Schlussbericht zum Verwendungsnachweis

Teil 2 Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger:	**Förderkennzeichen:**
fzmb GmbH, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie	13GW0458A

Vorhabenbezeichnung:

Verbund: Schnelle und ökonomische POC-Tests zur Bestimmung von Immunstatus und bakterieller Resistenzfaktoren

Teilvorhaben: Erforschung der Mikrodispensierprozesse für die Mikroarray-Schnelltest-Plattform sowie Entwicklung von Antikörpern und Screeningverfahren

eingereicht im Rahmen der BMBF-Förderinitiative "Forschungscampus – öffentlich-private Partnerschaft für Innovationen" InfectoGnostics 2025

Laufzeit des Vorhabens:	01.09.2020 – 31.08.2025
Berichtszeitraum:	01.09.2020 – 31.08.2025

Inhaltsverzeichnis

Teil 2 Eingehende Darstellung 3
1 Ausführlichere Darstellung der Arbeiten und Ergebnisse 3
2 Wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 13
3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 14
4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans 14
5 Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 15
6 Veröffentlichungen des Ergebnisses 15

Teil 2 Eingehende Darstellung

1 Ausführlichere Darstellung der Arbeiten und Ergebnisse

Das Ziel des Vorhabens bestand darin, eine offene Multiparameter-Plattform für quantitative immunologische Assays unterschiedlicher Formate auf Mikroarray-Basis für die infektiologische Diagnostik zu entwickeln. Die adressierte Anwendung der neuen technologischen Lösungen im Bereich des Test- und Gerätedesigns ist die Diagnostik von zwei medizinisch hochrelevanten infektiologischen Indikationen. Zum einen sollte durch die parallele Messung von Anti-Erreger-Antikörpern eine umfassende Aussage zum Impfstatus ermöglicht werden und zum anderen sollte die Antigen-Bestimmung von bakteriellen Resistenzfaktoren gegen Antibiotika wesentliche Informationen für die Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten zur Verfügung stellen. Entsprechend des medizinischen und marktseitigen Bedarfs wurden hierfür Lateral-Flow-Assays als Schnelltestformat entwickelt. Parallel dazu erfolgte die Entwicklung eines multifunktionalen Mikroarray-Readers für das Antigen- und Antikörperscreening und die Auswertung von Lateral-Flow-Assays in der Entwicklungsphase.

Das Teilvorhaben beschäftigte sich mit der Entwicklung der Antikörper, Screeningverfahren und der Mikroarrays für die Applikationen mit den Aufgaben:

- Antikörperentwicklung und -produktion
- Entwicklung der Antikörper/Antigen-Screeningverfahren im Mikrotiterplatten-Format
- Entwicklung der Dispensiersubstanzen und Spottingprotokolle für Arrays auf Mikrotiterplatten und Membrantests
- Entwicklung und Herstellung der Arrays für die membranbasierten Anwendungen

Die Arbeiten waren in drei Hauptarbeitspakete gegliedert. Alle Aufgaben wurden in enger Kooperation mit den Verbundpartnern ausgeführt.

AP 1 Entwicklung des Betalaktamasen-Lateral Flow Test

Im ersten Arbeitspaket wurde die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen die weltweit wichtigsten Betalaktamasen unter Verwendung der Hybridomatechnik durchgeführt. Für die Immunisierung wurde rekombinante Antigene verwendet. Die Hybridomzelllinien wurden durch chemische Fusion von Milzzellen der immunisierten Mäuse mit Myelomzellen unter Verwendung von Polyethylenglykol hergestellt. Nach der Fusion fand eine Selektion der Klone durch den Zusatz von HAT zu dem Kulturmedium statt. Vor dieser Selektion wurde die HAT-Empfindlichkeit der Myelomzellen getestet, um die Ansiedlung nicht fusionierter Zellen zu vermeiden. Es erfolgte eine Klonierung und Reklonierung der Antikörper produzierenden Klone mithilfe des „minimal cell dilution“-Verfahrens, bis die Monoklonalität erreicht wurde. Die Anpassung der produzierenden Klone an normales Zellkulturmedium ohne Wachstumsfaktoren war notwendig, gefolgt von der Vermehrung und der Kryokonservierung der Klone, um die langfristige Verfügbarkeit sicherzustellen.

Zur Herstellung der Antikörper im Labormaßstab war eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen erforderlich. Dies umfasste die Schaffung eines Wachstumsumfeldes, das sowohl das Wachstum der Zellen als auch eine maximale Antikörperproduktion förderte. Das Erstellen von Wachstumskurven

sowie die Quantifizierung der Antikörperbildung in den Kulturüberständen waren entscheidend, um die Effizienz der Antikörperproduktion zu beurteilen. Die Wahl der Methode zur Antikörperaufreinigung hing vom spezifischen Antikörpertyp und dem verwendeten Zellkulturmedium ab. Es stellte sich heraus, dass die Affinitätschromatographie mit Protein A bzw. G-Sepharose als besonders effektiv erwies. Die Quantifizierung und die Qualitätskontrolle der gereinigten Antikörper wurden durch SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt, um sowohl die Spezifität als auch die Reinheit der produzierten Antikörper zu bestätigen.

Es wurden Antikörper gegen die Betalaktamasen blaVIM-1, blaNDM, blaKPC, blaOXA-48, blaOXA-23, blaCTX-M-15, blaCTX-M-9, blaIMP-1, blaOXA-58 und mcr-1 als Marker für die Resistenz gegenüber Colistin produziert und geliefert. Insgesamt wurden 69 unterschiedliche monoklonale Betalaktamasen-Antikörper aus den genannten Targets isoliert.

Für das Screening der Antikörper erfolgte die Etablierung eines Proteinmikroarrays, der unkomplizierte und schnell durchführbare Screeningtests ermöglicht. Der geplante Lösungsansatz sah die Verwendung eines Mikroarrays als „in-house“-Methode vor, wobei die rekombinanten Antigene als Fängermoleküle an einer festen Phase immobilisiert wurden (Abb. 1). Die Non-Contact-Spotting-Technologie stellte dabei die gewählte Methode zur Immobilisation der Antigene auf Mikrotiterplatten dar.

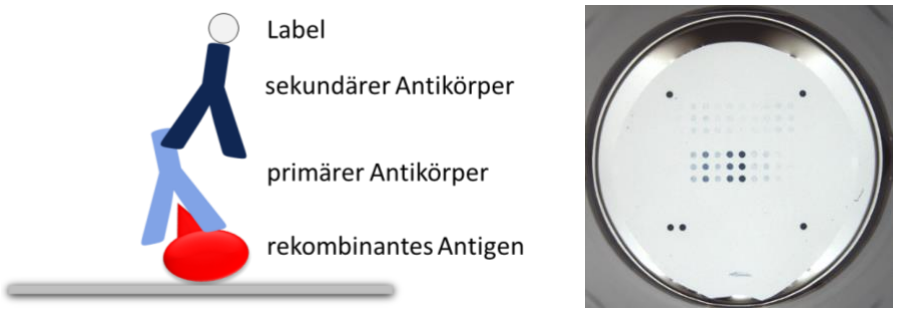


Abbildung 1: Aufbau indirekter ELISA (links) und Mikroarray (rechts)

Um die Effektivität dieser Methode zu gewährleisten, wurden verschiedene Parameter systematisch getestet und optimiert. Zunächst erfolgte die Untersuchung unterschiedlichster Oberflächenmodifikationen der Mikrotiterplatten, um kovalente und adsorptive Kopplungen der Antigene zu realisieren. Zusätzlich wurde eine Variation der Dispenser im Nanoliter- und Pikoliterbereich für das Spotting sowie der Spotgrößen durchgeführt, die zwischen 100 und 400 Mikrometern Durchmesser lagen. Diese Parameter beeinflussten maßgeblich die Qualität und Reproduzierbarkeit der resultierenden Proteinmikroarrays. Ebenso wurde die Spotting-Konzentration des Antigens variiert, wobei Werte zwischen 10 und 100 µg/ml berücksichtigt wurden. Die Anzahl der Tropfen pro Spot wurde ebenfalls adaptiert, wobei zwischen ein bis drei Tropfen pro Spot getestet wurden. Durch diese systematische Herangehensweise konnten die besten Bedingungen ermittelt werden, die eine stabile und reproduzierbare Herstellung der Proteinmikroarrays gewährleisteten.

Die erfolgreichen Tests führten zu den Ergebnissen, die nachwiesen, dass die Hybridomüberstände sowie die daraus isolierten Antikörper nicht nur funktional waren, sondern auch spezifisch an die rekombinanten Antigene binden konnten. Diese Beobachtungen wurden durch entsprechende Experimente, die an den entwickelten Mikroarrays durchgeführt wurden, verifiziert. Die Etablierung

des Screeningtests für den Nachweis der gegen Betalaktamasen gerichteten Antikörper erwies sich als durchweg erfolgreich. Hierbei konnten die Antigene als Fängermoleküle effektiv immobilisiert werden, und es zeigte sich, dass für alle getesteten Isolate identische Oberflächenmodifikationen, Dispensing-Techniken, Spotting-Volumina, Pufferbedingungen sowie Spotting-Konzentrationen verwendbar waren. Die Definition optimierter Parameter führte somit nicht nur zu einer reproduzierbaren Herstellung der Proteinmikroarrays, sondern legte auch die Grundlage für die weitere Charakterisierung der Antikörper, wobei der Fokus auf der Identifizierung geeigneter Kombinationen von Fänger- und Detektor-Antikörpern lag. Durch diese Methodik wurde die Qualität und Spezifität des Antikörpernachweises weiter verbessert.

Basierend auf dem erfolgreichen Screening wurden Prototypen der Proteinmikroarrays für den Betalaktamasennachweis entwickelt und deren Funktionalität geprüft. Der Projektpartner IPHT übernahm die Entwicklung des Assay-Protokolls, während der Partner -4H- JENA engineering GmbH die Prozessparameter zur Bildaufnahme definierte. Zudem war die fzmb GmbH verantwortlich für die Entwicklung des Informationstransfers des Array-Layouts. In diesem Kontext wurde eine elektronische Datenverarbeitung zur Weitergabe von Layout-Informationen in Bezug auf die Position der gespotteten Substanzen, Referenzspots zur Identifizierung der Position und Festlegung des Array-Grids, sowie zur Angabe erwarteter Spot-Durchmesser und Spot-Abstände entwickelt. Diese Informationen waren entscheidend für die automatisierte Auswertung der Array-Bilder.

Des Weiteren stellte die fzmb GmbH Referenz-Mikroarrays (Abb. 2) her, indem Farbstoffe in verschiedenen Konzentrationen gespottet wurden. Diese Arrays dienten dem Partner 4H zur Definition relevanter Prozessparameter.

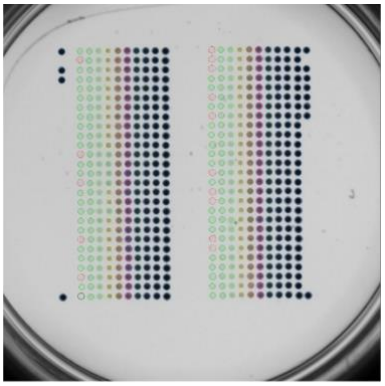


Abbildung 2: Referenz-Mikroarray mit unterschiedlichen Spotkonzentrationen

Die entwickelte elektronische Datenverarbeitung zur Weitergabe der Layout-Informationen wurde erfolgreich implementiert und getestet. Die Herstellung der Referenz-Mikroarrays und die Erzeugung von Spots mit variierenden Farbintensitäten wurden erfolgreich abgeschlossen. Der Spot-Erkennungs-algorithmus der Software erkannte erfolgreich die Spots und wertete diese aus. Durch die Analyse der unterschiedlichen Farbintensitäten der Spots war es möglich, den Auswertebereich zu optimieren. Diese Optimierung führte zu einer präziseren Identifizierung und Charakterisierung der analysierten Proben. Die Fähigkeit des Algorithmus, subtile Unterschiede in den Farbnuancen zu erkennen, trug entscheidend zur Verbesserung der Analyseergebnisse bei.

Die Entwicklung der Lateral-Flow-Assays basierte auf den Vorarbeiten zur Entwicklung funktionaler Antikörperpaarungen. Die Immobilisierung der Fängerantikörper erfolgte mittels Non-Contact-Spotting-Technologie auf Nitrocellulose-Membranen. Zu Beginn der Arbeiten wurde ein grundlegendes Verständnis für die optimale Nutzung der Non-Contact-Spotting-Technologie geschaffen, indem verschiedene Dispenser getestet wurden. Dieser Test hatte das Ziel, die effizienteste Methode zur Präzision bei der Abgabe der Antikörper zu identifizieren. Schlussendlich zeigte sich der Nanoliterdispenser als die effektivste Lösung für das Spotting, da er die Größe und Verteilung der Spots präzise kontrollieren konnte, was für die Qualität des späteren Assays von wesentlicher Bedeutung war. Weiterhin zeigten die Antikörper keinen Funktionalitätsverlust durch diese druckbasierte Dispensiermethode.

Ein weiterer zentraler Aspekt des Projekts war die Untersuchung, inwieweit die Variation von Spotanzahl und Volumina die Signalintensität der resultierenden Lateral-Flow-Streifen beeinflusste. Diese Streifen wurden an die Projektpartner übergeben, um erste Versuche mit einer Reihe unterschiedlicher Konjugate durchzuführen. Diese Tests waren entscheidend, um fundierte Informationen über die Leistungsfähigkeit der Antikörper zu sammeln und deren Anwendbarkeit in einem realen Testumfeld zu bewerten.

Zusätzlich wurde die Porengröße der verwendeten Nitrocellulose-Membranen intensiver analysiert. In diesem Kontext wurden Membranen mit drei unterschiedlichen Porengrößen (100, 140 und 180 CN) getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren signifikant, da die Membran mit der mittleren Porengröße (CN140) optimale Signalstärken bei konstanten Fließeigenschaften aufwies. Neben den Fließeigenschaften wurde auch die Spotmorphologie betrachtet, welche auch bei einer 140er Porengröße die besten Ergebnisse aufwies (Abb. 3).

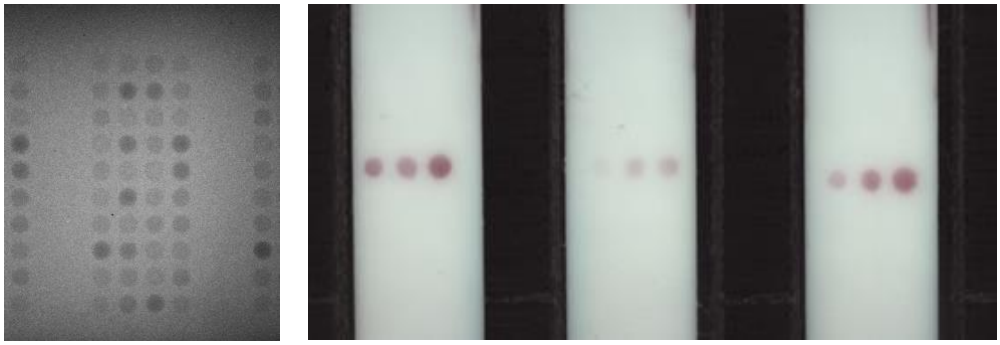


Abbildung 3: Aufnahme nach dem Spotting mittels Kopfkamera des Dispensers (links); unterschiedliche Spotanzahl und Porengrößen; linke Membran mit Porengröße 140 (rechts)

Parallel dazu wurde das Cut-Marker-Spotting auf 30 cm langen Sheets durchgeführt. Hierbei kam es zu einer weiteren Optimierung der Marker-Erkennung im Guillotine Cutter, die durch Anpassungen der Farbstoffkonzentration erzielt wurde. Dies gewährte eine exakte Trennung der einzelnen Arrays mit einer erhöhten Genauigkeit von ± 0,1 mm, was wiederum die Effizienz der Verarbeitung nach dem Spotting-Prozess verbesserte.

Im Besonderen stellte die Qualitätskontrolle der hergestellten Arrays eine Herausforderung dar. Aufgrund der schnellen Trocknung der Spots war eine kamerabasierte Überprüfung der Qualität nach Abschluss des Spotting-Prozesses nicht praktikabel. Um diese Problematik zu adressieren, wurde ein speziell abgestimmter Farbstoff im Spotting-Puffer eingesetzt. Dieser Farbstoff musste die Fähigkeit

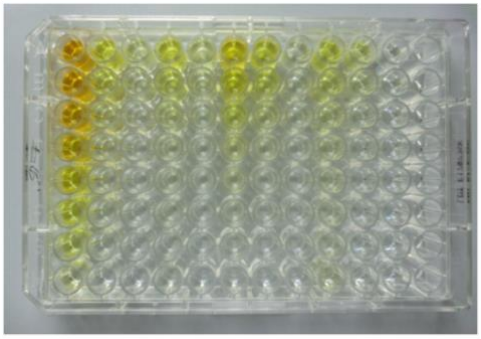
haben, sich während der Assay-Prozesse auszuwaschen, ohne die analytische Performance des Tests zu beeinträchtigen. Dieser Schritt war besonders wichtig, um eine verlässliche Testergebnissicherheit zu gewährleisten. Dieser Farbstoff konnte problemlos ausgewaschen werden, ohne die Funktionalität der Antikörper zu beeinträchtigen.

Die Kombination aus präzisen Spotting-Techniken, der sorgfältigen Auswahl der Membranen und den Optimierungen bei der Qualitätskontrolle sorgte dafür, dass die entwickelten Prototypen nicht nur funktional waren, sondern auch den hohen Standards der analogen Performance entsprachen.

AP 2 Entwicklung eines Multiparametertests zur Detektion des Impfstatus

Für die Entwicklung von Referenz-ELISA für spezifische Impfstatus-Antigene wurden in diesem Arbeitspaket die notwendigen Voraussetzungen geschaffen. Basierend auf den definierten Targets identifizierte der Projektpartner IPHT die wichtigsten Antigene (Tetanus, Diphtherie, Masern, Mumps, Bordetella pertussis, Polio, Rubella, Hepatitis) und führte eine umfassende Recherche durch, um kommerzielle Quellen dieser Antigene zu finden. Zu einem späteren Zeitpunkt kam SARS-CoV-2 als Antigen dazu. Das FZMB stellte die erforderlichen Referenz-ELISA zur Verfügung, um die Funktionalität der beschafften Antigene zu testen.

Die Entwicklung der ELISA erfolgte durch die Implementierung von Screeningtests, welche die Vorteile einer einfachen und schnellen Durchführung boten. Für diese Tests wurde eine flexible Methodik etabliert, die eine genaue und zuverlässige Analyse der Antigene ermöglichte. Zunächst wurden die Antigene als Fängermoleküle auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Diese feste Phase ermöglichte eine gezielte Interaktion zwischen den Antigenen und den Antikörpern. Nach der Inkubation des immobilisierten Antigens mit Serumproben wurde die Detektion der gebundenen Antikörper durch einen mit Peroxidase markierten Sekundärantikörper, etwa anti-human-IgG-HRP, durchgeführt. In einem letzten Schritt wurde das Chromogen umgesetzt, was zu einer farblichen Reaktion führte, die quantitativ ausgewertet werden konnte. Für die ordnungsgemäße Durchführung der Tests war es entscheidend, die optimalen Konzentrationen der verwendeten Antigene und Sekundärantikörper zu bestimmen. Hierbei wurden verschiedene Versuchsansätze verfolgt, um die Sensitivität und Spezifität der Assays zu maximieren. Die Etablierung zuverlässiger Assay-Kontrollen stellte sicher, dass die Ergebnisse reproduzierbar und valide waren. Die Funktionalität der durch das IPHT beschafften Antigene wurde durch eine systematische Optimierung der Antigen- und Sekundärantikörper-Konzentrationen durchgeführt. Dies führte zu einem erfolgreichen Screening eines Serenpanels aus der Probenbank, das mit dem Referenz-ELISA untersucht wurde (Abbildung 4). Das Screening wurde im Projektablauf mit Ausbau der Probenbank permanent erweitert.



Proben-ID	Diphterie OD	Tetanus OD	Masern OD	VZV OD	Röteln OD	Mumps OD
LW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NEG	0,04	0,06	0,09	0,03	0,02	0,00
STD	0,94	0,89	0,97	0,93	0,95	1,01
STD	0,14	0,76	0,99	0,92	0,98	1,01
57	0,07	1,43	2,05	2,16	2,06	1,31
58	0,63	1,83	1,66	2,03	2,28	1,25
59	0,05	0,71	2,10	2,35	1,59	1,29
60	0,90	2,34	1,23	1,95	1,34	1,39
61	0,67	1,01	1,92	2,58	1,26	0,38
62	0,30	1,85	1,69	2,66	1,24	0,38
63	1,60	2,16	1,84	0,74	2,02	1,15
64	0,17	0,81	1,47	1,87	1,32	0,64
65	0,91	1,53	1,23	1,56	2,26	0,08
66	0,44	0,91	1,88	2,05	1,95	1,70
67	0,14	1,59	1,82	1,61	2,46	1,06
68	1,06	2,24	2,17	2,37	1,66	1,32

Abbildung 4: Referenz-ELISA (links); Ausschnitt der Ergebnis-Tabelle der optischen Dichten zu den Referenzseren (rechts)

Nach der erfolgreichen Etablierung der Referenz-ELISA und der damit verbundenen Identifizierung funktionaler Antigene wurden diese Antigene als Grundlage für die Konstruktion von Proteinmikroarrays ausgewählt. Diese Mikroarraysysteme ermöglichen eine parallele Analyse zahlreicher Proben. Für die Testung wurden die Impfantigene entsprechend Schema in Abb. 5 in eine 96er Mikrotiterplatte als Vakzin-01 Array gespottet.

Spot-ID	Antigen	
1-3	Ag_Diphteria-Toxoid	Antigen-Auswahl
4-6	Ag_Tetanus-Toxoid	
7-9	Ag_Bordetella-pertussis-Toxin	
10-12	Ag_Measles-Virus_Premium	
13-15	Ag_Mumps-Virus	
16-18	Ag_VZV_Glycoprotein	
19-21	Ag_VZV_Envelope_Glycoprotein_I	
22-24	Ag_VZV_Envelope_Glycoprotein_E	
25-27	Ag_Rubella_Virus	
28-30	Ag_Rubella_Spike_Ectodomain_E1-E2	
31-33	Ag_Polio_VP1	
34-36	Ag_Polio_VP2	
37-38	Polio1_VP3_rec.IVS	
39-41	Ag_Rubella_particles	
42-44	Ag_HepB_rek.-Surface_ad	
45-47	Ag_HepB_rek.-Surface_ay	
48-50	S2_N_2.23.6.89_VS	Covid-19
51-53	S2_Spike-S1-S2_2.23.6.90_VS	
54-57	human-IgG	Kontrollen
58-59	human-IgM	
60	Puffer	
61	Ag_rec.Protein-A/G-HRP_0.2	

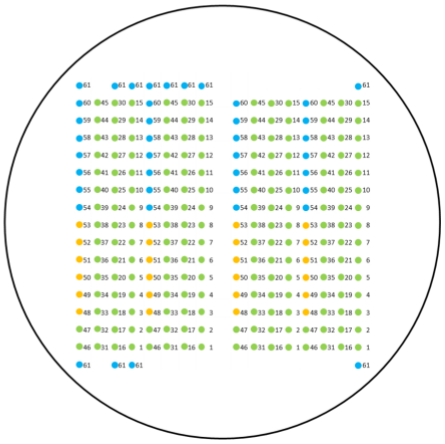


Abbildung 5: Array-Layout des Vakzin-01 Array (tabellarisch und schematisch)

Im späteren Verlauf des Projektes wurden unterschiedliche Vakzin-Arrays hergestellt, bei welchen weitere bzw. andere Impfantigene verwendet wurden. Die Prozessparameter für die Herstellung der Mikroarrays wurde optimiert. Die systematische Untersuchung dieser Variablen führte zur Definition optimaler Parameter, die eine reproduzierbare Herstellung der Proteinmikroarrays ermöglichten. Diese Bedingungen wurden dokumentiert, um später eine konsistente Qualität und Reproduzierbarkeit sicherzustellen. Die produzierten Arrays wurden den Projektpartnern zur weiteren Bearbeitung und Anwendung zur Verfügung gestellt. Abbildung 6 zeigt beispielhaft zwei vom IPHT prozessierte Arrays mit je einem Serum mit und ohne Antikörper gegen das Tetanus-Antigen.

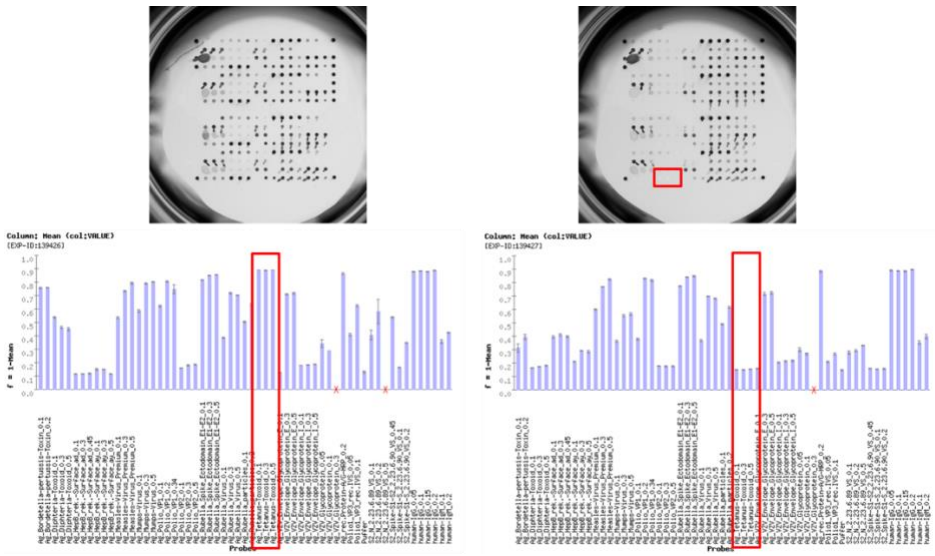


Abbildung 6: Screening mit Referenzseren: Tetanus positiv (links) und Tetanus negativ (rechts)

Bei der Übertragung der Referenz-ELISA auf einen mikroarray-basierten Test wurde eine gezielte Herangehensweise verfolgt, um die Effizienz und Multiplexfähigkeit der Tests zu maximieren. Das primäre Ziel war es, die bisherigen Lösungen hinsichtlich der Testmethodik zu verbessern und das Multiplexing der verschiedenen Antigene in den Mittelpunkt zu stellen. In diesem Kontext war die Entwicklung einer Software von zentraler Bedeutung, die die Layout-Informationen der Mikroarrays elektronisch verarbeitet. Die Software, die in dieser Phase entwickelt wurde, ermöglichte die elektronische Übertragung der Layout-Daten, was eine präzise Identifizierung der Positionen der gespottenen Substanzen und der Referenzspots zur Bestimmung der Array-Ausrichtung und zur Festlegung des Array-Grids sicherstellte. Diese Informationen waren entscheidend für die richtige Auswertung der Tests. Dabei konnte auf die Ergebnisse aus AP 1 zurückgegriffen werden.

Im Verlauf der Arbeiten wurde die Software wiederholt getestet und optimiert. Es wurde besonders Wert daraufgelegt, dass die Benutzerfreundlichkeit gegeben war und dass auch komplexe Anforderungen, wie die automatische Griderkennung und die Anpassung von Spotgrößen und Spotabständen, berücksichtigt wurden. Neben der automatisierten Spoterkennung spielt auch das Erkennen von Fehlspots oder Verunreinigungen eine entscheidende Rolle. Der Algorithmus zur Spoterkennung wurde soweit optimiert, dass weitestgehend alle Verunreinigungen erkannt und markiert bzw. bei der Berechnung ausgeschlossen werden. Der Projektpartner IPHT, der für die Entwicklung des entsprechenden Assay-Protokolls verantwortlich war, konnte die neue Ansätze effektiv in die bestehenden Protokolle integrieren, was die endgültige Übertragung der Referenz-ELISA auf das mikroarray-basierte System erleichterte. Der zu den Analysen benötigte Reader wurde von der Firma -4H- JENA engineering GmbH entwickelt und als Prototyp zur Verfügung gestellt, was ein Auslesen der Mikroarrays mit den neuen Software-Features ermöglichte.

Die Übertragung der Microarrays auf das Lateral-Flow-Format erfolgte mittels Non-Contact-Spotting-Technologie der Impfantigene auf Nitrocellulose-Membranen, um die Grundlage für die Entwicklung eines funktionalen Lateral-Flow-Assays zu schaffen. Zunächst fanden Vorversuche zum Spotting des Cut-Markers auf 30 cm langen Nitrocellulose-Sheets statt. Dies beinhaltete auch die anschließende Marker-Erkennung im Guillotine Cutter, was entscheidend für die spätere automatisierte Verarbeitung der Assays war. Hier konnte auf die Vorarbeiten aus AP 1 zurückgegriffen werden. Nach diesen grundlegenden Tests wurden erste Singleplex-Impfstatus-Tests im Nano- und Pikoliterbereich

appliziert, um die Eignung der Non-Contact-Spotting-Technologie zu validieren und zu optimieren. Insbesondere der Einsatz eines Nanoliterdispensers stellte sich als besonders vorteilhaft heraus, da er die höchsten Signalintensitäten für die immobilisierten Impfantigene erzielte. Dies war ein wichtiger Schritt, um die Empfindlichkeit des späteren Assays zu gewährleisten. Neben den Intensitäten wurde hier auch der Einfluss der Spotpositionierung auf der Membran näher untersucht.

Um die Fließeigenschaften der Nitrocellulose-Membran weiter zu untersuchen, wurden mehrere Layouts entwickelt und bereitgestellt. Bei den damit produzierten Lateral-Flow Assays wurden Vorversuche im Dip-Stick Format durchgeführt, um die Fluiddynamik und die Signalverstärkung zu beurteilen. In diesen Tests zeigte sich, dass eine versetzte Anordnung der Spots signifikante Vorteile hinsichtlich der Signalintensität brachte. Dies führte zu einer verbesserten Nachweisbarkeit der Antigen-Antikörper-Interaktionen und war ein wesentlicher Fortschritt in der Optimierung des Assay-Designs. Abbildung 7 zeigt zwei verschiedene Spotanordnungen, wobei Spots in Laufrichtung teilweise hintereinander lagen. Außerdem ist ein prozessierter Dipstick zu erkennen, welcher eine Schweifbildung unmittelbar hinter den Spots zeigt. Bei einer Spotanordnung, bei welcher die Spots in Laufrichtung hintereinanderliegen, führt dies dazu, dass der hintere Spot nicht genügend Kontakt zur Probe und dem Konjugat hat, was zu schwächeren Intensitäten führte.

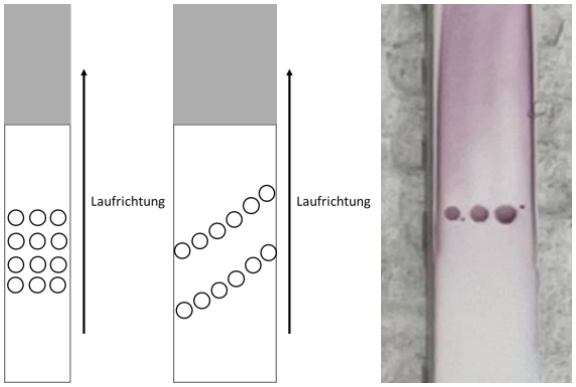


Abbildung 7: Unterschiedliche Spotpositionierung (links); prozessierter Dipstick mit Schweifbildung hinter den Spots (rechts)

Es wurden Experimente mit breiteren Streifen, versetzten Spotanordnungen und variierenden Proben- sowie Konjugat-Konzentrationen durchgeführt. Parallel dazu wurden verschiedene Konjugate getestet, um deren Eignung für die spezifischen Anwendungen im Rahmen des Projektes zu überprüfen. Diese Tests erfolgten in enger Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Senova, die Rückmeldungen zur Performance der eingesetzten Reagenzien gaben. Die Methodik des Spotting-Prozesses wurde nicht nur hinsichtlich der technischen Parameter, sondern auch unter Berücksichtigung der erforderlichen Qualitätssicherungsmaßnahmen optimiert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, mögliche Risiken wie unzureichende Spot-Morphologie und die Verwendung von Marker-Farbstoffen, die die analytische Performance negativ beeinflussen könnten, zu minimieren. Durch den Einsatz geeigneter Farbstoffe im Spotting-Puffer wurde erreicht, dass diese sich später durch die Substanzen des Assays vollständig auswaschen ließen, ohne die assayspezifischen Reaktionen zu stören.

Es fanden Spottings auf mehreren Membransheets statt, um die Prozessstabilität zu evaluieren. Diese Schritte waren entscheidend, um sicherzustellen, dass die Spotting-Prozessparameter, die zuvor

definiert worden waren, ordnungsgemäß funktionierten und eine qualitativ hochwertige Übertragung der Impf-Antigene gewährleistet wurde. Die Erkenntnisse aus diesen ersten Testreihen flossen in die weiteren Planungen und die Produktion von Lateral-Flow-Streifen ein, was die Grundlage für die Fabrikation eines Prototyps bildete. Abbildung 8 zeigt die Mastersheets im Hochpräzisions-Mikrodispenser. Das Spotting erfolgt zunächst ohne aufgebrachtes Saug-, Konjugat- und Proben-Pad. Dadurch ist keine zusätzliche Z-Bewegung nötig und die Applikation der Proben kann beschleunigt erfolgen.

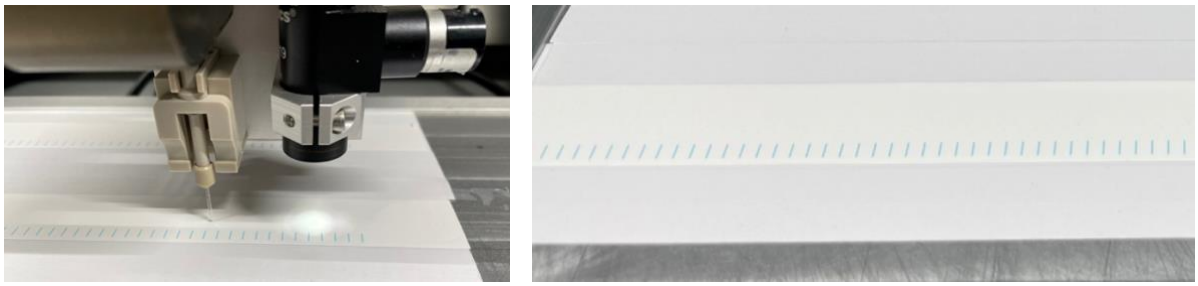


Abbildung 8: Spotting auf Mastershets mit Cutmarker und Proben mittels Nanoliterdispenser

Die fertigen Protein-Mikroarrays wurden dem Projektpartner Senova zur Verfügung gestellt, welcher für die Herstellung und Konfektionierung des Lateral-Flow-Assay-Prototypen verantwortlich war. Dies ermöglichte es, die Prototypen für zukünftige Anwendungen gezielt im Rahmen des Projekts zu nutzen.

Abbildung 9 zeigt die prozessierten Lateral-Flow-Test-Streifen in der Schnelltestkassette.

Abbildung 9: Lateral-Flow-Assays in Kassetten

Im Rahmen der Produktion der Prototypen wurde die Inter-Batch und Intra-Batch Performance der LFAs untersucht. Die Antigene wurden dazu immer im Vorfeld frisch verdünnt. Die Analyse ergab, dass der Produktionsprozess stabil war. Es konnte nachgewiesen werden, dass die LFAs auch in größeren Stückzahlen störungsfrei produziert werden konnten. Die Ergebnisse bestätigten die Zuverlässigkeit und Konsistenz des Herstellungsverfahrens, was für zukünftige Produktionen entscheidend ist.

Im Rahmen des AP 2.7 wurde eine vielfältige Reihe von Multiparameter-Lateral-Flow-Tests hergestellt, mit dem Ziel, diese im Zuge weiterer Forschungsaktivitäten langfristig zu verifizieren und zu validieren. Das FZMB spielte eine zentrale Rolle in diesem Prozess, indem es die Analyse der mit dem Prototyp des Readers erzeugten Bilder übernahm. Diese Bilder initiierten die umfassende Auswertung aller durchgeführten Tests. Die gesammelten Daten wurden anschließend den Projektpartnern zur Verfügung gestellt, was essenziell für die präzise Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und der Korrelation der Tests im Vergleich zum etablierten Referenz-ELISA war. Darüber hinaus erstellte das FZMB mit der Einrichtung einer Ergebnisdatenbank, die eine systematische und optimale Verwaltung der gesammelten Daten ermöglichte. Diese lückenlose Dokumentation stellte sicher, dass alle Schritte der Entwicklungsarbeit nachvollziehbar waren, was eine unverzichtbare Grundlage für eventuelle spätere Produktentwicklungen bildete.

Während des Projekts wurde das Einlesen der abgearbeiteten Lateral-Flow-Arrays mithilfe eines multifunktionalen Mikroarray-Detektionsgeräts in die Wege geleitet. Erste Bewertungen der Signalintensitäten fanden bereits statt, um die Leistungsfähigkeit der Tests zu beurteilen. Parallel dazu wurde die Ergebnisdatenbank in der Software implementiert, um die gesammelten Daten adäquat zu katalogisieren und damit eine weitreichende Dokumentation zu gewährleisten. Das Image Archive, das innerhalb der Software integriert wurde, bot die Möglichkeit, sämtliche Bilder und die entsprechenden Auswertungen der Spots zu speichern. Nutzer konnten die gesammelten Informationen unter dem jeweiligen Projekt und den spezifischen Experimenten ablegen. Für jedes Bild wurden relevante Informationen wie die Spots, Intensität, Experimentspezifikationen, Probenname, Datum und Grid hinterlegt. Dies ermöglichte sowohl den Zugriff auf historische Daten als auch die Option, Daten erneut einzulesen, was insbesondere von Bedeutung war, wenn Anpassungen an der Software oder dem Auswertealgorithmus vorgenommen wurden.

Zusätzlich wurde eine Cloud-Funktion implementiert, die den Projektpartnern einen erleichterten Zugriff auf die Daten erlaubte und die Möglichkeit eröffnete, kollaborativ an den Ergebnissen zu arbeiten. Die gesammelten Resultate wurden auf einem Server gespeichert, was eine zentrale und sichere Datenhaltung gewährleistete. Diese Fortschritte verbesserten nicht nur die Effizienz der Datenverarbeitung, sondern trugen auch zur Transparenz und Nachvollziehbarkeit der wissenschaftlichen Ergebnisse bei. Abbildung 11 zeigt einen Screenshot aus dem Image Archive der Software.

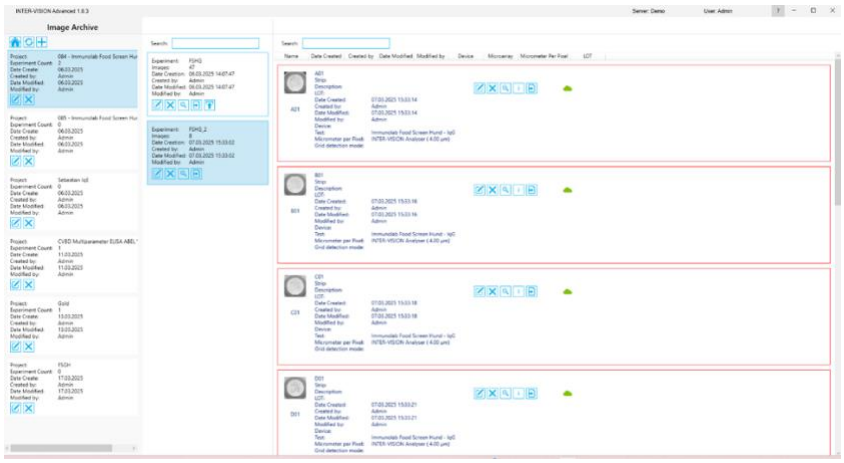


Abbildung 11: Image Archive

AP 3 Entwicklung eines multifunktionalen Mikroarray-Readers

Zur Erstellung des Lastenhefts sowie des Systemkonzepts des angestrebten Mikroarray Readers fand eine umfassende Funktions- und Anforderungsanalyse statt. Bei dieser Analyse wurden die Anforderungen der Anwender, vertreten durch das IPHT, sowie die Anforderungen der Entwickler, vertreten durch das FZMB, berücksichtigt. Die Anforderungen an den Mikroarray Reader umfassten spezifische Spezifikationen, die unter anderem die Mikroarray-Größe, den Fokus, die Spot-Größen und die Auflösung betrafen. Um sicherzustellen, dass alle Anforderungen präzise definiert waren, durchlief das Lastenheft mehrere Prüfungsprozesse. Diese Prüfungsprozesse wurden in enger Abstimmung mit den Partnern des Projekts durchgeführt, um eine gemeinsame Sichtweise auf die Entwicklung zu gewährleisten. Nach intensiven Diskussionen und der Bearbeitung von Rückmeldungen wurde schließlich das finale Lastenheft freigegeben. Dieses Dokument diente als Grundlage für das weitere Vorgehen und stellte sicher, dass alle Projektpartner auf einer klaren und einheitlichen Basis weiterarbeiten konnten.

Ein zentrales Ergebnis des Projekts war die Entwicklung eines Prototyps für ein Mikroarray-Detektionsgerät, dessen Einsatz zur Auswertung von Assays auf Basis von Mikroarrays und Mikrotiterplatten vorgesehen war. Die Arbeiten gliederten sich in vier Unterarbeitspakete, die einzelnen Projektpartnern zugewiesen wurden. Der Lösungsansatz sah vor, das Gerät zur Auswertung mit den erforschten Assays in den verschiedenen Formaten zu verwenden.

Die Testung des multifunktionalen Mikroarray-Detektionsgerätes umfasste verschiedene Mikroarray-Formate. Die mechanische Funktionsweise des Gerätes, wie das Ein- und Ausfahren des Probenhalters, sowie das Stoppen des Probenhalters bei Betätigung des LED-Knopfs wurden intensiv getestet. Des Weiteren wurde die homogene Beleuchtung sowohl im Durchlicht als auch im Auflicht überprüft, um die Gleichmäßigkeit der Lichtverteilung zu gewährleisten. Die präzise Ansteuerung der definierten Positionen stellte einen weiteren Prüfpunkt dar, wobei auch der Einbau von Adaptern für das Einlesen verschiedener Mikroarray-Formate erprobt wurde. Die generelle Handhabung des Gerätes, einschließlich des Aufbaus und des Einschaltvorgangs, war ebenfalls Teil der Testreihe. Ein zentraler Aspekt der Tests betraf die Softwarekompatibilität. In diesem Zusammenhang wurde unter anderem die Ansteuerung der Motoren und der Beleuchtungsquellen sowie das Ein- und Ausfahren des Probenhalters getestet.

Die gewonnenen Ergebnisse flossen in die Berichterstattung ein und wurden mit den Projektpartnern geteilt, um eine transparente Kommunikation über den Fortschritt und die Herausforderungen des Projekts zu gewährleisten. Das Hauptziel, die Auswertung der Mikroarrays auf Lateral-Flow-Assays sowie 96-Mikrotiterplatten durchzuführen, wurde erreicht.

2 Wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Mittelverwendung (Personal, Material, FE-Leistungen) erfolgte innerhalb der genehmigten Kostenstruktur.

3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Arbeiten wurden entsprechend Planung durchgeführt. Es handelte sich um sehr aufwendige Entwicklungsarbeiten über einen Zeitraum von 60 Monaten. Das fzmb hat dabei in enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern erfolgreich an der Erreichung des Projektziels gearbeitet. Alle Projektziele wurden erreicht.

4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Das Projekt adressierte den großen medizinischen Bedarf an einfach handhabbaren, präzisen Schnelltestsystemen, die als Multiparameter-Format in der Lage sind, umfassende diagnostische Aussagen für komplexe Fragestellungen zeit- und patientennah zu liefern. Um diesem Bedarf gerecht zu werden, sind neuartige technologische Lösungen im Bereich der Multiplex-Schnelltestdesigns unverzichtbar. Der Indikationsbereich für die im Vorhaben entwickelten Tests bedient den weltweiten großen Bedarf an einer zeit- und patientennahen infektiologischen Diagnostik. Viele lebensbedrohende Infektionskrankheiten stellen weltweit trotz aller Fortschritte in ihrer medizinischen Erforschung und Therapie ein großes gesundheitliches Problem dar. Die Ursachen für das Wiederaufkommen alter und das Entstehen neuer, häufig länderübergreifend auftretender Infektionserkrankungen sind in unterschiedlichen Regionen der Welt vielschichtig. Die globale Mobilität von Menschen wie auch von Lebensmitteln fördert ihre Verbreitung. Dazu kommt das große Problem, dass ursprünglich erfolgreiche Behandlungen von Infektionskrankheiten mit Antibiotika aufgrund zunehmender Resistenzen der Erreger ihre Wirksamkeit verlieren.

Zu den wesentlichen Voraussetzungen, um diese Entwicklungen kontrollieren und entsprechend reagieren zu können, gehören Kenntnisse über den aktuellen Immunitätsstand gegenüber bestimmten Infektionskrankheiten sowie über das Vorhandensein von bakteriellen Resistenzfaktoren gegen Antibiotika.

1. Die schnelle Vor-Ort-Erfassung des Impfstatus von Menschen (z.B. Migranten, Fernreisende, Immunsupprimierte, Kinder) sowie Tieren ist einer der wichtigsten transsektoralen Ansätze zur Prävention von verschiedenen Infektionskrankheiten. Die mit dem neuen infektiologischen Schnelltestsystem zu erhebenden Multiparameter-Befunde zur Existenz von Antikörpern als Maß für den Impfschutz werden nicht nur klinische, sondern auch sozioökonomische Bedeutung sowie großen Anwendernutzen für die dezentrale Diagnostik und Therapie haben. Das gilt insbesondere, weil die Spezifikationen des Systems seinen Einsatz auch in Regionen der Welt erlauben werden, in denen solche Parameter wegen der unzureichenden technischen Ausstattung bislang nicht bestimmt werden können. Andererseits kann die einfache, schnelle und exakte Prüfung der Immunität gegen bestimmte Infektionskrankheiten auch dazu beitragen, unnötige, in Einzelfällen mit Nebenwirkungen behaftete Impfungen zu vermeiden. Die neue Mikroarray-basierte Multiplex-Schnelltest-Plattform wird in Kombination mit dem multifunktionalen Lesegerät durch die parallele Bestimmung unterschiedlicher Antikörper zeitnahe Aussagen zum Impfstatus für indizierte Panel an Infektionskrankheiten ermöglichen.
2. Die zweite, für die neue Multiplex-Plattform ausgewählte Indikation, der direkte und parallele Nachweis der wesentlichen Betalaktamasen als bedeutende Resistenzfaktoren mittels preis-

günstiger Schnelltests ist hochrelevant für Epidemiologie, Hygiene und Therapie von Infektionen mit MRGN. Der Markt für derartige Produkte befindet sich aufgrund der weltweit steigenden Anzahl von nosokomialen Infektionen und Antibiotikaresistenzen in stetem Wachstum. Eine kontinuierliche Zunahme ist hier vor allem bei den MRGN zu verzeichnen. Ein besonderes Problem stellen dabei Carbapenemase-bildende Enterobacteriaceae dar.

Insgesamt wird die Verfügbarmachung einer Multiparameteranalytik im Schnelltestbereich in den beiden adressierten Indikationsbereichen der infektiologischen Diagnostik ein evidenz-basiertes präventives und therapeutisches Vorgehen ermöglichen und maßgeblich die Effektivität, Sicherheit und damit auch Wirtschaftlichkeit der Diagnostik verbessern. Der Markteintritt der neuen Produkte wird durch aussagekräftige diagnostische Leistungsparameter und durch Parameter wie Zeit- und Kosteneffizienz sowie einfache Handhabbarkeit erleichtert werden.

Die Vermarktung von Test und Lesegerät wird zusammen mit den Partnern Senova GmbH und -4H-JENA engineering GmbH erfolgen. Die fzmb GmbH ist für die Bioreagenzien für die Resistenz-bestimmung und die Herstellung der Mikroarrays verantwortlich. Die Vermarktung der Schnelltest-Mikroarrays zur Impfkontrolle und Resistenzfaktorbestimmung wird durch die Senova GmbH erfolgen. Senova verfügt über entsprechende Vertriebskanäle, die eine erfolgreiche Platzierung am Markt erlauben. Dafür müssen vorab die Arbeiten für eine IVD-Zulassung abgeschlossen werden. Die Senova GmbH geht, basierend auf dem Marktvolumen, von Verkaufszahlen für die Mikroarray-Schnelltests für beide Indikationen aus, die sich nach Markteinführung von 45.000 Tests pro Jahr auf 190.000 Tests im fünften Jahr nach Markteintritt steigern werden. Die fzmb GmbH wird an den Verkaufserlösen durch die Lieferung der Mikroarrays zu einem Preis von zwei Euro pro Test partizipieren. Zusätzlich wird mit Einnahmen durch Kooperationen und Dienstleistungen gerechnet, da die neue Multiplex-Mikroarray-Plattform ein vielseitiges Anwendungspotenzial besitzt.

5 Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit wurden keine konkurrierenden Produkte bekannt.

6 Veröffentlichungen des Ergebnisses

Folgende Veröffentlichungen wurden im Projektverlauf durch die fzmb GmbH zusammen mit den Projektpartnern gemacht:

Sindy Burgold-Voigt, Elke Müller, David Zopf, Stefan Monecke,Sascha D. Braun, Katrin Frankenfeld, Michael Kiehntopf, Sebastian Weis, Thomas Schumacher, Mathias W. Pletz, Ralf Ehricht & The CoNAN Study Group: Development of a new antigen-based microarray platform for screening and detection of human IgG antibodies against SARS-CoV-2; Scientific Reports, 2022, 12:8067, DOI 10.1038/s41598-022-10823-7

Elke Müller, Sindy Burgold-Voigt, David Zopf, Stefan Monecke, Sascha D. Braun, Katrin Frankenfeld, Michael Kiehntopf, Sebastian Weis, Thomas Schumacher, Mathias W. Pletz, Ralf Ehricht: Development and validation of a new antigen-based microarray platform for screening and detection of human IgG antibodies against SARS-CoV-2; Poster zur 74. DGHM Jahrestagung, 5.-7. September 2022, Berlin (Posterpreis)

Dominik Gary: Rapid detection of vaccination status by using a new antigen based microarray lateral flow assay; Vortrag; 7th AMR Conference Novel Antimicrobials & AMR Diagnostics, Basel, 16.-17.03.2023

Elke Müller, Sindy Burgold-Voigt, Sascha D. Braun, Stefan Monecke, David Zopf, Katrin Frankenfeld, Domenique Krähmer, Thomas Schumacher, Hans-Hermann Söffing, Ralf Ehricht: Development of a new antigen-based microarray platform for screening and detection of human IgG antibodies against vaccine antigens and transfer to a lateral flow assay; Poster, KIT 2023, 16. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, 14.-17.06.2023

Sascha D. Braun, Martin Reinicke, Celia Diezel, Elke Müller, Katrin Frankenfeld, Thomas Schumacher, Hugo Arends, Stefan Monecke and Ralf Ehricht: High-throughput screening of monoclonal antibodies against carbapenemases using a multiplex protein microarray platform; Front. Microbiol., Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, Volume 16 – 2025; https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1650094, 26.08.2025

Sascha D. Braun, Elke Müller, Martin Reinicke, Celia Diezel, Katrin Frankenfeld, Thomas Schumacher, Hugo Arends Ralf Ehricht: High-throughput screening of monoclonal antibodies against carbapenemases using a multiplex protein microarray platform; Poster, 77. DGHM-Jahrestagung 2025, Jena, 22.-24. September 2025

Sascha D. Braun, Elke Müller, Martin Reinicke, Celia Diezel, Katrin Frankenfeld, Shahinda Rezk, Ralf Ehricht: Establishing an epidemiological platform for Carbapenem resistance in Egypt: using data visualization tool microreact and microarray for real-time surveillance and data integration; Poster, 77. DGHM-Jahrestagung 2025, Jena, 22.-24. September 2025