

Immunsystem-to-go: Toll-like Rezeptor-Assay – eine neue Technologieplattform für Next Generation Immunoassays

**gefördert durch das Bundesministerium für
Bildung und Forschung**

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger:	NH DyeAGNOSTICS GmbH
Förderkennzeichen:	031B0818A
Vorhabensbezeichnung:	ITG
Laufzeit:	2019-07-01 bis 2023-04-30
Berichtszeitraum:	2019-07-01 bis 2023-04-30

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

GEFÖRDERT VOM



**Bundesministerium
für Bildung
und Forschung**

TEIL I – Kurzbericht:

Aufgabenstellung und Stand von Wissenschaft und Technik

Zum Schutz der menschlichen Gesundheit ist der schnelle und genaue Nachweis von Mikroorganismen (MO) und ihren Bestandteilen bzw. Rückständen essentiell. Dieses gilt u. a. für die Bereitstellung von keimfreiem Wasser (Trinkwasser, Industrie-, Badegewässer), für die Lebensmittelherstellung, die Pharmaproduktion sowie die Medizintechnik. Vorhandene Nachweissysteme für MO nutzen antikörper- und nukleinsäurebasierte Verfahren sowie die langwierige, selektive mikrobielle Kultivierung. Die bisherigen Nachweismethoden sind: (i) Zeitaufwändig und damit kostenintensiv, (ii) meist indirekt und/oder Antikörper-basiert und damit fehleranfällig, (iii) z.T. in Form vieler Einzelnachweise und (iv) benötigen Expertise und spezielle Laborausstattung.

Anders als bisherige Testsysteme für den Nachweis von Mikroorganismen (MO) und deren Bestandteile basiert *Immunsystem-to-go* erstmalig auf der Verwendung von Rezeptoren des menschlichen angeborenen Immunsystems, den sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR). Damit ist *Immunsystem-to-go* nicht auf den Einsatz sowie das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern oder langwierige Kultivierungen angewiesen.

Im Rahmen des Verbundprojektes ITG sollten TLR-Assays für den Nachweis von MO (Legionellen als erstes Anwendungsbeispiel) basierend auf universellen Liganden (TLR) entwickelt werden, die eine Next-Generation-Technologieplattform zu bestehenden Antikörper-basierten Immunoassays oder mikrobiologischen Methoden darstellen. Diese Next-Generation-Technologieplattform sollte hohe Performance und einfachste Handhabbarkeit für den MO-Nachweis auweisen. Der Fokus lag dabei auf membranbasierten TLR-Assays und soll anhand der marktrelevanten Anwendungen eines Schnellnachweises von Mikroorganismen(gruppen) – Legionellen als erstes Anwendungsbeispiel – im Trinkwasser sowohl in Form eines Streifentests (TLR-Lateral-Flow-Assay, TLR-LFA) als auch in Form eines Durchflusstests (TLR-Flow-Through-Assay, TLR-FTA) bis hin zu validierten Prototypen umgesetzt werden.

Für die Etablierung einer TLR-basierten Technologieplattform bedurfte es daher der Bereitstellung funktioneller TLR seitens des Projektpartners IGB, da der Kauf von kommerziellen TLR in den erforderlichen Mengen das gesamte Projekt nicht mehr finanzierbar machen würde. Dazu wurden

zwei Ansätze verfolgt: A) Herstellung von HEK-Zellen, die an ihrer Oberfläche TLR exprimieren, sowie freie (mobile) TLR nach Überexpression durch den Konsortiumspartner IGB sowie der Aufreinigung in Zusammenarbeit mit NHD. Entsprechende Zelllinien waren bei Projektpartner IGB tw. zu Projektbeginn vorhanden.

Ablauf des Vorhabens:

Die Arbeiten im Vorhaben erfolgten in Kooperation mit der fzmb GmbH Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb), der Senova Gesellschaft für Biowissenschaften und Technik GmbH (SEN) und dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB). Die Arbeiten von NHD umfassten die Arbeitspakete AP 0, AP 1, AP 3, AP 5, AP 9, AP 10, AP 11 und AP 12.

Nach Planung und Konzeption wurden zu Beginn des Vorhabens - parallel zur Generierung rekombinanter TLR durch das IGB - Nachweis- und Aktivitätsassays für TLRs entwickelt. Dies ermöglichte die prozesskontrolle und -optimierung der Herstellung mobiler TLR. Die Etablierung der Assays erfolgte mittels kommerziell erhältlicher TLRs und Modell-Liganden (z.B. inaktivierte E.coli).

Durch den Einsatz kommerziell erhältlicher TLR konnten erste Assay-Komponenten und -aufbauten (Flow Through Assay; FTA) entwickelt werden. Es wurde u.a. eine Markierungschemie für den späteren Fluoreszenz-basierten MO-Nachweis etabliert. TLR zeigten dabei eine hohe Bindungsaffinität zu Pyrogenen (u.a. Bestandteile von MO). Pyrogene sind ubiquitär. Nach Datenlage des IGB (Dr. A. Burger-Kentischer) vor Projektbeginn, können TLR als Fänger genutzt werden, ohne dass es einer besonderen Pyrogen-freien Umgebung bedarf. Unsere Daten mit kommerziell erworbenen TLR in diesem Projekt zeigten, dass einer höheren Konzentration von TLR bedarf, um eine Absättigung der TLR durch ubiquitär vorkommende Pyrogene zu vermeiden. Andernfalls sind keine Bindungsstellen für LPS mehr nutzbar. Leider konnten bis zum Projektende keine rekombinanten und aktiven TLR durch das IGB zur Verfügung gestellt werden.

Die Realisierung aller Projektvorhaben und der späteren Assay-Produktion wäre bei Verwendung kommerziell erhältlicher TLR nicht finanziert gewesen. Weshalb der Projektpartner FZMB einen Ersatz-Liganden identifiziert und initial getestet hat – Polymyxin B (PMB). Die Projektpartner NHD und Senova nutzen nachfolgend und zufriedenstellend PMB als Ersatz von TLR zur Weiterentwicklung der Assay-Plattform. PMB ist günstig in der Beschaffung und hat zudem den Vorteil weitere MO zu detektieren.

Neben der Entwicklung, Testung und Optimierung des FTA erfolgte die prototypische Entwicklung eines Analysegeräts zur Detektion des FTA. Dabei basiert der Nachweis auf Fluoreszenz-markierten Assay-Komponenten. Der Einsatz dieses Analysegeräts ist auch für viele anderen, fluoreszenz-basierte Test möglich.

Nach prototypischer Entwicklung des FTA und es Analysegerätes erfolgte die Validierung des PMB-basierten FTA im Vergleich mit herkömmlichen, langwierigen Legionellen-Tests. Dabei konnten ähnliche Sensitivitäten und Spezifitäten gezeigt werden. Die Produktion einer 0-Serie des FTA und des Analysegeräts wird angestrebt.

Ergebnisse:

Die wichtigsten Ergebnisse sind:

- Charakterisierung von mobilen TLR unter Etablierung diverser Methoden
- Etablierung der Modifikation von Fänger-Molekülen
- Etablierung des Liganden Polymyxin B für die Entwicklung des Lateral Flow Assays bzw. Flow-Through-Assays
- Konstruktion und 3D-Druck von individualisierten FTA- und Analysegerät-Gehäusen und Bauteilen
- Aktivitäts-Assay für TLR4/MD2
- Entwicklung eines Fluoreszenz-basierten Analysegerät
- Entwicklung von Assay-Komponenten, die auch für anderweitige Assays angepasst werden können

Immunsystem-to-go: Toll-like Rezeptor-Assay – eine neue Technologieplattform für Next Generation Immunoassays

**gefördert durch das Bundesministerium für
Bildung und Forschung**

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger:	NH DyeAGNOSTICS GmbH
Förderkennzeichen:	031B0818A
Vorhabensbezeichnung:	ITG
Laufzeit:	2019-07-01 bis 2023-04-30
Berichtszeitraum:	2019-07-01 bis 2023-04-30

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

GEFORDERT VOM



**Bundesministerium
für Bildung
und Forschung**

TEIL II – Eingehende Darstellung:

Anders als bisherige Testsysteme für MO und deren Bestandteile basiert *Immunsystem-to-go* erstmalig auf der Verwendung von Rezeptoren des menschlichen angeborenen Immunsystems, den sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR). Damit ist *Immunsystem-to-go* nicht auf den Einsatz sowie das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern oder langwierige Kultivierungen angewiesen. Die in Säugetieren Anfang der 2000er Jahre entdeckten TLR weisen eine hohe Bindungsaffinität zu evolutionär konservierten Bestandteilen von MO auf (z. B. Lipoproteine, Lipopolysaccharide). So kann ein Typ TLR eine ganze MO-Klasse erkennen, z.B. grampositive oder gramnegative Bakterien. Im Rahmen des Verbundprojektes ITG sollen TLR-Assays für den Nachweis von MO (Legionellen als erstes Anwendungsbeispiel) entwickelt werden, die eine Next-Generation-Technologieplattform zu bestehenden Antikörper-basierten Immunoassays oder mikrobiologischen Methoden darstellen. Diese Next-Generation-Technologieplattform zeichnet sich durch hohe Performance und einfachste Handhabbarkeit für den MO-Nachweis aus. Der Fokus liegt dabei auf membranbasierten TLR-Assays und soll anhand der marktrelevanten Anwendungen eines Schnellnachweises von Mikroorganismen(gruppen) – Legionellen als erstes Anwendungsbeispiel – im Trinkwasser sowohl in Form eines Streifentests (TLR-Lateral-Flow-Assay, TLR-LFA) als auch in Form eines Durchflusstests (TLR-Flow-Through-Assay, TLR-FTA) bis hin zu validierten Prototypen umgesetzt werden.

TLR haben eine hohe Bindungsaffinität zu Pyrogenen zu denen u.a. auch Bestandteile von Mikroorganismen gehören. Pyogene sind ubiquitär. Nach Datenlage des IGB (Dr. A. Burger-Kentischer) vor Projektbeginn, können TLR als Fänger genutzt werden, ohne dass es einer besonderen Pyrogen-freien Umgebung bedarf. Unsere Daten mit kommerziell erworbenen TLR in diesem Projekt zeigen, dass einer höheren Konzentration von TLR bedarf, um eine Absättigung der TLR durch ubiquitär vorkommende Pyogene zu vermeiden. Andernfalls sind keine Bindungsstellen für LPS mehr nutzbar (siehe Abb.1). Für den Proof-of-Concept konnte NHD mit gekauften freien TLR sowohl die Bindung von LPS als auch Gram-negative MOs nachweisen – allerdings in Abhängigkeit zu der Medien-Qualität bzw. Reinheit (vgl. Abb. 1).

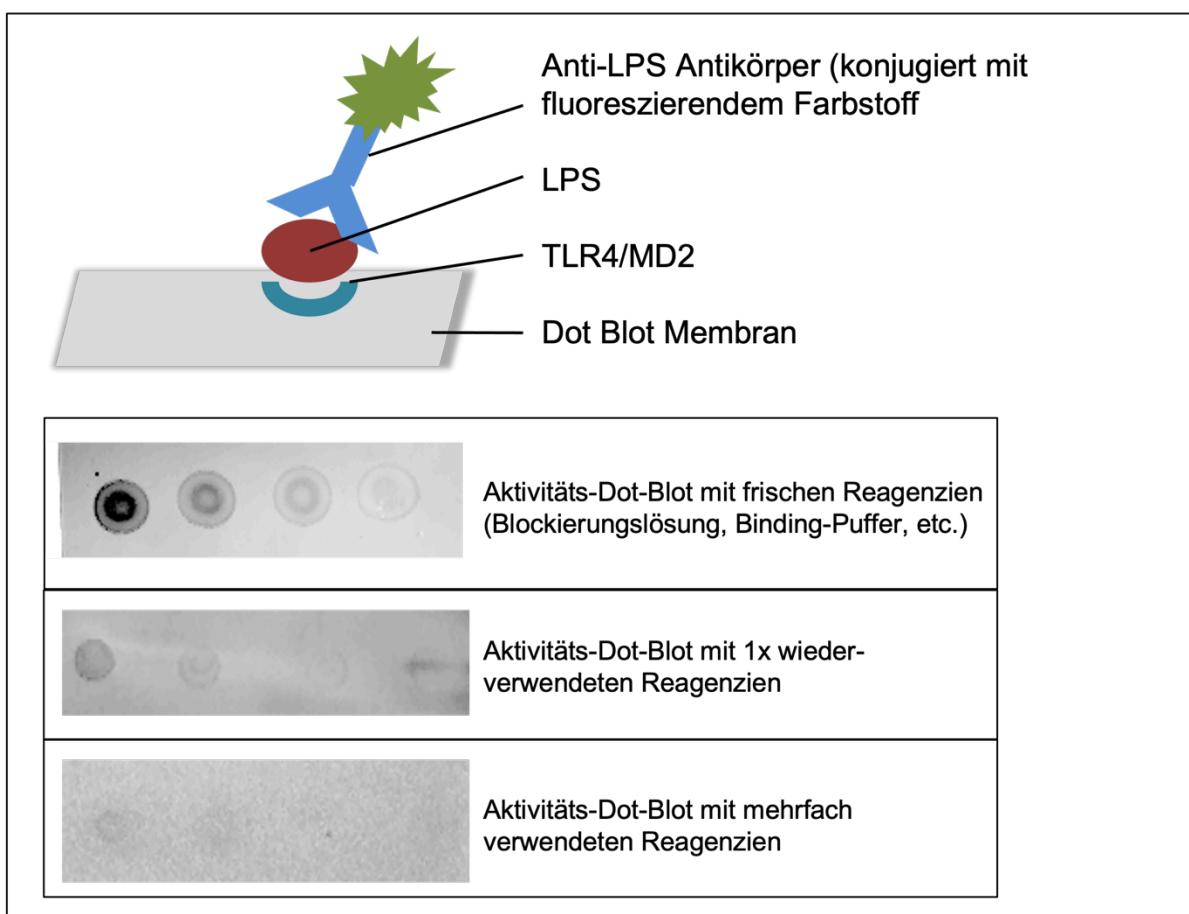


Abb. 1: Aktivitätsnachweis von TLR4 im Dot Blot Format in Abhängigkeit der Reagenzien-Qualität (verschiedene Verdünnungen von TLR4/MD2 verwendet; absteigend von li nach re)

Für die Etablierung einer TLR-basierten Technologieplattform bedarf es daher der Bereitstellung funktioneller TLR seitens des IGB, weil der Kauf von kommerziellen TLR in den erforderlichen Mengen das gesamte Projekt nicht mehr finanziert machen würde. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt: A) Herstellung von HEK-Zellen, die an ihrer Oberfläche TLR exprimieren, sowie freie (mobile) TLR nach Überexpression durch den Konsortiumspartner IGB sowie der Aufreinigung in Zusammenarbeit mit NHD.

Bis dato konnte das IGB allerdings keine mobilen TLR bereitstellen. Betroffen davon sind die Projektpartner Senova, FZMB und NHD. Damit die Technologieplattform dennoch weiter entwickelt und etabliert werden kann, wurde seitens der anderen Konsortiumspartner (NHD, SEN und fzmb) nach einem Protein/ Peptid gesucht, welches als TLR-Alternative eine starke Bindungsaffinität zu LPS hat. Hierzu wurde Polymyxin B (PMB) identifiziert. PMB bindet mit hoher Affinität an LPS und ist somit in der Lage ein breites Spektrum von Gram-negativen Bakterien zu erkennen. Das wurde in der

Vergangenheit bereits für andere antimikrobielle Peptide berichtet, die auch für Versuche mit Streifentests genutzt wurden, jedoch nicht für PMB. Hier gelang der konzentrationsabhängige Nachweis der PMB-Bindung an *E.coli*, LPS und Legionellen im Elisa- und LFA-Format. NHD hat daraufhin PMB in die eigenen Arbeitspakete integriert (siehe einzelne AP). Die Technologieplattform wurde unter Nutzung von PMB weiterentwickelt.

Für die Fluoreszenz-basierte Detektion konnte ein prototypisches Set-up aus Fluorophor und Detektionssystem entwickelt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass es gelingen konnte, ein wasserlösliches Fluorophor mit sehr gutem Signal-to-Noise-Verhalten zu etablieren. Gängige Fluorophore sind hydrophob und nur in organischen (meist toxischen) Lösungsmitteln lösbar. Wenn sich die Haltbarkeitsstudien als erfolgreich zeigen, kann dieses Set-up auch für andere kommerzielle Anwendungen (z.B. fluoreszenzbasierte Lateral Flow Assays) genutzt werden.

AP 0: Projektkoordination und -management

AP1 umfasste die Koordination der Entwicklung im Rahmen des Projektes durch NHD. Projektleiter war Herr Dr. Jan Heise. Er koordinierte die Zusammenarbeit zwischen den Partnern und überwachte den Fortschritt des Projektes. Er war zentraler Ansprechpartner für den Projektträger sowie Organisator der mindestens regelmäßig stattfindenden Status-Meetings (online und Präsenz).

AP 1: Spezifikation und Konzeption

In Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden Anforderungen an die neuartige Plattform definiert sowie die einzelnen Komponenten inklusive Hard- und ggf. Software zur schnellen Identifikation gramnegativer Bakterien wie Salmonellen, Legionellen und Coliforme mittels TLR-4 sowie Identifikation grampositiver Bakterien wie Streptokokken, Staphylokokken und Enterokokken mittels TLR-2 spezifiziert. Dies erforderte die Mitarbeiter aller Projektpartner. Ergebnis ist ein applikatives und technisches Spezifikationsdokument einschließlich der Konzeption der Komponenten, Testsysteme und Demonstratorgerät, unter Berücksichtigung der Grenzwerte der Trinkwasserverordnung sowie weiterer regulatorischer Anforderungen.

Dies umfasste die Spezifikation der biologischen Testsysteme und applikativen Anforderungen, die theoretische Konzeption bzw. Ablauf eines MO-Nachweises basierend auf mobilen TLR im

klassischen Lateral Flow Assay Format (LFA) oder Flow Through Assay im Minisäulenformat (FTA) sowie die Spezifikation der Plattform-Hardware (inkl. Analyse-gerät).

AP 3: Rekombinante Herstellung der TLR (mobile TLR) als Fänger- und Detektormolekül

Ziel war die Bereitstellung von mobilen TLRs als Fänger- und Detektormoleküle unter Etablierung von Produktionszelllinien, welche die TLRs oder deren Bindungsdomäne verstärkt exprimieren und sekretieren.

Die Klonierung und Überexpression mobiler TLR erfolgt durch das IGB. NHD übernahm die Entwicklung einer Reinigungsstrategie für exprimierte TLR unter Berücksichtigung späterer Anwendung im Großmaßstab sowie einen Dot Blot-basierten Aktivitätsnachweises (Monitoring des TLR-Aktivität während der Herstellung; siehe Abb. 1)

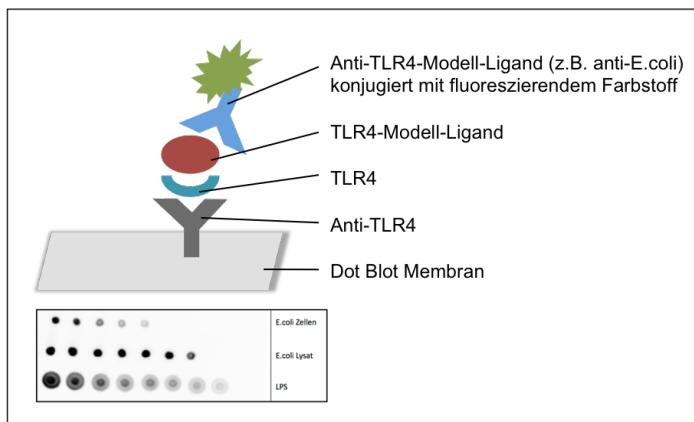


Abb. 1: Aktivitätsnachweis von TLR4 im Dot Blot Format

Parallel zur Überexpression der TLRs erfolgte auch die Überexpression der Proteine MD2 bzw. CD14 (IGB). Die Anwesenheit dieser Proteine ist entscheidend für die Aktivität der TLR (Bindung von MO). Die Reinigungsstrategie der TLRs wurde hinsichtlich paralleler Gewinnung von MD2/CD14 geprüft und geringfügig angepasst. Die von NHD entwickelten Kontrollen zur Beurteilung der Reinigungsschritte hinsichtlich Effizienz und Aktivität umfassten: Western Blot-Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von TLR/MD2/CD14 während der einzelnen Reinigungsschritte sowie TLR4-Aktivitätsnachweis im Dot Blot-Format mit ausgewählten Modell-Liganden. Hierfür wurden verschiedene spezifische Antikörper und Modell-Liganden getestet, charakterisiert und entsprechende Reaktionsbedingungen etabliert (Abb. 2). Zudem erfolgte der Einsatz verschiedener Detergentien und Zusätze, um eine optimale Komplex-Bildung von TLR/MD2 bzw. CD14 zu erreichen

und damit eine ausreichende Aktivität (= Bindung an MO) zu ermöglichen. Ein fluoreszenz-basiertes Nachweis-System wurde ebenfalls entwickelt.

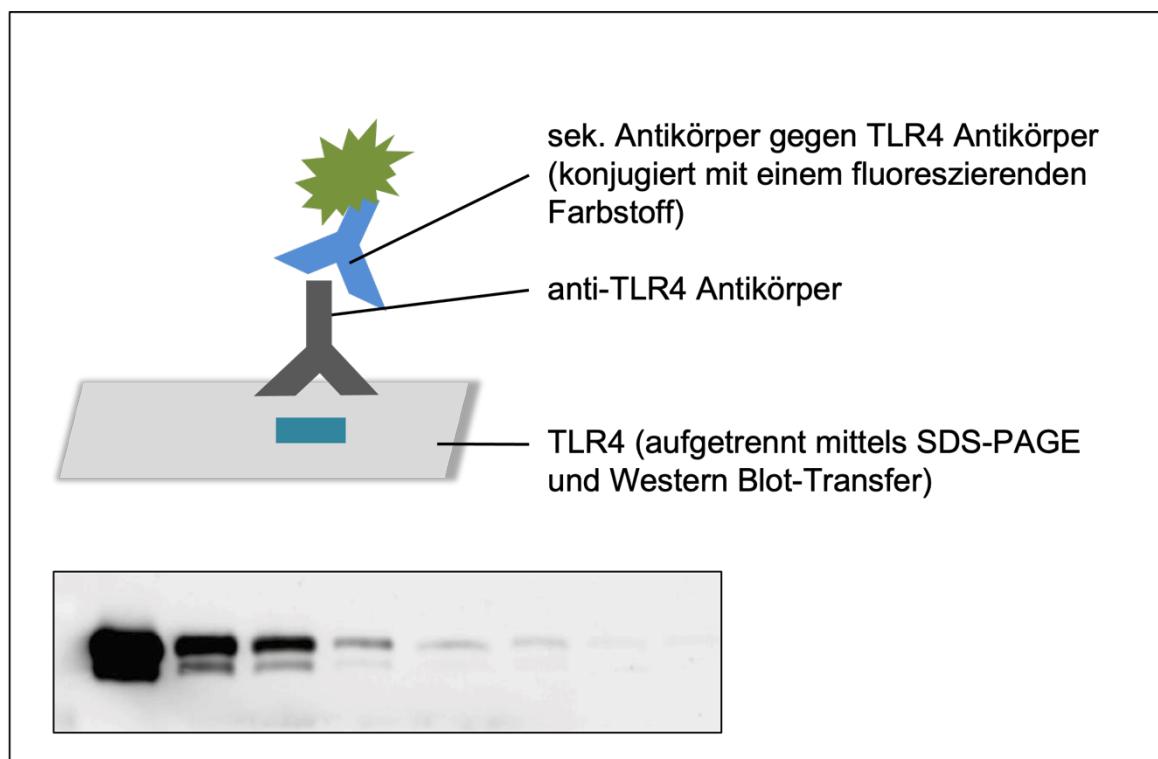


Abb. 2: Western Blot zur Charakterisierung/Selektion von TLR Antikörpern (verschiedene Verdünnungen von TLR4/MD2 verwendet; absteigend von li nach re)

Als TLR-Alternative fungierte Polymyxin B (PMB). Die Bindung von LPS an PMB im DotBlot-Format konnte gezeigt werden (Abb. 3). Ebenso konnten weitere Ergebnisse (ebenfalls bei den Projektpartner FZBM und Senova) aus den TLR-versuchen auf PMB übertragen werden.

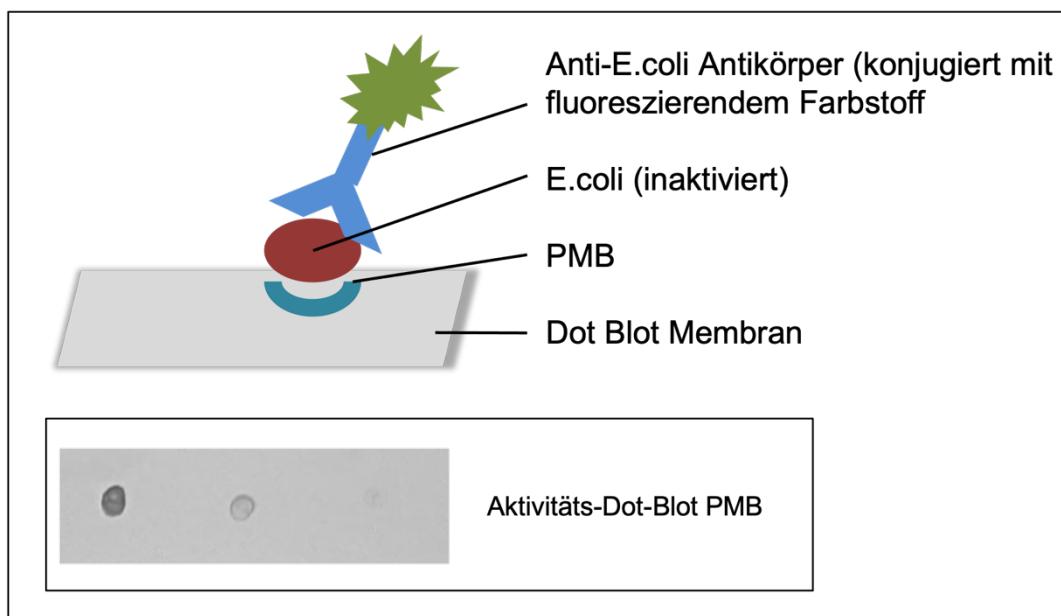


Abb. 3: Aktivitätsnachweis von PMB im Dot Blot Format (verschiedene Verdünnungen von PMB verwendet; absteigend von li nach re)

AP 5: Charakterisierung mobile TLR

Ziel dieses Arbeitspaketes war die Charakterisierung der Bindungsaffinität rekombinant hergestellter TLR als Fänger- und Detektormolekül zum Aufbau von LFA und FTA. Auf die Ergebnisse aus AP3 konnte dabei tw. zurückgegriffen werden. Gemeinsam mit dem FZMB erfolgte die Auswahl und Charakterisierung von Referenz-Antikörpern für die Liganden (z.B. LPS) und für die Detektoren (TLR/MD2/CD14). Diese wurden genutzt zur Etablierung eines ELISA im Mikrotiterplattenformat (FZMB) für den Vergleich des Bindungsaffinität TLR vs. Antikörper. Die Arbeiten erfolgten mit kommerziell erhältlichen TLR4/MD2.

Bis dato konnte das IGB allerdings keine mobilen TLR bereitstellen. NHD hat daraufhin PMB in die eigenen Arbeitspakete integriert (siehe oben). Die Technologieplattform wurde unter Nutzung von PMB weiterentwickelt. Basierend auf diesen theoretischen Erkenntnissen wurden zunächst grundlegende Versuche zur generellen Nutzbarkeit des PMB-Liganden für den geplanten Legionellen Assay durchgeführt. Dazu wurde PMB in unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 50 µg/ml) in Kavitäten einer 96-Well Platte immobilisiert. PBS-Puffer wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation von synthetischem LPS, dass ein Biotin-Label trägt. Die

Detektion erfolgte mit einem Streptavidin-poly-HRP und einem TMB-Substrat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

AP 9: Konjugation der TLR für FTA und Entwicklung eigener Filtersysteme

Ziel dieses Arbeitspaketes war die generierten mobilen TLR mit Fluoreszenzlabeln zu markieren, zu reinigen und auf Funktionalität zu überprüfen. Des Weiteren sollte ein Filter- bzw. Fraktionierungssystem zur Trennung von mobilen TLR-MO-Komplexen und ungebundenen mobile TLR entwickelt werden. Für die Fluoreszenz-basierte Markierung von TLR erfolgte die Auswahl und Anpassung geeigneter Fluoreszenz-Farbstoffe. Die Auswahl erfolgte nach den Kriterien Ladung, Fluoreszenz-Ausbeute, Detektionsbereiche, Stöchiometrie, Preis und Zugänglichkeit. Ein optimaler Farbstoff hinsichtlich max. Quantenausbeute, min. Hintergrund und chemischen Markierungseigenschaften ist ein spezieller wasserlöslicher Farbstoff (normalerweise sind Fluoreszenz-Farbstoff nur in speziellen, meist toxischen Lösungsmittels löslich) mit Spektraleigenschaften Abs: 650 nm/ Em.: 710 nm. Die genaue Struktur des Farbstoffs ist vertraulich. Der Farbstoff trägt bei uns die Bezeichnung G370. Die gute Wasserlöslichkeit des Farbstoff erleichtert die Reinigung der Konjugate (Entfernung von überschüssigen Farbstoff-Molekülen), erniedrigt so weiter den Signal-Hintergrund und erhöht damit die Sensitivität.

Anschließend erfolgte die Optimierung der Markierungschemie hinsichtlich TLR-Aktivität, Dimerisierung, Interaktion mit MD2/CD14 und Löslichkeit. Entscheidend für eine spätere Aktivität der TLR ist die Besetzung der Liganden-Bindestelle des TLR während der Markierung, da eine fluoreszenz-markierte Bindestellen die Aktivität der TLR signifikant beeinflusst. Die Vorversuche erfolgten mit kommerziell erhältlichen TLR4/MD2 (Abb. 3).

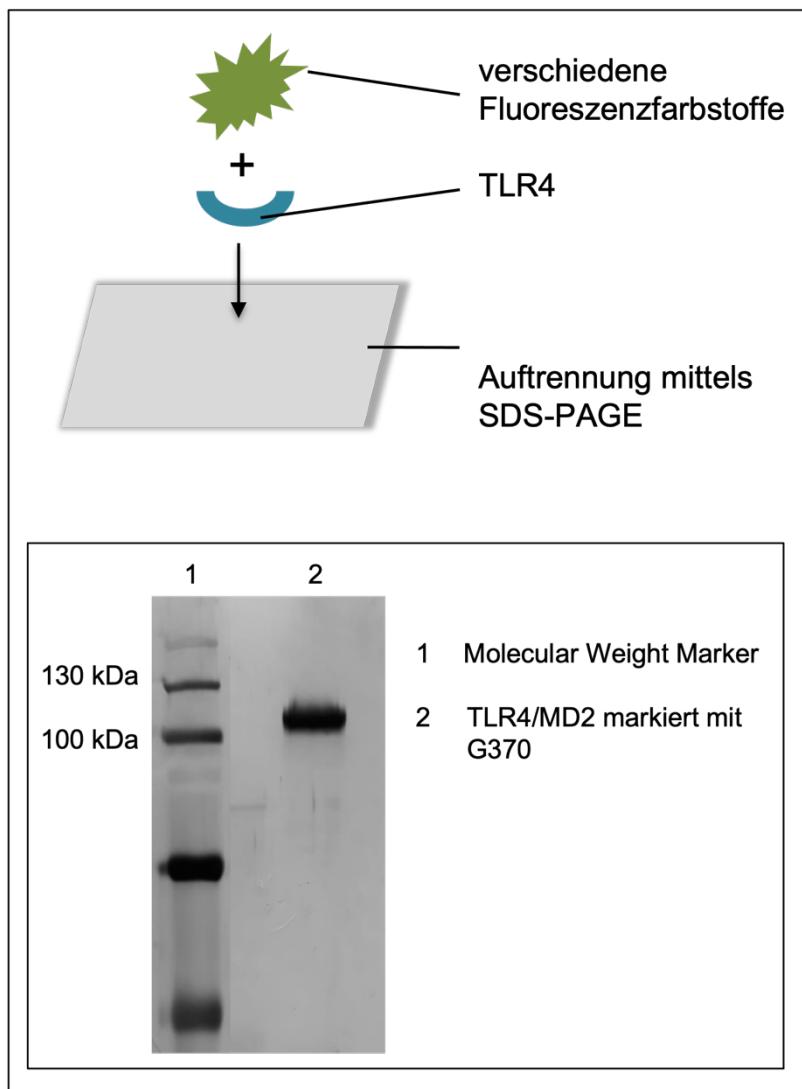


Abb. 4: Bsp. für die Visualisierung von markiertem TLR4

Gemeinsam mit dem FZMB erfolgte die Auswahl geeigneter Modelle für Filtertests. Die Test der Filtermaterialien erfolgte mit *E. coli* (inaktiviert; nicht gentechnisch verändert), deren Größe den später zu untersuchenden Legionellen entspricht. Verschiedene Filtermaterialien wurden hinsichtlich benötigter Porengrößen mit *E. coli* und fluoreszierenden nano-Partikeln getestet. Entscheidend für die spätere Anwendung mit fluoreszenz-markierten TLR war, dass das Filtermaterial keine eigene oder nur geringe Auto-Fluoreszenz aufweist. Je größer die Auto-Fluoreszenz ist, umso weniger sensitiv ist der TLR-Nachweis. Ein geeignetes Filtermaterial stellten Nitrocellulose-basierte Materialien dar (Sartorius CN 140). Für die Einfassungen der Filter wurden verschiedene Kunststoffe, die 3D-verdrückbar sind getestet – auch hier im Hinblick auf die möglichst geringe Autofluoreszenz. Hier zeigte sich Nylon als am besten geeignet. NHD hat prototypisch eine single-FTA-Variante für die gelegentliche Verwendung entwickelt (Abb. 5) und das FZMB eine 96-Well-Variante für den Hochdurchsatz.



Abb. 5: Komponenten für den prototypischen Aufbau des LTA-Filters

AP 10: Spezifische Weiterentwicklung des Analyse-Geräts für FTA

Parallel zu den in AP 9.1 ausgewählten Fluoreszenz-Farbstoffen wurden erste alternative Belichtungssysteme ausgewählt und charakterisiert. 4 verschiedene LEDs (light emitting diode) u.a. hinsichtlich Lichtstärke, Peakwellenlänge und spektraler Bandbreite getestet. Unter Beachtung der spektralen Eigenschaften des korrespondierenden Fluoreszenzfarbstoff (siehe unten) konnte ein spezielles Set aus drei verschiedenen LEDs entwickelt werden, welches einen höheren Energieeintrag (und damit potentiell höhere Sensitivität) ermöglicht als in einem konventionellen Set-up. Ein prototypischer Aufbau ist abgeschlossen. Die neuen Filterspezifikationen unterliegen der Geheimhaltung. Hinsichtlich Compliance wurden anzuwendende Normen und zutreffende Richtlinien identifiziert (Niederspannungsrichtlinie; Produkthaftung; Produktsicherheit) Daraus resultierend wurde für die Entwicklung das begleitende Risikomanagement aufgesetzt. Das Design- und Konstruktions-FMEA wurde fortlaufend durchgeführt).

AP 11: FTA-Entwicklung

Nach Testung der TLR-FTA-Komponenten erfolgte die Entwicklung des Assays und seine fortlaufende Optimierung hinsichtlich praktischer Umsetzbarkeit, Nachweisgrenzen und mglw. notwendigen Proben-Vorbehandlungen. Dies erfolgte zunächst modellhaft anhand von ungefährlichen Bakterienstämmen (z.B. inaktivierte E.coli) und wurde später auf Legionellen (inaktiviert) übertragen werden. Da rekombinante TLR4/MD2 nicht zur Verfügung standen wurden kommerziell erhältliche TLR4/MD2 sowie PMB (als Ersatz). Alle in vorherigen AP ermittelte und definierte Parameter sowie Anforderungen wurden in einen Assay zusammengeführt. Zur Bewertung kam der Prototyp des optischen Analysegeräts zum Einsatz.

Es wurden Protokolle entwickelt für die Herstellung der Test-Hardware (Filtersystem und Analyse-Gerät). Zudem erfolgte die Anfertigung erster Prototypen – Tests und Analyse-Gerät (z.T. mit verfügbaren Fertigkomponenten, z.T. mittels angepasstem 3D-Druck. Im Zusammenspiel Assay und Analyse-Gerät wurde einige marginale Anpassungen vorgenommen. Für die Testung kamen inaktivierte Mos sowie PMB zum Einsatz. Ein Einsatz für die Detektion anderer Fluoreszenz-basierter Assays ist zudem möglich.

AP 12 Validierung und Benchmarking von LFA und FTA mit bestehenden Methoden

Die Validierung und Benchmarking des TLR-basierten FTA (AP 11) wurden direkt nach der erfolgreichen Erarbeitung des FTA gestartet. Hierfür wurden die Leistungsdaten des Assays bestimmt und auch im Hinblick auf Anwendbarkeit mit herkömmlichen Test verglichen. UV-inaktivierte Legionellen, E. coli und S. aureus wurden durch das FZMB generiert und allen Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Die ermittelten Leistungsdaten zeigen eine Sensitivität im Bereich von 10^4 Bakterien (Legionellen/ E.coli). Damit ist der Test vergleichbar mit herkömmlichen Test. Auch der PMB-basierte Assay zeigte eine ähnliche Sensitivität, bietet dabei den Vorteil, dass auch weitere Mos - neben Legionellen - nachgewiesen werden können. Auch die durchgeführten Test für den LFA durch die Partner Senova und fzmb zeigten ebenfalls vergleichbare Ergebnisse.

Assay	Nachweisgrenze	Sensitivität	Spezifität	Multianalytnachweis
FTA PMB	$0,9 \cdot 10^4$ Zellen/ml	96,4%	100%	E. coli, weitere möglich
Kommerzieller Hydrosense Test	$1,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml	94,70%	98,18%	keine weiteren gram-negativen Bakterien nachweisbar

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

Die Arbeiten von NHD umfassten die Arbeitspakete AP 0, AP 1, AP 3, AP 5, AP 9, AP 10, AP 11 und AP 12. Hierfür wurden Personal- und Materialausgaben getätigt.

Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten:

Die Arbeiten wurden entsprechend Planung durchgeführt. Es handelte sich um sehr aufwendige Entwicklungsarbeiten über den gesamten Projektzeitraum. Es erfolgte nicht nur die Charakterisierung der Liganden TLR/MD2, sondern auch die Entwicklung eines Analysegeräts sowie eines bis dato nicht vorhandenen Flow-Through Assays. Zudem wurde durch das fzmb ein alternativer Liganden eingeführt, um die Arbeiten zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen. Dieser alternative Ligand kam auch in den AP von NHD zum Einsatz.

Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:

Es wurde ein Assay entwickelt, der in der Lage ist eine ganze Mikroorganismen-Gruppe schnell zu detektieren und dabei auf die Verwendung einzelner, spezifischer Bakterien-Antikörper verzichtet. Im Bereich der Trinkwasser-Analytik bietet dies den Vorteil schneller Reaktionen auf mögliche Kontaminationen ohne aufwändige Anzucht- und Kultivierungsprozeduren. Der entwickelte Test zeigt das Potential, erfolgreich zur Bekämpfung und Eindämmung von Infektionskrankheiten beizutragen. Zudem wurde ein Analysegerät und ein neuartiges Assay-Format entwickelt (Flow Trough), das für eine Vielzahl anderer diagnostischer, fluoreszenz-basierter Tests genutzt werden kann.

Während der Durchführung bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

Im Verlauf des Projekts sind keine neuen Produkte oder Technologien zum Nachweis von Legionellen oder anderen gramnegativen Bakterien in Trinkwasserproben bekannt geworden.

Erfolgte oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF:

Es sind keine Veröffentlichungen seitens NHD durchgeführt worden oder in Planung.