

Spektroskopische Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit innerhalb von 3,5 Stunden auf einem Mikrofluidik-Chip

Ute Neugebauer^{1,2,3,4}, Ulrich-Christian Schröder^{1,2}, Johanna Kirchhoff^{3,4}, Uwe Hübner², Thomas Henkel², Jörg Weber⁵, Jürgen Popp^{1,2,3,4}

¹Center for Sepsis Control and Care, Universitätsklinikum Jena

²Leibniz-Institute für Photonische Technologien, Jena

³Institut für Physikalische Chemie und Abbe Center of Photonics, Friedrich-Schiller-Universität Jena

⁴Forschungscampus InfectoGnostics Jena

⁵Biophotonics Diagnostics GmbH, Jena

In Zeiten steigender Antibiotikaresistenzen sind neue und präzise Methoden dringend erforderlich, mit denen die Antibiotikaempfindlichkeit von infektionsauslösenden Krankheitserregern innerhalb weniger Stunden bestimmt werden kann. Etablierte Methoden der mikrobiologischen Praxis sind sehr genau und kostengünstig. Sie basieren jedoch auf der Kultivierung von Bakterien aus der Patientenprobe und benötigen somit mindestens einen Tag, oft sogar bis zu zwei oder drei Tage. Eine Kultivierung ist notwendig, um genügend biologisches Material des bakteriellen Erregers für nachfolgende Tests zu erzeugen.

In diesem Report stellen wir einen integrierten mikrofluidischen Aufbau vor, der Bakterien in verdünnten Suspensionen lokal anreichert, um sie anschließend spektroskopisch zu charakterisieren. Auf diese Weise stehen innerhalb von 3,5 Stunden Informationen über die Antibiotikaresistenz zur Verfügung, die dem behandelnden Arzt helfen können, dem Patienten eine bedarfsgerechte, schmalbandige Antibiotikatherapie zu verschreiben.

Der integrierte mikrofluidische Aufbau (Abbildung 1a) ermöglicht, Bakterien direkt aus verdünnten Suspensionen (bspw. Urinproben von Patienten) zu erfassen und den Erreger einschließlich seiner antibiotischen Empfindlichkeit markierungs- und zerstörungsfrei Raman-spektroskopisch zu charakterisieren [1]. Vorteile dieses mikrofluidischen Aufbaus sind die minimale Probenvorbereitung vor dem Aufbringen der Probe auf den Chip und die automatisierte Probenverarbeitung auf dem Chip, was für den Bediener minimale aktive Bearbeitung und minimale Interaktionszeit mit infektiösem Material bedeutet. Gleichzeitig können genaue Ergebnisse aus der spektroskopischen

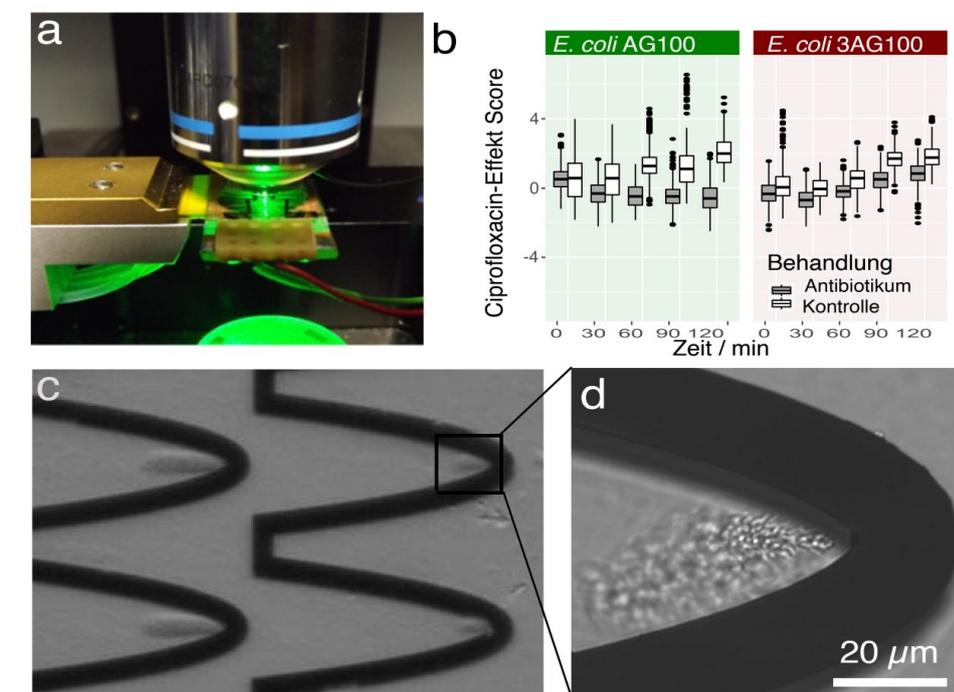


Abb. 1:

- Bild des integrierten mikrofluidischen Aufbaus für Raman-Messungen.
- Unterschiedliches Verhalten von behandelten empfindlichen Bakterien (*E. coli* AG100) und resistenten Bakterien (*E. coli* 3AG100) in Bezug auf den Ciprofloxacin-Effekt Score.
- Detailaufnahme der dielektrophoretischen Fängereinheit im mikrofluidischen Aufbau. Bakterien werden in den Hohlräumen der Spitzen zurückgehalten.
- Vergrößerte Region aus c) zur besseren Visualisierung der eingefangenen Bakterien. (Abb. modifiziert nach Schröder et al. J. Biophotonics 2017)

sieren [1]. Vorteile dieses mikrofluidischen Aufbaus sind die minimale Probenvorbereitung vor dem Aufbringen der Probe auf den Chip und die automatisierte Probenverarbeitung auf dem Chip, was für den Bediener minimale aktive Bearbeitung und minimale Interaktionszeit mit infektiösem Material bedeutet. Gleichzeitig können genaue Ergebnisse aus der spektroskopischen

Analyse innerhalb kürzester Zeit gewonnen werden, wodurch die Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit beschleunigt wird, um resistente Stämme innerhalb weniger Stunden (< 3,5 Stunden einschließlich aller Präparations-schritte) zu identifizieren.

Zur Durchführung der On-Chip-Analyse wird eine kleine Menge (< 100 Mikroliter)

der Bakteriensuspension in Spritzen gefüllt und automatisch in den Mikrofluidik-Chip gepumpt. In der Analyse-kammer erzeugen sinusförmige Elektroden (Abbildung 1c) ein inhomogenes elektrisches Feld. Auf Bakterien in diesem elektrischen Feld wirkt eine dielektrophoretische Kraft, die die Bakterien zurückhält. Während die Flüssigkeit weiterhin durch den Chip fließt, sammeln sich die Bakterien im Bereich der Wellenspitze an (Abbildung 1c und vergrößert in Abbildung 1d). Ein automatisierter Medienaustausch ist in einem solchen Chip möglich. Dieser kann notwendig sein, um einen starken Fluoreszenzhintergrund, der durch unterschiedliche gelöste Substanzen in der Urinprobe des Patienten hervorgerufen wird, in der Raman-Analyse zu vermeiden.

Die Bakterienwolke (Abbildung 1d) ist nun im Fokus des Lasers, der für die Raman-Charakterisierung eingesetzt wird. Hochwertige Raman-Spektren können innerhalb von nur 2 s / Spektrum gewonnen werden. Um einen repräsentativen Überblick zu erhalten, wurden 300 Spektren an sechs verschiedenen Erfassungsorten gesammelt. Um resistente Bakterien zu identifizieren, müssen deren Raman-Spektren in Gegenwart und Abwesenheit des jeweiligen Antibiotikums verglichen werden. Exemplarisch wurde dies für *Escherichia coli*, dem häufigsten Erreger bei Harnwegsinfektionen, und dem häufig verschriebenen Fluorchinolon-Antibiotikum Ciprofloxacin gezeigt. Abbildung 1b zeigt das unterschiedliche Verhalten von empfindlichen *E. coli* (*E. coli* AG100) und resistenten *E. coli* (*E. coli* 3AG100) in Bezug auf den Ciprofloxacin-Effekt-Score, der aus den Raman-Daten berechnet wurde. Während behandelte, empfindliche Bakterien (grau) einen negativen Ciprofloxacin-Effekt-Score aufweisen, haben resistente Bakterien einen positiven Wert – ebenso wie die unbehandelte Kontrollgruppe (weiß). Eine klare Unterscheidung ist bereits nach 60 Minuten Interaktionszeit möglich.

Häufig interessiert den behandelnden Arzt und Infektiologen nicht nur, ob der Erreger empfindlich oder resistent gegenüber einem bestimmten Antibiotikum ist, sondern auch die minimale Hemmkonzentration (MHK). Dies ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, die sichtbares Wachstum der Bakterien verhindert. Der Goldstandard zur Bestimmung der MHK ist ein Mikrodilutionstest, der ca. 20 Stunden dauert. In der klinischen Praxis werden häufig automatisierte Laborgeräte eingesetzt (bspw. Vitek 2 von bioMérieux oder Phoenix von BD), die in der Regel ebenfalls acht Stunden bis zum Ergebnis benötigen. Die Raman-Spektroskopie birgt das Potenzial, diese Analyse zu beschleunigen, wie kürzlich am Beispiel von *E. coli* und Ciprofloxacin gezeigt wurde [2]. In dieser Publikation wird ein Algorithmus vorgestellt, der eine Bestimmung der MHK in weniger als zwei Stunden ermöglicht und erfolgreich mehrere klinische Isolate von Sepsis-Patienten in Übereinstimmung mit der klinischen Diagnostik charakterisieren konnte.

In aktuellen Arbeiten am Leibniz-Institut für Photonische Technologien in Jena wird in Zusammenarbeit mit dem integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum „Sepsis und Sepsisfolgen“ (Center for Sepsis Control and Care) des Universitätsklinikums derzeit an einer neuen Chipgeneration geforscht, die die gleichzeitige, parallele Testung auf mehrere Antibiotika erlauben soll.

Eine kommerzielle Umsetzung des Ansatzes ist mit der Spin-off-Firma Biophotonics Diagnostics in Vorbereitung.

Danksagung

Dem Freistaat Thüringen unter Kofinanzierung durch die Europäische Union im Rahmen des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) (FKZ 2015 FGI 0011, 2016 FGI 0010), dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (CSCC, FKZ 01E01502, FKZ 13GW0096F), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (JBIL, FKZ: PO 633/29-1, BA 1601/10-1), der Leibniz Gemeinschaft (SAS-2015-HKI-LWC), der Europäischen Kommission (COST BM 1401) und dem Fond der Chemischen Industrie wird für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Aktuelle Publikationen

[1] U.-C. Schröder, J. Kirchhoff, U. Hübner, G. Mayer, U. Glaser, T. Henkel, W. Pfister, W. Fritzsche, J. Popp, U. Neugebauer: *On-Chip spectroscopic assessment of microbial susceptibility to antibiotics within 3.5 hours*. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(11):1547-1557.

[2] J. Kirchhoff, U. Glaser, J. A. Bohnert, M. W. Pletz, J. Popp, U. Neugebauer. *Simple ciprofloxacin resistance test and determination of minimal inhibitory concentration (MIC) within two hours using Raman spectroscopy*. *Analytical Chemistry* 2018, 90, 1811–1818