Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Zuwendungsempfänger	Förderkennzeichen
BLINK AG	**13GW0456A**

Vorhabenbezeichnung

Verbundprojekt:

Adaptierbare dezentrale Diagnostik für die Tier- und Humanmedizin (ADA)

Teilvorhaben:

Adaptierbare dezentrale Diagnostik-Plattform für die Tier- und Humanmedizin (ADA-P)

Laufzeit des Vorhabens

01.09.2020 – 31.08.2025

Berichtszeitraum

01.09.2020 – 31.08.2025

Teil I: Kurzbericht

1. Aufgabenstellung

Im Rahmen des ADA-P Teilvorhabens der BLINK AG wurden folgende Ziele verfolgt:

1) Definition der wesentlichen Produktanforderungen (Marker, Probenvorbereitung) für die Human- und Veterinärmedizin
2) Erforschung und Anwendung der Nanoreaktorbeads für einen Multiplex Assay
3) Etablierung einer geeigneten Probenvorbereitung für Veterinär- und Humanmedizin für Laboranwendung und Kartusche
4) Erstellen einer Multiprobenkartusche
5) Integration des kompletten Assay-Ablaufs in die BlinkOne Plattform
6) Fertigung und Bereitstellung eines Demonstrator Gerätes für die geplanten Anwendertests
7) Etablierung einer Möglichkeit zur Untersuchung der Wirtsantwort bei S. aureus Infektionen
8) Erarbeitung eines Konzeptes für die Sequenzierung von Amplifikationsprodukten in Nanoreaktorbeads
9) Bewertung der Machbarkeit der phänotypischen Resistenzbestimmung mittels Nanoreaktorbeads

2. Voraussetzungen und Stand der Technik

Staphylococcus aureus ist einer der häufigsten klinisch relevanten Bakterien und kann sowohl in Menschen als auch in Tieren verschiedenste Infektionen verursachen. Es soll eine adaptierbare dezentrale MRSA-Diagnostik-Plattform für die Tier- und Humanmedizin erarbeitet werden. Die wenigen POC-Anwendungen für molekularbiologische MRSA-Tests sind nicht multiplexfähig, können keine Punktmutationen abbilden und sind hinsichtlich der relevanten Marker und bezüglich des Nachweises von klinisch und therapeutisch relevanten Virulenzfaktoren beschränkt. Verfügbare Möglichkeiten im Labor sind die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), mit hohem Arbeitsaufwand, schlechter Standardisierbarkeit, aber geringen Kosten oder MALDI-TOF, Multi-locus sequence typing (MLST) und spa-Typisierung, welche für den POC-Einsatz ungeeignet sind. Weitere mögliche Methoden wären die DNA-Mikroarrays oder Methoden des „next generation sequencing“ (NGS), allerdings sind Kosten und Aufwand für Routine- und Screening Anwendungen sehr hoch.

Für die Verarbeitung von mehreren Proben (Sample-Multiplexing) in einer Kartusche zur umfänglichen Detektion des Erregers und seiner Virulenz-Marker am Ort des Geschehens innerhalb kürzester Zeit sind weder in der wissenschaftlichen Literatur noch als kommerzialisiertes Produkt Lösungen bekannt. Bislang übliche Pooling-Verfahren, die insbesondere bei niedrig prävalenten Erregern eingesetzt werden, haben durch die zwangsläufige Verdünnung der Probe immer eine zu geringe Sensitivität. Darüber hinaus stellt der Mangel an Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Targets (Target-Multiplexing) mit höchster Empfindlichkeit für Anwendungen außerhalb von Laborumgebungen eine wesentliche technologische Lücke dar, die mit unserem Vorhaben geschlossen werden soll.

Sequenzierungsverfahren haben bislang keinen Eingang in dezentrale Test-Formate gefunden. Während die Durchführung der eigentlichen Sequenzbestimmung mit der Einführung der Nanopore-Sequenzierung mit einem sehr kompakten Gerät möglich ist, ist der gesamte Arbeitsablauf einschließlich der erforderlichen Probenvorbereitung nach wie vor sehr aufwendig, teuer und langsam und nicht außerhalb des Labors möglich. In AP2 des Gesamtvorhabens soll eine automatisierbare, schnelle und dezentrale Möglichkeit der Probenvorbereitung mit anschließender Sequenzierung untersucht werden.

In der klinischen und veterinärmedizinischen Infektionsüberwachung ist es von entscheidender Bedeutung, frühzeitig mit einer wirksamen Therapie beginnen zu können. Die zusätzliche Bestimmung der Wirtsantwort kann dabei von großer Hilfe sein, um den Krankheitsverlauf besser vorhersehen zu können. Neue Ansätze zur schnelleren Bestimmung von phänotypischen Resistenzprofilen sind für eine wirksame Antibiotikatherapie wichtig. Eine neue Methode stellt die Wachstumsanalyse von Mikroorganismen in kodierten mikrofluidischen Tröpfchen dar. Bislang sind keine Arbeiten zur Implementierung von kodierten Emulsionsreaktoren in dezentral einsetzbaren automatisierten Vorrichtungen bekannt.

3. Ablauf des Vorhabens und Zusammenarbeit mit Partnern

Das Projekt ADA hat mit Unterstützung des Netzwerks InfectoGnostics Forschungscampus Jena fünf Partner (BLINK AG, Leibniz-IPHT, Leibniz-HKI, UKJ und das FLI) zu einer stark verdichteten Zusammenarbeit zusammengeführt.

1) Die Produktanforderungen wurden definiert:
    a. mit dem UKJ: Probenvorbereitung humanmedizinischer Proben
    b. mit dem FLI: Probenvorbereitung veterinärmedizinischer Proben
    c. mit dem IPHT: Anforderungen an das MRSA-Marker Panel (mit Prioritätsstufen)
2) Erstellung von Nanoreaktorbeads für Multiplex Assays
    a. Etablierung von 16 verschiedenen Codes mit zwei Fluoreszenzkanälen
    b. Erforschung von Multiplex-Nanoreaktoren zur Wirtsantwort Analyse
3) Herstellung von lyophilisierten Bakterien-Pellets zur Verwendung als interne Prozesskontrolle (IPC)
    a. In Absprache mit dem IPHT wird *Bacillus atrophaeus* als IPC verwendet
4) Erarbeitung einer generellen Probenvorbereitung für die Veterinär- und Humanmedizin für Laboranwendung und Kartusche
    a. Informationen zu klinischen Probenmatrizes (UKJ) und Bereitstellung von Milchproben (FLI)
    b. Regelmäßige Besprechungen zur Erarbeitung des finalen Assay Protokolls mit UKJ, FLI, IPHT
5) Erstellung einer Multiprobenkartusche und Integration des kompletten Assay-Ablaufs
6) Unterstützung der Durchführung des Anwendertests
    a. Bereitstellung eines Demonstrator Gerätes und der 16 kodierten und mit Markern gekoppelten Nanoreaktoren für das IPHT
    b. Bereitstellung Analyse-Software und Dokumentations-Software für das IPHT
    c. Auswertung der analytischen Performance des Anwendertestes des IPHTs
7) Darstellung einer Möglichkeit zur Untersuchung der Wirtsantwort mittels Luciferase Detektion in Multiplex-Nanoreaktorbeads

8) Änderung des Konzeptes des automatisierten Gesamtprozesses für die Sequenzierung von Amplifikationsprodukten zu einer automatisierbaren Probenvorbereitung einer Sequenzierbibliothek
9) Bewertung der Machbarkeit der phänotypischen Resistenzbestimmung mittels Nanoreaktorbeads
    a. Evaluation der Kodierungsmöglichkeiten von Droplets mit dem HKI

4. Wesentliche Ergebnisse

Die Arbeiten für die Erstellung eines Nanoreaktorbead basierten MRSA Multiplex Tests wurden erfolgreich abgeschlossen und wesentliche Erkenntnisse erarbeitet:

- Priorisiertes Marker Set für MRSA mit Antibiotika-Resistenz- und Virulenzfaktoren und fortlaufendes Screening neuer Marker durch den Partner IPHT (Entstehung vieler wissenschaftlichen Paper)
- Lyophilisiertes standardisiertes Pellet einer internen Prozesskontrolle, Nutzung projektübergreifend und für andere Campuspartner möglich
- Adaptierbare universell einsetzbares Multiplex-Nanoreaktorbead Set mit 16 Kodierungen
- Digitale PCR als Singleplex und Multiplex PCR in Nanoreaktoren qualitativ gleiche und verbesserte Prozess Ergebnisse gegenüber quantitativer PCR (Goldstandard)
- Assay Protokoll für veterinärmedizinische Milchproben und humanmedizinische Abstrichproben etabliert
- Erfolgreicher MRSA-Multiplex-Anwendertest von veterinär- und humanmedizinischen Proben
- Assay im Kartuschen Format am vollautomatischen Diagnostikgerät - BLINK One durchführbar
- Erfolgreiche Dekodierung von Bead basierten Sample-Multiplex Experimenten
- Etablierung einer Methode zur Erstellung einer Sequenzierbibliothek mit Nanoreaktorbeads
- Erkenntnisse zur phänotypischen Resistenzbestimmung mittels Streulichtmessung gesammelt

Jena, den 16.01.2026