

WGA-Alexa633

Durchlicht

Overlay

1

2 µm

## Projektbericht

# FRAUNHOFER-PROJEKT »AESKULAP«: FORSCHER ENTWICKELN SCHNELLE UND SICHERE SEPSIS-DIAGNOSTIK

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Sepsis – umgangssprachlich auch Blutvergiftung – ist in Deutschland die dritthäufigste Todesursache. Entwickelt sich eine Sepsis, wird sie umgehend mit Breitbandantibiotika behandelt, eine nicht immer optimale Therapie. Breitbandantibiotika setzen Ärzte ein, weil die Identifizierung der Erreger und möglicher Antibiotikaresistenzen sehr zeitaufwändig ist und der Patient nicht schnell genug behandelt werden könnte. In dem gemeinschaftlichen Projekt »Aeskulap« entwickeln Wissenschaftler der Fraunhofer-Institute FIT, IMPS, ILT und ITEM eine Technologie, mit der sich Erreger schneller erkennen und Resistenzen schneller testen lassen – damit der Sepsis-Patient zukünftig schnell eine sichere Therapie erhält.

Für eine sichere Diagnose von Sepsis-Erregern werden herkömmlich zunächst Kulturen aus Blutproben angelegt – ein Vorgehen, das viel Zeit benötigt, die man aber für eine Behandlung der Sepsis nicht hat. Nun wollen Wissenschaftler der Fraunhofer-Institute FIT, IMPS, ILT und ITEM gemeinsam im Projekt »Aeskulap« eine schnellere Diagnostik-Methode entwickeln. Dafür sollen die Erreger zunächst mit spezifischen Antikörpern farblich markiert und dann mit einem mikrofluidischen Sortierer aufgetrennt werden. Anschließend sollen die Bakterien unter optimierten Kulturbedingungen vermehrt und auf ihre Antibiotika-Empfindlichkeit getestet werden. Die Kultur soll spätestens nach sechs Stunden abgeschlossen sein. Diese Kultur ist bisher der zeitraubendste Schritt, den es zu verkürzen gilt, um in signifikant kürzerer Zeit den Infektionserreger und seine möglichen Antibiotikaresistenzen zu diagnostizieren. Und um schließlich den Patienten gezielt mit ausgewählten Antibiotika behandeln zu können.

**1** Antikörperfärbung des grampositiven Keims *Staphylococcus aureus*. Der Vergleich verschiedener mikroskopischer Bilder zeigt, dass die Färbung spezifisch alle *Staphylococcus-aureus*-Bakterien in dem Präparat anfärbt. Darstellung von links nach rechts: Fluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff Alexa 633, im Vergleich dazu das Durchlichtbild und schließlich Fluoreszenzbild und Durchlichtbild übereinandergelagt.



### Spezifische Antikörper gegen Sepsis-Keime finden

Am Fraunhofer ITEM wurden zunächst Keime ausgewählt, die für mehr als 95 Prozent der Sepsis-Fälle ursächlich sind: grampositive Keime der Spezies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* sowie gramnegative Erreger wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae*. Von diesen klinisch relevanten Keimen wurden Reinkulturen in dem Infektionslabor des Fraunhofer ITEM unter S2-Bedingungen angelegt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Damit die Erreger sicher diagnostiziert werden können, sollen sie mit spezifischen Antikörpern gefärbt werden, die die zweifelsfreie Erkennung in einem Durchflusszytometer, einem fluidischen Sortierer, ermöglichen. Dafür wurden experimentell die Färbeprotokolle geprüft, die eine Färbung der Keime mit nachfolgend uneingeschränkter Vitalität erlauben, um sie anschließend zu kultivieren. Für die Färbung der Erreger wurden käuflich erhältliche Antikörper ausgewählt und bezüglich ihrer Spezifität geprüft. Um die Funktionalität des Sortierers sicherzustellen, müssen die ausgewählten Antikörper ausschließlich den Zielorganismus erkennen und dürfen nicht oder nur gering an weitere Bakterienspezies binden. Dies stellt bei vielen Antikörpern ein Problem dar, da die allgemeinen experimentellen Anwendungen häufig eine genaue Spezifitätsprüfung nicht erfordern. Darum müssen alle im Projekt »Aeskulap« eingesetzten Antikörper einer umfangreichen Prüfung unterzogen werden. Ob eine Färbung spezifisch und ausschließlich für den betreffenden Keim ist, wird sowohl mit dem Durchflusszytometer als auch unter dem Laserscanningmikroskop überprüft.

Bisher fanden die Wissenschaftler einen spezifisch färbenden Antikörper gegen *Staphylococcus aureus*, dessen Spezifität sie sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch nachweisen konnten (Abb. 1). Der Antikörper bindet nur an den Zielorganismus, lässt aber weitere Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* ungefärbt. Desgleichen wurde die Unterscheidung der Keime hinsichtlich ihrer Oberflächeneigenschaften nach grampositiv und gramnegativ mittels fluoreszenzgekoppelter Markierung gezeigt. Die Vitalität und damit die Wachstumskinetik aller untersuchten Keime wurde durch die verwendeten Antikörper und Färbemethoden nicht beeinflusst. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um in der nachfolgenden Kultur eine valide Antibiotikatestung zu etablieren. Die schnelle Antibiotikatestung im Mikroformat ist ein weiterer wichtiger Schritt für die Beschleunigung des Verfahrens.

### Ausblick

Mit dem Nachweis einer spezifischen Färbung und einer uneingeschränkten Vitalität der Bakterien nach der Färbeprozedur ist ein wichtiger Schritt zur Entwicklung des mikrofluidischen Sortierers getan. In der nahen Zukunft stehen die Arbeiten zur Miniaturisierung der Kulturbedingungen für die Bakterien und die Validierung der Prüfung der Antibiotikaresistenzen im miniaturisierten Format auf dem Plan.



### KONTAKT

Dr. Meike Müller  
Telefon +49 511 5350-262  
meike.mueller@item.fraunhofer.de