

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtblauer

**Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper
zum Nachweis von *Cronobacter* spp.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ina Kleinstieber

aus Friedrichroda

München 2015

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Karin Schwaiger

Tag der Promotion: 31.01.2015

Dem Unergründlichen

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM.....	3
2.1 Taxonomie und biochemische Eigenschaften von <i>Cronobacter</i>	3
2.2 Vorkommen und Verbreitung von <i>Cronobacter</i>.....	5
2.3 Erkrankungen.....	6
2.4 Pathogenitätsmechanismen von <i>Cronobacter</i>	8
2.4.1 Toxine/Enzyme	8
2.4.2 Adhäsion und Invasion.....	10
2.5 <i>Cronobacter</i>-spezifische Zellwandantigene	12
2.6 Nachweisverfahren für <i>Cronobacter</i>.....	17
2.6.1 Klassische mikrobiologische Verfahren.....	17
2.6.2 Apparative Verfahren.....	17
2.6.3 Antikörper-basierte Verfahren	19
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3.1 Material	21
3.1.1 Chemikalien und Biochemika	21
3.1.2 Bakterienstämme	22
3.1.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien	25
3.1.4 Weitere Materialien.....	27
3.1.5 Geräte	29
3.1.6 Software	30
3.2 Methodik	31
3.2.1 Bradford-Bestimmung.....	31
3.2.2 Enzymimmuntest (EIA)	31
3.2.3 Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung.....	32
3.2.4 2-D-Elektrophorese	32
3.2.5 Generierung von Hybridomzelllinien.....	33
3.2.6 Immunoblot	33
3.2.7 Immunfluoreszenz.....	34

3.2.8 Präparation und Detektion von Lipopolysacchariden	35
3.2.8.1 Isolierung von Lipopolysacchariden	35
3.2.8.2 Silberfärbung.....	36
3.2.8.3 Immunoblot	36
3.3 Ergebnisse	37
3.3.1 Präparation des Immunisierungsmaterials	37
3.3.1.1 Empfindlichkeit verschiedener Bakterienstämme gegenüber Polymyxin B	39
3.3.2 Immunogen-Herstellung.....	43
3.3.3 Immunisierung	44
3.3.4 Etablierung von Enzymimmuntests	45
3.3.4.1 Herstellung von Antigen-Präparationen	45
3.3.4.2 Stabilitätstest	46
3.3.5 Kontrolle des Immunisierungserfolges.....	48
3.3.6 Etablierung und Produktivität von Hybridom-Zelllinien	53
3.3.7 Charakterisierung der Antikörper.....	55
3.3.7.1 Bestimmung der relativen Affinität der mAK gegen <i>Cronobacter</i> spp.....	55
3.3.7.1.1 Monoklonale Antikörper gegen <i>Cronobacter</i> spp.-Ghosts - mAK α G.....	55
3.3.7.1.2 Monoklonale Antikörper gegen <i>Cronobacter</i> spp.-Lysate - mAK α L.....	61
3.3.7.1.3 Nachweisempfindlichkeit der indirekten EIAs	68
3.3.7.2 Inter-Genus-Spezifität der monoklonalen Antikörper.....	70
3.3.7.3 Epitop-Spezifität.....	73
3.3.7.3.1 Immunoblots mit mAK α G	75
3.3.7.3.2 Immunoblots mit mAK α L.....	76
3.3.7.4 Immunfluoreszenz-Untersuchungen	84
3.3.7.4.1 Monoklonale Antikörper gegen <i>Cronobacter</i> spp.-Ghosts - mAK α G.....	84
3.3.7.4.2 Monoklonale Antikörper gegen <i>Cronobacter</i> spp.-Lysate - mAK α L.....	85
4. DISKUSSION	87
4.1 Entwicklung von Antikörpern	87
4.2 Charakterisierung der Antikörper	90
4.3 Testverfahren.....	93
4.4 Ausblick.....	95
5. Zusammenfassung.....	96

5 . SUMMARY.....	97
6. LITERATURVERZEICHNIS	98
DANKSAGUNG	110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ATCC	Präfix der Stammsammlung der American Type Culture Collection
DSMZ	Präfix der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzyme immuno assay (Enzymimmuntest)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Glc	Glucose
IEF	Isoelektrische Fokussierung
iFA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KbE	Koloniebildende Einheiten
Kdo	Ketodesoxyoctonsäure
LB	Luria-Bertani-Medium
Leg	Legionaminsäure
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spektrometry (matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion)
MHI	Präfix der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der LMU München
mAK	Monoklonaler Antikörper
NBT/BCIP	Substratlösung für Präzipitations-Immunblots
NWG	Nachweisgrenze
Omp	Outer membrane Protein
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
p.a.	Pro analysis
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PIF	Powdered infant formula

Abkürzungsverzeichnis

PK	Proteinase K
Qui	Quinovose
Rha	Rhamnose
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelektrophorese
TBS	Tris Buffered Saline
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
WHO	World Health Organisation
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1. EINLEITUNG

Cronobacter spp. sind opportunistische Erreger, die mit seltenen, aber drastisch verlaufenden Infektionen in Verbindung gebracht werden (Lai et al., 2001). Innerhalb der Gattung *Cronobacter* werden sieben Spezies auf Basis von biochemischen Eigenschaften und DNA-Verwandschaften unterschieden (Iversen et. al., 2007 und 2008; Joseph et al. 2012a). Erkrankungsfälle werden vor allem mit Stämmen der Spezies *C. sakazakii* aber auch *C. turicensis* und *C. malonicus* in Verbindung gebracht (Holy & Forsythe, 2003; Stephan et al., 2011). Von Infektionen mit *Cronobacter* spp. waren insbesondere Säuglinge betroffen, die im Rahmen eines Klinikaufenthaltes mit kontaminiertem, rekonstituierter und falsch gelagerter Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (powdered infant formula, PIF) versorgt wurden (Simmons et al., 1989; Biering et al., 1989; Noriega et al., 1990; Chap et al., 2009). Vereinzelt wurden auch schwere Erkrankungsverläufe bei immunsupprimierten Erwachsenen beobachtet (Lai et al., 2001), die weniger mit PIF als vielmehr mit einem ubiquitären Vorkommen der Erreger (Jaradat et al., 2009) in Verbindung zu stehen scheinen. Die Infektionen manifestieren sich u. a. in schweren Meningitiden, nekrotisierenden Enterocolitiden oder Septikämien mit meist letalem Ausgang. Im Falle eines Überlebens bleiben schwere neurologische Schäden beim Patienten zurück (Willis & Robinson, 1988; Biering et al., 1989; Lai et al., 2001).

Es besteht daher ein großes Interesse sowohl an einer detaillierten Charakterisierung der Pathogenitätsmechanismen, die zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt sind, als auch an einfachen kostengünstigen Nachweissystemen, die in der Praxis einen schnellen und sicheren Nachweis pathogener *Cronobacter*-Stämme gewährleisten können.

Ziel dieser Arbeit war es, monoklonale Antikörper (mAK) gegen *Cronobacter* spp. zu generieren und diese umfassend zu charakterisieren. Damit sollte die Grundlage dafür geschaffen werden, einerseits hochempfindliche, spezifische, einfach handhabbare und Vor-Ort einsetzbare immunchemische Nachweisverfahren zu etablieren, mit denen die Analysedauer im Vergleich zu den klassischen mikrobiologischen Verfahren deutlich verkürzt werden kann. Andererseits stellen hochaffine und gut charakterisierte mAK effiziente Werkzeuge dar, mit denen wertvolle Erkenntnisse zu Pathogenitätsmechanismen von *Cronobacter* spp. gewonnen werden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß §10a des Tierschutzgesetzes mit dem Vorhaben „Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von Cronobacter spp.“ angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54.2532.6-2-12 genehmigt.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Taxonomie und biochemische Eigenschaften von *Cronobacter*

Bei der Gattung *Cronobacter* handelt es sich um gramnegative, mesophile, motile und peritrich begeißelte Stäbchenbakterien mit einer Größe von etwa $3 \times 1 \mu\text{m}$, die nicht zur Sporenbildung befähigt sind (Farmer et al., 1980). Erstmals beschrieben wurden diese Keime in Zusammenhang mit dem Auftreten von Meningitis-Fällen im Jahr 1961. Die Klassifizierung erfolgte zunächst als gelb-pigmentierter *Enterobacter cloacae* (Urmeyi & Franklin, 1961). Auf Basis von Untersuchungen der DNA-Zusammensetzung, Pigmentierung und von biochemischen Besonderheiten wurden 1980 die Keime als *Enterobacter sakazakii* klassifiziert (Farmer et al., 1980). In dieser Studie wurde mittels DNA-DNA-Hybridisierung festgestellt, dass nur 31-54% Verwandtschaft zu *Enterobacter cloacae* besteht, die einzelnen Stämme der neuen Spezies hingegen 83-91% Übereinstimmungen untereinander zeigten. Als Ergebnis weiterer biochemischer Untersuchungen sowie Untersuchungen des Erbgutes wurde 2007 die Gattung *Cronobacter* mit sechs verschiedenen Spezies (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. dublinensis* und *C. genomospecies 1*) vorgeschlagen (Iversen et al., 2007a und 2008). Im Jahr 2011 wurde eine weitere Spezies (*C. condimenti*) beschrieben sowie eine Umbenennung der Spezies *C. genomospecies 1* in *C. universalis* vorgenommen (Joseph et al., 2012a). Auf Basis weiterführender 2013 veröffentlichter DNA-Sequenzanalysen wurde postuliert, dass die drei nicht pathogenen *Enterobacter*-Spezies *E. pulveris*, *E. helveticus* und *E. turicensis* ebenfalls in die Gattung *Cronobacter* einzubeziehen sind (*C. pulveris*, *C. helveticus*, *C. zurichensis*) (Brady et al. 2013; Masood et al., 2013). Für eine eindeutige Zuordnung zum Genus ist die Datenlage jedoch zu unsicher (Jaradat et al., 2014), so dass sich die derzeit aktuelle taxonomische Klassifizierung entsprechend Tabelle 1 darstellt.

Für *Cronobacter* spp. werden in Kultur auf Trypton-Soja-Agar verschiedene Kolonietypen beobachtet, die ineinander übergehen können. Es sind sowohl gefurchte bis gekerbte Kolonieformen zu beobachten, die bei Kontakt mit der Impföse eine gummiartige Konsistenz aufweisen, als auch weiche, glatte Kolonien, die leicht mit der Öse abzutragen sind (Farmer et al., 1980). Als Kohlenstoffquelle genügt *Cronobacter* spp. Glucose und Citrat. Die Notwendigkeit der Zufuhr von Vitaminen, Aminosäuren und anderen Wachstumsfaktoren besteht nicht. *Cronobacter* spp. sind fakultativ anaerob (Iversen et al., 2007a), einige Stämme

besitzen thermoresistente Eigenschaften (Williams et al., 2005).

Tabelle 1: Taxonomische Klassifizierung von *Cronobacter* spp.

TAXON	BEZEICHNUNG
Domäne	Bacteria
Stamm	Proteobacteria
Klasse – Classis	Gammaproteobacteria
Ordnung – Ordo	Enterobacteriales
Familie - Familia	Enterobacteriaceae
Gattung – Genus	<i>Cronobacter</i>
Art – Species	<i>C. condimenti</i> <i>C. dublinensis</i> <i>C. malonaticus</i> <i>C. muytjensii</i> <i>C. sakazakii</i> <i>C. turicensis</i> <i>C. universalis</i> (<i>C. helveticus</i>) (<i>C. pulveris</i>) (<i>C. zurichensis</i>)

Die Befähigung zur Pigmentbildung ist bei Raumtemperatur besonders stark ausgeprägt (optimale Temperatur: 25 °C). Bei Temperaturen um 36-37 °C hingegen ist diese Eigenschaft nicht bei allen Stämmen zu beobachten (Urmeyi & Franklin, 1961; Farmer et al., 1980). Das gelbe Pigment ist unlöslich in Wasser, Ethanol, Chloroform und Ether (Urmeyi & Franklin, 1961) und wurde 2006 von Lehner et al. als Carotinoid identifiziert.

Eine Vielzahl der Stämme von *Cronobacter* spp. zeichnet sich durch die Expression von α -Glucosidase aus (Farmer et al., 1980; Muytjens et al., 1984), eine Eigenschaft, die auch zur Entwicklung von chromogenen Nachweisnährböden eingesetzt wurde. Hierbei werden die Nährböden mit dem chromogenen Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indonyl- α -D-Glucopyranosid versetzt (0,15 g/l); das Wachstum von α -Glucosidase-exprimierenden Bakterien resultiert in einer blau-grünen Verfärbung der Kolonien (Iversen et al., 2004b). Sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse sind mit diesen Testsystemen jedoch nicht völlig auszuschließen (Gurtler et al., 2005).

Die Fähigkeit von *Cronobacter* spp., Gelatine zu hydrolysieren (Urmeyi & Franklin, 1961; Farmer et al., 1980) sowie Lactose unter Säurebildung, zum Teil unter Gasentwicklung, zu fermentieren, wurde mehrfach nachgewiesen. Die Gasproduktion ist bei 37 °C besonders intensiv ausgeprägt (Iversen et al., 2004a).

Einige Stämme von *Cronobacter* spp. sind zudem in der Lage, durch eine verstärkte Exopolysaccharid-Synthese Kapseln zu bilden (Iversen et al., 2004a). Es können so Barrieren gebildet werden, die die ganze Zelle umhüllen. Diese Matrices bieten den Mikroorganismen Schutz vor Austrocknung, fungieren aber auch als Barriere gegen die Wirkung von Antibiotika. Die Bildung von Exopolymeren ist auch die Voraussetzung für die Bildung von Biofilmen, die für *Cronobacter* spp. beschrieben wurden (Lehner et al., 2005). Durch die viskose Umhüllung der Mikroorganismen mit Exopolymeren sind zudem antigen wirkende Oberflächenstrukturen durch das Immunsystem der Wirtsorganismen schwerer zu erkennen, eine Bekämpfung der Bakterien im Körper wird somit erschwert (Iversen et al., 2004a; Chenu & Cox, 2009).

2.2 Vorkommen und Verbreitung von *Cronobacter*

Obwohl zahlreiche Untersuchungen zum Vorkommen von *Cronobacter* spp. durchgeführt wurden, konnte bisher kein natürliches Habitat identifiziert werden. In verschiedenen Veröffentlichungen wurden jedoch Pflanzen als Hauptreservoir postuliert (Jaradat et al., 2009; Molloy et al., 2009). So gelang die Isolierung von *Cronobacter* spp. aus Kräutern und Gewürzen, z.B. Thymian, Anis, Süßholzwurzel, Kamille, Fenchel, Kümmel (Baumgartner et al., 2009; Jaradat et al., 2009) sowie aus Getreide, Cerealien und Viehfutter auf Pflanzenbasis (Molloy et al., 2009). Als potentielles Umweltreservoir werden auch Insekten angesehen. So konnte *Cronobacter* spp. in mexikanischen Fruchtfliegen (*Anastrepha ludens*) und dem Darm der gemeinen Stechfliege (*Stomoxys calcitrans*) nachgewiesen werden (Kuzina et al., 2001; Hamilton et al., 2003). Auch Nachweise in Boden, Staub und im Inhalt von Staubsaugerbeuteln (Jaradat et al., 2009) lassen Schlüsse auf ein ubiquitäres Vorkommen zu.

In mehreren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass ein Persistieren von *Cronobacter* spp. in trockenen Matrices über längere Zeit möglich ist. Die Resistenz gegenüber Trockenheit und osmotischem Stress wird einerseits durch die Fähigkeit zur Kapselbildung erklärt. Andere Mechanismen, wie die Möglichkeit zur Akkumulation von Trehalose (Beeuwer et al., 2003), die Bildung von DNA-Reparaturproteinen (Álvarez-Ordóñez et al., 2014) oder die Bildung von β -Carotin als wirksames Agens gegen reaktive Sauerstoffradikale (Joseph et al., 2012b) werden in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert.

Besondere Bedeutung kommt dem Nachweis von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (*powdered infant formula*, PIF) zu. Nach Erkrankungsfällen bei

Neugeborenen konnte *Cronobacter* spp. in diesen Erzeugnissen (insbesondere in trinkfertigen Zubereitungen nach Lagerung bei falschen Temperaturen) identifiziert werden (Simmons et al., 1989; Biering et al., 1989; Noriega et al., 1990; Chap et al., 2009). Nur vereinzelt wurde hingegen *Cronobacter* spp. in Folgenahrung für Kinder, älter als 6 Monate, nachgewiesen (Chap et al., 2009). Untersuchungen ergaben, dass insbesondere die Zubereitung und die Lagerung von rekonstituierter PIF kritische Faktoren für das Wachstum von *Cronobacter* spp. darstellen. So sind *Cronobacter* spp. in der Lage, bei Temperaturen zwischen 6 °C und 45 °C (kapselbildende Stämme bis 47 °C) zu wachsen. Optimale Wachstumsbedingungen liegen, abhängig von Stamm und Medium, zwischen 37 und 43 °C. (Farmer et al., 1980; Nazarowec-White & Farber, 1997; Iversen et al., 2004a).

Durch die Fähigkeit Biofilme auf diversen Oberflächen (Latex, Polycarbonat, Silikon, in geringerem Maße: rostfreier Stahl) zu bilden, können nicht ausreichend gereinigte und desinfizierte Zubereitungsutensilien bzw. medizinisches Instrumentarium (Farmer et al., 1980; Noriega et al., 1990; Iversen et al., 2004a) ebenso zu einer nosokomialen Verbreitung der Keime führen, wie die falsche Lagerung des fertigen Produktes (Biering et al., 1989) oder eine unzureichende Zubereitungstemperatur. *Cronobacter* spp. gelten als deutlich thermotoleranter als andere Vertreter der Familie der Enterobacteriaceae (Nazarowec-White & Farber 1997; Breeuwer et al., 2003). Studien ergaben, dass das Infektionsrisiko drastisch reduziert werden kann, wenn das zugegebene Wasser für die Rekonstitution von PIF eine Temperatur von 70 °C überschreitet, das fertige Produkt bei einer Temperatur von unter 4 °C gelagert und die Aufbewahrungszeit minimiert wird (Nazarowec-White & Farber, 1997; Iversen et al., 2004a; Chap et al., 2009; Chen et al., 2009). Diese Untersuchungen bilden u.a. die Grundlagen für Risikobewertungen und das Erstellen von Empfehlungen und Leitfäden durch international anerkannte Organisationen. So wurden 2007 durch WHO und FAO Richtlinien für Herstellung und Umgang mit PIF veröffentlicht und 2008 durch die Codex-Alimentarius-Kommission für Lebensmittelhygiene der "Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children, CAC/RCP 66 - 2008" verabschiedet, um das Risiko von Kontaminationen durch *Cronobacter* spp. sowohl im Bereich der Versorgung mit als auch der Herstellung von PIF zu minimieren.

2.3 Erkrankungen

Cronobacter spp. sind fakultativ pathogene Bakterien, d.h. nur unter bestimmten Voraussetzungen, beispielweise bei einem geschwächten Immunsystem, resultiert eine Kolonisation mit diesem Erreger in einer klinisch manifesten Erkrankung (Biering et al.,

1989).

Verschiedene Krankheitsbilder werden mit *Cronobacter* spp. in Verbindung gebracht. Hauptsächlich sind Neugeborene (Frühchen) betroffen, die nosokomial infiziert wurden. Hierbei wurden generalisierte Infektionen mit schweren Meningitiden, teilweise auch in Verbindung mit Sepsis, beschrieben (Arseni et al., 1987; Biering et al., 1989; Simmons et al., 1989; Lai et al., 2001; Bowen & Braden, 2006). Symptomatisch äußert sich das häufig tödlich verlaufende Krankheitsbild u.a. durch starkes Fieber. Auch blutige Durchfälle, nekrotisierende Enterocolitiden und Infektionen des Urogenital- und Respirationstraktes wurden als typische Krankheitsbilder beobachtet (Simmons et al., 1989; Lai et al., 2001). Nach einer Infektion sind histologisch im Hirngewebe Flüssigkeitsansammlungen, Mikroabszesse, eine Dichteverminderung der weißen Hirnmasse sowie Infarkte und Einblutungen im Bereich der Hirnrinde feststellbar (Urmenyi & Franklin, 1961; Willis & Robinson, 1988; Lai et al., 2001). Wird eine manifeste Erkrankung überlebt, bleiben bei den Patienten oft schwere Folgeschäden am Hirn zurück. So werden Gehör- und Sehschäden, sowie spastische Lähmungen beschrieben, die sich auf alle Gliedmaßen erstrecken können (Willis & Robinson, 1988; Biering et al., 1989; Lai et al., 2001).

Krankheitsausbrüche wurden auch bei Erwachsenen beschrieben. In diesen Fällen lag meist eine ausgeprägte Schwächung des Immunsystems, z.B. als Folge einer Krebserkrankung vor. Gekennzeichnet waren diese Fälle u. a. durch Bakteriämie, Urosepsis, Konjunktivitis, Osteomyelitis bzw. Pneumonie (Lai et al., 2001). Insbesondere bei älteren Menschen (über 70 Jahre) treten verstärkt Harnwegsinfektionen auf (Patrick et al., 2014). Ein ursächlicher Zusammenhang mit der Aufnahme kontaminiertes Lebensmittel gilt in diesen Fällen als unwahrscheinlich bzw. ist auch aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *Cronobacter* spp. nicht zu belegen.

Als medikamentöse Therapie bei Vorliegen einer Meningitis wurde bis in die 80er Jahre standardmäßig eine Mischung von Ampicillin und Chloramphenicol appliziert (Farmer et al., 1980; Drudy et al., 2006). Aufgrund seines kritischen Nebenwirkungsprofils wurde Chloramphenicol mittlerweile durch Gentamicin ersetzt. In den meisten Fällen liegt eine Empfindlichkeit von *Cronobacter* spp. gegen diese Wirkstoffkombination vor. In zunehmendem Maß erwerben *Cronobacter* spp. allerdings Resistenzen, die den Einsatz von Carbapenemen oder Cephalosporinen in Kombination mit einem weiteren Antibiotikum, zum Beispiel aus der Klasse der Aminoglykoside zur erfolgreichen Therapie erfordern. Die Fähigkeit zur Bildung von β -Lactamase konnte bisher nur vereinzelt bei *Cronobacter*-

Stämmen nachgewiesen werden (Caubilla-Barron, 2007; Jaradat et al., 2014). Ein Einsatz von Antibiotika aus den Gruppen der Lincosamide, Glycopeptide, Streptogramine oder Fusidinsäure ist therapeutisch nicht zweckmäßig, da *Cronobacter* spp. gegen diese Wirkstoffe natürliche Resistenzen besitzen (Caubilla-Barron, 2007; Chenu & Cox, 2009; Hunter et al., 2008).

2.4 Pathogenitätsmechanismen von *Cronobacter*

Einen wesentlichen Pathogenitätsmechanismus von *Cronobacter* spp. stellt deren ausgeprägtes Adhäsions- und Invasionsvermögen dar. Mehrfach wurde das Bindungsvermögen von *Cronobacter* spp. an menschliche Epithelzellen beschrieben (Mange et al., 2006; Townsend et al., 2008), wobei die Effizienz der Bindung und die daraus resultierende Pathogenität der verschiedenen Stämme eine gewisse Variationsbreite aufweist (Grishin et al., 2013). So konnte festgestellt werden, dass beispielsweise das Adhäsionsvermögen bei humanen Isolaten deutlich ausgeprägter ist als bei Wildstämmen (Liu et al., 2012).

Zudem spielen weitere Virulenzfaktoren wie die Bildung von Toxinen oder die Expression von Schutzfaktoren, die ein Überleben des Bakteriums trotz der Aktivierung des Abwehrsystems des Wirtsorganismus ermöglichen, eine bedeutende Rolle im Krankheitsgeschehen. Trotz vielfältiger Studien sind aber zahlreiche Fragen hinsichtlich der Pathogenitätsmechanismen von *Cronobacter* spp. derzeit noch offen.

2.4.1 Toxine/Enzyme

Bei der Bewertung der Bedeutung potentieller Toxine ist vorab zu bemerken, dass kein geeignetes in-vitro-Modell existiert, das eine direkte Übertragung der Ergebnisse zur Toxizität auf Neugeborene zulässt.

- Enterotoxine

Die Bedeutung einer vermeintlichen Enterotoxinproduktion ist nicht abschließend geklärt. Bisher gelang es weder Gene zu identifizieren, die für ein Enterotoxin codieren, noch das Enterotoxin selbst genau zu charakterisieren.

Im Jahr 2003 veröffentlichte Untersuchungen zeigten, dass nach intraperitonealer Applikation von Bakterienfiltraten verschiedener *Cronobacter*-Stämme im 'suckling mouse assay' Enterotoxinaktivität gemessen werden konnte (Pagotto et al., 2003). Eine Isolierung

und weitere Charakterisierung des möglichen Toxins erfolgte allerdings in diesem Zusammenhang nicht. Raghav und Aggarwal gelang es 2007 ein potentielles Enterotoxin aus *Cronobacter* spp.-Isolaten abzutrennen und aufzureinigen. Es handelte sich um ein Protein mit einer Molekularmasse von etwa 66 kDa. Das Protein zeigte eine nennenswerte Thermostabilität (30 min bei 90 °C). Die höchste toxische Aktivität wurde bei pH 6 festgestellt (Raghav & Aggarwal, 2007). Untersuchungen, die dieses Ergebnis bestätigen konnten, finden sich bisher nicht.

- Enzyme

Eine Vielzahl von Enzymen, die durch *Cronobacter* spp. gebildet werden können, beeinflussen die pathogenen Eigenschaften dieser Bakterien. Es wurde beispielsweise die Sekretion proteolytischer Enzyme beschrieben, die zu Gewebeschäden und Zelllyse führen können (Pagotto et al., 2003). Zudem gelang es, ein für eine Zink-Metalloprotease codierendes Gen (*zpx*) zu identifizieren. Dieses Enzym bewirkt in vitro eine Deformation von CHO-Zellen im Gewebeverband (Kothary et al., 2007). Einige pathogene *C. sakazakii*-Stämme sind zudem in der Lage, Sialinsäuren zu verstoffwechseln und als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Sialinsäuren sind in Muttermilch und PIF zu finden, stellen aber auch einen wesentlichen Bestandteil der Mucin-Schicht im menschlichen Gastrointestinaltrakt dar. Eine enzymatische Verwertung von Sialinsäuren könnte über Interaktion mit der Mucinschicht im Wirtsorganismus zu einem gesteigerten pathogenen Potential führen (Joseph et al., 2012b; Grim et al., 2013).

Andere Untersuchungen zeigten bei Stämmen von *Cronobacter* spp., die im 'suckling mouse assay' eine toxische Wirkung aufwiesen, eine verstärkte Expression von Superoxiddismutase und Thiol-Peroxidase. Beide Enzyme spielen eine Rolle sowohl bei der Biofilmbildung als auch für die Invasivität und Pathogenität von Mikroorganismen (Yang et al., 2009). In einem pathogenen *C. turicensis* Stamm wurden außer einer Superoxiddismutase, die gegen vom Immunsystem produzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) schützt und so ein Persistieren der Keime in Makrophagen von bis zu 96 h ermöglicht, weitere potentielle Virulenzfaktoren identifiziert, so zum Beispiel verschiedene Komponenten des Typ-6-Sekretionssystems oder ein Enterobactin-Rezeptorprotein, das die Akquirierung von siderophosphatgebundenem Eisen auch in einer Umgebung ermöglicht, in der Eisen limitiert ist (Townsend et al., 2007; Carranza et al., 2009).

- Endotoxin

Bei der Zelllyse gramnegativer Erreger wie *Cronobacter* spp. können Lipopolysaccharide (LPS) freigesetzt werden. Das enthaltene Lipid A entfaltet nach Freisetzung im Wirt starke pyrogene Eigenschaften. Heftige Entzündungsreaktionen bis hin zum septischen Schock können als toxische Wirkung auftreten. Postuliert wird auch ein Mechanismus, bei dem durch die Wirkung von LPS zelluläre Tight-Junctions zerstört werden und somit die Permeabilität von physiologischen Barrieren wie z.B. der Blut-Hirn-Schranke erhöht wird. Das kann zu einem leichteren Eindringen von Bakterien und in dessen Folge zu einer gesteigerten Pathogenität führen (Townsend et al., 2007; Kim & Loessner, 2008; Emami et al., 2011).

2.4.2 Adhäsion und Invasion

Da die meisten beschriebenen Erkrankungsfälle nach dem Konsum von rekonstituierter PIF beschrieben wurden, ist davon auszugehen, dass zunächst intestinale Epithel- und Endothelzellen kolonisiert werden, bevor es zu einem Eindringen in den zentralen Blutkreislauf und ggf. zu einem Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke kommt. Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass *Cronobacter* spp. in der Lage sind, sich an menschliche Epithelien aber auch an andere Zellen, wie beispielsweise Erythrozyten zu binden (Mange et al., 2006; Liu et al., 2012). Zudem wurde die Fähigkeit zur Invasion in menschliche Intestinal- und mikrovaskuläre Endothelzellen des Hirns gezeigt (Mange et al., 2006; Giri et al., 2012).

- Fimbrien / Pili

Eine essentielle Bedeutung bei der Adhäsion von *Cronobacter* spp. scheint der Ausprägung von Fimbrien zuzukommen. Diese können an Oberflächenproteine (z.B. Fibronektin) der Wirtszellen binden. Bei einigen pathogenen *Cronobacter*-Stämmen wurden Gene für Typ-IV-Pili nachgewiesen. Diese Pili wurden auch bei *E. coli*-Stämmen gefunden, die Meningitiden bei Kleinkindern auslösen können. Auch Gene für andere Pili-Typen, für die sich homologe Gene bei verschiedenen Pathogenen finden, wurden bei einigen *Cronobacter*-Stämmen beschrieben und werden als eine mögliche Erklärung für die Diversität in der Virulenz der verschiedenen *Cronobacter*-Stämme diskutiert (Grim et al., 2013).

- Flagellen

Die Expression von Flagellen korreliert mit dem Bindungsvermögen an Wirtszellen (Carranza, et al., 2009). Wie an einem mutierten Stamm *C. sakazakii* ES 5 gezeigt werden konnte, resultiert die Abwesenheit von Flagellen in einer deutlichen Reduktion des

Adhäsionsvermögens (Hartmann et al., 2010).

- OmpA

Die Bedeutung von OmpA als potentieller Pathogenitätsfaktor aufgrund seiner Eigenschaft als Adhäsin und Invasin bzw. als wichtiger Faktor bei der Biofilmbildung ist für viele Bakterien wie z.B. *E. coli* bekannt (Smith et al., 2007) und konnte auch für *C. sakazakii* gezeigt werden. So wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben, dass OmpA beispielsweise an den Fibronectinrezeptor der Wirtszelloberfläche bindet und so die Invasion der Keime in die Zelle ermöglicht (Mange, et al., 2006; Nair et al., 2007; Kim et al., 2010; Lui et al., 2012).

Für die Invasivität von *Cronobacter* spp. sowohl in mikrovaskuläre Endothelzellen (Modell für Blut-Hirn-Schranke) als auch in intestinale Epithelzellen scheint die Expression von OmpA essentiell zu sein, wobei die Invasivitätsrate mit der Expression von OmpA korreliert. Auch Zusammenhänge zwischen der Ausprägung von OmpA und dem Überleben sowie der Vermehrung von *Cronobacter* spp. im Blut des Wirtes wurden beschrieben (Nair & Venkitanarayanan, 2007; Singamsetty et al., 2008; Mittal et al., 2009b; Kim et al., 2010). Des Weiteren scheint es für die Pathogenese von nekrotisierenden Enterocolitiden wesentlich zu sein, dass *Cronobacter*-Keime, die aktiv in dentritische Zellen aufgenommen wurden, infolge der Expression von OmpA in Selbigen überleben können. Sie sind so in der Lage, die Reifung der dentritischen Zellen zu hemmen. Die unreifen dendritischen Zellen dienen zudem als Nische für die Replikation von *Cronobacter* spp. (Mittal et al., 2009a). Die Anreicherung dieser Zellen im Intestinum sowie eine verstärkte Bildung von immunsuppressiven Faktoren wie IL-10 und TGF-β scheint mitverantwortlich für die letzten Endes resultierende Dysfunktion der intestinalen Barrierefunktion zu sein (Mittal et al., 2009a; Emami et al., 2011).

- Reorganisation des Cytoskeletts

Durch Sekretion von Effektor-Molekülen und Wechselwirkungen mit Signalkaskaden (z.B. Hemmung von Phosphorylierungsreaktionen) im Wirtsorganismus können pathogene Organismen die Struktur des Cytoskeletts beeinflussen. Eine Umorganisation der Aktinfilamente kann so induziert werden (Singamsetty et al., 2008). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei der Invasion von *Cronobacter* spp. in mikrovaskuläre und intestinale Endothelzellen sowohl Mikrofilamente als auch Mikrotubuli der Wirtszellen beteiligt sind (Nair & Venkitanarayanan, 2007; Singamsetty et al., 2008).

2.5 *Cronobacter*-spezifische Zellwandantigene

Gramnegative Bakterien sind durch einen charakteristischen Aufbau ihrer Zellwand gekennzeichnet, bestehend aus der äußeren Membran, einer dünnen Mureinschicht und der Cytoplasmamembran. Die Mureinschicht gramnegativer Bakterien besteht aus ein bis zwei Schichten des Peptidoglykans Murein, welches sich aus den Grundbausteinen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure zusammensetzt (Cypionka, 2010). Zwischen äußerer Membran und Mureinschicht liegt der periplasmatische Raum. In diesem Zellkompartiment befinden sich verschiedene Proteine wie Enzyme, Bindungsproteine oder Chemorezeptoren (Reinhard et al., 1995; Munk et al., 2008). Der periplasmatische Raum stellt auch einen Reaktionsraum für biochemische Prozesse dar. Ein Austausch hydrophiler Stoffe zwischen Periplasma und Umgebung findet durch Porine statt. Porine sind Kanäle in der äußeren Membran, die von drei Proteineinheiten gebildet werden, mit Wasser gefüllt sind und so eine Diffusionsbarriere bilden (Reinhard et al., 1995; Fuchs et al., 2007).

Sowohl die äußere Membran als auch die Cytoplasmamembran setzen sich aus Phospholipid-Doppelschichten zusammen. Die äußere Membran hat, im Gegensatz zum Bilayer der Cytoplasmamembran, einen asymmetrischen Aufbau. Während die Cytoplasmamembran durch zwei Membranblätter aus Phospholipiden gebildet wird, setzt sich die äußere Membran aus einem inneren Membranblatt aus Phospholipiden und einem äußeren Membranblatt, das einen hohen Anteil an Lipopolysacchariden (LPS) aufweist, zusammen (Fuchs et al., 2007; Munk et al., 2008). Die Anwesenheit von LPS in der äußeren Membran ist charakteristisch für gramnegative Bakterien und bedingt einige spezifische Eigenschaften dieser Organismen. Von besonderer Bedeutung ist die Wirkung des LPS als Endotoxin (Caroff & Karibian, 2003; Rolle & Mayr, 2006; Cypionka, 2010).

LPS setzen sich aus drei strukturell verschiedenen Motiven zusammen, nämlich dem Lipid A, dem Kernoligosaccharid und der O-spezifischen Seitenkette (Abbildung 1). Der lipophile Teil des LPS, das Lipid A, ist im Bilayer der äußeren Membran verankert. Lipid A besteht aus sechs Fettsäureresten, die an zwei phosphorylierte Glucosaminreste gebunden sind. Über eine weitere glykosidische Bindung ist das Lipid A an das Kernoligosaccharid (Core) gebunden, das aus teilweise phosphorylierten Heptosen und Hexosen besteht und in seiner Zusammensetzung eine geringe Variabilität zwischen den verschiedenen Organismen aufweist (Caroff & Karibian, 2003).

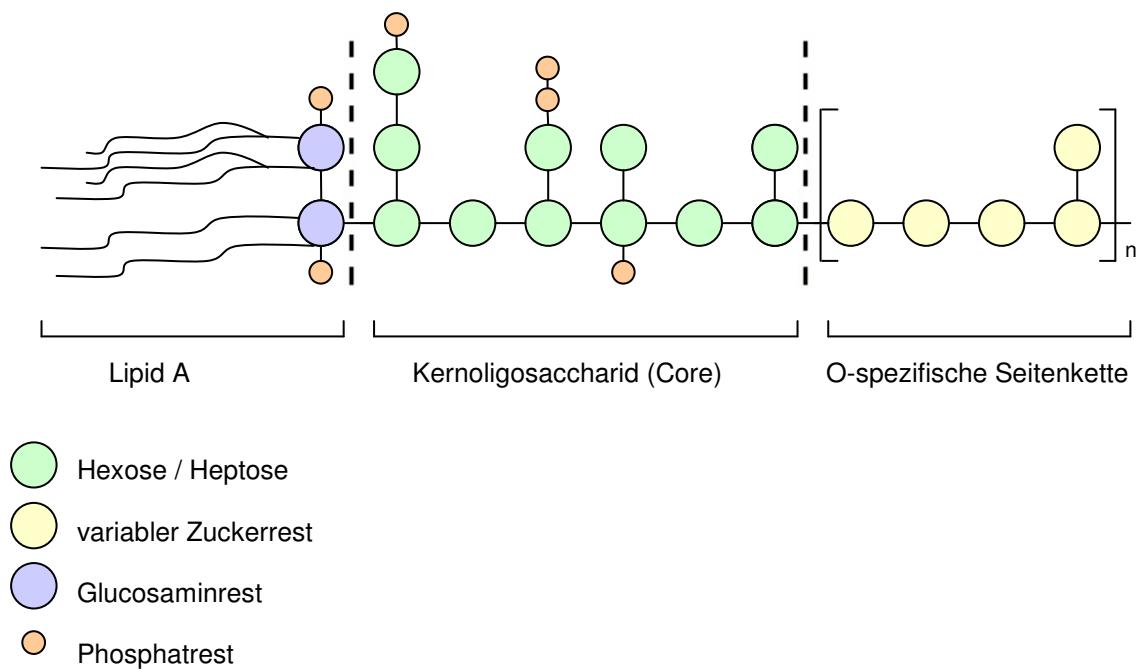


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Lipopolysaccharid-Moleküls (modifiziert nach Munk et al., 2008)

Hoch variabel hingegen ist der dritte Molekülabschnitt, die O-spezifische Seitenkette. Die Seitenkette ragt aus der äußeren Membran heraus und bedingt, in Verbindung mit der Core-Region, die hydrophilen Eigenschaften der Bakterienwand. Die O-spezifische Seitenkette wird i.d.R. aus Einheiten von vier oder fünf Zuckerresten gebildet, die sich innerhalb der Kette mehrfach wiederholen (Fuchs et al., 2007; Munk et al., 2008). Für den Stamm *Cronobacter turicensis* HPB 3287 beispielsweise konnte ein Pentasaccharid identifiziert werden, das in glykosidisch gebundenen Wiederholungen ein Polymer mit einer Molekülmasse von ca. 25.000 Da bildet (MacLean et al., 2011; Tabelle 2). Die variable Seitenkette wirkt als spezifische antigene Struktur (O-Antigen). Die Struktur der O-spezifischen Seitenkette bietet auch die Möglichkeit verschiedene Serotypen gramnegativer Bakterien zu unterscheiden. Bis heute gelang es beispielsweise innerhalb der Gattung *Cronobacter* 17 verschiedene Serotypen zu definieren. Davon entfallen sieben auf die Spezies *C. sakazakii* (O1 - O7), drei auf *C. turicensis* (O1 - O3), jeweils zwei auf *C. malonaticus* (O1, O2) und *C. muytjensii* (O1, O2). Für *C. universalis* wurde bisher nur ein Serotyp (O1) nachgewiesen (Jarvis et al., 2011 und 2013; Sun et al., 2011 und 2012). In verschiedenen Arbeitsgruppen gelang die Strukturaufklärung der O-spezifischen Seitenketten einiger Serotypen von *Cronobacter* spp. (Tabelle 2). Dabei sind 11 der 13 identifizierten Oligosaccharid-Strukturen, die sich im LPS-Molekül wiederholen, verzweigt. Für einige Stämme wurden identische Grundstrukturelemente nachgewiesen (Markierungen in Tabelle 2). Die Hauptkomponenten bilden Glucose (Glc), Rhamnose (Rha) und Galactose (Gal),

sowie Derivate dieser Monosaccharide. Zudem sind auch selten vorkommende Derivate von Fucose (Fuc), Quinovose (Qui) und Legionaminsäure (Leg) Bestandteile der O-Antigene einiger Serotypen von *Cronobacter* spp. In der O-spezifischen Seitenkette von *C. sakazakii* Serotyp O5 sowie eines *C. malonaticus*-Stammes wurde der Zucker Ketodesoxyoctonsäure (Kdo) nachgewiesen (MacLean et al., 2009c; Sun et al., 2012). Dieses Kohlenhydrat ist charakteristischer Bestandteil der Core-Region aller gramnegativen Bakterien und bindet dort unmittelbar ans Lipid A. Diese Kdo-Lipid-A-Domäne wird als essentiell für die endotoxische Wirkung von LPS angesehen (Caroff & Karibian, 2003; Rolle & Mayr, 2006; Fuchs et al., 2007). Ein Vorkommen von Kdo als Bestandteil der O-spezifischen Seitenkette gilt als selten (MacLean et al., 2009c; Sun et al., 2012).

Ein Hauptprotein der äußeren Membran gramnegativer Bakterien ist das 'Outer membrane protein A' (OmpA). Durch seine β -Barrel-Struktur mit acht transmembranen Strängen ist OmpA in der Lage, die äußere Membran des Mikroorganismus strukturell zu stabilisieren, fungiert zugleich als Virulenz- und Pathogenitätsfaktor (2.4.2) und als Rezeptor, z.B. für Phagen und Colicin (Etz et al., 2011).

Tabelle 2: Oligosaccharid-Strukturen der O-spezifischen Seitenkette verschiedener Serotypen von *Cronobacter* spp. Die mit *, ** bzw. *** gekennzeichneten Stämme enthalten jeweils die gleichen Grundstrukturelemente.

Spezies	Serotyp	Struktur	Literatur
<i>C. sakazakii</i>	O1	$\alpha\text{-D-GlcP}-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}A$ $[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Quip3NAc}-(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-GlcP}-(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}-(1\rightarrow]$	Sun et al., 2012
<i>C. sakazakii</i> *	O2	$\alpha\text{-D-GalpA}-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-}(ungeklärt)$ $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}-(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcPNAc}-(1\rightarrow]$	Sun et al., 2012
<i>C. sakazakii</i> **	O3	$[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Quip3NAc}-(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcPNAc}-(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcP}A-(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}-(1\rightarrow]$ $\beta\text{-D-GlcP}$	Arbatsky et al., 2012
<i>C. sakazakii</i>	O5	$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Quip3NAc}-(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-Kdop-}(2\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcPNAc}-(1\rightarrow]$ OAc	Sun et al., 2012
<i>C. sakazakii</i> ***	O6	$[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Kdop-}(2\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-GlcP}-(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-GalcP-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalcpNAc}-(1\rightarrow]$ OAc_2	Sun et al., 2012
<i>C. sakazakii</i>	O7	$\beta\text{-D-GlcPNAc}$ $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc}-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalcpA}-(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc}-(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcPNAc}-(1\rightarrow]$	Sun et al., 2012
<i>C. sakazakii</i>	nicht bekannt	$[\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Quip3NAc}-(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}-(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcP}A-(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}-(1\rightarrow]$ $\alpha\text{-D-GlcP}$	MacLean et al., 2009b
<i>C. sakazakii</i> *	nicht bekannt	$\alpha\text{-D-GalpA}-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}$ $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcP}-(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcPNAc}-(1\rightarrow]$ OAc	Czerwicka et al., 2010

Fortsetzung Tabelle 2: Oligosaccharid-Strukturen der O-spezifischen Seitenkette verschiedener Serotypen von *Cronobacter* spp. Die mit *, ** bzw. *** gekennzeichneten Stämme enthalten jeweils die gleichen Grundstrukturelemente.

Spezies	Serotyp	Struktur	Literatur
<i>C. turicensis</i>	O2	$[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Legp5Ac7Ac-(2}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]$	MacLean et al., 2011
<i>C. turicensis</i>	nicht bekannt	$\alpha\text{-D-Glc}p$ \downarrow_2 $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}pNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}pNAc-(1}\rightarrow]$	Czerwicka et al., 2013
<i>C. turicensis</i>	nicht bekannt	$\alpha\text{-D-Glc}p$ \downarrow_4 $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Legp5Ac7Ac-(2}\rightarrow]$	MacLean et al., 2011
<i>C. malonaticus</i> ***	nicht bekannt	$\beta\text{-D-Glc}pNAc$ \downarrow_2 $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Kdop-(2}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalcpNAc-(1}\rightarrow]$	MacLean et al., 2009c
<i>C. muytjensii</i> **	nicht bekannt	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Quip3NAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}pNAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}pA-(1}\rightarrow]$	MacLean et al., 2009a

2.6 Nachweisverfahren für *Cronobacter*

2.6.1 Klassische mikrobiologische Verfahren

In der "Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel" wird als Referenzverfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp. auf die Norm ISO/TS 22964 verwiesen. Das analytische Procedere beginnt mit einer nicht selektiven Voranreicherung der Probe in gepuffertem Peptonwasser, anschließend erfolgt eine selektive Flüssiganreicherung in modifizierter Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon unter Zusatz von Lactose und Vancomycin. Letzteres hemmt das Wachstum grampositiver Keime, die hohe Salzkonzentration in der Bouillon sowie die hohe Bebrütungstemperatur von 44 °C hemmen das Wachstum von anderen *Enterobacteriaceae*. Im Anschluss wird ein Aliquot der angereicherten Bouillon auf selektive Nährböden ausgebracht, z.B. ESIA (*Enterobacter sakazakii* isolation agar) oder CCI (Chromogenic *Cronobacter* isolation agar). Die Selektivmedien enthalten als Indikator für α -Glucosidase-Aktivität, die für *Cronobacter* spp. charakteristisch ist, das Chromogen 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid (Farmer et al., 1980; Muytjens et al., 1984). Die *Cronobacter*-Kolonien nehmen auf diesen Medien während der Inkubation eine spezifische blau-grüne Färbung an.

Sowohl der hohe Zeitaufwand als auch die teilweise mangelnde Spezifität der klassischen Analyseverfahren (Gurtler et al., 2005) waren Anlaß für eine ganze Reihe von Untersuchungen, die die Entwicklung schnellerer und spezifischerer Nachweisverfahren zum Ziel hatten.

2.6.2 Apparative Verfahren

Apparative Verfahren bieten die Möglichkeit schnell und automatisiert Mikroorganismen nachzuweisen.

Relativ weit verbreitet sind PCR-basierte Testssysteme für den Nachweis von *Cronobacter* spp. Grundprinzip dieser Verfahren sind Amplifikation und Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen. Bereits 2004 veröffentlichten Lehner et al. ein PCR-Verfahren zur Identifizierung von *Cronobacter* spp., das auf dem Nachweis des spezifischen 16S-rRNA-Gens beruht. Heute finden in der Praxis vor allem real-time PCR-Verfahren Anwendung. Hier ist direkt während der Analyse eine Signal-Detektion möglich, da durch die Amplifikation von DNA eine

Aktivierung von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt. Dies kann durch den Einsatz von Sondenmolekülen (z.B. TaqMan-System) oder den Einsatz von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. SYBR Green) geschehen (Schmidt & Rothhämel, 2012). PCR-Verfahren für den Nachweis von *Cronobacter* spp. auf dieser Basis wurden z.B. von Liu et al. (2006) etabliert. Mittlerweile sind entsprechende Test-Kits kommerziell erhältlich (z.B. Applied Biosystems, 2011). Auch die FDA empfiehlt aktuell die Verwendung von PCR-Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp. (Chen et al., 2012).

Durch die Kombination von molekularbiologischen und immunchemischen Techniken gelang es Blazkova et al. (2011) einen immunchromatographischen Test zum Nachweis von *Cronobacter* spp. zu entwickeln. Dazu wurden auf einer Nitrocellulosemembran Antikörper gegen Digoxigenin immobilisiert, mit denen mittels PCR amplifizierte und mit Biotin und Digoxigenin markierte Gensequenzen (komplementär der 16S rRNA von *Cronobacter* spp.) gebunden werden. Die Visualisierung der Bindung erfolgt durch Zugabe von Carbon-Nanopartikeln, die mit Biotin bindendem Neutravidin beladen sind. Postuliert wird ein Nachweis von *Cronobacter* spp. mit dieser Methode innerhalb von 16 Stunden. Dieses Nachweissystem wurde auch für die Untersuchung von PIF eingesetzt, nach Voranreicherung der Keime lag die Nachweigrenze bei weniger als 10 Keimen in 10 g PIF (Javurková et al., 2012). Auf einem analogen Prinzip basiert ein weiteres Nachweisverfahren, das 2014 von Chen et al. beschrieben wurde. Hier wurden zur Detektion mit Neutravidin beladene Gold-Nanopartikel eingesetzt. Es gelang auch bei einer Begleitflora von 10^8 KbE/mL *Salmonella* spp. spezifisch *Cronobacter* spp. nachzuweisen, in der Anreicherungsbouillon lag die Nachweigrenze bei 10^6 KbE/mL (Chen et al., 2014).

Als alternatives Identifizierungs-/Bestätigungsverfahren hat in den letzten Jahren die MALDI-TOF-MS-Analyse (matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry) weite Verbreitung gefunden. Ein auf diesem Nachweisprinzip basierendes Verfahren wurde auch zur Untersuchung von PIF eingesetzt (Javurková et al., 2012). Hierbei erfolgt eine Anreicherung der Keime nach Suspendieren der Probe in Flüssigkulturmedium. Im Anschluss werden nach Inkubation auf Selektivagar (z.B. ESIA) potentielle *Cronobacter*-Kolonien identifiziert und eine geringe Menge der selektierten Bakterien in Zimtsäurederivat-haltiger Matrix auskristallisiert. Nach Laser-Desorption werden im Massenspektrometer dann die Massen der Analyten (Messbereich meist 2-20 kDa) bestimmt. Aus dem sich daraus ergebenden Gesamtspektrum, das meist durch ribosomale Proteine dominiert wird, kann ein für den jeweiligen Mikroorganismus typischer Fingerprint erstellt werden (Javurková et al., 2012).

Weitere apparative Verfahren wie die Pulsfeldgelektrophorese oder die Multilocus-Sequenzanalyse dienen in erster Linie zur Feintypisierung von Isolaten (Holy & Forsythe, 2014). In der Routineanalyse zum Nachweis von *Cronobacter* spp. kommen sie nicht zur Anwendung und werden daher an dieser Stelle nicht näher beschrieben.

2.6.3 Antikörper-basierte Verfahren

Die Durchführung von PCR- und MALDI-TOF-Verfahren ist mit einem großen apparativen und ggf. auch infrastrukturellen Aufwand, dem Einsatz von hoch qualifiziertem Personal und daraus resultierend mit hohen Kosten verbunden. Als Alternative bieten sich immunchemische Testsysteme an, die kostengünstiger sind und auch schnelle spezifische Untersuchungen vor Ort, z.B. bei der Produktion von Lebensmitteln ermöglichen würden. Auf Antikörpern basierende Nachweisverfahren für *Cronobacter* spp. wurden bislang jedoch nur vereinzelt beschrieben. Eine Etablierung in der Routineanalytik erfolgte bisher nicht.

Bereits im Jahr 2009 wurde durch Hochel & Škvor ein indirektes EIA-Verfahren zum Nachweis von *C. sakazakii* entwickelt. Dazu wurden Kaninchen mit erhitzten bzw. Formaldehyd-inaktivierten Zellsuspensionen von *C. sakazakii* ATCC 29544 immunisiert. Nach affinitätschromatographischer Isolierung der IgG-Fraktionen (polyklonale Antikörper) wurden indirekte Enzyimmuntests etabliert. Die gereinigten IgG-Fraktionen dienten als primäre spezifische Antikörper, als Sekundärantikörper wurde peroxidasemarkiertes Anti-Kaninchen-IgG verwendet. Die Beschichtung der EIA-Platten erfolgte mit ganzen Zellen von *C. sakazakii*, die beschichteten Platten wurden zudem mit Glutaraldehyd (0,5% v/v) fixiert. Die gegen Formaldehyd-inaktivierte *C. sakazakii*-Keime gewonnenen Kaninchenserien erwiesen sich als etwas sensitiver, die Nachweisgrenze des entsprechenden EIA lag bei $0,6 \times 10^5$ KbE/ml (bezogen auf Stamm *C. sakazakii* ATCC 29544). Allerdings reagierte nur einer von zwölf weiteren getesteten *C. sakazakii*-Stämmen positiv, so dass die Autoren eine Serotyp-Spezifität der hergestellten Kaninchen-Antiseren postulierten (Hochel & Škvor, 2009). Eine Zuordnung der untersuchten Keime zu den verschiedenen Serotypen von *C. sakazakii* erfolgte in der Publikation jedoch nicht.

Park et al. gelang es 2012 einen hochspezifischen Sandwich-EIA zur Detektion von *C. muytjensii* zu etablieren. Dieses System basiert auf polyklonalen Antikörpern (Fangantikörper: IgY aus dem Hühnerei, Detektionsantikörper: IgG aus dem Kaninchen). Als Immunogen wurde ein mittels Ultraschallbehandlung gewonnenes Zelllysat von *C. muytjensii*

ATCC 51329 eingesetzt. Kreuzreaktionen im generierten Testsystem mit pathogenen Bakterienstämmen anderer Gattungen wie *E. coli*, *S. Thyphimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* und *L. monocytogenes* wurden nicht festgestellt. Auch Kreuzreaktionen mit Stämmen der Gattung *Enterobacter* konnten nicht nachgewiesen werden. Angaben zur Epitop-Spezifität wurden nicht gemacht. Aus dem Genus *Cronobacter* war nur für *C. mucilaginosus*-Stämme eine positive Reaktion feststellbar, andere *Cronobacter*-Spezies wurden nicht erfasst, wobei allerdings nur drei *C. mucilaginosus*-Stämme, zwei *C. sakazakii*-Stämme und ein Stamm der Spezies *C. turicensis* getestet wurden. Die Nachweisgrenze des EIAs wurde mit $6,3 \times 10^4$ KbE/ml angegeben (Park et al., 2012).

Weitere immunchemische Testsysteme, die auch für die Untersuchung von PIF eingesetzt wurden, beschrieben Xu et al. (2014). Neben einem auf polyklonalen Kaninchen-Antikörpern basierenden indirekten EIA-Verfahren, wurden unter Verwendung von polyklonalen (Kaninchen)- bzw. monoklonalen (Maus)-Antikörpern auch zwei Sandwich-EIAs etabliert. Die Versuchstiere wurden mit hitzeinaktivierten Keimen des Stammes *C. sakazakii* ATCC 29544 immunisiert. Die Nachweisgrenzen lagen bei 10^5 KbE/ml (indirekter EIA) bzw. 2×10^4 KbE/ml (Sandwich-EIAs). Für dotierte PIF-Proben konnten nach 10 h Anreicherung in einer nicht selektiven Bouillon (modifizierte Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon) Nachweisgrenzen von 1 KbE/100 g PIF realisiert werden. Während in den Sandwich-EIAs lediglich mit Stämmen der Spezies *C. sakazakii* positive Signale erhalten wurden (vier Stämme wurden getestet), reagierten im indirekten EIA unter Verwendung der aufgereinigten polyklonalen Antikörper alle untersuchten 12 *Cronobacter*-Stämme verschiedener Species, wie z.B. *C. malonaticus*, *C. mucilaginosus*, *C. turicensis* oder *C. dublinensis*. Kreuzreaktivität mit Stämmen anderer Gattungen (z.B. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*) wurde nicht nachgewiesen (Xu et al., 2014).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

6-Amino-n-Capronsäure (Sigma-Aldrich, A2504)
ALEXA Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (Invitrogen, A11029)
Aminopterin (Sigma, A 515)
Bradford-Reagenz (Sigma, B6916)
Bromphenolblau (Serva, 15375)
Casein (Oxoid, LP0041)
Coomassie Blue R „Phast Gel“ (GE Healthcare, 17-0518-01)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, 04693124001)
Desoxyribonuclease I (Sigma, DN25)
Dulbecco´s Medium (Biochrom, F 0435)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, EDTA (Sigma, E1644)
Equilibration Buffer I ReadyPrep starter kit (BIO-RAD 163-2107)
Equilibration Buffer II ReadyPrep starter kit (BIO-RAD 163-2108)
Fetal Calf Serum, FCS (Biochrom, S 0115)
Goat Anti-Mouse Fab-Fragment Alexa 488 (Life Technologies, A11017)
Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)
Hypoxanthin/Thymidin (Sigma, H 0137)
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore, WBKLS0100)
L-Glutamin (Biochrom, K 0282)
LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, 17-0446-01)
Magermilchpulver (Merck, 1.15363.0500)
Mercaptoethanol (Sigma, M 6250)
Mineralöl (BIO-RAD, 163-2129)
Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagent (Sigma, ISO2)
Natriumpyruvat (Biochrom, L 0473)
NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets (Roche, 11 697 471 001)
Overlay Agarose Ready Prep (BIO-RAD, 163-2111)

Paraformaldehyd (Fluka, 76240)
Polyethylenglycol PEG 1500 (Roche, 10783641001)
Polyklonales Kaninchen-Anti-Maus-Ig/HRP (Dako, P0161)
Precision Plus Protein All Blue Standards (BIO-RAD, 161-0373)
Ponceau S Solution (Sigma, P7170)
Polymyxin B Sulfat (Sigma, P1004)
Proteinase K (Sigma-Aldrich, P6556)
Rehydration/Sample Buffer Ready Prep (BIO-RAD, 163-2106)
Ribonuclease A (Sigma, R5503)
Silbernitrat (Sigma-Aldrich, 209139)
Tetramethylbenzidin (Sigma, T 2885)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS (Roth, 0188.3)
Tris/Tricine/SDS Buffer, 10 x (BIO-RAD, 161-0744)
Triton X-100 (Sigma, 9002-93-11)
Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503)
Trypton (Fluka, 95039)
Tween-20 (Sigma, P1379)
XT MOPS Running Buffer, 20 x Electrophoresis purity reagent (BIO-RAD, 161-0788)
XT Sample Buffer, 4 x (BIO-RAD, 161-0791)

Alle weiteren, nicht separat aufgeführten Reagenzien wurden in p.a.-Qualität eingesetzt.

3.1.2 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Bakterienstämme aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der LMU München (Präfix: MHI) verwendet. Soweit es sich dabei um Isolate aus anderen Sammlungen wie der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen (DSMZ) oder der Stammsammlung des Institutes für Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelhygiene der Universität Zürich (Präfix: E) handelt, ist die ursprüngliche Bezeichnung ergänzend aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung		Spezies	Herkunftsland	Herkunft
<i>Cronobacter</i> spp.				
MHI 975	DSMZ 4485	<i>Cronobacter sakazakii</i>	USA	Kind (Rachen)
MHI 977		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Milchpulver
MHI 979		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Milchpulver
MHI 982		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 986		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 987		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 990		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 992		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 995		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 21000		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 21001		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 21002		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 21008		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 21011		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 21012		<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Babynahrung
MHI 21027	E 604	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Kanada	Klinisches Isolat
MHI 21028	E 655	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Kanada	Klinisches Isolat
MHI 21029	E 785	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Holland	Neugeborenes
MHI 21030	E 789	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Holland	Neugeborenes
MHI 21032	E 796	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Großbritannien	Human
MHI 21035	E 886	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Holland	Neugeborenes
MHI 21036	E 535	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Deutschland	Humanes Isolat
MHI 21037	E 786	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Holland	Neugeborenes
MHI 21038	E 821	<i>Cronobacter sakazakii</i>	USA	Neugeborenes
MHI 21039	E 823	<i>Cronobacter sakazakii</i>	USA	Neugeborenes
MHI 21040	E 824	<i>Cronobacter sakazakii</i>	USA	Human
MHI 21041	E 901	<i>Cronobacter sakazakii</i>	USA	Klinisches Isolat
MHI 21031	E 793	<i>Cronobacter muytjensii</i>	USA	Human
MHI 21026	3032	<i>Cronobacter turicensis</i>	Schweiz	Neugeborenes
MHI 21049	E 625	<i>Cronobacter turicensis</i>	Korea	Babynahrung
MHI 21050	E 609	<i>Cronobacter turicensis</i>	Großbritannien	Lebensmittel
MHI 981		<i>Cronobacter universalis</i>	Deutschland	Milchpulver

Fortsetzung Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung		Spezies	Herkunftsland	Herkunft
Sonstige gramnegative Enterobacteriaceae				
MHI 708	DSMZ 499	<i>Escherichia coli</i>	Deutschland	unbekannt
MHI 712		<i>Escherichia coli</i>	Deutschland	unbekannt
MHI 815		<i>Escherichia coli</i>	Deutschland	unbekannt
MHI 902	DSMZ 30039	<i>Citrobacter freundii</i>	Deutschland	Typstamm
MHI 903	DSMZ 30047	<i>Citrobacter sp.</i>	Deutschland	Hackfleisch
MHI 904	DSMZ 30054	<i>Enterobacter cloacae</i>	Deutschland	Spinalflüssigkeit
MHI 905		<i>Moellerella wisconsensis</i>	Deutschland	Rohschinken
MHI 906	DSMZ 5570	<i>Shigella sonnei</i>	unbekannt	Typstamm
MHI 909	DSMZ 10062	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Senftenberg	Deutschland	unbekannt
MHI 910	DSMZ 30097	<i>Hafnia alvei</i>	Deutschland	unbekannt
MHI 911	DSMZ 788	<i>Proteus mirabilis</i>	Deutschland	unbekannt
MHI 913	DSMZ 30119	<i>Proteus vulgaris</i>	Deutschland	Faeces
MHI 914	DSMZ 4782	<i>Shigella flexneri</i>	Deutschland	Typstamm
MHI 952	DSMZ 6676	<i>Providencia stuartii</i>	Deutschland	Faeces (Kind)
MHI 955	DSMZ4560	<i>Enterobacter hermannii</i>	Deutschland	Human (Fuß)
MHI 968		<i>Enterobacter asburiae</i>	Japan	unbekannt
MHI 969		<i>Enterobacter aerogenes</i> WS 1292	Deutschland	unbekannt
MHI 973	DSMZ 4780	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Deutschland	Human (Nasenschleim)
MHI 974	DSMZ 4480	<i>Serratia rubidea</i>	Deutschland	Typstamm
MHI 991	DSMZ 6675	<i>Morganella morganii</i>	Deutschland	Faeces (Kind)
MHI 21024		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	unbekannt	Kolostrum (Kalb)
Ohne	BL 21	<i>Escherichia coli</i>	Deutschland	unbekannt
Sonstige Gramnegative Keime				
MHI 954	DSMZ 2403	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Deutschland	Typstamm
MHI 1000	DSMZ 939	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Deutschland	Wasser
MHI 1001	DSMZ 4358	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Deutschland	Rohmilch
MHI 1004	DSMZ 30020	<i>Aeromonas media</i>	Deutschland	pasteurisierte Milch
MHI 1007	DSMZ 30004	<i>Achromobacter liquefaciens</i>	Deutschland	unbekannt
MHI 1017	DSMZ 291	<i>Pseudomonas putida</i>	Deutschland	Laktatanreicherung

Fortsetzung Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung		Spezies	Herkunftsland	Herkunft
Grampositive Keime				
MHI 163	DSMZ 4384	<i>Bacillus cereus</i>	Deutschland	Lebensmittelvergiftung
MHI 348	DSMZ 20372	<i>Staphylococcus aureus</i>	unbekannt	unbekannt
MHI 379		<i>Staphylococcus aureus</i>	unbekannt	Milch
MHI 409		<i>Staphylococcus aureus</i>	unbekannt	Kolostrum
MHI 414	DSMZ 20491	<i>Staphylococcus aureus</i>	unbekannt	unbekannt

3.1.3 Lösungen, Puffer und NährmedienAnzucht der Bakterien

- **Luria-Bertani-Medium (LB):** 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, A. dest. ad 1000 ml (pH 7,0)

Lyse von Bakterien

- **Lyse-Puffer:** 20 mg Polymyxin-B-Sulfat, 0,4 mg DNase, 9,5 mg MgCl₂, 80 µg RNase, 1,5 ml Complete-Mini-Stock-Solution, PBS ad 10 ml

EIA

- **Bicarbonatpuffer:** (pH 9,6): 1.000 ml A. dest., 1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃
- **Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):** 1000 ml A. dest., 6,79 g NaCl, 1,47 g Na₂HPO₄, 0,43 g KH₂PO₄ (pH 7,3)
- **Absättigungslösung:** 3 g Casein, 97 ml PBS
- **Waschlösung:** 1000 ml A. dest., 8,55 g NaCl, 2,5 ml Tween 20
- **TMB-Lösung:** 9 ml Methanol, 1 ml Aceton, 50,4 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
- **H₂O₂-Puffer:** 800 ml A. dest., 44,129 g Citronensäure Monohydrat, 200 ml 1M KOH (pH 3,95), 336 µl H₂O₂
- **Chromogen-/ Substratlösung:** 20 ml H₂O₂-Puffer, 1 ml TMB-Lösung
- **Stopplösung:** 1 mol/l H₂SO₄

SDS-PAGE bzw. 2-D-Elektrophorese

- **Tris/HCl-Puffer:** 0,73 g Tris, A. dest. ad 100 ml, HCl bis pH 8,0
- **SDS-Puffer:** 0,2 g EDTA, 15 g SDS, Tris/HCl ad 200 ml
- **Bromphenolblau-Lösung:** 0,3% (w/v) Bromphenolblau in A. dest.
- **Coomassie-Färbelösung:** 1 Tablette Coomassie Blue R "PhastGel", 120 ml Methanol, 80 ml A. dest.
- **Entfärbler:** 300 ml A. dest., 150 ml Methanol, 50 ml Eisessig
- **Fixierer:** 425 ml A. dest., 50 ml Eisessig, 25 ml Glycerin

Immunoblot

- **Anodenpuffer I:** 37,2 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1000 ml
- **Anodenpuffer II:** 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1000 ml
- **Kathodenpuffer:** 5,24 g 6-Amino-n-Capronsäure, 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1000 ml
- **Absättigungslösung:** 3 g Casein, 97 ml A. dest., 25 µl Tween 20
- **Entfärbelösung:** 5 ml Eisessig, A. dest. ad 100 ml
- **Detektionslösung:** Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (Thermo, 34095)

Zellkultur

- **HT- Medium:** 500 ml Dulbecco´s Medium, 100 ml FCS, 5 ml Na-Pyruvat-Lösung (100 mM), 10 ml L-Glutaminlösung (200 mM), 5 ml Mercaptoethanolösung (5 mM), 5 ml Hypoxanthin (100 mM)/ Thymidin (16 mM)
- **HAT-Selektivmedium:** HT-Medium + Aminopterin (1 Fläschchen in 10 ml sterilem PBS gelöst)

LPS-Präparation und Detektion

- **TAE-Puffer:** 540 mM Tris-Acetat-Puffer (pH 8,5), 2 mM EDTA (steril filtriert)
- **Lösung I:** 0,3 g SDS, 0,6 g Trizma base, 1,28 ml 1N NaOH, A. dest. ad 10 ml
- **Lösung II:** 0,5 ml 1M Tris-HCl (pH 8), 333 µl 3M Na-Acetat, A. dest. ad 10 ml
- **3M Na-Acetat (pH 5,2)**
- **Phenollösung:** Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (1:1:24)

- **2x SDS-Ladepuffer:** 120 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% Glycerin, 4% SDS, 8% β -Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenolblau
- **Fixierlösung:** 40 ml Ethanol (absolut), 5 ml Essigsäure (96%), 55 ml A. dest.
- **Fixierlösung mit Na-Perjodat**, frisch herstellen: 200 ml Fixierlösung, 1,4 g Na-Perjodat
- **Färbelösung**, frisch herstellen: 140,2 ml A. dest., 2,8 ml 1N NaOH, 2 ml Ammoniak (32%), 5 ml AgNO₃-Lösung (20% in A. dest.)
Die Reihenfolge der Substanzzugabe ist einzuhalten!
- **Entwickler**, frisch herstellen: 200 ml A. dest., 10 mg Citronensäure, 100 μ l Formaldehyd (37%)
- **50 mM EDTA-Lösung:** 3,42 g EDTA, A. dest. ad 200 ml
- **TBS:** 0,48 g TRIS, 1,8 g NaCl, A. dest. ad 200 ml
- **Blotpuffer:** 3,03 g TRIS, 14,4 g Glycin, 200 ml Methanol, 800 ml A. dest.
- **Absättigungslösung**, frisch herstellen: 0,2 g Tween 20,6 g Magermilchpulver, TBS ad 200 ml; Magermilchpulver unter Erwärmen lösen und durch einen Papierfilter filtrieren

Sonstiges

- **Proteinase-K-Lösung (PK):** 1,0 mg Proteinase K, A. dest ad 1000 μ l

3.1.4 Weitere Materialien

EIA

Mikrotiterplatten (96 well, Nunc, Immuno Plate Maxi Sorp, 439454)

Bradford-Bestimmung

Küvette, Quarzglas suprasil 10,00 mm (Hellma)

SDS-PAGE

PhastGelTM Gradient 10-15 (GE Healthcare, 17-0540-01)

PhastGelTM SDS-Buffer Strips Pufferstreifen (GE Healthcare, 17-0516-01)

PhastGelTM Sample Appl. 8/1 (GE Healthcare 18-1618-01)

Immunoblot

Immobilon-P Transfer Membrane PVDF 0,45 µm (Millipore, IPVH304F0)
Electrode Paper Novablot (GE Healthcare, 80-1106-19)

2-D-Elektrophorese

Electrode Wicks (BIO-RAD, 1654071)
IPG-Strips 11 cm, pH 4-7 (BIO-RAD 163-2015)
IPG-Strips 11 cm, pH 5-8 (BIO-RAD 163-2018)
PROTEAN i12 IEF Cell 11 cm rehydration trays (BIO-RAD, 1654025)
Criterion Tris-HCl Gel 10%, IPG + 1 well, 11 cm (BIO-RAD, 345-0101)
Criterion Tris-HCl Gel 12,5%, IPG + 1 well, 11 cm (BIO-RAD, 345-0102)
Criterion XT Bis-Tris Gel 12%, IPG + 1 well, 11 cm (BIO-RAD, 345-0121)

Zellfusion

Maus-Myelomzellen X63-Ag8.653 (DSM, ACC-43)
Mikrotiterplatten (96 well, Nunc, 436110)

LPS-Präparation und Detektion

Criterion XT Bis-Tris Gel 12%, 18 Well Comb, 30 µl, 1.0 mm (BIO-RAD, 345-0118)
Immobilon-P Transfer Membrane PVDF 0,45 µm (Millipore, IPVH304F0)
Criterion Blotter Filter Papier (BIO-RAD, 1704085)

Sonstiges

Columbia-Agar mit Schafblut Plus Platten (Oxoid, PB5039A)
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore, UFC803024)
Eppendorf Reaktionsgefäß 0,5 ml (Eppendorf, 0030 121.023)
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml (Eppendorf, 0030 120.086)
Eppendorf Reaktionsgefäß 2,0 ml (Eppendorf, 0030 120.094)
Filterpapier Grade 3 hw (Munktell, 4.303.150)
Gold Seal, 22 x 22 mm (Sciences Services GmbH, E63757-01)
Lysing Matrix B (MP Biomedicals, 6911-050)
Millex GV Filter Unit 0.22 µm (Millipore, SLGV033RB)
PP-Röhrchen, steril, 15 ml (Greiner bio-one, 188271) und 50 ml (Greiner bio-one, 227261)
Zählkammer nach Thoma (Brand)

3.1.5 Geräte

Gelelektrophorese

Criterion Cell (BIO-RAD)

Phast System Separation and Control Unit (Amersham Pharmacia Biotech)

Protean IEF Cell (BIO-RAD)

GS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD)

EPS 1001 (GE Healthcare)

Power Pac HC (BIO-RAD)

Immunoblot

Novo Blot Multiphor II (Amersham Biosciences)

Kodak Image Station 200MM (Biostep)

Criterion Blotter 560BR (BIO-RAD)

Sonstige:

Autoklav: Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH)

Brutschrank: Brutschrank - Memmert

Heizblock: Thermomixer comfort (Eppendorf)

Magnetrührer: AREX Heating Magnetic Stirrer (VELP Scientifica)

Mikroskop: Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence)

pH-Meter: inoLab (wtw)

Photometer: Photometer UV - 1602 (Shimadzu Corporation)

Autoreader: Sunrise (Tecan)

Pipetten: Eppendorf Research 10-100 µl, 10-300 µl

Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 100-1000 µl

Ribolyser: Hybaid Ribolyser Homogenisator (Hybaid GmbH)

Schüttler: Vortex-Genie Model K-550-GE (Merck)

Schüttelinkubator: Controlled Environment Incub. Shaker (New Brunswick)

Sterilbank: Sterilwerkbank HERA-safe (Heraeus)

Taumler: Heidolph Polymax 1040 (Schütt)

Waagen: Sartorius excellence

Sartorius research

Zentrifugen: Zentrifuge Multifugee 1 S-R (Heraeus)
 Biofuge pico (Heraeus)
 Suprafuge 22 (Heraeus)

3.1.6 Software

Bildanalyse Software, BZ-Analyser für Fluoreszenzmikroskop (Keyence)
RIDAWIN (R-Biopharm AG)
KODAK 1D 3.6. software (Biostep)
PDQuest 2-D-Analysis software 2003 (BIO-RAD)

3.2 Methodik

3.2.1 Bradford-Bestimmung

Um den Proteingehalt von Proben zu bestimmen, wurden 5 µl proteinhaltiges Probenmaterial mit 5 µl A. dest. verdünnt und mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Als Blindwert wurden 5 µl A. dest. wie eine Probe behandelt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln über einen Zeitraum von 10 min. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben photometrisch bei 595 nm gegen den Blindwert vermessen und über eine Kalibriergerade (0–500 µg/ml bovines Serumalbumin) der Proteingehalt quantitativ bestimmt.

Prinzipiell wurden Bestimmungen der Proteinkonzentration mittels Bradford im Rahmen dieser Arbeit nur für die hergestellten Lysate (3.3.1) durchgeführt, da die Ghost-Präparationen (3.3.1) aufgrund ihrer Zusammensetzung (Suspension von unlöslichen Zellbestandteilen) diversen Verdünnungsschritten unterzogen werden mussten, um die Trübung des Probenmaterials soweit zu reduzieren, dass eine valide photometrische Bestimmung erfolgen konnte.

3.2.2 Enzymimmuntest (EIA)

Für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Cronobacter* spp. in Seren immunisierter Mäuse bzw. Zellkulturüberständen (ZKÜ) der generierten Hybridoma-Zelllinien, wurden indirekte EIA-Verfahren unter Verwendung verschiedener Antigen-Präparationen eingesetzt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit gleich bleibenden Konzentrationen der Antigen-Präparationen (3.3.4.1; verdünnt in Bicarbonatpuffer; 100 µl/Kavität) beschickt und bei Raumtemperatur (Ausnahme: unbehandeltes Keimmaterial bei 4 °C) über Nacht inkubiert.

Anschließend wurden die Platten ausgeschlagen und die Kavitäten mit je 200 µl Absättigungslösung versetzt. Nach 2-3 h wurden die Platten erneut ausgeschlagen, dreimal mit Waschlösung gespült und auf einem Stapel mit Filterpapier trocken geschlagen. Danach wurde eine Verdünnungsreihe der polyklonalen Maus-Antiseren bzw. antikörperhaltigen ZKÜ zugegeben (100 µl/Kavität). Nach einstündiger Inkubationszeit und viermaligem Waschen mit Waschlösung wurden in jede Kavität 100 µl der peroxidasemarkierten Sekundärantikörper (Anti-Maus-Ig-HRP; verdünnt 1:3.000 in 1% Casein/PBS) pipettiert und erneut eine Stunde inkubiert. Nach einem dritten Waschschritt (5-maliges Spülen) wurden in

jede Kavität 100 µl Substrat/Chromogenlösung gegeben und nach 20 min die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung beendet. Mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät (Autoreader) erfolgte abschließend die Bestimmung der Extinktion bei 450 nm.

Die Bestimmung der Affinität bzw. der Spezifität der hergestellten Antikörper erfolgte unter identischen EIA-Bedingungen, mit dem Unterschied, dass hierbei eine Verdünnungsreihe der Antigen-Präparationen zur Beschickung der Platten verwendet wurde und die Antikörper in gleich bleibender Konzentration eingesetzt wurden.

3.2.3 Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Zur Auftrennung der Proteine wurden 20 µl Probenmaterial, 10 µl SDS-Puffer sowie 1 µl Bromphenolblaulösung vermischt und für 5 min auf 100 °C erhitzt. Aliquote jeder Probe (1 µl, max. 2 µg Protein) wurden auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 15 °C und 10 mA in einem Spannungsgradienten von 110 bis 240 V.

Für eine anschließende Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau wurden die Gele in filtrierter Coomassie-Färbelösung für 60 min auf einem Taumler inkubiert und im Anschluss über 2 h mit Entfärbelösung entfärbt. Danach wurden die Gele kurz mit A. dest abgespült und abschließend für 10 min mit Fixierlösung behandelt.

3.2.4 2-D-Elektrophorese

Ein etwa 150–250 µg Protein enthaltendes Aliquot des Probenmaterials (Lysate nach Polymyxinbehandlung; 3.3.2) wurde mit 1,5 ml 2-D-Sample-Puffer versetzt und anschließend mittels Ultrafiltrationseinheiten auf ein Volumen von etwa 120 µl aufkonzentriert. Der Ansatz wurde auf einen 11 cm-IEF-Strip aufgetragen und für 12 h inkubiert. Anschließend wurde der Gelstreifen zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) in die Protean-IEF-Cell eingebracht. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde der IEF-Strip während der Inkubation und der isoelektrischen Fokussierung mit Mineralöl beschichtet.

Die IEF wurde bei 20 °C unter folgenden technischen Bedingungen durchgeführt:

	Spannung	Zeit	Volt-Hours	Verlauf	Rehydrierung	Strom
	[V]		[V-hr]			[µA/strip]
Stufe 1	250	20 min	-	linear	inaktiv	max. 50
Stufe 2	8.000	2,5 h	-	linear	inaktiv	max. 50
Stufe 3	8.000	-	20.000	rapid	inaktiv	max. 50

Nach Abschluss der isoelektrischen Fokussierung wurde der Gelstreifen je 10 min in Equilibration-Puffer I und II konditioniert und nach kurzem Abspülen mit Running-Puffer in die vorgesehene Aussparung des 2D-Gels eingebracht. Luftreste in der Aussparung wurden durch Auffüllen mit erwärmer Agarose entfernt. In eine weitere Kavität des Gels wurden 5 µl der Referenzproteinlösung pipettiert. Nach ca. 5 min (Verfestigung der Agarose) konnte das Gel in die Elektrophoresekammer eingebracht werden. Die Apparatur wurde vollständig mit Running Puffer befüllt und die Elektrophorese bei 200 V durchgeführt (35 bis 60 min). Im Anschluss wurde das Gel entweder mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt oder mittels Immunoblot weiter untersucht.

3.2.5 Generierung von Hybridomzelllinien

Die Zellfusionen wurden, wie von Wiescher (2013) beschrieben, durchgeführt. Nach Entnahme der Milz und Präparation einer Einzelzellsuspension wurde das Zellmaterial unter Verwendung von Polyethylenglykol 1500 mit Maus-Myelomzellen der Linie X36-Ag8.653 fusioniert. Zur Kultivierung der Fusionsprodukte wurden mit Makrophagen vorbeschichtete Mikrotiterplatten ($2,5 \times 10^3$ Zellen/Kavität) verwendet.

Der erste Test auf Produktion von Antikörpern erfolgte mittels indirektem EIA (3.3.5) 12 d nach Zellfusion. Positiv reagierende Klone wurden weiter vermehrt und mittels Endpunktverdünnung (Limiting-dilution-Technik) kloniert. Die Isotypisierung der selektierten Klone erfolgte mittels eines Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kits.

3.2.6 Immunoblot

Zur Überprüfung der Reaktivität generierter Antikörper wurde über SDS-PAGE (3.2.3) oder 2-D-Elektrophorese (3.2.4) aufgetrenntes Probenmaterial mittels Semidry-Blotting in

einem Novo Blot Multiphor II-Gerät für 1 h bei 0,8 mA/cm² auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Aufbau dieses Verfahrens ist in Abbildung 2 skizziert.

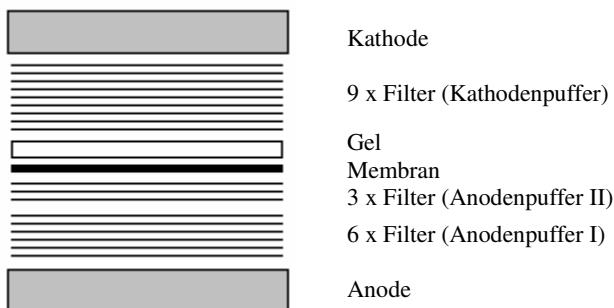


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Graphitblotters für Semidry-Blotting

Nach erfolgtem Blotting wurden die Membranen mit Ponceau-S-Lösung angefärbt und mit 5% (v/v) Essigsäure entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Position der Referenzproteine wurde markiert. Anschließend wurden zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen die Membranen über Nacht in Absättigungslösung inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Primärantikörper in Form von Zellkulturüberständen (ZKÜ) der Hybridome (i.d.R. eingesetzt in einer Verdünnung von 1:10 in 3%- Casein-PBS-Tween-Lösung) für 1 h. Nach einem Waschschritt [3 x 10 min in PBS unter Zusatz von 0,025% (v/v) Tween 20] wurde der Blot für 1 h mit peroxidasemarkierten Sekundärantikörpern (Kaninchen-anti-Maus; 1:1.500 in 3%-Casein-PBS-Tween) inkubiert und der Waschschritt wiederholt. Nach weiteren 10 min, in denen die Membran in PBS gespült wurde, erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit Immobilon Western-Chemiluminescent-HRP-Substrat. Abschließend wurde die Lumineszenzsentwicklung auf der Membran über eine Kodak Image Station ermittelt.

Alternativ erfolgte die Detektion der enzymmarkierten sekundären Antikörper auf der Membran unter Verwendung der NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets.

3.2.7 Immunfluoreszenz

Um Aussagen über Bindungseigenschaften von Antikörpern an Oberflächenstrukturen vitaler Bakterien treffen zu können, wurden Immunfluoreszenztests durchgeführt. Dazu wurden über Nacht Bakterien ausgewählter Stämme in 10 ml LB bei 37 °C im Schüttelinkubator angezüchtet. Ein Aliquot der Kultur (20 µl) wurde mit 230 µl PBS versetzt und bei 7.000 x g für 15 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde nach Entfernen des

Überstandes in 225 µl PBS unter Zusatz von 1% (v/v) Tween 20 aufgenommen, mit 25 µl des zu testenden antikörperhaltigen ZKÜ versetzt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach wurde erneut bei 7.000 x g für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 250 µl PBS resuspendiert. Folgende Arbeitsschritte wurden anschließend im Dunkeln ausgeführt:

- Zugabe von 1 µl fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (Anti-Mouse Fab-Fragment)
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Zentrifugation (7.000 x g, 15 min)
- Pellet aufnehmen in 250 µl PBS.

Ein Aliquot der erhaltenen Suspension (40 µl) wurde abschließend mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Das beschriebene Verfahren kam auch für die Untersuchung von Bakterienpräparationen nach Polymyxin-B-Verdau zur Anwendung. Dabei wurden statt der lebenden Keime Aliquote der nach 3.3.2 hergestellten Ghost-Präparationen (5 µl) wie oben beschrieben aufgearbeitet und untersucht.

3.2.8 Präparation und Detektion von Lipopolysacchariden

Im Rahmen von Untersuchungen zur Epitop-Spezifität der generierten Antikörper, wurden Lipopolysaccharid-Präparationen verschiedener Bakterienstämme hergestellt und analysiert.

3.2.8.1 Isolierung von Lipopolysacchariden

Bakterien ausgewählter Stämme wurden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C angereichert; 2 x 1 ml dieser Anzuchten wurden dann bei 13.000 x g für 2 min zentrifugiert und anschließend die Pellets in 100 µl TAE-Puffer resuspendiert. Jeder Probe wurden 200 µl Lösung I (3.1.3) zugegeben und vorsichtig 6-8 mal invertiert. Die Ansätze wurden ca. 20 min bei 100 °C inkubiert und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden 200 µl Phenollösung zu jedem Ansatz gegeben, durch Invertieren homogenisiert und 15 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die abgetrennte wässrige obere Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und als Präparation für das weitere Verfahren genutzt. Dieser Arbeitsschritt, der der Extraktion der Lipopolysaccharide und deren Anreicherung in der wässrigen Phase dient, wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Anschließend wurden die Präparationen mit 200 µl A. dest. und 50 µl 3M Na-Acetat (pH 5,2) versetzt. Zum Ausfällen der LPS wurden jeweils 500 µl Ethanol (absolut) zugegeben, invertiert und 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in je 200 µl Lösung II (3.1.3) aufgenommen. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt und das Präzipitat nach einem Trocknungsschritt (10-20 min bei 45 °C im Heizblock zur Entfernung von Ethanolresten) in 50 µl A. dest. gelöst. Die erhaltene LPS-Präparation wurde für maximal eine Woche bei 4 °C aufbewahrt oder direkt mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C erhitzt. Aliquote der Aufarbeitung wurden dann auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Trenngel wurde ein Criterion XT Bis-Tris Gel 12% verwendet, die Auftrennung erfolgte bei konstant 200 V für ca. 45 min.

3.2.8.2 Silberfärbung

Zum Sichtbarmachen der aufgetrennten LPS mittels Silberfärbung wurde das Trenngel in 200 ml Fixierlösung über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Anschließend erfolgte ein Oxidationsschritt durch Inkubation in Fixierlösung mit Zusatz von Na-Perjodat (7 g/l) unter leichtem Schwenken (40 rpm) für 5 bis 10 min. Danach wurde das Gel 3 x 15 min in 500 ml A. dest. unter Schwenken (40 rpm) gewaschen, bevor es für 10 min unter Schwenken (70 rpm) in Färbelösung inkubiert wurde. Es folgten drei weitere Waschschritte (3 x 10 min mit 500 ml A. dest. bei 40 rpm). Im Anschluss wurde das Gel in Entwicklerlösung gelegt. Bevor sich der Hintergrund braun verfärbte, wurde der Entwickler abdekantiert und die Reaktion mit 50 ml 50 mM EDTA (pH 8) gestoppt. Nach etwa 10 min wurde das Gel in A. dest. überführt und bei 4 °C gelagert.

3.2.8.3 Immunoblot

Das Übertragen der LPS vom Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte über einen Zeitraum von 16 h bei 4 °C in einem Tankblotgerät bei einer Spannung von 10 V (max. 40 mA). Das weitere Vorgehen erfolgte analog dem unter 3.2.6 beschriebenen Verfahren, wobei folgende Modifikationen im Versuchsablauf eingesetzt wurden:

- längere Inkubationszeit der Primärantikörper (2 d),
- Verwendung von PBS unter Zusatz von 0,1% (v/v) Tween 20 als Waschlösung,
- Einsatz von Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Präparation des Immunisierungsmaterials

Bei herkömmlichen Verfahren zur Herstellung und Inaktivierung von Bakterienpräparationen, wie z.B. unter Verwendung von Paraformaldehyd oder auch durch Temperaturbehandlung, ist mit deutlichen Veränderungen der Oberflächenstrukturen der Bakterien und einer Denaturierung von Membranproteinen zu rechnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte für die Immunisierung von Mäusen zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen *Cronobacter* spp. Immunisierungsmaterial zum Einsatz kommen, bei dem potentiell immunogene Zielstrukturen der Bakterien in möglichst unveränderter Form vorliegen. Um diese Vorgaben erfüllen zu können, wurde ein Aufarbeitungsverfahren etabliert, bei dem die Bakterien abgetötet und die Oberflächenstrukturen der Mikroorganismen weitgehend erhalten werden:

Das Antibiotikum Polymyxin B wurde aufgrund seiner speziellen Eigenschaften für die Herstellung der Immunogen-Präparationen ausgewählt. Polymyxin B gehört zur Gruppe der Polypeptid-Antibiotika. Gebildet werden diese Decapeptide, die bakterizid auf gramnegative Erreger wirken, durch das Bakterium *Bacillus polymyxa* (Stansly & Schlosser, 1947). Strukturell bestehen Polymyxine aus einem hydrophilen Ring (sieben Aminoacylreste), an dem über eine Amidbindung ein Tripeptid gebunden, das mit einem Fettsäurerest verestert ist. Er verleiht dem Molekül durch seine Lipophilie einen amphiphilen Charakter (Hausmann & Craig, 1954; Hausmann, 1956; Wilkinson & Lowe, 1964). Die bakterizide Wirkung der Polymyxine beruht auf einer Adhäsion an die bakterielle Zellwand gramnegativer Bakterien (Few & Schulman, 1953; Neter et al., 1958) in deren Folge es durch strukturelle Wechselwirkungen zu einer partiellen Desorganisation der Membranstruktur (Schindler & Teuber, 1975) und damit zu einer Permeabilitätsverhöhung der Membran kommt (Koch, 1998; Pristovsek & Kidric, 1999).

Durch die Behandlung von Bakterien mit Polymyxin-B-Sulfat können prinzipiell zwei unterschiedliche Kategorien von Immunisierungsmaterial gewonnen werden. Durch einen Zentrifugationsschritt nach Polymyxin-B-Verdau wird mit dem Pellet einerseits Material generiert, das v.a. potentiell immunogen wirkende Bestandteile der Bakterienzellwand enthält, andererseits kann auch der nach Zentrifugation erhaltene Überstand, der theoretisch v.a. Bestandteile des Cytoplasmas enthält, als Immunogen eingesetzt werden (Lysat).

Aufnahmen von behandelten Bakterien unter dem Phasenkontrastmikroskop nach Polymyxin-B-Verdau zeigten, dass nach einer 1,5 stündigen Inkubationszeit noch Cytoskelette der behandelten Bakterien zu erkennen sind. Diese bakteriellen Zellhüllen, die nach Zelllyse von den ausgetretenen Cytoplasmabestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt werden können, werden im weiteren Verlauf der Arbeit als „Ghosts“ bezeichnet (in Anlehnung an: Langemann et al., 2010; Jalava et al., 2003). Signifikante strukturelle Unterschiede zwischen vitalen Bakterien und Polymyxin-B-Präparationen konnten lichtmikroskopisch nicht sichtbar gemacht werden. Dies ist in Abbildung 3 am Beispiel der Stämme *C. turicensis* MHI 21026 und *C. sakazakii* MHI 21001 dargestellt.

Eine Differenzierung zwischen Ghosts und lebenden Bakterien war lediglich anhand deutlicher Unterschiede in der Motilität möglich. Während nach Polymyxin-Behandlung in den Präparationen nun mehr unbewegliche Ghosts zu sehen waren, zeigten die unbehandelten Organismen eine deutlich ausgeprägte Motilität. Zellwand-Trümmer waren in den Polymyxin-B-Sulfat-Präparationen nicht zu beobachten - ein Hinweis darauf, dass mit Polymyxin-B-Sulfat ein Abtöten der Bakterien unter weitgehender Strukturerhaltung möglich ist.

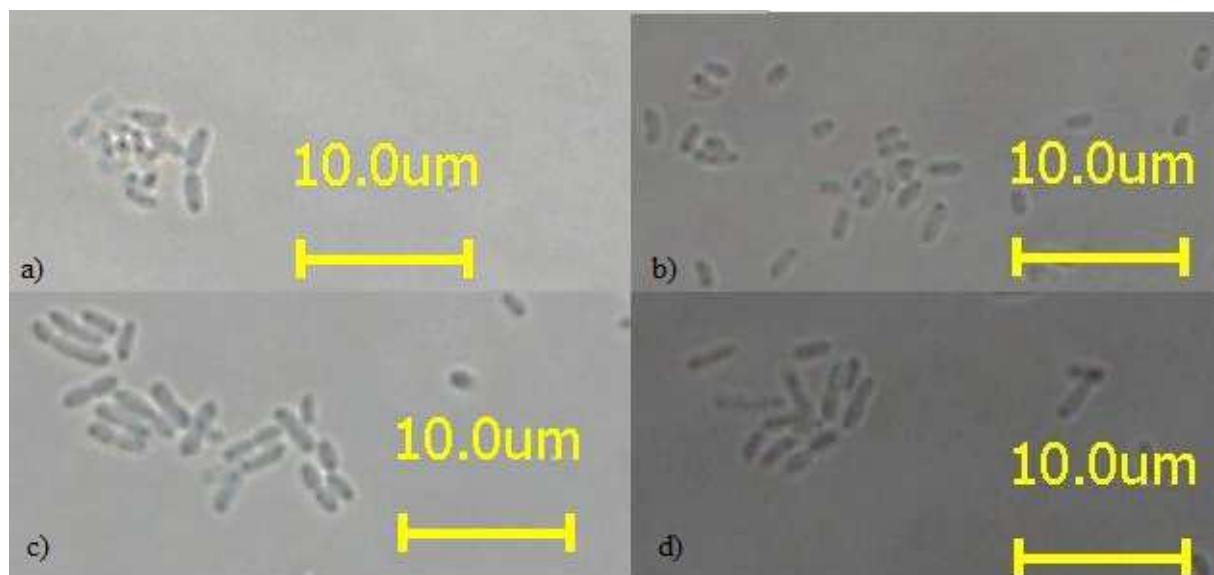


Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahmen der Stämme *C. sakazakii* MHI 21001 (a, b) bzw. *C. turicensis* MHI 21026 (c, d)
a)/c) vitale unbehandelte Bakterien
b)/d) nach Behandlung mit Polymyxin-B-Sulfat (Ghost-Präparationen)

Bei der Auswahl der Stämme (Tabelle 4) für die Herstellung der Immunogen-Präparationen wurden folgende Auswahlkriterien festgelegt:

- (I) Verwendung mindestens zwei verschiedener Spezies der Gattung *Cronobacter*,
- (II) unterschiedliche geographische Herkunft der Stämme,
- (III) verschiedene Matrices aus denen die Stämme isoliert wurden und
- (IV) mindestens ein Stamm, der nachweislich zu Erkrankungsfällen geführt hat.

Tabelle 4: Zur Gewinnung der Immunogene genutzte *Cronobacter* spp. Stämme

Mikroorganismus	Stamm	Herkunftsland
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21001	Deutschland
<i>Cronobacter turicensis</i>	MHI 21026	Schweiz
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21040	USA

C. sakazakii MHI 21001 wurde in Deutschland aus Babynahrung isoliert. Bei den Stämmen *C. turicensis* MHI 21026 und *C. sakazakii* MHI 21040 handelt es sich jeweils um klinische Isolate, wobei dem Stamm *C. turicensis* MHI 21026 zwei schwere Erkrankungsfälle Neugeborener zugeordnet werden können (Mange et al., 2006).

3.3.1.1 Empfindlichkeit verschiedener Bakterienstämme gegenüber Polymyxin B

Zur Etablierung des oben skizzierten Verfahrens wurden zunächst die in Tabelle 4 aufgeführten drei Stämme der Gattung *Cronobacter* sowie, um das Untersuchungsspektrum auf andere gramnegative Bakterien zu erweitern, drei weitere Bakterienstämme der Gattungen *Escherichia*, *Salmonella* und *Yersinia* (siehe Tabelle 5) mit polymyxinhaltigem Lysepuffer (3.1.3) versetzt. Nach einer definierten Inkubationszeit bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurde eine Öse der Bakteriensuspension auf Blutagarplatten ausgestrichen, diese über Nacht bei ebenfalls 37 °C im Brutschrank inkubiert und im Anschluss ausgewertet.

Zunächst wurde das Präzipitat einer 50 ml Anzucht in Luria-Bertani-(LB)-Medium (37 °C; über Nacht), das durch Zentrifugation (10.000 x g, 4 °C, 10 min) gewonnen worden war, für 1 h mit 0,5 ml des polymyxinhaltigen Lysepuffers (3.1.3) behandelt. Wie in Tabelle 5 (Variante 1) dargestellt, zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Bakterien nicht vollständig abgetötet werden können. Um die Effizienz der Polymyxin-B-Sulfat-Behandlung zu erhöhen, wurde die Inkubationszeit auf 1,5 h und die Menge des eingesetzten Lysepuffers auf 1 ml erhöht. Durch diese Modifikationen konnte die Wirksamkeit des Verfahrens signifikant verbessert werden (Tabelle 5; Variante 2).

Tabelle 5: Effekt verschiedener Varianten einer Polymyxin-B-Behandlung auf Vertreter der Familie Enterobacteriaceae.

- Variante 1: Zell-Pellet behandelt mit 0,5 ml Polymyxin-B-Sulfat-Lysepuffer für 1 h bei 37 °C
- Variante 2: Zell-Pellet behandelt mit 1,0 ml Polymyxin-B-Sulfat-Lysepuffer für 1,5 h bei 37 °C

Mikroorganismus	Stamm	Wachstum	
		Variante 1	Variante 2
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21001	++	+/-
<i>Cronobacter turicensis</i>	MHI 21026	-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21040	-	-
<i>Escherichia coli</i>	BL 21	++	++
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Senftenberg	MHI 909	++	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MHI 973	-	-

- vollständig abgetötet (keine Einzelkolonien im Ösenausstrich auf Blutagar)
+/- in verschiedenen Ansätzen entweder vollständig abgetötet oder einzelne Kolonien
++ deutliches Wachstum (Bildung eines Bakterienrasens nach Ösenausstrich auf Blutagar)

Von den zunächst sechs untersuchten Stämmen war unter den geänderten Versuchsbedingungen lediglich bei *E. coli* BL 21 ein deutliches Wachstum auch nach Polymyxin-B-Sulfat-Verdau zu verzeichnen. Bei allen anderen untersuchten Stämmen trat nach Polymyxin-Behandlung eine weitestgehende Inaktivierung des Keimmaterials auf.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Untersuchungen (Variante 2) auf die in Tabelle sechs aufgeführten Stämme ausgeweitet. Die Untersuchungen zielten darauf ab, mögliche Resistenzen der für die Folgeuntersuchungen genutzten Stämme gegenüber Polymyxin B zu identifizieren und damit die Informationen der Stammbibliothek zu ergänzen. Grundsätzlich wurden im Laufe der Untersuchungen von allen mit Polymyxin behandelten Präparationen Kontrollausstriche auf Blutagar angelegt. Dieser Arbeitsschritt diente als In-Prozess-Kontrolle, um die Effektivität des Polymyxin-B-Verdaus zu überprüfen.

Ein Großteil der untersuchten Stämme zeigte eine deutliche Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit Polymyxin-B-Sulfat. Bei fünf der untersuchten Stämme war jedoch auch nach einer 1,5 stündigen Polymyxin-B-Behandlung ein deutliches Wachstum zu verzeichnen (BL 21, MHI 904, MHI 913, MHI 968, MHI 974). Bei keinem dieser resistenten Stämme handelte es sich um *Cronobacter* spp.

Tabelle 6: Effekt des Polymyxin-B-Verdaus auf das Wachstum gramnegativer Keime. Angegeben ist zudem die nach Polymyxin-Behandlung nachweisbare Proteinkonzentration (Bradford-Bestimmung) im zellfreien Überstand.

Mikroorganismus	Stamm	Wachstum nach Polymyxin-B-Behandlung	Protein-konzentration im Lysat (mg/ml) ¹
<i>Cronobacter</i> spp.			
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 975	-	3,7
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 977	-	3,3
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 979	-	3,7
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 982	-	2,0
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 986	-	3,1
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 987	-	3,1
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 990	-	2,8
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 992	-	2,5
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 995	+	1,2
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21000	-	1,3
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21002	-	3,2
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21008	-	2,3
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21011	-	1,9
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21012	-	2,9
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21027	+/-	1,5
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21028	+/-	3,0
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21029	+/-	1,7
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21030	+/-	3,1
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21032	+/-	3
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21039	+/-	3,8
<i>Cronobacter sakazakii</i>	MHI 21035	+/-	2,1
<i>Cronobacter universalis</i>	MHI 981	-	3,4
<i>Cronobacter muytjensii</i>	MHI 21031	-	4,6
<i>Cronobacter turicensis</i>	MHI 21049	-	1,8
<i>Cronobacter turicensis</i>	MHI 21050	-	1,9
Sonstige gramnegative Enterobacteriaceae			
<i>Citrobacter freundii</i>	MHI 902	-	2,4
<i>Enterobacter cloacae</i>	MHI 904	++	1,2

Fortsetzung Tabelle 6: Effekt des Polymyxin-B-Verdaus auf das Wachstum gramnegativer Keime. Angegeben ist zudem die nach Polymyxin-Behandlung nachweisbare Proteinkonzentration (Bradford-Bestimmung) im zellfreien Überstand

Mikroorganismus	Stamm	Wachstum nach Polymyxin-B-Behandlung	Proteinkonzentration im Lysat (mg/ml) ¹
Sonstige gramnegative Enterobacteriaceae			
<i>Hafnia alvei</i>	MHI 910	-	0,4
<i>Proteus vulgaris</i>	MHI 913	++	0,4
<i>Enterobacter asburiae</i>	MHI 968	++	1,8
<i>Serratia rubidea</i>	MHI 974	++	3,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MHI 21024	-	0,5
Sonstige Gramnegative			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MHI 1000	-	5,0

- ¹ nach Aufkonzentrieren um Faktor 10 mittels Ultrafiltrationseinheiten
 - vollständig abgetötet (keine Einzelkolonien im Ösenausstrich auf Blutagar)
 +/- in verschiedenen Ansätzen entweder vollständig abgetötet oder einzelne Kolonien
 + einzelne Kolonien (1 bis 7) im Ösenausstrich sichtbar
 ++ deutliches Wachstum (Bildung eines Bakterienrasens auf Blutagar)

Die Effizienz des Verfahrens zeigte sich auch bei der Bestimmung des Proteingehaltes in den Lysaten, die im Anschluss an jede Polymyxin-B-Behandlung durchgeführt wurde. Mit Ausnahme der Stämme *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris* und *Klebsiella pneumoniae* waren in den Lysaten aller Stämme Proteinkonzentrationen von > 1 mg/ml nachweisbar (Tabelle 6). Auch bei den Stämmen, die Anzeichen einer Resistenz gegen Polymyxin B zeigten, wurde Protein im Lysat nachgewiesen. Dieser Sachverhalt spricht dafür, dass auch bei diesen Stämmen eine Aktivität des eingesetzten Antibiotikums zu verzeichnen ist.

3.3.2 Immunogen-Herstellung

Als Immunogene wurden Polymyxin-B-Präparationen der in Tabelle 4 (3.3.1) aufgeführten *Cronobacter* Stämme verwendet. Die ausgewählten Bakterienstämme wurden auf Columbia Agar mit Schafblut angezüchtet. Für die Immunogenherstellung wurde Koloniematerial der ausgewählten Stämme im Brutschrank bei 37 °C über Nacht in 50 ml LB-Medium angezüchtet. Nach Zentrifugation des Keimmaterials (10.000 x g, 4 °C, 10 min) wurden die erhaltenen Pellets in je 1,5 ml steriler PBS-Lösung aufgenommen, nach Überführung in Eppendorf-Tubes erneut bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Bakteriolyse wurden die erhaltenen Pellets in je 1 ml polymyxinhaltigem Lysepuffer aufgenommen und anschließend 1,5 h unter sanftem Schütteln (300 rpm) bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der antibiotischen Wirkung des Polymyxin-B-Sulfats wurde eine Öse des Materials auf Blutagarplatten ausgestrichen, diese über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag abgelesen (3.3.1.1).

Die Ansätze wurden nach dem Lyse-Schritt in Eppendorf-Gefäßen bei 7 °C und 14.000 x g für 30 min zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden sterilfiltriert, mittels Ultrafiltrationseinheiten um etwa Faktor 10 aufkonzentriert und abschließend der Proteingehalt mittels Bradford-Bestimmung ermittelt. Die so erhaltenen proteinhaltigen, partikelfreien Konzentrate werden im Folgenden als „Lysate“ bezeichnet.

Die nach der Polymyxin-B-Sulfat-Behandlung erhaltenen Pellets wurden in 250 µl PBS resuspendiert („Ghost-Präparationen“). Das beschriebene Verfahren wurde für die drei *Cronobacter* Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040 im Laufe der Untersuchungen 16 (MHI 21040) bis 20 mal (MHI 21026) durchgeführt. Für die Aufbewahrung über einen Zeitraum länger als eine Woche wurde das Material bei -20 °C eingefroren.

In den Lysaten konnten Proteingehalte von 1 bis 5 mg/ml nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Proteinmenge lag dabei bei Stamm MHI 21040 mit 2,4 mg/ml signifikant unter denen der Stämme MHI 21026 (3,1 mg/ml) und MHI 21001 (3,4 mg/ml).

3.3.3 Immunisierung

Für die Produktion monoklonaler Antikörper (mAK) gegen *Cronobacter* spp., wurden weibliche Balb/c –Mäuse intraperitoneal immunisiert. Immunisiert wurde eine Gruppe von vier Tieren mit Lysaten und eine weitere Gruppe von fünf Tieren mit den entsprechenden Ghost-Präparationen. Die Grundimmunisierung erfolgte mit einer Emulsion aus Immunogen und inkomplettem Freundschem Adjuvans (iFA). Sechs Wochen (Lysate) bzw. acht Wochen (Ghosts) nach der Grundimmunisierung wurde den Mäusen erstmals Blut entnommen, um mittels EIA zu kontrollieren, ob im Serum der immunisierten Tiere spezifische Antikörper gegen *Cronobacter* nachzuweisen sind. Die erste Restimulierung erfolgte 14 Wochen nach der Grundimmunisierung, fünf Wochen später erfolgte erneut eine Blutentnahme. Mittels EIA wurden diejenigen Tiere aus den beiden Immunisierungsgruppen identifiziert, bei denen hohe Titer hochaffiner spezifischer Antikörper nachweisbar waren (3.3.5). Drei Tage vor der geplanten Zellfusion erhielten die ausgewählten Mäuse nochmals eine Restimulierungs injektion ohne Zusatz von Adjuvans. Details zu den durchgeföhrten Immunisierungen sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst.

Tabelle 7: Übersicht zur Immunisierung von Mäusen mit Ghost-Präparationen von *Cronobacter* spp. Verwendet wurde jeweils eine Mischung bestehend aus gleichen Anteilen Ghosts der *Cronobacter*-Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040.

Arbeitsschritt	Zeitpunkt	Tier	applizierte Ghosts ¹
Grundimmunisierung	Woche 1	Maus I-IV	1×10^7 in iFA
1. Blutentnahme	Woche 9	Maus I-IV	
1. Restimulierung	Woche 15	Maus I-IV	1×10^7 in iFA
2. Blutentnahme	Woche 20	Maus I-IV	
2. Restimulierung	Woche 23	Maus II	2×10^7 in PBS
Zellfusion	Woche 24	Maus II	

¹ Die Angaben basieren auf dem Keimzahlgehalt der Präparation vor der Polymyxin-induzierten Inaktivierung.

Tabelle 8: Übersicht zur Immunisierung von Mäusen mit Lysat-Präparationen von *Cronobacter* spp. Verwendet wurde jeweils eine Mischung bestehend aus gleichen Anteilen der *Cronobacter*-Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040.

Arbeitsschritt	Zeitpunkt	Tier	applizierte Proteinmenge
Grundimmunisierung	Woche 1	Maus V-IX	30 µg Protein in iFA
1. Blutentnahme	Woche 7	Maus V-IX	
1. Restimulierung	Woche 15	Maus V-IX	40 µg Protein in iFA
2. Blutentnahme	Woche 20	Maus V-IX	
2. Restimulierung	Woche 21	Maus V	60 µg Protein in PBS
Zellfusion	Woche 22	Maus V	

3.3.4 Etablierung von Enzymimmuntests

3.3.4.1 Herstellung von Antigen-Präparationen

Als Antigen-Präparationen, die v.a. bei der Beschichtung von Mikrotiterplatten und in Immunoblots eingesetzt wurden, dienten Lysate bzw. Ghosts der in den Tabellen 5 und 6 aufgeführten Bakterienstämme. Herstellung und Aufarbeitung der Präparationen erfolgte, wie für die Immunogen-Herstellung beschrieben (3.3.2).

Daneben wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung auch anderes antigenhaltiges Material hergestellt und für EIA-, Immunoblot- bzw. Immunfluoreszenzuntersuchungen eingesetzt.

a) vitale Keime

Zur Überprüfung, ob die gewonnenen polyklonalen Seren bzw. mAK auch mit lebenden unbehandelten Keimen reagieren, wurden die entsprechenden Stämme in 50 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C angereichert, nach Abzentrifugieren (15 min, 10.000 x g) mit 10 ml PBS gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren die Pellets in 500 µl PBS aufgenommen. Für die EIAs wurden die Mikrotiterplatten mit diesen Suspensionen in seriellen Verdünnungen (1:100 bis 1:10.000) beschichtet.

b) Ribolyser-Material

Im EIA wurden des Weiteren auch Zellhomogenisate eingesetzt, die mittels Zellaufschluss im Ribolyser gewonnen worden waren. In diesem Verfahren werden durch stark

beschleunigte Silikatpartikel die Zellmembranen der behandelten Bakterien zerstört und Cytoplasmabestandteile freigesetzt. Das so erhaltene Probenmaterial enthält sowohl Membranstrukturen als auch Cytoplasmabestandteile. Für Fragestellungen, in denen eine Differenzierung zwischen Ghost-Präparation und Lysat nicht notwendig war, bot diese Präparationsmethode eine schnelle und wenig aufwändige Alternative zum Polymyxin-Verdau.

Um diese Homogenisate zu erzeugen, wurden 1,5 ml einer 37 °C Über-Nacht-Kultur (10 ml LB-Medium) des zu untersuchenden Stammes in Lysing Matrix B Röhrchen unter Zusatz von Proteinasehemmern auf Stufe 6 des Ribolyser-Gerätes lysiert. Um eine Denaturierung der Proteine durch die entstehende Wärmeentwicklung zu vermeiden, wurde die Reaktionszeit auf 40 sec begrenzt und im Anschluss die Probe auf Eis gekühlt. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Die in den Proberöhrchen enthaltenen Silikatpartikel wurden im Anschluss durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 4.000 x g abgetrennt.

3.3.4.2 Stabilitätstest

Um die Stabilität der hergestellten Lysat- und Ghost-Präparationen begleitend zu überwachen, wurde ausgewähltes Probenmaterial über einen Zeitraum von 3 Jahren bei -20 °C aufbewahrt und in mehrmonatigen Abständen im EIA unter Verwendung verschiedener Antikörper analysiert. Als Antigene wurden Ghost-Präparationen und Lysate der *Cronobacter* Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040 eingesetzt. Dafür wurden Mikrotiterplatten mit seriellen Verdünnungen (von 1:100 bis 1:6.400) der entsprechenden, bei -20 °C gelagerten Präparationen beschichtet. Als primäre Antikörper wurden zunächst die im Rahmen der Blutentnahmen (3.3.3) gewonnenen Antiseren, später Zellkulturüberstände von Hybridomazellen in einer konstanten Verdünnung (Antiseren 1:2.000; ZKÜ 1:50) in PBS verwendet. Für eine vergleichende Bewertung der EIA-Ergebnisse wurden diejenigen Verdünnungen der Präparationen herangezogen, für die im EIA Extinktionen zwischen 0,2 und 1,5 ermittelt wurden. Zur Absicherung des Ergebnisses wurden jeweils Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Erste Untersuchungen, die mit polyklonalen Mausantiseren durchgeführt wurden, zeigten keine signifikanten Veränderungen der Reaktivität innerhalb eines fünfmonatigen Versuchszeitraums. Auf eine Darstellung von Details dieser Untersuchungen wird verzichtet.

Für die weiteren Untersuchungen wurden ZKÜ der hergestellten Hybridome eingesetzt.

ZKÜ bzw. Antikörper, die aus Hybridomzelllinien gewonnen wurden, denen eine Immunisierung mit Ghost-Material zugrunde lag, werden im Folgenden mit mAK α G bezeichnet, ZKÜ bzw. Antikörper, die aus Hybridomzelllinien gewonnen wurden, denen eine Immunisierung mit Lysaten voraus ging, mit mAK α L bezeichnet.

Für die Untersuchungen der ausgewählten Ghost-Präparationen (MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040) mit monoklonalen Antikörpern wurde der breit reagierende mAK 1H9 α G als primärer Antikörper im EIA eingesetzt. Über den Untersuchungszeitraum hinweg war tendenziell eine Abnahme der Reaktivität festzustellen. Während beim Stamm *C. turicensis* MHI 21026 die Extinktionen über den Untersuchungszeitraum von 1,1 (\pm 0,2) auf 0,74 (\pm 0,01) und beim Stamm *C. sakazakii* MHI 21040 von 1,3 (\pm 0,3) auf 0,71 (\pm 0,03) absanken (67% bzw. 56% des Ausgangswertes), wurden beim Stamm *C. sakazakii* MHI 21001 mit einer Extinktion von 0,24 (\pm 0,03) am Ende der Versuchsreihe noch 91% des Ausgangswertes von 0,26 (\pm 0,03) erhalten (Abbildung 4a).

Aufgrund der hohen Spezifität der gegen die Lysat-Präparationen generierten Antikörper (mAK α L; 3.3.7), wurden für die Stabilitätstests zwei verschiedene mAK α L eingesetzt. Hierbei wurde für die Kombination von Stamm MHI 21001 und mAK 2C12 α L eine signifikante Abnahme der Reaktivität festgestellt. Die Auswertung der 1:6.400 Verdünnung (Proteinkonzentration ca. 0,4 μ g/ml) zeigte ein Absinken der Extinktion von 1,33 (\pm 0,43) zu Beginn des Versuchszeitraumes auf 0,56 (\pm 0,02) am Ende der Lagerungszeit. Dies entspricht etwa 42% des Ausgangswertes (Abbildung 4b). Für das Lysat des Stammes MHI 21040 (primärer Antikörper: mAK 2F8 α L, Abbildung 4b), konnte in diesem Versuchaufbau hingegen keine signifikante Abnahme der Reaktivität verzeichnet werden.

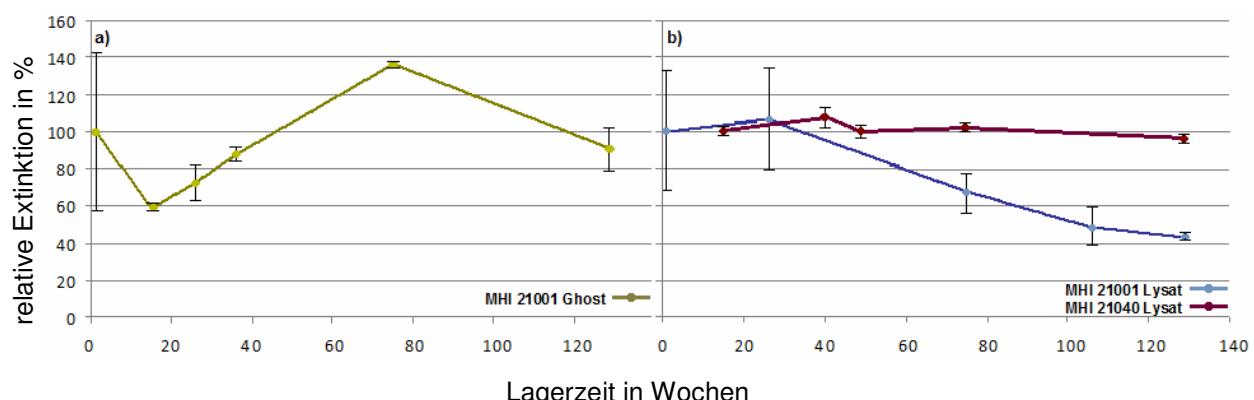


Abbildung 4: Stabilitätstest von Präparationen der Stämme *C. sakazakii* MHI 21001 und MHI 21040 über einen Zeitraum von 136 Wochen

- a) Ghost-Präparation des Stammes MHI 21001 (Verdünnung 1:100), mAK: 1H9 α G
- b) Lysate der Stämme MHI 21001 und MHI 21040 (Verdünnung 1:6.400), mAK: 2C12 α L und 2F8 α L

Die vorliegenden Ergebnisse der Stabilitätstest zeigen, dass die Präparationen nach Polymyxin-B-Verdau bei einer Lagerung von -20 °C weitgehend stabil sind, jedoch bei einer mehrmonatigen Lagerung bei -20 °C ein Abbau antigener Strukturen nicht auszuschließen ist, wie am Beispiel des mAK 2C12 α L und dem Lysat des Stammes MHI 21001 beobachtet wurde.

3.3.5 Kontrolle des Immunisierungserfolges

Im Verlauf des Immunisierungsprozesses wurde den Tieren, wie unter 3.3.3 beschrieben, zweimal Blut entnommen und die daraus gewonnenen polyklonalen Antiseren mittels EIA-Untersuchungen charakterisiert. Zur Bestimmung der Antikörper-Titer wurden indirekte EIA-Verfahren eingesetzt, wobei alle Antiseren mit verschiedenen Antigenpräparationen (Lysat- und Ghost-Material bzw. lebenden Keime) getestet wurden. Definiert wurde der Antikörper-Titer als diejenige Verdünnungsstufe des Antiserums, bei der im EIA noch eine Extinktion von 1,0 erreicht wurde. Dazu wurden im EIA die Antigene in einer gleich bleibenden Konzentration und die Mäuseseren in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt.

Die Untersuchung der Antiseren von den Tieren, die mit Ghosts immunisiert worden waren, erfolgte zunächst mit der auch für die Immunisierung eingesetzten Ghost-Präparation (10^7 KbE/ml einer anteiligen Mischung von Ghost-Material der Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040). Im Serum aller Mäuse wurden bereits nach der ersten Blutentnahme signifikante Titer im Bereich von 1:20.000 bis 1:55.000 gegen *Cronobacter*-Ghosts nachgewiesen. Nach Restimulierung der Tiere konnte ein deutlicher Anstieg der Titer auf Werte von 1:200.000 bis 1:270.000 verzeichnet werden, die höchsten spezifischen Antikörper-Konzentrationen wiesen die Seren der Mäuse II und III auf (Titer von 1:230.000 bzw. 1:270.000, Abbildung 5a).

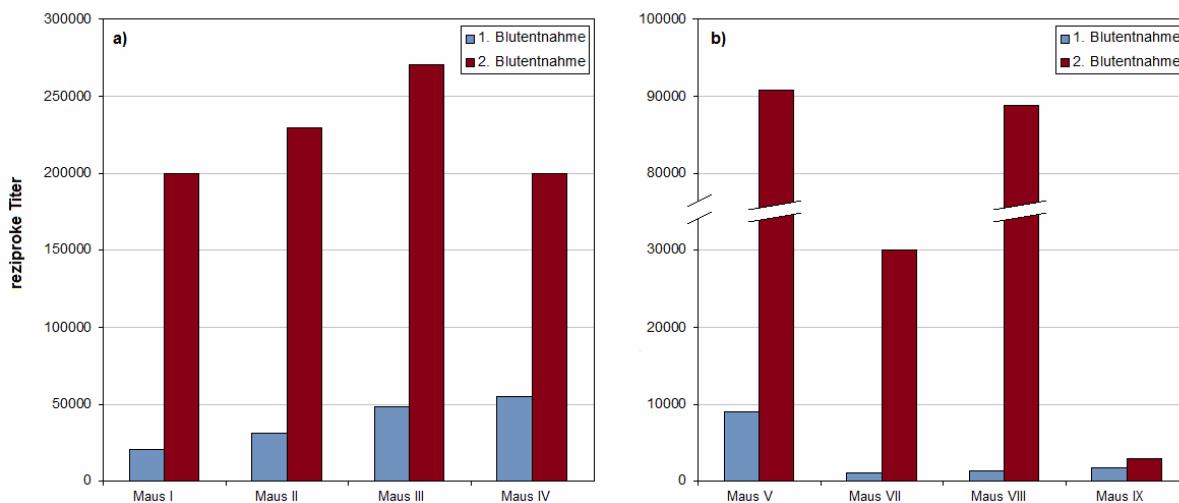


Abbildung 5: Nachweisbare Antikörper-Titer in den Seren der mit Ghosts (a) bzw. Lysaten (b) immunisierten Mäuse. Zur Titerbestimmung wurde jeweils homologes Material der Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040 eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob die Seren der Mäuse I bis IV nach der 1. Restimulierung auch Reaktivität gegen Lysate bzw. lebende unbehandelte *Cronobacter*-Keime zeigten, wurden weitere Titerbestimmungen unter Verwendung indirekter EIAs durchgeführt. Zur Beschichtung der Platten wurden hierbei Lysate der Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040 (Proteinkonzentration je 1 µg/ml) bzw. Keimmaterial des Stammes MHI 21001, hergestellt nach 3.3.4.1, in einer Verdünnung von 1:4.000 eingesetzt. Prinzipiell konnte für alle überprüften Antiseren im indirekten EIA Reaktivität mit diesen alternativen Antigenpräparationen nachgewiesen werden, wobei das Serum von Tier II in diesen Versuchen tendenziell die höchsten Titer aufwies (Tabelle 9).

Spezifische Antikörper konnten auch in den Seren derjenigen Tiere, die mit *Cronobacter*-Lysaten immunisiert worden waren, nachgewiesen werden. Für die Titerbestimmungen wurde zur Beschichtung der EIA-Platten eine anteilige Mischung von Lysaten der Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040 (Proteinkonzentration 1 µg/ml) eingesetzt. Die Titer der Antiseren nach der ersten Blutentnahme bewegten sich im Bereich von 1:1.000 (Maus VII) bis 1:8.900 (Maus V). Nach Restimulierung der Tiere war eine deutliche Zunahme der Titer zu verzeichnen, die Werte lagen mit 1:3.000 (Maus IX) bis 1:91.000 (Maus V) deutlich über den Ergebnissen der ersten Blutentnahme (Abbildung 5b). Bei beiden Titerbestimmungen zeigte das polyklonale Antiserum von Maus V die höchsten Antikörper-Titer. Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurden die Seren auch in indirekten EIAs gestestet, bei denen unbehandeltes Keimmaterial des Stammes MHI 21001 (nach 3.3.4.1, Verdünnung 1:4.000) zur Beschichtung der Platten eingesetzt wurde. Auch hierbei wurde für das Antiserum von

Maus V die höchste Antikörperaktivität nachgewiesen. Der Titer lag hier bei 1:101.000, während in den Seren der anderen Tiere die Titer zwischen 1:3.000 (Maus IX) und 1:35.000 (Maus VII) variierten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Mittels indirekter EIAs nachweisbare reziproke Antikörper-Titer in den Seren der mit Ghosts (Mäuse I-IV) bzw. Lysaten (Mäuse V-IX) immunisierten Tiere nach der 1. Restimulierung. Zur Beschichtung der Platten wurden unterschiedliche Antigen-Präparationen verwendet.

Antigen-Präparation					Antigen-Präparation		
MHI 21001 Lysat	MHI 21026 Lysat	MHI 21040 Lysat	MHI 21001 unbehandelt		MHI 21001, MHI 21026, MHI 21040 Lysate	MHI 21001 unbehandelt	
Maus I	45.000	38.000	19.000	60.000	Maus V	91.000	101.000
Maus II	352.000	54.000	18.000	234.000	Maus VII	30.000	35.000
Maus III	151.000	13.000	7.000	120.000	Maus VIII	89.000	25.000
Maus IV	154.000	51.000	6.000	135.000	Maus IX	3.000	3.000

Untersuchungen zur Affinität der Seren wurden ebenfalls mittels indirekter EIA-Verfahren durchgeführt. Dabei erfolgte die Beschickung der Mikrotiterplatten mit einer seriellen Verdünnungsreihe lebender Zellen des Stammes MHI 21001 (nach 3.3.4.1), beginnend in einer Verdünnung von 1:4.000 (entspricht etwa einer Keimzahl von 7×10^7 KbE/ml). Die Seren wurden in konstanter Konzentration (Verdünnung 1:3.000) zugegeben. Unter diesen EIA-Bedingungen gilt, dass je geringer die Konzentration des Beschichtungsantigens ist, bei der noch eine signifikante Extinktion von $\geq 1,0$ beobachtet werden kann, desto höher ist die Affinität des eingesetzten Antiserums. Die höchste Affinität der untersuchten Seren war in den jeweiligen Versuchstiergruppen für Maus IV bzw. Maus V festzustellen (Abbildung 6). In der Gruppe der Versuchstiere, die mit Ghost-Material immunisiert worden waren, lagen die Keimzahlen, ab der noch eine Extinktion von 1,0 im EIA erreicht wurde für die Tiere IV ($1,3 \times 10^6$ KbE/ml), III ($1,7 \times 10^6$ KbE/ml) und II ($1,8 \times 10^6$ KbE/ml) in einem ähnlichen Größenbereich. Für Tier I war mit $3,8 \times 10^6$ KbE/ml bereits eine signifikant höhere Keimzahl nötig, um eine Extinktion von 1,0 zu erhalten.

Deutlich größere Unterschiede in der Affinität der Seren untereinander waren in der Versuchstiergruppe der Mäuse zu verzeichnen, die mit Lysaten immunisiert worden waren (Abbildung 6). Während mit den Seren der Tiere V und VIII bereits bei einer Keimzahl von

$1,3 \times 10^6$ bzw. $1,4 \times 10^6$ KbE/ml eine Extinktion von 1 im EIA erreicht wurde, waren bei den Seren der Tiere VII und IX Keimzahlen von $1,8 \times 10^7$ bzw. $7,5 \times 10^7$ KbE/ml notwendig.

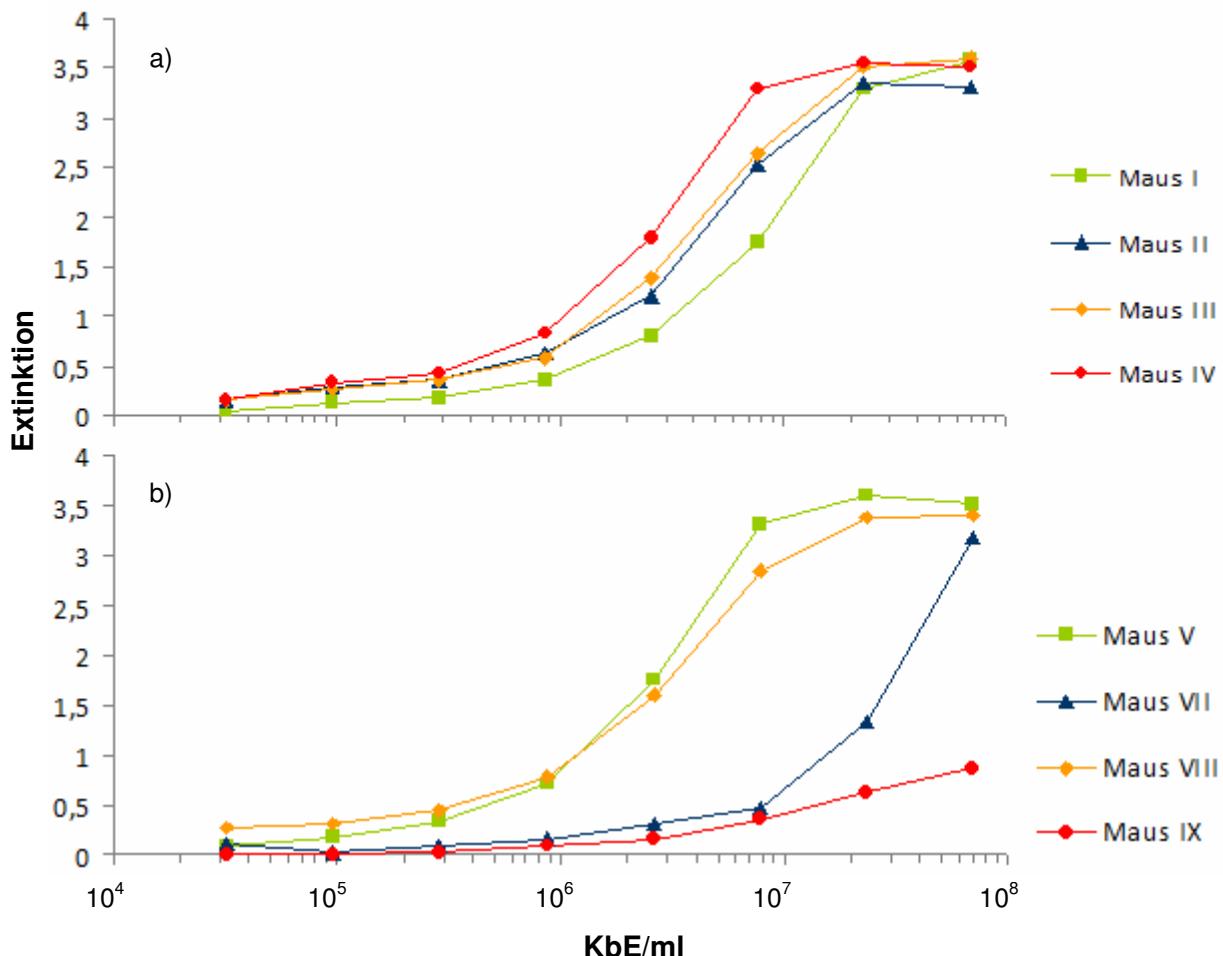


Abbildung 6: Orientierende Bestimmung der Affinität von
 a) Seren der mit Ghost-Material immunisierten Mäuse,
 b) Seren der mit Lysat-Material immunisierten Mäuse.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit lebenden Keimen des Stammes *C. sakazakii* MHI 21001. Die Antiseren der aufgeführten Versuchstiere wurden in einer konstanten Verdünnung von 1:3.000 eingesetzt.

Des Weiteren wurden mittels indirektem EIA Untersuchungen zur Intra-Genus-Spezifität der Seren durchgeführt. Als Antigene wurden dabei Suspensionen der in Tabelle 10 aufgeführten Bakterienstämme (Präparation nach 3.3.4.1) in einer Verdünnung von 1:120.000 eingesetzt. Die Seren wurden in einer konstanten Verdünnung von 1:3.000 zugegeben. Für das Experiment ausgewählt wurden die Seren der Mäuse II und IV sowie V und VIII, die in den bisherigen Untersuchungen tendenziell die höchsten Antikörper-Titer bzw. die höchsten Affinitäten gezeigt hatten.

Alle untersuchten Antiseren zeigten eine breite Reaktivität für die verschiedenen

Cronobacter-Stämme (Tabelle 10). Tendenziell reagierten die Seren, die aus der Versuchtiergruppe stammen, die mit Ghost-Material immunisiert wurden, stärker mit den untersuchten Bakterien als die Seren der Tiere, die mit Lysaten immunisiert wurden.

Tabelle 10: Reaktivität von Mäuse-Antiseren gegen *Cronobacter*-Ghosts (Mäuse II und IV) bzw. *Cronobacter*-Lysate (Mäuse V und VIII) mit verschiedenen Vertretern des Genus *Cronobacter*. Die Daten wurden mittels indirektem EIA ermittelt.

Stamm	Maus			
	II	IV	V	VIII
MHI 975 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 977 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 979 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 982 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 986 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 987 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 990 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 992 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 995 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21000 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21001 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21002 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21008 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21011 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21012 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21027 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21028 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21029 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21030 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21032 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21035 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21037 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21039 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21040 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21036 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21038 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 21041 <i>C. sakazakii</i>				
MHI 981 <i>C. universalis</i>				
MHI 21031 <i>C. muytjensii</i>				
MHI 21026 <i>C. turicensis</i>				

 Extinktion > 1

 Extinktion zwischen 0,3 und 1

 Extinktion ≤ 0,3 und > Leerwert

Im Hinblick auf die Generierung von mAK wurde aus der Gruppe der Tiere, die mit Ghost-Material immunisiert worden waren, Maus II ausgewählt. Der Titer im Serum (2. Blutentnahme) dieses Tieres, der unter Verwendung der Ghost-Präparation ermittelt wurde, lag mit 1:200.000 zwar etwas niedriger als der von Tier III (1: 270.000), doch im Serum von Maus II war zu diesem Zeitpunkt mit Abstand die höchste Antikörperaktivität gegenüber lebenden Bakterien und Lysaten zu verzeichnen. Im Serum von Maus II konnte zudem eine

breite Reaktivität mit verschiedenen *Cronobacter* Stämmen beobachtet werden (Tabelle 10).

Bei den mit Lysaten immunisierten Tieren wies das Serum von Maus V im Vergleich zu den Seren der anderen Tiere, in allen Untersuchungen die höchsten Titer sowie die höchste Affinität auf. Da auch im Rahmen der Untersuchung der Intra-Genus-Spezifität eine Reaktion mit allen getesteten Keimen nachgewiesen werden konnte, wurde Tier V für die Zellfusions-Experimente (3.2.5) ausgewählt.

3.3.6 Etablierung und Produktivität von Hybridom-Zelllinien

Um Antikörper produzierende Zelllinien zu etablieren, wurde mit den aus den Milzen der Mäuse II und V gewonnenen Einzelzellsuspensionen verfahren, wie unter 3.2.5 beschrieben. Zwölf Tage nach Zellfusion und danach in regelmäßigen Abständen wurde die Antikörperproduktion der Hybridom-Zellen mittels EIA getestet. Ziel war es, produktive Hybridome von Nichtproduzenten zu separieren und anschließend gut produzierende Klone weiter zu kultivieren, um letztlich stabile mAK-produzierende Reinkulturen zu erhalten.

Bei Testung der beiden durchgeführten Zellfusionen wurden 27 reaktive Klone (12 Klone: Ghost-Präparation als Immunogen; 15 Klone: Lysate als Immunogen) identifiziert. Mittels indirektem EIA wurden die Antikörper-Titer in den gewonnenen Zellkulturüberständen der Hybridomzellen (ZKÜ) bestimmt. Dabei erfolgte die Titerbestimmung in den ZKÜ der Hybridomzellen, die aus der Immunisierung mit Ghost-Präparationen hervorgingen (Maus II), mit einer anteiligen Mischung von in je 1 ml sterilem PBS resuspendierten Ghosts der Stämme *C. sakazakii* MHI 21001, *C. sakazakii* MHI 21040 und *C. turicensis* MHI 21026 (Verdünnung 1:500). Für die Bestimmung der Titer in den Überständen der Hybridomzellen, die nach Immunisierung mit Lysaten gewonnen wurden (Maus V), wurde eine Lösung verwendet, in der die Lysate der Stämme *C. sakazakii* MHI 21001, *C. sakazakii* MHI 21040 und *C. turicensis* MHI 21026 gepoolt in einer Proteinkonzentration von je 0,5 µg/ml eingesetzt wurden.

Es konnte eine große Spannbreite in der Produktivität der Hybridomzellen nachgewiesen werden. Die ZKÜ der Hybridome, die auf Basis von Ghost-Präparationen als Immunogen gewonnen worden waren, zeigten Antikörper-Titer von 1:2 bis 1:2.500. Die Titer der ZKÜ von Hybridomen, die aus mit Lysat-Material immunisierten Tieren gewonnenen worden waren, bewegten sich in einem Bereich von 1:7 bis 1:6.500.

In Hinblick auf die Etablierung von stabilen Zelllinien wurden jeweils sieben Klone mit tendenziell hoher Antikörper-Produktivität ausgewählt und mittels Limiting-Dilution-Technik kloniert. Die AK-Produktivität nach der ersten Klonierung wurde mittels indirektem EIA bestimmt (Tabelle 11). Während für die mAK α L die Titer der ZKÜ untereinander nur gering differierten (1: 5.000 bis 1:8.000), zeigten die Titer der mAK α G eine große Spannbreite von 1:10 (mAK 1A11 α G) bis 1:8.000 (mAK 2G8 α G).

Des Weiteren wurde von allen mAK mittels Isotypisierungskit der Subtyp bestimmt. Alle produzierten Antikörper sind der Antikörperklasse IgG zuzuordnen. Unter den mAK α G finden sich Antikörper der Subtypen IgG₁ und IgG_{2a}, bei den mAK α L handelt es sich um die Subtypen IgG₁, IgG_{2a} und IgG_{2b} (Tabelle 11).

Tabelle 11: Produktivität der ausgewählten Hybridomzelllinien. Die Titerbestimmungen erfolgten mittels indirektem EIA. Die Beschichtung der Platten erfolgte mit gepoolten a) Ghosts (1:3.000) bzw. b) Lysaten (0,2 μ g Protein/ml) der *Cronobacter*-Stämme MHI 21001, MHI 21026 und MHI 21040. Die Subtypen der mAK wurden mittels Isotypisierungskit bestimmt.

mAK gegen Ghost-Präparationen - mAK α G							
Klon	1A11 α G	1H9 α G	2B5 α G	2B11 α G	2B12 α G	2F7 α G	2G8 α G
Titer	1: 10	1: 4.000	1: 250	1: 4.000	1: 250	1: 6.000	1: 8.000
Subtyp	IgG _{2a}	IgG _{2a}	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁
mAK gegen Lysate - mAK α L							
Klon	1A11 α L	1C4 α L	1G3 α L	1G9 α L	2C12 α L	2F8 α L	2G4 α L
Titer	1: 7.000	1: 5.000	1: 8.000	1: 8.000	1: 5.000	1: 6.000	1: 8.000
Subtyp	IgG _{2b}	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₁	IgG _{2b}	IgG _{2b}	IgG _{2a}

3.3.7 Charakterisierung der Antikörper

Um die gewonnenen mAK umfassend zu charakterisieren, kamen verschiedene, vorwiegend immunchemische Untersuchungsverfahren wie EIA, Immunoblots und Immunfluoreszenzuntersuchungen zum Einsatz. Schwerpunktmäßig wurden hierbei Lysate und Ghost-Präparationen der in Tabelle 3 aufgeführten Stämme verwendet. Für spezielle Fragestellungen wurden zudem Untersuchungen mit unbehandeltem Keimmaterial (3.3.4.1a) oder anderen Präparationen wie z. B. Ribolyser-Zellextrakten (3.3.4.1b) durchgeführt.

Für EIA-basierte Untersuchungen zur Spezifität und Affinität der gewonnenen mAK, wurden als Ausgangsmaterialien für die Beschickung der Mikrotiterplatten hauptsächlich Lysate in einer Ausgangsverdünnung von 1:50 (entspricht 10-100 µg Protein pro ml) sowie Ghost-Präparationen in einer Verdünnung beginnend ab 1:100 (entspricht etwa $1-10 \times 10^9$ KbE/ml) eingesetzt. Wurde unbehandeltes Keimmaterial oder Ribolyser-Extrakte im indirekten EIA verwendet, erfolgte die Beschichtung der Platten i. d. R. ebenfalls mit einer Ausgangsverdünnung von 1:100. Weitere Verdünnungsschritte mit Bicarbonatpuffer erfolgten üblicherweise jeweils im Verhältnis 1:2.

3.3.7.1 Bestimmung der relativen Affinität der mAK gegen *Cronobacter* spp.

3.3.7.1.1 Monoklonale Antikörper gegen *Cronobacter* spp.-Ghosts - mAK αG

Die durchgeführten EIA-Untersuchungen zeigten, dass mit Ausnahme von mAK 1A11 αG die Antikörper dieser Gruppe mit den Ghost-Präparationen aller untersuchten und in Tabelle 12 aufgeführten *Cronobacter*-Stämme reagierten.

Tabelle 12: Reaktivität der hergestellten mAK α G mit Ghost- und Lysat-Präparationen verschiedener *Cronobacter*-Stämme. Die Ergebnisse wurden mittels indirekter EIA-Verfahren erhalten. Zur Beschichtung der Platten wurden serielle Verdünnungen von Präparationen der aufgeführten Stämme verwendet. Die mAK α G wurden in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1. Klon) eingesetzt.

Cronobacter-Stämme	mAK										
	1H9 α G	2B5 α G	2B11 α G 2B12 α G	2F7 α G	2G8 α G	1A11 α G					
MHI 975 <i>C. sakazakii</i>	++	+	++	++	++	+	++	++	++	+++	
MHI 977 <i>C. sakazakii</i>	+	++	+++	+	++	+	+++	+	+++	+++	
MHI 979 <i>C. sakazakii</i>	+++	+	+++	++	++	(+)	+++	++	+++	+++	
MHI 982 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+++	-	+++	-	+++	+++	
MHI 986 <i>C. sakazakii</i>	+	+	+++	++	++	+	+++	+	+++	+++	
MHI 987 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+++	
MHI 990 <i>C. sakazakii</i>	+	+	+++	+	+	+	+++	(+)	+++	+++	
MHI 992 <i>C. sakazakii</i>	+	+	+++	++	++	+	+++	++	+++	+++	
MHI 995 <i>C. sakazakii</i>	++	++	+++	(+)	++	-	+++	-	+++	+	
MHI 21000 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+++	-	+++	+	+++	+	
MHI 21001 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+++	-	+++	+	+++	+++	++
MHI 21002 <i>C. sakazakii</i>	+	+	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	
MHI 21008 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+++	+	+++	++	+++	+++	
MHI 21011 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	++	+++	+	+++	+	+++	+++	
MHI 21012 <i>C. sakazakii</i>	+	+	+++	+	+++	+	+++	++	+++	+++	
MHI 21027 <i>C. sakazakii</i>	++	(+)	+++	+	+	(+)	++	(+)	+	+	
MHI 21028 <i>C. sakazakii</i>	+++	+	+++	+	+++	+	+++	++	+++	+++	
MHI 21029 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	++	+	+++	+	+++	+++	
MHI 21030 <i>C. sakazakii</i>	+++	+	+++	+	++	+	++	++	+++	+++	
MHI 21032 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+	+	++	+	+++	+++	
MHI 21035 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	+	+	+	++	+	+++	+++	
MHI 21039 <i>C. sakazakii</i>	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+++	-
MHI 21040 <i>C. sakazakii</i>	++	+	+++	-	++	-	+++	-	+++	+	+
MHI 981 <i>C. universalis</i>	++	++	+++	+	+++	+	+++	-	+++	+++	
MHI 21031 <i>C. muytjensii</i>	++	+++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	+	
MHI 21026 <i>C. turicensis</i>	++	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+++	+
MHI 21049 <i>C. turicensis</i>	++	+	+++	++	+	+	+	+	++	++	+
MHI 21050 <i>C. turicensis</i>	++	(+)	+++	+	+	+	+	+	++	++	(+)

Extinktion im EIA:

+++ > 2 bei einer Verdünnung des Ghost-Materials von 1:10.000 (ca. 1-10 $\times 10^7$ KbE/ml)
+++ > 2 bei Proteinkonzentration von 0,7 μ g/ml (Lysat-Material)

++ 1-2 bei einer Verdünnung des Ghost-Materials von 1:10.000 (ca. 1-10 $\times 10^7$ KbE/ml)
++ 1-2 bei Proteinkonzentration von 0,7 μ g/ml (Lysat-Material)

+ < 1 bei einer Verdünnung des Ghost-Materials von 1:10.000 (ca. 1-10 $\times 10^7$ KbE/ml)
+ < 1 bei Proteinkonzentration von 0,7 μ g/ml (Lysat-Material)

(+) geringfügig über dem Leerwert (< 0,3 bei allen Verdünnungsstufen)

- keine eindeutig positive Reaktion nachweisbar

nicht getestet

Hierbei zeigte mAK 2B5 α G die höchste Affinität und eine breite Reaktivität. Im indirekten EIA konnten mit diesem Antikörper für alle untersuchten *Cronobacter*-Ghosts in einer Verdünnung von 1:25.000 (entspricht etwa $0,4\text{--}4 \times 10^7$ KbE/ml) noch Extinktionen von $> 2,1$ und in einer Verdünnung von 1:100.000 (entspricht $1\text{--}10 \times 10^6$ KbE/ml) noch Extinktionen von $> 0,4$ erzielt werden. Ähnliche Charakteristika wies der mAK 2G8 α G auf, wobei dieser Antikörper jedoch mit einzelnen Stämmen (MHI 21027, MHI 21049, MHI 21050) vergleichsweise schwach reagierte. Besonders auffällig war dies bei Stamm MHI 21027, bei dem bereits bei einer Verdünnung (Ghost-Präparation) von 1:10.000 nur noch ein sehr geringes Messsignal im EIA erhalten wurde, während bei allen anderen Stämmen noch Extinktionen von $> 2,0$ ermittelt wurden. Die im Rahmen dieser Untersuchungen erstellten Antigen-Verdünnungskurven sind exemplarisch für mAK 2G8 α G in Abbildung 7 dargestellt.

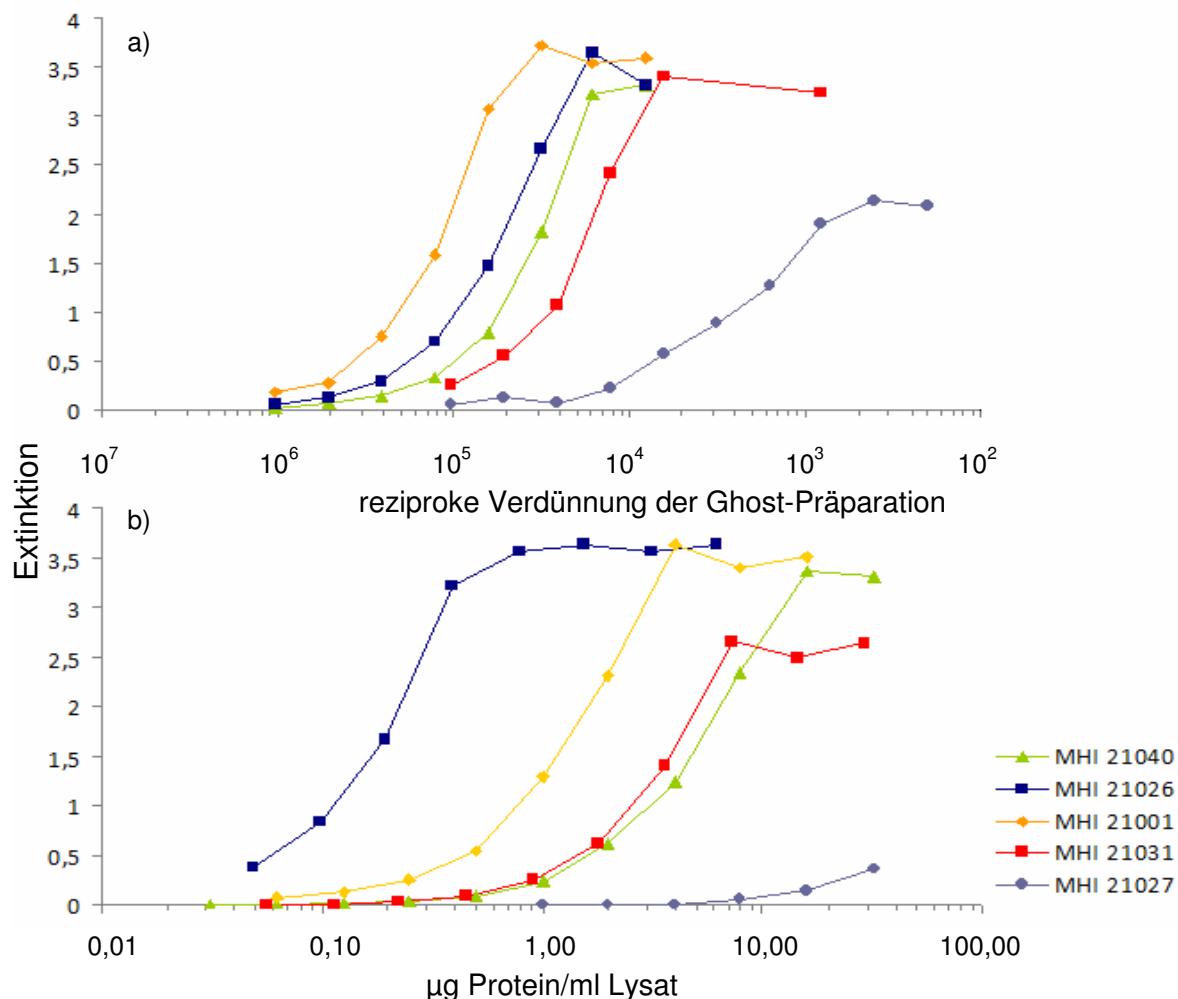


Abbildung 7: Relative Affinität des mAK 2G8 α G für Ghost-Präparationen (a) und Lysate (b) ausgewählter *Cronobacter*-Stämme im indirekten EIA. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit seriellen Verdünnungen von Ghost- und Lysat-Präparationen der angegebenen *Cronobacter*-Stämme. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1. Klon) eingesetzt.

Die Antikörper 2B11 α G und 2B12 α G, mit denen im indirekten EIA wie auch mit mAK 2F7 α G tendenziell geringere Messsignale als mit den affineren mAK 2B5 α G und 2G8 α G erhalten wurden, zeigten ein nahezu identisches Reaktionsprofil (Tabelle 12).

Von den getesteten breit reagierenden Antikörpern wies mAK 1H9 α G die vergleichsweise geringste Affinität für Ghost-Material von *Cronobacter* spp. auf. So reagierten im Gegensatz zu allen anderen mAK bei einer Beschichtungskonzentration von ca. 5×10^6 KbE/ml nur mehr 14% der untersuchten Stämme deutlich positiv.

Für mAK 1A11 α G wurde bereits in den ersten orientierenden Versuchen nur eine geringe Reaktivität mit den untersuchten Ghost-Präparationen festgestellt. Da zudem auch mit verschiedenen Lysaten keine Reaktion nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Antikörper nur eingeschränkt für weitergehende Untersuchungen genutzt und daher auch nicht mit allen zur Verfügung stehenden *Cronobacter*-Stämmen getestet (Tabelle 12).

In den EIA-Untersuchungen, in denen Lysate als Antigenpräparationen eingesetzt wurden, waren für die mAK α G vergleichsweise geringere Reaktivitäten nachzuweisen. Zum Teil war bei einigen Antikörpern (mAK 2B5 α G, 2B11 α G, 2B12 α G und 2F7 α G) keine Reaktivität mit manchen Lysaten festzustellen, obwohl diese mAK stark mit den Ghosts dieser Stämme reagiert hatten (z.B. MHI 21040). Die tendenziell geringere Affinität der mAK α G für die entsprechenden Lysate spricht dafür, dass Anteile der antigen wirkenden Strukturen durch Zentrifugation und Filtration im Rahmen der Aufarbeitung nach 3.3.2 zurückgehalten werden und daher nur in einem eingeschränkten Umfang in den Lysat-Präparationen vorliegen. Bei mAK 2G8 α G war die unterschiedliche Reaktivität mit den Ghost-Präparationen und den Lysaten am geringsten ausgeprägt (Tabelle 12), zudem wurden die mit Abstand höchsten Affinitäten für die Lysate der untersuchten Stämme nachgewiesen (Tabelle 13). Mit Ausnahme der Stämme MHI 995, MHI 21001, MHI 21027, MHI 21031 und MHI 21040 wurden bei Einsatz dieses mAKs im indirekten EIA selbst bei niedrigen Beschichtungskonzentrationen von 0,1 μ g Protein pro ml Lysat noch hohe Messsignale erhalten, wie exemplarisch in Abbildung 7b dargestellt ist.

Alle anderen untersuchten mAK α G zeigten deutlich schwächere Reaktivität mit den Lysaten der eingesetzten *Cronobacter*-Stämme.

Gestützt wurden die in Tabelle 12 dargestellten semiquantitativen Ergebnisse durch die Bestimmung der relativen Affinitäten der mAK α G für die Lysate aller untersuchten *Cronobacter*-Stämme (Tabelle 13). Die relative Affinität wurde definiert als diejenige Proteinkonzentration der Antigenpräparation, bei der unter den Bedingungen eines mAK-Überschusses im indirekten EIA noch eine Extinktion von 1,0 erreicht wird. Bei den Angaben zur relativen Affinität ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Lysaten um Rohpräparationen von ganzen Keimen handelte und somit eine breite Mischung unterschiedlichster Proteine und anderer struktureller Komponenten darstellte. Daraus folgt, dass der tatsächliche Antigengehalt sicherlich in einem deutlich niedrigeren Konzentrationsbereich liegt, als die aus dem Gesamtproteingehalt der Lysate errechneten Werte.

Grundsätzlich konnte für die mAK 1H9 α G, 2B5 α G, 2B11 α G, 2B12 α G und 2F7 α G ein sehr heterogenes Reaktionsprofil mit den Lysaten der untersuchten *Cronobacter*-Stämme nachgewiesen werden. Während für Lysate einzelner Stämme bereits bei Konzentrationen von deutlich weniger als 1 μ g/ml eine Extinktion von 1,0 im indirekten EIA erzielt wurde, mussten bei anderen Stämmen Proteinkonzentrationen im zweistelligen μ g-Bereich eingesetzt werden (Tabelle 13).

Insbesondere bei Einsatz der mAK 1H9 α G und 1B11 α G im indirekten EIA wurden sehr flache Dosis-Wirkungs-Kurven erhalten. Des Weiteren konnte für 14 bzw. 19 der getesteten 28 *Cronobacter*-Lysate im untersuchten Konzentrationsbereich (die Ausgangskonzentrationen für die Beschickung der Mikrotiterplatten lagen für diese Stämme bei 20 bis 90 μ g/ml) keine Extinktion von ≥ 1 im indirekten EIA erreicht werden; fünf der 28 untersuchten Lysate reagierten negativ. Darunter waren auch die Stämme MHI 21001 und MHI 21040, deren Ghost-Präparationen für die Immunisierung der Mäuse verwendet worden waren. Auch mAK 2F7 α G zeigte mit den Lysaten von fünf *Cronobacter*-Stämmen keine Reaktivität.

Tabelle 13: Relative Affinität der mAK α G für Lysate verschiedener *Cronobacter*-Stämme. Die Bestimmung erfolgte im indirekten EIA unter Verwendung serieller Verdünnungsreihen der Antigenpräparationen. Angegeben sind die Proteinkonzentrationen im Lysat [μ g/ml], bei denen unter diesen Versuchsbedingungen mit Einsatz des jeweiligen mAK in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1.Klon) noch eine Extinktion von 1,0 erreicht wurde.

<i>Cronobacter</i> spp. (Lysate)	mAK				
	1H9 α G	2B5 α G	2B11 α G	2F7 α G	2G8 α G
<i>C. sakazakii</i>					
MHI 975	5	0,2	1	0,5	0,1
MHI 977	0,2	2,6	> 80	> 80	< 0,1
MHI 979	> 90	0,5	> 90	0,6	0,1
MHI 982	> 60	1,5	-	-	0,1
MHI 986	1,8	0,6	> 60	0,8	0,1
MHI 987	> 50	1,3	> 50	> 50	0,2
MHI 990	30	1,8	> 50	-	0,2
MHI 992	1	0,3	> 60	0,4	0,1
MHI 995	1	> 30	-	-	0,8
MHI 21000	> 30	> 30	-	> 30	0,1
MHI 21001	> 60	> 60	-	> 60	0,9
MHI 21002	3,2	2,7	3,7	0,4	0,1
MHI 21008	4,8	0,8	2,8	0,6	0,1
MHI 21011	> 50	0,4	> 50	1	0,2
MHI 21012	2,3	0,8	> 70	0,4	0,1
MHI 21027	> 30	3,4	> 30	> 30	> 30
MHI 21028	> 60	2,1	12	0,5	0,1
MHI 21029	30	> 40	> 40	1	< 0,3
MHI 21030	1,7	2	3,5	0,6	0,1
MHI 21032	> 70	2,6	3	1	0,1
MHI 21035	> 50	1,8	> 50	2,7	0,3
MHI 21039	> 50	5	3	0,6	0,1
MHI 21040	> 20	-	-	-	3,4
<i>C. universalis</i>					
MHI 981	1	1,3	> 70	-	0,1
<i>C. mucilaginosus</i>					
MHI 21031	0,1	8,3	0,8	0,4	3
<i>C. turicensis</i>					
MHI 21026	1,6	2,8	7,9	0,8	0,1
MHI 21049	> 20	0,6	> 20	> 20	0,4
MHI 21050	> 20	1	> 20	> 20	0,6

- keine eindeutig positive Reaktion nachweisbar (Extinktion kleiner als dreifacher Leerwert)

Zusammenfassend zeigten die durchgeföhrten Untersuchungen, dass mAK 2B5 α G und 2G8 α G in der Gruppe der monoklonalen Antikörper gegen *Cronobacter* spp.-Ghosts im EIA die höchsten Affinitäten für die untersuchten Antigen-Präparationen aufweisen, während für mAK 1A11 α G und 1H9 α G die geringsten Reaktivitäten ermittelt wurden.

3.3.7.1.2 Monoklonale Antikörper gegen *Cronobacter* spp.-Lysate - mAK α L

In den durchgeführten EIA-Untersuchungen basierend auf den mAK α L zeigte sich, dass die Antikörper dieser Gruppe, mit Ausnahme von mAK 2F8 α L, der mit allen untersuchten Antigenpräparationen reagierte, ein deutlich anderes Reaktionsprofil aufwiesen als die oben beschriebenen mAK α G. So wurden für mAK 1A11 α L, 1C4 α L, 1G3 α L, 1G9 α L und 2C12 α L lediglich Reaktivitäten mit Präparationen von Stämmen der Spezies *C. sakazakii* nachgewiesen (Tabelle 14). Dabei wurden zudem nur einzelne Stämme und nicht die gesamte Spezies erfasst. Mit Präparationen anderer Arten der Gattung *Cronobacter* wurden negative Ergebnisse im EIA erhalten. Im Gegensatz hierzu reagierte der mAK 2G4 α L sehr selektiv mit *C. turicensis* MHI 21026.

Für mAK α L konnten im Rahmen der Untersuchungen mittels EIA, anders als für mAK α G, keine systematischen Unterschiede in ihrer Reaktivität zwischen Ghosts und Lysaten festgestellt werden. Wenn mAK α L im EIA positiv mit Lysaten reagierten, dann waren adäquate Reaktionen auch mit den entsprechenden Ghost-Präparationen zu beobachten und umgekehrt. Analog verhielt es sich mit unbehandeltem Keimmaterial (Tabelle 14). Alle Stämme, deren Ghost- bzw. Lysat-Präparationen mit den mAK α L reagiert hatten, zeigten auch in diesen Untersuchungen positive EIA-Reaktionen.

Insgesamt zeigte der breit reagierende mAK 2F8 α L die höchsten Affinitäten im EIA. Für alle untersuchten *Cronobacter*-Ghost-Präparationen konnten bei einer Verdünnungsstufe von 1:10.000 noch Extinktionswerte von > 3 erreicht werden. Bis auf einzelne Stämme (MHI 975, MHI 21001, MHI 21002 und MHI 21040) waren für Ghost-Präparationen von *C. sakazakii* sogar in Verdünnungen von 1:100.000 noch Extinktionen von > 3 nachzuweisen. Für Ghost-Material der Spezies *C. turicensis* und *C. muytensi* konnten hingegen bei einer Verdünnung von 1:100.000 nur mehr Extinktionswerte von 0,3 bis 1,2 ermittelt werden.

Für den hochspezifischen mAK 2G4 α L wurden bei Testung der Ghost-Präparationen lediglich mit dem *C. turicensis*-Stamm MHI 21026 Extinktionen von $> 0,3$ erhalten, wobei noch sehr niedrige Beschichtungskonzentrationen von etwa 1×10^5 KbE/ml zu positiven Messergebnissen führten.

Wurden die anderen mAK α L mit Ghost-Präparationen verschiedener *Cronobacter* spp. getestet, wurde für alle Antikörper ein nahezu identisches Reaktionsprofil erhalten. Die mAK α L zeigten aber eine große Spannbreite bei der Reaktivität mit den jeweiligen Stämmen. So reagierten zum Beispiel Ghosts des Stammes MHI 21001 vergleichsweise schwach. Wurde

Ghost-Material dieses Stammes in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt (entspricht ca. $1-10 \times 10^7$ KbE/ml), lagen die ermittelten Extinktionen mit diesen Antikörpern im EIA unter 0,7 während für alle anderen positiv reagierenden Stämme Extinktionen ermittelt wurden, die in dieser Verdünnungsstufe deutlich über 1 lagen und teilweise auch eine Extinktion von 3 überschritten. Tendenziell waren für mAK 1A11 α L geringere Affinitäten für die Ghosts zu beobachten als für mAK 1C4 α L, 1 G9 α L, 1G3 α L und 2 C12 α L. Die Antikörper 1C4 α L und 1G9 α L unterschieden sich in der semiquantitativen Auswertung der EIA-Untersuchungen (Tabelle 14) von mAK 1G3 α L und 2C12 α L lediglich in einer geringeren Reaktivität mit den Ghosts des Stammes MHI 21039.

Tabelle 14: Reaktivität der hergestellten mAK α L gegen Ghost- und Lysat-Präparationen sowie unbehandeltes Keimmaterial verschiedener *Cronobacter*-Stämme. Die Ergebnisse wurden mittels indirekter EIA-Verfahren erhalten. Zur Beschichtung der Platten wurden serielle Verdünnungen von Präparationen der aufgeführten Stämme verwendet (Spalte A: Ghosts, Spalte B: Lysat, Spalte C: vitale Keime). Die mAK α L wurden in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1. Klon) eingesetzt.

Cronobacter-Stämme	mAK														
	1A11 α L			1C4 α L 1G9 α L			1G3 α L 2C12 α L			2G4 α L			2F8 α L		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
MHI 975	<i>C. sakazakii</i>	+++	+	+	++	+	+	++	+	+	-	-	+++	+++	+
MHI 977	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 979	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 982	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 986	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 987	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 990	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 992	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 995	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 21000	<i>C. sakazakii</i>	++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21001	<i>C. sakazakii</i>	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21002	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 21008	<i>C. sakazakii</i>	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21011	<i>C. sakazakii</i>	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21012	<i>C. sakazakii</i>	++	+	+	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21027	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 21028	<i>C. sakazakii</i>	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21029	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 21030	<i>C. sakazakii</i>	++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21032	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 21035	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-		-	-		-	-	+++	+++	+
MHI 21036	<i>C. sakazakii</i>		-			-			-			-			+
MHI 21037	<i>C. sakazakii</i>		-			-			-			-			+
MHI 21038	<i>C. sakazakii</i>			+		+			+			-			+

Fortsetzung Tabelle 14: Reaktivität der hergestellten mAK α L gegen Ghost- und Lysat-Präparationen sowie unbehandeltes Keimmaterial verschiedener *Cronobacter*-Stämme. Die Ergebnisse wurden mittels indirekter EIA-Verfahren erhalten. Zur Beschichtung der Platten wurden serielle Verdünnungen von Präparationen der aufgeführten Stämme verwendet (Spalte A: Ghosts, Spalte B: Lysat, Spalte C: vitale Keime). Die mAK α L wurden in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1. Klon) eingesetzt.

Cronobacter-Stämme	mAK														
	1A11 α L			1C4 α L 1G9 α L			1G3 α L 2C12 α L			2G4 α L			2F8 α L		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	++	+	+	++	+++	+	+++	+++	+	-	-		+++	+++	+
MHI 21039	<i>C. sakazakii</i>	++	+	+	++	+++	+	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+
MHI 21040	<i>C. sakazakii</i>	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+
MHI 21041	<i>C. sakazakii</i>			-			-			-					+
MHI 981	<i>C. universalis</i>	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+
MHI 21031	<i>C. muytjensii</i>	-	-		-	-	-	-	-	-	(+)		+++	+	+
MHI 21026	<i>C. turicensis</i>	-	-		-	-	-	-	-	+++	+++	+	+++	+++	+
MHI 21049	<i>C. turicensis</i>	-	-		-	-	-	-	-	(+)	-		+++	+++	+
MHI 21050	<i>C. turicensis</i>	-	-		-	-	-	-	-	(+)	-		+++	+++	+

Extinktion im EIA:

+++	> 2 bei einer Verdünnung des Ghost-Materials von 1:10.000 (ca. 1-10 x 10 ⁷ KbE/ml)
+++	> 2 bei Proteinkonzentration von 0,7 μ g/ml (Lysat-Material)
++	1 - 2 bei einer Verdünnung des Ghost-Materials von 1:10.000 (ca. 1-10 x 10 ⁷ KbE/ml)
++	1 - 2 bei Proteinkonzentration von 0,7 μ g/ml (Lysat-Material)
+	< 1 bei einer Verdünnung des Ghost-Materials von 1:10.000 (ca. 1-10 x 10 ⁷ KbE/ml)
+	< 1 bei Proteinkonzentration von 0,7 μ g/ml (Lysat-Material)
+	> 0,3 bei einer Keimzahl von ca. 10 ⁶ KbE/ml
(+)	geringfügig über dem Leerwert (< 0,3 bei allen Verdünnungsstufen)
-	keine eindeutig positive Reaktion nachweisbar
	nicht untersucht

Detailliertere Untersuchungen zur relativen Affinität der mAK α L für Lysate von *Cronobacter*-spp. sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Relative Affinität der mAK α L für Lysate verschiedener *Cronobacter*-Stämme. Die Bestimmung erfolgte im indirekten EIA unter Verwendung serieller Verdünnungsreihen der Antigenpräparationen. Angegeben sind die Proteinkonzentrationen im Lysat [μ g/ml], bei denen unter diesen Versuchsbedingungen mit Einsatz des jeweiligen mAK in einer Verdünnung des ZKÜ (1.Klon) von 1:50 noch eine Extinktion von 1 erreicht wurde.

<i>Cronobacter</i> spp. (Lysate)	mAK						
	1A11 α L	1C4 α L	1G9 α L	1G3 α L	2C12 α L	2G4 α L	2F8 α L
<i>C. sakazakii</i>							
MHI 975	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80	-	< 0,06
MHI 977	-	-	-	-	-	-	< 0,07
MHI 979	-	-	-	-	-	-	< 0,08
MHI 982	-	-	-	-	-	-	< 0,05
MHI 986	-	-	-	-	-	-	< 0,06
MHI 987	-	-	-	-	-	-	< 0,05
MHI 990	-	-	-	-	-	-	0,1
MHI 992	-	-	-	-	-	-	< 0,06
MHI 995	-	-	-	-	-	-	0,14
MHI 21000	0,5	0,03	0,1	0,02	< 0,01	-	< 0,03
MHI 21001	0,04	0,09	0,25	0,4	0,3	-	0,15
MHI 21002	-	-	-	-	-	-	< 0,06
MHI 21008	0,1	< 0,02	0,04	< 0,02	< 0,02	-	< 0,06
MHI 21011	< 0,04	< 0,01	0,02	0,03	0,01	-	< 0,05
MHI 21012	0,9	0,04	0,1	0,05	0,04	-	< 0,07
MHI 21027	-	-	-	-	-	-	< 0,03
MHI 21028	0,07	0,03	0,1	0,025	< 0,02	-	< 0,06
MHI 21029	-	-	-	-	-	-	0,04
MHI 21030	0,1	0,03	0,2	0,09	0,04	-	< 0,09
MHI 21032	-	-	-	-	-	-	< 0,06
MHI 21035	-	-	-	-	-	-	0,1
MHI 21039	> 80	0,03	0,24	0,1	0,05	-	< 0,09
MHI 21040	-	-	-	-	-	-	0,06
<i>C. universalis</i>							
MHI 981	-	-	-	-	-	-	< 0,06
<i>C. muytjensii</i>							
MHI 21031	-	-	-	-	-	> 16	5,5
<i>C. turicensis</i>							
MHI 21026	-	-	-	-	-	0,009	< 0,03
MHI 21049	-	-	-	-	-	-	0,08
MHI 21050	-	-	-	-	-	-	0,1

- keine Extinktion im EIA nachweisbar

Auffallend war zunächst, dass die Beschichtungskonzentrationen, bei denen im EIA eine Extinktion von 1,0 erzielt wurde, für viele Stämme bei unter 0,1 µg Protein pro ml lagen; ein Hinweis auf eine vergleichsweise hohe Affinität der eingesetzten Antikörper. Wie zu erwarten, zeigten die mAK α L insgesamt deutlich höhere Affinitäten zu den Lysaten als die mAK α G.

Durch die quantitative Auswertung der EIA-Untersuchungen wurde bestätigt, dass sich die Affinitäten von mAK 1A11 α L, 1C4 α L, 1G9 α L, 1G3 α L und 2C12 α L für *Cronobacter*-Lysate untereinander in jeweils ähnlichen Größenbereichen bewegen, wobei die mAK 1A11 α L und 1G9 α L die tendenziell geringsten Affinitäten aufwiesen. Für diese beiden mAK α L waren die Dosis-Wirkungskurven zum Teil durch einen sehr flachen Verlauf gekennzeichnet, wie in Abbildung 8 exemplarisch für Stamm MHI 21039 dargestellt ist.

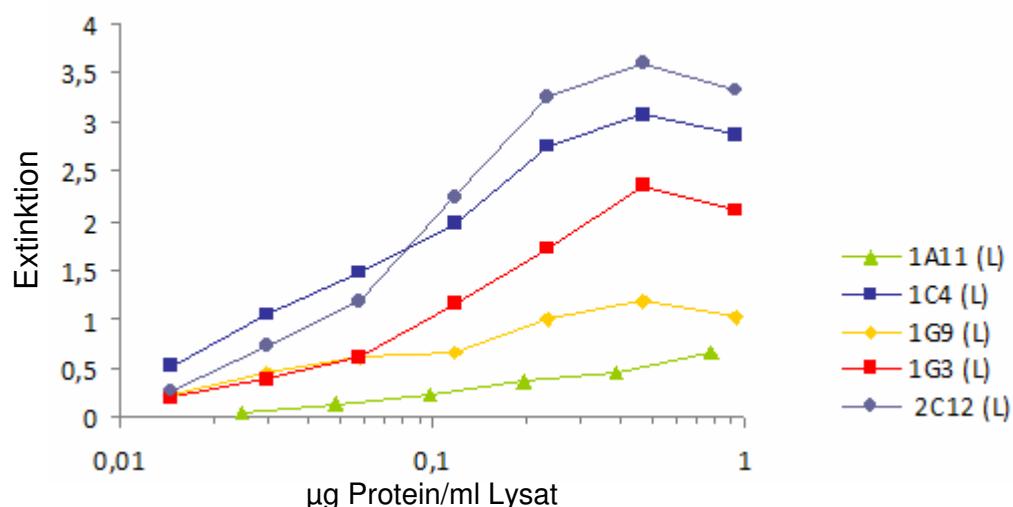


Abbildung 8: Reaktivität verschiedener mAK α L mit Lysat des Stammes *C. sakazakii* MHI 21039. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit seriellen Verdünnungen des Lysats, die Antikörper wurden fix in einer 1:50 Verdünnung (ZKÜ, 1. Klon) eingesetzt.

Der Antikörper 2G4 α L zeigte auch in Verbindung mit Lysaten eine hochspezifische Reaktion mit hoher Affinität für *C. turicensis* MHI 21026. Bereits eine Proteinkonzentration von 0,009 µg/ml im Lysat reichte aus, um mit dieser Antigenpräparation eine Extinktion von 1,0 im EIA zu erhalten. Für die Lysate der *C. turicensis*-Stämme MHI 21049 und MHI 21050 wurden hingegen bei Einsatz des mAK 2G4 α L nur geringfügige Extinktionen im EIA nachgewiesen. Die Messwerte waren um etwa Faktor 1.000 geringer als für MHI 21026.

Auffällig war, dass der breit reagierende mAK 2F8 α L für alle untersuchten Stämme (außer MHI 21031) sehr hohe Affinitäten aufwies, d.h. die Beschichtungskonzentrationen, die im EIA in einer Extinktion von $> 1,0$ resultierten, lagen mit max. 0,15 μ g/ml auf einem sehr niedrigen Niveau. Auch für das Lysat des Stammes *C. sakazakii* MHI 975, das mit den anderen mAK α L nur sehr schwach reagierte (Tabelle 15), wurde mit mAK 2F8 α L ein hohes Messsignal erhalten. Während die Extinktionen im EIA für das Lysat dieses Stammes in Verbindung mit den mAK 1A11 α L, 1C4 α L, 1G3 α L, 1G9 α L und 2C12 α L selbst bei einer Proteinkonzentration von 80 μ g/ml einen Wert von 1,0 nicht erreichten, lagen die Werte im EIA basierend auf mAK 2F8 α L bei einem Proteingehalt von 0,06 μ g/ml noch bei $> 3,0$. Lediglich mit dem Lysat von *C. muytjensii* MHI 21031 zeigte 2F8 α L eine tendenziell schwache Reaktivität. Von dieser Präparation wurden 5,5 μ g Protein/ml benötigt, um im EIA eine Extinktion von 1,0 zu erhalten. Der deutliche Unterschied in den Affinitäten von mAK 2F8 α L zwischen dem Lysat dieses Stammes und den anderen untersuchten Keimen, ist in Abbildung 9 im Vergleich mit den Stämmen *C. sakazakii* MHI 990 und MHI 21035 dargestellt.

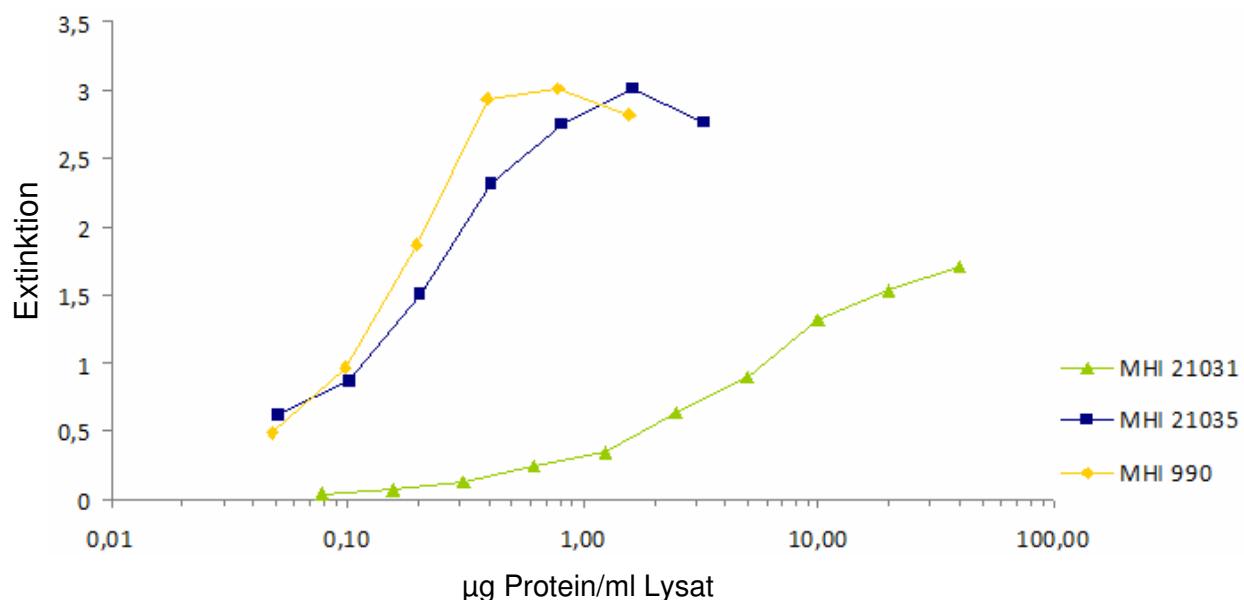


Abbildung 9: Reaktivität von mAK 2F8 α L mit Lysaten ausgewählter *Cronobacter*-Stämme. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit seriellen Verdünnungen der Lysat-Präparationen der angegebenen *Cronobacter*-Stämme, der Antikörper (ZKÜ, 1. Klon) wurde in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt.

Für die Gruppe der monoklonalen Antikörper gegen *Cronobacter*-Lysate lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sich zwei Antikörper aufgrund ihrer hohen Affinität und ihrer Spezifität klar von den anderen mAK α L differenzieren lassen. Dabei zeigte mAK 2G4

α L ein sehr selektives Verhalten und reagierte nur mit dem *C. turicensis*-Stamm MHI 21026, mAK 2F8 α L hingegen zeichnete sich durch eine breite Reaktivität mit allen eingesetzten *Cronobacter*-Präparationen aus. Die anderen hergestellten mAK α L zeigten lediglich Reaktivität mit einzelnen *C. sakazakii*-Stämmen, wobei sich das Spezifitätsmuster der Antikörper untereinander nicht unterschied. Auch im Hinblick auf die Affinitäten konnten mit Ausnahme des mAK 1A11 α L nur geringe Unterschiede zwischen diesen Antikörpern im indirekten EIA ermittelt werden.

3.3.7.1.3 Nachweisempfindlichkeit der indirekten EIAs

Die Unterschiede in den Affinitäten der mAK ließen sich auch an der Nachweisempfindlichkeit der jeweiligen indirekten EIAs ablesen. Die Nachweisgrenze (NWG) im EIA als Maß für die Sensitivität der gewonnenen Antikörper wurde definiert als die Antigenkonzentration, bei der im EIA eine Extinktion erreicht wird, die den dreifachen Wert des antigenfreien Kontrollstandards überschreitet.

Die Sensitivität differiert für jeden der untersuchten Antikörper in Abhängigkeit vom untersuchten Mikroorganismus. Zudem variierten insbesondere für die mAK α G die Nachweisempfindlichkeiten sehr stark. Verdeutlicht wird dies am Beispiel von Stamm MHI 21001; während im EIA bereits ab 0,06 μ g Protein pro ml Lysat ein positiver Nachweis mit mAK 2G8 α G erhalten wurde, konnte mit mAK 2F7 α G diese Präparation unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen erst ab einer Proteinkonzentration von 32 μ g/ml erfasst werden.

Die höchsten Sensitivitäten wurden mit dem Testsystem basierend auf mAK 1H9 α G und 2G8 α G erreicht (Tabelle 16). Für mAK 2G8 α G war dieses Ergebnis zu erwarten, da dieser Antikörper die höchsten Affinitäten der mAK α G im indirekten EIA zeigte. Dies war bei mAK 1H9 α G nicht der Fall. Es wurden sehr flache Verläufe der Dosis-Wirkungskurven im EIA nachgewiesen und häufig wurden auch unter Verwendung von Lysaten mit Proteingehalten größer 50 μ g/ml keine Extinktionen von 1 erreicht. Dennoch war es mit diesem Antikörper möglich, bereits vergleichsweise geringe Antigenkonzentrationen (z. B. 0,05 μ g Protein/ml Lysat des Stammes MHI 21030) im indirekten EIA sicher zu erfassen.

Im Vergleich zu den mAK α G reagierten die mAK α L erwartungsgemäß sensitiver auf die untersuchten Lysate, da diese Antikörper das Ergebnis der Immunisierung von Mäusen mit Lysat-Material darstellen. Die ermittelten NWG lagen weitestgehend unter 0,01 μ g Protein

pro ml Lysat. Insbesondere für mAK 1C4 α L, 1G3 α L, 1G9 α L und 2C12 α L, die alle ein identisches Reaktionsprofil für *Cronobacter* spp. aufwiesen (vgl. 3.3.7.1.2) und sich auch in ihren Affinitäten nur wenig unterschieden, lagen auch die NWG in ähnlichen Konzentrationsbereichen. MAK 1C4 α L zeigte hier tendenziell die höchste und mAK 1G3 α L die niedrigste Sensitivität, wie in Tabelle 16 an ausgewählten Stämmen dargestellt ist. Eine hohe Nachweisempfindlichkeit der mAK α L im indirekten EIA war auch für unbehandeltes Keimmaterial festzustellen (Ergebnisse nicht dargestellt). So konnten die in Tabelle 16 aufgeführten Stämme bei einer Keimzahl von ca. 10^7 KbE/ml (entspricht einer Verdünnung der LB-Anzucht von 1:32.000) von allen mAK α L noch sicher erfasst werden. 1C4 α L zeigte auch hier die höchste Sensitivität. Bereits bei sehr niedrigen Beschichtungskonzentrationen von unter 10^6 KbE/ml (bezogen auf die in Tabelle 16 dargestellten Stämme) wurden im EIA Extinktion erreicht, die den dreifachen Wert des antigenfreien Kontrollstandards deutlich überschritten.

Tabelle 16: Nachweisgrenzen monoklonaler Antikörper, ermittelt mittels indirektem EIA. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit seriellen Verdünnungen von Lysat-Präparationen der angegebenen *Cronobacter*-Stämme, die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1.Klon) eingesetzt.

mAK	Nachweisgrenzen der mAK für die Antigenpräparation in μ g/ml		
	MHI 21001 (Lysat)	MHI 21039 (Lysat)	MHI 21030 (Lysat)
1H9 αG	0,06	0,1	0,05
2B5 αG	8,0	0,2	0,1
2B11 αG	-	0,3	0,5
2F7 αG	32,0	0,1	0,1
2G8 αG	0,06	0,02	0,005
1A11 αL	0,005	0,05	0,004
1C4 αL	0,003	0,003	0,003
1G9 αL	0,005	0,007	0,007
1G3 αL	0,015	0,007	0,007
2C12 αL	0,008	0,003	0,005

Für den selektiven mAK 2G4 α L wurde bei Einsatz des Lysates von Stamm *C. turicensis* MHI 21026 eine Nachweisgrenze von 0,0002 μ g/ml (0,2 ng/ml) ermittelt. Die ermittelte NWG für das Lysat des Stammes *C. muytjensii* MHI 21031, für den mit mAK 2G4 α L als einziges weiteres *Cronobacter*-Lysat eine schwach positive Reaktion im EIA nachgewiesen werden konnte, betrug dagegen 42 μ g/ml (Faktor 200.000). Lebende Bakterien des Stammes MHI 21026 waren bei Keimzahlen von 10^4 KbE/ml noch im indirekten EIA nachweisbar.

3.3.7.2 Inter-Genus-Spezifität der monoklonalen Antikörper

Um die Spezifität der gewonnenen mAK auch Genus-übergreifend beurteilen zu können, wurden ergänzend zu den bisherigen Tests mit Lysaten und Ghost-Material von *Cronobacter* spp. (3.3.7.1) EIA-Untersuchungen mit Präparationen weiterer gramnegativer und grampositiver Bakterienstämme durchgeführt. Für die Beschichtung der Platten wurden sowohl Lysate und Ghosts als auch Zellhomogenisate nach Ribolyser-Behandlung (3.3.4.1b) eingesetzt. In Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Untersuchungen mit Ribolyser-Material im indirekten EIA vergleichbare Ergebnisse lieferten, wie sie unter Verwendung von Ghosts erhalten worden waren. Die Herstellung von Ribolyser-Zellhomogenisaten ist jedoch mit einem deutlich geringeren Aufwand verbunden als die Probenvorbereitung mit Polymyxin-Verdau, so dass sich dieses Material dafür eignete, in einem vereinfachten Verfahren Untersuchungen zum Reaktionsspektrum der mAK im indirekten EIA durchzuführen.

Die untersuchten mAK α G zeigten eine insgesamt sehr breite Reaktivität gegenüber den getesteten gramnegativen Keimen (Tabelle 17). Während die mAK 1H9 α G, 2B5 α G und 2G8 α G Reaktivität mit allen untersuchten Enterobacteriaceae-Stämmen zeigten (insbesondere mit den Ghost-Präparationen), wurde für die mAK 1A11 α G, 2B11 α G, 2B12 α G und 2F7 α G nur mit den Präparationen einzelner gramnegativer Stämme eine positive Reaktion festgestellt (14 von 28 Stämmen). Diese Antikörper besitzen beispielsweise keine Reaktivität mit den getesteten Vertretern von *Hafnia alvei* (MHI 910), *Proteus vulgaris* (MHI 913) oder *Yersinia enterocolitica* (MHI 973). 1A11 α G reagierte als einziger der mAK α G nicht mit gramnegativen Bakterien außerhalb der Familie der Enterobacteriaceae.

Wie bereits im Rahmen der Untersuchungen mit *Cronobacter* spp. festgestellt worden war, reagierten auch hier die mAK α G mit Lysaten tendenziell schwächer als mit den entsprechenden Ghost-Präparationen. Mit den bisherigen Feststellungen (3.3.7.1.1) korreliert zudem, dass auch bei diesen Untersuchungen mit verschiedenen gramnegativen Enterobacteriaceae für mAK 2G8 α G vergleichsweise höhere Extinktionen mit Lysaten im EIA zu beobachten waren, als für die anderen getesteten mAK α G.

Mit Präparationen der untersuchten grampositiven Stämme konnte, mit Ausnahme von mAK 2B5 α G, keine Reaktivität beobachtet werden. Die Reaktion von 2B5 α G mit *Bacillus cereus* MHI 163 (inaktiviert mit 4% Paraformaldehyd in PBS) war aber nur sehr schwach ausgeprägt. So waren Keimzahlen von ca. 1×10^9 KbE/ml erforderlich, um im indirekten EIA eine Extinktion von 0,5 zu erreichen. Dieser Wert wurde bei allen anderen mit mAK 2B5 α G

positiv reagierenden Ghost-Präparationen (Tabelle 17) bereits bei Keimzahlen von ca. 10^6 KbE/ml (entspricht einer Verdünnung der Ghost-Präparation von 1:50.000) deutlich überschritten.

Zusammenfassend, auch unter Berücksichtigung der in 3.3.7.1.1 dargestellten Ergebnisse, deuten die gewonnenen Daten zur Intra- und Inter-Genus-Spezifität der gegen *Cronobacter*-Ghosts gerichteten mAK darauf hin, dass die Antikörper mit Epitopen reagieren, die innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae regelmäßig zu finden sind.

Wie aufgrund in 3.3.7.1.2 dargestellten Untersuchungen zu erwarten war, zeigten die mAK α L auch im EIA mit Präparationen anderer Bakterienstämme, die nicht dem Genus *Cronobacter* zuzuordnen sind, unterschiedliche Reaktionsmuster. So reagierte mAK 2F8 α L für den bereits innerhalb der Gattung *Cronobacter* eine breite Reaktivität nachgewiesen werden konnte, auch mit 26 von 28 der getesteten gramnegativen Bakterien anderer Gattungen. Lediglich mit den Stämmen *Escherichia coli* (MHI 708) und *Providencia stuartii* (MHI 952) war keine Reaktivität nachweisbar. Auch grampositive Organismen wurden durch diesen Antikörper erfasst (Tabelle 17).

Die nach den bisherigen Untersuchungen (3.3.7.1.2) postulierte Selektivität der mAK α L für *C. sakazakii* (ausgenommen mAK 2F8 α L und mAK 2G4 α L) wurde bestätigt. Für keine der in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzten 28 gramnegativen und zwei grampositiven Spezies konnte mit den mAK 1A11 α L, 1C4 α L, 2C12 α L, 1G3 α L und 1G9 α L eine positive Reaktion nachgewiesen werden (Tabelle 17).

Für den *C. turicensis*-spezifischen mAK 2G4 α L wurden lediglich mit Ghost-Material der Stämme *Klebsiella pneumoniae* (MHI 21024), *Serratia rubidea* (MHI 974), *Yersinia enterocolitica* (MHI 973) und *Enterobacter cloacae* (MHI 904) Extinktionen erhalten, die geringfügig über denen der jeweiligen Leerwerte lagen. Wurden die Ghost-Präparationen in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, bewegten sich die Extinktionen im EIA bei 0,5 (MHI 973 und MHI 21024) bzw. 0,2 (MHI 904 und MHI 974). Die Affinität von mAK 2G4 α L ist somit für Ghosts von *C. turicensis* MHI 21026 etwa 2.000-fach höher als für diese Stämme.

Tabelle 17: Reaktivität der hergestellten mAK mit Antigenpräparationen verschiedener gramnegativer Bakterienstämme. Die Ergebnisse wurden mittels indirekter EIA-Verfahren erhalten. Zur Beschichtung der Platten wurden serielle Verdünnungen von Präparationen der aufgeführten Stämme verwendet. Die mAK wurden in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ nach 1. Klonierung eingesetzt.

Bakterienstämme	mAK												
	1A11 αG	1H9 αG	2B5 αG	2B11 αG	2B12 αG	2F7 αG	2G8 αG	1A11 αL	1C4 αL	1G9 αL	1G3 αL	2C12 αL	2G4 αL
Gramnegative Enterobacteriaceae													
MHI 902	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
MHI 904	<i>E. cloacae</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
MHI 909	<i>S. Senftenberg</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	(+)	-	-	+
MHI 910	<i>H. alvei</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MHI 913	<i>P. vulgaris</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MHI 968	<i>E. asburiae</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 973	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	(+)	-	-	+
MHI 974	<i>S. rubidea</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	(+)	-	-	+
MHI 21024	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	(+)	-	-	+
BL 21	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 708	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
MHI 712	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 815	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 903	<i>Citrobacter sp.</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
MHI 905	<i>M. wisconsensis</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 906	<i>S. somnei</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 911	<i>P. mirabilis</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 914	<i>S. flexneri</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 952	<i>P. stuartii</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MHI 955	<i>E. hermannii</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MHI 969	<i>E. aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MHI 991	<i>M. morganii</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Sonstige Gramnegative Keime													
MHI 954	<i>A. lwoffii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MHI 1000	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MHI 1001	<i>P. fluoreszens</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
MHI 1004	<i>A. media</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
MHI 1007	<i>A. liquefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MHI 1017	<i>P. putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Grampositive Keime													
MHI 163	<i>B. cereus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MHI 414	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+	eindeutig positive Reaktion, Extinktionswerte im EIA lagen deutlich über 0,5
(+)	geringfügig über dem Leerwert (< 0,5 bei allen Verdünnungsstufen, nur mit Ghost-Material)
-	keine eindeutig positive Reaktion nachweisbar (Extinktion kleiner als dreifacher Leerwert)

Zusammenfassend ist festzustellen, dass für die gegen Ghost-Präparationen generierten Antikörper, mit Ausnahme von mAK 2B11 α G und 2B12 α G, die eine identische Spezifität aufweisen, für jeden der Antikörper ein unterschiedliches Reaktionsmuster nachgewiesen werden konnte. Während für mAK 1A11 α G lediglich Kreuzreaktivität mit Vertretern der Familie Enterobacteriaceae nachgewiesen werden konnte, zeigten die weiteren mAK α G im EIA auch Familien-übergreifend positive Reaktionen.

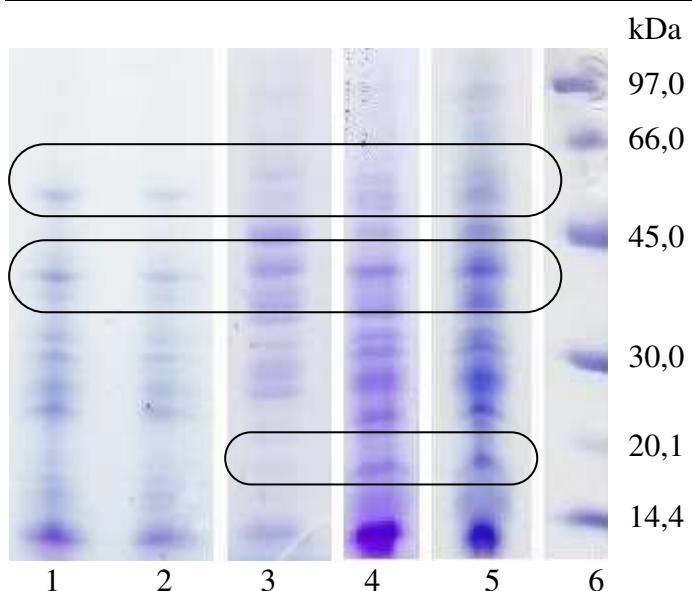
Die vorliegenden Untersuchungen zeigten zudem, dass alle mAK α L, mit Ausnahme 2F8 α L und 2G4 α L, eine identische Spezifität aufweisen. Die Reaktivität ist auf einzelne Stämme der Spezies *C. sakazakii* beschränkt. Dagegen ist für mAK 2F8 α L, dessen breite, auch Genus-übergreifende Reaktivität charakteristisch. Eine hoch selektive Reaktivität mit *C. turicensis* MHI 21026 wurde für mAK 2G4 α L nachgewiesen.

3.3.7.3 Epitop-Spezifität

Zur weiteren Charakterisierung der mAK, insbesondere im Hinblick auf deren Epitop-Spezifität, wurden Immunoblots eingesetzt. In Vorversuchen wurde zuerst überprüft, inwieweit sich die nach Polymyxin-Verdau erhaltenen Ghost- und Lysat-Präparationen elektrophoretisch mittels SDS-PAGE auftrennen lassen. Ziel war es zudem, Aussagen über eine optimale Beladung der Gele treffen zu können, um in weiterführenden Untersuchungen mittels Immunoblot bestmöglich verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

In Abbildung 10 sind mit Coomassie gefärbte Gele nach SDS-PAGE dargestellt, auf denen verschiedene Lysat-Präparationen in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetrennt wurden. Bei der Applikation von 0,4 μ g Protein oder weniger je Laufspur konnten charakteristische Banden teilweise nur mehr schwer detektiert werden (Abbildung 10, Positionen 1 bis 3). Ab einer Menge von ca. 3 μ g Protein, ließ die Qualität der Trennung z.T. deutlich nach (Abbildung 10, Position 5).

Weiterhin ist zu erkennen, dass die Proteinmuster der Lysat-Aufarbeitungen verschiedener gramnegativer Bakterien unterschiedlicher Genera z.T. deutliche Parallelen zueinander zeigten. So finden sich auf gleicher Höhe Banden zwischen 50 kDa und 60 kDa. Auch bei ca. 40 kDa ist eine deutliche Bande in allen untersuchten Präparationen erkennbar (Abbildung 10, obere Markierungen).

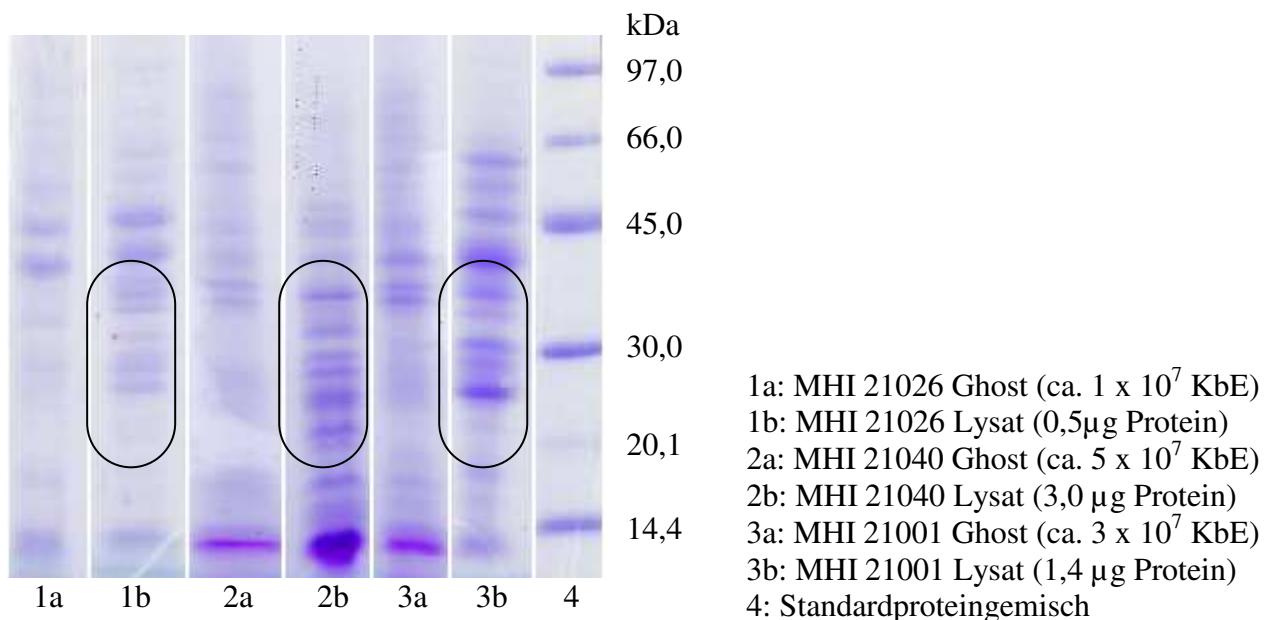


- 1: *Y. enterocolitica* MHI 973, Lysat (Proteinmenge: 0,3 µg)
- 2: *S. Senftenberg* MHI 909, Lysat (Proteinmenge: 0,2 µg)
- 3: *C. sakazakii* MHI 21040, Lysat (Proteinmenge: 0,4 µg)
- 4: *C. sakazakii* MHI 21040, Lysat (Proteinmenge: 1,5 µg)
- 5: *C. sakazakii* MHI 21040, Lysat (Proteinmenge: 3,0 µg)
- 6: Standardproteingemisch

Abbildung 10: SDS-PAGE von Lysat-Präparationen verschiedener gramnegativer Bakterien nach Anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blau. Aufgetrennt wurden Lysate mit differierenden Proteinkonzentrationen. Die Markierungen kennzeichnen prominente Banden der aufgetrennten Lysate.

Das Proteinprofil der untersuchten *Cronobacter*-Stämme (MHI 21001, MHI 21026, MHI 21040) weist jedoch im Gegensatz zu den Salmonellen (MHI 909) und Yersinien (MHI 973) zusätzlich eine prominente Bande bei etwa 18 kDa (Abbildung 10, untere Markierung) auf.

Mittels SDS-PAGE konnte zudem verdeutlicht werden, dass sich die Zusammensetzung der Proteinfraktionen von Lysat- und Ghost-Aufarbeitungen, wie zu erwarten, deutlich voneinander unterscheidet (Abbildung 11). Am Beispiel der verschiedenen *Cronobacter*-Stämme ist erkennbar, dass in den Lysaten der Anteil der Proteine zwischen 20 und 40 kDa tendenziell höher ist, als bei den Ghosts (Markierungen Abbildung 11).



3.3.7.3.1 Immunoblots mit monoklonalen Antikörpern gegen *Cronobacter* spp.-Ghosts – mAK αG

Bei Verwendung der mAK αG wurden, wie in Abbildung 12 exemplarisch für den Stamm *C. turicensis* MHI 21026 dargestellt, unterschiedliche Reaktionsmuster in den Immunoblots erhalten.

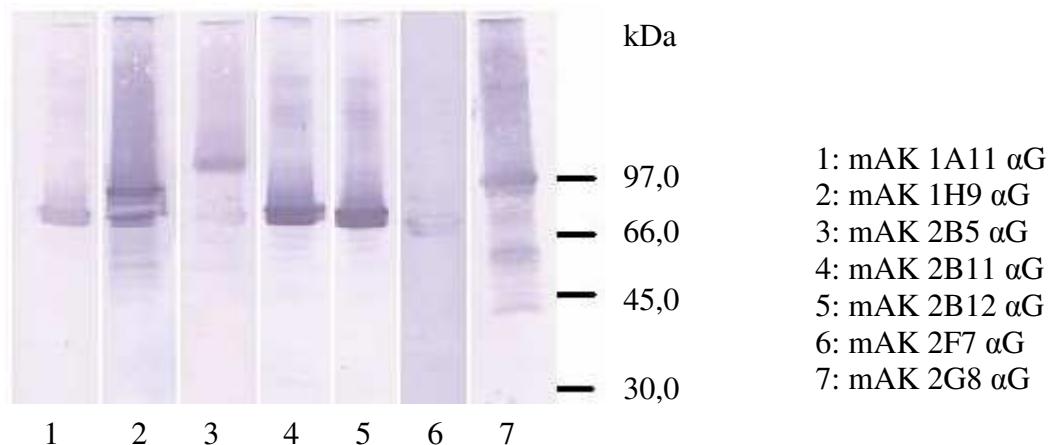


Abbildung 12: Immunoblot einer Ghost-Präparation von Stamm *C. turicensis* MHI 21026 nach SDS-PAGE. Das nach Polymyxin-Verdau erhaltene Pellet wurde in 500 µl PBS suspendiert (ca. 10^{11} KbE/ml). 2 µl dieser Suspension wurden mit 8 µl Bicarbonat-Puffer und 5 µl SDS-Lösung vermischt und 1 µl dieses Materials pro Kavität im SDS-Gel aufgetrennt. Die primären Antikörper wurden in einer Verdünnung des ZKÜ (1.Klon) von 1:5 eingesetzt. Die Detektion gebundener AK erfolgte mittels NBT/BCIP.

Grundsätzlich war eine Reaktivität der untersuchten mAK α G lediglich in Bereichen von > 40 kDa zu verzeichnen. Deutlich erkennbar ist, dass mAK 2B11 α G und 2B12 α G (Abbildung 12; Positionen 4 und 5) in Intensität und Reaktionsmuster nahezu identisch reagierten. Diese Beobachtung korreliert mit den in den Abschnitten 3.3.7.1.1 und 3.3.7.2 dargestellten homologen Reaktivitäten der beiden Antikörper in den EIA-Untersuchungen zur Affinität und Spezifität. Während bei mAK 1A11 α G und 2F7 α G deutliche Unterschiede bei der Affinität und Spezifität im EIA festgestellt worden waren, zeigten diese mAK im Immunoblot ein sehr ähnliches Reaktionsmuster (Abbildung 12; Positionen 1 und 6). Die reaktive Bande lag etwa auf gleicher Höhe wie das von den mAK 2B11 und 2B12 erkannte Protein, die Intensität der Reaktion war aber deutlich schwächer. Von diesen mAK ließen sich im Immunoblot die mAK 1H9 α G, 2B5 α G und 2G8 α G deutlich unterscheiden. So zeigte mAK 2B5 α G die stärkste Reaktion im Bereich von > 97 kDa (Abbildung 12, Position 3), während mAK 2G8 α G zusätzlich sehr intensiv mit Proteinbanden von < 50 kDa (Abbildung 12, Position 7) reagierte.

Die eindeutige Reaktivität der mAK mit spezifischen Banden im Immunoblot legt nahe, dass es sich bei den Antigenen der mAK α G um Proteine handelt. Da die Ghost-Präparationen vor allem aus den unlöslichen Anteilen der lysierten Bakterien bestehen, könnte es sich hierbei um Bestandteile bakterieller Membranen handeln.

Aufgrund der breiten Reaktivität dieser mAK im EIA, insbesondere mit gramnegativen Keimen (3.3.7.1.1 und 3.3.7.2), waren diese Antikörper jedoch nicht für den angestrebten spezifischen *Cronobacter*-Nachweis einsetzbar. Daher wurden auch keine weiterführenden Untersuchungen zur genauen Identifizierung der reaktiven Antigene durchgeführt.

3.3.7.3.2 Immunoblots mit monoklonalen Antikörpern gegen *Cronobacter* spp.-Lysate – mAK α L

Bei der Untersuchung von mAK α L im Immunoblot konnten analog zu den oben beschriebenen EIA-Spezifitäten voneinander deutlich differierende Reaktionsmuster beobachtet werden:

a) Immunoblots mit mAK 2F8 α L

Die in Abbildung 13 exemplarisch dargestellten Blots von Lysaten der Stämme *C. turicensis* MHI 21026 und *C. sakazakii* MHI 21040 zeigen deutliche Parallelen zueinander.

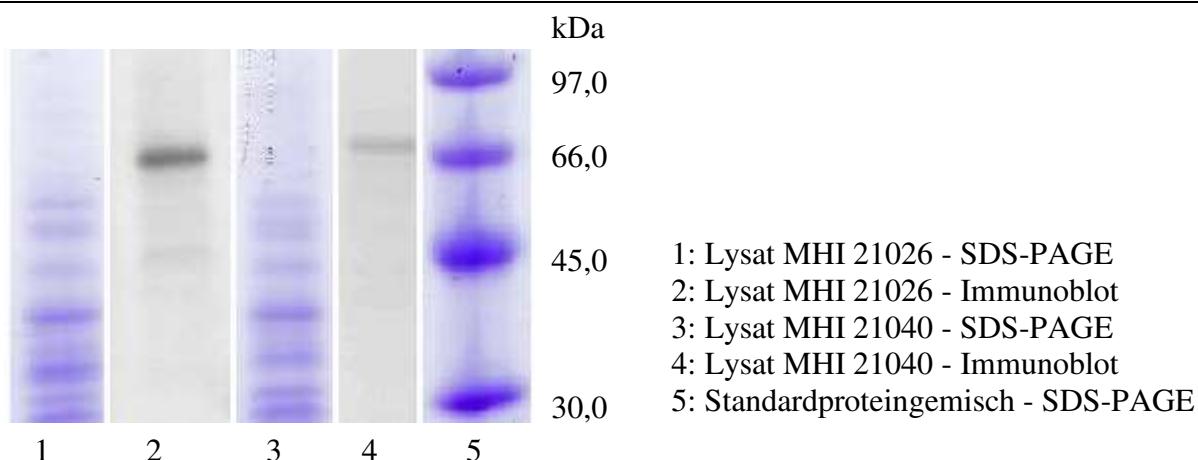


Abbildung 13: Vergleich SDS-PAGE - Immunoblot von Lysat-Aufarbeitungen der Stämme *C. turicensis* MHI 21026 und *C. sakazakii* MHI 21040 mit mAK 2F8 α L, eingesetzt in einer Verdünnung von 1:5 (ZKÜ, 1.Klon).

Der Antikörper reagiert in beiden Präparationen mit einem Bestandteil der Lysat-Präparation im Bereich von etwa 70 kDa. Dabei handelt es sich offensichtlich nicht um eine der besonders prominenten Proteinbanden, die in der SDS-PAGE erkennbar waren (Abbildung 13, Positionen 1 und 3). Eine Bestätigung, dass es sich bei den von mAK 2F8 α L erkannten Lysat-Bestandteilen um Proteine handelt, wurde mittels Proteinase-K-Test erbracht. Dazu wurden Lysate verschiedener *Cronobacter*-Stämme mit PBS auf Proteinkonzentrationen von 30 – 100 μ g/ml eingestellt. Zu 400 μ l Aliquoten dieser Lösungen wurde je 4 μ l Proteinase-K-Lösung (PK) gegeben, die Ansätze 1 h unter leichtem Schütteln bei 65 °C und im Anschluss über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben zur Inaktivierung der PK 1 h im siedenden Wasserbad erhitzt. Im indirekten EIA wurde anschließend getestet, ob die Proteinase-K-Präparationen im Vergleich zu den unbehandelten Lysaten eine reduzierte Reaktivität mit den zu testenden Antikörpern aufweisen. Als Negativkontrolle wurden 400 μ l PBS analog wie eine Probe behandelt, als Positivkontrolle wurden die Lysate unbehandelt in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt.

Der Effekt der Proteinase-K-Behandlung auf die Reaktivität von mAK 2F8 α L ist in Tabelle 18 anhand der Lysat-Präparation des Stammes *C. sakazakii* MHI 21001 dargestellt. Nach Verdau des Lysates mit PK reagierten die Ansätze im EIA negativ, die gemessenen Extinktionen entsprachen denen der Leerwerte.

Tabelle 18: Reaktivität des mAK 2F8 α L mit unbehandeltem bzw. mit Proteinase K behandeltem Lysat des Stammes *C. sakazakii* MHI 21001. Der mAK wurde in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ nach 1.Klonierung) eingesetzt.

Proteinkonzentration im Lysat	Extinktion im indirekten EIA	
	Lysat unbehandelt	Lysat nach Proteinase-K-Behandlung
10 μ g/ml	3,22	0,02
5 μ g/ml	1,61	0,02
2,5 μ g/ml	0,85	0,02

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass mAK 2F8 α L mit Proteinstrukturen der *Cronobacter*-Stämme reagiert und unterstreichen damit die Ergebnisse der Immunoblots. Aufgrund der geringen Selektivität von 2F8 α L wurden jedoch keine weiterführenden Untersuchungen zur genauen Identifizierung des reaktiven Proteins durchgeführt.

b) Immunoblots mit weiteren mAK α L

Die Untersuchungen im Immunoblot, die mit den anderen mAK α L durchgeführt wurden, resultierten in für Protein-Antigene untypischen Reaktionsmustern.

- mAK 2G4 α L

Der selektiv mit *C. turicensis* MHI 21026 reagierende mAK 2G4 α L zeigte im Immunoblot mit der Lysat-Aufarbeitung dieses Stammes ein deutlich anderes Reaktionsmuster, als es für mAK 2F8 α L mit Lysaten verschiedener *Cronobacter*-Stämme beobachtet worden war. In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass eine Zuordnung zu Proteinbanden aus der SDS-PAGE hier nicht möglich ist. Es sind lediglich zwei breite Reaktionszonen in den Bereichen von 30 bis 40 kDa und 70 bis 100 kDa erkennbar. Zudem ist festzustellen, dass selbst mit einer Beladung von lediglich 0,04 μ g Protein pro Bande eine sehr intensive Reaktion mit mAK 2G4 α L zu beobachten ist. Das entspricht etwa einem 30stel der Proteinmenge, die für eine optimale Beladung eines SDS-Gel mit Coomassie-Färbung nach Elektrophorese ermittelt worden war.

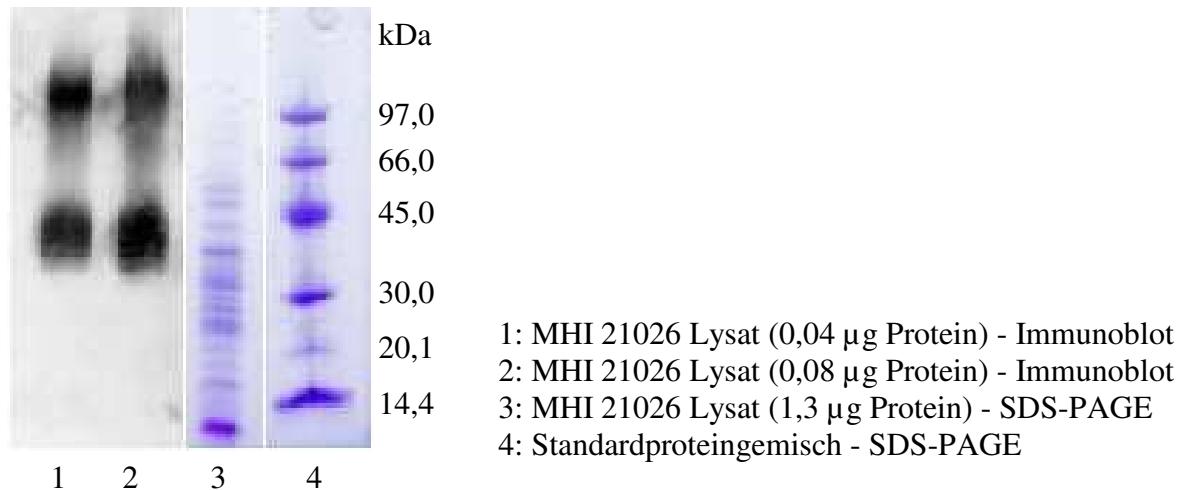


Abbildung 14: Vergleich des bei Einsatz des mAK 2G4 αL erhaltenen Immunoblots mit einer SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) der eingesetzten Präparation des Stammes *C. turicensis* MHI 21026. Der Antikörper 2G4 αL wurde in einer Verdünnung des ZKÜ (1.Klon) von 1:10 eingesetzt.

Die nach den Untersuchungen im EIA postulierte Selektivität des mAK 2G4 αL auf Stamm MHI 21026 wurde auch im Immunoblot bestätigt. Bei adäquater Beladung der Gele konnten für andere *C. turicensis* Stämme keine positiven Reaktionen im Blot nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

- mAK 1A11 αL, 1C4 αL, 1G3 αL, 1G9 αL und 2C12 αL

Für diese monoklonalen Antikörper wurden untereinander ähnliche Reaktionsmuster beobachtet (Abbildung 15). Grundsätzlich wurden in den Immunoblots drei Hauptreaktionszonen in den Bereichen um 20 kDa, 45 kDa und 97 kDa erhalten. Die Antikörper 1G3 αL und 2C12 αL, die sich hinsichtlich Intensität und Reaktionsmuster nicht signifikant unterscheiden, reagierten im Bereich von 45 und 37 kDa deutlich schwächer als die Antikörper 1A11 αL, 1C4 αL und 1G9 αL, die wiederum untereinander ein nahezu identisches Bild im Immunoblot ergeben. Diese Unterschiede in der strukturellen Spezifität der mAK, waren aufgrund der Untersuchungen im indirekten EIA nicht erwartet worden, da diese Antikörper dort ein sehr homogenes Reaktionsprofil gezeigt hatten (3.3.7.1.2).

Grundsätzlich konnten ähnlich wie für mAK 2G4 αL auch bei diesen Untersuchungen keine klar definierten Reaktionsbanden erhalten werden, die eine Zuordnung zu im SDS-Gel sichtbaren Proteinbanden erlaubt hätten (Abbildung 15).

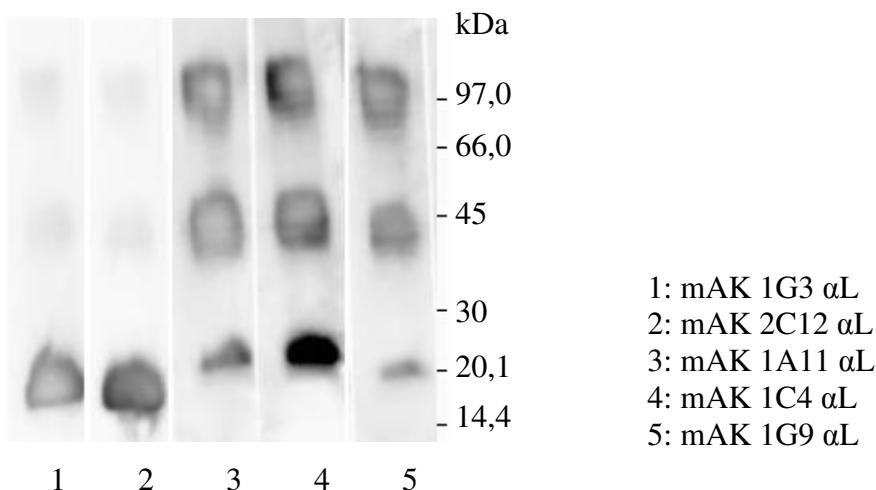


Abbildung 15: Immunoblot-Analysen zur Reaktivität der mAK mit Lysat-Präparationen von *C. sakazakii* MHI 21001. Die primären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:10 (ZKÜ, 1.Klon) eingesetzt.

- 2D-Gel-Elektrophorese:

Eine differenziertere Auf trennung und Darstellung von Proteinen kann durch das Verfahren der 2D-Elektrophorese (SDS-PAGE nach isoelektrischer Fokussierung) mit anschließendem Immunoblot erfolgen. Diese Methode wurde ergänzend zu den bisherigen Untersuchungen angewendet, um evt. doch vorhandene potentiell antigen wirkende Proteinstrukturen zu identifizieren. Für die Versuchsreihe wurden die mAK 1G3 αL und 2G4 αL eingesetzt.

Dazu wurde zunächst eine isoelektrische Fokussierung (IEF) von Lysat-Material des Stammes *C. turicensis* MHI 21026 im pH-Bereich von pH 4 bis pH 7 und pH 5 bis pH 8 durchgeführt. Nach anschließender Elektrophorese, Blotten und Entwickeln mit mAK 2G4 αL zeigte sich deutlicher als bei der 1D-PAGE auf der Membran ein streifiges Muster mit parallel verlaufenden Banden in den Bereichen von 20 bis 30 kDa und 60 bis 70 kDa (Abbildung 16b). Es ist deutlich erkennbar, dass eine Fokussierung der antigen wirkenden Struktur an einem bestimmten pH-Wert nicht möglich ist. Ein Vergleich mit einer Aufnahme einer Membran nach Ponceau-Färbung (Anfärben der Proteine) vor dem Immunoblot mit mAK 2G4 αL und dem fertig entwickelten Blot (Abbildung 16) zeigt, dass eine Zuordnung der reaktiven Strukturen zu einzelnen Protein-Spots nach 2D-Elektrophorese nicht möglich ist. Diese Ergebnisse legen dar, dass es sich bei dem von mAK 2G4 αL erkannten Antigen nicht um eine Proteinstruktur handeln kann.

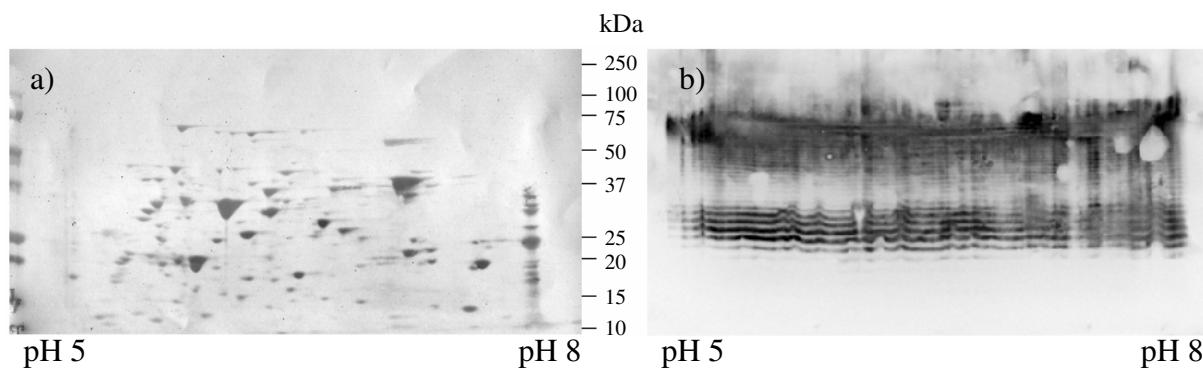


Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse einer 2D-Elektrophorese von Lysat des Stammes *C. turicensis* MHI 21026 (aufgetragene Menge ca. 250 µg Protein) im pH-Bereich 5 bis 8;

a) Membran nach 2D-Elektrophorese und Ponceau-Färbung,

b) Membran nach 2D-Elektrophorese und Immunoblot mit mAK 2G4 αL, eingesetzt in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1.Klon).

Analog wurde auch Lysat des Stammes *C. sakazakii* MHI 21001 mit mAK 1G3 αL als Vertreter der mAK αL, die selektiv mit einzelnen *C. sakazakii* Stämmen reagieren, in der 2D-Elektrophorese mit anschließendem Immunoblot getestet. Auch hier war keine Zuordnung zu Protein-Spots im zuvor angefärbten Gel möglich. Es waren, ähnlich wie für mAK 2G4 αL reaktive Banden zwischen 15 und 20 kDa im Blot zu erkennen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Für eine weitere Charakterisierung der Epitopspezifität dieser Antikörper, wurden daher Lysate der Stämme *C. turicensis* MHI 21026 und *C. sakazakii* MHI 21001 der unter 3.3.7.3.2a) beschriebenen Proteinase-K-Behandlung unterzogen. Das Lysat des Stammes *C. sakazakii* MHI 21001 wurde neben dem mAK 1G3 αL auch mit den anderen, sehr ähnlich reagierenden mAK 1A11 αL, 1C4 αL, 1G9 αL und 2C12 αL getestet. Für die Beurteilung von mAK 2G4 αL wurde das Lysat des Stammes *C. turicensis* MHI 21026 verwendet. Es war festzustellen, dass alle eingesetzten mAK mit den PK-behandelten Proben schwächer reagierten. Die im indirekten EIA erzielten Extinktionen sanken auf 20 bis 55% im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Wurden die Präparationen dagegen einer Temperaturbehandlung ohne PK-Zusatz unterzogen, war ein Anstieg der Extinktion im indirekten EIA auf bis zu 170% des Ausgangswertes zu verzeichnen (Tabelle 19). Offensichtlich kam es durch die Erhitzung der Lysate zu einer Demaskierung von weiteren Epitopen in den Präparationen.

Tabelle 19: Reaktivität verschiedener mAK α L mit unbehandelten bzw. mit Proteinase K- und hitzebehandelten Lysaten der Stämme *C. sakazakii* MHI 21001 und *C. turicensis* MHI 21026. Die mAK wurde in einer Verdünnung von 1:50 (ZKÜ, 1. Klon) eingesetzt. Angegeben sind die im indirekten EIA gemessenen Extinktionswerte.

mAK α L	Extinktion im indirekten EIA		
	Lysat	Lysat nach	Lysat nach
	unbehandelt	Proteinase-K-Behandlung	Temperaturbehandlung
Lysat MHI 21001			
1A11 α L	0,7	0,4	1,2
1C4 α L	1,4	0,5	1,9
2C12 α L	1,0	0,2	1,1
1G3 α L	1,1	0,3	1,3
1G9 α L	0,7	0,3	1,0
Lysat MHI 21026			
2G4 α L	1,1	0,3	2,2

Da das in den oben beschriebenen Immunoblots erhaltene Bandenmuster stark dem typischen LPS-Muster ähnelte (Poxton, 1995, Jaradat et al., 2011), wurde zunächst LPS aus *C. turicensis* MHI 21026 isoliert (3.2.8) und mit mAK 2G4 α L getestet. Als Kontrolle wurden kommerzielle LPS-Präparationen von *E. coli* und *S. Typhimurium* in den Versuchsaufbau einbezogen.

Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass mAK 2G4 α L mit Bestandteilen der LPS-Fraktion von *C. turicensis* MHI 21026 reagiert. In Abbildung 17 ist der entsprechende Immunoblot dargestellt, eine Reaktivität mit den als Kontrolle eingesetzten LPS-Präparationen von *E. coli* und *S. Typhimurium* wurde nicht festgestellt. Intensiv gefärbte Banden wurden zwischen 20 und 30 kDa und im Bereich ab ca. 60 kDa beobachtet (Abbildung 17).

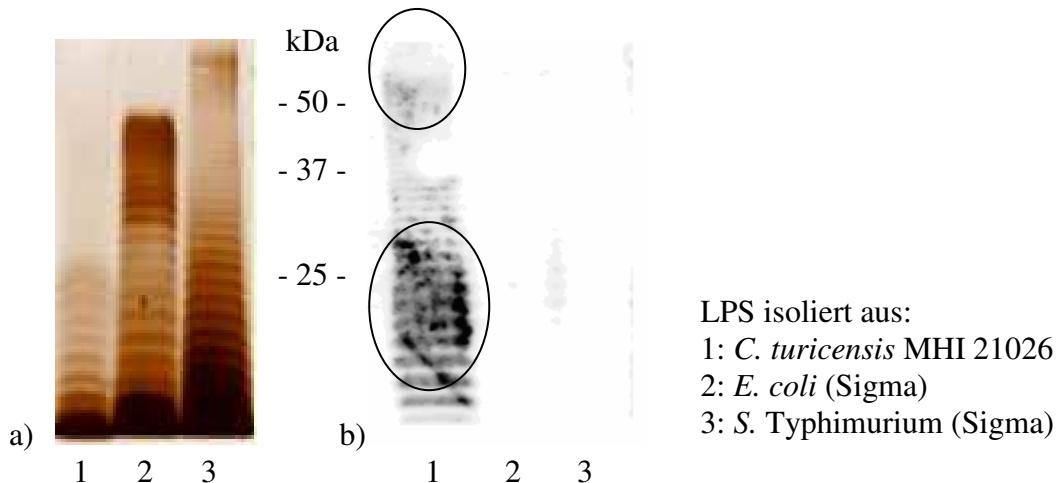


Abbildung 17: Nachweis von Lipopolysacchariden nach Gelelektrophorese und Immunoblot

a) SDS-Gel nach Silberfärbung

b) Immunoblot mit mAK 2G4 α L.

Die Markierungen kennzeichnen die Zonen der Reaktionsmaxima im Immunoblot.

Analog wurden LPS-Präparationen der Stämme *C. sakazakii* MHI 21008 und MHI 21012 mit den Antikörpern 1A11 α L, 1C4 α L und 1G3 α L untersucht. Abbildung 18 zeigt anhand des mAK 1C4 α L, dass auch diese mAK mit isoliertem LPS reagieren. Die Zonen der intensivsten Reaktion waren wiederum im Bereich von ca. 30 kDa sowie bei > 60 kDa zu erkennen.

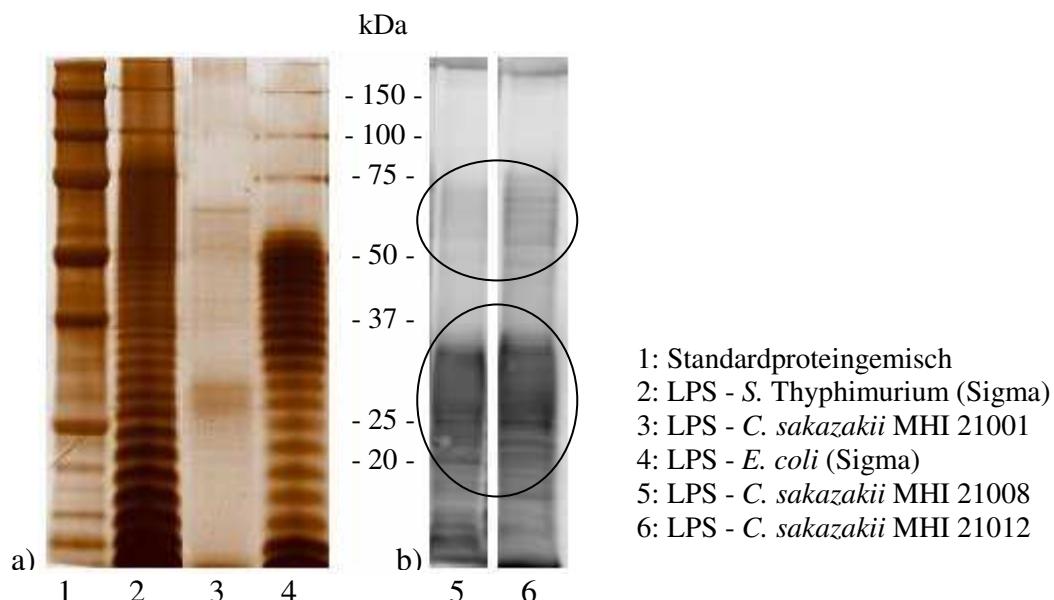


Abbildung 18: Nachweis von Lipopolysacchariden nach Gelelektrophorese und Immunoblot

a) SDS-Gel nach Silberfärbung

b) Immunoblot mit mAK 1C4 α L gegen isoliertes LPS von *C. sakazakii*.

Die Markierungen kennzeichnen die Zonen der Reaktionsmaxima im Immunoblot.

Annähernd analoge Resultate wurden mit den mAK 1A11 α L und 1G3 α L erzielt. Für mAK 1G3 α L der bereits im Immunoblot mit den Lysat-Präparationen nur schwach reagierte (Abbildung 15), waren die Reaktionszonen jedoch deutlich schwerer erkennbar. Es konnte lediglich im Bereich um 30 kDa eine positive Reaktion mit Teilen der LPS-Präparation beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.3.7.4 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Immunfluoreszenztests (3.2.7) wurden sowohl mit Ghosts als auch mit lebendem Keimmaterial durchgeführt, um zu überprüfen, ob die generierten Antikörper, insbesondere die LPS-reaktiven, tatsächlich in der Lage sind an degenerierte (Ghosts) bzw. native Keimzellwände zu binden.

3.3.7.4.1 Monoklonale Antikörper gegen *Cronobacter* spp.-Ghosts - mAK α G

Diese Antikörper zeigten in der Immunfluoreszenz keine eindeutig positiven Reaktionen mit vitalen Keimen. Wie in Abbildung 19a anhand einer Präparation des Stammes *C. sakazakii* MHI 987 exemplarisch dargestellt ist, konnte lediglich für Zelldebris und vereinzelte Keime, deren Motilität im Phasenkontrastmikroskop wahrnehmbar eingeschränkt war, eine schwache Anfärbung beobachtet werden.

Wurden die mAK α G hingegen mit Ghost-Material getestet, konnten für die Stämme, die im EIA sowohl als Ghost-Präparation als auch als Lysat positiv reagiert hatten, mittels Immunfluoreszenz eine schwache Bindung der Antikörper gezeigt werden, obwohl bei vitalen Bakterien dies nicht der Fall war. Die fluoreszierenden Bereiche waren allerdings nicht gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt (Abbildung 19b).

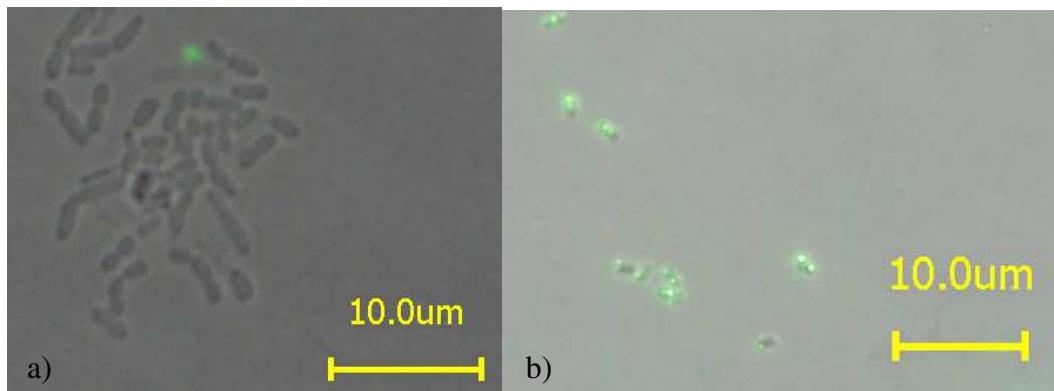


Abbildung 19: Immunfluoreszenzuntersuchungen

- a) vitale Keime von *C. sakazakii* MHI 987 mit mAK 2F7 α G (1 sec Belichtungszeit; Overlay-Modus)
- b) Ghost von *C. turicensis* MHI 21026 mit mAK 1H9 α G (2 sec Belichtungszeit; Overlay-Modus)

3.3.7.4.2 Monoklonale Antikörper gegen *Cronobacter* spp.-Lysate - mAK α L

- mAK 2F8 α L

Für den mAK 2F8 α L, der im indirekten EIA sehr unspezifisch reagierte (positive Reaktion mit allen untersuchten *Cronobacter*-Stämmen sowie der Mehrzahl der anderen untersuchten Keime) und für den im Immunoblot Proteinstrukturen als antigene Determinanten identifiziert worden waren, konnte ebenfalls keine Reaktivität mit vitalen Keimen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dagegen waren an den untersuchten Ghosts deutliche Fluoreszenzeffekte zu beobachten (Ergebnisse nicht dargestellt).

- mAK 2G4 α L

MAK 2G4 α L zeigte auch in den Immunfluoreszenzuntersuchungen nur mit Stamm *C. turicensis* MHI 21026 eine positive Reaktion. Während annähernd 100% der beobachteten lebenden Mikroorganismen dieses Stammes eine deutliche Fluoreszenz an der Zelloberfläche zeigten (Abbildung 20), wurden bei Versuchen, in denen Ghost-Präparationen statt vitaler Bakterien eingesetzt wurden, lediglich bei ca. 70% der Ghosts eindeutige Fluoreszenzeffekte beobachtet. Dies war zu erwarten, da durch die Bindung von Polymyxin B an die LPS-Moleküle Strukturveränderungen der bakteriellen Zellwand induziert werden (3.3.1).



Abbildung 20:
Immunfluoreszenzuntersuchung von *C. turicensis* MHI 21026 mit mAK 2G4 α L (1/7 sec Belichtungsdauer).

Weiterhin war in unbehandelten Vergleichsproben unter dem Phasenkontrastmikroskop zu beobachten, dass vitale Bakterien des Stammes *C. turicensis* MHI 21026 ohne Zusatz von mAK 2G4 α L eine deutlich höhere Motilität zeigten, als die Präparate, denen der Antikörper zugesetzt worden war.

- weitere mAK α L

Für die Antikörper 1A11 α L, 1C4 α L, 1G3 α L, 1G9 α L und 2C12 α L konnte für alle Stämme, die im EIA eine positive Reaktion zeigten, ebenfalls positive Reaktionen bei Immunfluoreszenzuntersuchungen von unbehandeltem Keimmaterial nachgewiesen werden. Exemplarisch zeigt Abbildung 21 eine Aufnahme von lebenden Bakterien des Stammes MHI 21001 nach Reaktion mit mAK 1A11 α L bei einer Belichtungszeit von 1/10 sec.

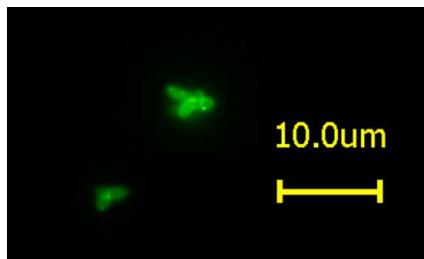


Abbildung 21: Immunfluoreszenzuntersuchung von *C. sakazakii* MHI 21001 mit mAK 1A11 α L (1/10 sec Belichtungsdauer).

Zusammenfassend zeigten die Immunfluoreszenzuntersuchungen mit mAK α L, dass mit den Antikörpern, die mit LPS-Strukturen reagieren im Gegensatz zu den breit reagierenden mAK α G und 2F8 α L (Proteine als antigene Determinanten) lebende Keime gezielt erfasst werden können.

4. DISKUSSION

Durch *Cronobacter* spp. hervorgerufene Infektionen sind durch hohe Mortalitäts- (Drudy et al., 2006) bzw. Komplikationsraten gekennzeichnet (Willis & Robinson, 1988; Biering et al., 1989; Lai et al., 2001). Am häufigsten erkranken immunsupprimierte ältere Menschen sowie Kinder unter einem Jahr (Patrick et al., 2014). Insbesondere bei Neugeborenen, bei denen die Infektion in der Regel über kontaminierte Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (powdered infant formula, PIF) erfolgt, enden manifestierte Erkrankungen häufig letal (Friedemann, 2008; Jaradat et al., 2014). Deswegen wurden *Cronobacter*-Infektionen trotz der geringen Prävalenz (Friedemann, 2008; Patrick et al., 2014) sowohl von WHO und FAO (Paoli & Hartnett, 2006) als auch von den zuständigen Stellen innerhalb der EU als ernstzunehmendes Problem für die öffentliche Gesundheit eingestuft. Relativ zügig nachdem - zumindest bei Kleinkindern - der Zusammenhang zwischen Infektion und Kontamination von Lebensmitteln gezeigt werden konnte, wurden daher gesetzliche Regelungen zum Schutz des Verbrauchers getroffen. So legt die VO (EG) 2073/2005 (Anhang I, lfd. Nr. 1.24) fest, dass in 10 g Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke (Säuglinge unter 14 Monaten) *Cronobacter* spp. während der Haltbarkeitsdauer nicht nachweisbar sein darf. Des Weiteren wurden von der Codex Alimentarius Kommission Empfehlungen zu adäquaten Hygienemaßnahmen im Umgang mit PIF erarbeitet (FAO & WHO, 2007; Codex Alimentarius Commission, 2008).

Um lebensmittelbedingte Infektionen durch *Cronobacter* spp. zu verhindern, wäre die Verfügbarkeit von einfachen, vor Ort einsetzbaren – idealerweise laborunabhängigen – und robusten Analyseverfahren wünschenswert, mit denen die Keime schnell in kontaminierten Lebensmitteln nachgewiesen werden könnten. Diese Kriterien werden z.B. von Antikörperbasierten Nachweisverfahren erfüllt. Bislang stehen aber keine entsprechenden Nachweissysteme zur Verfügung.

4.1 Entwicklung von Antikörpern

In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper (mAK) zum Nachweis von *Cronobacter* spp. generiert und charakterisiert. Die mAK wurden durch Immunisierung von Mäusen und anschließender Etablierung AK-produzierender Hybridomzelllinien gewonnen. Um in den Tieren eine breite Immunantwort zu induzieren, wurden für die Immunisierung

verschiedene *Cronobacter* spp. unterschiedlicher Provenienz eingesetzt. Im Einzelnen handelte es sich dabei um die Stämme *C. sakazakii* MHI 21001 (Isolat aus Babynahrung), *C. sakazakii* MHI 21040 und *C. turicensis* MHI 21026 (klinische Isolate), wobei Stamm *C. turicensis* MHI 21026 nachweislich in zwei schwere Erkrankungsfälle bei Neugeborenen involviert war (Mange et al., 2006). Als Immunogene wurden Lysate und Ghost-Präparationen nach Behandlung der Keime mit Polymyxin-B-Sulfat (3.3.1) eingesetzt.

Zur Induzierung von Antikörpern gegen Mikroorganismen müssen die verwendeten Keimpräparationen inaktiviert werden. Die Verwendung von mit klassischen Verfahren wie z.B. Behandlung der Keime mit Hitze, Aceton oder NaOH hergestellten, nicht pathogenen Immunogen-Präparationen zur Immunisierung von Versuchstieren, resultiert aber häufig in der Bildung von IgM-Antikörpern, die nur bedingt für die Entwicklung von diagnostischen Enzymimmuntests einsetzbar sind. Oft sind zudem auch nur geringe Titer LPS-spezifischer Antikörper in den Seren der Versuchstiere nachzuweisen. Dies ist auch bei Verwendung von gereinigtem LPS als Immunogen der Fall. Zudem ist bei diesen Methoden nicht zu steuern, mit welchen Strukturelementen der Lipopolysaccharide die gebildeten AK interagieren. So wurden nach Immunisierung mit isoliertem LPS häufiger Antikörper gegen den Lipid-A-Teil oder die Core-Region gebildet als gegen das O-Antigen (Poxton, 1995). Für eine zielgerichtete Bildung von mAK gegen O-spezifische Seitenketten kamen z.B. Präparationen zur Anwendung, bei denen das isolierte O-Antigen kovalent an ein Protein gebunden wurde, um die Intensität der Immunreaktion gegenüber der Immunisierung mit isoliertem LPS zu erhöhen und dabei die Toxizität des Immunisierungsmaterials durch Verzicht auf den pyrogen wirkenden Lipid-A-Teil zu vermindern (Poxton, 1995). Dieses aufwändige Verfahren wurde bspw. in der Humanmedizin bei der Entwicklung von Vaccinen gegen gramnegative Erreger beschrieben (Cryz et al., 1991).

Im Rahmen verschiedener Arbeiten gelang es auch mit klassischen Verfahren, diagnostisch einsetzbare monoklonale Antikörper (IgG bzw. IgM) gegen O-Antigene unterschiedlicher Bakterien-Gattungen zu gewinnen. Als Immunogene wurden dabei u.a. mit Paraformaldehyd behandeltes (Szijártó et al., 2014) oder hitzeinaktiviertes Keimmaterial (Jaradat & Zawistowski, 1996) eingesetzt. So war es möglich, mAK zu generieren, die z.B. das O5-Antigen von *Salmonella* Thyphimurium (Jaradat & Zawistowski, 1996) oder das O25-Antigen von *E. coli* erfassen (Szijártó et al., 2014). Im Hinblick auf die Gewinnung von Antikörpern gegen *Cronobacter* spp. konnten Jaradat et al. (2011) nach wiederholter Immunisierung von Mäusen mit LPS-Präparationen (eingebettet in eine Polyacrylamid-Matrix), zwar Antikörper in den Seren der immunisierten Mäuse gegen LPS eines *C.*

muytjensii-Stammes mittels Immunoblot nachweisen, aufgrund der niedrigen Titer scheiterten jedoch alle durchgeführten Zellfusions-Experimente zur Etablierung stabiler Hybridomzelllinien. Die geringe Immunogenität der Präparationen wurde von den Autoren auf die vermutete lineare Struktur des O-Antigens beim verwendeten Stamm *C. muytjensii* ATCC 51329 zurückgeführt. Eine solche Struktur konnte von MacLean et al. (2009a; Tabelle 2) auch für den Stamm *C. muytjensii* 3270 gezeigt werden. Andere Studien zur Generierung von Antikörpern gegen LPS-Strukturen von *Cronobacter* spp. wurden bisher nicht publiziert. Im Rahmen der Entwicklung von indirekten EIA-Verfahren zum Nachweis von *C. sakazakii* wurde 2009 von Hochel & Škvor zwar betont, dass die generierten polyklonalen Antikörper serotyp-spezifisch seien, die präsentierten Ergebnisse zur Spezifität der Antikörper belegten jedoch deren Reaktivität mit Proteinstrukturen, die im LPS-Molekül an sich nicht vorkommen.

Mit der in der vorliegenden Arbeit neu etablierten Methode zur Immunogenherstellung basierend auf einem Polymyxin-B-Verdau der Keime konnten in den immunisierten Mäusen hohe Antikörper-Titer gegen *Cronobacter* induziert und letztendlich eine ganze Reihe von mAK hergestellt werden, von denen ein hoher Anteil mit O-Antigenen von *Cronobacter* spp. reagiert. Dass die Bildung von LPS-spezifischen Antikörpern durch so hergestellte Immunogene zumindest für *Cronobacter* spp. reproduzierbar möglich ist, zeigte sich auch im Rahmen von weiteren am Institut durchgeführten Immunisierungen, bei denen gezielt *C. sakazakii*-Stämme verschiedener Serotypen (O2, O7) eingesetzt wurden. Auch hier konnten erfolgreich stabile Hybridome generiert werden, die mAK gegen diese Typen O-spezifischer Seitenketten produzieren. Weitere derzeit noch laufende Immunisierungen mit *Yersinia* spp., ebenso ein Vertreter der Familie der gramnegativen Enterobacteriaceae, untermauern die generelle Einsetzbarkeit dieses Verfahrens (E. Schäringer, persönliche Mitteilung).

Die Gründe für die hohe Immunogenität der so hergestellten Präparationen sind allerdings unklar. Der bakterizide Effekt von Polymyxin B beruht auf einer Bindung des Antibiotikums an LPS der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien (Neter et al., 1958; Pristovsek & Kidric, 1999; Tsubery et al., 2002). Aufgrund der amphiphilen Struktur adsorbiert Polymyxin über elektrostatische Wechselwirkungen. Der hydrophile Teil des Moleküls reagiert mit den Phosphatresten der LPS, während der lipophile Teil des Antibiotikums mit den Fettsäureresten des Lipid A in Wechselwirkung tritt (Moore et al., 1986; Domingues et al., 2012). Denkbar ist, dass aus dieser Bindung über eine Erhöhung der Strukturkomplexität eine Steigerung der Immunantwort resultiert. Andererseits werden dem Polymyxin B in einer neueren Publikation auch adjuvante Eigenschaften zugeschrieben. So konnte bei Mäusen eine

Steigerung der humoralen Immunantwort beobachtet werden, wenn das als Immunogen verwendete Ovalbumin zusammen mit Polymyxin B oder anderen Polypeptid-Antibiotika auf die Nasenschleimhaut aufgetragen wurde. Die Ursache für diesen Effekt blieb unklar, allerdings deuten die Untersuchungen darauf hin, dass der amphiphile Charakter von Polymyxin B einen entscheidenden Einfluss auf das adjuvante Potential hat (Yoshino et al., 2013).

Bei einer Immunisierung mit Lysaten nach Polymyxin-B-Verdau, ist jedoch zu beachten, dass die Immunogen-Präparationen frisch hergestellt werden. Die durchgeführten Stabilitätstests zeigten, dass die Antigene, die mit den O-Antigen-spezifischen mAK interagieren, einem kontinuierlichen Abbau unterliegen (3.3.4.2). Vorstellbar ist, dass die Polysaccharidketten oxidativen Prozessen ausgesetzt sind, die eine Veränderung der Epitop-Struktur zur Folge haben oder freigesetzte Enzyme (Glucosidasen) einen "Alterungsprozess" der Antigene induzieren.

4.2 Charakterisierung der Antikörper

Es wurden zwei Kategorien von mAK generiert: mAK gegen *Cronobacter* spp.-Ghosts (mAK α G) und mAK gegen *Cronobacter* spp.-Lysate (mAK α L).

Alle **mAK α G** sowie ein mAK α L (2F8) zeichneten sich durch ein sehr breites und Genus-übergreifendes Reaktionsspektrum aus. So zeigten diese mAK außer mit *Cronobacter* spp. Reaktivität mit verschiedenen anderen Vertretern der Enterobacteriaceae, wie z.B. Stämmen der Spezies *C. freundii*, *K. pneumoniae* oder *S. Senftenberg* und teilweise mit weiteren gramnegativen Keimen wie *P. fluorescens* oder *A. media* (Tabellen 12 und 17). Bei zwei dieser mAK (2B5 α G und 2F8 α L) konnten zudem im indirekten EIA auch Affinitäten für Gram-positive Erreger (z.B. *B. cereus*) nachgewiesen werden (Tabelle 17).

Alle aus der Immunisierung mit *Cronobacter* spp.-Ghosts resultierenden mAK reagierten ausnahmslos mit Proteinstrukturen der Keime. Für sechs der acht gegen Proteine gerichteten mAK wurde im Immunoblot ein Protein von ca. 70 kDa als Antigen identifiziert. Untersuchungen zur Epitopspezifität von Antikörpern gegen *Cronobacter* spp. wurden im Jahr 2009 von Hochel und Škvor (polyklonale AK) und 2011 von Jaradat et al. (monoklonale AK) veröffentlicht. Die in diesen Arbeiten charakterisierten Antikörper reagierten mit einem breiten Spektrum an Proteinen, wobei allerdings keine prominenten Banden bei ca. 70 kDa beobachtet werden konnten. Auch für die anderen in den eigenen Untersuchungen isolierten

mAKs 2B5 α G und 2G8 α G, die ein anderes Reaktionsmuster im Immunoblot zeigten (Abbildung 12), waren keine charakteristischen Gemeinsamkeiten mit den Immunoblots von Hochel & Škvor (2009) bzw. Jaradat et al. (2011) festzustellen.

Charakteristisch für die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen mAK gegen von *Cronobacter* spp. exprimierte Proteine war, dass im indirekten EIA positive Reaktionen mit lebenden Keimen erhalten wurden, in den Immunfluoreszenz-Untersuchungen aber eine Bindung der mAK an die Zellen nicht verifiziert werden konnte. Da für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen die Bakterien mehrmals gewaschen und anschließend die einzelnen Keime unter dem Mikroskop beobachtet wurden, im EIA dagegen das komplette Material der Anzucht Verwendung fand, ist davon auszugehen, dass die EIA-Reaktivität der Präparation durch proteinhaltigen Zelldebris verursacht wurde. Die Beobachtungen sprechen zudem dafür, dass die als antigene Determinanten fungierenden Proteine entweder nicht Bestandteil der membranassoziierten Oberflächenproteinfraktion sind oder bei lebenden Zellen die für die Reaktion der mAK entscheidenden Epitope nicht für die Antikörper zugänglich sind.

Die mAK, die im Immunoblot bei ca. 70 kDa ein Reaktionsmaximum zeigten, waren im EIA durch unterschiedliche Kreuzreaktivität charakterisiert. So reagierte z.B. mAK 2F7 α G mit acht der 22 getesteten gramnegativen Enterobacteriaceae außerhalb der Gattung *Cronobacter* während mAK 1A11 α G, 2B11 α G und 2B12 α G mit 12 dieser Stämme eine positive Reaktion zeigten. MAK 1H9 α G hingegen erfasste alle untersuchten Enterobacteriaceae (Tabellen 12 und 17). Die Vermutung liegt daher nahe, dass diese mAK an unterschiedliche Epitope der gleichen Proteinstruktur binden. Die sehr breite Reaktivität der Antikörper spricht für "hochkonservierte" Epitope, die Genus-übergreifend vorkommen, innerhalb der verschiedenen Spezies jedoch geringe strukturelle Abweichungen aufweisen. Zusammenfassend bleibt aber festzustellen, dass diese mAK aufgrund ihrer breiten Reaktivität für den Einsatz im angestrebten spezifischen *Cronobacter*-Nachweissystem ungeeignet sind. Daher wurden auch weiterführende Untersuchungen zur genauen Charakterisierung und Identifizierung der jeweiligen Antigene im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Im Gegensatz hierzu zeigten sechs der sieben **mAK α L**, die aus der Immunisierung mit den nach Polymyxin-Behandlung der Keime gewonnenen Lysat-Präparationen resultierten, ein deutlich spezifischeres Reaktionsspektrum. Die hohe Intra-Genus-Spezifität der mAK α L, die fehlenden Kreuzreaktivitäten mit verwandten Keimgruppen und letztendlich die

charakteristischen Reaktionsmuster der mAK in den durchgeführten Immunoblots sprachen dafür, dass die O-spezifischen Seitenketten des LPS die antigenen Determinanten für diese mAK darstellen (Poxton, 1995; Jaradat et al., 2011). Eine in einer weiterführenden Studie durchgeführte Serotypisierung der untersuchten *Cronobacter*-Stämme zeigte, dass alle mit den mAK 1A11 α L, 1C4 α L, 1G3 α L, 1G9 α L und 2C12 α L reaktiven *C. sakazakii*-Stämme dem Serotyp O1 zuzuordnen sind (Ergebnisse nicht dargestellt). Obwohl diese fünf mAK durch eine identische Intra-Genus-Spezifität gekennzeichnet sind und keine Kreuzreaktivität mit anderen Spezies zeigten (Tabellen 14 und 17), unterschieden sie sich doch geringfügig in ihrer Affinität (Tabelle 15) und zeigten z.T. in den Immunoblots ein signifikant unterschiedliches Reaktionsmuster (Abbildung 15). So wiesen die mAK 2C12 α L und 1G3 α L in den Reaktionszonen um 45 kDa und 100 kDa eine deutlich schwächere Reaktion auf als die mAK 1A11 α L, 1C4 α L und 1G9 α L. Da die O1-spezifische Seitenkette von *C. sakazakii* eine verzweigte Struktur besitzt (Sun et al., 2012; Tabelle 2), ist denkbar, dass die verschiedenen AK an unterschiedliche Stellen des O-Antigens binden, woraus verschiedene Reaktionsmuster im Immunoblot resultieren können.

Auffällig war, dass *C. sakazakii* MHI 21040 nicht von den O1-spezifischen Antikörpern erkannt wurde, obwohl dieser Stamm dem Serotyp O1 zuzuordnen ist und zudem Bestandteil der Immunogen-Präparation war. Detaillierte Untersuchungen zeigten, dass dieser Stamm phänotypische Abweichungen zu anderen *Cronobacter*-Stämmen aufweist. So ist er nicht invasiv und zeigt deutlich geringere Wachstumsraten (Weiner, 2013). Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei diesem Stamm durch eine Mutation wichtige Virulenzfaktoren, wie die O-spezifische Seitenkette, nicht vollständig exprimiert werden und in Folge dessen, O1-Antigen-spezifische mAK nicht binden können.

Auch hinsichtlich des hochspezifisch mit *C. turicensis* MHI 21026 reagierenden mAK 2G4 α L sprechen die Untersuchungen für ein Epitop innerhalb der O-spezifischen Seitenkette. Während die anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *C. turicensis*-Stämme zum Serotyp O3 gehören, ist MHI 21026, der als einziger Stamm von mAK 2G4 α L erfasst wird, dem *C. turicensis*-Serotyp O1 zuzuordnen (Jarvis et al., 2011).

Eine abschließende Bestätigung des Bindungsvermögens von mAK 2G4 α L an die O-spezifische Seitenkette von *C. turicensis* MHI 21026 wurde am Lehrstuhl durch Untersuchungen einer *wzx*-Mutante erbracht. Das *wzx*-Gen codiert für eine O-Antigen-Flippase, die für den Transport von Kohlenhydrat-Einheiten an die äußere Seite der bakteriellen Membran verantwortlich ist. Aus diesen Bausteinen wird dann das O-spezifische

Polysaccharid zusammengesetzt (Marolda et al., 2004). Fehlt die Translocase, wie in der untersuchten Mutante, kann kein O-Antigen ausgebildet werden; dies führte dazu, dass mAK 2G4 α L nicht mehr an die Zelloberfläche dieser Mutante binden konnte (Schauer et al., 2014).

Mit den in der vorliegenden Arbeit generierten O-Antigen-spezifischen mAK wurden zudem die Grundlagen für weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen von *Cronobacter* spp. geschaffen. Insbesondere mAK 2G4 α L bietet sich aufgrund seiner besonderen Eigenschaften (hohe Spezifität, sehr hohe Affinität, Hemmung der Motilität) für den Einsatz in Folgeuntersuchungen an. So konnte im Rahmen einer weiteren Dissertationsarbeit der Nachweis erbracht werden, dass mAK 2G4 α L nicht nur hoch affin an lebende Keime von *C. turicensis* MHI 21026 in Kulturmedien bindet, sondern diese Keime auch nach einer Invasion innerhalb eukaryotischer Zellen (CaCo2) erfasst. Zudem wurde gezeigt, dass mAK 2G4 α L die Invasion von *C. turicensis* MHI 21026 in Epithelzellen hemmt (Weiner, 2013).

In anderen detaillierten Studien konnte die in den eigenen Untersuchungen beobachtete Hemmung der Motilität von *C. turicensis* durch den mAk 2G4 α L bestätigt werden. Dabei wurde gezeigt, dass durch eine monovalente Bindung von mAK 2G4 α L ans O1-Antigen von *C. turicensis* MHI 21026 die Flagellenaktivität beeinflusst und in dessen Folge die Motilität der Keime inhibiert wird (Schauer et al., 2014). Damit wird bestätigt, dass die Flagellenaktivität dieses Stammes einen Hauptvirulenzfaktor darstellt. Dies wurde bereits für andere *Cronobacter*-Stämme postuliert (Carranza, et al., 2009; Hartmann et al., 2010).

4.3 Testverfahren

Bisher wurden in drei Publikationen die Entwicklung von EIA-Testverfahren zum Nachweis von *Cronobacter*-Stämmen beschrieben (Hochel & Škvor, 2009; Park et al., 2012; Xu et al., 2014). Hochel & Škvor (2009) etablierten indirekte EIA-Verfahren zum Nachweis von *C. sakazakii*, allerdings werden von den eingesetzten Antikörpern nur einige wenige *Cronobacter*-Stämme erfasst. Mit dem von Park et al. etablierten Sandwich-EIA konnten drei untersuchte *C. muytjenisii*-Stämme nachgewiesen werden. Der Assay zeigte jedoch keine Reaktion mit gestesteten *C. sakazakii*- und *C. turicensis*-Stämmen (Park et al., 2012), die zusammen mit *C. malonaticus* an den meisten schweren *Cronobacter*-Infektionen beteiligt sind (Jaradat et al., 2014). Für Untersuchungen von Lebensmitteln auf eine Kontamination mit *Cronobacter* spp. sind diese Testsysteme daher nur eingeschränkt geeignet.

Aussichtsreicher erscheinen dagegen die EIA-Verfahren, die von Xu et al. (2014) entwickelt wurden. Ein Sandwich-EIA auf Basis monoklonaler Antikörper zeigte eine hohe Spezifität und reagierte nur mit den untersuchten *C. sakazakii*-Stämmen (keine Kreuzreaktivität mit anderen *Cronobacter*-Spezies). Da lediglich vier *C. sakazakii*-Stämme (keine Serotypisierung) getestet wurden, ist bisher noch unklar, ob sich die Ergebnisse auf alle sieben *C. sakazakii*-Serotypen übertragen lassen. Untersuchungen zur Epitop-Spezifität wurden in dieser Studie nicht beschrieben. Ein weiteres, parallel entwickeltes, auf polyklonalen Antikörpern basierendes, indirektes EIA-Verfahren konnte alle getesteten *Cronobacter*-Stämme erfassen, Genus-übergreifende Kreuzreaktionen traten nicht auf (Xu et al., 2014).

Für die von den verschiedenen Arbeitsgruppen etablierten Sandwich-EIAs, mit denen i.d.R. eine höhere Sensitivität als mit indirekten EIA-Formaten erreicht werden kann (Porstmann & Kiessig, 1992), wurden Nachweisgrenzen von 2 bis 6×10^4 KbE/ml angegeben (Park et al., 2012; Xu et al., 2014), für die indirekten EIAs Nachweisgrenzen von 6×10^4 bis 10^5 KbE/ml (Hochel & Škvor, 2009; Xu et al., 2014). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Antikörper zeigten z.T. eine höhere Affinität. So war mit dem mAK 2G4 α L ein sicherer Nachweis von *C. turicensis* MHI 21026 im indirekten EIA bei einer Lebendkeimzahl von ca. 10^4 KbE/ml noch möglich. Die weiteren mAK α L zeigten im indirekten EIA eine tendenziell geringere Affinität. Abhängig vom untersuchten Stamm und vom eingesetzten Antikörper lagen die ermittelten Nachweisgrenzen im Bereich von 10^5 KbE/ml (z.B. für *C. sakazakii* MHI 21011 mit mAK 1C4 α L) bis 10^7 KbE/ml (z.B. für *C. sakazakii* MHI 21038 mit mAK 1A11 α L). Derzeit laufende Untersuchungen zur Etablierung von Sandwich-EIA-Verfahren, basierend auf den im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Antikörper deuten darauf hin, dass mit dem mAK 2G4 α L Nachweisgrenzen im Bereich von $< 10^4$ KbE/ml realisiert werden können, für den Nachweis von *Cronobacter* spp. des Serotyps O1 mittels mAK 1C4 α L liegen die Werte im Bereich von $1 - 4 \times 10^4$ KbE/ml (E. Scharinger, persönliche Mitteilung). Diese Daten bestätigen die hohe Affinität der entwickelten Antikörper.

4.4 Ausblick

Zusammenfassend eröffnen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Materialien (Antikörper) und methodischen Ansätze (Immunogen-Präparation) neue Möglichkeiten in der immunochemischen Analytik der lebensmittelhygienisch bedeutsamen Familie der Enterobacteriaceae - insbesondere von *Cronobacter* spp. So ist es offensichtlich mit dem eingesetzten Immunisierungsverfahren möglich, gezielt O-Antigen-spezifische IgG zu produzieren. Antikörper dieses Types gelten – im Gegensatz zu IgM-Antikörpern – aufgrund ihrer Eigenschaften (geringe Größe, Vorliegen als Monomer, Stabilität) als besonders geeignet für die Etablierung immunochemischer Nachweisverfahren (Rehm & Letzel, 2010). Die Entwicklung Serotyp-spezifischer EIAs für den Nachweis von *Cronobacter* spp. ist damit möglich, unter praktischen Gesichtspunkten ist aber der kombinierte Einsatz von mAK mit unterschiedlichen Serotyp-Spezifitäten in einem EIA-System sicherlich sinnvoller. So könnte ein breiteres Spektrum an Serotypen zeitgleich erfasst und ein Nachweisverfahren entwickelt werden, das in der Lage ist, alle relevanten *Cronobacter* Keime in PIF und anderen Matrices nachzuweisen.

Vorstellbar wäre zudem die Entwicklung eines affinitätschromatographischen Verfahrens, das bei der gezielten Anreicherung von *Cronobacter* spp. aus verschiedenen Probenmatrices Anwendung finden kann, um bspw. in Kombination mit PCR-basierten Verfahren auch bei geringer Ausgangskeimzahl ohne weitere Anreicherungsschritte die Bakterien im Lebensmittel zeitnah detektieren zu können. Zur Realisierung dieses Konzeptes müsste allerdings zuerst überprüft werden, ob die Aktivität der eingesetzten Antikörper bei der Immobilisierung an die Trägermatrix erhalten bleibt (Rehm & Letzel, 2010). Der Einsatz der Affinitätschromatographie als Anreicherungsverfahren von Bakterien aus z.T. komplexen Matrices wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Peskoller et al., 2009; Ott et al.; 2011; Wiescher, 2013).

Im Hinblick auf gezielte Untersuchungen zu den einer *Cronobacter*-Infektion zugrundeliegenden Pathogenitätsmechanismen wäre es schließlich sicherlich interessant zu klären, welcher Mechanismus der flagellenabhängigen Adhäsion von *C. turicensis* MHI 21026 an den Wirtsorganismus zugrunde liegt und ob bzw. welche Rezeptoren hierbei von Bedeutung sind. Durch den Einsatz der generierten mAK könnte auch geklärt werden, ob analoge Mechanismen auch bei *C. sakazakii*-Stämmen existieren und falls ja, ob bei den LPS-spezifischen Antikörpern Serotyp-spezifische Unterschiede in der Beeinflussung von Adhäsivität/Invasivität bzw. Beeinträchtigung der flagellären Aktivität auftreten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Cronobacter spp. sind opportunistische pathogene Erreger, die insbesondere nach der Aufnahme kontaminiierter Lebensmittel schwere Infektionen mit hohen Letalitätsraten bei Neugeborenen und immungeschwächten Erwachsenen hervorrufen können. Um spezifische immunochemische Nachweisverfahren für diese Keimgruppe zu etablieren, wurden in der vorliegenden Arbeit monoklonale Antikörper (mAK) zum Nachweis von *Cronobacter* spp. generiert und umfassend charakterisiert.

Zur Präparation der Immunogene wurden *Cronobacter*-Keime mit Polymyxin B behandelt und anschließend wurden Mäuse entweder mit dem durch Zentrifugation erhaltenem Zellpellet (Ghosts) oder mit dem zellfreien Überstand (Lysat) dieser Präparationen immunisiert. Beide Präparationen erwiesen sich als hoch immunogen, die nachweisbaren Titer lagen üblicherweise bei > 1:10.000. Insgesamt konnten 14 stabile Hybridomzelllinien (sieben je Ansatz) etabliert werden. Die Intra- bzw. Inter-Genus-Spezifität und Affinität der entsprechenden mAK wurde umfassend unter Verwendung von indirekten EIA-Verfahren überprüft. Für Studien zur Epitopspezifität der generierten mAK wurden Immunoblots und Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt.

Alle mAK, die aus der Immunisierung mit *Cronobacter*-Ghosts resultierten, zeichneten sich durch ein sehr breites Reaktionsspektrum aus, Kreuzreaktionen wurden vorzugsweise mit Vertretern aus der Familie der *Enterobacteriaceae* aber auch mit anderen gramnegativen Keimen beobachtet. Für alle mAK konnten Proteine als antigene Determinanten identifiziert werden, die relativen Molekulargewichte reaktiver Proteinbanden lagen üblicherweise im Bereich von > 40 kDa.

Demgegenüber zeigten sechs der sieben mAK, die aus der Immunisierung von Mäusen mit Polymyxin B generierten Lysat-Präparationen resultierten, eine hohe Affinität für die O-spezifische Seitenkette der *Cronobacter*-typischen Lipopolysaccharide (LPS): mAK 2G4 αL reagierte hochspezifisch mit dem *C. turicensis*-Stamm (MHI 21026; Serotyp O1). Im indirekten EIA war dieser Erreger bei Keimzahlen von ca. 10⁴ KbE/ml noch nachweisbar. Für die weiteren fünf mAK, die alle spezifisch mit *C. sakazakii* des Serotyps O1 reagierten, wurden im indirekten EIA Nachweisgrenzen im Bereich von 10⁵-10⁷ KbE/ml ermittelt. Alle mAK gegen LPS gehören zum IgG-Subtyp und reagierten in der Immunfluoreszenz mit lebenden *Cronobacter*-Keimen.

5 . SUMMARY

Production and characterization of monoclonal antibodies against *Cronobacter* spp.

Cronobacter spp. are opportunistic pathogens that cause serious infections, characterized by high lethality rates, particularly in infants and immunocompromised adults after ingestion of contaminated food. To establish immunochemical assays for the specific detection of *Cronobacter*, within this study monoclonal antibodies were generated and comprehensively characterized.

For the preparation of the immunogen, *Cronobacter* cells were first treated with polymyxin B and, subsequently, mice were immunized either with the resulting cell pellet (ghosts) obtained by centrifugation or with the cell-free supernatants (lysate) of these preparations. Both polymyxin B derived preparations were highly immunogenic, serum antibody titres were usually higher than 1:10,000. Cell fusion experiments resulted in the establishment of 14 stable hybridoma cell lines (seven per approach). Intra- and inter-genus-specificity and affinity of the mAbs were determined by using indirect enzyme immunoassays (EIA). Epitope-specificity of the generated mAbs was determined by immunoblot- and immunofluorescence techniques.

All of the mAbs derived from the immunization with *Cronobacter* ghosts were characterized by broad reactivity towards bacteria mainly within the family *Enterobacteriaceae* but also to other gram-negative bacteria. For all of these mAbs proteins were identified as antigenic determinants. Reactive bands generally showed an apparent molecular weight of > 40 kDa.

In contrast, using the lysate preparation as immunogen, six of the seven obtained mAbs exhibited high affinity for the O-polysaccharide chains of *Cronobacter* specific lipopolysaccharides (LPS): mAb 2G4 α L showed highly specific reactions with *C. turicensis* MHI 21026 (serotype O1). Employing this mAb in an indirect EIA, the limit of detection was at approx. 10^4 cfu/ml. For the other five O-antigen-specific mAbs, which interacted specifically with strains of *C. sakazakii*, serotyp O1, detection limits ranging from 10^5 - 10^7 cfu/ml were achieved. All anti-LPS mAbs were of the IgG subtype and reacted with viable *Cronobacter* cells as shown by immunofluorescence studies.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Álvarez-Ordóñez, A., Begely, M., Clifford, T., Deasy, T., Coolins, B., Hill, C. (2014). Transposon mutagenesis reveals genes involved in osmotic stress and drying in *Cronobacter sakazakii*. *Foodservice Research International*, 55, 45–54.

Applied Biosystems (2011). Applied Biosystems Food Tahogen Detection System- TaqMan® *Cronobacter sakazakii* Detection Kit, Firmeninformation Publication 116MI29-02.

Arbatsky, N. P., Sun, Y., Shashkov, A. S., Wang, M., Liu, B., Daeva, E. D., Wang, L., Knirel, Y. A. (2012). Structure an genetics of the O-antigen of *Cronobacter sakazakii* G2726 (serotype O3) closely related to the O-antigen of *C. muytjensii* 3270. *Carbohydrate Research*, 355 (2011), 50-55.

Arseni, A., Malamou-Ladas, E., Koutsia, C., Xanthau, M., Trikka, E. (1987). Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Hospital Infection*, 9, 143-150.

Baumgartner, A., Grand, M., Liniger, M., Iversen, C. (2009). Detection and frequency of *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *International journal of food microbiology*, 136 (2), 189-192.

Biering, G., Karlsson, S., Clark, N. C., Jonsdottir, K. E., Ludvigsson, P., Steingrimsson, O. (1989). 3 cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (9), 2054-2056.

Blazovka, M., Javurovka, B., Fukal, L., Rauch, P. (2011). Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter*. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011), 2828-2834.

Bowen, A. B. & Braden, C. R. (2006). Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (8), 1185-1189.

Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., De Vos, P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliotta* gen. nov. as *Lelliotta nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliotta amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* in *Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (5), 309-319.

Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., Joosten, H. M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 967–973.

Burger, A. & Wachter, H. (Hrsg.) (1998). *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch.*, 8. neu bearbeitete und erweiterte Auflage, S. 102-103. Walter de Gruyter, Berlin.

Caroff, M. & Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338 (23), 2431-2447.

Caranza, P., Hartmann, I., Lehner, A., Stephan, R., Gehrig, P., Grossmann, J., Riedel, K. (2009). Proteomic profiling of *Cronobacter turicensis* 3032, a food-borne opportunistic pathogen. *Proteomics*, 9 (13), 3564-3579.

Caubilla-Barron, J., Hurrell, E., Townsend, S., Cheetham, P., Loc-Carrillo, C., Fayet, O., Prère, M. F., Forsythe, S. J. (2007). Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *Journal of clinical Microbiology*, 45 (12), 3979-85.

Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, J., Osaili, T., Shaker, R., Jaradat, Z., Hartantyo, S. H. P., Abdullah Sani, N., Estuningsih, S., Forsythe, S. J. (2009). International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *International Journal of Food Microbiology*, 136 (2009), 185-188.

Chen, P.-C., Zahoor, T., Oh, S.-W., Kang, D.-H. (2009). Effect of heat treatment on *Cronobacter* spp. in reconstituted, dried infant formula: preparation guidelines for manufacturers. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 730-737.

Chen, F., Ming, X., Chen, X., Gan, M., Wang, B., Xu, F., Wei, H. (2014). Immunochromatographic strip for rapid detection of *Cronobacter* in powdered infant formula in combination with silica-coated magnetic nanoparticles separation and 16S rRNA probe. *Biosensors & Bioelectronics*, 15 (61), 306-13. Epub 2014 May 24.

Chen, Y., Lampel, K., Hammack, T. (2012). Bacterial Analytical Manual Chapter 29, *Cronobacter*, U.S. Food an Drug Adminsitration, Update 29.07.2014.

Chenu, J. W. & Cox, J. M. (2009). *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: current status and future prospects. *Letters in Applied Microbiology*, 49 (2), 153-159.

Codex Alimentarium Commission. Code of hygienic practice for powdered formulae for infants an young children, CAC/RCP 66 - 2008.

Cryz, S. J., Cross, A. S., Sadoff, J. C., Wegmann, A., Que, J. U., Fürer, E. (1991). Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O18 O-specific polysaccharide (O-PS)-toxin A and O-PS-cholera toxin conjugate vaccines in humans. *Journal of infectious diseases*, 163 (5), 1040-1045.

Cypionka, H. (2010). Grundlagen der Mikrobiologie. 4. überarbeitete und aktualisierte Auflage, S. 35-38 und 298-304. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Czerwcka, M., Marszewska, K., Forsythe, S. J., Bychowska, A., Mazgajczyk, A., Dziadziszko, H., Ossowska, K., Stepnowski, P., Kaczynsky, Z. (2013). Chemical structure of the O-polysaccharides isolated from *Cronobacter turicensis* sequence type 5 strains 57, 564 and 566. *Carbohydrate Research*, 373, 89-92.

Czerwcka, M., K., Forsythe, S. J., Bychowska, A., Dziadziszko, H., Kunikowska, D., Stepnowski, P., Kaczynsky, Z. (2010). Structure of the O-polysaccharides isolated from *Cronobacter sakazakii* 767. *Carbohydrate Research*, 345, 908-913.

Domingues, M., M., Inácio, R. G., Raimundo, J. M., Martins, M., Castanho, M. A., Santos, N. C. (2012). Biophysical characterization of polymyxin B interactions with LPS aggregates and membrane model systems. *Biopolymers*, 98 (4), 338-344.

Drudy, D., Mullane, N. R., Quinn, T., Wall, P. G., Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (7), 996-1002.

Emami, C. N., Mittal, R., Wang, L., Ford, H. R., Prasadrao, N. V. (2011). Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. *Journal of Immunology*, 186 (2), 7067-79.

Etz, H., Minh, D. B., Schellack, C., Nagy, E., Meinke, A. (2011). Bacterial phage receptors, versatile tools for display of polypeptides on the cell surface. *Journal of Bacteriology*, 183 (23), 6924-35.

FAO-WHO (2007). Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula.

Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., Brenner, D. J. (1980). *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30 (3), 569-584.

Few, A. V., Schulman, J. H. (1953). The Absorption of Polymyxin E by Bacteria and Bacterial Cell Walls and its Bactericidal Action. *The Journal of General Microbiology*, 9, 454-466.

Friedemann, M. (2008). Gesundheitliches Gefährdungspotential von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp. nov.) in Säuglinsnahrung. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 51 (6), 664-674.

Fuchs, G., Schlegel, H.-G., Eittinger, T. (Hrsg.). (2007). Allgemeine Mikrobiologie. 8., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 137. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Giri, C. P., Shima, K., Tall, B. D., Curtis, S., Sathyamoorthy, V., Hanisch, B., Kim, K. S., Kopecko, D. J., 2012. *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) invade and

translocate across both cultured human intestinal epithelial cells an human brain microvaskular endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 52, 140-147.

Grim, C. J., Kotewicz, M. L., Power, K. A., Gopinath, G., Franco, A. A., Jarvis, K. G., Yan, Q. Q., Jackson, S. A., Sathyamoorthy, V., Hu, L., Pagotto, F., Iversen, C., Lehner, A., Stephan, R., Fanning, S., Tall, B. D. (2013). Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics*, 14, 366.

Grishin, A., Papillon, S., Bell, B., Wang, J., Ford, H. R. (2013). The role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery*, 22 (2), 69-75.

Gurtler, J. B., Kornacki, J. L., Beuchat, L. R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International journal of food microbiology*, 104 (1), 1-34.

Hamilton, J. V., Lehane, M. J., Braig, H. R. (2003). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (10), 1355-1356.

Hartmann, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L., Riedel, K., 2010. Genes Involved in *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2251-2261.

Hausmann, W. & Craig, L. C. (1954). Polymyxin B₁ Fractionation, Molecular Weight Determination, Amino Acid and Fatty Acid Composition. *Journal of the American Chemical Society*, 76, 4892-4896.

Hausmann, W. (1956). The Amino Acid Sequence of Polymyxin B₁. *Journal of the American Chemical Society*, 78, 3663-3667.

Hochel, I. & Škvor, J. (2009). Charakterisation of Antibodies for the Immunochemical Detection of *Enterobacter sakazakii*. *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (S2), 66-74.

Holý, O. & Forsythe, S. (2014). *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection, *The Journal of Hospital Infection*, 86, 169-177.

Hunter, C. J. & Bean, J. F. (2013). *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis an necrotizing enterocolitis. *Journal of Perinatology*, 33 (8), 581-585.

Hunter, C. J., Petrosyan, M., Ford, H. R., Prasadrao, N. V. (2008). *Enterobaccer sakazakii*: An Emerging Pathogen in Infants an Neonates. *Surgical Infections*, 9 (5), 533-539.

Iversen, C., Lane, M., Forsythe, S. J. (2004a). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38 (5), 378-382.

Iversen, C., Druggan, P., Forsythe, S. (2004b). A selektive medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International journal of food microbiology*, 96 (2), 133-139.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. (2007a). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *Bmc Evolutionary Biology*, 7.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. (2007b). Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (11), 3814-3816.

Iversen, C., Mullane, N., McCardel, B., Tal, B. D., Lehner, A., Fannin, S., Joosten, H. (2008). *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1442-1447.

Jalava, K., Eko, F. O., Riedmann, E., Lubitz, W. (2003). Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery. *Expert Review Vaccines*, 2 (1), 45-51.

Jaradat, Z. W. & Zawistowski, J. (1996). Production and characterization of monoclonal antibodies against the O-5 antigen of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (1), 1-5.

Jaradat, Z. W., Ababneh, Q. O., Saadoun, I. M., Samara, N. A., Rashdan, A. (2009). Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiology*, 9 (225).

Jaradat, Z. W., Rashdan, A., Ababneh, Q. O., Jaradat, S. A., Bhunia, A. K. (2011). Characterization of surface proteins of *Cronobacter muytjensii* using monoclonal antibodies and MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Microbiology*, 11 (148).

Jaradat, Z. W., Al Mousa, W., Elbetieha, A., Al Nabulsi, A., Tall, B. T. (2014). *Cronobacter* spp.-opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *Journal of Medical Microbiology*, 63, 1023-1037.

Jarvis, K. G., Grim, C. J., Franco, A. A., Gopinath, G., Sathyamoorthy, V., Hu, L., Sadowski, J. A., Lee, C. S. Lee, Tall, B. D. (2011). Molecular Characterization of *Cronobacter*

Lipopolysaccharide O-Antigen Gene and Development of Serotype-Specific PCR Assays Clusters. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (12), 4017-4026.

Jarvis, K. G., Yan, Q. Q., Grim, C. J., Power, K. A., Franco, A. A., Hu, L., Gopinath, G., Sathyamoorthy, V., Kotewicz, M. L., Kothary, M. H., Lee, C., Sadowski, J., Fanning, S., Tall, B. D. (2013). Identification and Characterization of Five New Molecular Serogroups of *Cronobacter* spp. *Foodborne Pathogenes and Disease*, 10 (4), 343-352.

Javurková, B., Blazková, M., Fukal, L., Rauch, P. (2012). Rapid detection of genus *Cronobacter* in powdered infant formula milk. *European Food Research and Technology*, 234, 1099-1104.

Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M. J., Forsythe, S. J. (2012a). *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water, and food ingredients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1277-1283.

Joseph, S. & Forsythe, S. J. (2012). Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 4 in Neonatal Infections, *Emerging Infectious Diseases*, 17 (9), 1713-1715.

Joseph, S., Desai, P., Ji, Y., Cummings, C. A., Shih, R., Degoricija, L., Rico, A., Brzoska, P., Hamby, S. E., Masood, N., Hariri, S., Sonbol, H., Chuzhanova, N., McClelland, M., Furtado, M. R., Forsythe, S. J. (2012b). Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species. *PLoS ONE* 7, e49455.

Kim, K., Kim, K.-P., Choi, J., Lim, J.-A., Lee, J., Hwang, S., Ryu, S. (2010). Outer Membrane Proteins A (OmpA) and X (OmpX) Are Essential for Basolateral Invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (15), 5188-5198.

Kim, K. P. & Loessner, M. J. (2008). *Enterobacter sakazakii* invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. *Infection and Immunity*, 76 (2), 562-70.

Koch, P., J. (1998). Untersuchungen zur Wechselwirkung von Polymyxin B mit bakteriellen Lipopolysacchariden. Dissertation FU Berlin.

Kothary, M. H., McCardell, B. A., Frazar, C. D., Deer, D., Tall, B. D. (2007). Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by zpx and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4142-4151.

Kuzina, L. V., Peloquin, J. J., Vacek, D. C., Miller, T. A. (2001). Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 42 (4), 290-294.

Lai, K. K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults - Case reports and a review of the literature. *Medicine*, 80 (2), 113-122.

Langemann, T., Koller, V. J., Muhammad, A., Kudela, P., Mayr, U. B., Lubitz, W. (2010). The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioengineered bugs*, 1 (5), 326-336.

Lehner, A. & Stephan, R. (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, 67 (12), 2850-2587.

Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B., Stephan, R. (2005). Biofilm formation, extracellular polysaccharide production and cell-to cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *Journal of Food Protection*, 68, 2287-2294.

Lehner, A., Grimm, M., Rattei, T., Ruepp, A., Frishman, D., Manzardo, G. G., Stephan, R. (2006). Cloning and characterization of *Enterobacter sakazakii* pigment genes and in situ spectroscopic analysis of the pigment. *FEMS microbiology letters*, 265 (2), 244-248.

Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., Huang, X. (2006). Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Microbiological Methods*, 65 (1), 21-31.

Liu, Q., Mittal, R., Emami, C. N., Iversen, C., Ford, H. R., Prasadrao, N. V. (2012). Human Isolates of *Cronobacter sakazakii* bind Efficiently to Intestinal Epithelial Cells In Vitro to Induce Monolayer Permeability and Apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 176, 437-447.

MacLean, L. L., Vinogradov, E., Pagotto, F., Perry, M. B. (2011). Characterization of the lipopolysaccharide O-antigen of *Cronobacter turicensis* HPB3287 as a polysaccharide containing a 5,7-diacetmaido-3,5,7,9-tetradeoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (legionaminic acid) residue. *Carbohydrate Research*, 346 (2011), 2589-2594.

MacLean, L. L., Pagotto, F., Farber, J. M., Perry, M. B. (2009a). The structure of the O-antigen in the endotoxin of emerging food pathogen *Cronobacter (Enterobacter) muytjensii* strain 3270. *Carbohydrate Research*, 344 (5), 667-671.

MacLean, L. L., Pagotto, F., Farber, J. M., Perry, M. B. (2009b). Structure of the antigenic repeating pentasaccharide unit of the LPS O-polysaccharide of *Cronobacter sakazakii* implicated in the Tennessee outbreak. *Biochemistry and Cell Biology*, 87 (2), 459-465.

MacLean, L. L., Vinogradov, E., Pagotto, F., Farber, J. M., Perry, M. B. (2009c). Characterization of the O-antigen in the lipopolysaccharide of *Cronobacter (Enterobacter) malonicus* 3267. *Biochemistry and Cell Biology*, 87 (6), 927-932.

Mange, J.-P., Stephan, R., Borel, N., Wild, P., Kim, K. S., Pospischil, A., Lehner (2006). Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiology*, 6.

- Marolda, C. L., Vicarioli, J. M., Valvano, M. A. (2004). *Wzx* proteins involved in biosynthesis of O-antigen function in association with the first sugar of the O-specific lipopolysaccharide subunit. *Microbiology*, 150, 4095-4105.
- Masood, N., Moore, K., Farbos, A., Hariri, S., Paszkiewicz, K., Dickins, B., McNally, A., Forsythe, S. (2013). Draft Genome Sequences of Three Newly Identified Species in the Genus *Cronobacter*, *C. helveticus* LMG23732^T, *C. pulveris* LMG24059 and *C. zurichensis* LMG23730^T. *Genome Announcements*, 1 (5).
- Mittal, R., Bulgheresi, S., Emami, C., Prasad Rao, N. V. (2009a). *Enterobacter sakazakii* targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs. *Journal of Immunology*, 183 (10), 6588-6599.
- Mittal, R., Wang, Y., Hunter, C. J., Gonzalez-Gomez, I., Prasad Rao, N. V. (2009b). Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A. *Laboratory Investigation*, 89 (3), 263-277.
- Molloy, C., Cagney, C., O'Brien, S., Iversen, C., Fanning, S., Duffy, G. (2009). Surveillance and characterisation by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 198-203.
- Moore, R. A., Bates, N. C., Hancock, R. E. W. (1986). Interaction of Polycationic Antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide and Lipid A Studied by Using Dansyl-Polymyxin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29 (3), 496-500.
- Munk, K. (Hg) (2008). Taschenlehrbuch Biologie - Mikrobiologie, S. 35-37. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Muytjens, H. L., van der Ros-van de Repe, J., van Druten, H. A. (1984). Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *Journal of Clinical Microbiology*, 20 (4), 684-686.
- Nair, M. K. M. & Venkitanarayanan, K. (2007). Role of Bacterial OmpA and Host Cytoskeleton in the Invasion of Human Intestinal Epithelial Cells by *Enterobacter sakazakii*. *Pediatric Research*, 62 (6), 664-669.
- Nazarowec White, M. & Farber, J. M. (1997). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, 24 (1), 9-13.
- Neter, E., Gorzynski, E. A., Westphal, O., Lüderitz, O. (1958). The effects of antibiotics on enterobacterial lipopolysaccharides (endotoxins), hemagglutination and hemolysis. *Journal of Immunology*, 80 (1), 66-72.

- Noriega, F. R., Kotloff, K. L., Martin, M. M., Schwalbe, R. S. (1990). Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *The pediatric infectious disease journal*, 9 (6), 447-449.
- Ott, S., Niesser, R., Seidel, M. (2011). Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Separation Science*, 34, 1-12.
- Pagotto, F. J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S., Farber, J. M. (2003). *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *Journal of Food Protection*, 66 (3), 370-375.
- Paoli, M. G. & Hartnet, E. (2006). Overview of a Risk Assessment Model for *Enterobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. The Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organisation (WHO).
- Park, S., Shukla, S., Kim, Y., Oh, S., Kim, S. H., Kim, M. (2012). Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytensi* (formerly called *Enterobacter sakazakii*). *Microbiology and Immunology*, 56 (14), 472-479.
- Patrick, M. E., Mahon, B. E., Greene, S. A., Rounds, J., Cronquist, A., Wymore, K., Boothe, E., Lathrop, S., Palmer, A., Bowen, A. (2014). Incidence of *Cronobacter* spp. Infections, United States, 2003-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (9), 1520-1523.
- Peskoller, C., Nießner, R., Seidel, M. (2009) Entwicklung von schnellen und selektiven Anreicherungsmethoden zur Probenvorbereitung von Mikroorganismen in Trinkwasser. *Analytik News*, 13.03.2009.
- Porstman, T. & Kiessig, S.T. (1992). Enzyme immunoassay techniques. An overview. *Journal of Immunological Methods*, 150 (1), 5-21.
- Poxton, I. R. (1995). Antibodies to lipopolysaccharide. *Journal of Immunological Methods*, 186 (1), 1-15.
- Pristovsek, P. & Kidric, J. (1999). Solution Structure of Polymyxins B and E and Effect Binding to Lipopolysaccharide: An NMR and Molecular Modeling Study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42 (22), 4604-4613.
- Raghav, M. & Aggarwal, P. K. (2007). Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* Enterotoxin. *Canadian journal of microbiology*, 53 (6), 750-755.
- Rehm, H., Letzel, T. (2010). Proteinbiochemie, Proteomics. 6. Auflage, S. 183-207. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Reinhard, E., Kreis, W., Rimpler, H. (1995). Pharmazeutische Biologie 1, 5. neu überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 395-399. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Rolle, M., Mayr, A. (2006). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. überarbeitete Auflage, S. 348-376. MVS Medizinverlage, Stuttgart.

Schauer, K., Lehner, A., Dietrich, R., Kleinsteuber, I., Canals, R., Zurfluh, K., Weiner, K., Märtlbauer, E. (2014). A *Cronobacter turicensis* O1 Antigen Specific Monoclonal Antibody Inhibits Bacterial Motility and Entry Into Epithelial Cells. *Infection and immunity*. 2014 Dec 22. pii: IAI.02211-14.

Schmidt, H. & Rothhämel, S. (2012): Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Jansohn, M. & Rothhämel, S. (Hrsg.), Gentechnische Methoden, 5. Auflage, Kap. 4. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Schindler, P. G. & Teuber, M. (1975). Action of Polymyxin B on Bacterial Membranes: Morphological Changes in the Cytoplasm and in the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8 (1), 95-104.

Simmons, B. P., Gelfand, M. S., Haas, M., Metts, L., Ferguson, J. (1989). *Enterobacter sakazakii* Infections in Neonates Associated with Intrinsic Contamination of Powdered Infant Formula. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 10 (9), 398-401.

Singamsetty, V. K., Wang, Y., Shimada, H., Prasadrao, N. V. (2008). Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. *Microbial Pathogenesis*, 45 (2008), 181-191.

Smith, S. G. J., Mahon, V., Lambert, M. A., Fagan, R. P. (2007). A molecular swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiological Letters*, 273 (2007), 1-11.

Stansly, P. G. & Schlosser, M. E. (1947). Studies on Polymyxin: Isolation and identification of *Bacillus polymyxa* and differentiation of Polymyxin from certain known antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 54 (5), 549-556.

Stephan, R., Lehner, A., Tischler, P., Rattei, T. (2011). Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates. *Journal of Bacteriology*, 193 (1), 309-310.

Sun, Y., Arbatsky, N. P., Wang, M., Shashkov, A. S., Liu, B., Wang, L., Knirel, Y. A. (2012). Structure and genetics of the O-antigen of *Cronobacter turicensis* G3882 from a new serotype, *C. turicensis* O2, and identification of a serotype-specific gene. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 66 (3), 323-333.

Sun, Y., Wang, M., Liu, H., Wang, J., He, X., Zeng, J., Guo, X., Li, K., Cao, B., Wang, L. (2011). Development of an O-Antigen Serotyping Scheme for *Cronobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (7), 2209-2214.

Szijártó, V., Lukasiewicz, J., Gozdziewicz, T. K., Magyarics, Z., Nagy, E., Nagy, G. (2014).

Diagnostic Potential of Monoclonal Antibodies Specific to the Unique O-Antigen of Multidrug-Resistant Epidemic *Escherichia coli* Clone ST131-O25b:H4. *Clinical and vaccine immunology*, 21 (7), 930-939.

Townsend, S., Hurrell, E., Gonzalez-Gomez, I., Lowe, J., Frye, J. G., Forsythe, S., Badger, J. L. (2007). *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology*, 153, 3538-3547.

Townsend, S., Hurrell, E., Forsythe, S. (2008). Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiology*, 8 (64).

Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S., Eisenstein, M., Fridkin, M. (2002). Modulation of the Hydrophobic Domain of Polymyxin B Nonapeptide: Effect on Outer-Membrane Permeabilization and Lipopolysaccharide Neutralization. *Molecular Pharmacology*, 62, 1036-1042.

Urmeyi, A. M. & Franklin, A. W. (1961). Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet*, 1 (7172), 313-315.

Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., Li, J. (2010). Structure-Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *Journal of Medical Chemistry*, 53 (5), 1898-1916.

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (ABl. Nr. L 338 S. 1, ber. ABl. 2006 Nr. L 278 S. 32), Zuletzt geändert durch Art. 1 ÄndVO (EU) 217/2014 vom 7. 3. 2014 (ABl. Nr. L 69 S. 93).

Weiner, K. (2013). Charakterisierung des Infektionsverlaufs von *Cronobacter* spp. und dessen Einfluss auf wirtsspezifische intrazelluläre Signalwege. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wiescher, F. M. M. (2013). Produktion von poly- und monoklonalen Antikörpern gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* und Sporen von *Bacillus cereus* zur Entwicklung eines bioaffinitätschromatographischen Schnellnachweises. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Wilkinson, S. & Lowe, L. A. (1964). Structure of Polymyxin B1. *Nature*, 4938, 1211.

Williams, T. L., Monday, S. R., Edelson-Mammel, S., Buchanan, R., Musser, S. M. (2005). A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of *Enterobacter sakazakii*. *Proteomics*, 5 (16), 4161-4169.

Willis, J. & Robinson, J. E. (1988). *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 7 (3), 196-199.

Xu, X., Zhang, Y., Shi, M., Sheng, W., Du, X., Yuan, M., Wang, S. (2014). Two novel analytical methods based on polyclonal and monoclonal antibodies for the rapid detection of *Cronobacter* spp.: Development and application in powdered infant formula, *LWT-Food Science and Technology*, 56, 335-340.

Yang, J., Wei, L., Gu, M., Fang, X., Yang, P. (2009). Identification of proteins involved in infectivity an enterotoxin production in *Enterobacter Sakazakii*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 17, 164-181.

Yoshino, N., Endo, M., Kanno, H., Matsukawa, N., Tsutsumi, R., Takehita, R., Sato, S. (2013). Polymyxins as Novel and Safe Mucosal Adjuvants to Induce Humoral Immune Response in Mice. *PLOS one* 8 (4), e61643.

Zhou, F., Peng, Z., Murugan, R., Kellum, J. A. (2013). Blood purification and mortality in sepsis: a meta-analysis of randomized trials. *Critical care medicine*, 41 (9), 2209-2220.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für die freundliche Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen, das mir ermöglichte diese Arbeit in großen Teilen außerhalb der üblichen Arbeitszeiten anzufertigen.

Ich danke Herrn Dr. Maximilian Moravek, dass er zunächst die Betreuung des Themas übernahm. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. Richard Dietrich dafür, dass er sich nach den personellen Umbrüchen im Institut bereit erklärt hat, die Betreuung der Arbeit zu übernehmen und die Unterstützung auch über diverse Zwangspausen beiderseits hinweg kompetent, engagiert und stets mit einem Funken Humor aufrecht zu erhalten. Danke Ritchie!

Besonders möchte ich mich auch bei Gabi, Bruni, Kristina, Eva und Franzi bedanken, die so oft auf meine "nächtlichen Anforderungsscheine" reagiert und mich damit sowohl fachlich als auch moralisch sehr unterstützt haben. Ein ganz großes Dankeschön geht auch an Uta; sei es für die Absättigungen, wenn es bei mir mal wieder später wurde, für so manche gemeinsam verbrachte abendliche Laborstunde oder für die liebevolle Versorgung vom Schwein.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während meines Schaffens am Institut.

Herrn Dr. Markus Fritz danke ich für die Herstellung des "Erstkontakts" und das damit verbundene "kameradschaftliche Anschubsen".

Ich danke Hildegard und Horst, dass sie mich in den Chor gelotst haben, obwohl ich eigentlich gar keine Zeit dafür hatte und bei den 'Apotheken-Mädels' Heike und Uschi, dass sie mich immer mal wieder aus der Arbeit herausgerissen haben.

Ein lieber Dank geht auch an Petra Reitz für ihre Begleitung, seit sich unsere Wege in Prizren kreuzten.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie: meinen Eltern, die mich stets auf meinem Weg unterstützt haben, meinem Bruder, der den Blick auf "das Danach" nicht verlor und ganz besonders Georg für seine Geduld, sein Verständnis und seine Bereitschaft, insbesondere in den letzten Monaten viel zurückzustellen und einiges an Verzicht hinzunehmen.