

Vollautomatisches Screening auf 19 Atemwegserreger am Point of Care

Durch Vor-Ort-Diagnostik ist eine schnelle Therapieeinleitung und Eindämmung von Resistenzen möglich.

Dr.-Ing. Markus Rombach und Prof. Dr.-Ing. Roland Zengerle, Universität Freiburg und Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung, Freiburg

Respiratorische Krankheitserreger haben nicht erst seit der Corona-Pandemie Hochkonjunktur, sondern sind das ganze Jahr über Hauptverursacher von Infektionen unterschiedlich schweren Verlaufs. Atemwegserkrankungen können dabei von einer Vielzahl an Erregern ausgelöst werden, wobei die Symptomatik beim Patienten oft ähnliche Muster zeigt. Die korrekte Identifizierung des auslösenden Pathogens ist deshalb essenziell für die Einleitung der passenden Therapie, welche je nach Pathogen sehr unterschiedlich ausfällt. So werden bei bakteriellen Infektionen z.B. Antibiotika verabreicht, welche bei viralen Infekten keine Wirkung zeigen. Bei vergleichbarer Symptomatik besteht die Tendenz zur Gabe von Breitbandantibiotika und somit der Förderung von Resistenzen, da dem behandelnden Arzt aufgrund der langen Analysedauer von mehreren Tagen die Entscheidungsgrundlage fehlt. Auch hinsichtlich der Quarantänisierung der Patienten kann wertvolle Zeit gewonnen werden, wenn innerhalb kurzer Zeit ein aussagekräftiger Befund vorliegt.

Die Disk für den Vor-Ort-Einsatz

Innerhalb eines Forschungsprojekts wurde vom Hahn-Schickard-Institut für Mikroanalyssysteme in Freiburg im Breisgau ein vollautomatisiertes Analysesystem zum Vor-Ort-Einsatz entwickelt, welches das parallele Screening einer Patientenprobe auf bis zu 19 Atemwegserreger innerhalb von drei Stunden ermöglicht. Das System besteht aus dem Analysegerät (Player) sowie einer zentrifugal betriebenen Testkartusche (Disk), welche alle zur



Abb. 1: Hahn-Schickard entwickelt Schnelltests zur Vor-Ort-Analyse z. B. von Krankheitserregern. Hier zwei Varianten im CD-Format, welche als Einwegkartuschen hergestellt werden und komplexe Analyseprozesse abbilden. Foto: Bernd Müller Fotografie, Hahn-Schickard

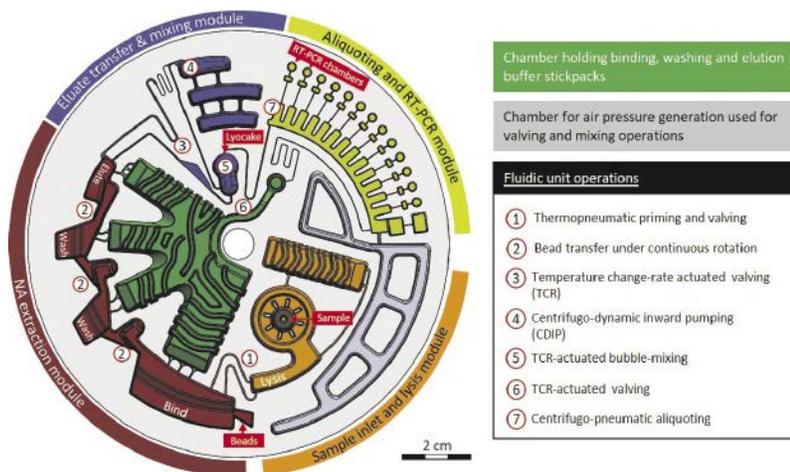


Abb. 2: Das Bild zeigt die RespiDisk zum Vor-Ort-Screening von Atemwegsinfektionen. Die Patientenprobe wird dabei in die Probeneingabe pipettiert (runde, orange Kammer unten Mitte), woraufhin das Erbgut der Erreger in mehreren Schritten isoliert und aufgereinigt wird, bevor es mit den PCR-Reagenzien gemischt und auf mehrere Reaktionskammern verteilt wird, in welchen die Nachweisreaktionen stattfinden (kleine, runde gelbe Kammern oben rechts). Der gesamte Ablauf ist vollautomatisiert und bedient sich einer Vielzahl an mikrofluidischen Elementen zum Mischen, Schalten und Pumpen von Flüssigkeiten. Foto: Hahn-Schickard

Analyse benötigten Reagenzien beinhaltet. Die fluidisch funktionalen Elemente der Disk werden, ähnlich wie Blister zur Tablettenverpackung, über das sogenannte Thermoformverfahren hergestellt (Abb. 1). Die zur Analyse erforderlichen Reagenzien werden auf verschiedenste Arten in die Kartusche eingebracht und konserviert, beispielsweise mittels Pipettieren und

Lufttrocknen oder über das Einlegen von gefriergetrockneten Substanzen. Flüssige Reagenzien (z.B. zur Extraktion des Erbguts) werden kostengünstig und präzise in Beuteln, den sogenannten Stickpacks, vorgelagert, deren Inhalt zum Zeitpunkt des Einsatzes über Zentrifugation freigesetzt werden kann. Die Kartusche wird nach der Bestückung abschließend mit einer



Dr.-Ing. Markus Rombach, Bereichsleiter Prototyping & Scale-Up, Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung, Freiburg



Prof. Dr.-Ing. Roland Zengerle, Institutsleiter, Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung, Freiburg

Siegelfolie fluidisch dicht verschlossen und dadurch auch gegen Kontamination von außen geschützt. Alle verwendeten Herstellprozesse sind skalierbar und können somit reibungslos in die Massenfertigung transferiert werden.

Eine Probe – 19 Antworten

Die Bedienung beschränkt sich auf das Einbringen einer Abstrichprobe aus dem Atemwegstrakt in die Einlasskammer auf der Disk und das Starten des spezifischen Frequenz- bzw. Temperaturprotokolls. Die Analyse wird anschließend vollautomatisch vom System durchgeführt, beginnend mit der Extraktion bzw. Aufreinigung des Erbguts (DNA/RNA) aus den Erregern über die Mischung mit verschiedenen Reagenzien bis hin zum Erreger-spezifischen Nachweis per RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR). Alle Schritte sind über selbst entwickelte, mikrofluidische Schaltelemente bzw. Operationen verknüpft, mit welchen verschiedenste Analyseabläufe (z.B. hier bestehend aus über 20 Einzelschritten) auf kleinstem Raum abbildbar sind (Abb. 2). Mit dem System kann innerhalb von aktuell drei Stunden zwischen 19 verschiedenen Erregern bzw. Subtypen differenziert werden, wodurch der behandelnde Arzt bereits eine erste belastbare Grundlage für

Jahr 2016 eine Ausgründung aus dem außeruniversitären Forschungsinstitut in Form einer GmbH. Durch diesen Schritt konnten einige zentrale Punkte fokussiert adressiert und optimiert werden:

- Entwicklung einer Probenschnittstelle zur direkten Eingabe von Abstrichtipfern (z.B. Nasopharynx-, Rachen- sowie Rektalproben)
 - Umgehung der Aufreinigung des Erbguts hin zum direkten Einsatz der lysierten Patientenprobe in der PCR-Nachweisreaktion zur Zeiteinsparung (45 min)
 - Integration einer nested PCR (verschachtelte PCR) zur Erhöhung der Sensitivität
 - Optimierung der Komponenten zur Durchführung der Nachweisreaktionen
 - Erhöhung der Robustheit sowie der Bedienbarkeit für den Endnutzer
 - Reduzierung der gesamten Analysezeit auf 30–40 min für zwei parallele Tests
- Die daraus entstandene, universelle Plattform bietet die Möglichkeit, sehr schnell auf den aktuellen Bedarf zu reagieren, indem die Reagenzien ausgetauscht und angepasst werden, wie z.B. aktuell bei der SARS-CoV-2-Pandemie. Die Einsatzmöglichkeiten der Plattform in der humanen Infektionsdiagnostik sind sehr vielfältig und reichen z.B. vom Nachweis antibiotikaresistenter Erreger über den Nachweis respiratorischer Erreger als Einzelreaktion oder als breites Panel zur Differentialdiagnostik, wie anfangs beschrieben.

die Therapieentscheidung erhält. Die Palette an nachweisbaren Markern umfasst aktuell Influenzaviren A & B, vier humane Coronaviren, vier Parainfluenzaviren 1–4, RSV A & B, hMPV A & B, Adeno-, Boca-, Rhino- und Enterovirus sowie die atypischen Bakterien *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* und *B. pertussis* und kann zukünftig beliebig erweitert werden (RSC Analyst, 2020).

Weiterentwicklung zum Schnelltestverfahren

Zur Weiterentwicklung und möglichen Vermarktung der bei Hahn-Schickard entwickelten Technologie, erfolgte im

| www.hahn-schickard.de |