

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Hygiene
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Direktor: Prof. Dr. Volkhard A.J. Kempf

**Etablierung eines Hochdurchsatz-Immunfluoreszenz-
Testverfahrens zur Bestimmung der Seroprävalenz
von anti-*Bartonella henselae* IgG-Antikörpern**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
David Villinger

aus Nürnberg

Frankfurt am Main, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Volkhard Kempf
Korreferent/in:	Prof. Dr. Michael Rieger
Tag der mündlichen Prüfung:	08.11.2022

Meiner Frau und Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 <i>Bartonella henselae</i> als Humanpathogen.....	7
1.1.1 Infektionen mit <i>B. henselae</i>	8
1.1.2 Seroprävalenz von <i>B. henselae</i> -Antikörpern	8
1.2 Die Gattung <i>Bartonella</i>	9
1.2.1 Humanpathogene Bartonellen	9
1.2.2 Bartonellenspezifische Pathogenitätsfaktoren	12
1.2.3 Andere tierpathogene Bartonellen.....	12
1.2.4 Bartonellen im <i>one-health</i> -Konzept.....	13
1.3 Diagnostische Nachweisverfahren von <i>B. henselae</i> -Infektionen.....	14
1.3.1 Prinzip des indirekten Immunfluoreszenztestverfahrens.....	15
1.3.2 Immunfluoreszenzverfahren mit Hochdurchsatz.....	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Antibiotika	20
2.1.4 Zellkulturen und Kulturmedien.....	21
2.1.5 Bakterienstämme und Bakterienkulturmedien.....	21
2.1.6 Serologische Testkits.....	22
2.1.7 Antikörper	22
2.1.8 Referenzseren.....	22
2.1.9 Software	27
2.1.10 Serumproben.....	27

2.2 Methoden	28
2.2.1 Objektträgerbasierter Immunfluoreszenztest von Euroimmun	28
2.2.2 96-Well-plattenbasierter <i>high-throughput</i> Immunfluoreszenztest (hpIFT)	29
2.2.2.1 Kultivierung von <i>Bartonella</i> spp.	31
2.2.2.2 Zellkultur.....	31
2.2.2.3 Zellzahlbestimmung und Zellkulturaussaat in 96-Well-Platten	32
2.2.2.4 Infektion der Zellkultur.....	33
2.2.2.5 Fixierung	33
2.2.2.6 Färbung.....	34
2.2.2.7 Experimentaldesign für hohen Probendurchsatz	35
2.2.2.8 Mikroskopie und Auswertung	38
2.2.3 Statistik.....	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Etablierung des hpIFT	42
3.1.1 Methodvalidierung	42
3.1.2 Evaluation der Titer-Grenzwerte	45
3.1.3 Überprüfung der Reproduzierbarkeit.....	46
3.1.4 Seroreaktivität unterschiedlicher <i>B. henselae</i> - und <i>B. quintana</i> -Stämme	48
3.1.5 Überprüfung der Kreuzreaktivität des eingesetzten <i>B. henselae</i> -Antigens mit fremdreaktiven Humanseren.....	50
3.1.6 Vergleich der Performance des hpIFT versus des konventionellen Immunfluoreszenztests	54
3.2 Ergebnisse der hpIFT-Analyse zum Nachweis von anti- <i>B. henselae</i> IgG- Antikörpern in Blutspendeseren.....	55
4 Diskussion	57
4.1 Einordnung der Ergebnisse des hpIFT.....	57

4.1.1. Diagnostische Validität des hpIFT bezüglich Sensitivität und Spezifität	57
4.1.2 Reproduzierbarkeit der Methode	59
4.1.3 Spezifität der Methode innerhalb der Spezies <i>B. henselae</i>	60
4.1.4 Spezifität der Methode durch Bestimmung kreuzreagierender Antikörper	61
4.1.5 Performance des hpIFT unter Hochdurchsatz-Bedingungen	63
4.2 Einsatz und Limitationen der hpIFT-Methode.....	64
4.3 Ausblick.....	65
5 Zusammenfassung.....	66
6 Summary	68
7 Referenzen	70
8 Abkürzungsverzeichnis.....	76

1 Einleitung

Seit der Einführung des Immunfluoreszenztestverfahrens (im Folgenden IFT) in der Medizin in den 1960er Jahren hat sich diese Antikörpernachweismethode zu einem der am häufigsten genutzten serologischen Laboruntersuchungsverfahren entwickelt.^{1,2} Mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs können dabei Antikörper gegen spezifische Zielantigene, etwa von bestimmten humanpathogenen Erregern, mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Zum routinemäßigen Einsatz kommt diese Methode unter anderem auch beim Nachweis von gebildeten Antikörpern gegen das Bakterium *Bartonella henselae* (im Folgenden *B. henselae*), welches als Auslöser der Katzen-Kratz-Krankheit identifiziert wurde. Zoonose-Erreger wie *B. henselae* sind insbesondere im Rahmen des *one-health*-Konzepts aktuell mehr und mehr in den Focus der Forschung gerückt.³ Weltweit gibt es jedoch nur vereinzelte Prävalenzerhebungen mit hohen Fallzahlen zu diesen Erregern.³ Nicht zuletzt das Fehlen eines kostengünstigen und geeigneten serologischen Hochdurchsatzverfahrens zum Nachweis von *B. henselae*-Antikörpern in der Routine könnte hierbei eine Rolle spielen.

1.1 *Bartonella henselae* als Humanpathogen

Bartonellen sind anspruchsvoll wachsende, intrazellulär lebende, mikroaerophile gramnegative Stäbchenbakterien und gehören zu den α_2 -Proteobakterien. Aufgrund der Möglichkeit neuer molekularbiologischer Analysen mittels 16S-rDNA wurde die ehemalige, vor 1993 noch existierende Bezeichnung der *Rochalimaea* unter der neuen Gattung *Bartonella* zusammengefasst.³

Als Pathogene unterschiedlicher Säugetiere sind sie weltweit in verschiedenen geographischen Regionen verbreitet. Vektoren sind dabei häufig blutsaugende Arthropoden, etwa Flöhe oder Zecken.³

B. henselae wurde beim Menschen erstmals 1992 als Krankheitserreger beschrieben.⁴ Innerhalb der Spezies *B. henselae* konnte eine australische Studie durch die Sequenzierung von 273 klinischen Isolaten zwei genotypische Gruppen identifizieren. Es handelt sich dabei um die *B. henselae*-Gengruppen Houston-1 und Marseille, die sich sogar noch in weitere Stämme unterteilen ließen.⁵ Unterschiede

in der klinischen Manifestation oder der Epidemiologie wurden in dieser Studie zwischen den beiden Gengruppen allerdings nicht festgestellt.

1.1.1 Infektionen mit *B. henselae*

Infektionen mit *B. henselae* präsentieren sich häufig asymptomatisch oder stellen sich in Form der Katzenkratzkrankheit dar, ein Krankheitsbild, geprägt durch eine selbstlimitierende, zum Teil fieberhafte lokale Lymphadenopathie.⁶ Darüber hinaus können allerdings auch schwerwiegendere systemische Verläufe auftreten, darunter Augeninfektionen, viszerale Infektionen sowie Krankheitsbilder mit Beteiligung des Zentralnervensystems.⁷⁻¹⁰ Auch als Ursache der „kulturnegativen“ Endokarditiden kommt *B. henselae* als Erreger in Betracht.¹¹⁻¹³ Bei schwer immunsupprimierten Patientinnen und Patienten, typischerweise in Assoziation mit einer HIV-Infektion, kann es außerdem zu dem vaskuloproliferativen Krankheitsbild der Bazillären Angiomatose kommen.¹⁴

Der häufigste Weg einer Infektion beim Menschen ist — nach derzeitigem Stand der Forschung — der Kontakt mit *B. henselae*-kontaminiertem Katzenflohkot, übertragen durch Bisse oder Kratzer von Katzen, so wie durch direkten Kontakt zu kontaminiertem (Katzen-)Blut.³ Inwieweit auch Hunde eine Rolle in der Übertragung spielen bleibt noch unklar.¹⁵

1.1.2 Seroprävalenz von *B. henselae*-Antikörpern

Antikörpernachweise gegen *B. henselae* wurden bei Patientinnen und Patienten auf allen Kontinenten nachgewiesen wodurch von einer weltweiten Verbreitung ausgegangen wird.¹⁶

Eine Studie der Universität Freiburg ermittelte bei 61 von 454 (13,4 %) der Patientinnen und Patienten mit unklaren Tumoren an Kopf oder Nacken die Katzenkratzkrankheit als deren Ursache.¹⁷ Als Nachweis der Katzenkratzkrankheit wurden hier Fälle definiert, die mindestens zwei der drei Kriterien (klinische Zeichen, positive Serologie und/oder molekularbiologischer Nachweis) erfüllten.

Studien zu Seroprävalenzen bei gesunden Kohorten kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Für Deutschland wurde eine Prävalenz von 3 % bis 6 % geschätzt.¹⁸ Eine brasilianische Studie fand unter 500 asymptomatischen Blutspenderinnen und Blutspendern eine Seroprävalenz von 16 % Antikörper gegen *B. henselae*.¹⁹ Außerdem gelang erstaunlicherweise sogar bei 15 (3 %) der Blutspenderinnen und Blutspendern der molekulargenetische und bei 6 (1,2 %) der kulturelle Nachweis von *B. henselae*.¹⁹

In mehreren Studien wurden erhöhte Prävalenzen bei bestimmten Risikogruppen ermittelt. Dabei stand vor allem der Kontakt zu Katzen als Risiko im Fokus. So fand beispielsweise eine koreanische Studie bei Katzenbesitzerinnen und Katzenbesitzern eine Seroprävalenz von 22,2 % verglichen mit einer Seropositivität von 13,7 % bei Probandinnen und Probanden, die keine Katzen hielten.²⁰ Allerdings wurden darüber hinaus auch weitere Risikogruppen in Studien beschrieben. Etwa konnten bei 45,3 % von Waldarbeiterinnen und Waldarbeitern in Nordrhein-Westfalen *B. henselae*-Antikörper nachgewiesen werden,²¹ was auf ein mögliches Übertragungsgeschehen z.B. durch Zecken hinweisen könnte.^{3,22,23}

1.2 Die Gattung *Bartonella*

1.2.1 Humanpathogene Bartonellen

Außer *B. henselae* wurden in der Literatur bereits mindestens zwölf weitere Bakterien der Gattung *Bartonella* als Humanpathogene beschrieben.²⁴ Für die überwiegende Mehrheit der gesicherten Infektionen beim Menschen sind neben *B. henselae* vor allem *B. quintana* und *B. bacilliformis* verantwortlich.²⁵

B. quintana ist ein Erreger, der im ersten Weltkrieg unter Soldaten besondere Bekanntheit erfuhr. Die auslösende Erkrankung bekam daher auch den Namen „Schützengrabenfieber“ oder „Fünf-Tage-Fieber“. Bekannter Vektor ist hier die Kopf- oder Kleiderlaus. Nach einer relativ langen Inkubationszeit von etwa 10 bis 30 Tagen leiden die Patientinnen und Patienten typischerweise unter Fieber, einer aseptischen Meningitis und starken Kopfschmerzen. Heutzutage ist die Erkrankung im mitteleuropäischen Kulturkreis nur noch selten anzutreffen. Sie wird häufig assoziiert mit Immunschwäche, vor allem bei (Alkohol-)Suchterkrankungen und

gleichzeitigem Lausbefall (erhöhte Vulnerabilität bei Obdachlosigkeit).²⁶ Bei HIV-Erkrankten allerdings können *B. quintana* ebenso wie *B. henselae* das Krankheitsbild der Bazillären Angiomatose auslösen.²⁷

Die Erkrankung Oroya-Fieber hingegen hat den Namen von der peruanischen Ortschaft Oroya, an der 1870 eine Eisenbahnlinie nach Lima gebaut wurde. Auslöser ist das Bakterium *B. baciliformis*. Damals kamen mehrere tausend Menschen bei einem Ausbruch dieser Infektion ums Leben. Die Erkrankung geht mit hohem Fieber, Lymphknotenschwellung, schwerer Hämolyse und anschließender Immunsuppression einher. Typisch für das Oroya-Fieber sind im Verlauf auftretende, sogenannte Verruga peruana, knotig ulzerierende vaskuloproliferative Hautläsionen. *B. baciliformis* kommt bisher ausschließlich in den Anden zwischen Peru, Ecuador und Kolumbien vor und wird von der Sandmücke auf den Menschen übertragen.^{27,28}

Gemeinsamkeiten von *B. quintana* und *B. baciliformis* bestehen etwa zum einen in ihrer Fähigkeit, sich intraerythrozytär zu vermehren und so besonders heftige Krankheitssymptome auszulösen. Zum anderen sind für beide Infektionserreger die Bildung vasoproliferativer Läsionen, wie die der Bazillären Angiomatose und der Verruga peruana, charakteristisch.^{29,30}

Andere Bartonellen wurden wesentlich seltener beim Menschen detektiert.³¹ **Tab. 1** zeigt eine Übersicht der bekannten bzw. der mutmaßlich humanpathogenen *Bartonella* spp. Bei einigen Spezies konnten Vektor und Wirt noch nicht sicher zugeordnet werden.²⁴

Tab. 1: Bestätigt oder potentiell humanpathogene *Bartonella* spp. mit primären Wirten, Vektoren und zufälligen Wirten. Übernommen aus²⁴

Bartonellen Spezies	Primärer Wirt	Vektor	Zufälliger Wirt
<i>B. alsatica</i>	Kaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Kaninchenfloh (<i>Spilopsyllus cuniculi</i>)	Mensch
<i>B. bacilliformis</i>	Mensch	Sandfliege (<i>Lutzomyia verrucarum</i>)	Keine
<i>B. clarridgeiae</i>	Katze (<i>Felis catus</i>)	Katzenfloh (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Mensch, Hund
<i>B. elizabethae</i>	Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	Rattenfloh (<i>Xenopsylla cheopis</i>)	Mensch, Hund
<i>B. grahamii</i>	Maus (<i>Clethrionomys glareolus</i> , <i>Microtus agrestis</i> , <i>Apodemus flavicollis</i>)	Nagetier Flöhe	Mensch
<i>B. henselae</i>	Katze (<i>Felis catus</i>)	Katzenfloh (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Mensch, Hund, Pferd, Meerestiere
<i>B. koehlerae</i>	Katze (<i>Felis catus</i>)	Katzenfloh (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Mensch, Hund
<i>B. melophagi</i>	Schaf (<i>Ovis aries</i>)	Schaflausfliege (<i>Melophagus ovinus</i>)	Mensch
<i>B. quintana</i>	Mensch	Kleiderlaus (<i>Pediculus humanis</i>)	Katze, Hund
<i>B. rochalimae</i>	Hunde (<i>Candis</i>)	Menschenfloh (<i>Pulex irritans</i> , <i>Pulex simulans</i>)	Mensch, Hund
<i>B. tamiae</i>	Unbekannt (Ratten?)	Unbekannt (Milben? Zecken?)	Mensch
<i>B. vinsonii arupensis</i>	Weißfußmaus (<i>Peromyscus leucopus</i>)	Unbekannt (Flöhe? Zecken?)	Mensch
<i>B. vinsonii berkhoffii</i>	Kojote (<i>Canis latrans</i>) Hund (<i>Canis familiaris</i>)	Unbekannt (Zecken?)	Mensch, Katzen
<i>B. washoensis</i>	Kalifornischer Ziesel (<i>Spermophilus beecheyii</i>)	Floh (<i>Oropsylla montana</i>)	Mensch, Hund

Die Rolle und das Ausmaß der Humanpathogenität einiger weiterer *Bartonella* spp., wie etwa von *B. schoenbuchensis* wird momentan kontrovers diskutiert.^{32,13} Die auch in Mitteleuropa verbreitete Hirschlausfliege (*Lipoptena cervi*) ist bekannt dafür, unter anderem als Vektor von *B. schoenbuchensis* bei Wildtieren zu fungieren.³³ Fälle von schwerwiegenden Infektionen beim Menschen mit *B. schoenbuchensis* sind aber in der Literatur bisher nicht beschrieben.

1.2.2 Bartonellenspezifische Pathogenitätsfaktoren

Bartonellen weisen einige Besonderheiten auf, mit denen sie sich ihrem jeweiligen Wirt besonders gut angepasst haben. In der Literatur beschriebene *Bartonella*-spezifische Pathogenitätsfaktoren sind insbesondere Adhäsine. Als Schlüssel für die bei anderen bakteriellen Infektionen äußerst selten beobachteten Angiogenesen, die zu den beschriebenen vaskuloproliferativen Krankheitsbildern — wie etwa der Bazilläre Angiomatose — führen können, wurde etwa der Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) identifiziert.^{3,34,35} Auch die Fähigkeit der Adhäsion an Geweben und zwischen den Bakterien ist für die Pathogenität von *Bartonella* spp. von zentraler Bedeutung. Gut beschriebene Faktoren bei diesem Prozess sind etwa der Adhäsionsfaktor *Bartonella-adhesin A* (BadA) von *B. henselae* und die hoch-homologen *variably expressed outer-membrane proteins* (Vomps) von *B. quintana*, die beide der Klasse der trimeren Autotransporter-Adhäsine (TAAs) angehören.^{36,37} BadA-homologe TAAs scheinen bei allen *Bartonella* spp. vorzukommen und dienen dem Andocken an Endothelzellen und an extrazelluläre Matrixproteinen, sowie der Autoagglutination.¹⁴ Eine immundominante Funktion von BadA wird angenommen.³⁸ Es konnte für Vomps gezeigt werden, dass etwa bei chronischen *B. quintana*-Infektionen ihre Expression abnahm oder gar nicht vorhanden war. Durch die unterschiedliche Expression wird vermutet, dass so das Wirts-Immunsystem untergraben werden könnte.³⁹

1.2.3 Andere tierpathogene Bartonellen

Bartonellosen gelten als überwiegend vektorassoziierte Erkrankungen. Mehr noch als Menschen kolonisieren und infizieren Bartonellen andere nichtmenschliche Tiere. Katzen gelten dabei, neben weiteren Säugetieren, als klassisches Erregerreservoir von Bartonellen.⁴⁰ Vektoren sind unterschiedliche Arthropoden, allen voran Flöhe, aber auch Zecken und andere Gliederfüßer.³

Katzen sind als Wirte am besten erforscht. Hier wurden hauptsächlich die Spezies *B. henselae*, *B. clarridgeiae* und *B. koehlerae* gefunden.²³ Auch Hunde sind als typische Wirte von Bartonellen bekannt.⁴¹ In der Literatur finden sich aber auch immer neue Nachweise von Bartonellen bei anderen Tieren, wie beispielsweise bei Elchen, Kaninchen, Schafen, Fledermäusen, mehreren Nagetierarten, einigen wilden

Karnivoren und sogar bei Schweinswalen.^{3,24} Ebenso werden auch immer weitere potentielle Vektoren diskutiert.

Bei Katzen gilt in erster Linie der Katzenfloh als Überträger von *B. henselae*. Die Kopflaus (*Pediculus humanus humanus*) überträgt *B. quintana*. Die Sandmücke (*Lutzomyia verrucarum*) ist Überträger von *B. bacilliformis*.²³ Als weitere Vektoren wurden aber zuletzt auch Zecken und Stechmücken immer häufiger beschrieben bzw. vermutet.^{42,43} Eine abschließende Bewertung der Validität dieser Vermutungen ist allerdings noch ausstehend.

1.2.4 Bartonellen im *one-health*-Konzept

Im Zuge zunehmender wissenschaftlicher Erkenntnisse, auch auf Grund neu aufkommender molekularbiologischer Sequenzierungsmethoden, kann das Bild der Bartonellen immer klarer gezeichnet werden.³ Es konnten dadurch zuletzt immer weitere *Bartonella* spp. (und Subspezies) beschrieben werden, die sich an unterschiedlichste Wirte und Vektoren anpassen und damit diverse Infektionskrankheiten sowohl bei nicht-menschlichen Tieren als auch beim Menschen auslösen können. Darüber hinaus setzt sich auch in der Bartonellen-Forschung der Trend fort, das Wechselspiel zwischen Wirt und Vektor aus unterschiedlichen Perspektiven zu beleuchten.

Veränderte Bodennutzung, die Auswirkungen des Klimawandels, der weltweite Bevölkerungszuwachs und die exzessive Zunahme der Nutztierhaltung sind nur einige Beispiele für Faktoren, die auf die Verbreitung von Zoonosen Auswirkungen haben.^{44,45} Auch Bartonellen zählen daher zu Recht zu den klassischen Pathogenen, die in das von der WHO ins Leben gerufenen *one-health*-Konzept gehören. Die Überwachung und Prophylaxe von Infektionen durch diese Erreger erfordert also eine interdisziplinäre Herangehensweise mit gemeinsamen Forschungsansätzen, unter anderem aus den Bereichen Veterinärmedizin, Humanmedizin und Umweltmedizin. Wie in diesem Zusammenhang ein diagnostisches Konzept für die Erfassung von der Verbreitung von Bartonellen etwa aussehen könnte, zeigt eine kürzlich publizierte Arbeit³ (siehe **Abb. 1**).

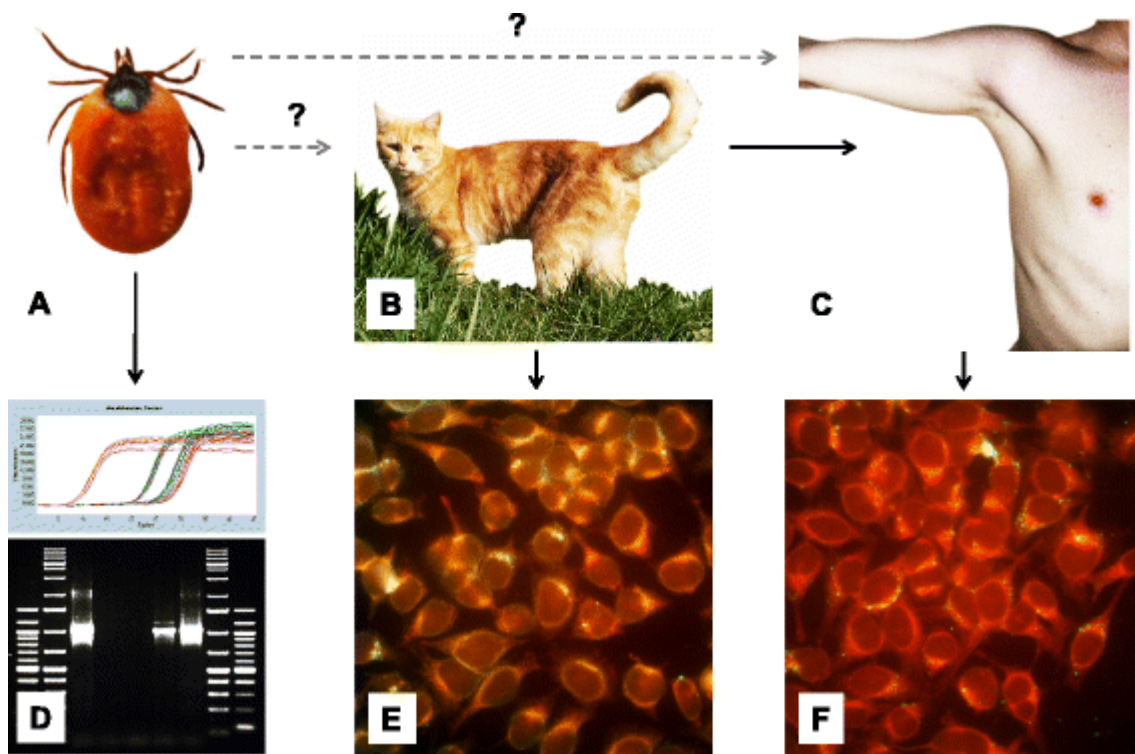


Abb. 1: *One-health* Konzept zum Nachweis von *Bartonella* spp.-Infektionen in Menschen und domestizierten Tieren. Aus Vektoren (A) erfolgt der direkte Nachweis mittels molekularbiologischer Verfahren, aus den Wirten (B, C) der indirekte Nachweis mittels IFT. Übernommen aus³.

Um ein umfassendes Bild von Wirt-Vektor-Übertragungen und -Infektionen zu erstellen, schlägt das vorgestellte Modell der genannten Studie sowohl den Direktnachweis von Bartonellen mittels PCR in Vektoren (hier z.B. Zecken), sowie — wenn auch nur selten erfolgreich — auch bei Wirten vor. Parallel dazu bleibt der Kern der Diagnostik der indirekte Nachweis (unterschiedlicher) *Bartonella* spp.-spezifischen Antikörpern mittels Antikörpernachweisverfahren, wie etwa dem in dieser Arbeit beschriebenen IFT sowohl beim Menschen aber auch bei nicht menschlichen Wirten.

1.3 Diagnostische Nachweisverfahren von *B. henselae*-Infektionen

Da sich Bartonellen intrazellulär vermehren, ist ein direkter kultureller Nachweis dieser Bakterien extrem schwierig. Es existieren zwar neuere Kulturmedien, welche die Anzucht erleichtern,⁴⁶ der in der Routine gängige direkte Nachweis von Bartonellen, etwa aus Geweben (Lymphknoten, Herzklappen), erfolgt aber nach wie vor mittels molekularbiologischer Nachweisverfahren (16S-rRNA). Neuere molekularbiologische Verfahren sind in Erprobung.⁴⁷

Als indirekte Nachweisverfahren zur Detektion von *B. henselae* konnten sich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-basierte Verfahren in der Routine bisher noch nicht durchsetzen. Bei diesen Verfahren beruht der Antikörpernachweis auf enzymvermittelten Farbreaktionen. Eine vielversprechende Ausnahme davon könnte allerdings der kürzlich am Referenzlabor für Bartonellen entwickelte ELISA-Test sein, der eine Sensitivität von 100 % bei PCR-gesicherten und eine Sensitivität von 76 % bei klinisch verdächtigen Infektionen verspricht, bei einer Spezifität von 93 %.⁴⁸ Momentan gilt allerdings in der Humanmedizin zum indirekten Nachweis von *B. henselae* Infektionen weltweit weiterhin der indirekte IFT als Methode der ersten Wahl.⁴⁹

1.3.1 Prinzip des indirekten Immunfluoreszenztestverfahrens

Ziel des IFT ist der mikroskopische Nachweis humaner Antikörper gegen bestimmte Antigene, in der Regel Oberflächenstrukturen oder Proteine, beispielsweise von *B. henselae*-Bakterien. Während IgM-Antikörper sehr früh (oft bereits nach wenigen Tagen) gebildet werden, ist es für im menschlichen Körper gebildete Antikörper der Klasse IgG charakteristisch, dass diese in der Regel erst später nach einer stattgefundenen Infektion, oder zumindest nach ausgeprägtem Kontakt durch das Immunsystem mit einem bestimmten Erreger gebildet werden. Dann aber bleiben IgG-Antikörper sehr lange, zum Teil sogar lebenslang nachweisbar. Ihr Nachweis ist daher meist auch gleichzusetzen mit einer schon länger bestehenden (latenten) oder bereits abgelaufenen Infektion mit dem Erreger, gegen den die IgG-Antikörper spezifisch binden.

Bei dem hier beschriebenen Antikörper-Nachweisverfahren, dem indirekten IFT, binden zunächst für bestimmte Antigene spezifische Antikörper mit dem Zielantigen, sofern diese Antikörper in der Serumprobe in ausreichender Menge vorhanden sind. Diese Zielantigene könnten zum Beispiel Zielproteine der Zellwand von Bakterien sein, die eine Zellkultur infiziert haben. Im Fluoreszenzmikroskop zu sehen sind allerdings die zusätzlich hinzugefügten, mit einem Farbstoff markierten anti-humanen Antikörper, welche wiederum an die vorher gebundenen spezifischen Antikörper binden. Der sichtbare Nachweis erfolgt also „indirekt“ über

die gebundenen fluoreszierenden anti-humanen Antikörper, sogenannte „Sekundärantikörper“.¹

Die technische Raffinesse des IFT liegt in der hochentwickelten Fluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz zu herkömmlichen Auflichtmikroskopen, bei denen durch eine bestimmte Art der Färbung, etwa der Gramfärbung, verschiedene Strukturen voneinander kontrastreich dargestellt werden — je nachdem, wie gut die Farbstoffe in den Strukturen gehalten werden — macht sich die Fluoreszenzmikroskopie selbst-leuchtende, also fluoreszierende Stoffe zu Nutze. Diese Stoffe markieren gezielt einzelne Strukturen im Präparat, welche dann wiederum von sich aus Licht mit einem Wellenlängenspektrum emittieren. Diese fluoreszierenden Farbstoffe benötigen allerdings selbst eine Lichtenergie, die sie anregt. Auch hier hat jeder fluoreszierende Farbstoff ein mehr oder weniger starkes Anregungsspektrum an Wellenlängen, das ihn dann letztlich erst zum Emittieren von Licht bringt. Die optimalen Emissions- und Anregungswellenlängen unterscheiden sich für jeden fluoreszierenden Farbstoff deutlich. Um vom Präparat tatsächlich ausschließlich die gewünschten farbstoffmarkierten Strukturen sichtbar zu machen, ist die Herausforderung, den Farbstoff mit Licht einer Wellenlänge zu beleuchten, die ihn zum Erregen bringt, um dann möglichst nur Licht aus der Wellenlänge, die der Farbstoff emittiert, für die Betrachtung sichtbar zu machen. In der Fluoreszenz wird dafür in der Regel ein komplexes Filtersystem verwendet, das mit dem Anregungsfilter das eingehende Licht auf die gewünschten Wellenlängen reduziert und mit dem Sperrfilter das ausfallende Licht entsprechend gewünscht filtert.

Bei dem hier beschriebenen IFT sollen, wie erwähnt, Antikörper, die an Zielstrukturen — also Antigenen — binden, detektiert werden. Der IFT nutzt zur Markierung sogenannte Sekundärantikörper, welche wiederum selbst mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Im IFT wird daher zunächst immer das Antigen — häufig sind das mit dem Zielerreger infizierte humane Zellen — mit dem Serum der Probe, das potentiell Antikörper enthält, für eine gewisse Zeit inkubiert. In dieser Zeit binden vorhandene Antikörper, sogenannte Primärantikörper, an den Zielerregern. Danach wird das Präparat gewaschen, um alle nicht gebundenen

Antikörper wieder zu entfernen. Erst dann wird das Präparat mit einer Lösung, welche die markierten Sekundärantikörper enthält, inkubiert. Die Sekundärantikörper binden nun an freien Enden der bereits gebundenen Primärantikörper. Anschließend folgt ein erneuter Schritt des Waschens, um freie, nicht gebundene Sekundärantikörper wieder aus dem Präparat zu entfernen. Nun kann mit passenden auf den Fluoreszenzfarbstoff des Sekundärantikörpers eingestellten Filtern im Fluoreszenzmikroskop der Farbstoff detektiert werden. Somit werden indirekt die Primärantikörper nachgewiesen, die vom Sekundärantikörper gebunden werden, welche wiederum an dem leuchtenden Farbstoff gekoppelt sind.^{2,50,51}

1.3.2 Immunfluoreszenzverfahren mit Hochdurchsatz

Speziell zur Detektion von anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern entwickelte Hochdurchsatzverfahren mittels IFT kommen bisher routinemäßig in Infektionsserologischen Laboren nicht zum Einsatz. Einer der führenden kommerziellen Hersteller in der Infektionsserologie — mit einem eigens entwickelten objektträgerbasierten IFT — ist die Firma Euroimmun (siehe **Kap. 2.2.1.**). Ihr Angebot an Laborgeräten zum IFT-Verfahren enthält mittlerweile auch solche mit automatisierter Live-Mikroskopie in Bildschirmdarstellung sowie die Funktion einer semiautomatisierten Prozessierung der Seren mit den Objektträgern etwa für Laborstraßen mit sehr hohem Durchsatz. Solche Systeme sind allerdings sehr teuer in Anschaffung und Betrieb und können dabei eine konventionelle Mikroskopie bisher nicht vollständig ersetzen.⁵²

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Studie sollten 5.215 humane Blutspender-Seren zur Erhebung der Seroprävalenz von Antikörpern der Klasse IgG gegen *B. henselae* erhoben werden. Diese hohe Anzahl an Seren wäre mittels konventioneller IFT-basierter Untersuchungsmethoden im Arbeitsumfang nicht zu bewältigen. Der indirekte IFT sollte insoweit modifiziert werden, dass eine ökonomische Testung dieser großen Probenmenge ermöglicht wird, bei gleichwertiger Sensitivität und Spezifität. Zunächst sollte hierfür eine Umstellung des Verfahrens von kommerziell

erhältlichen Objektträgern mit zehn IFT-Feldern in ein 96-Well-Platten-Format vorgenommen werden. Dazu sollte der Workflow unter Zuhilfenahme eines Pipettierroboters so optimiert werden, dass ein Arbeiten im Hochdurchsatz ermöglicht wird. Mit der Etablierung eines *high-throughput* IFT (im Weiteren hpIFT) sollte dieser auch methodisch validiert werden. Zuletzt sollte die Praktikabilität des hpIFT anhand der zu testenden 5.215 Seren überprüft werden, sowie gleichzeitig Daten zur anti-*B.-henselae* IgG-Prävalenz erstellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Herstellerfirma
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Nanophotometer	Implen, München
Zentrifugen: Biofuge stratos Multifuge 3SR+ Centrifuge 5417R	Thermo Fisher Scientific, Osterode Thermo Fisher Scientific, Osterode Eppendorf, Hamburg
Lamina-Air-Flow Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific, Osterode
Pipettierroboter Viaflow 96/384	Integra, Zizers (Schweiz)
Mehrfachpipette Viaflow II	Integra, Zizers (Schweiz)
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra, Zizers (Schweiz)
Inverses Mikroskop (Zellkultur) Axiovert 40 CFL	Carl-Zeiss, Jena
Brutschrank Heraeus BBD6220	Thermo Fisher Scientific, Osterode
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelinkubator Minitron	Infors HT, Basel (Schweiz)
Schüttelgerät Unimax 2010	Heidolph, Schwabach
Digitale Spiegelreflexkamera (DLSR) Nikon 3100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Kameras: C11440 orca-flash2.8 DS-Fi2	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City (Japan) Nikon GmbH, Düsseldorf
Gefrierschrank Froster-720 -22	Kirsch, Offenburg
Kühlschrank Super-720	Kirsch, Offenburg
Nikon ECLIPSE Ti - Fluoreszenzmikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf
Vortex Genie2	Science Industries, Bohemia (USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Übersicht über die in der Studie verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herstellerfirma
Zellkulturflaschen Cellstar, <i>cell culture flasks</i>	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Pipettenspitzen	Integra, Zizers (Schweiz)
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reagenzreservoir	Integra, Zizers (Schweiz)
Zellkultur Mikrotiterplatten, 96-Well, Polystyren	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Falcon - konische Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Osterode
Einmal-Halbmikroküvetten	Sarstedt, Berlin
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Koenigshofen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha (USA)
Glaskolben und -flaschen	Schott Duran, Mainz

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Antibiotika

Tab. 4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Antibiotika

Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Antibiotika	Herstellerfirma
PBS	Thermo Fisher Scientific, Osterode
PBS- Tween	Merck, Darmstadt
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PFA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin	Thermo Fisher Scientific, Osterode
Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Osterode

2.1.4 Zellkulturen und Kulturmedien

Tab. 5: Übersicht über die in der Studie verwendeten Zellkulturen

Zelllinie	Zelltyp	Kultivierungsmedium	Referenz
HeLa 229	Permanente Zelllinie aus Zervixkarzinoms-Epithelzellen	RosWell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) Supplementiert mit 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	ATCC

2.1.5 Bakterienstämme und Bakterienkulturmedien

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Bakterienmedien

Medium	Eigenschaften	Referenz /Hersteller
<i>Bartonella</i> -Liquid-Medium (BaLi)	Spezialmedium für <i>Bartonella</i> spp.	46
Columbia-Blutagarplatten mit 5 %-Schafsblut	Universalmedium	Becton Dickinson, Heidelberg

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Bartonellenstämme

Stamm	Pathogenitätsfaktoren	Referenz
<i>B. henselae</i> Houston-1 RSE247	BadA ⁻	zur Verfügung gestellt von C. Dehio, Basel (Schweiz)
<i>B. henselae</i> Houston-1 MFE341	BadA ⁺	53
<i>B. henselae</i> Marseille	BadA ⁺	54
<i>B. henselae</i> Marseille	BadA ⁻	54
<i>B. quintana</i> JK31	Vomp ⁺	39
<i>B. quintana</i> 2D70	Vomp ⁻	39

2.1.6 Serologische Testkits

Tab. 8: Übersicht über die in der Studie verwendeten serologischen Testkits

Kit	Herstellerfirma
Anti- <i>B. henselae</i> -IFT (IgG) und anti- <i>B. quintana</i> -IFT (IgG), Produktcode: FK-219b-1010-1G	Euroimmun, Lübeck
Anti- <i>Brucella</i> spp.-ELISA (IgG/IgM)	Virion/Serion, Würzburg
Anti- <i>Coxiella burnetii</i> -IFT (IgG Phase I und Phase II/IgM)	Fuller Laboratories, Fullerton (USA)
<i>Epstein-Barr-Virus</i>	Virion/Serion, Würzburg
Anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -IFT (IgG/IgM)	DiaSorin, Dietzenbach
Anti- <i>Leptospira interrogans</i> -IHA	Ravo Diagnostika GmbH, Freiburg
Anti- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -ELISA (IgG/IgM)	Euroimmun, Lübeck
Anti- <i>Rickettsia typhi/rickettsii</i> -IFT (IgG/IgM)	DiaSorin, Dietzenbach
<i>Treponema pallidum</i> -TPPA	Fujirebio, Tokyo (Japan)
<i>Treponema-pallidum</i> -FTA Abs (IgG/IgM)	Mast Diagnostica, Reinfeld

2.1.7 Antikörper

Tab. 9: Übersicht über die in der Studie verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
FITC-markierter anti-human IgG-Antikörper	unverdünnt	Euroimmun, Lübeck
anti- <i>B. henselae</i> Marseille wildtype (rabbit)	1:2000	55
anti-BadA f6 (rabbit); Fragment 377-539 bp (Stiel Region)	1:200	54
Alexa-Fluor 488-markierter anti-rabbit IgG-Antikörper (goat)	1:200	Dianova GmbH, Hamburg

2.1.8 Referenzseren

Humane Seren, die in dieser Studie als Referenzseren genutzt wurden, stammen aus der Serumbank des Konsiliarlaboratoriums für Bartonellen (ernannt vom Robert Koch-Institut, Berlin) des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene sowie des Instituts für Virologie (*Epstein-Barr-Virus*-Seren)

des Universitätsklinikums Frankfurt am Main. Hierbei handelt es sich um Rückstellproben von im Routinebetrieb unter akkreditierten Bedingungen (zertifiziert nach ISO D-ML-13102-01-00) getesteten Patientinnen- und Patientenproben sowie aus sog. Ringversuchs-Seren (Instand e.V.). Die Seren wurden genutzt als Positiv- und Negativkontrollen sowie zur Evaluation der Kreuzreaktivität anderer Antikörper mit dem Bartonellen-Antigen. Alle Seren wurden abgenommen im Zeitraum zwischen Januar 2012 und August 2015 und bei -20 °C aufbewahrt. Für die Verwendung der Referenzseren liegt die Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums vor (Ethikvotum Geschäftsnummer 423/11).

Tab. 10: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Referenzseren aus der Serumbank des Konsiliarlaboratoriums

Serum Bezeichnung	Getesteter Parameter	Positiv bis Titerstufe	Weitere klinische und diagnostische Angaben	Interpretation
Ref. Bh1	<i>B. henselae</i> IgG (IFT)	1:160	Bartonelleninfektion klinisch unwahrscheinlich.	Grenzwertiger IgG Titer. Der Befund spricht gegen eine Infektion mit <i>B. henselae</i> .
Ref. Bh2	<i>B. henselae</i> IgG (IFT)	1:160	Bartonelleninfektion klinisch unwahrscheinlich.	Grenzwertiger IgG Titer. Der Befund spricht gegen eine Infektion mit <i>B. henselae</i> .
Ref. Bh3	<i>B. henselae</i> IgG (IFT)	1: 5.120	Bartonelleninfektion klinisch wahrscheinlich.	Der Befund ist mit einer Infektion mit <i>B. henselae</i> vereinbar.
Ref. Bh4	<i>B. henselae</i> IgG (IFT)	1: 5.120	Bartonelleninfektion klinisch wahrscheinlich.	Der Befund ist mit einer Infektion mit <i>B. henselae</i> vereinbar.
Ref. Bh5	<i>B. henselae</i> IgG (IFT)	1: 40.960	Bartonelleninfektion klinisch wahrscheinlich.	Der Befund ist mit einer Infektion mit <i>B. henselae</i> vereinbar.

Ref. Bh6	<i>B. henselae</i> IgG (IFT)	1:10.240	Bartonellen- infektion molekular- biologisch gesichert.	Infektion mit <i>B. henselae</i> .
Ref. LE1	<i>Leptospira</i> spp. IgG (IHA)	1:2.560	-	Auffällige Leptospiren- Serologie.
Ref. LE2	<i>Leptospira</i> spp. IgG (IHA)	1:640	-	Auffällige Leptospiren- Serologie.
Ref. LE3	<i>Leptospira</i> spp. IgG (IHA)	1:320	-	Auffällige Leptospiren- Serologie.
Ref. LE4	<i>Leptospira</i> spp. IgG (IHA)	1:1.280	-	Auffällige Leptospiren- Serologie.
Ref. AP1	<i>Anaplasma</i> (ehemals <i>Ehrlichia</i>) <i>phagocytophilum</i> IgM (IFT)	1:20	-	Infektion mit <i>Anaplasma</i> <i>phagocytophilum</i> .
Ref. AP2	<i>Anaplasma</i> (ehemals <i>Ehrlichia</i>) <i>phagocytophilum</i> IgM (IFT)	1:20	-	Infektion mit <i>Anaplasma</i> <i>phagocytophilum</i> .
Ref. AP3	<i>Anaplasma</i> (ehemals <i>Ehrlichia</i>) <i>phagocytophilum</i> IgG (IFT)	1:64	-	Der Befund deutet auf eine Infektion mit <i>Anaplasma</i> <i>phagocytophilum</i> hin.
Ref. AP4	<i>Anaplasma</i> (ehemals <i>Ehrlichia</i>) <i>phagocytophilum</i> IgG (IFT)	1:64	-	Der Befund deutet auf eine Infektion mit <i>Anaplasma</i> <i>phagocytophilum</i> hin.

Ref. BR1	<i>Brucella</i> spp. IgG (ELISA)	positiv	-	Manifeste oder abgelaufene Infektion mit <i>Brucella</i> spp.
Ref. BR2	<i>Brucella</i> spp. IgG (ELISA)	positiv	-	Manifeste oder abgelaufene Infektion mit <i>Brucella</i> spp.
Ref. BR3	<i>Brucella</i> spp. Suchtest (Latex- Agglutination)	positiv	-	Infektion mit <i>Brucella</i> spp. nicht ausgeschlossen.
Ref. BR4	<i>Brucella</i> spp. IgM (ELISA)	positiv	-	Frische Infektion mit <i>Brucella</i> spp. oder unspezifische Reaktion.
Ref. CB1	<i>Coxiella burnetii</i> IgG (IFT)	Phase I: <1:16 Phase II: 1:4.096	-	Frische Infektion mit <i>Coxiella burnetii</i> .
Ref. CB2	<i>Coxiella burnetii</i> IgG (IFT)	Phase I: 1:16.384 Phase II: >1:32.768	-	Chronische Infektion mit <i>Coxiella burnetii</i> .
Ref. CB3	<i>Coxiella burnetii</i> IgG (IFT)	Phase I: 1:64 Phase II: 1:64	-	Infektion mit <i>Coxiella</i> <i>burnetii</i> nicht ausgeschlossen.
Ref. CB4	<i>Coxiella burnetii</i> IgG (IFT)	Phase I: 1:64 Phase II: 1:512	-	Verdacht auf zurückliegende Infektion mit <i>Coxiella</i> <i>burnetii</i> .
Ref. MP1	<i>Mycoplasma</i> <i>pneumoniae</i> IgG (ELISA)	positiv	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Mycoplasma</i> <i>pneumoniae</i> .
Ref. MP2	<i>Mycoplasma</i> <i>pneumoniae</i> IgG (ELISA)	positiv	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Mycoplasma</i> <i>pneumoniae</i> .

Ref. MP3	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgG (ELISA)	positiv	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
Ref. MP4	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> IgG (ELISA)	positiv	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
Ref. TP1	<i>Treponema pallidum</i> TPPA IgG (IFT)	1:5.120 >1:10	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Treponema pallidum</i> .
Ref. TP2	<i>Treponema pallidum</i> TPPA IgG (IFT)	1:163.840 >1:10	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Treponema pallidum</i> .
Ref. TP3	<i>Treponema pallidum</i> TPPA IgG (IFT)	1:40.960 >1:10	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Treponema pallidum</i> .
Ref. TP4	<i>Treponema pallidum</i> TPPA IgG (IFT)	1:40.960 >1:10	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Treponema pallidum</i> .
Ref. RI1	<i>Rickettsia typhi</i> IgG (IFT)	1:128	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Rickettsia typhi</i> .
Ref. RI2	<i>Rickettsia typhi</i> IgG (IFT)	1:128	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Rickettsia typhi</i> .
Ref. RI3	<i>Rickettsia typhi</i> IgG (IFT)	1:128	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Rickettsia typhi</i> .
Ref. RI4	<i>Rickettsia typhi</i> IgG (IFT)	1:128	-	(Zurückliegende) Infektion mit <i>Rickettsia typhi</i> .

Ref. EB1	Epstein-Barr-Virus EBNA-1-IgG (ELISA)	positiv	-	Zurückliegende Infektion mit Epstein- Barr-Virus
Ref. EB2	Epstein-Barr-Virus EBNA-1-IgG (ELISA)	positiv	-	Zurückliegende Infektion mit Epstein- Barr-Virus
Ref. EB3	Epstein-Barr-Virus EBNA-1-IgG (ELISA)	positiv	-	Zurückliegende Infektion mit Epstein- Barr-Virus
Ref. EB4	Epstein-Barr-Virus EBNA-1-IgG (ELISA)	positiv	-	Zurückliegende Infektion mit Epstein- Barr-Virus

2.1.9 Software

Tab. 11: Übersicht über die in der Arbeit verwendete Software

Office 2010	Microsoft, Redmond (USA)
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil (Schweiz)
NIS-Elements Imaging Software	Nikon, Düsseldorf

2.1.10 Serumproben

Zur Antikörperbestimmung standen für diese Studie 5.215 Seren gesunder, zufällig ausgewählter Blutspenderinnen und Blutspendern zur Verfügung. Die Seren wurden im Rahmen eines vom Robert Koch-Institut geförderten Projektes nach deren Abnahme und Verarbeitung durch den Projektpartner (Gesundheitsamt Stuttgart) bei -20 °C bis -70 °C aufbewahrt. Aliquotiert in 96-Deep-Well Platten wurden diese Seren dann zur Austestung an das Nationale Konsiliarlaboratorium für Bartonellen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Frankfurt am Main (im Weiteren UKF) verschickt. Bis zum Tag der Analysen wurden die Seren bei -20 ° aufbewahrt.

Für die Verwendung der Blutspendeseren in dieser Studie liegt die Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums vor (Ethikvotum Geschäftsnummer 423/11).

2.2 Methoden

2.2.1 Objektträgerbasierter Immunfluoreszenztest von Euroimmun

Als Vergleichsmethode zum entwickelten hpIFT wurde der am UKF unter akkreditierten Bedingungen (zertifiziert nach ISO D-ML-13102-01-00) im Routinebetrieb angewandte, kommerziell hergestellte, indirekte IFT zum semiquantitativen Nachweis von spezifischen Antikörpern der Klassen IgG und IgM gegen *B. henselae* und *B. quintana* der Firma Euroimmun (Lübeck, Produkt Code FK-219b-1010-1G) verwendet.

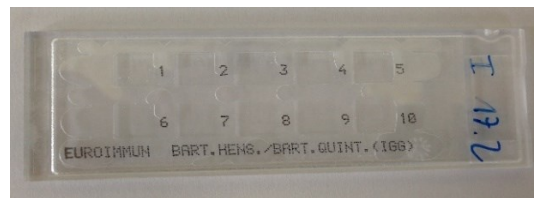


Abb. 2: Objektträgerbasierter indirekter IFT zum Nachweis von *B. henselae* und *B. quintana* Antikörpern der Klasse IgG der Firma Euroimmun.

Bei diesem Testverfahren werden humane Seren zunächst in einer geometrischen Verdünnungsreihe beginnend bei 1:80, mit PBS-Tween-Puffer verdünnt und dann auf die modifizierten Objektträger pipettiert. Euroimmun nutzt dabei eine sogenannte „Titerplane-Technik“, bei der alle Reaktionen innerhalb der speziell hergestellten Objektträger stattfinden. Euroimmun schreibt dazu in den Herstellerangaben:

„Zur Standardisierung der Analysen wurde von EUROIMMUN die Titerplane™-Technik entwickelt: Die Proben oder das markierte Antiserum werden zunächst auf die Reaktionsfelder eines Reagenzträgers pipettiert. Danach legt man die Objektträger von oben in die Aussparungen des Reagenzträgers, wodurch alle BIOCHIPS gleichzeitig Kontakt mit den Tropfen bekommen und die Reaktionen gestartet werden. Position und Höhe der Tropfen sind durch die Geometrie des Systems genau definiert, die Proben verlaufen nicht mehr. Da sich die Flüssigkeit in einem abgeschlossenen Raum befindet, ist eine „feuchte Kammer“ überflüssig. Man kann beliebig viele Proben unter identischen Bedingungen simultan nebeneinander inkubieren.“⁵⁶

Um den Test durchführen zu können, müssen also zunächst die Reagenzträger vorbereitet und die Seren verdünnt auf die Reagenzträger pipettiert werden.

Sodann werden diese für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgt ein Waschschrift und der Sekundärantikörper wird aufgetragen. Daraufhin wird erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Abschließend werden die Objektträger mit Deckgläsern eingedeckt und sind dadurch bereit für die Fluoreszenzmikroskopie. Als Antigen nutzt Euroimmun bei diesem Testverfahren den *B. henselae*-Stamm Houston-1 (BadA).⁵⁶

2.2.2 96-Well-plattenbasierter *high-throughput* Immunfluoreszenztest (hpIFT)

Der hier etablierte hpIFT zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *B. henselae* ist eine auf das 96-Well-Platten-Format weiterentwickelte Variante des bereits gut etablierten indirekten IFT. Die Entwicklung beruht auf der Basis bereits existierender Protokolle wie dem des *Centers of Disease Control and Prevention* (Atlanta, USA).⁵⁷

Im Unterschied zu objektträgerbasierten kommerziell erhältlichen Methoden finden hier alle Reaktionen und Arbeitsschritte in den Vertiefungen, den sogenannten Wells (*Engl.*: Vertiefung, Senkung) der 96-Well-Titerplatten statt. Eine 96-Well-Platte beinhaltet 8 * 12 Vertiefungen.

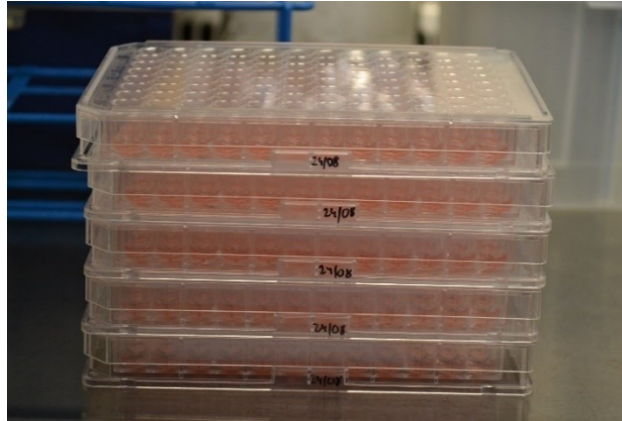


Abb. 3: 96-Well-Platten mit ausgesäten Zellkulturen und RPMI-1640 Zellkulturmedium.

Durch das 96-Well-Platten-Format besteht die Möglichkeit, dass Reagenzien nicht nur mit Einfachpipetten, sondern auch mit 8-Kanal-Handpipetten oder sogar einem 96-fach-Pipettierroboter — wie in unserem Fall mit dem Integra VIAFLO 96/38 — befüllt werden können. Beinahe alle Arbeitsschritte konnten wir im 96-Well-Format unter Zuhilfenahme des VIAFLO 96/384 durchführen: angefangen mit der Zellkulturaussaat der HeLA 229-Zellen, der Infektion mit *B. henselae* und der Fixierung mit 3,75 % Paraformaldehyd (PFA) sowie der Blockierung der Welloberflächen mittels 0,2 % BSA, der Permeabilisierung der Zellen durch Triton X-100 und der Serumverdünnung auf 1:320, bis hin zur anschließenden Inkubation der Seren und Zugabe von Sekundärantikörpern.

Bei der darauffolgenden Fluoreszenzmikroskopie musste nicht mehr jeder Objektträger hintereinander eingelegt, sondern die 96 Wells einer Platte konnten direkt nacheinander interpretiert werden. Besonders zur Geltung kam die Methode, wenn die zu testenden humanen Seren ebenfalls bereits im 96-Well-Format — wie hier in 96-Deep-Well-Platten — vorlagen.

Alle folgenden dargestellten Schritte von der Anzucht der Bartonellen (**Kap. 2.2.2.1**) bis zu ihrer Fixierung (**Kap. 2.2.2.5.**) wurden unter sterilen Bedingungen auf einer Werkbank mit Laminar-Air-Flow-System durchgeführt.

2.2.2.1 Kultivierung von *Bartonella* spp.

Bei -80 °C gelagerte Bartonellen-Stämme, *B. henselae* Houston-1 RSE247 (BadA⁻), *B. henselae* Houston-1 MFE34 (BadA⁺), *B. henselae* Marseille (BadA⁺), *B. henselae* Marseille (BadA⁻), *B. quintana* JK31 (Vomp⁺) and *B. quintana* 2D70 (Vomp⁻) wurden im Eisbad aufgetaut und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ über 24 h in *Bartonella*-Liquid (BaLi)-Medium im Verhältnis 1:200 schüttelnd inkubiert. Eine Wachstums- und Reinheitskontrolle wurde auf Columbia-Blutplatten ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ über 24 h bebrütet. Wenn keine schnell wachsenden Kolonien sichtbar waren, wurde die Kultur als Reinkultur betrachtet.

2.2.2.2 Zellkultur

Die Kultivierung der HeLa 229-Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ über 24 h unter Verwendung des Zellkulturmediums RPMI-1640, supplementiert mit 10 % FCS und Antibiotikallösung in Zellkulturflaschen. Die HeLa 229-Zellen wurden bei Konfluenz trypsinisiert und im Verhältnis 1:6 passagiert.

Die potentiell unsterbliche Zelllinie der adhärent wachsenden HeLa 229-Zellen stammt aus dem Jahre 1951 und hat auf Grund ihrer Zuverlässigkeit mittlerweile in Experimenten von weit über 75.000 wissenschaftlichen Artikeln in der online Datenbank *U.S. National Library of Medicine* (PubMed) Platz gefunden.⁵⁸ Es handelt sich dabei um menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks (HeLa). Das *RosWell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 Medium ist eines der am häufigsten verwendeten Zellkulturmedien und basiert auf einer Lösung aus Glucose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen. Der Zusatz von Serum, in diesem Fall 10 % *fetal calf serum* (FCS), liefert die notwendigen Wachstumsfaktoren für die Vermehrung der Zellen. Die Antibiotikallösung verhindert eine Kontamination der nicht-infizierten Zellkulturen mit Bakterien. Ein Zellrasen entsteht durch Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ auf den speziell dafür entwickelten breiten Zellkulturflaschen, die eine besonders gute Zell-Adhäsion erlauben. Durch die Zugabe von 3 ml der vorher warmgestellten Endoprotease Trypsin (0,25 %) und des Chelatbildners EDTA (0,02 %), gelöst in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), lösen sich die Zellverbände innerhalb von 5

min bei 37 °C und 5 % CO₂ auf in einzelne Zellen. Die anschließende Zugabe von wenigen Millilitern FCS inaktiviert das restliche auf Dauer zelltoxische Trypsin. Die gelösten Zellen können nach Zentrifugation (1.000 RPM, RT, 10 min) mit PBS gewaschen werden. Anschließend werden sie entweder im Verhältnis 1:6 in einer neuen Zellkulturflasche mit RPMI-1640, 10 % FCS und Antibiotikallösung passagiert, oder aber in definierter Anzahl in 96-Well-Platten verteilt.

2.2.2.3 Zellzahlbestimmung und Zellkulturaussaat in 96-Well-Platten

Eine Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ /Well in der 96-Well-Platte ergab in der Lichtmikroskopie nach einem Tag Zellkultur einen dichten einlagigen Rasen.

Um dies zu erreichen, wurde zunächst die Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dabei wurden 50 µl der vorher trypsinierten und zentrifugierten Zellen mit 50 µl Trypanblau gemischt (1:2) und sodann 10 µl dieser Suspension in die Zählkammer pipettiert. Durch den Mittelwert der mikroskopischen Auszählung der nicht gefärbten Lebendzellen in den vier Eckquadraten, multipliziert mit dem Verdünnungs- und Kammerfaktor (10^4) erhält man die Zellzahl/ml der Suspension. Um die Zielvorgabe von $2 \cdot 10^4$ Zellen/Well zu erreichen, wurden alle Wells entsprechend mit HeLa 229-Zellen (100 µl Suspension und $2 \cdot 10^4$ Zellen /Well) ausgesät.

Zur Evaluation der Seroreaktivität unterschiedlicher Bartonellenstämme (siehe **Kap. 3.1.4**) und zur Bestimmung von Kreuzreaktivitäten mit fremdaktiven Humanseren (siehe **Kap. 3.1.5**) des hpIFT wurde bei der Herstellung der 96-Well-Platten mit den Stämmen *B. henselae* Houston-1 MFE341 BadA⁺, *B. henselae* Marseille (BadA⁺), *B. henselae* Marseille (BadA⁻), *B. quintana* JK31 (Vomp⁺) und *B. quintana* 2D70 (Vomp⁻) analog vorgegangen.

2.2.2.4 Infektion der Zellkultur

Am darauffolgenden Tag wurden die ausgesäten Zellen mit *B. henselae* Houston-1 RSE247 (BadA-) mit einer MOI von 100 infiziert.

Die Multiplizität der Infektion (engl. *multiplicity of infection*, kurz MOI) gibt das Verhältnis der Erreger pro zu infizierende Zelle an. Pro Well (mit je $2 \cdot 10^4$ HeLa 229-Zellen) wurden somit $2 \cdot 10^6$ ($100 \cdot 2 \cdot 10^4$) Bartonellen benötigt. Die im Nanophotometer gemessene Optische Dichte (OD) bei 600 nm der in BaLi-Medium suspendierten *B. henselae* wurde mit dem bekannten Koeffizienten (OD = 1 entspricht $5 \cdot 10^8$ Bakterien / ml) multipliziert, um die vorhandene Zellzahl pro Milliliter und in der Folge das benötigte Gesamtvolumen zu ermitteln. Dieses Volumen an Bakteriensuspension wurde zunächst abzentrifugiert (4991 g, RT, 10 min) und anschließend mit RPMI-1640 Medium mit dem Volumen von 100 µl/Well (ohne FCS) resuspendiert. Daraufhin wurden alle Wells der Platten abgesaugt, mit je 100 µl der hergestellten Bakteriensuspension befüllt und zur Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank bebrütet.

2.2.2.5 Fixierung

Die Antigenpräparation wurde durch die Fixierung der infizierten Zellen abgeschlossen. Zunächst wurde hierfür das vorhandene RPMI-1640 in den Wells verworfen. Danach folgten zwei Waschgänge mit jeweils 100 µl PBS/Well. Erst dann wurden die Wells mit 3,75 % Paraformaldehyd (PFA, pH 7,4) bei 4 °C für 15 min inkubiert. PFA vernetzt als kreuzvernetzendes Fixativ die Zellstrukturen miteinander. Wie sich später zeigte, hatte dies keinen negativen Einfluss auf die Antigen-Antikörper-Erkennung. Zum Abschluss des Schrittes der Fixierung erfolgten zwei erneute Waschgänge mit 100 µl PBS/Well und eine Befüllung der Wells ebenfalls mit 100 µl PBS/Well.

Das Ergebnis bestand in einem dauerhaft fixierten Präparat ohne Infektionsrisiko. Bei 4 °C Lagerung unter einer Verdunstungsschutzfolie zeigten die fixierten, für die Färbung vorbereiteten 96-Well-Platten des hpIFT auch nach zwei Monaten weder eine mikrobielle Kontamination noch Einbußen der Testperformance und könnten vermutlich auch über einen noch längeren Zeitraum gelagert werden.

Mit dem Abschluss der Fixierung wurde daher der nachfolgende Schritt „Färbung“ (**Kap. 2.2.2.6**) unter Laborbedingungen ohne Verwendung einer sterilen Werkbank mit Laminar-Air-Flow System durchgeführt.

2.2.2.6 Färbung

Zusammenfassend müssen für eine klare Darstellung einer Antikörper-Antigen-Reaktion zunächst die Blockierung des zuvor hergestellten Antigenpräparats (Bartonellen-infizierte HeLa 229-Zellen) mit 0,2 % BSA und die Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 erfolgen. Daraufhin folgt im vorletzten Schritt des hpIFT, durch Zugabe der 1:320 vorverdünnten Patientinnen- und Patientenserum, die Bindung möglicherweise vorhandener anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern. Abschließend dient der hinzugegebene, mit *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) konjugierte, gegen humane IgG spezifisch gerichtete Sekundärantikörper dem indirekten fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *B. henselae* im menschlichen Serum.

Im Detail wurde wie folgt vorgegangen, wobei bei allen beschriebenen Waschschritten je 100 µl PBS/Well pipettiert und verworfen wurden:

Es besteht prinzipiell die Gefahr, dass Bestandteile von Serumproben, wie etwa Antikörper oder auch der später hinzugefügte Sekundärantikörper direkt an den Oberflächen der Mikrotiterplatten binden könnten. Dies hätte Hintergrundsignale und im ungünstigsten Falle falsch positive Ergebnisse zur Folge. Um die Oberflächenbindungsstellen zu sättigen, wurde für 15 min mit 100 µl 0,2 % BSA je Well bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS.

Um eine Antigenbindung an die intrazellulär gelegenen *B. henselae* Bakterien zu ermöglichen, ist eine Überwindung der Zellmembran durch die Antikörper notwendig. Für die dafür notwendige Permeabilisierung wurde für 15 min bei Raumtemperatur das Detergenz Triton X-100 (0,2 %) verwendet. Im Anschluss folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS.

Die in 96-Deep-Well-Platten gefrorenen Blutspendeseren wurden aufgetaut und in zwei Schritten, zunächst auf 1:16 (dies bedeutet eine Abnahme von je 5 µl Serum pro Blutspendealiquot auf 75 µl PBS) und dann nochmals 1:20 mit PBS verdünnt. Von der Zielverdünnung 1:320 wurden dann 40 µl/Well bei Raumtemperatur für eine Stunde auf die den hpIFT transferiert. Anschließend folgten wieder zwei Waschschrirte mit PBS.

An den anti-human IgG-Antikörper (Sekundärantikörper) ist der Fluoreszenzmarker FITC gekoppelt. Anregungs- und Emissionsmaxima von FITC betragen 495 nm bzw. 519 nm (siehe auch **Kap. 2.2.2.8.** und **Abb. 7**).⁵⁹ Die markierten Sekundärantikörper wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Abschließend folgten drei schnelle Waschschrirte und der hpIFT wurde verdunkelt bei 4 °C bis zur Fluoreszenzmikroskopie gelagert. Die anfänglich in den Versuchen verwendete Gegenfärben der DNA mit DAPI wurde im Laufe der Experimente aus dem Workflow entfernt, da dadurch keine nennenswerte Verbesserung in der mikroskopischen Auswertung erzielt werden konnte.

2.2.2.7 Experimentaldesign für hohen Probendurchsatz

Bei allen Arbeitsschrirten, bei denen Flüssigkeiten in oder aus den 96-Well-Platten pipettiert wurden, kam der semi-automatische Mehrkanalpipetten-Roboter VIAOFLO 96/384 (freundlicherweise bereitgestellt von der Firma Integra, Zizers, Schweiz) zum Einsatz.

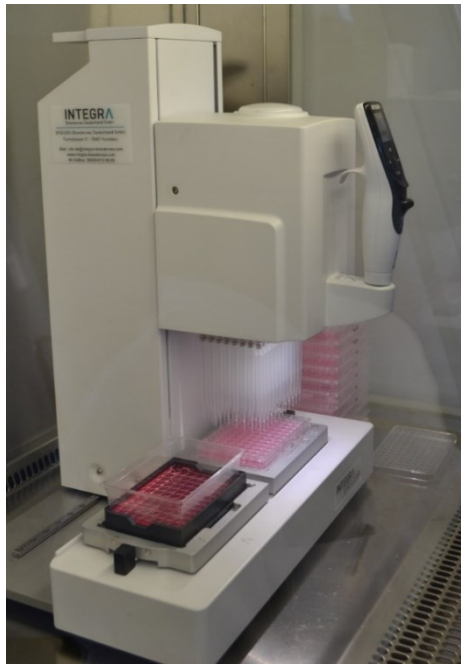


Abb. 4: Pipettierroboter VIAFLO 96/384 Integra, Zizers (Schweiz) im Einsatz unter der Laminar-Air-Flow-Werkbank. Im vorderen Slot ist ein Reservoir mit RPMI-1640 Zellkulturmedium eingesetzt und befüllt die im hinteren Slot eingelegten 96-Well-Platten.

Erst der Einsatz dieses Gerätes ermöglichte den routinefreundlichen Einsatz der Methode unter Hochdurchsatzbedingungen. Durch die Erstellung eines einfachen Pipettierschemas (siehe **Tab. 12**) konnten unter Einsatz des VIAFLO 96/384 beispielsweise an einem Tag (innerhalb von ca. fünf Stunden) 2.640 Patientinnen- und Patientenproben, entsprechend 30 vorher bereits fixierten und blockierten 96-Well-Platten, mit dem hpIFT gefärbt werden.

Tab. 12: Pipettierschema für den hpIFT unter Verwendung des Pipettenroboters VIAFLO 96/384 der Firma Integra und die dafür benötigten Reservoirs und Pipettenspitzen. Zu Steigerung der Effizienz wurde das Gegenfärben mit DAPI aus dem ursprünglichen Workflow gestrichen (in der Tabelle durchgestrichene Arbeitsschritte 14 und 15).

Verwendete Volumina: 5µl, 40µl, 75µl, 95µl und 100µl			
Arbeitsschritte	Reservoir	Pipettenspitzen	Pipettierart
Sterile Bedingungen:			
1. Zellaussaat 100µl, 24h Inkubation	Reservoir 1	1250µl	VIAFLO
2. Infektion 100µl, 24h Inkubation	Reservoir 2	1250µl	VIAFLO
Nicht-Sterile Bedingungen:			
<i>Überstand wird jeweils händisch verworfen</i>			
3. Waschschrift PBS, 2x je 100µl	Reservoir 3	1250µl	VIAFLO
4. Fixierung 100µl, 15min Inkubation bei 4°C	Reservoir 4	1250µl	VIAFLO
5. Waschschrift PBS, 2x je 100µl	Reservoir 3 wiederverwendbar	1250µl	VIAFLO
6. Blockierung 100µl, 15min Inkubation bei RT	Reservoir 5	1250µl	VIAFLO
7. Waschschrift PBS, 1x 100µl	Reservoir 3 wiederverwendbar	1250µl	VIAFLO
8. Permeabilisierung 100µl, 15min Inkubation bei RT	Reservoir 6	1250µl	VIAFLO
9. Waschschrift 2x PBS, je 100µl	Reservoir 3 wiederverwendbar	1250µl	VIAFLO
10. Serum Verdünnung 1:320, 40µl	96-Deep-Well Platten (Seren)		
I. Verdünnung 1:16 (5µl Serum + 75µl PBS)	96-Well Platten <i>round-bottom</i> 1	2x 5-125µl	Mehrkanalpipette händisch
II. Verdünnung 1:20 (5µl der I. Verdünnung + 95µl PBS)	96-Well Platten <i>round-bottom</i> 2	2x 5-125µl	Mehrkanalpipette händisch
Überführung in Wells des hpIFT 40µl		1x 40µl	Mehrkanalpipette händisch
11. Waschschrift 2x PBS, je 100µl	Reservoir 3 wiederverwendbar	1250µl	VIAFLO
12. Sekundärantikörper 40µl, 1h Inkubation bei RT (dunkel)	Reservoir 7	1250µl	VIAFLO
13. Waschschrift 3x PBS, je 100µl	Reservoir 3 wiederverwendbar	1250µl	VIAFLO
14. Gegenfärbung DAPI 40µl	Reservoir 8	1250µl	VIAFLO
15. Waschschrift 3x PBS, je 100µl	Reservoir 3 wiederverwendbar	1250µl	VIAFLO

Bei dem entwickelten hpIFT wurden für jede Platte die ersten acht Wells als Kontrollen belegt (siehe **Tab. 13**).

Tab. 13: Kontrollen mit folgenden Abweichungen von der Standard-Präparation

Well Position	Kontrolle für	Zellkultur	Primär-Antikörper mit serodiagnostischem Titer	Sekundär-Antikörper
1A	Negativkontrolle	infizierte Zellkulturen	-/-	-/-
1B	Sekundär-AK-Negativkontrolle (Anti-human)	infizierte Zellkulturen	-/-	FITC-markierter anti-human IgG-AK

1C	Sekundär-AK Negativ- kontrolle (Anti-rabbit)	infizierte Zellkulturen	-/-	Alexa488- markierter goat anti- rabbit IgG-AK
1D	Positiv- kontrolle	infizierte Zellkulturen	rabbit anti- <i>B. henselae</i> -AK 1:2.000	Alexa488- markierter goat anti- rabbit IgG-AK
1E	Negativ- kontrolle	infizierte Zellkulturen	Kontrollserum 1 <i>B. henselae</i> < 1:80	FITC- markierter anti-human IgG-AK
1F	Negativ- kontrolle	infizierte Zellkulturen	Kontrollserum 2 <i>B. henselae</i> < 1:80	FITC- markierter anti-human IgG-AK
1G	Positiv- kontrolle	infizierte Zellkulturen	Kontrollserum 3 <i>B. henselae</i> 1:5120	FITC- markierter anti-human IgG-AK
1H	Positiv- kontrolle	infizierte Zellkulturen	Kontrollserum 4 <i>B. henselae</i> 1:5120	FITC- markierter anti-human IgG-AK

Anmerkung: AK = Antikörper

Zusammenfassend war das Ziel, ein Protokoll zu entwickeln, welches es möglich macht, mit Beginn der Antigenherstellung im Hochdurchsatz innerhalb von vier Tagen Serumproben für die Fluoreszenzmikroskopie bereit zu stellen. Bei dem hier verwendeten hpIFT fand an Tag 1 die Zellkulturanzucht und -aussaat, an Tag 2 die Infektion, an Tag 3 die Fixierung mit Blockierung und an Tag 4 die Antikörper-Färbung statt.

2.2.2.8 Mikroskopie und Auswertung

Die mikroskopische Auswertung des hpIFT erfolgte bei 200-facher Vergrößerung unter dem invertierten Fluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE Ti (Nikon, Düsseldorf). Zur Visualisierung des an den Sekundärantikörper konjugierten FITC-

Markers wurde der Filterwürfel mit Bandpassfilter GFP-B von Nikon⁶⁰ mit einem Anregungsfilter von 470/40 nm und einem Sperrfilter von 535/45 nm gemäß Herstellerangaben verwendet (siehe **Abb. 5**).

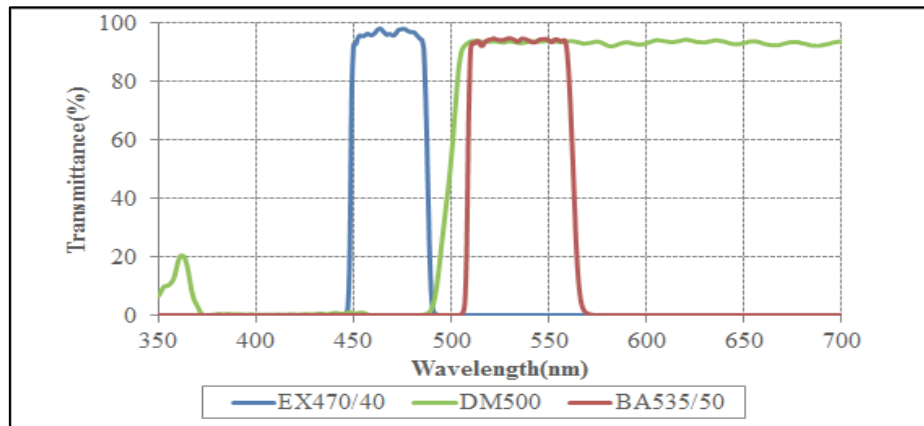


Abb. 5: Prozentuale Durchlässigkeit (Transmittance) von Lichtspektrum des Bandpassfilters GFP-B der Firma Nikon. In Blau die Wellenlängen die der Anregungsfilter passieren lässt und in Rot die, die der Sperrfilter passieren lässt. Übernommen aus⁵⁷.

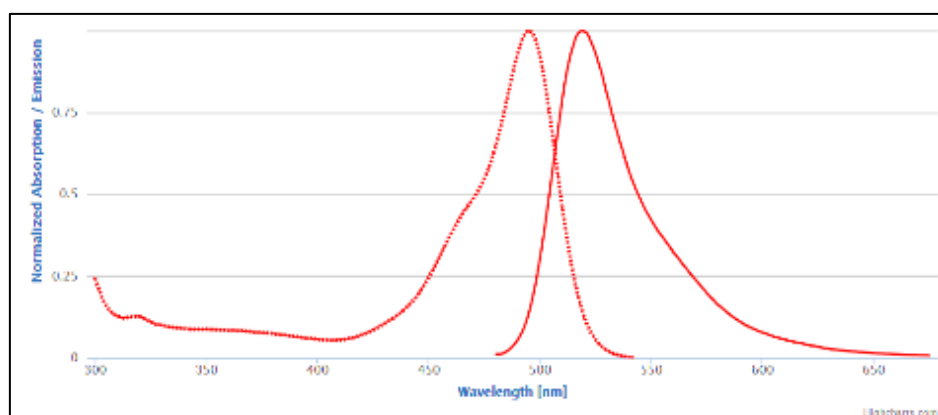


Abb. 6: Prozentuale Verteilung des Anregungs-(gestrichelte Linie) und Emissionsspektrums (durchgezogene Linie) des Fluoreszenzmarkers, FITC (Ziomek 1982). Übernommen aus⁵⁸.

Mit diesem Filter kann vom Anregungslicht nur ein 40 nm breites Spektrum an Wellenlängen den Anregungsfilter passieren und das Präparat treffen. Die Mitte dieses Spektrums liegt bei 470 nm, was somit bedeutet, dass ein Spektrum von 450 nm bis 490 nm Wellenlängen Licht auf die hier eingesetzten FITC-markierten Antikörper trifft (siehe **Abb. 6**).⁶¹ Entsprechend wird über den Sperrfilter von den fluoreszierenden Molekülen emittiertes Licht nur in den Wellenlängen zwischen

513 nm bis 557 nm für den Betrachter sichtbar. Die vom Hersteller angegebene Mitte dieses Lichtspektrums liegt hier bei 535 nm. Licht anderer Wellenlängen wird herausgefiltert.

Mit bis zu 490 nm (nur knapp unterhalb des idealen Anregungszustands von FITC) resultierte bei dem hier dargelegten Ansatz eine ausreichende Anregung zur Erzeugung eines Emissionslichts mit klaren, gut sichtbaren Darstellungen der Fluoreszenz für den Betrachter wie in **Abb. 7** deutlich erkennbar.

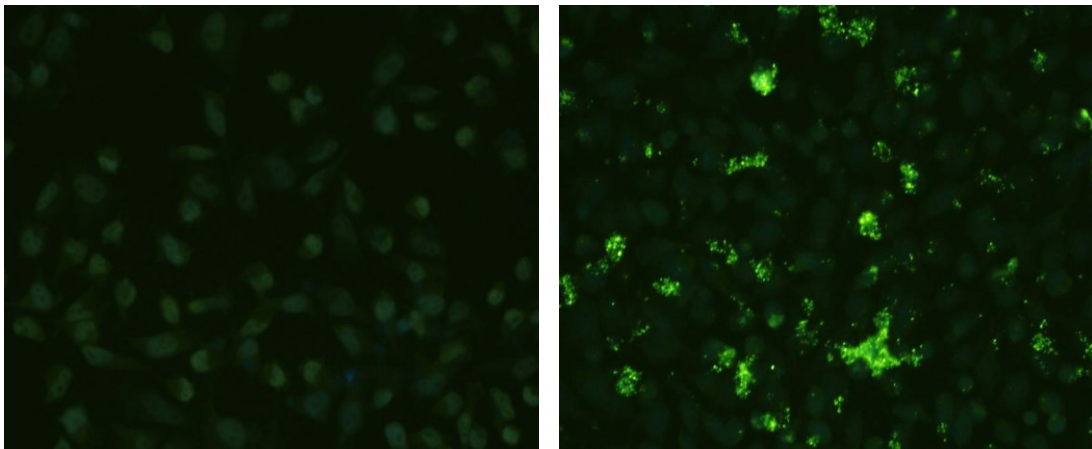


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von FITC-gefärbten HeLa 229-Zellen ohne (links) und mit Nachweis (rechts) von anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern. Serumverdünnung 1:320, 200-fache Vergrößerung.

Die mikroskopische Auswertung des hpIFT erfolgte ohne Verwendung einer Digitalkamera und stets mit Hilfe eines Bewertungsschemas in vorgegebener Reihenfolge, beginnend mit den Positiv- und Negativkontrollen in Spalte 1 von Well A bis H (vgl. **Tab. 13**), die auf jeder 96-Well-Platte als optische Referenz und gleichzeitig als Interpretationshilfe dienten. Auswertungen erfolgten verblindet nach dem Vier-Augen-Prinzip durch zwei unabhängige Personen (Wibke Ballhorn und David Villinger).

2.2.3 Statistik

Alle Untersuchungen im Rahmen der Validierung (Methodenvalidierung I und II, **Kap. 3.1.1**) wurden mindestens im Doppelansatz durchgeführt und ergaben vergleichbare Ergebnisse in der Bewertung.

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurde in dieser Arbeit Microsoft Excel verwendet.

Um für ein diagnostisches Testverfahren — im vorliegenden Fall der hpIFT — die Sensitivität und Spezifität zu bestimmen, bedarf es einer Vergleichsmethode, die als Goldstandard gewertet wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der objektträgerbasierte IFT von Euroimmun als Goldstandard festgelegt. Für das Konfidenzintervall wurde 95 % angelegt.

Darüber hinaus wurde zum Vergleich der Methoden des objektträgerbasierten IFT von Euroimmun und des hpIFT eine Konkordanzanalyse vorgenommen. Um die Urteilsübereinstimmung der beiden Methoden zu prüfen, wurde hierfür der sogenannte Cohens Kappa⁶² bestimmt. Hierbei wird letztlich die Differenz zwischen durch Zufall erwarteten und beobachteten Urteilsübereinstimmungen betrachtet. Eine Interpretation des Cohens Kappa ist nicht einheitlich. In der vorliegenden Studie wurde sich an die vorgeschlagene Bewertung nach Altman⁶³ gehalten.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des hpIFT

Um ein für den Hochdurchsatz effizientes diagnostisches Verfahren zu etablieren, wurde der hpIFT zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *B. henselae* im 96-Well-Platten-Format etabliert.

Gleichzeitiges Pipettieren aller 96 Wells, unter Verwendung des 96-Well-Pipettierrobers VIAFLO 96/384 während beinahe aller Reaktions-/Arbeitsschritte (siehe **Tab.12**), stellte sich im Hochdurchsatz als entscheidende effizienzsteigernde Komponente im Vergleich zum objektträgerbasierten indirekten IFT dar. Dabei gilt dies für die Zellkulturaussaat der HeLa 229-Zellen, die Infektion mit *B. henselae*, die Fixierung mit 3,75 % Paraformaldehyd (PFA), die Blockierung der Welloberflächen mittels 0,2 % BSA, die Permeabilisierung der Zellen durch Triton X-100, die Serumverdünnung auf 1:320, wie auch die anschließende Inkubation der Seren und Zugabe von Sekundärantikörpern (Details siehe **Kap. 2.2.2**).

Mit diesem Verfahren kann auch in großer Stückzahl innerhalb von nur vier Tagen Antigen für die mikroskopische Interpretation angefertigt werden (Tag 1: Zellkulturanzucht und -aussaat, Tag 2: Infektion, Tag 3: Fixierung und Blockierung, Tag 4: Antikörper-Färbung; siehe **Kap.2.2.2.7**)

Ein 96-Well-Format ermöglichte außerdem eine unkomplizierte schnelle Durchsicht einzelner Wells bei der visuellen Ergebnisinterpretation mittels Fluoreszenzmikroskopie ohne Wechsel einzelner Objektträger.

3.1.1 Methodenvalidierung

Um zu prüfen, inwieweit die hier etablierte hpIFT-Methode mit in der Routine etablierten Verfahren bei der Bestimmung von Antikörpertitern übereinstimmt, wurden die Ergebnisse der anti-*B. henselae* IgG-Bestimmung von insgesamt 20 zufällig ausgewählten, mit dem hpIFT als positiv bzw. als negativ gewerteten Blutspendeseren mit dem objektträgerbasierten IFT von Euroimmun verglichen. Zusätzlich wurden mit beiden Methoden je zwei Seren ohne, zwei Seren mit moderat-positivem und zwei Seren mit hoch-positivem bekanntem IgG-

Antikörpernachweis gegen *B. henselae* aus der Serumbank des Referenzlabors für Bartonellen abgeglichen (siehe **Kap. 2.1.8, Tab. 10**).

Dafür wurden alle Seren über acht Verdünnungsstufen, beginnend mit einer Verdünnung von 1:80 bis 1:20.480 austitriert, mit beiden Methoden (dem hpIFT und dem Euroimmun IFT) gefärbt und durch geschultes Personal verblindet im Vier-Augen-Prinzip mikroskopiert (siehe **Abb. 8** und **Abb. 9**). Als Antigen für den hpIFT wurde der *B. henselae* Houston-1 RSE 247 (BadA)-Stamm gewählt (Auswahlbegründung siehe auch **Kap. 3.1.4**).

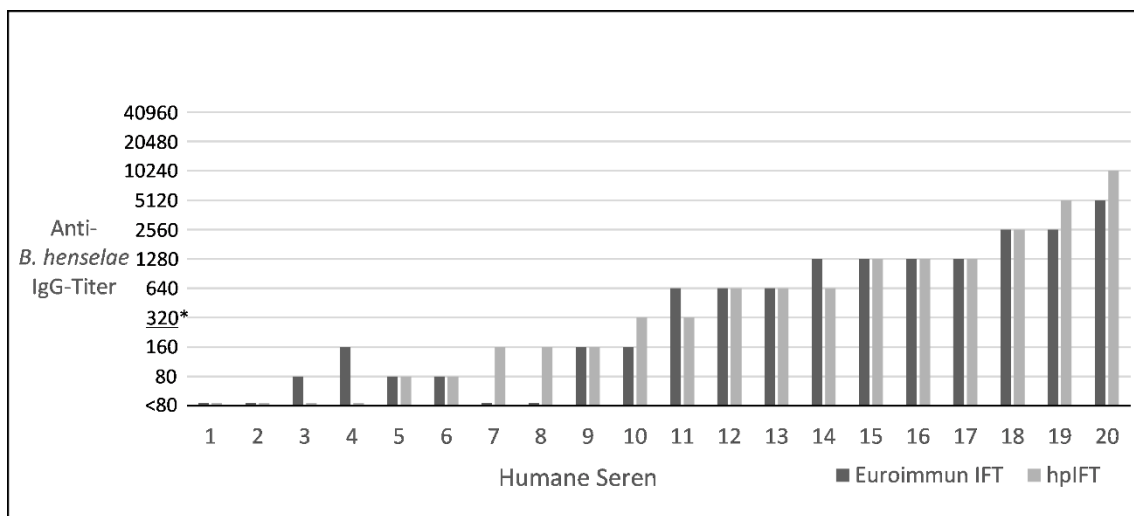


Abb. 8a: Methodvalidierung I des hpIFT (Blutspendeseren). Vergleich der anti-*B. henselae* IgG-Titer des neu etablierten hpIFT mit dem objektträgerbasierten IFT von Euroimmun. Es wurden 20 verschiedene, zufällig ausgewählte, im hpIFT positiv und negativ bestimmte humane Seren von Blutspenderinnen und Blutspendern mit jeweils beiden Methoden vollständig austitriert; *cut-off-Titer ≥ 320 .

Es wurde hierbei gezeigt, dass bei den verwendeten Blutspendeseren oberhalb eines Titers von 1:160 nicht mehr als eine Titerstufe Unterschied in den Ergebnissen der beiden Methoden auftrat. Lediglich die Seren der #4, #7 und #8 in **Abb. 8a** zeigten einen Unterschied von zwei messbaren Stufen im Bereich bis zu einem Titer von 1:160.

Dargestellt als Bland Altman Regression⁶³ ergibt sich dazu folgende Darstellung, siehe **Abb. 8b**. Mit einer derartigen Darstellung kann das Ausmaß der

Messschwankungsbreite der beiden Methoden sichtbar gemacht werden. Darüber hinaus wird deutlich, ob ein systemischer Fehler in einer der Messmethoden vorliegt, d.h. ob eine Methode prinzipiell größere oder kleinere Werte misst. Außerdem wird festgestellt, ob eine Streuung von der Größe der Messwerte abhängt.

In **Abb. 8b** ist zu sehen, dass eine sehr geringe Abweichung zwischen den beiden Methoden besteht. Ein systemisches Abweichen lässt sich nicht ausmachen, da keine der beiden Methode prinzipiell größere Werte misst. Lediglich im niedrigen Titer Bereich findet man Werte (als Punkte dargestellt), die außerhalb der oberen und unteren Referenzlinie ($\pm 1,96$ der Standardabweichung, bei „1“ auf der X-Achse) liegen. Dies ergibt sich aus den (oben erwähnten, **Abb. 8a**) Differenzen mit zwei Titerstufen bei den Messungen im Titer Bereich 1:160 (Seren #4, #7, #8).

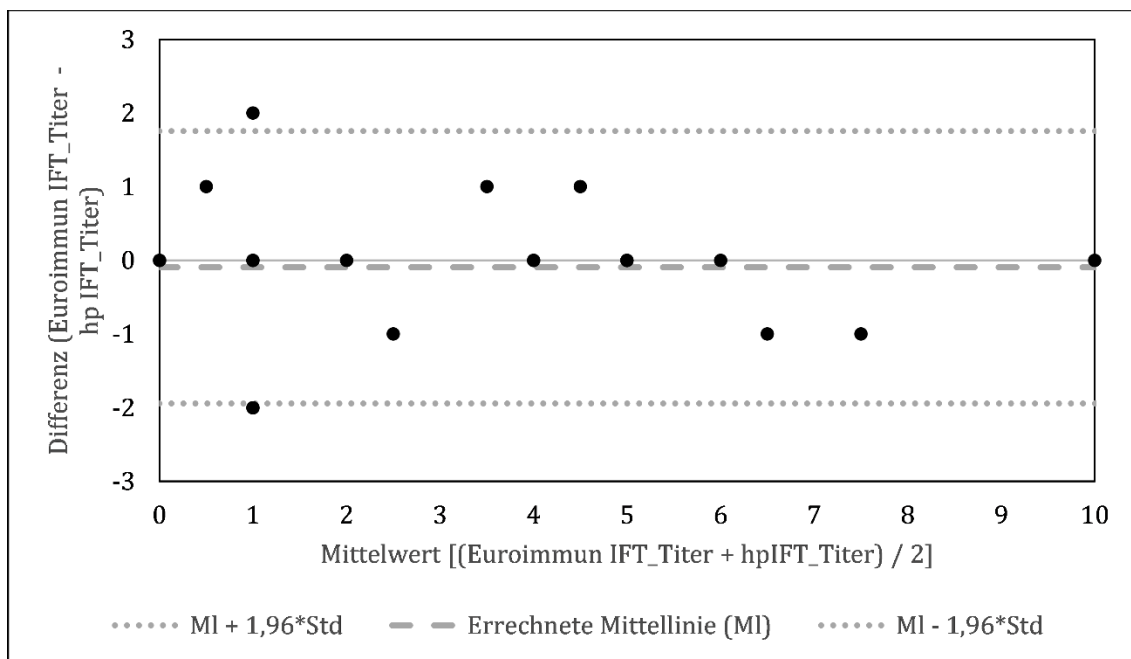


Abb. 8b: Bland Altman Regression zum Vergleich der Messschwankungsbreite beider Methoden. Daten entnommen aus „Methodenvalidierung I des hpIFT (Blutspendeseren)“, **Abb. 8a**. In der x-Achse ist der Mittelwert der Titer in Stufen aufgetragen. D.h. 0 = „< 1:80“, 1 = „1:80“, 2 = „1:160“ usw. Beispielsweise ergibt sich der x-Wert „1“ für das Serum #4 (Abb. 7.a) aus „Euroimmun IFT = 1:160“, also 2 (Titerstufe), plus „hpIFT = < 1:80“, also 0, geteilt durch 2. Somit ist $x = 1$. Die y-Achse bildet die Titerstufen-Differenzen der Methoden (Euroimmun und hpIFT) ab. Der y-Wert für das Serum #4 ergibt sich aus: „Euroimmun IFT = 1:160“, also 2, minus „hpIFT = < 1:80“, also 0. Somit ist $y = 2$. Gestrichelt = errechnete Mittellinie; gepunktet = obere und untere Referenzlinie ($\pm 1,96$ der *Std = Standardabweichung).

Durch Verwendung der Referenzseren aus der Konsiliarlabor-Serenbank (siehe **Kap. 2.1.8**) wurde in **Abb. 9** gezeigt, dass beide im Euroimmun IFT mit einem Titer von $< 1:320$ getesteten Seren auch im hpIFT $< 1:320$ getestet wurden. Weiterhin wurden alle vier im Euroimmun IFT $\geq 1:320$ getesteten Seren mit dem hpIFT in diesem Bereich bestätigt. Allerdings fällt auf, dass bei Serum #2 — ähnlich wie bei den Blutspendeseren #4, #7 und #8, in **Abb. 8a** — ein Unterschied von zwei messbaren Stufen im Bereich bis zu einem Titer von 1:160 im Vergleich der beiden Methoden gemessen wurde. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich beim hpIFT im moderat-positiven und hoch-positiven Bereich bei Serumprobe #3 und #6. Trotz einer Messung von vier bzw. fünf Titerstufen unterhalb der Ergebnisse des Euroimmun IFT, liegen diese Proben oberhalb des *cut-off*-Titers.

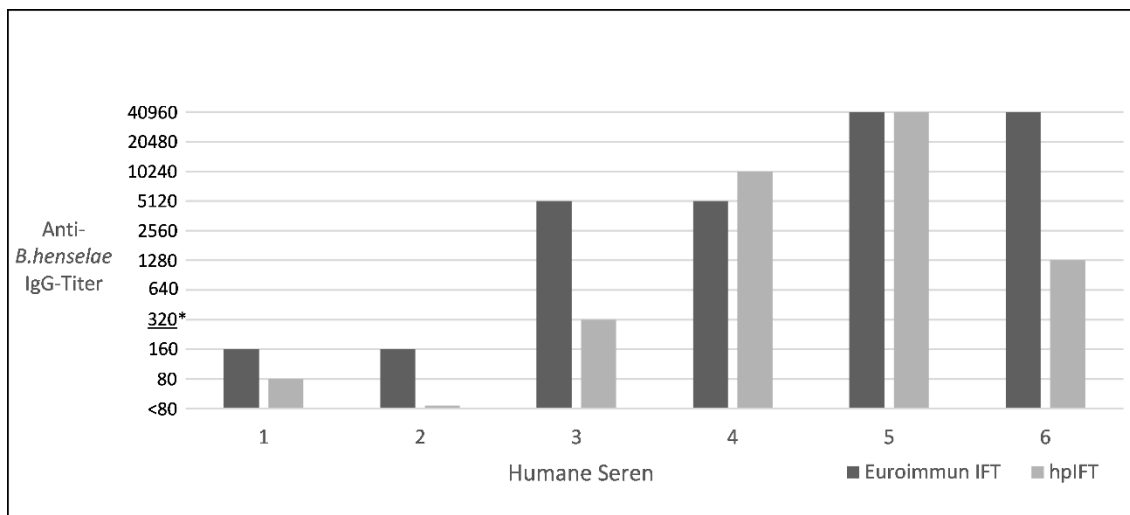


Abb. 9: Methodvalidierung II des hpIFT (Referenzseren). Vergleich IgG-Titern des hpIFT mit dem objektträgerbasierten IFT von Euroimmun. Es wurden sechs verschiedene Seren aus der Serenbank des Referenzlaboratoriums für Bartonellen mit jeweils beiden Methoden vollständig ausstitriert; **cut-off*-Titer ≥ 320 .

3.1.2 Evaluation der Titer-Grenzwerte

Aufgrund der Tatsache, dass kein positives serologisches Ergebnis (*cut-off*-Titer nach CDC: $\geq 1:320$) in der Methodvalidierung des hpIFT (siehe **Kap. 3.1**) verpasst wurde und der Test ein positives Ergebnis damit eindeutig anzeigt, wurde die Titerstufe $\geq 1:320$ als alleinige Serumverdünnung für den hpIFT festgelegt.^{57,64}

Antikörpertiter < 1:320 (also: < 1:80, 1:80, 1:160) wurden von dem in dieser Studie angewandten hpIFT somit nicht differenziert und demnach einheitlich als negativ bewertet. Im Euroimmun IFT ist der *cut-off*-Titer in den Herstellerangaben konform zu den CDC-Vorgaben^{57,64} ebenso bei $\geq 1:320$ angesetzt. Aus **Abb. 8a** und **Abb. 9** wird ersichtlich, dass mit dieser Bewertung alle von Euroimmun IFT als positiv interpretierten Proben auch mit dem hpIFT als positiv interpretiert wurden. Bei den vom Euroimmun IFT negativ interpretierten Proben verhält es sich mit einer Ausnahme ebenso.

Diese Ausnahme bildet Serum #10 (**Abb. 8a**), welches im hpIFT mit 1:320 als positiv, beim Euroimmun IFT mit 1:160 allerdings nicht als positiv interpretiert wurde. Hier liegt jedoch nur eine Titerstufe zwischen den Ergebnissen der beiden Testverfahren.

3.1.3 Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Zur Sicherung von Qualitätsstandards und zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden Referenzkontrollen in jeden Lauf des hpIFT integriert (siehe **Tab. 13, Kap. 2.2.2.7**). Es handelte sich dabei um folgende Kontrollen. Ein Well diente als Negativkontrolle (HeLa 229-Zellen, infiziert, keine Antikörperzugabe). Ein weiteres Well (HeLa 229-Zellen, infiziert) wurde mit anti-*B. henselae* (rabbit) und dem Alexa-Fluor 488-markierten anti-rabbit IgG-Antikörper (goat) inkubiert und diente damit als technische Positivkontrolle. Um zu prüfen, ob humane und Kaninchenantikörper spezifisch reagierten, wurden je zwei Negativkontrollen mit humanen und Kaninchen-Sekundärantikörpern ohne Primärantikörper inkubiert (HeLa 229-Zellen, infiziert, nur Sekundärantikörper). Jeweils zwei weitere Wells wurden mit positiv und negativ getesteten Seren aus der Serumbank des UKF bestückt. Diese dienten als weitere Positiv- und Negativkontrollen (HeLa 229-Zellen, infiziert, positiv bzw. negativ getestete humane Seren, Sekundärantikörperzugabe).

Tab. 14: Reproduzierbarkeit der Positiv- und Negativkontrollen (siehe Details zu den Kontrollen Tab. 13)

Well Position	Kontrolle für	Testläufe	Davon richtig positiv/negativ	Reproduzierbarkeit
1A	Negativkontrolle	n = 60	n = 60	100 %
1B	Sekundär-AK-Negativkontrolle (anti-human)	n = 60	n = 60	100 %
1C	Sekundär-AK Negativkontrolle (anti-rabbit)	n = 60	n = 60	100 %
1D	Positivkontrolle	n = 60	n = 60	100 %
1E	Negativkontrolle	n = 60	n = 60	100 %
1F	Negativkontrolle	n = 60	n = 60	100 %
1G	Positivkontrolle	n = 60	n = 60	100 %
1H	Positivkontrolle	n = 60	n = 60	100 %

Auf 60 unterschiedlichen 96-Well-Platten des hpIFT konnten im Vier-Augen-Prinzip alle fünf Negativkontrollen und drei Positivkontrollen ausnahmslos reproduziert werden. Dies belegt, dass der Test jederzeit und in jedem Lauf mit allen hier eingesetzten jeweils acht Positiv- und Negativkontrollen korrekt reagierte, was eine hohe Reproduzierbarkeit der ermittelten Serum-Titer nahelegt (siehe **Tab. 14**).

3.1.4 Seroreaktivität unterschiedlicher *B. henselae*- und *B. quintana*-Stämme

Der hpIFT wurde mit dem Ziel erstellt, Antikörper der Klasse IgG gegen Stämme des Bakteriums *B. henselae*⁶⁵ im humanen Serum zu detektieren. Es stellte sich die Frage, ob innerhalb der Spezies *B. henselae* der Einsatz verschiedener Erregerisolate unterschiedliche Seroreaktivitäten in dem hier dargestellten serologischen Testverfahren bedingen könnte.

Um die Spezifität der hpIFT-Methode zu prüfen, wurde daher der Versuchsaufbau aus der Testevaluierung (siehe **Kap. 3.1.1** und **Abb. 8a**) mit 20 getesteten Blutspendeseren mit sechs unterschiedlichen Antigenen, aber ansonsten gleichbleibenden Bedingungen wiederholt.

Als Antigene wurden sowohl die zwei humanpathogenen *B. henselae*-Stämme Houston-1 MFE 341 (BadA⁺) und Marseille (BadA⁺), sowie jeweils deren BadA defiziente homologe Stämme Houston-1 RSE247 (BadA⁻) und Marseille (BadA⁻), als auch der humanpathogene *B. quintana*-Stamm JK31 (Vomp⁺) mit der korrespondierenden *B. quintana*-Variante 2D70(Vomp⁻) verwendet.

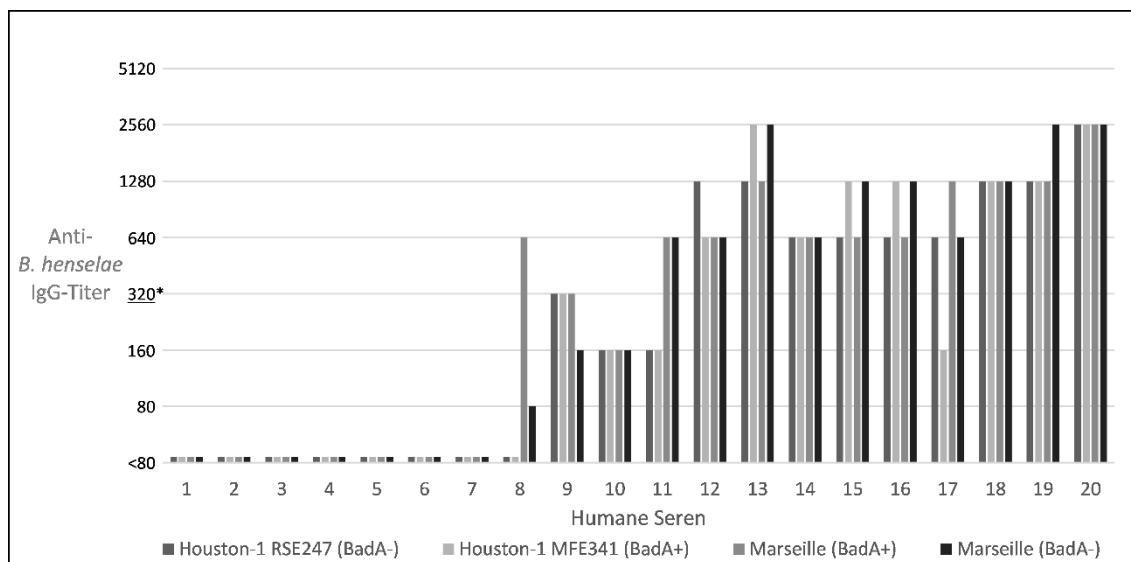


Abb. 10a: Seroreaktivität unterschiedlicher *B. henselae*-Stämme. Es wurden 20 verschiedene Blutspendeseren unter der Verwendung unterschiedlicher Bartonellen-Stämme als Antigen [*B. henselae* Houston-1 RSE 247 (BadA⁻), Marseille (BadA⁺), Houston-1-MFE34 (BadA⁺) und Marseille (BadA⁻)] vollständig austitriert; *cut-off-Titer ≥ 320 .

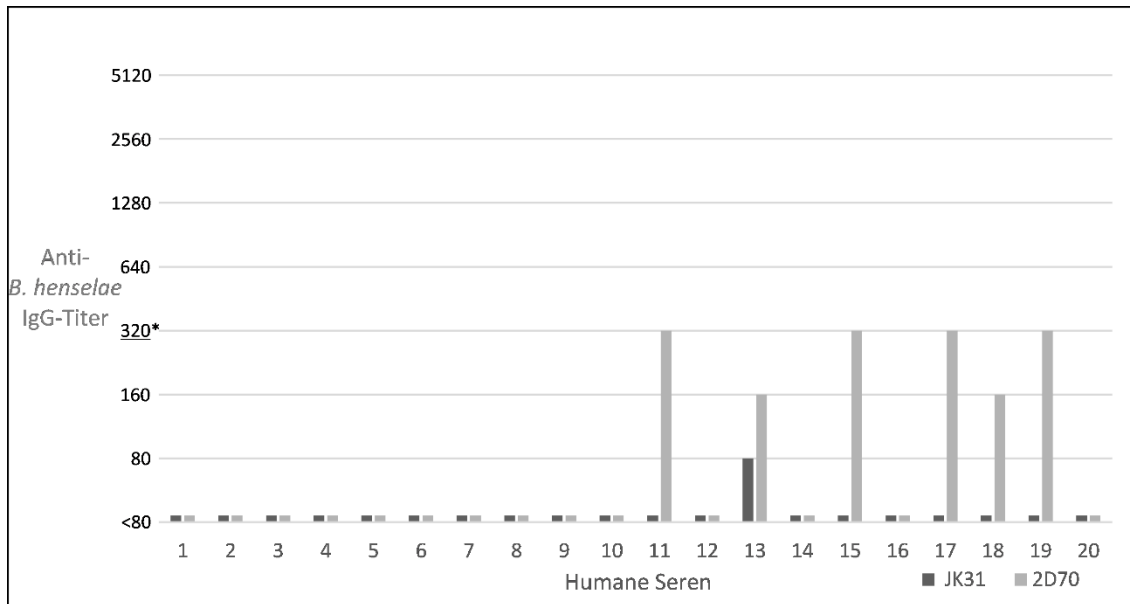


Abb. 10b: Seroreaktivität unterschiedlicher *B. quintana*-Stämme. Es wurden 20 verschiedene Blutspendeseren unter der Verwendung unterschiedlicher Bartonellen-Stämme als Antigen [*B. quintana* JK31 (Vomp⁺) und *B. quintana* 2D70(Vomp⁻)] vollständig austitriert; *cut-off-Titer ≥ 320 .

Die Unterschiede innerhalb der vier *B. henselae*-Stämme (siehe **Abb. 10a**) fielen minimal aus (nur in zwei Fällen um mehr als eine Titerstufe.). Lediglich bei Serum #8 erfolgte bei Einsatz des Stammes Marseille (BadA⁺) ein drei bzw. vier Titerstufen höheres Ergebnis sowie bei Verwendung von Houston-1 MFE341 (BadA⁺) zeigte sich bei Serum #17 ein zwei bzw. drei Titerstufen niedrigeres Ergebnis im Vergleich zum Einsatz der anderen drei Stämme als Antigen. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte der Stamm Houston-1 RSE 247 (BadA⁻) subjektiv eine etwas deutlichere Reaktivität („Leuchtkraft“) im Vergleich zu den anderen Stämmen. Die Ergebnisse, die unter Einsatz der *B. quintana*-Stämme produziert wurden, lagen alle entweder bei $< 1:80$ oder zeigten deutlich geringere Titerstufen als dies bei der Verwendung von Stämmen aus der *B. henselae*-Gruppe der Fall war (siehe **Abb. 10b**). Die Daten belegen, dass das System des hpIFT zum Nachweis von *B. henselae* IgG-Antikörpern keine wesentlichen Unterschiede bei Einsatz verschiedener Isolate aufweist.

3.1.5 Überprüfung der Kreuzreaktivität des eingesetzten *B. henselae*-Antigens mit fremdreaktiven Humanseren

Menschliches Serum beinhaltet naturgemäß einen Pool verschiedener Immunglobuline. Es ist anzunehmen, dass Kreuzreaktionen mit diesen Antikörpern besonders dann entstehen können, wenn der Körper einem bestimmten Pathogen ausgesetzt ist oder war, der dem Genus *Bartonella* nah verwandt ist („Antigen-Mimikry“). Um zu prüfen, ob messbare Titer an kreuzreagierenden Antikörpern die Ergebnisse des hpIFT beeinflussen könnten, wurden HeLa 229-Zellen wie beschrieben mit den verschiedenen bereits zuvor eingesetzten *Bartonella* spp.-Stämmen (siehe **Kap. 3.1.4**) infiziert und mit Seren der Serenbank des Referenzlaboratoriums bei Nachweis von Antikörpern gegen *B. quintana*, *Leptospira* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Treponema pallidum*, *Brucella* spp., *Rickettsia typhi*, *Epstein-Barr-Virus* und *Mycoplasma pneumoniae* hinsichtlich Kreuzreaktivität analysiert.

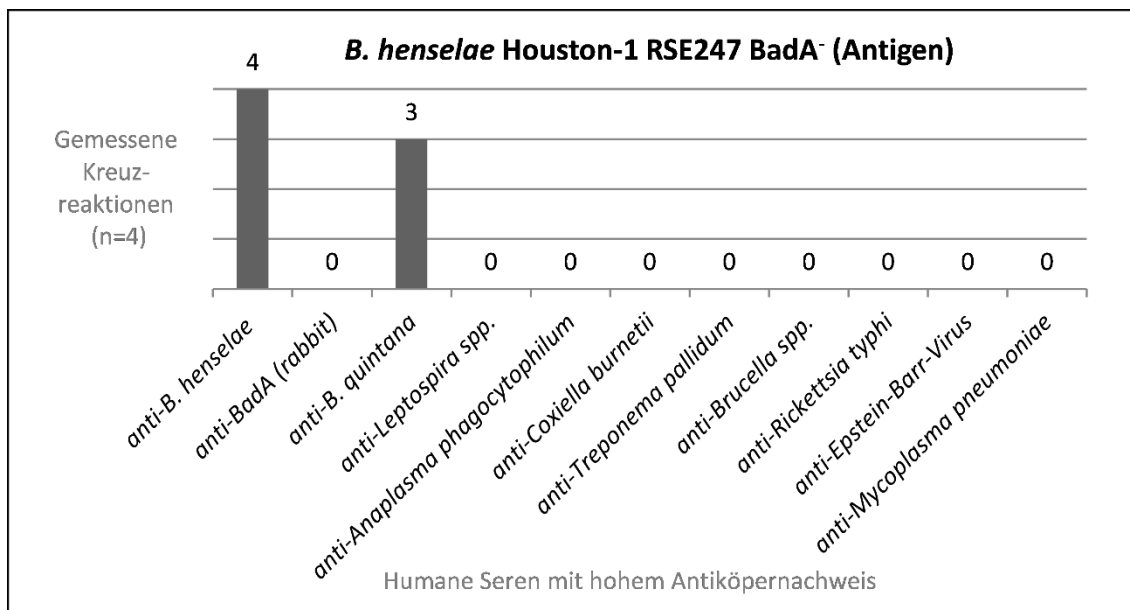


Abb. 11: Prüfung der Kreuzreaktivität des hpIFT bei Verwendung von *B. henselae* Houston-1 RSE247 BadA⁻ als Antigen-Stamm. Anzahl gemessener Kreuzreaktionen (y-Achse) bei jeweils vier getesteten Seren mit nachgewiesenen Antikörpern gegenüber der in der x-Achse angegebenen Pathogenen. Eingesetzt wurden Seren mit dem Nachweis folgender Antikörper: anti-*B. henselae* IgG (n = 4), anti-BadA IgG (rabbit) (n = 4), anti-*B. quintana* IgG (n = 4), anti-*Leptospira* spp. IgG (n = 4), anti-*Anaplasma phagocytophilum* IgG (n = 4), anti-*Coxiella burnetii* IgG (n = 4), anti-*Treponema pallidum* IgG (n = 4), anti-*Brucella* spp. IgG (n = 4), anti-*Rickettsia typhi* IgG (n = 4), anti-*Epstein-Barr Virus* IgG (n = 4), anti-*Mycoplasma pneumoniae* IgG (n = 4).

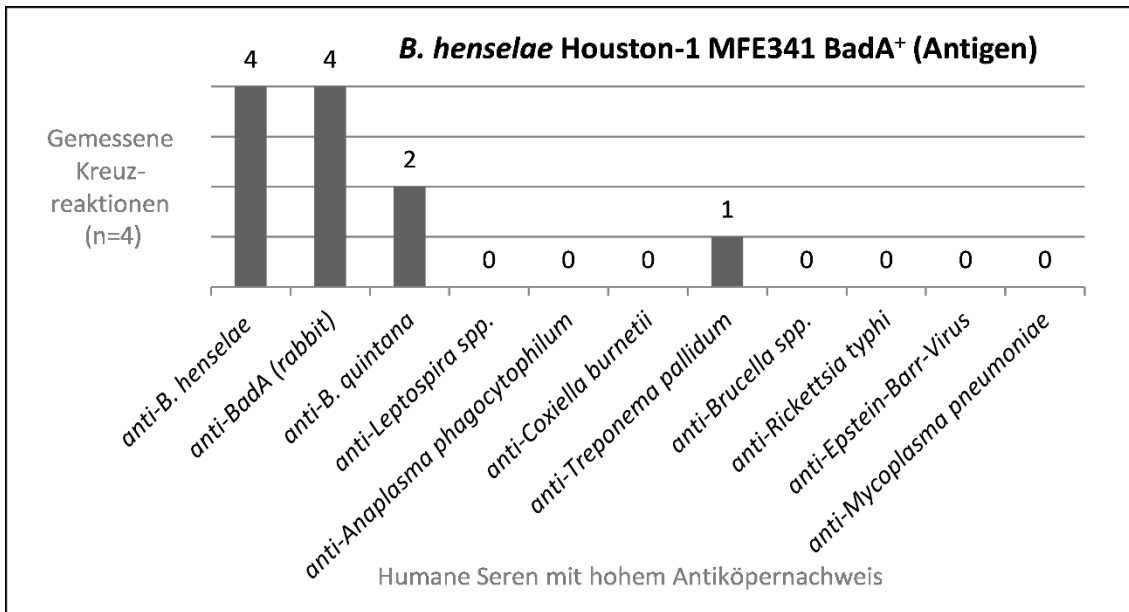


Abb. 12: Prüfung der Kreuzreaktivität des hpIFT bei Verwendung von *B. henselae* Houston-1 MFE341 BadA⁺ als Antigen-Stamm. Anzahl gemessener Kreuzreaktionen (y-Achse) bei jeweils vier getesteten Seren mit nachgewiesenen Antikörpern gegenüber der in der x-Achse angegebenen Pathogenen. Eingesetzt wurden Seren wie in **Abb. 11** angegeben.

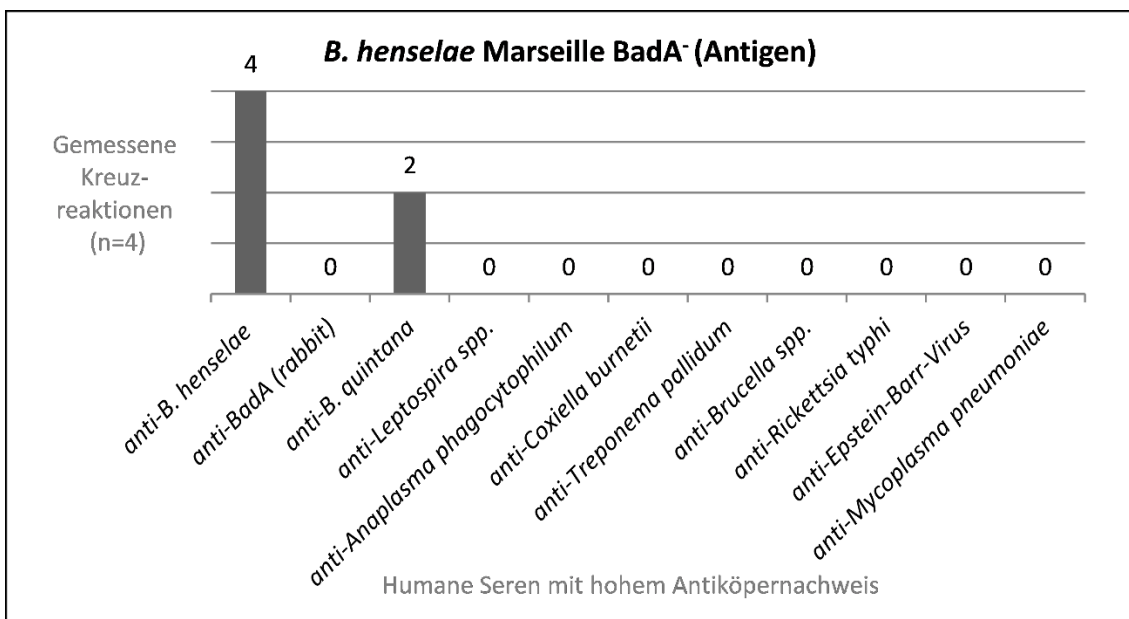


Abb. 13: Prüfung der Kreuzreaktivität des hpIFT bei Verwendung von *B. henselae* Marseille BadA⁻ als Antigen-Stamm. Anzahl gemessener Kreuzreaktionen (y-Achse) bei jeweils vier getesteten Seren mit nachgewiesenen Antikörpern gegenüber der in der x-Achse angegebenen Pathogenen. Eingesetzt wurden Seren wie in **Abb. 11** angegeben.

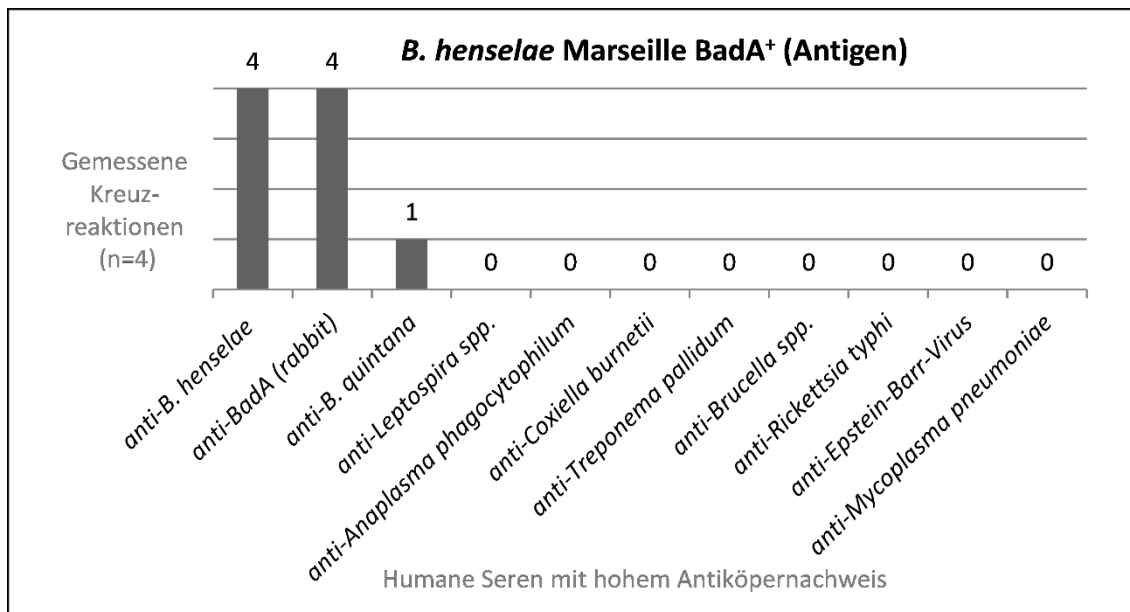


Abb. 14: Prüfung der Kreuzreaktivität des hpIFT bei Verwendung von *B. henselae* Marseille BadA⁺ als Antigen-Stamm. Anzahl gemessener Kreuzreaktionen (y-Achse) bei jeweils vier getesteten Seren mit nachgewiesenen Antikörpern gegenüber der in der x-Achse angegebenen Pathogenen. Eingesetzt wurden Seren wie in **Abb. 11** angegeben.

In **Abb. 11** bis **14** (Antigen hergestellt aus *B. henselae*-Stämmen) konnte gezeigt werden, dass alle Positivkontrollen für *B. henselae* im hpIFT positiv waren. Auch die Verwendung von anti-*B. henselae* BadA (rabbit) IgG-Antikörper als weitere Kontrolle zeigte nur bei Antigenen mit Stämmen, bei denen BadA auch exprimiert wird, eine positive Reaktion.

Gezeigt werden konnte weiter, dass bei den mit *B. henselae* als Antigen verwendeten hpIFT bei Seren mit hohen Titern gegen *B. quintana* in zwei von vier Fällen Kreuzreaktionen auftraten.

Außerdem zeigte eine von vier Serumproben mit bekannten Antikörpern gegen *Treponema pallidum* eine Reaktion bei der Verwendung von *B. henselae* Houston-1 RSE 247 Wildtyp (BadA⁻) als Antigen. Bei den anderen Antigenen zeigten die Anti-*Treponema pallidum* positiven Seren keine Reaktionen.

Darüber hinaus erzeugten Seren mit hohen Antikörpertitern gegen *Anaplasma phagocytophilum*, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Rickettsia typhi*, *Mycoplasma pneumoniae* und *Epstein-Barr-Virus* bei keinem der verwendeten Antigene positive Ergebnisse.

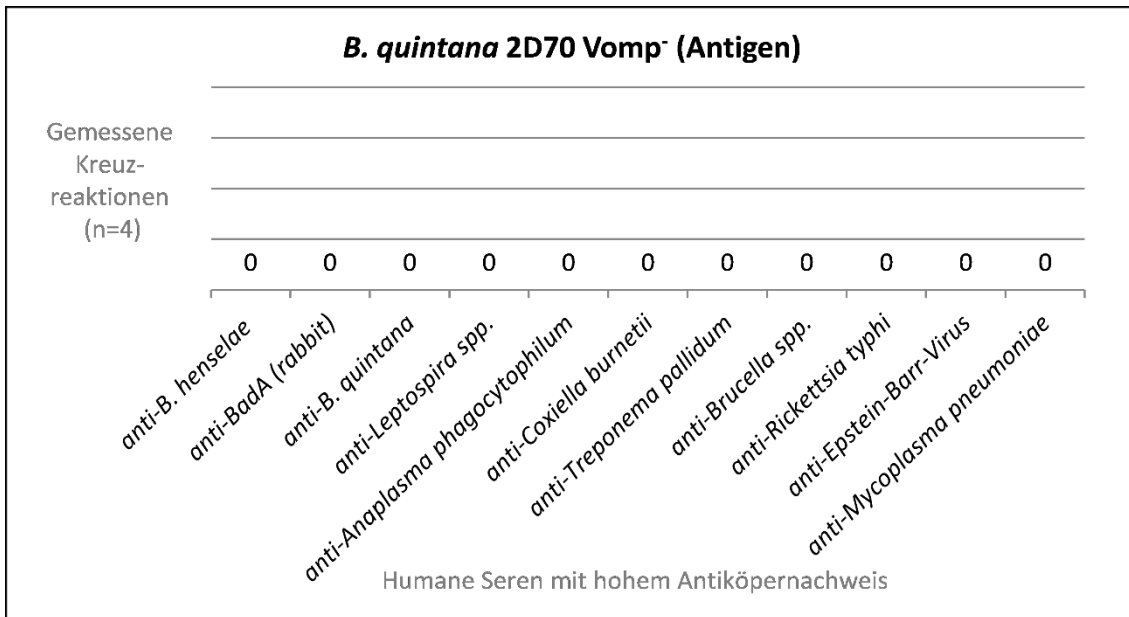


Abb. 15: Prüfung der Kreuzreaktivität des hpIFT bei Verwendung von *B. quintana* 2D70 Vomp⁻ als Antigen-Stamm. Anzahl gemessener Kreuzreaktionen (y-Achse) bei jeweils vier getesteten Seren mit nachgewiesenen Antikörpern gegenüber der in der x-Achse angegebenen Pathogenen. Eingesetzt wurden Seren wie in **Abb. 11** angegeben.

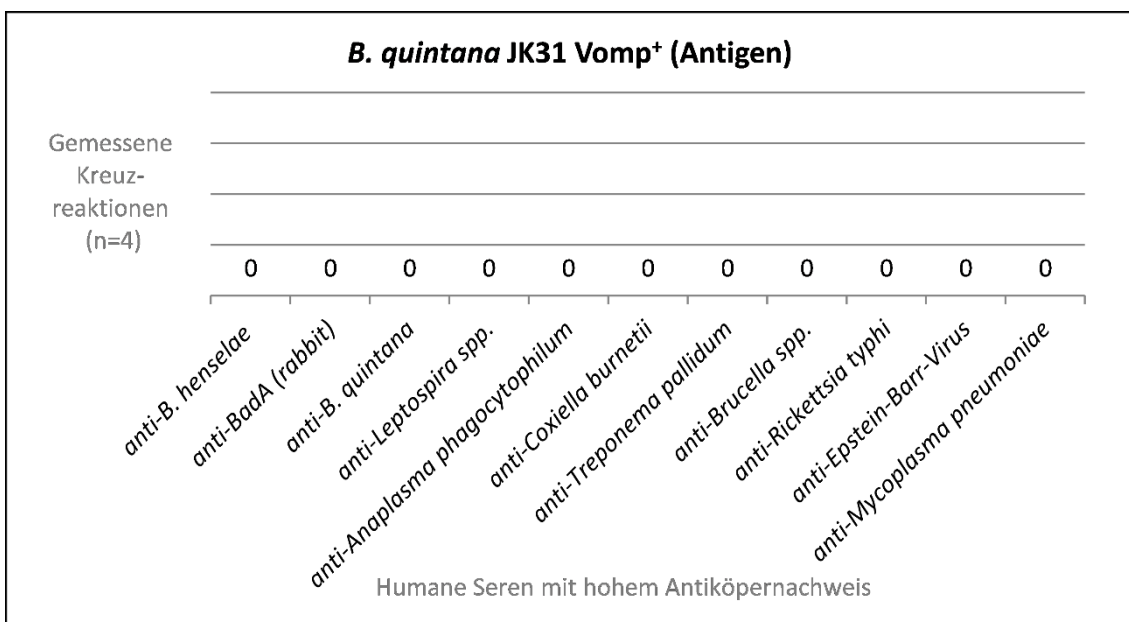


Abb. 16: Prüfung der Kreuzreaktivität des hpIFT bei Verwendung von *B. quintana* JK31 Vomp⁺ als Antigen-Stamm. Anzahl gemessener Kreuzreaktionen (y-Achse) bei jeweils vier getesteten Seren mit nachgewiesenen Antikörpern gegenüber der in der x-Achse angegebenen Pathogenen. Eingesetzt wurden Seren wie in **Abb. 11** angegeben.

Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen zu Kreuzreaktivität mit Antigen hergestellt aus *B. quintana*-Stämmen sind in **Abb. 15 und 16** abgebildet.

Erstaunlicherweise zeigte sich bei Verwendung von *B. quintana* als Antigen keinerlei positive Reaktion bei Einsatz aller o.g. Seren. darunter auch Seren mit bekannt hohem Anteil an Antikörpern gegen *B. quintana*.

3.1.6 Vergleich der Performance des hpIFT versus des konventionellen Immunfluoreszenztests

Nach der Methodenvalidation mit jeweils zehn positiven und zehn negativen Seren (siehe **Kap. 3.1.1**) stellte sich die Frage, wie sich der hpIFT im Vergleich zum objektträgerbasierten IFT von Euroimmun bei einer größeren Anzahl an Vergleichsproben verhielt. Um Sensitivität und Spezifität des hpIFT zum Nachweis von anti-*B. henselae* IgG im Vergleich zum Euroimmun IFT zu prüfen, wurden 238 Seren zufällig ausgewählt, wobei bei der Auswahl darauf geachtet wurde, dass mindestens drei Proben von jeder der 60 getesteten 96-Well-Platten der hier beschriebenen Blutspendeseren Studie ausgewählt wurden (siehe **Tab. 15**).

Tab. 15: Performance des hpIFT im Vergleich zum Euroimmun IFT bei einem *cut-off*-Titer von $\geq 1:320$ basierend auf dem Vergleich von 238 Blutspendeseren

Methode	<i>cut-off</i>	Sens (%)	95 % CI	Spez (%)	95 % KI	PPV	NPV
hpIFT	positiv	86,2	0,79 - 0,91	80,6	0,72-0,87	79.0	87.4

Euro = Euroimmun; *CI* = Konfidenzintervall; *+PPV* = positiver prädiktiver Wert; *-NPV* = negativer prädiktiver Wert; *Sens* = Sensitivität; *Spez* = Spezifität

Bei der Annahme, dass der Euroimmun IFT eine Sensitivität und Spezifität von je 100 % besitzen würde, konnte für den hpIFT eine Sensitivität von 86,2 % (95 %-Konfidenzintervall = 0,79 - 0,91) und eine Spezifität von 80,6 % (95 %-Konfidenzintervall = 0,73 - 0,87) ermittelt werden. Der positive prädiktive Wert lag bei 79,0 %, der negative prädiktive Wert lag bei 87,4 %.

Zur Abschätzung der Konkordanz, also der Frage ob beide Methoden übereinstimmende Beurteilungen bzw. Messergebnisse erzeugen, wurde der Cohens Kappa⁶² statistisch mittels Microsoft Excel aus den Ergebnissen der 238

Seren (siehe auch **Tab.15**) des hpIFT und des Euroimmun IFT errechnet. Dabei ergab sich als Cohens Kappa ein Wert von 0,46. Nach der Interpretation von Altman⁶³ stellt dies einen moderaten Wert dar. Ein Cohens Kappa von 1 würde eine 100 % Übereinstimmung bedeuten und ein Cohens Kappa von 0 entspräche einer zufällig erwartbaren Übereinstimmung der Ergebnisse des hpIFT und des Euroimmun IFT. Die Methoden decken sich bei einem Wert von 0,46 also moderat gut in ihrer Urteilsübereinstimmung, oder anders ausgedrückt, ihrer Objektivität.

3.2 Ergebnisse der hpIFT-Analyse zum Nachweis von anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern in Blutspendeseren

In der vorliegenden Studie wurden schließlich 5.215 Seren gesunder Blutspenderinnen und Blutspender mit der hier beschriebenen hpIFT-Methode auf die Prävalenz von anti-*B. henselae* IgG-Antikörper gescreent.

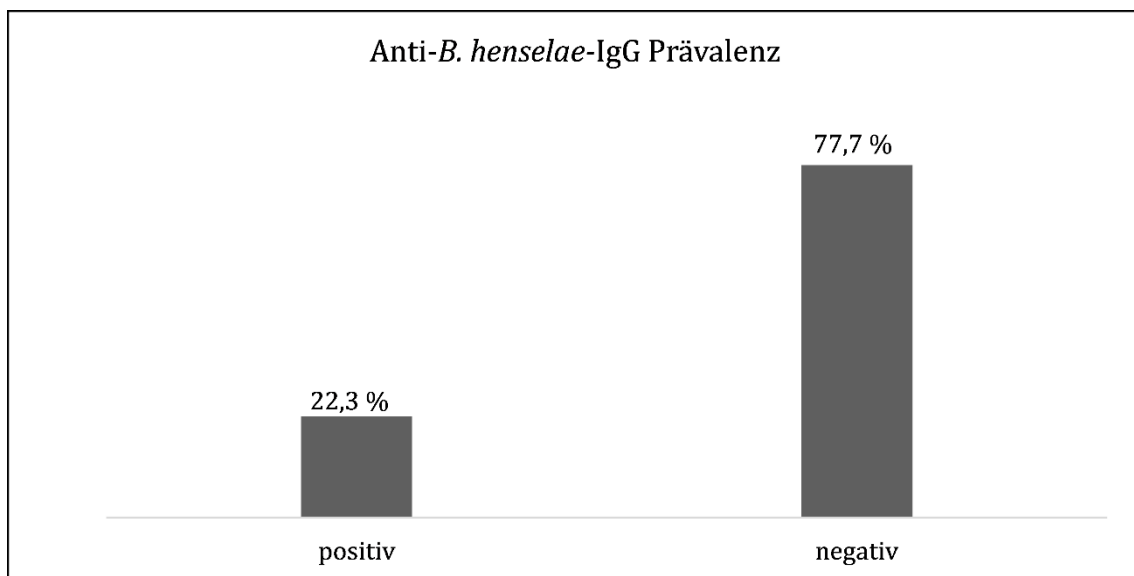


Abb. 17: Seroprävalenz von anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern in einem Blutspenderkollektiv. Nachweise bei 5.215 Blutspendeseren mittels hpIFT.

Die mikroskopische Bewertung der Proben erfolgte im Vier-Augen-Prinzip. Alle mitgeführten Kontrollen lieferten die erwarteten Ergebnisse. Folgende Kontrollen wurden in die ersten acht Wells (1A-1H) eingesetzt: 1A = Negativkontrolle ohne Antikörperinfektion, 1B = Sekundär-Antikörper Negativkontrolle (FITC-goat anti-

human IgG), 1C = Sekundär-Antikörper Negativkontrolle (Alexa-488-goat anti-rabbit IgG), 1D = „technische“ Positivkontrolle, sowie je zwei weitere Negativ(1E,1F)- und Positiv(1G,1H)-kontrollen bekannter Seren; siehe auch **Tab. 13** und **Kap. 3.1.3**.

Die Auswertung ergab bei 22,3 % der Seren (1.163 Seren, 95 %-Konfidenzintervall = 21,19 % bis 23,45 %) einen IgG-Nachweis (Titern $\geq 1:320$) und somit eine Bewertung als positiv. Demgegenüber wurden 77,7 % der Seren (4.053 Seren, 95 %-Konfidenzintervall = 76,57 % bis 78,83 %) als negativ identifiziert (Titer $< 1:320$).

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (I) der modifizierte hpIFT mit beinahe gleichwertiger Sensitivität und Spezifität verglichen mit einer konventionellen IFT Untersuchungsmethode bei umfangreichen Probenmengen ein ökonomisches, einfach zu bedienendes, zuverlässiges und präzises Verfahren zur Detektion von *B. henselae* IgG-Antikörper in humanen Seren darstellt und (II), dass die ermittelte anti-*B. henselae* IgG-Prävalenz von 22,3 % unter 5.215 Blutspenderinnen und Blutspendern verglichen mit weltweit publizierten Studien vergleichbarer Kohorten der letzten Jahre höher ausfällt als in der Literatur beschrieben.

4.1 Einordnung der Ergebnisse des hpIFT

4.1.1 Diagnostische Validität des hpIFT bezüglich Sensitivität und Spezifität

In **Kap. 3.1.1** und **Kap. 3.1.6** wurde gezeigt, dass der hpIFT mit einer Sensitivität von 86,2 % und einer Spezifität von 80,6 % eine verhältnismäßig valide Methode darstellt, bezogen auf das Standardverfahren (Euroimmun IFT) mit einer in Studien beschriebenen Sensitivität von 88 % und Spezifität von 89 %.⁴⁹

Zunächst wurde mit 20 getesteten Seren dargestellt, dass im Bereich $> 1:160$ in keinem Fall mehr als eine Titerstufe Differenz im Vergleich zum objekträgerbasierten IFT von Euroimmun (hier als Goldstandard definiert) erzielt wurde. Im niedrigen Titer-Bereich bis $1:160$ gab es vereinzelte Abweichungen ($n = 3$) mit zwei Titerstufen Unterschied. Diese sind aber im Hinblick auf den Wert, den der hpIFT messen sollte (eindeutig positiv $\geq 1:320$), zu vernachlässigen, da der hpIFT lediglich zwischen Titerstufen von $\geq 1:320$ und $< 1:320$ unterscheidet. Bei zwei Referenzseren im moderat-positiven und im hoch-positiven Bereich zeigte der hpIFT im Vergleich zum Euroimmun-IFT allerdings Abweichungen von fünf bzw. vier Titerstufen. Hoch positiv gemessene Blutspenderseren hingegen waren alle mit beiden Methoden gut reproduzierbar. Diese Abweichungen bei den Referenzseren konnten abschließend nicht vollständig geklärt werden. Pipettierfehler wurden so weit wie möglich durch Einsatz von Kontrollen ausgeschlossen. Eine falsch-positive

Reaktion im Euroimmun-IFT sollte als Erklärungsmöglichkeit der Abweichung der Referenzseren auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, wenn die Kreuzreaktivität bedacht wird (siehe dazu **Kap. 4.1.4**). Letztlich spielt jedoch diese Abweichung im hoch-positiven Titer-Bereich keine entscheidende Rolle für die Validierung des hpIFT, da alle Proben für den zusammengefassten Bereich der Titer-Grenze $\geq 1:320$ mit beiden Proben reproduziert wurden, sofern man eine Titerstufe Abweichung als tolerabel akzeptiert, was international anerkannter Standard ist. Es kann also festgehalten werden, dass bei 26 Proben die Bewertung $\geq 1:320$ und $< 1:320$, mit einer erlaubten Abweichung von einer Titerstufe für alle Proben mit beiden Testverfahren bestätigt wurde und der hpIFT deshalb eine sehr gut validierte Methode darstellt.

Die in **Kap. 3.1.6** durch den Vergleich von 238 Blutspendeseren mit dem Euroimmun-IFT ermittelten Wert der Sensitivität von 86,2 % und Spezifität von 80,6 % ergeben sich, wenn man annimmt, dass der Euroimmun-IFT die Goldstandard-Methode ist und eine Sensitivität und Spezifität von je 100% aufweist. Dieser Test ist weitestgehend nach dem Protokoll der CDC⁶⁴ hergestellt, wenngleich unter Einsatz eines BadA-negativen *B. henselae*-Stammes (eigene Daten, nicht publiziert). Eine Studie am Universitätsklinikum Freiburg, welche die Sensitivität und Spezifität verschiedener serologischer Testverfahren bei Kindern mit Katzenkratzkrankheit untersucht hat, kommt auf eine Bandbreite an Ergebnissen der Sensitivität dieser Testverfahren zwischen 14 % und 100 %.⁶⁶ Eine niederländische Studie hingegen, die ebenfalls unterschiedliche serologische Nachweisverfahren zum Nachweis von *B. henselae*-Antikörpern verglichen hat, kommt für den Euroimmun IFT auf eine Sensitivität von 88 % und auf eine Spezifität von 89 %.⁴⁹ Hierfür wurden 50 Patientinnen und Patienten mit gesichertem Nachweis von der Katzenkratzkrankheit und 55 gesunde Patientinnen und Patienten in der Kontrollgruppe untersucht. Dies macht deutlich, dass der alleinige Vergleich zum Euroimmun-IFT keine absolute Aussage über die Sensitivität und Spezifität geben kann. Eine erneute Validierung des Testverfahrens mit Hilfe einer signifikanten Anzahl an molekularbiologisch gesicherten Fällen der Katzenkratzkrankheit und einer entsprechenden Kontrollgruppe könnte möglicherweise eine noch genauere Aussage erbringen. Aufgrund des akzeptablen

Ergebnisses ist der Methodenvergleich mit dem Euroimmun-IFT zur Validierung trotzdem als ausreichend zu bewerten, insbesondere für den geplanten Einsatz als serologisches Verfahren für Prävalenzstudien.

4.1.2 Reproduzierbarkeit der Methode

Die im Testverfahren eingesetzten acht Kontrollen pro 96-Well-Platte wurden bei allen 60 in der Studie verwendeten Platten zu 100 % reproduziert (Einzelteste: n = 480, davon Negativkontrollen: n = 300 und Positivkontrollen: n = 180), wodurch die Zuverlässigkeit der Methode belegt werden konnte.

Weder der Zusatz von Kaninchen-Sekundärantikörpern (bei n = 60) noch von humanen Sekundärantikörpern (bei n = 60) ohne Zugabe von Primärantikörpern (Serum) zu *B. henselae*-infizierten HeLa 299-Zellen konnten an das Antigen binden und führten daher nicht zu falsch positiven Ergebnissen. Antigene ohne Hinzufügen von Primär- und Sekundärantikörpern wurden ebenfalls immer als eindeutig negativ bewertet (n = 60) und zeigten daher ebenfalls keine falsch positiven Ergebnisse. Mit Hilfe der fluoreszierenden Primärantikörper gegen *B. henselae* wurde die technische Leistungsfähigkeit zudem bei jedem Nachweis belegt (technische Kontrolle: n = 60). Letztlich konnte mit je zwei diagnostisch bestätigten positiven (n = 120) und zwei negativen Seren (n = 120) die Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt werden. Der hpIFT zeigt sich also als äußerst zuverlässig und stabil.

Diese eindeutigen Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass in einer möglichen hpIFT-Weiterentwicklung die Anzahl der Kontrollen aufgrund der stabilen Reproduzierbarkeit wahrscheinlich sogar deutlich reduziert werden könnte. Besonders als visuelle Orientierungshilfe und zum Einstellen und Kalibrieren des Mikroskops für die Fluoreszenzmikroskopie stellten sich die Kontrollen als wichtige visuelle Orientierungshilfen dar. Eine Reduktion auf beispielsweise je eine Positiv- und Negativkontrolle könnte sicherlich in Erwägung gezogen werden, da die Effizienz der Methode dadurch nochmals deutlich erhöht werden würde. Die Antigenherstellung und die Färbung würden an Komplexität im Workflow

abnehmen. Außerdem stünden sechs weitere Wells pro 96-Well-Platte für Proben zur Verfügung, was die ökonomische Effizienz des Testes weiter erhöhen würde.

4.1.3 Spezifität der Methode innerhalb der Spezies *B. henselae*

In **Kap. 3.1.4** wurde gezeigt, dass der hpIFT ein Minimum an Abweichungen innerhalb der beiden verwendeten *B. henselae*-Stämme Houston-1 und Marseille aufwies. Studien zeigen, dass beide Stämme für die Infektion der Katzenkratzkrankheit verantwortlich gemacht werden.⁵ Es sollte daher sichergestellt werden, dass eine serologische Messmethode nicht nur für eine der beiden Stämme spezifisch ist. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei dem hpIFT lediglich minimale Unterschiede innerhalb der als Antigen verwendeten Stämme mit denselben Antikörpern auftraten. Serum #8 (siehe **Kap. 3.1.4, Abb. 10a**) allerdings zeigte bei Verwendung des BadA-positiven Marseille-Stammes als Antigen eine mit drei bzw. vier Titer Stufen stärkere Reaktion im Vergleich zur Verwendung der beiden Houston-Stämme und des BadA-negativen Marseille-Stammes als Antigen. Diese einzelne Abweichung lässt sich nicht einfach erklären. Die Tatsache, dass bei der Verwendung des *B. henselae* BadA-negativen Marseille-Stammes und bei den beiden *B. henselae* Houston-Stämmen ein Titer zwischen < 1:80 und 1:80 vorlag spricht allerdings dagegen, dass bei diesem Serum eine *B. henselae* Infektion mit einem Marseille Stamm vorlag. In diesem Fall wäre sonst zu erwarten, dass auch das Antigen mit dem zweiten *B. henselae* Marseille-Stamm (Bad A-) stark reagieren würde, was aber nicht der Fall war (siehe **Abb. 10a**). Desweiteren ist dieses Phänomen in keiner der weiteren Testungen aufgetaucht. Am ehesten handelt es sich daher um einen falsch hoch-positiven Titer unbekannter Ursache.

Ebenso gilt dies für den falsch niedrig gemessenen Titer bei Serum #17 unter Verwendung des *B. henselae* Houston-1 MFE341 (Bad⁺)-Stammes, da auch hier alle drei anderen Stämme im gleichen Zielbereich liegen.

Alle anderen Abweichungen von einer Titerstufe lassen sich auf die Messungenauigkeit beim IFT zurückführen. Generell gelten etwa Untersucher- oder Versuchsbedingte Abweichung von einer Titerstufe als tolerabel. Es ist also davon auszugehen, dass der hpIFT ausgelöste Infektionen durch die Stämme

B. henselae Houston-1 und *B. henselae* Marseille in gleicher Weise detektiert. Die Testung der *B. quintana*-Stämme in diesem Versuch diente als Kontrolle und es konnte gezeigt werden, dass zwar schwache Kreuzreaktionen innerhalb der Spezies *Bartonella* vorherrschten, diese aber nur in geringen Titerstufen auftraten und bei einem *cut-off* von 1:320, wie bei dem hier vorliegenden hpIFT, nicht detektiert werden und somit in der Regel nicht zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Ob zu anderen *B. henselae*-Stämmen Kreuzreaktionen bestehen, wäre zwar von wissenschaftlichem Interesse, es erscheint aber als unwahrscheinlich, dass diese heftiger als bei *B. quintana* auftreten würden. Darüber hinaus gelten *B. henselae* und *B. quintana* mit Ausnahme der Andenregion (*B. bacilliformis*) als die weltweit vorherrschenden humanpathogenen Bartonellen, weshalb sich in dieser Studie auf das erwähnte Untersuchungsformat beschränkt wurde.

4.1.4 Spezifität der Methode durch Bestimmung kreuzreagierender Antikörper

Bei der Testung der Kreuzreaktivität schnitt der hpIFT im Vergleich besonders gut ab. Die gemessenen Kreuzreaktionen mit hochpositiven Seren mit Antikörpern gegen nahe Verwandte der Bartonellen, bzw. mit als hoch-kreuzreaktiv bekannten Antikörpern, zeigte lediglich bei einer Probe mit bekannten Antikörpern gegen speziesfremde Pathogene, und zwar bei einer Probe mit anti-*Treponema pallidum* Antikörpern, eine Kreuzreaktion.

Kreuzreaktivitäten bei serologischen Antikörpernachweisverfahren sind keine Seltenheit. Eine niederländische Studie von 2010 verglich verschiedene *B. henselae*-IFT sowie ein ELISA bezüglich der Häufigkeit des Auftretens von Kreuzreaktionen.⁴⁹ Dabei wurde auch der Euroimmun-IFT zum Antikörpernachweis der Klasse IgG miteingeschlossen. In dieser Studie erreichte der Euroimmun-IFT die höchste Rate an Kreuzreaktivitäten von etwa 13 % für Seren mit Antikörpernachweis gegen *Coxiella burnetii* (n = 21) und bei Seren mit bekannten Antikörpern gegen *Epstein-Barr-Virus* eine positive Rate von etwa 8 % (n = 151). Andere Studien deuten sogar auf bis zu 50 % Kreuzreaktionen gegen *Coxiella burnetii* hin.⁶⁷ Die Kreuzreaktivität bezüglich *Treponema pallidum* wurden in diesen Studien leider nicht untersucht.

Im hpIFT wurden weder bei Seren mit bekannt vorliegenden Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* noch gegen das *Epstein-Barr-Virus* Kreuzreaktionen festgestellt. Hierbei sollte beachtet werden, dass die Probenanzahl mit je vier Seren pro gemessenen Parameter zum Ausschluss von Kreuzreaktionen in unserer Studie relativ niedrig angesetzt wurde. Trotzdem legen die Ergebnisse nahe, dass der hpIFT fast keine bis sehr wenige Kreuzreaktionen außerhalb der *Bartonella* spp. aufweist. Es ist anzunehmen, dass Kreuzreaktionen maximal mit ähnlich hoher Häufigkeit wie bei vergleichbaren Methoden auftreten.

Das Auftreten von Kreuzreaktionen innerhalb der Spezies *Bartonella* dagegen ist ein bekanntes Phänomen.⁶⁸ Die dargelegten Versuche zeigten, dass je nach verwendetem *B. henselae*-Stamm zwischen 25 % und 75 % der Seren mit hochpositiven Antikörpernachweis gegen *B. quintana* kreuzreagierten. Tatsächlich lassen sich also bei diesem Testverfahren Kreuzreaktionen mit anderen Bartonellen nicht ausschließen. In der Praxis sollte dies trotzdem eine geringe Rolle spielen. Wie bereits in **Kap. 3.1.4** gezeigt, werden hier tatsächlich nur bei hoch positiven Antikörpernachweisen innerhalb der *Bartonella* spp. Kreuzreaktionen erwartet. Hoch positive Antikörpernachweise mit *B. quintana* erwartet man bei einer akuten oder kürzlich durchgemachten Infektion mit den Symptomen des „Fünf-Tage-Fiebers“ (auch „Schützengrabenfieber“). Diese Symptome wären v.a. Fieber, aseptische Meningitis und starke Kopfschmerzen. Dies ist bei einer Kohorte von Blutspenderinnen und Blutspendern in Deutschland eher unwahrscheinlich, zumal die Erkrankung im mitteleuropäischen Kulturkreis nur noch selten anzutreffen ist und dann häufig mit einer Immunschwäche und dem gleichzeitigen Vorliegen eines Körperlaus-Befalls (*Pediculus humanus corporis*) korreliert.^{26,69} Es ist anzunehmen, dass dies entsprechend auch für *B. bacilliformis* und andere seltener als-Humanpathogene-in-Frage-kommende *Bartonella* spp. zutrifft. Eine mögliche Erklärung für Kreuzreaktionen ist die ubiquitäre Verbreitung des Adhäsins BadA und dessen Homologe im Genus *Bartonella*⁶⁹, welches in seiner Domänenstruktur als hochgradig konserviert gilt.³⁶ Letztlich kann jedoch mit dem Testverfahren ein gänzlicher Ausschluss von Kreuzreaktionen mit anderen *Bartonella* spp. nicht getroffen werden. Im Zweifelsfall sollte eine separate Testung idealerweise mit separater Austitrierung für *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* und

möglicherweise sogar weiterer möglicher humanpathogener Bartonellenspezies erfolgen. Bei solch einem vergleichenden Test würde man erwarten, dass Antikörper gegen das jeweilige Antigen am besten binden und die Unterscheidung etwa von anti-*B. quintana*-Antikörpern zu anti-*B. henselae*-Antikörpern würde entsprechend durch einen höheren Antikörpertiter der jeweiligen Bartonellen-Spezies deutlich werden.

4.1.5 Performance des hpIFT unter Hochdurchsatz-Bedingungen

Im Vergleich zum kommerziellen IFT konnte die Arbeitslast im Hochdurchsatzverfahren enorm gesenkt werden. Das in **Kap. 2.2.2.7, Tab. 12** beschriebene Pipettierschema mit 13 Schritten ermöglichte insbesondere unter der Zuhilfenahme des Mehrkanalpipetten-Roboters VIAOFLO 96/384 ein hoch effizientes Arbeiten. Das serielle Erstellen einer großen Anzahl von 96-Well-Platten (in der beschriebenen Studie haben sich 30 Platten pro Durchgang als besonders praktikabel herausgestellt) ließ sich sinnvoll in drei bzw. vier Arbeitstagen durchführen: Zellkulturanzucht und -aussaat (Tag 1), Infektion (Tag 2), Fixierung und Blockierung (Tag 3) und Antikörper-Färbung (Tag 4), wobei die letzten beiden Schritte theoretisch auch an einem Tag durchführbar wären. Die mikroskopische Auswertung der serologischen Ergebnisse aus 96-Well-Platten mit einfachem Weiterschieben der Wells auf dem Mikroskop ließ schnelles und konzentriertes Ablesen der Ergebnisse zu, ohne aufwendiges Wechseln der Objektträger im Objektträgerhalter eines Fluoreszenzmikroskops. Mit dem Durchlauf der Prävalenzstudie mit 5.215 Seren konnte die Praktikabilität der hpIFT-Methode bestätigt werden. In Betracht gezogen werden muss allerdings, dass die Anforderungen an die räumliche und technische Ausstattung im Labor — siehe dazu **Kap. 2.2** — wesentlich höher liegen im Vergleich zum objektträgerbasierten IFT, welcher neben einem geeigneten Fluoreszenzmikroskop wenige Voraussetzungen für die Anwendung hat. Dies gilt ebenso für Verbrauchsmaterialien und die Nutzung des Pipettierroboters beim hpIFT. Hier fallen deutlich höhere Investitionskosten an (Pipettierroboter: ca. 25.000 Euro).

4.2 Einsatz und Limitationen der hpIFT-Methode

Wie beschrieben stellt sich der hpIFT als vielversprechende Alternative zu herkömmlichen serologischen Antikörpernachweisverfahren zur Detektion von anti-*B. henselae*-Antikörpern dar. Im Vergleich zu anderen Verfahren sind allerdings noch wenig Daten vorhanden, es bedarf eventuell noch weiterer Hochdurchsatz-Studien und möglicherweise einer erweiterten Validation der Methode. Andere Verfahren wie beispielsweise der kürzlich auf den Markt gekommene ELISA⁴⁸ zeigen ebenfalls vielversprechende Ergebnisse bei relativ einfacher Anwendung. Ob solche Verfahren womöglich auch als kombinierte Testverfahren in der Routinediagnostik Einsatz finden könnten, wäre ebenfalls ein Ansatz zukünftiger Erhebungen. Zu evaluieren wäre hier — beispielsweise als Routinediagnostik — ein Zwei-Stufen-Algorithmus mit 1. Screening ELISA und 2. Bestätigung durch den hpIFT, analog wie dies etwa in der Borrelien-Serologie-Diagnostik⁷⁰ (1. ELISA, 2. Westernblot) schon seit Jahren als Goldstandard praktiziert wird.

Einschränkungen, die bei Einsatz des hpIFT im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren in Kauf genommen werden müssen, sind zum einen gegenwärtig die Beschränkung auf den Nachweis von IgG-Antikörpern ohne Nachweis von IgM-Antikörpern (weil gegenwärtig nicht systematisch validiert) und zum anderen die Beschränkung auf eine Verdünnungsstufe ($< 1:320$; $\geq 1:320$) bei der Bestimmung der Antikörper. Dies schränkt das Verfahren zwar in seiner Anwendung ein, insbesondere in Prävalenzstudien interessiert aber überwiegend der Nachweis der spezifischeren IgG-Antikörper. Diese bedürfen in der Regel auch keiner Antikörperbestimmung im zeitlichen Verlauf, bei denen beispielsweise der Titer-Anstieg eine Rolle spielt (z.B. etwa im Hinblick auf akute klinische Fragestellungen). Im Sinne einer klassischen Prävalenzstudie beschränkt sich der hpIFT hier also auf das Wesentliche (d.h. die IgG-Bestimmung in einer Serumverdünnungsstufe), um möglichst effizient Fragen der Prävalenz zu beantworten. Für viele Fragestellungen im *one-health* Kontext wären dabei Prävalenzstudien zu *B. henselae*-Infektionen mit möglichst hoher Fallzahl sicherlich besonders hilfreich.³

4.3 Ausblick

Schlussfolgernd ist der modifizierte hpIFT ein zuverlässiges und präzises Verfahren zur Detektion von anti-*B. henselae* IgG-Antikörper in humanen Seren und konnte bereits in einer großen Studie (Fallzahl n = 5.215, 22,3 % positiv) seine Praktikabilität als Hochdurchsatz-Tool für Prävalenzstudien unter Beweis stellen. Eine Weiterentwicklung der Methode zum Nachweis auch von Infektionen mit anderen *Bartonella* spp., sowie die Modifikation für die Anwendung im veterinärmedizinischen Bereich könnten im Sinne eines *one-health* Ansatzes von großer Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

Bartonella henselae (*B. henselae*) ist ein zoonotischer humanpathogener Erreger, der die Katzenkratzkrankheit sowie andere Infektionskrankheiten verursacht. Trotz des globalen Auftretens sind epidemiologische Daten rar oder beruhen auf geringen Fallzahlen. Die aktuelle Forschung zu Bartonellen zielt mehr und mehr auf einen interdisziplinären Ansatz, der als *one-health*-Konzept zusammengefasst werden kann und als solcher zunehmend Daten zur Seroprävalenz mit hohen Fallzahlen benötigt.

Die Detektion von anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT) ist die Diagnostik der Wahl für *Bartonella*-Infektionen. Dabei handelt es sich um ein objektträgerbasiertes Verfahren, wodurch dessen Handhabung ungeeignet für die Verarbeitung im Hochdurchsatz wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der *high-throughput* IFT (hpIFT) zum Nachweis von anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern im 96-Well-Platten-Format entwickelt, welcher es zum ersten Mal ermöglicht, seroepidemiologische Daten mit hohen Fallzahlen zu generieren.

Für die Antigenpräparation im 96-Well-Platten-Format wurden HeLa 229-Zellen mit *B. henselae* [Houston-1 RSE 247 (BadA⁻)-Stamm] infiziert, fixiert, blockiert und permeabilisiert. Humane Seren wurden 1:320 verdünnt. Nach Inkubation der Seren folgte die Zugabe von Sekundärantikörpern. Für die genannten Schritte wurde ein einfacher, ökonomischer Workflow unter Zuhilfenahme des Pipettierroboters VIAOFLO 96/384 von Integra erstellt.

Mit dem entwickelten hpIFT wurden insgesamt 5.215 Proben verarbeitet. Alle Seren wurden bei einem *cut-off*-Wert von 1:320 bewertet, dabei galten Werte von $\geq 1:320$ als positiv. Um die diagnostische Validität zu überprüfen, wurden zunächst 20 bekannte Seren in unterschiedlichen Titerstufen und anschließend 238 zufällig ausgewählte Blutspendeseren mit der kommerziellen objektträger-basierten IFT-Methode von Euroimmun (Produktcode: FK-219b-1010-1G) verglichen. Zur Überprüfung der Intraspezies-Kreuzreaktivität wurden verschiedene *B. henselae*-Stämme [Houston-1 RSE 247 (BadA⁻), Marseille (BadA⁺), Houston-1 MFE341

(BadA⁺), Marseille (BadA⁻) und *B. quintana*-Stämme [JK31 (Vomp⁺) und 2D70(Vomp⁻)] als Antigen mit unterschiedlichen, in der Antikörperkonstellation bekannten Seren untereinander verglichen. Um die Interspezies-Kreuzreaktivitäten abzuklären, wurden Seren mit hohen IgG-Antikörpern gegen andere Pathogene (*Anaplasma phagocytophilum*, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Rickettsia typhi*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, Epstein-Barr-Virus und *B. quintana*) überprüft.

Es zeigte sich, (I) dass der modifizierte hpIFT mit beinahe gleichwertiger Sensitivität (86,2 %) und Spezifität (80,6 %) verglichen mit dem kommerziell erhältlichen IFT von Euroimmun bei umfangreichen Probenmengen ein ökonomisches, vergleichsweise einfach zu bedienendes, zuverlässiges und präzises Verfahren zur Detektion von anti-*B. henselae* IgG-Antikörpern in humanen Seren darstellt und (II), dass die ermittelte anti-*B. henselae* IgG-Prävalenz von 22,3 % unter 5.215 Blutspenderinnen und Blutspendern verglichen mit weltweit publizierten Studien vergleichbarer Kohorten der letzten Jahre höher ausfällt als angenommen.

Der hier etablierte hpIFT stellt damit ein vielversprechendes Tool für die Hochdurchsatz-Serologie zum Nachweis von anti-*B. henselae*-Antikörpern in Prävalenzstudien dar. Eine weitere Modifizierung beispielsweise für den veterinären Bereich könnte im Sinne des *one-health* Ansatzes neue Möglichkeiten für epidemiologische Forschungsaspekte eröffnen.

6 Summary

Bartonella henselae (*B. henselae*) is a zoonotic pathogen causing cat scratch disease and other infectious diseases. Despite its global occurrence, epidemiological data are rather sparse or only represent small sample numbers. Present research on *Bartonella* spp. follows an interdisciplinary approach that can be summarized as the *one-health-concept*, and needs seroprevalence data with high case numbers.

Detection of anti-*B. henselae* IgG antibodies by indirect immunofluorescence assay (IFA) is the diagnostic of choice in *Bartonella* infections. These tests are microscopy-slide based and handling is therefore inconvenient when processing larger sample numbers.

In this study the *high-throughput* screening assay (hpIFT) for the detection of anti-*B. henselae* IgG antibodies using 96-well plates was designed and made it possible for the first time to generate seroepidemiological data of *B. henselae* infections on a larger scale.

Using the 96-well plate format for antigen preparation HeLa 229-cells were infected with *B. henselae* [Houston-1 RSE 247 (BadA⁻) strain], fixed, blocked and permeabilized. Human sera were diluted by 1:320. After incubating the sera, secondary antibodies were added. For all steps an easy, economical workflow was created that included pipetting-robot VIAOFLO 96/384 of Integra.

With the developed hpIFT a total amount of 5.215 sera were processed. All sera were assayed at a cut-off titer of 1:320 and results $\geq 1:320$ were evaluated as positive. To check the diagnostic validity, firstly, 20 familiar sera in different dilutions were tested and, secondly, 238 randomly picked blood donor sera were counterchecked with Euroimmun's slide-based IFA (product code: FK-219b-1010-1G). To assess the intraspecies crossreactivity, different *B. henselae* strains [Houston-1 RSE 247 (BadA⁻), Marseille (BadA⁺), Houston-1 MFE341 (BadA⁺), Marseille (BadA⁻)] and *B. quintana* strains [JK31 (Vomp⁺) and 2D70(Vomp⁻)] were prepared as antigen and were compared using different antibody constellations of sera. To evaluate the interspecies-crossreactivity sera with high IgG antibody titer

against other pathogens (*Anaplasma phagocytophilum*, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Rickettsia typhi*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Epstein-Barr-Virus* und *B. quintana*) were evaluated.

Results showed that (I) the modified hpIFT, with nearly the same value of sensitivity (86,2 %) and specificity (80,6 %) compared with the commercially available IFT from Euroimmun, proved to be an economic, comparably easy-to-handle, reliable method to detect anti-*B. henselae* IgG antibodies in large scale sample sizes and (II) that the investigated anti-*B. henselae* IgG prevalence of 22,3 % amongst 5.215 blood donors is higher than expected, compared to worldwide studies within similar cohorts of recent years.

The here established hpIFT already shows to be a promising tool in *high-throughput* serology for the detection of anti-*B. henselae*-antibodies in seroprevalence studies. Modifications, for example for the veterinary field, could open up new possibilities in epidemiological research aspects in the context of *one-health*.

7 Referenzen

1. Beutner E. Immunofluorescent staining: the fluorescent antibody method. *Bacteriol Rev.* 1961;25(1):49-76.
2. Mohan K, Pai S, Rao R, Sripathi H, Prabhu S. Techniques of immunofluorescence and their significance. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(4):415-419.
3. Regier Y, O'Rourke F, Kempf V. *Bartonella* spp: a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):261.
4. Regnery R, Anderson B, Clarridge J, Rodriguez-Barradas M, Jones D, Carr J. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol.* 1992;30(2):265-274.
5. Zeaiter Z, Fournier P, Raoult D. Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):1023-1030.
6. Nelson C, Saha S, Mead P. Cat-Scratch Disease in the United States, 2005-2013. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(10):1741-1746.
7. Cerpa Polar R, Orellana G, Silva Caso W, Sanchez Carbonel J, Santisteban J, Del Valle Mendoza J. Encephalitis with convulsive status in an immunocompetent pediatric patient caused by *Bartonella henselae*. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(6):610-613.
8. Deschasse C, Bielefeld P, Muselier A, et al. Eye and cat scratch disease: a case series. *J Fr Ophtalmol.* 2016;39(2):164-170.
9. Eiger-Moscovich M, Amer R, Oray M, Tabbara KF, Tugal-Tutkun I, Kramer M. Retinal artery occlusion due to *Bartonella henselae* infection: a case series. *Acta Ophthalmol.* 2016;94(5):367-70.
10. Kiu K, Hanizasurana H, Zunaina E. Neuroretinitis with dual infections. *Int Med Case Rep J.* 2015;8:255-258.
11. Verdier-Watts F, Piloni J, Piegay F, et al. An exceptional case of tricuspid infective endocarditis due to *Bartonella henselae* revealed by an old pulmonary embolism. *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* 2016;65(1):48-50.
12. Sosa T, Goldstein B, Cnota J, et al. Melody valve *Bartonella henselae* endocarditis in an afebrile teen: a case report. *Pediatrics.* 2016;137(1).

13. Vayssier-Taussat M, Moutailler S, Femenia F, et al. Identification of novel zoonotic activity of *Bartonella* spp., France. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(3):457-462.
14. Schmidgen T, Kaiser PO, Ballhorn W, et al. Heterologous expression of *Bartonella* adhesin A in *Escherichia coli* by exchange of trimeric autotransporter adhesin domains results in enhanced adhesion properties and a pathogenic phenotype. *J Bacteriol*. 2014;196(12):2155-2165.
15. Keret D, Giladi M, Kletter Y, Wientroub S. Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*. 1998;80-B(5):766-767.
16. Windsor J. Cat-scratch disease: epidemiology, aetiology and treatment. *Br J Biomed Sci*. 2001;58(2):101-110.
17. Ridder G, Boedeker C, Technau-Ihling K, Grunow R, Sander A. Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck. *Clin Infect Dis*. 2002;35(6):643-649.
18. Fischer SF. Zoonosen. In Mauch H, ed. *MiQ*, Germany, Munich: Urban & Fischer in Elsevier; 2012.
19. Pitassi L, Paiva D, Scorpio D, et al. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):e0003467.
20. Kwon H, Im J, Lee S, et al. The seroprevalence of *Bartonella henselae* in healthy adults in Korea. *Korean J Intern Med*. 2017;32(3):530-535.
21. Kempf V, Lebedziejewski M, Alitalo K, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation*. 2005;111(8):1054-1062.
22. Dietrich F, Schmidgen T, Maggi R, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(5):1395-1398.
23. Regier Y, Ballhorn W, Kempf V. Molecular detection of *Bartonella henselae* in 11 *Ixodes ricinus* ticks extracted from a single cat. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):105.
24. Chomel B, Kasten R. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol*. 2010;109(3):743-750.
25. Kaiser P, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf V. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol*. 2011;301(1):7-15.

26. Raoult D, Foucault C, Brouqui P. Infections in the homeless. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(2):77-84.
27. Mada P, Zulfiqar H, Joel Chandranesan A. Bartonellosis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; March 14, 2021.
28. Gomes C, Ruiz J. Carrion's Disease: the sound of silence. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(1).
29. Schulte B, Linke D, Klumpp S, et al. *Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. *Infect Immun.* 2006;74(9):5003-5013.
30. Garcia-Quintanilla M, Dichter A, Guerra H, Kempf V. Carrion's disease: more than a neglected disease. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):141.
31. Daly J, Worthington M, Brenner D, et al. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(4):872-881.
32. Dehio C, Sauder U, Hiestand R. Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5320-5323.
33. Regier Y, Komma K, Weigel M, et al. Combination of microbiome analysis and serodiagnostics to assess the risk of pathogen transmission by ticks to humans and animals in central Germany. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):11.
34. Werth N, Beerlage C, Rosenberger C, et al. Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. *PLoS One.* 2010;5(7).
35. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 2018;109(3):560-571.
36. Linke D, Riess T, Autenrieth I, Lupas A, Kempf V. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.* 2006;14(6):264-270.
37. O'Rourke F, Schmidgen T, Kaiser P, Linke D, Kempf V. Adhesins of *Bartonella* spp. *Adv Exp Med Biol.* 2011;715:51-70.
38. Riess T, Raddatz G, Linke D, Schafer A, Kempf V. Analysis of *Bartonella* adhesin A expression reveals differences between various *B. henselae* strains. *Infect Immun.* 2007;75(1):35-43.

39. Zhang P, Chomel B, Schau M, et al. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(37):13630-13635.
40. Breitschwerdt E, Kordick D. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(3):428-438.
41. Perez C, Maggi R, Diniz P, Breitschwerdt E. Molecular and serological diagnosis of *Bartonella* infection in 61 dogs from the United States. *J Vet Intern Med*. 2011;25(4):805-810.
42. Sanogo Y, Zeaiter Z, Caruso G, et al. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodida*) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(3):329-332.
43. Chung C, Kasten R, Paff S, et al. *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(7):1311-1313.
44. Gordon I. Review: livestock production increasingly influences wildlife across the globe. *Animal*. 2018;12(s2):s372-s382.
45. McMahon B, Morand S, Gray J. Ecosystem change and zoonoses in the Anthropocene. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(7):755-765.
46. Riess T, Dietrich F, Schmidt K, et al. Analysis of a novel insect cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(16):5224-5227.
47. Liu Y, Zhao L, Song X, et al. Development of fluorogenic probe-based and high-resolution melting-based polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae*. *J Microbiol Methods*. 2017;138:30-36.
48. Jost M, Latz A, Ballhorn W, Kempf V. Development of a specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay as an in vitro diagnostic tool for detection of *Bartonella henselae* antibodies in human serum. *J Clin Microbiol*. 2018;56(12).
49. Vermeulen M, Verbakel H, Notermans D, Reimerink J, Peeters M. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 6):743-745.

50. Schieker M, Pautke C, Reitz K, et al. The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J Anat.* 2004;204(2):133-139.
51. Vassileva S. Immunofluorescence in dermatology. *Int J Dermatol.* 1993;32(3):153-161.
52. Yoo I, Oh J, Cha H, Koh E, Kang E. Performance of an automated fluorescence antinuclear antibody image analyzer. *Ann Lab Med.* 2017;37(3):240-247.
53. Lu Y, Franz B, Truttmann M, et al. *Bartonella henselae* trimeric autotransporter adhesin BadA expression interferes with effector translocation by the VirB/D4 type IV secretion system. *Cell Microbiol.* 2013;15(5):759-778.
54. Riess T, Andersson S, Lupas A, et al. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med.* 2004;200(10):1267-1278.
55. Kempf V, Schaller M, Behrendt S, et al. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol.* 2000;2(5):431-441.
56. Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG. Euroimmun Website. <https://www.euroimmun.de/produkte/techniken/indirekte-immunfluoreszenz/iift-inkubation.html>. Accessed March 21, 2019.
57. Dalton M, Le Robinson, Cooper J, Regnery R, Olson J, Childs J. Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center. *Arch Intern Med.* 1995;155(15):1670-1676.
58. Greely H, Cho M. The Henrietta Lacks legacy grows. *EMBO Rep.* 2013;14(10):849.
59. Alhabbab R. Immunofluorescence (IF) Assay. In: Alhabbab RY, ed. *Basic Serological Testing*. Vol. 74. Switzerland, Cham: Springer International Publishing; 2018:119-126.
60. Nikon Healthcare Products & Solutions (Microscope Solutions). Nikon Website. https://www.nikon.com/products/microscope-solutions/lineup/accessory/filter_cubes/. Accessed March 19, 2019.
61. Fluorophores.org. Institute of Analytical Chemistry, Graz University of technology Website. <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252>. Accessed March 19, 2019.
62. McHugh M. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med.* 2012:276-282.

63. Altman D. *Practical statistics for medical research*. New York, NY: Chapman and Hall, 1991;10(10):1635-1636.
64. Regnery R, Olson J, Perkins B, Bibb W. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *The Lancet*. 1992;339(8807):1443-1445.
65. Brenner D, O'Connor S, Winkler H, Steigerwalt A. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *Int J Syst Bacteriol*. 1993;43(4):777-786.
66. Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20(6):392-401.
67. La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2270-2274.
68. Baneth G, Kordick D, Hegarty B, Breitschwerdt E. Comparative seroreactivity to *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among cats from Israel and North Carolina. *Vet Microbiol*. 1996;50(1-2):95-103.
69. Kaiser P, Linke D, Schwarz H, Leo J, Kempf V. Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process. *Cell Microbiol*. 2012;14(2):198-209.
70. Hofmann H, Fingerle V, Hunfeld KP, et al. Cutaneous Lyme borreliosis: guideline of the German Dermatology Society. *Ger Med Sci*. 2017;15:Doc14.

8 Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
BadA	<i>Bartonella</i> -adhesin A
BaLi	<i>Bartonella</i> -Liquid –Medium
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GFP-B	<i>green fluorescent protein-B</i>
HeLa	Henrietta Lacks - Zelllinie
hpIFT	<i>high-throughput</i> Immunfluoreszenztest
IFA	<i>immunofluorescenc assay</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IHA	Indirekter Hämagglutinations Assay
ISO	Internationale Organisation für Normung
MAT	Mikroagglutinationstest
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreacion
PFA	Paraformaldehyd

Pubmed	US National Library of Medicine National Institutes of Health
RPM	revolutions per minute
RPMI	<i>RosWell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Raumtemperatur
TPPA	Treponema-Pallidum-Hämagglutinations-Assay
UKF	Konsiliarlaboratorium für Bartonellen, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Frankfurt am Main
WHO	<i>World Health Organization</i>