Signales bewirkte. Die

Kombination aus mAb 1F3 (LMU, München) als Fängerantikörper und pAb 24-15 (JLU, Gießen) als Detektionsantikörper ist somit für die Mikroarray-Messungen am MCR 3 SLT geeignet.

a)  $10^4$  KBE/mL    b)  $10^6$  KBE/mL    c)  $10^8$  KBE/mL

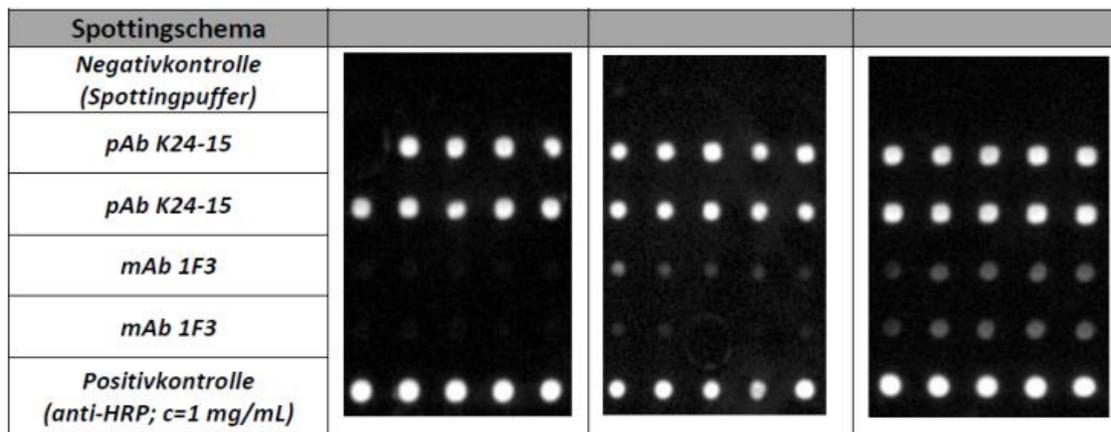


Abbildung 39: Spottingsschema der MCR 3 SLT-Messungen von *Yersinia enterocolitica* SG O3 mit dem Detektionsantikörper pAb 24-15 und verschiedenen immobilisierten Fängerantikörpern. Es wurde eine Bakterienkonzentration von a)  $10^4$  KBE/mL b)  $10^6$  KBE/mL und c)  $10^8$  KBE/mL *Yersinia enterocolitica* SG O3 vermessen.

Mit dem sensitivsten Antikörperpaar konnte für *Yersinia enterocolitica* am MCR 3 SLT eine Kalibrierkurve erstellt werden (Abbildung 40). Die Nachweisgrenze für *Yersinia enterocolitica* lag bei  $1.76 \times 10^7$  KBE/mL (Tabelle 8).

Tabelle 8: Arbeitsbereich und Nachweisgrenze des Antikörper-Mikroarrays zur Detektion von lebenden *Yersinia enterocolitica*.

Fängerantikörper	Detektionsantikörper	Arbeitsbereich [KBE/mL]	LOD [KBE/mL]
mAb1F3	pAb K24-15	$2,1 \times 10^7 - 4,4 \times 10^8$	$1.76 \times 10^7$

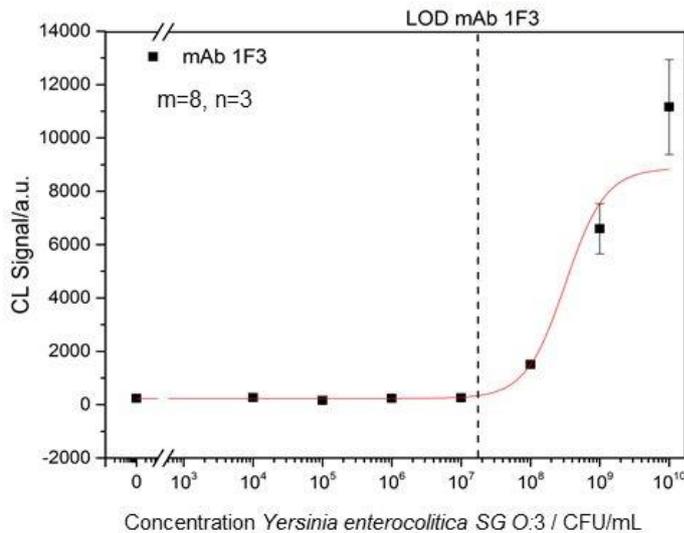


Abbildung 40: Kalibrierkurve des Antikörper-Mikroarrays für die Detektion von *Yersinia enterocolitica* SG O:3 mit dem Fängerantikörper mAb 1F3 und dem Detektoinsantikörper pAB K24-15.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Detektion von *Yersinia enterocolitica* mit Antikörper-Mikroarrays am MCR 3 SLT sehr gut möglich war. Das sensitivste Antikörperpaar bestand aus polyklonalen pAB 24-15 Detektionsantikörper der JLU, Gießen, und dem monoklonalen Fängerantikörper mAb 1F3 der LMU, München.

### *Klebsiella pneumoniae*

Für die sensitive Detektion von *Klebsiella pneumoniae* wurde ein MCR 3 SLT-Programm geschrieben und optimiert. Die *Klebsiella pneumoniae*-Zellen sowie die dazugehörigen Antikörper wurden von den Projektpartnern der LMU, München und JLU, Gießen, zur Verfügung gestellt. Die Mikroorganismen wurden sowohl hitzeinaktiviert als auch mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) inaktiviert und anschließend vermessen. Diverse Parameter des MCR 3 SLT-Programmes wie Temperatur, Waschzyklen, Enzymkonzentration, Antikörper-Konzentration und Inkubationszeit wurden getestet und optimiert. Abbildung 41 zeigt die erstellte Kalibrierkurve mit einer Nachweisgrenze von  $1.0 \times 10^7$  KBE/mL für die hitzeinaktivierten *Klebsiella pneumoniae*-Bakterienzellen sowie  $2.6 \times 10^7$  KBE/mL für die mit PFA inaktivierten Zellen. Eine Hitzeinaktivierung ist demnach besser für den Antikörper-Mikroarray geeignet (Tabelle 9).

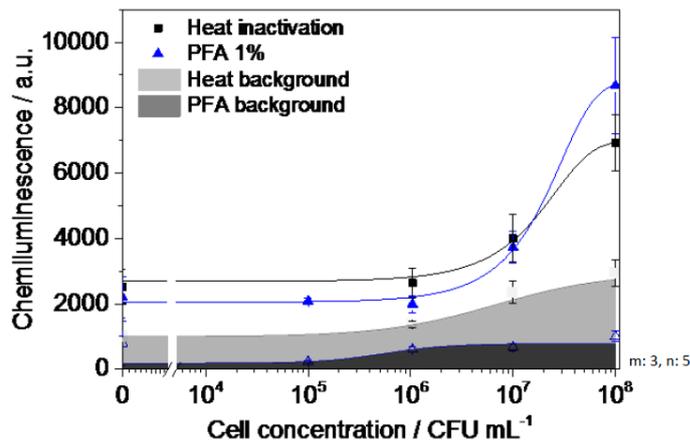


Abbildung 41: Kalibrierkurve des Antikörper-Mikroarrays für die Detektion von hitzeinaktivierten und mit 1 % PFA inaktivierten *Klebsiella pneumoniae*-Bakterienzellen am MCR 3 SLT.

Tabelle 9: Arbeitsbereich und Nachweisgrenze des Antikörper-Mikroarrays zur Detektion von lebenden *Klebsiella pneumoniae*-Bakterien.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Arbeitsbereich (KBE/mL)	Nachweisgrenze (KBE/mL)
hitzeinaktiviert	$9,6 \times 10^6 - 1,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
Inaktiviert mit 1 % PFA	$2,0 \times 10^7 - 5,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$

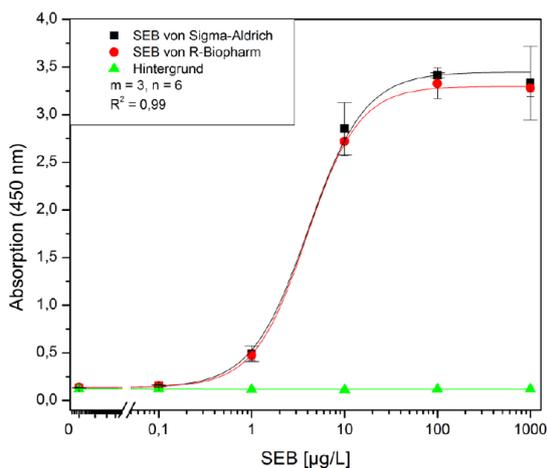
### Staphylokokken-Enterotoxine

Das Ziel dieses Teilarbeitspaketes bestand in der Entwicklung eines Mikroarray-basierten Schnellnachweisverfahrens für die gemeinsame Erfassung der beiden Staphylokokken-Enterotoxine A und B. Zur Analytik der Staphylokokken-Enterotoxine wurden das polyklonale Antikörperpaar (polyklonaler Fänger- und biotinylierter Detektionsantikörper) und das SEB des Projektpartners R-Biopharm AG verwendet. Zusätzlich wurde auch ein kommerziell erhältliches SEB von Sigma Aldrich verwendet. Das Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA) stammte von dem Projektpartner der LMU, München.

Eine erste Optimierung des Sandwich-Immunoassays erfolgte auf der Mikrotiterplatte. Die hierbei ermittelten Konzentrationen sämtlicher Reagenzien dienten als Richtwerte für die Anwendung auf der Mikroarray-Analyse-Plattform MCR 3 SLT. Zunächst wurde der Sandwich-Immunoassay auf der Mikrotiterplatte mit einem Sandwich-ELISA getestet. Mit dem Sandwich-ELISA wurde für beide SEB Toxine (kommerziell erhältliches SEB von Sigma Aldrich, SEB von R-Biopharm AG)

eine Nachweisgrenze von 0,16  $\mu\text{g/L}$  ermittelt (Abbildung 42 a, Tabelle 10). Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des polyklonalen anti-SEB-Antikörpers mit SEA wurden die Testmittelpunkte der Graphen in Abbildung 42 b verwendet ( $\text{IC}_{50}$  SEB:  $3,9 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$ ,  $\text{IC}_{50}$  SEA:  $185,2 \pm 77,7 \mu\text{g/L}$ ). Die Kreuzreaktivität des polyklonalen SEB-Antikörpers für das SEA-Antigen betrug 2,1 % und ist somit als gering einzustufen.

42 a)



42 b)

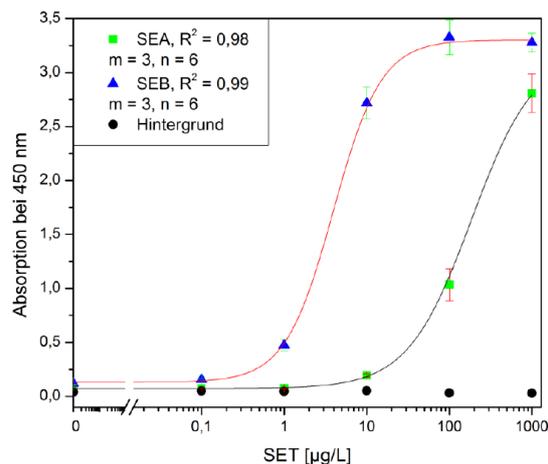


Abbildung 42: Kalibrierkurve für SEB mittels Sandwich-ELISA für verschiedene SEB Toxine (42 a), Kreuzreaktivität des polyklonalen anti-SEB-Fängerantikörpers mit SEA (42 b).

Für SEA wurde eine Nachweisgrenze von 0,53  $\mu\text{g/L}$  ermittelt (Abbildung 42, Tabelle 10). Auch für die polyklonalen anti-SEA-Antikörper wurde die Kreuzreaktivität mit dem SEB-Toxin geprüft (Abbildung 43). Die Ermittlung erfolgte über die Testmittelpunkte ( $\text{IC}_{50}$  SEA:  $0,68 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ ,  $\text{IC}_{50}$  SEB:  $1361,6 \pm 380,9 \mu\text{g/L}$ ). Die Kreuzreaktivität der polyklonalen anti-SEA-Antikörper für das SEB Antigen betrug 0,05 % und ist somit als gering einzustufen.

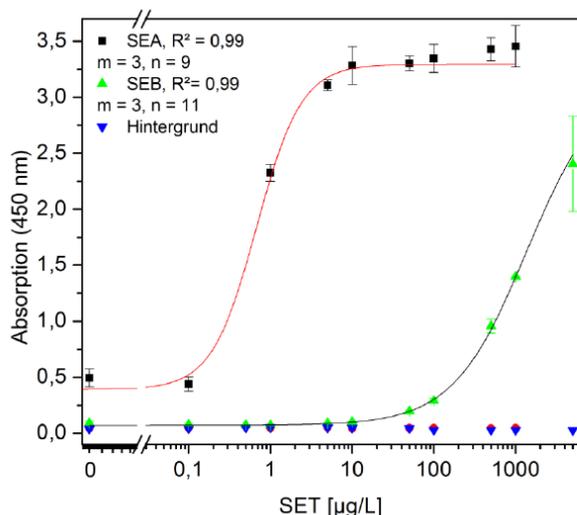


Abbildung 43: Kalibrierkurve für SEA mittels Sandwich-ELISA, Kreuzreaktivität des polyklonalen anti-SEA-Fängerantikörpers mit SEB.

Tabelle 10: Arbeitsbereiche und Nachweisgrenzen der Sandwich-ELISAs zur Detektion von Staphylokokken-Enterotoxinen.

Staphylokokken-Enterotoxin	Arbeitsbereich (µg/L)	Nachweisgrenze (µg/L)
SEB (Sigma)	1,6 ± 0,2 - 0,9 ± 2,2	0,16
SEB (R-Biopharm AG)	1,6 ± 0,2 - 8,5 ± 2,1	0,16
SEA (LMU, München)	0,28 ± 0,1 - 1,63 ± 2,1	0,53

Im nächsten Schritt wurde ein Messprogramm für einen SMIA am MCR 3 SLT geschrieben und optimiert. Es wurden hierzu verschiedene Parameter wie beispielsweise die Zusammensetzung des Spottingpuffers, Flußgeschwindigkeit, Volumeneinheiten oder Inkubationszeiten angepasst. Für den SMIA wurde ebenfalls der polyklonale Fängerantikörper sowie der dazugehörige polyklonale biotinylierte Detektionsantikörper von R-Biopharm AG verwendet.

Für SEB wurde eine Kalibrierkurve mit einem Testmittelpunkt von 17,6 µg/L und einer Nachweisgrenze von 0,2 µg/L erzielt (Abbildung 44). Das für SEB optimierte Messprogramm wurde ebenfalls für SEA angewandt. Es resultierte eine Kalibrierkurve mit einem Testmittelpunkt von 89,9 µg/L und einer Nachweisgrenze von 0,8 µg/L (Abbildung 45). Die Gesamtdauer des optimierten Messprogrammes betrug 15 min.

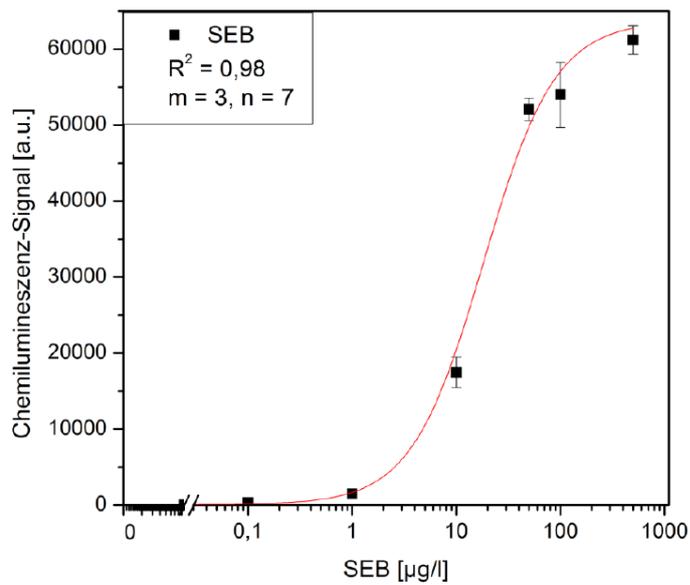


Abbildung 44: Kalibrierkurve des SMIA für SEB.

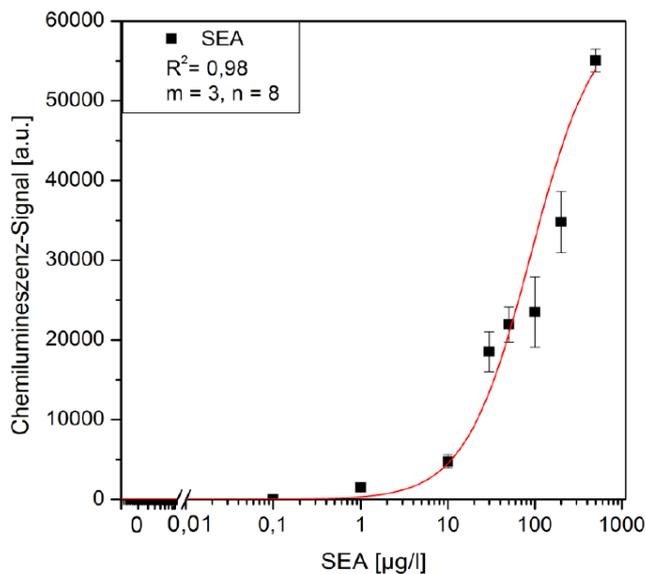


Abbildung 45: Kalibrierkurve des SMIA für SEA.

Tabelle 11: Arbeitsbereiche und Nachweisgrenzen der SMIA zur Detektion von Staphylokokken-Enterotoxinen.

Staphylokokken-Enterotoxin	Arbeitsbereich (µg/L)	Nachweisgrenze (µg/L)
SEB	7,3 ± 0,1 - 42,2 ± 1,2	0,2
SEA	27,0 ± 0,2 - 298,8 ± 27,3	0,8

Nach erfolgreicher Einzelkalibrierung wurde auch eine Multiplex-Messung mit allen zur Verfügung gestellten Toxinen am MCR 3 SLT durchgeführt. Es wurden die Toxine SEB, SEA sowie auch die B-Komponente des nicht-hämolytischen Enterotoxins des *Bacillus cereus* (NheB) verwendet. Für die Messungen am MCR 3 SLT wurden der nicht aufgereinigte Kulturüberstand des NheB-Toxins und die zugehörigen Antikörper von der LMU, München, zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe von Multiplexmessungen am MCR 3 SLT konnten Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit unspezifischen Antigenen direkt mitbestimmt werden. Es wurden Mikroarray-Chips mit den Fängerantikörpern aller der zur Verfügung gestellten Toxine immobilisiert. Die Toxine wurden mit dem jeweils zugehörigen Detektionsantikörper vermessen. Im Vergleich zu den Toxinen SEB und SEA zeigte das NheB-Toxin niedrigere Chemilumineszenz-Signale (Abbildung 46). Dies könnte möglicherweise auf den geringeren Biotinylierungsgrad der von der LMU, München, zur Verfügung gestellten Detektionsantikörper sowie die geringere Konzentration der anti-NheB-Antikörper zurückzuführen sein (Konzentration: 0,25 mg/mL). Für die Messung von SEB und SEA wurden dagegen höhere Konzentrationen des Fängerantikörpers verwendet (Konzentration: 0,5 mg/mL). Zur Messung des NheB-Toxins wurden lediglich unaufgereinigte Kulturüberstände des NheB-Toxins zur Verfügung gestellt. Dies könnte ebenfalls ein Grund für die niedrigeren Chemilumineszenz-Signale am MCR 3 SLT sein.

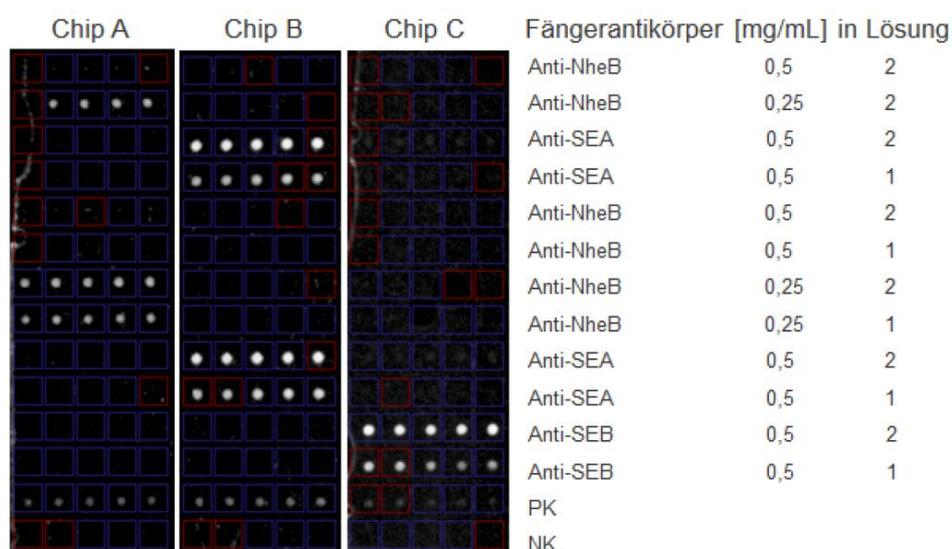


Abbildung 46: Messung der Kreuzreaktivität am MCR 3 SLT. Auf Chip A wurde NheB vermessen, auf Chip B SEA und auf Chip C SEB.

Die Kreuzreaktivitäten wurden über die Chemilumineszenz-Signale ermittelt. Es wurden die Signalintensitäten der Fremdantigene mit denen der komplementären Analyten ins Verhältnis gesetzt. Es handelte sich um Einzelmessungen. Die Ergebnisse sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Wie an den niedrigen Werten in Tabelle 12 erkennbar ist, konnten keine signifikanten Wechselwirkungen der einzelnen Immunoassays untereinander beobachtet werden. Die Messungen ergaben deutlich sichtbar eine Selektivität der Antikörper, da nur für die gewünschten Antigen-Antikörper-Paare Detektionssignale erhalten wurden.

Tabelle 12: Messungen zur Testung der Kreuzreaktivitäten

Antigen	Anti-NheB	Anti-SEA	Anti-SEB
NheB	-	3.0 %	3.4%
SEA	0.85 %	-	0.85%
SEB	1.2 %	2.3 %	-

### Arbeitspaket 3.2 F&E Technikum Produktionsverfahren

Mit R-Biopharm AG wurden die Herstellprotokolle für die NHS-aktivierten Jeffamine-Glaschips abgestimmt. Die IWC-TUM hat hierbei eine SOP (Standard Operation Procedure) für die Herstellung der NHS-aktivierten Jeffamine-Glaschips ausgearbeitet und diese dem Projektpartner R-Biopharm AG zur Verfügung gestellt.

#### SOP für die Herstellung der NHS-aktivierten Jeffamine-Glaschips (Stückzahl 40 Glaschips)

Das Jeffamine® ED-2003 wurde von der Firma Huntsman bestellt. Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich beliefert.

##### 1. Reinigung und Aktivierung der Glasoberfläche

Zu Beginn wird ein Satz von 40 handelsüblichen Glasobjektträgern (26 mm x 76 mm x 1 mm) mit einem Glasdiamantstift in der rechten unteren Ecke mit fortlaufenden Chargennummern versehen. Die Gravur dient zudem zur Unterscheidung der beiden Objektträgerseiten. Die Oberflächenchemie erfolgt auf der unbeschrifteten Objektträgerseite. Es werden jeweils 20 Objektträger in einem Färbeschaleneinsatz in 200 mL einer 2 %igen Hellmanex®-Lösung getaucht und zuerst 1 h lang im Ultraschallbad belassen, danach für 15 Stunden auf einem Schüttler (300 rpm) und abschließend 1 Stunde im Ultraschallbad behandelt. Danach werden sie fünfmal mit je 200 mL destilliertem Wasser gespült. Die Glasoberfläche der Objektträger wird mit einer frisch zubereiteten Lösung aus Salzsäure (37 % (v/v)) und Methanol angeätzt. Hierfür werden die Objektträger für 1 Stunde in 200 mL Lösung in einem Färbeschaleneinsatz auf dem Schüttler (300 rpm) belassen. Daraufhin werden die Objektträger fünfmal mit je 200 mL destilliertem Wasser in der Färbeschale gereinigt. Danach werden die Objektträger für 1 Stunde in konzentrierter Schwefelsäure geschüttelt (300 rpm), erneut fünfmal mit je 200 mL destilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

##### 2. Silanisierung der Glasoberfläche

Die Hälfte aller Objektträger wird mit der Gravur nach unten in Petrischalen vorgelegt. Auf einen Chip wird 600 µL GOPTS (3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan) gleichmäßig aufgetragen. Von der anderen Hälfte des Objektträgersatzes wird ein Glasobjektträger mit der unmarkierten Seite auf den mit GOPTS versehenen Chip gelegt, wodurch sogenannte Sandwiches entstehen. Aus vierzig Objektträgern werden somit zwanzig Sandwiches gebildet, welche für 3 h in geschlossenen

Petrischalen gelagert werden. Anschließend werden sie mit Hilfe einer Pinzette getrennt und in einen Färbeschaleinsatz gefüllt mit 200 mL absoluten Ethanol überführt, und für 15 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Es erfolgt ein weiterer Waschschriff mit Methanol und zum Schluss erneut mit Ethanol. Danach werden die Glasobjektträger im Stickstoffstrom getrocknet.

### 3. Beschichtung mit Jeffamine® ED-2003

Für die Beschichtung werden 20 g Jeffamine® ED-2003 bei 98 °C im Trockenschrank geschmolzen. Die Beschichtung mit Jeffamine® ED-2003 erfolgt ebenfalls nach der Sandwich-Technik. Die Hälfte der Objektträger wird mit der silanisierten Seite nach oben in Petrischalen vorgelegt. Je 600 µL flüssiges Jeffamine® ED-2003 werden darauf pipettiert und im Sandwich-Format mit einem weiteren Glasobjektträger bedeckt. Die Sandwiches werden in geschlossenen Petrischalen für 15 h bei 98 °C im Trockenschrank gelagert. Daraufhin werden die noch heißen Sandwich-Pakete manuell in destilliertem Wasser getrennt und vorgespült, zweimal für je 15 min unter Austausch des Wassers im Ultraschallbad gereinigt und schließlich unter Stickstoff getrocknet. Die Glasobjektträger werden visuell auf Verunreinigungen überprüft. Die Jeffamine® ED-2003-beschichteten Glasobjektträger können bis zur Aktivierung einige Wochen im Exsikkator unter Vakuum aufbewahrt werden.

### 4. NHS-Aktivierung

Die freien Aminogruppen der Jeffamine-beschichteten Glasobjektträger werden mit DSC (N,N-Disuccinimidylcarbonat), einem bifunktionellem Crosslinker, modifiziert. Hierzu werden jeweils 600 µL einer Lösung aus 160 mg DSC, 8 mg DMAP (1,4-Dimethylaminopyridin) und 250 µL Triethylamin in 6 mL trockenem DMF (Dimethylformamid) auf einen Jeffamine® ED-2003-belegten Glasobjektträger pipettiert und mit einem weiteren Jeffamine® ED-2003-PEG-belegten Glasobjektträger bedeckt. Zur Umsetzung der Reaktion werden die Glasobjektträger für vier Stunden bei 22 °C in geschlossenen Petrischalen inkubiert. Anschließend werden die Sandwiches in Methanol getrennt, in eine Färbeschale mit 200 mL Methanol überführt und zweimal für 5 min im Ultraschallbad unter Austausch des Methanols gereinigt. Die Glasobjektträger werden im Stickstoffstrom vollständig getrocknet, visuell kontrolliert. Anschließend kann das Spotting der Reagenzien auf der NHS-aktivierten Jeffamine-Glasoberfläche erfolgen.

## **Arbeitspaket 3.3. Mikroarray Geräteadaption MCR 3 SLT**

Da sich in dem abgeschlossenen AIF-Projekt SaBC gezeigt hat, dass eine Erhöhung der Temperatur auf 30 °C an der Mikroarray-Flusszelle zu einer Sensitivitätssteigerung führte, wurde ein MCR 3 SLT mit einer temperaturkontrollierten Flusszelle von GWK beschafft. Dieses Gerät war zusätzlich mit einer Probenschleife ausgestattet. Die Ventile und Verschlauchungen wurden so angepasst, dass eine injizierte Probe direkt am MCR 3 SLT prozessiert werden konnte. Entsprechend mussten Arbeitsprotokolle zur Vermessung der

Chemilumineszenz-SMIAs am MCR 3 SLT angepasst werden (z.B. Prozessprotokolle für die Automatisierung und Auswertesoftware). Messprotokolle für die Antikörper-Mikroarrays wurden erstellt und hinsichtlich Sensitivität und Schnelligkeit optimiert. Die Testung der Antikörper für die SMIAs erfolgte auf dem MCR 3 SLT.

#### II.1.4. Arbeitspaket 5. Validierung und Laborvergleichsuntersuchungen

Nach der erfolgreichen Testungs- und Optimierungsphase wurden die entwickelten SMIAs validiert, indem Kalibrierkurven mit gemessen wurden. Es wurden jeweils die Nachweisgrenze und der Arbeitsbereich an mehreren Mikroarray-Chips getestet. Eine Zusammenfassung aller erzielten Ergebnisse ist in der Tabelle 13 dargestellt:

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der etablierten Antikörper-Mikroarrays

Mikroorganismus	Fänger Antikörper	Detektionsantikörper	Arbeitsbereich [KBE/mL]	Nachweisgrenze (LOD) [KBE/mL]
<i>Cronobacter sakazakii</i>	mAb 2F8 (SG: O2)	pAb 105	$2,1 \times 10^4$ - $3,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^2$
<i>Cronobacter sakazakii</i>	mAb 2F8 (biotin)	mAb 2F8 (biotin)	$4,5 \times 10^5$ - $3,1 \times 10^6$	$4,7 \times 10^4$
<i>Cronobacter sakazakii</i>	mAb 1C4 (SG O1)	mAb 1C4 (biotin)	$1,4 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^5$
<i>Cronobacter turicensis</i>			$1,3 \times 10^6$ - $6,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$
<i>Yersinia enterocolitica</i>	mAb 1F3	pAb K 24-15	$2,1 \times 10^7$ - $4,4 \times 10^8$	$1,76 \times 10^7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			$9,6 \times 10^6$ - $1,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
SEB	pAb, SEB R-Biopharm AG	pAb, SEB-R-Biopharm AG	$7,3 \pm 0,1$ - $42,2 \pm 1,2$	0,2 µg/L
SEA	pAb, SEA R-Biopharm AG	pAb, SEA-R-Biopharm AG	$27,0 \pm 0,2$ - $298,8 \pm 27,3$	0,8 µg/L

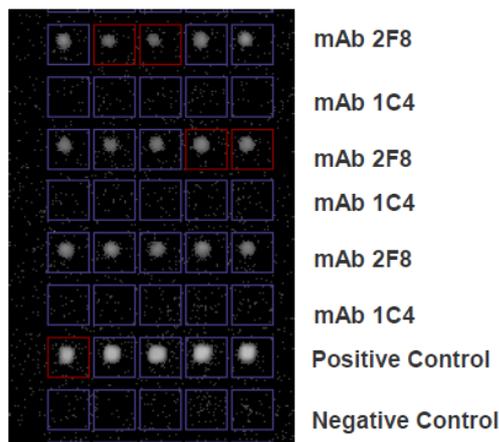
#### II.1.5. Arbeitspaket 6: Praxistests der entwickelten Testmuster

##### MCR 3 SLT Messungen von *Cronobacter sakazakii* SG O2 in Milupa® Anfangsmilch

Für den Praxistest der Antikörper-Mikroarrays wurden MCR 3 SLT Messungen in Lebensmittelmatrix durchgeführt. Hierzu wurden Milupa® Anfangsmilch (100 mL) mit verschiedenen Konzentrationen an *Cronobacter sakazakii* SG O2 aufgestockt (3 KBE/10 g Anfangsmilch und 30 KBE/10 g Anfangsmilch) und bei 37 °C kultiviert. Sie wurden mit Kulturverfahren vorher charakterisiert und hitzeinaktiviert. Wie in Abbildung 47 zu sehen ist, ist die Detektion von *Cronobacter sakazakii* SG O2 in 100 mL Milupa® Anfangsmilch am MCR 3 SLT sehr gut möglich. Für den Fängerantikörper mAb 2F8, der sensitiv für die *Cronobacter sakazakii* Serogruppe O2 ist, konnten deutliche Chemilumineszenz-Signale im Vergleich zu der Blank-

Probe erzielt werden. Zudem konnte eine vernachlässigbare Kreuzreaktivität mit dem Antikörper mAb 1C4 gezeigt werden. Dieser reagiert sensitiv auf SG O1. Durch Vermessen einer Blank-Probe ohne Zugabe von *Cronobacter sakazakii*-Bakterien wurde ein Schwellwert bei einem Chemilumineszenz-Signal von 216 a.u. erreicht. Der monoklonale Antikörper mAb 2F8 zeigte sowohl bei der mit 30 KBE/mL als auch bei der mit 3 KBE/mL *Cronobacter sakazakii*-Bakterien aufgestockten Milchprobe ein Chemilumineszenz-Signal unterhalb des Schwellwertes.

47 a)



47 b)

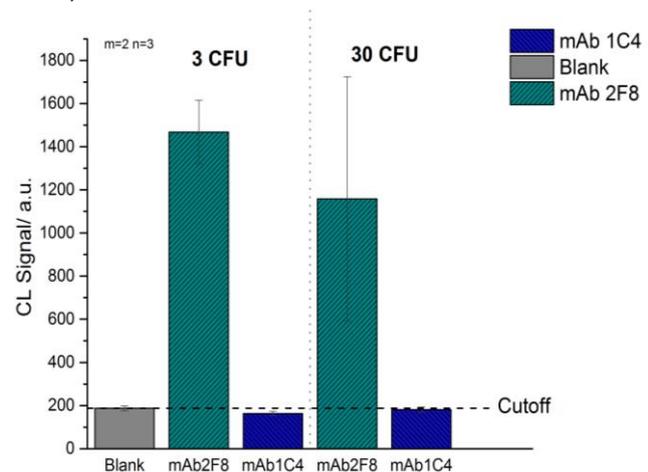


Abbildung 47: Spottingschema des Antikörper-Mikroarrays für die Detektion von *Cronobacter sakazakii* SG O2 in Anfangsmilch (47 a), MCR 3 SLT Messung für die Detektion von *Cronobacter sakazakii* SG O2 in Anfangsmilch (47 b).

#### MCR 3 SLT Messungen zur Detektion von SEB in Milch mit einem SMIA basierend auf magnetischen Nanopartikel-Clustern.

Zusätzlich wurde der etablierte SMIA mit magnetischen Nanopartikel-Clustern am MCR 3 SLT zur Detektion von SEB in Lebensmittelmatrix (Milch 1,5 %) getestet. Hierzu wurden verschiedene anti-SEB-Fängerantikörper auf den Mikroarray-Chip immobilisiert. Die Antikörper-funktionalisierten magnetischen Nanopartikel-Cluster wurden mit SEB aufgestockten Milchproben inkubiert, magnetisch separiert und am MCR 3 SLT mit dem vorher etablierten Programm (siehe Abschnitt 2.2.2) vermessen. Als Detektionsantikörper wurde mAb 1D6-Biotin des Projektpartners LMU, München verwendet. Die Probe wurde in den Mikroarray-Chip direkt injiziert und wie in 2.2.2 beschrieben mit Hilfe eines Permanentmagneten für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Wie Abbildung 48 ersichtlich, zeigten sich deutliche Chemilumineszenz-Signale im Vergleich zu der Blank-Messung. Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der Nachweis von SEB in Realproben mit magnetischen Nanopartikel-Clustern mit Hilfe eines Antikörper-Mikroarrays sehr gut möglich ist.

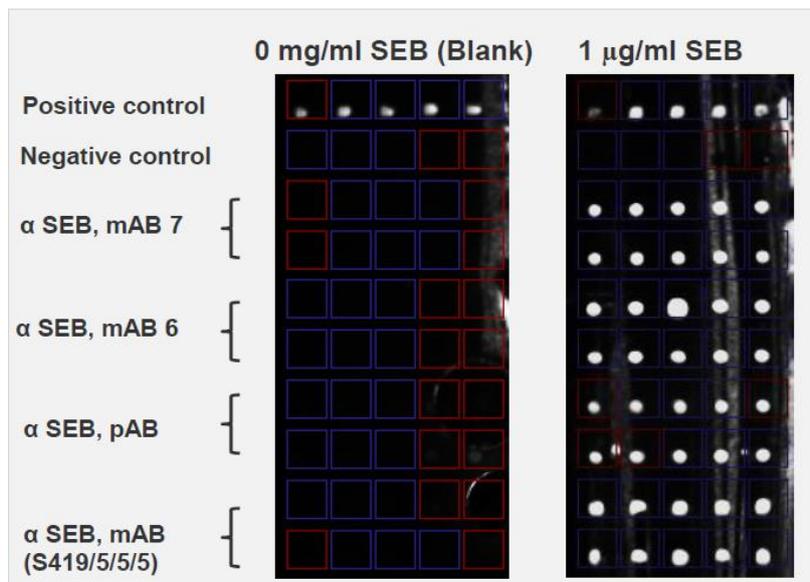


Abbildung 48: Nachweis von SEB in Milch mit einem auf magnetischen Nanopartikel-Clustern basierten SMIA.

Zusätzlich wurden Milchproben mit verschiedenen Konzentrationen von SEB aufgestockt und gemäß dem optimierten SMIA-Assay auf dem MCR 3 SLT vermessen. Die Abbildung 49 zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einer Nachweisgrenze von 0.76 µg/L. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der Einsatz von magnetischen Nanopartikel-Clustern für einen SMIA auf dem MCR 3 SLT in Lebensmittelmatrix möglich ist.

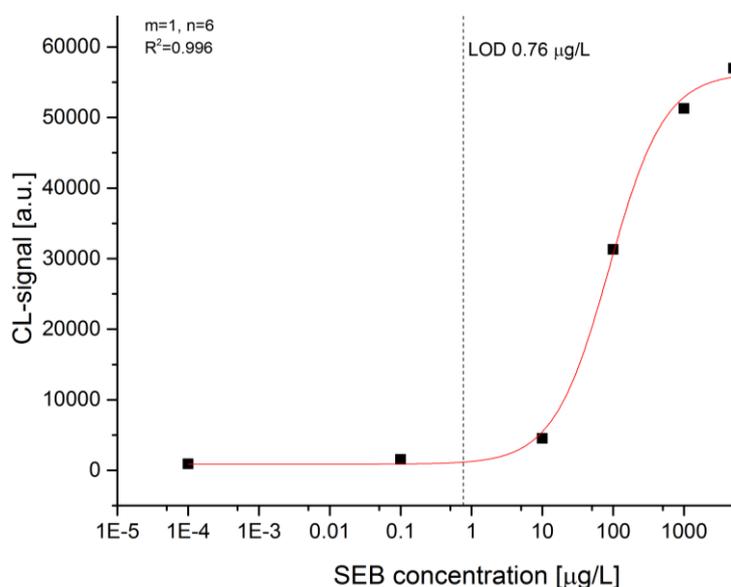


Abbildung 49: Kalibrierkurve für die Detektion von SEB in Milch mit einem auf magnetischen Nanopartikel-Clustern basierten SMIA,  $m=1$ ,  $n=6$ ,  $R^2=0,966$ .

## II.1.6. Literaturverzeichnis:

Agoston, R; Soni, KA; McElhany, K.; Cepeda, ML; Zuckerman, U; Tzipori, S; Mohacsi-Farkas, C; Pillai, SD, Rapid Concentration of Bacillus and Clostridium Spores from Large Volumes of Milk, Using Continuous Flow Centrifugation. *Journal of Food Protection*, 2009,72, 666-668.

Andresen, D; Von Nickisch-Rosenegk, M; Bier, F.F. Helicase dependent On-chip amplification and its use in multiplex pathogen detection. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 403, 244-248.

Arvidsson, P; Plieva, FM; Savina, IN; Lozinsky, VI; Fexby, S; Bulow, L; Galaev, IY; Mattiasson, B, Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 2002, 977, 27-38.

Brewster, JD, Isolation and concentration of Salmonellae with an immunoaffinity column. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55, 287-293.

Dainiak, MB; Plieva, FM; Galaev, IY; Hatti-Kaul, R; Mattiasson, B, Cell chromatography: Separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns. *Biotechnology Progress* 2005, 21, 644-649.

Donhauser, SC; Niessner R; Seidel, M, Quantification of E. coli DNA on a flowthrough chemiluminescence Mikroarray read-out system after PCR Amplification. *Analytical Sciences*, 2009, 25, 669-674.

Donhauser, SC; Niessner, R; Seidel, M, Sensitive quantification of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica, and Campylobacter jejuni by combining stopped polymerase chain reaction with chemiluminescence flow-through DNA Mikroarray analysis. *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 3153-3560.

Elsholz, B; Worl, R; Blohm, L; Albers, J; Feucht, H; Grunwald, T; Jurgen, B; Schweder, T; Hintsche, R; Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical Mikroarrays. *Analytical Chemistry*, 2006, 78, 4794-4802.

Ercolinia, D; Hilla, PJ; Dodd, CER, Development of a fluorescence in situ hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52, 267-271.

Fujikawa H and Shimojima Y, Estimation of viable Salmonella cell numbers in meat and meat product using real-time PCR. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 2008, 49, 261-265.

Gehring, AG; Albin, DM; Bhunia, AK; Reed, SA; Tu, SI; Uknalis, J, Antibody Mikroarray detection of Escherichia coli O157 : H7: Quantification, assay limitations, and capture efficiency. *Analytical Chemistry*, 2006, 78, 6601-6607.

Horak, D; Balonova, L; Mann BF; Plichta, Z; Hernychova, L; Novotny, MV; Stulik, J, Use of magnetic hydrazide-modified polymer microspheres for enrichment of *Francisella tularensis* glycoproteins. *Soft Matter*, 2012, 8, 2775-2786.

Huelseweh, B; Ehricht, R; Marschall, HJ, A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents. *Proteomics*, 2006, 6, 2972-2981.

Jungbauer, A; Hahn, R, Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1184, 62-79.

Karsunke, XYZ; Niessner R; Seidel, M, Development of a multichannel flow-through chemiluminescence Mikroarray chip for parallel calibration and detection of pathogenic bacteria *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395, 1623-1630.

Klein, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, 6, 257-260.

Kloth, K; Niessner, R; Seidel M, An open stand-alone platform for regenerable automated Mikroarrays. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24, 2106-2112.

Magliulo, M; Simoni, P; Guardigli, M; Michelini, E; Luciani, M; Lelli, R; Roda, A, A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157 : H7, *Yersinia enterocolitica*, *salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2007, 55, 4933-4939.

Malorny, B; Tassios PT; Radström, P; Cook, N; Wagner, M; Hoorfar, J, Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83, 39-48.

McKillip, JL; Drake, M, Real-Time Nucleic Acid-Based Detection Methods for Pathogenic Bacteria in Food. *Journal of Food Protection*, 2004, 67, 823-832.

Meyer, C; Fredriksson-Ahomaa, M; Sperner, B; Martlbauer, E, Detection of *Listeria monocytogenes* in pork and beef using the VIDAS (R) LMO2 automated enzyme linked immunoassay method. *Meat Science*, 2011, 88, 594-596.

Pappert, G; Rieger, M; Niessner, R, Seidel, M, Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of *E. coli*. *Microchimica Acta*, 2010, 168, 1-8.

Patel, PD, (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21, 96-115.

Pemov, A; Modi, H; Chandler, DP; Bavykin, S, DNA analys with multiplex Mikroarrayenhanced PCR. *Nucleic Acid Research*, 2005, 33, e11.

Peskoller, C; Niessner, R; Seidel, M, Cross-flow microfiltration system for rapid enrichment of bacteria in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009a, 393, 399-404.

Peskoller, C; Niessner, R; Seidel, M, Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of *Escherichia coli* bacteria. *Journal of Chromatography A*, 2009b, 1216, 3794-3801.

Olsvik, O; Popovic, T; Skjerve, E; Cudjoe, KS; Hornes, E; Ugelstad, J; Uhlen, M, Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 1994, 7, 43-54.

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

Safarik, I and Safarikova, M, Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*, 1999, 722, 33-53.

Stevens, KA; Jaykus, LA, Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, 30, 7-24.

Stewart, LD; McNair, J.; McCallan, L; Thompson, S; Kulakov LA; Grant IR, Production and Evaluation of Antibodies and Phage Display-Derived Peptide Ligands for Immunomagnetic Separation of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50, 1598-1605.

Swaminathan, B; Feng, P, Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annual Review in Microbiology*, 2004, 48, 401-426.

D'Urso, OF; Poltronieri, P.; Marsiglianti, S; Storelli, C.; Hernandez, M; Rodriguez-Lazaro, D, A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiology*, 2009, 26, 311-316.

Walcher, G; Stessl, B; Waghner, M; Eichenseher, F; Loessner, MJ; Hein, I, Evaluation of Paramagnetic Beads Coated with Recombinant *Listeria* Phage Endolysin-Derived Cell-Wall-Binding Domain Proteins for Separation of *Listeria monocytogenes* from Raw Milk in Combination with Culture-Based and Real-Time Polymerase Chain Reaction-Based Quantification. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, 7, 1019-1024.

Wolter, A; Niessner, R; Seidel M, Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flow-through chemiluminescence Mikroarray readout system. *Analytical Chemistry*, 2008, 80, 5854-5863.

Wolter, A; Niessner, R; Seidel M, Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody Mikroarrays. *Analytical Chemistry* 2007, 79, 4529-4537.

## II.1.7. Fazit

Im Teilvorhaben Schnellkonzentrierung und Multiplex-Mikroarray-Analyse von Mikroorganismen und Toxinen der IWC-TUM des Verbundprojektes LEVERA wurden folgende Ziele erreicht (Tabelle 14):

Tabelle 14: Übersicht der vereinbarten Ziele und Ergebnisse im Projektvorhaben.

Vereinbartes Ziel	Ergebnis
Entwicklung eines Immunfiltrationsverfahren zur schnellen Separation und Anreicherung von Bakterien und Toxinen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimierung der Verfahren zur Probenvorbereitung (monolithische Immunoextraktion, immunomagnetische Separation)</li> <li>• Konstruktion und Aufbau einer funktionstüchtigen automatischen monolithischen Immunoextraktionsanlage (auto-MIE)</li> </ul>
Etablierung von schnellen Multiplex-Analyseverfahren für pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Validierung verschiedener Antikörper gegen bakterielle Antigene</li> <li>• Entwicklung von Antikörper-Mikroarrays für pathogene Mikroorganismen und Toxine</li> <li>• Entwicklung eines regenerierbaren SMIA für SEB</li> <li>• Kombination der Probenvorbereitung mit dem Multiplex-Analyseverfahren auf dem MCR 3 SLT</li> </ul>
Optimierung und Validierung, sowie on-site Testung der entwickelten immunchemischen Verfahren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimierung und Validierung der Antikörper-Mikroarrays und der Probenvorbereitung</li> <li>• On-site Testung der entwickelten immunchemischen Verfahren in Lebensmittelmatrix: <ul style="list-style-type: none"> <li>- immunomagnetische Separation</li> <li>- monolithische Immunoextraktion</li> <li>- Antikörper-Mikroarrays</li> </ul> </li> </ul>

## II.2. Zahlenmäßiger Nachweis

Der Verwendungsnachweis für Zuwendungen auf Ausgabenbasis (VZNA) wurde dem Projektträger zusätzlich zur digitalen Version auch in Papierform mit rechtsverbindlicher Unterschrift des Zuwendungsempfängers zugestellt.

In Tabelle 15 sind die einzelnen Positionen im Gesamtfinanzierungsplan dargestellt.

Tabelle 15: Zahlenmäßiger Nachweis.

Alle Beträge in Euro (€)

Position		Entstandene Ausgaben	Gesamtfinanzierungsplan
0812	Personalkosten	260.518,35	258.610,00
0834	Materialkosten	58.388,59	55.830,00
0846	Dienstreisen	4.398,82	7.500,00
0850	Investitionen	162.418,94	162.860,00
<b>Summe</b>		<b>485.724,70</b>	<b>484.800</b>

Bei der IWC-TUM ergab sich ein Finanzierungsdefizit von 924,7 Euro

## II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das durchgeführte Projekt lieferte einen hohen Forschungs- und Entwicklungsbeitrag zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen und Toxinen in Lebensmitteln. Die pathogenen Erreger in Lebensmitteln werden bisher fast ausschließlich mit dem Kultivierungsverfahren identifiziert und quantifiziert. Dieses Verfahren benötigt mehrere Tage bis eine Aussage über Identität und Herkunft des Krankheitserregers gemacht werden kann. Um jedoch die Zeit vom Auftreten einer mikrobiell bedingten Gefahr bis zur Identifizierung des Erregers und auch die Ermittlung der Ausbreitung in der Lebensmittelwarenkette zu verringern, war die Entwicklung einer universell einsetzbaren Schnelldiagnostik und Schnellidentifizierung enorm wichtig. Das anspruchsvolle Thema der Entwicklung solcher Systeme konnte nur im Rahmen eines Verbundprojektes umgesetzt werden. Auch die Realisierung des angestrebten Ziels, ein multiplexfähiges Schnellnachweissystem zur Quantifizierung von diversen pathogenen Mikroorganismen und Toxinen in Lebensmitteln zu untersuchen, war nur in Kooperation mit einem interdisziplinären Team sowie mit Partnern aus Wirtschaft und Forschung möglich. Dadurch konnten verschiedene Methoden und Erfahrungen aus verschiedenen Arbeitsgebieten (wie z.B. die Antikörperproduktion und deren Testung am MCR 3 SLT) getestet und zusammengeführt werden. Die Entwicklung des Schnelldiagnostik- und Schnellidentifizierungssystems konnte nur mit einem sehr hohen Forschungs- und Entwicklungsaufwand durchgeführt werden. Hierzu war die Förderung des Verbundprojektes aus öffentlichen Mitteln essentiell. Der Mehrwert über den Forschungsverbund hinaus könnte in der zukünftigen Anwendung der entwickelten Systeme und Methoden durch den Endnutzer (z.B. spezialisierte Labore für Lebensmittelanalytik und Umweltanalytik) bestehen.

## II.4. Voraussichtlicher Nutzen

Im Rahmen des Projektes konnte ein Gesamtsystem bestehend aus einer automatisierten monolithischen Immunoextraktionsanlage (Auto-MIE) und einem Multiplex-Immunoassay zur schnellen Quantifizierung von relevanten Mikroorganismen und Toxinen aus dem Bereich der Lebensmittelsicherheit auf dem MCR 3 SLT erarbeitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Antikörper-Mikroarrays mit hoher Qualität herzustellen. Zudem steigerte die monolithische Immunoextraktion die Selektivität und Sensitivität.

GWK Präzisionstechnik als Tochterunternehmen von R-Biopharm AG hat das Interesse, die MCR 3-Technologie in den Markt zu bringen. Der Milchprüfing Bayern wendet die Analyseplattform MCR 3 für die Anwendung Antibiotika in Milch in der Routine an. Die MCR 3-Technologie (Gerät und Antikörper-Mikroarray-Chips) wurde im Rahmen des Verbundprojektes durch die Entwicklung von SMIAs zur Identifizierung und Quantifizierung von lebensmittelrelevanten pathogenen Mikroorganismen und Toxinen erweitert. Die von der JLU, Gießen und LMU, München hergestellten monoklonalen und polyklonalen Antikörper waren gut anwendbar für die Antikörper-Mikroarrays am MCR 3 SLT. Mit dem Projektvorhaben LEVERA könnte die Anwendungspalette für Multiplex-Analysen in den nächsten Jahren bei R-Biopharm AG erweitert werden. Die Produktion der Antikörper-Mikroarrays in Kleinstserie sowie der Immunoextraktionsanlage erfolgte zunächst an der IWC-TUM. Die Immunoextraktionsanlage mit den MIF-Säulen kann in Zukunft aber auch bei R-Biopharm AG produziert werden und eventuell als getrenntes Produkt oder in Kombination mit dem MCR 3 SLT vermarktet werden. Der Markt in der mikrobiologischen Lebensmittelsicherheit ist als sehr groß einzuschätzen.

Die einzelnen Verfahren für Aufkonzentrierung und Analyse sind universell einsetzbar und könnten somit auch für andere Anwender von großem Interesse sein. Zum Beispiel ist die Mikroarray-Technologie auch für andere wissenschaftliche Felder wie z.B. Wasseranalytik, klinische Diagnostik und Pharmazie anwendbar und könnte in Zukunft in neue Produkte münden.

Aus wissenschaftlicher Sicht war das BMBF-Verbundprojekt LEVERA sehr erfolgreich. Es konnten Vorträge und Posterbeiträge auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert werden. Im Rahmen des Projektes konnten zahlreiche Master- und Bachelorarbeiten erfolgreich abgeschlossen werden. Aktuell laufen 3 Doktorarbeiten mit Themen aus LEVERA. PD Dr. Seidel konnte in der Zeit der Projektes seine Habilitation mit dem Thema „Chemiluminescence Mikroarrays in Analytical Chemistry“ abschließen.

Die im Projekt erarbeiteten Erfahrungen und Ergebnisse werden zukünftig in weitere nationale und internationale Forschungsprojekte einfließen.

## II.5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit wurden keine wesentlichen Ergebnisse von dritter Seite bekannt, die eine Anpassung von Methoden oder eine geänderte Vorgehensweise erfordert hätten. Unter Berücksichtigung der Fachliteratur wird jedoch deutlich, dass die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden im Bereich der Lebensmittelsicherheit in den letzten Jahren vorangetrieben wurde. Hinsichtlich des Einsatzes von schnellen Antikörper-basierten Methoden zur Schnellidentifizierung- und Schnelldiagnostik von lebensmittelrelevanten Pathogenen besteht zweifellos weiterer Forschungs- und Entwicklungsbedarf.

## II.6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die gewonnenen Ergebnisse wurden in den Zwischenberichten und im Abschlussbericht ausführlich dargestellt. Das Projekt wurde im Rahmen von nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt. Publikationen sind in international hochrangigen Zeitschriften geplant:

### Veröffentlichungen:

Szkola, A.; Linares E.M.; Worbs, S.; Dorner, B.G.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Niessner, R.; Seidel, M., Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based Mikroarray immunoassay. The Analyst 2014, 139, 5886-5893.

### Vorträge

M. Seidel, Kulturunabhängige Nachweisverfahren für Bakterien und Viren, VAAM Fachgruppensitzung „Qualitätssicherung und Diagnostik“, 20.9.2013, Villingen-Schwenningen.

M. Seidel, Chemilumineszenz-Mikroarrays: Entwicklung einer Mikroarray-Analysenplattform und Anwendungsbeispiele im Bereich Wasser- und Lebensmittelkontrolle, Hochschullehrernachwuchs-Treffen 2015 der DECHEMA und ProcessNet, 19.02.2015, Frankfurt, Deutschland.

M. Seidel, Analytische Mikroarrays: Herausforderungen und Potenzial. 11.-13.3.2015, 9. Deutschen BioSensor Symposium, München.

M. Seidel et al., Magnetische Immunfiltration und Mikroarray-Analyse: Eine geeignete Kombination zur schnellen Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen und Toxinen in Lebensmitteln, ANAKON, 23.-26.03.2015, Graz, Österreich.

M. Seidel, Rapid detection of pathogens by flow-based chemiluminescence Mikroarrays. 26.-30.9.2015, BBMEC 11, Regensburg.

Nistler et al., Magnetic Nanocomposites for Rapid Biosensing in Complex Matrices, BIOSENSORS 2016, 24-27.05.16, Gothenborg, Schweden.

Poster:

M. Adebar et al., Kombination von monolithischer Immunfiltration und ELISA zur schnellen Quantifizierung von *Cronobacter sakazakii* aus Milch, ANAKON, 2015, Graz, Österreich.

M. Adebar et al., Schnelldachweis von pathogenen Bakterien und bakteriellen Toxinen in Lebensmitteln durch ein automatisiertes Chemilumineszenz-Mikroarray-Analysesystem, BioSensor, 2015, München, Deutschland.

Nistler et al., Rapid and Sensitive Detection of Staphylococcal Enterotoxins by Immunomagnetic Separation Inline-Coupled Mikroarray Analysis, BIODEFENSE 2016, München, Deutschland.

Geplante Veröffentlichungen:

Nistler et al., Production and characterization of long-term stable superparamagnetic iron oxide-shell silica-core nanocomposites, Journal of Magnetic Materials and Magnetism, 2017.

Adebar et al., Concentration and detection of *Bacillus cereus* spores in skimmed milk by monolithic immunoextraction.

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung): Schlussbericht	
3. Titel Schnellkonzentrierung und Multiplex-Mikroarray-Analyse von Mikroorganismen und Toxinen		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Seidel, Michael; Nistler, Angelika; Linares, Elisangela; Adebar, Manuela; Sandhu, Maryam; Gega, Alda; Kutschera, Lukas; Niessner, Reinhard		5. Abschlussdatum des Vorhabens 14.07.16
		6. Veröffentlichungsdatum: 15.01.17
		7. Form der Publikation: Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München; Marchioninistraße 17,81377 München		9. Ber. Nr. Durchführende Institution
		10. Förderkennzeichen 13N12613
		11. Seitenzahl des Schlussberichts: 61
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn		13. Literaturangaben: 36
		14. Tabellen: 15
		15. Abbildungen: 49
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung: Die Qualitätskontrolle von Lebensmitteln spielt eine wichtige Rolle für den Gesundheitsschutz der Bevölkerung und die damit verbundene Risikoregulierung. Die pathogenen Mikroorganismen und Toxine kommen nur in geringen Konzentrationen in Lebensmitteln vor, weswegen ein Aufkonzentrierungsverfahren mit dem Detektionsverfahren kombiniert werden muss. Im Rahmen des Projektes LEVERA wurde an der IWC-TUM an einem Schnellaufkonzentrierungsverfahren, der automatisierten monolithischen Immunoextraktion sowie der immunomagnetischen Separation gearbeitet. Es wurde eine automatisierte monolithische Immunoextraktionsanlage (auto-MIE) für die schnelle Separation und Anreicherung von Bakterien und mikrobiellen Toxinen in großen Volumina von Lebensmitteln (z.B. Milch) konstruiert und aufgebaut. Das Schnellaufkonzentrierungsverfahren konnte hierbei direkt mit dem Schnelldetektionsverfahren auf der multiplexfähigen Mikroarray-Plattform MCR 3 SLT kombiniert werden. Hierzu wurden Sandwich-Mikroarray-Immunoassays für lebensmittelrelevante pathogene Erreger auf der Mikroarray-Plattform MCR 3 SLT etabliert. Mit dem Ende des Projektes ist eine schnellere und umfassendere Risikobewertung von pathogenen Mikroorganismen und Toxinen in Lebensmitteln möglich.		
19. Schlagwörter Antikörper-Mikroarrays, Schnellmessverfahren, Schnellaufkonzentrierungsverfahren, mikrobiologische Qualitätssicherung, Lebensmittel, Immunoextraktion, Immunomagnetische Separation		
20. Verlag		21. Preis

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication): Final report	
3. title Rapid concentration and multiplex Mikroarray analysis of microorganisms and toxins		
4. author(s) (family name, first name(s)) Seidel, Michael; Nistler, Angelika; Linares, Elisangela; Adebar, Manuela; Sandhu, Maryam; Gega, Alda; Kutschera, Lukas; Niessner, Reinhard	5. end of project: 07.14.16	
	6. publication date 01.15.17	
	7. form of publication: final report	
8. performing organization(s) (name, address) Institute of Hydrochemistry; Technische Universität München; Marchioninistraße 17,81377 München	9. originator's report no.13N12613	
	10. reference no.	
	11. no. of pages 61	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references: 36	
	14. no. of tables: 15	
	15. no. of figures: 49	
16. supplementary notes		
17. presented at (title, place, date)		
18. abstract The quality control of food is crucial for public health and the corresponding risk management. The pathogenic microorganisms and toxins are only present in food at very low concentrations Hence a rapid concentration method has to be combined with the fast detection. In the LEVERA project, methods for the automated rapid concentrations of toxins and microorganisms (Immunomagnetic separation and monolithic immunoextraction) were established. An automated monolithic immunoextraction device for a rapid separation and concentration of bacteria and microbial toxins in large food volumina was constructed. To combine the rapid concentration method with the detection on the Mikroarray platform MCR 3 SLT several sandwich Mikroarray immunoassays for foodborne pathogens were established. An improved and rapid risk assessment for pathogenic microorganisms and toxins is now possible for food.		
19. keywords Antibody Mikroarrays, food safety, microorganisms and toxins in food, rapid enrichment and detection, immunomagnetic separation, immunoextraction, multiplex Mikroarray analysis		
20. publisher	21. price	