

Gefördert durch:



**PTKA**  
**Projektträger Karlsruhe**

im Karlsruher Institut für Technologie



**Verbundprojekt:** RiMaTH - Risikomanagement in der Trinkwasser-Hausinstallation  
- Schnellnachweismethoden für bakterielle Kontaminationen und  
Begleitung von Sanierungsvorhaben –

Teilprojekt 2

**Förderkennzeichen:** FKZ 02WRS1276B

**Zuwendungsempfänger:** Analytik Jena AG, Konrad-Zuse-Str. 1, 07745 Jena (AJ)

**Projektleitung:** Dr.-Ing. Jörg Weber (AJ)

**Koordinator:** PD Dr. Wolfgang Fritzsche (IPHT Jena)

**Projektlaufzeit:** 01.01.2012-30.06.2015

**Berichtszeitraum:** 01.01.2012-30.06.2015

**analytikjena**

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen FKZ 02WRS1276 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor“.

## **Inhalt**

1.	Kurze Darstellung des Projektes .....	3
1.1	Aufgabenstellung .....	4
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde .....	4
1.3	Planung und Ablauf des Projektes.....	5
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn .....	6
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	8
2	Detaillierte Darstellung des Projektes - Projektergebnisse.....	10
2.2	Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises .....	13
2.3	Notwendigkeit der geleisteten Arbeit .....	14
2.4	Verwertbarkeit der Ergebnisse .....	14
2.5	Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens durch andere Stellen.....	14
2.6	Veröffentlichung der Ergebnisse .....	15

**Zur Wahrung berechtigter Interessen der Analytik Jena AG oder Dritter ist zu beachten, dass dieser Bericht vertrauliche Informationen enthält. Diese Informationen sind *kursiv* gekennzeichnet.**

## 1. Kurze Darstellung des Projektes

In den vergangenen Jahren kam es zu einem verstärkten Auftreten von Infektionskrankheiten, welche durch humanpathogene Erreger der Gattungen *Legionella* oder *Pseudomonas* verursacht wurden. Zwei wichtige Vertreter sind hierbei *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die hervorgerufenen Erkrankungen z.B. Legionellose sind zum einen, das im Allgemeinen mildere Pontiac Fieber und zum anderen die teilweise tödlich verlaufende Legionärskrankheit. In den Jahren zwischen 2005 und 2011 lag die durchschnittliche Anzahl dieser beiden Infektionen insgesamt in Deutschland im mittleren dreistelligen Bereich mit einer zunehmenden Tendenz. Diese Fälle verliefen mit einer Letalität von 4,3 bis 8,1 Prozent. In der Europäischen Union (EU) stieg die Infektionsrate an Legionellose in den Jahren 1993 bis 2008 von 4,1 Erkrankungen je einer Million Einwohner auf 11,8. Dieser Umstand führte in der EU zum Überdenken der gängigen Normen und Standards. Die daraus resultierende Novellierung der europäischen beziehungsweise der deutschen Trinkwasserverordnung (Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch) trat am ersten November 2011 in Kraft. Diese beschließt die Testpflicht für alle Warmwasseranlagen ab 400 Liter Speichervolumen und gehört zu den weitreichendsten Änderungen der Trinkwasserverordnung in den vergangenen Jahren.

Um den neuen Anforderungen zu entsprechen und einen immensen Kostenanstieg durch die stark gestiegene Anzahl der Beprobungen zu vermeiden, ist es notwendig, eine schnelle Aussage vor Ort zu einer möglichen Gesundheitsgefährdung durch Pathogene, zu ermöglichen. Die alleinige Bestimmung der Anzahl an Genomkopien in der Probe ist für die Trinkwasseranalytik und für die darauf aufbauende Sanierungsüberwachung jedoch nicht ausreichend. Nur eine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen ermöglicht endgültige Entscheidungen, ob ein Gesundheitsrisiko für die Nutzer der Hauswasserinstallation besteht. Heutzutage gängige Systeme, wie auf Antigenen beruhende, sind nicht oder nur unzureichend in der Lage, lebende von toten Erregern zu unterscheiden und erreichen oftmals nicht die geforderte Nachweisgrenze. Die Verfahren, welche die geforderte Nachweisgrenze realisieren können, sind im Regelfall Zellkulturverfahren. Diese sind aber langwierig und kostenintensiv. Die nach ISO 11731-1 durchgeführte Methode benötigt 14 Tage für eine Aussage zu dem Kontaminationsgrad.

Aus diesem Grund war angestrebt, eine Schnellnachweismethode für die Detektion, Klassifizierung und Aktivitätsanalyse zu entwickeln. Für diesen Zweck ist eine molekularbiologische Methode wie eine Reverse Transkriptase (RT) Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die in ein fluidisches System implementiert und als Kartusche ausgeführt werden kann, angedacht. Diese sind in der Regel als Einwegprodukt ausführbar, für den mobilen Einsatz geeignet und parallelisierbar. Die gestellten Anforderungen an das neue System könnten durch

die Kombination einer chipbasierten RT-PCR mit einem elektrochemischen Array umgesetzt werden. Im System integriert ist eine vorgeschaltete Separation mittels modifizierter Partikel (Beads). Die Separation ist notwendig, da die geringe Keimzahl, das geringe Reaktionsvolumen und das große Probenvolumen, welches für eine repräsentative Probenahme anfällt, ein Problem darstellt.

## **1.1 Aufgabenstellung**

Ziel war es, zu untersuchen, in wie weit es möglich ist, mit den genannten Methoden ein automatisiertes und sensitives System zu erstellen, welches die Anforderungen der Trinkwasserverordnung im vollen Maße erfüllt. Zunächst ist es erforderlich, das Volumen der wässrigen Ausgangslösung der vorliegenden Proben unter Ausschluss der PCR-Inhibitoren einzuengen. Zudem wurden die Methoden für die Quantifizierung der lebensfähigen Erreger implementiert. Zunächst wurden die Verfahren an dem Modellorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*) erprobt und im Anschluss die Ergebnisse auf die Zielorganismen *Legionella pneumophila* und *Pseudomonas aeruginosa* übertragen.

## **1.2 Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde**

Das Projekt „RiMaTH“ wurde durch den Bereich „Life Science“ der AJ realisiert. AJ/Life Science kann im Bereich der molekularen Diagnostik und Analyse auf ein vielfältiges Produktportfolio verweisen. Dieses umfasst je nach Einsatzgebiet und Anwendung sowohl automatisierte Gesamtlösungen als auch Einzellösungen. Hervorzuheben in Bezug auf ihre Bedeutung für das Projekt „RiMaTH“ sind insbesondere die Entwicklungen der AJ/Life Science auf dem Gebiet der mobilen Diagnostik.

Für die im Projekt angestrebte Vor-Ort-Detektion von humanpathogenen Erregern der Gattungen *Legionella* oder *Pseudomonas* waren dabei die Erfahrungen bei der erfolgreichen Entwicklung und Vermarktung des „MobiLab“ von herausragender Bedeutung. Das „MobiLab“ ist als »Labor für unterwegs« anzusehen und ermöglicht eine vollständig dezentrale Nukleinsäureextraktion und den anschließenden Nachweis von verschiedenen relevanten Krankheitserregern. Das System ist so konzipiert, dass es trotz der manuellen Bearbeitung von Teilschritten auch für „Nichtspezialisten“ sehr einfach zu handhaben ist. Die bei der Entwicklung dieses Produktes gewonnenen Erkenntnisse und Erfahrungen wurden von der AJ auch bei der Realisierung des geplanten Lab-on-a-Chip-Systems für den Nachweis von humanpathogenen Erregern der Gattungen *Legionella* oder *Pseudomonas* genutzt.

Die Firmenstrategie der AJ zielt auf die Abbildung der gesamten analytischen Prozesskette, sowie auf die Bereitstellung der jeweils passenden Kitchemie für die durch sie entwickelten Analysemethoden und Geräte. Diesem Anspruch wird die AJ durch eine enge Zusammenarbeit mit ihren darauf spezialisierten Tochterfirmen und ausgewählten Partnerfirmen gerecht.

Im Verlauf von „RiMaTH“ übernahmen deshalb die Tochterunternehmen AJ Innuscreen GmbH (AJI) und die MoldiAx GmbH (MoldiAx) im Unterauftrag der spezialisierte Aufgaben bei der Anpassung der Kitchemie bzw. bei der Bereitstellung von Kulturisolaten der Erreger und Validierung der molekularbiologischen Assays.

### **1.3 Planung und Ablauf des Projektes**

Der Fokus des Projektes „RiMaTH“ lag für die AJ bei der Technologieentwicklung, hierbei letztlich auf Kombination unterschiedlicher molekularbiologischer Nachweisverfahren in einen Gesamtsystem. Dabei wurde auf die Expertise der Institute aus den Bereichen der Grundlagenforschung und der angewandten Forschung zurückgegriffen.

Die Erkenntnisse aus dem Bereich der Grundlagenforschung in der Verantwortung des Leibniz-Instituts für Photonische Technologien e.V. Jena (IPHT) und der BioSolutions Halle GmbH betrafen v.a. die Entwicklung des PCR/Array-Chipsystem bzw. die Entwicklung neuer Gensonden, Primersets für den Nachweis von humanpathogenen Erreger der Gattungen Legionella oder Pseudomonas. Das Gesamtprojekt wurde durch das IPHT Jena, Abteilung Nanobiophotonik koordiniert.

Da die Planung der Projekte in den Vorhabensteilbeschreibungen vorliegt, wird hier auf eine umfangreiche Darstellung verzichtet.

Abgeleitet aus den Zielen des Projektes ergab sich der folgende Arbeitsplan. Dargestellt sind ausschließlich Arbeitspakete unter Beteiligung der AJ.

## **B. Technologieentwicklung**

### **B1 PCR/Array-Chipsystem**

B1.1 Parameter- und Schnittstellendefinition

B1.2 Realisierung und Testung Modul PCR-Chip

B1.3 Realisierung und Testung Modul Microarray

B1.4 Testung kombinierte PCR mit Microarray mit DNA

B1.7 Aufbau Array-basiertes Labormuster

B1.8 Testung und Validierung des Labormusters

B1.9 Multiplex-Chip-PCR mit Schmelzkurvendetektion

### **B2 On-line Fluoreszenzdetektion (RT)**

B2.1: Parameter- und Schnittstellendefinition

B2.2: Realisierung Multiplex-Auslesung

B2.4 Etablierung und Testung Real-time Detektion

B2.7 Aufbau kombiniertes Labormuster

### C. Kommunikation-/Bildungsmaßnahmen

C1: Risikomanagement

C1.1: Datenkommunikations- und Softwarelösung

C1.1: Evaluierung neuer Technologien und Praxistest

### Meilensteinplanung

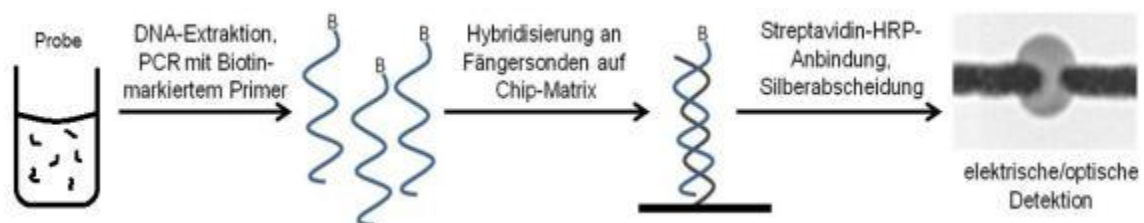
Meilenstein	Zeitpunkt		Bewertungskriterium
M1	18. PM	PCR/Array-Kombination	Aufbau eines Systems und erfolgreiche Durchführung einer DNA-Detektion mittels einer PCR/Array-Kombination
M2	18. PM	Isolierung von Bakterien aus Biofilm	Demonstration und umfassende Charakterisierung der Bakterien
M3	24. PM	DNA-Quantifizierung mittels RT	Demonstration einer DNA-Quantifizierung im Multiplex-Verfahren mittels on-line Fluoreszenzdetektion (RT)

### 1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn

Im Hinblick auf die im Projekt angestrebte Vor-Ort-Detektion von Mikroorganismen kann die AJ auf die erfolgreiche Entwicklung und Vermarktung des „MobiLab“ verweisen. Das „MobiLab“ als »Labor für unterwegs« war eines der ersten Entwicklungen von AJ/Life Science auf dem Gebiet der mobilen, molekularen Diagnostik von Mikroorganismen. Das System ermöglicht eine vollständig dezentrale Nukleinsäureextraktion und den anschließenden Nachweis von verschiedenen relevanten Krankheitserregern auf Basis einer PCR in der Kartusche.

Im Vorhaben sollte eine derartige PCR-Technologie mit einem elektrischen DNA-Chip kombiniert werden. Diese Technologie wurde am IPHT erfunden und in den letzten Jahren innerhalb des IPHT und der InnoProfile Nachwuchsforschungsgruppe „Jenaer BioChip Initiative“ weiterentwickelt. Der Einsatz von Chips für den spezifischen Nachweis von DNA-Sequenzen gewann nicht zuletzt durch die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms 2001 zunehmend an Bedeutung. Für die gezielte Untersuchung bekannter DNA-Abschnitte wurden komplementäre Fängermoleküle auf Trägermaterialien aufgebracht (eng. spotting). Sind die

Fänger-moleküle fluoreszenzmarkiert, so lassen sich komplementäre, ebenfalls fluoreszenzmarkierte Probenabschnitte nach erfolgreicher Hybridisierung über eine Änderung der Fluoreszenz detektieren (Wünschiers et al. 2001). Wurden, wie in Abbildung 1 dargestellt, Biotin-markierte PCR-Produkte für die Hybridisierung auf einer Trägermatrix genutzt, könnten diese anschließend über eine Enzymaktivität detektiert werden (Möller et al. 2005). Über die spezifische Anbindung biotinylierter Ziel-Amplifikate mit ihren komplementären Sequenzen an die Fängersonde wurde das Biotin fixiert und ragt im Anschluss in das Medium. Im nächsten Schritt wurde mit einer Streptavidin-modifizierten-Meerrettichperoxidase-(HRP)-Lösung inkubiert, wobei es zur stärksten nicht-kovalenten Bindung zwischen Streptavidin und Biotin kommt. Die HRP kann nur an Bereichen mit erfolgreicher Sondenhybridisierung gebunden werden. Die anschließende Benetzung der Oberfläche mit einer Silberionen enthaltenden Lösung führt an Stellen, an denen die HRP lokalisiert ist, zu einer Elektronenübertragung. Dabei werden beim Umsatz von  $H_2O_2$  Elektronen frei und auf die Silberionen übertragen. Es kommt zur Abscheidung von elementarem Silber. Das Aufbauen der Silberschicht führt direkt zum Absinken des elektrischen Widerstandes, welcher direkt gemessen und ausgewertet werden kann (Möller et al. 2008). Eine weitere Möglichkeit besteht in der optischen Auswertung der Silberspots über eine Grauwertanalyse.



**Abbildung 1: Prinzip einer Detektion beruhend auf der Verwendung von DNA-Chips.**

Aus der zu untersuchenden Probe wird DNA extrahiert und über Biotin-markierte Primer amplifiziert. Die biotinylierten Amplifikationsprodukte hybridisieren an spezifische Fängersonden auf einem DNA-Chip, an die Biotin-Reste bindet ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase wird elementares Silber abgeschieden, welches optisch oder elektrisch detektiert werden kann.

Zunächst wurde auf der Basis der Expertise des IPHT mit DNA-Chips aus Glas gearbeitet. Dessen Verwendung als Matrixmaterial erfordert jedoch eine aufwendige Vorbehandlung aus Plasmaaktivierung und Silanisierung, um Fängersonden auf dem Material immobilisieren zu können (Möller 2006). Negative Eigenschaften wie die Zerbrechlichkeit und der hohe Preis lassen Glas als Matrix unattraktiv erscheinen. Im Laufe des Projektes wurden die DNA-Chips aus Glas ersetzt. Um die Nachteile zu umgehen und um ein robustes Kartuschensystem für die

angestrebte Untersuchung zu erzeugen, musste nach geeigneten Trägermaterialien gesucht werden. In Zusammenarbeit mit dem IPHT Jena wurde eine neue einfache Bindungschemie entwickelt, um die als Fängersonden verwendeten spezifischen Oligonukleotide auf der Substratoberfläche fixieren zu können. Mit diesem Verfahren war es dann mit geringem technischen Aufwand möglich, ein transportables Auswertemodul für den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen zu entwickeln.

Zu Projektbeginn ungelöst waren zudem Fragen der Probenaufbereitung und zur Adaption der Kitchemie an die Anforderungen der mobilen Detektion. Dabei konnte die Etablierung einer standardisierten Probenaufbereitungsmethode für die Bakterienarten mit Lebend/Tot Diskriminierung aus großen Volumen entwickelt werden.

Die Hauptaufgabe der AJ/Life science war die Zusammenführung aller Teilmodule zu dem jeweiligen Gesamtsystem und die Realisierung von Teillösungen für das Labormuster unter Berücksichtigung der Probenvorbereitung. Im vorliegenden Projekt wurde der Nachweis von humanpathogenen Erregern der Gattungen Legionella oder Pseudomonas adressiert.

## **1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Am Projekt beteiligt waren die folgenden weiteren Partner:

- Umweltbundesamt (UBA) Bad Elster
- Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. Jena (IPHT)
- Biosolution Halle GmbH
- Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena, Institut für Physikalische Chemie

Wesentliche Unterauftragnehmer der AJ:

Analytik Jena Innuscreen GmbH (AJI): mit der Zielsetzung der Unterstützung der AJ bei der Anpassung der Kitchemie an die Erfordernisse der Extraktion und die Anforderungen eines miniaturisierten und automatisierten Lab-on-Chipsystems, der Mitarbeit bei der Konzeption der Probenaufbereitung von humanpathogenen Erreger der Gattungen Legionella oder Pseudomonas aus großen Probenvolumina und der Mitwirkung bei der Erstellung des Standardprotokolls für die Probenaufbereitung sowie des Handbuchs.

Analytik Jena Blomesystem GmbH (AJB): mit dem Ziel der Implementierung der Datenkommunikation/Datensicherheit.

Moldiax GmbH (Moldiax): mit dem Ziel der Validierung des durch die AJ bereitgestellten Lab-on-Chipsystems.



Im Folgenden sind die Aufgaben der einzelnen Projektpartner (AJ – siehe 1.3) detailliert dargelegt. Hervorzuheben ist, dass alle Teilaufgaben in enger Abstimmung der jeweils beteiligten Projektpartner bearbeitet wurden.

### **Umweltbundesamt (UBA): FG Mikrobiologie des Trink- und Badebeckenwassers**

Das Fachgebiet „Mikrobiologie des Trink- und Badebeckenwassers“ bearbeitete neben der Anwendung und Beratung zu Standard-Nachweisverfahren für die mikrobiologische Untersuchung von Wasserproben auch die Entwicklung und Prüfung von neuen Nachweisverfahren, insbesondere mit Untersuchungsmethoden für Krankheitserreger. Nach § 15 Abs. 1 der Trinkwasserverordnung lässt das Umweltbundesamt alternative Untersuchungsmethoden zu; dafür sind umfassende Vergleichsuntersuchungen sowie fundierte Kenntnisse sowohl der Referenzmethoden als auch der alternativen Methoden erforderlich. Mitarbeiter des Fachgebietes sind in die nationale (DIN) und internationale (ISO) Normungsarbeit genauso eingebunden wie in Erprobung und Validierung von molekularbiologischen Pathogennachweisen. Darüber hinaus sind Risikobewertung und Risikomanagement beim Vorkommen von pathogenen Mikroorganismen in Rohwasser, bei der Trinkwasseraufbereitung und Verteilung sowie in der Hausinstallation wichtige Themen, die im UBA Bad Elster im Rahmen mehrerer öffentlicher Beratungsveranstaltungen bearbeitet wurden.

### **Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. Jena (IPHT)**

Das IPHT besitzt umfangreiche technologische und wissenschaftliche Expertise auf den Gebieten der Mikrosystemtechnologie, des Wärmemanagements in Mikrometerstrukturen und der Mikrofluidik. In den letzten Jahren erfolgte die Entwicklung frei kombinierbarer fluidischer Funktionsstrukturen für eine Vielzahl von bioanalytischen Laborprozessen (z.B. DNA-Amplifikation und real-time Detektion, Einzelzell-PCR, Durchfluss-Mikroskopie). Darunter gehört die chipgestützte PCR seit mehr als 10 Jahren zu den Kernthemen der Lab-on-a-Chip-Entwicklung. In verschiedenen Verbundprojekten\* wurde diese Chip-basierte PCR mit einer Chip-basierten Detektion kombiniert und zum Nachweis von Pflanzenpathogenen bzw. Tierseuchen entwickelt. Diese robusten Chip-basierten Methoden sind besonders für den Vor-Ort-Nachweis geeignet und bilden den Ausgangspunkt der Entwicklung im Rahmen dieses Projektes.

\*Projekte:

*Phytochip (Nanobiotechnologische Detektion von Phytophthora-Arten mittels elektrisch auslesbaren DNA-Biochips, Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung FKZ 28-1-42.028-06)*  
*ATLAS (Chipbasiertes Detektionssystem für den Nachweis von Tierseuchen, BMBF FKZ 13N9519)*

### **BioSolutions Halle GmbH (BSH)**

Die BioSolutions Halle GmbH (BSH) ist ein „Fachlabor für molekulare Diagnostik und führt seit mehr als 8 Jahren mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis und zur Identifizierung von Mikroorganismen durch. Diese umfassen medizinische

Vorsorgeuntersuchungen (z.B. Parodontitis-Markerkeimbestimmung), Reinraummonitoring (Identifizierung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen) sowie Wasseranalytik.

Auf die langjährige Erfahrungen auf dem Gebiet der nukleinsäurebasierten Identifizierung von Mikroorganismen, insbesondere in den Bereichen der Entwicklung art- bzw. gattungsspezifischer Oligonukleotidsonden, dem 16S rRNA basierten Nachweis von Bakterien mittels Sandwichhybridisierung sowie der Entwicklung vermarktungsfähiger Produkte zur Identifizierung von Mikroorganismen in der Routinediagnostik wurde zurückgegriffen.

### **Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena: Institut für Physikalische Chemie**

Ein Arbeitsschwerpunkt der Arbeitsgruppe Popp am Institut für Physikalische Chemie, FSU Jena lag bei die Untersuchung von humanpathogenen Erreger der Gattungen Legionella und Pseudomonas mittels unterschiedlicher schwingungsspektroskopischen Methoden. Das Institut brachte seine gute Geräteausstattung für spezifische IR- und NIR-Experimente mit ein.

Es wurde die Identifizierung von Mikroorganismen mittels Raman-Spektroskopie ohne die Notwendigkeit der Kultivierung erforscht. In diesem Gebiet wurde bereits im Rahmen verschiedener Verbundprojekte die Grundlagen geschaffen, um einzelne Mikroorganismen (Bakterien bzw. Hefen) direkt ohne Anreicherung identifizieren zu können. In weiterführenden Projekten konnten Bakterien bzw. Sporen der Risikogruppe 3 erfolgreich aus heterogenen Matrices wie beispielsweise Boden isoliert und mittels Raman-Spektroskopie identifiziert werden. Erste Erfahrungen mit Legionellen konnten im TAB-Projekt QualityScan erzielt werden. Auf diese Expertise konnte bei der Bearbeitung des Projektes zurückgegriffen werden. Der Fokus wurde auf die Untersuchung der Mikroorganismen mittels Raman-Spektroskopie innerhalb von Biofilmen und Amöben gelegt und aus der Vielzahl der Spektren wurde eine Raman-Spektren-Datenbank abgeleitet.

## **2 Detaillierte Darstellung des Projektes - Projektergebnisse**

Die folgende Darstellung der wichtigsten Ergebnisse des Projektes ist im Wesentlichen entsprechend der Hauptarbeitspunkte des Arbeitsplanes gegliedert. Der Übersicht und der verständlichen Darstellung wegen wird nicht speziell in die Unterarbeitspunkte unterteilt. Ergebnisse beruhend auf den Arbeiten der Unterauftragnehmer sind in die Darstellung mit eingebunden.

### **B1 PCR/Array-Chipsystem**

Die Parameterbetrachtungen (B1.1) sind insbesondere im Hinblick auf das angestrebte Gesamtsystem vorgenommen worden, d.h. ausgehend von den Anforderungen der Anwendung wurde dann auf einzelne Funktionseinheiten differenziert und dazu dann die entsprechenden Schnittstellen konkretisiert. *U.a. wurden das zu bearbeitende Volumen jeweils mit mindestens 250 ml und die Anzahl der Detektionsspot mit mindestens 30 Stück festgelegt.*

Für die Realisierung des PCR-Chipmoduls (B1.2) war die Materialauswahl sehr entscheidend. Nach einer Vorauswahl von Materialien wurden spezifische Verträglichkeitstests mit den Auswahlkandidaten durchgeführt. Alle Materialien entsprachen den thermischen Anforderungen für eine Kartschenintegration

Neben den Festlegungen von Arraychip-Gestaltung (B1.3) und Spotanzahl wurden Arbeiten an ersten Testmustern der Chips vorgenommen. Im Zuge dessen sind auch Themen der Anpassung des Nachweisprotokolls und der Reagenzienstabilität betrachtet worden.

Innerhalb des Arbeitspaketes wurden eine Vielzahl von Versuchen zur Amplifikationen mit anschließender Chiphybridisierung durchgeführt.

Im Vordergrund der Arbeiten im Arbeitspaket (B1.4) stand die Betrachtung der Prozesse des Nachweises als kombinierte Plattform aus PCR und Microarray mit DNA. In dem Zusammenhang war die Vorlage der Reagenzien für den notwendigen Hybridisierungsschritt zwischen PCR und Chipdetektion eine entscheidende Aufgabe. In einem geschlossenen System muss dieser Schritt in einer mikrofluidischen Umgebung schnell erfolgen.

Im Vordergrund der Arbeiten zur Testung und Validierung des Labormusters (B1.8) stand hier vor allem die Überarbeitung der Temperatur und Heizprotokolle im ersten Labormuster- Aufbau.

Im Gesamtaufbau konnten entsprechende PCR-Untersuchungen mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt werden. Ziel war es, Real-Time-PCR-Assays im Kartuschenformat laufen zu lassen und durch die Schmelzkurvenanalyse die entsprechende Spezifitätsaussage zu erhalten.

Neben der Untersuchung der Modellsysteme E.coli. und Legionellen wurden Untersuchungen an Pseudomonaden durchgeführt (B 2.8). Hierfür wurden Primer-Paarungen unterschiedlicher Fragmentlänge getestet. Hierbei galt es sicherzustellen, dass der Nachweis von Legionella als auch von Pseudomonas mit dem gleichen Temperaturprofil ablaufen kann. Dies ermöglicht den Nachweis verschiedener Erreger aus einer Probe. Die **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt das Elektrophorese-Gelbild unterschiedlicher Fragmentlängen für weitere Arbeiten wurden die Primerpaarungen Pseudomonaden P1 und Legionella aus der ISO/TS 12869 eingesetzt.

Die erzielten Ergebnisse entsprechen damit im Wesentlichen den zu Projektbeginn definierten Anforderungen. Ein technisches Ziel des Projektes war die Entwicklung von Schnellnachweismethoden zur Detektion, Klassifizierung und Aktivitätsanalyse hygienisch relevanter Mikroorganismen. In Ergänzung zu den Kultivierungsverfahren, erfolgte eine Evaluierung und Implementierung von miniaturisierten (chipbasierten) und damit parallelisierbaren molekularbiologischen Methoden zur Detektion. Die Techniken wurden für einen Nachweis von Legionellen und Pseudomonaden etabliert. Eine Erweiterung auf einen größeren Satz von Erregern wurde vorbereitet. Mit den konzipierten Systemen ist sowohl eine Klassifizierung auf Gattungsebene als auch eine lebend/tot Diskriminierung der Schadkeime über die RNA erreicht worden.

## 2.2 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Position	Gesamtvorkalkulation (€)	Gesamtnachkalkulation €
Material	40.000,00	29.754,82
FE-Fremdleistungen	75.000,00	78.532,80
Personal	669.488,00	695.165,39
Reisekosten	3.400,00	242,44
Sonstige unmittelbare Vorhabenskosten	3.000,00	-
Gesamte Selbstkosten	790.888,00	803.695,45
Bundesanteil	395.444,00	395.444,00
Eigenanteil	395.444,00	408.251,45

Die Abweichungen von den Ansätzen der Gesamtkalkulation halten sich im nach NKBF98 möglichen Rahmen und waren für die erfolgreiche Durchführung des Projektes notwendig.

### **2.3 Notwendigkeit der geleisteten Arbeit**

Die Zuwendung wurde entsprechend der Nebenbestimmungen für Zuwendungen auf Kostenbasis des Bundesministeriums für Bildung und Forschung an Unternehmen der gewerblichen Wirtschaft für Forschungs- und Entwicklungsvorhaben (NKBF 98) sowie der weiteren Nebenbestimmungen und Hinweise zum Zuwendungsbescheid vom 27.10.2011 verwendet. Die Zuwendung wurde ausschließlich zur Erfüllung des Zweckes des Projektes wirtschaftlich und sparsam verwendet.

### **2.4 Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Ein Verwertungsaspekt ist die Erweiterung der Systemplattform ePaTOX II (Abbildung 2) der für DNA-Chip-Nachweise und Bereitstellung von Anwendungsassays für Wasserkeime im Bereich der Real Time PCR.



*Abbildung 2: mobiles Gerätesystem ePaTOX II*

Laufende Untersuchungen mit einer perfect-match Sonde PseuHybC12, welche nach dem Ende des Projektes entstand, zeigen, dass mit dem Verfahren im ePaTOX II einzelne Basenfehlpaarungen artspezifisch diskriminiert werden können.

### **2.5 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens durch andere Stellen**

Im Laufe des Projektes gab es Fortschritte auf dem Gebiet der Festphasenzytometrie als Basis zum automatisierten Auszählen einer Zellkulturplatte durch das Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie GmbH (FZMB). Diese Methode erreicht jedoch nicht die Spezifität bzw. Sensitivität im Vergleich zur DNA Chip Methode. Diese Entwicklung stellt keine Konkurrenz zur Entwicklung innerhalb des Projektes und zur späteren Verwertung dar.

## 2.6 Veröffentlichung der Ergebnisse

### Publikationen

- Biotechnology Advances: Gulshan Singh, Thor Axel Stenström, Surendra Pal Singh, Matthias Urban, Wolfgang Fritzsche, Kostı Tapio, Jussi Toppari, Francesc Xavier Prenafeta Boldú, Sarah Bouhadoun, Chantal Guillard, Nathalie Herlin-Boime and Rishi Shanker Molecular Detection of Bacteria and Decontamination of Water: Current trends and future perspectives, submitted

### Tagungsbeiträge

- DNA-Nanosensors 10.05.2012, Jena: Vortrag - Stefanie Treppner, Eileen Heinrich, Thomas Henkel, Karina Weber, Wolfgang Fritzsche Risk Management In Drinking Water House Installation
- Heiligenstädter Kolloquium 24-26.9.2012, Heiligenstadt: Poster - S. Treppner, E. Heinrich, D. Malsch, M. Urban, W. Fritzsche, T. Henkel Real-time Detektion von pathogenen Mikroorganismen aus Trinkwasserproben; J. Jatschka, T. Schneider, O. Stranik, W. Fritzsche Optische Biosensoren auf der Basis von plasmonischen Nanopartikeln
- Workshop "DNA-based microbial sensing in biotechnology" 16.-18.9.2013, Barcelona: Poster - M.Knoll, M.Urban, M.Thiele, J.Dieckmann, B.König, L.Fritzsche, W.Fritzsche Portable device for reaction and detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of DNA with smart phone application to indentify Legionella pneumophila
- SPIE Biosensors 5.-9.5.2014, Baltimore: Jacqueline Jatschka, Ondrej Stranik, André Dathe, Andrea Csáki, Wolfgang Fritzsche Comparison of plasmonic bioanalytical sensing platforms based on thin metallic layer, nanoparticles layer or single nanoparticles
- Heiligenstädter Kolloquium 24-26.9.2014, Heiligenstadt: Vortrag - C. Reuter, Dr. A. Csáki, M. Knoll, S. Hentschel, E. Heinrich, Dr. D. Malsch, M. Urban, Dr. A. Breitenstein, Dr. T. Henkel, Dr. W. Fritzsche Schnelle Nachweissysteme von Legionellen aus Wasserproben mittels DNA Amplifikation
- Heiligenstädter Kolloquium 22-24.9.2014, Heiligenstadt: Tagungsbandbeitrag - C. Reuter, A. Csáki, M. Knoll, S. Hentschel, E. Heinrich, D. Malsch, M. Urban, A. Breitenstein, T. Henkel, W. Fritzsche Schnelle Nachweissysteme für Legionellen aus Wasserproben mittels DNA Amplifikation
- Deutsche Biosensor Tagung, 10.-13.3.2013, Wildau: Vortrag - J. Jatschka Nachweis von enzymatischer Aktivität durch plasmonische Nanopartikel
- Deutsche Biosensor Tagung 11.-13. 3.2015 München: Vortrag - J. Jatschka, O. Stranik, C. Reuter, S. Treppner, A. Csáki, W. Fritzsche Echtzeit-Nachweis von DNA (Legionella) durch plasmonisch aktive Nanopartikel
- Molecular Plasmonics, 17-19.5.2015, Jena: Jacqueline Jatschka, Stefanie Hentschel, Ondrej Stranik, André Dathe, David Zopf, Andrea Csáki, Wolfgang Fritzsche Real-Time DNA Detection on a Plasmonic Nanoparticle Spot

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) <b>Schlussbericht</b>
3. Titel <b>RiMaTH - Risikomanagement in der Trinkwasser-Hausinstallation - Schnellnachweismethoden für bakterielle Kontaminationen und Begleitung von Sanierungsvorhaben –</b>  <b>Teilprojekt 2</b>	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]  <b>Dr. Jörg Weber Dr. Ute Stündl M.Sc. Martin Hentschel</b>	5. Abschlussdatum des Vorhabens <b>30.06.2015</b>
	6. Veröffentlichungsdatum <b>-keine Veröffentlichung-</b>
	7. Form der Publikation
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)  <b>Analytik Jena AG Konrad-Zuse-Str.1 07745 Jena</b>	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen <b>02WRS1276B</b>
	11. Seitenzahl <b>29</b>
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  <b>Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn</b>	13. Literaturangaben
	14. Tabellen <b>1</b>
	15. Abbildungen <b>27</b>
16. Zusätzliche Angaben <b>Zur Wahrung berechtigter Interessen der Analytik Jena AG oder Dritter ist zu beachten, dass dieser Bericht vertrauliche Informationen enthält und nicht veröffentlicht werden darf</b>	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)  <b>PTKA-WTE   KIT-Außenstelle Dresden   Jena den 12.01.2016</b>	
18. Kurzfassung 1. Zum Projektbeginn stand kein kommerziell verfügbares System zur Verfügung, welches eine schnelle Nachweismethode und Aktivitätsanalyse von hygienisch relevanten Mikroorganismen ermöglicht. 2. Inhalt des Projektes war deshalb die Entwicklung eines technischen Konzeptes, welches eine mobile und zeitoptimierte Nachweismethode zur Detektion, Klassifizierung und Aktivitätsanalyse hygienisch relevanter Mikroorganismen wie <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ermöglicht. 3 +4. Für die Gewährleistung des Lebendnachweises sind zwei Methoden etabliert. Ein DNA-Nachweis unter Ausschluss der freien DNA und ein auf RNA basierendes Verfahren mit anschließender Quantifizierung mittels einer qPCR. Diese Methoden sollten im Verlauf des Projektes genutzt werden und eine Klassifizierung der Erreger durch die Verwendung eines elektrischen Chiparrays ermöglicht werden. Aufbauend auf den gewonnenen Erfahrungen ist ein Gerätekonzept, welches alle relevanten Prozessabschnitte in sich vereinigt, entwickelt worden. 5. Im Projektverlauf konnten alle wesentlichen Projektziele erreicht werden. Die Analytik Jena wird die erhaltenen Ergebnisse auf ihre kommerzielle Verwertbarkeit prüfen und für die Erweiterung ihres Produktportfolios im Bereich der Kits und Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen nutzen.	
19. Schlagwörter <b>hygienisch relevanter Mikroorganismen, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Pseudomonas aeruginos</i></b>	
20. Verlag	21. Preis



## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) final report
3. title RiMaTH – Risk management in drinking water house installation – rapid detection method for contamination with bacteria and backing of refurbishment work	
4. author(s) (family name, first name(s))  <b>Dr. Jörg Weber</b> <b>Dr. Ute Stündl</b> <b>M.Sc. Martin Hentschel</b>	5. end of project <b>30.06.2015</b>
	6. publication date <b>-no publication-</b>
	7. form of publication
8. performing organization(s) (name, address)  <b>Analytik Jena AG</b> <b>Konrad-Zuse-Str.1</b> <b>07745 Jena</b>	9. originator's report no.
	10. reference no. <b>02WRS1276B</b>
	11. no. of pages <b>29</b>
12. sponsoring agency (name, address)  <b>Bundesministerium für</b> <b>Bildung und Forschung (BMBF)</b> <b>53170 Bonn</b>	13. no. of references
	14. no. of tables <b>1</b>
	15. no. of figures <b>27</b>
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)  PTKA-WTE   KIT-Außenstelle Dresden   Jena 12.01.2016	
18. abstract <b>1. For rapid detection and activity analysis of hygienic relevant microorganisms, there was no commercial available system at the beginning of the project.</b> <b>2. The development of a technical concept for a time-optimized method for detection, classification und activity analysis of hygienic relevant microorganisms like <i>Legionelle pneumophila</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> was the purpose of the project.</b> <b>3 + 4. Two methods are established to guarantee the detection of living cells. A DNA-assay excluding free DNA and RNA-assay with afterwards quantification performed by qPCR. During the project these methods should be used. Furthermore these methods should enable the classification of pathogens with an electrochemical chip-array.</b> <b>The development of the device concept which combines all relevant sections of the process was based on the gained experiences.</b> <b>5. All essential purposes of the project were achieved during the operational time. Analytik Jena will review all achieved results in respect of their commercial usability. Furthermore Analytik Jena will use the results to expand their product portfolio of kits und methods for the detection of microorganisms.</b>	
19. keywords <b>hygienic relevant mikroorganismen, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Pseudomonas aeruginos</i></b>	
20. publisher	21. price