



Deutscher Studienpreis | 1. Preis Natur- und Technikwissenschaften

Entwicklung eines spektroskopischen Schnelltests zur Detektion und quantitativen Charakterisierung von Antibiotika-Resistenzen bei Sepsis-Pathogenen

Multiresistente Bakterien sind eine globale Bedrohung für Gesundheit und Ernährung. Antibiotika werden wirkungslos. Mikrobiologische Diagnostik ist unumgänglich, um eine gezielte Therapie bei lebensbedrohlichen bakteriellen Infektionen einzuleiten. In dieser Arbeit wurden innovative Strategien zur schnellen Resistenztestung entwickelt. Mikrofluidik-Chips in Kombination mit Raman-Spektroskopie erlauben phänotypische Charakterisierung von Pathogenen. Schon nach 30 min Exposition wurden erste Antibiotika-induzierte Effekte in den Spektren nachgewiesen. Resistente Bakterien wurden nach 60 min zuverlässig detektiert. Nach nur 90 min Interaktion wurde die minimale Hemmkonzentration mit einem einfachen Ausleseverfahren bestimmt. Ein drastischer Zeitgewinn im Vergleich zu klassischen Methoden, welche 16 bis 20 Stunden benötigen. Flexibilität, Robustheit und Automatisierbarkeit des photonischen Verfahrens lassen die klinische Anwendbarkeit zu. Vorteile sind Kostensenkung und Eindämmung neuer Resistenzen.

Johanna Kirchhoff promovierte an der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Fachgebiet Physikalische Chemie.

Der vorliegende Beitrag wurde beim Deutschen Studienpreis 2020 mit dem 1. Preis in der Sektion Natur- und Technikwissenschaften ausgezeichnet. Er beruht auf der 2019 an der Friedrich-Schiller-Universität Jena eingereichten Dissertation »Charakterisierung der Antibiotika-Empfindlichkeit von Sepsis-Pathogenen mittels Raman-Spektroskopie« von Johanna Kirchhoff.

Entwicklung eines spektroskopischen Schnelltests zur Detektion und quantitativen Charakterisierung von Antibiotika-Resistenzen bei Sepsis-Pathogenen

Hintergrund

In den letzten Jahren sind multiresistente Keime zu einem weltweiten Problem herangewachsen. Wirkungsvolle Antibiotika verlieren ihre Wirksamkeit. Bei einer lebensbedrohlichen bakteriellen Infektion, wie einer Sepsis, muss sofort mit einer Antibiotika-Therapie begonnen werden. Der lebensbedrohliche Erreger muss beseitigt werden, um den Patienten zu retten. Jede Stunde zählt! Ist der Erreger resistent, wirkt die empirische Initialtherapie nicht.

Ich bin kein Arzt, ich bin Mikrobiologin. Bei der infektiösen Probe des Patienten beginnt mein Job: Es muss dringend getestet werden, auf welches Antibiotikum der Erreger reagiert. Es muss ein Resistogramm des Erregers angelegt werden. Der Erreger muss aber erst aus der Patientenprobe isoliert werden und dann identifiziert, dann dessen Antibiotika-Empfindlichkeiten charakterisiert. Darauf müssen Arzt und Patient in der Regel mehrere Tage warten, weil in der mikrobiologischen Routinediagnostik zeitaufwendige kulturbasierte Methoden verwendet werden. Wie be-

reits erwähnt, der Patient auf der Intensivstation bekommt, weil die lebensrettende Therapie nicht warten darf, sofort ein stark dosiertes Breitbandantibiotikum oder eine Kombination aus mehreren Antibiotika. Ist es ein »lieber« sensitiver Keim, ist solch eine Therapie völlig übertrieben.

»Mit Kanonen auf Spatzen schießen«, wie Prof. Michael Bauer (Klinikdirektor Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena) sagt. Geht man aber mit einer sanften Schmalband-Antibiose an den lebensbedrohlichen Keim, gewöhnt sich dieser an die Behandlung und entwickelt Resistenzen gegen solche Substanzen. Das angewendete Antibiotikum ist für diesen Erreger keine wirksame Behandlungsoption mehr. »Use it and you lose it«, wie sich Prof. Mathias Pletz (Institutsdirektor Infektionsmedizin, Universitätsklinikum Jena) zum Antibiotika-Gebrauch äußerte. Ein Teufelskreis, die Behandlung und die Resistenzentwicklung.

Die Evolution der Bakterien, die Entwicklung von Resistenzen, können wir nicht aufhalten. Aber wir können schnellere Tests entwickeln. Schneller Resistenzen detektieren. Schneller ein richtiges Antibiotikum definieren. Gezieltes Dosieren. Weniger Nebenwirkungen. Besserer Therapierfolg. Resistenzentwicklung eindämmen. Die Patienten könnten viel schneller mit einer zugeschnittenen, effektiven Antibiotika-Therapie behandelt werden. Das ist

meine Motivation. Die Resistenztestung drastisch zu beschleunigen. Einen schnelleren Resistenztest zu entwickeln. Die Antibiotika-Empfindlichkeiten von Sepsis-Erregern in kürzester Zeit zu ermitteln.

Dies kommt Menschen jeden Alters aller Bevölkerungsgruppen zugute, denn Sepsis kann jeden treffen und im Leben bedrohen. Es lassen sich Dauerschäden abmildern und in Anzahl senken, Krankenhausaufenthalte verkürzen und somit auch Behandlungskosten einsparen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die phänotypischen Reaktionen von Sepsis-verursachenden Bakterien auf eine Antibiotikum-Behandlung mittels Raman-Spektroskopie untersucht und hinsichtlich ihrer Antibiotika-Empfindlichkeit charakterisiert. Es wurden die Interaktionen von bedeutenden Sepsis-Pathogenen verschiedener Gruppen mit klinisch relevanten Antibiotika unter unterschiedlichen Bedingungen sowie einem variierenden Setup untersucht. Die Untersuchungen wurden in der interdisziplinären Forschungsgruppe von Prof. Ute Neugebauer am Center for Sepsis Control and Care am Universitätsklinikum Jena und von Prof. Jürgen Popp am Leibniz-Institut für Photonische Technologien (Leibniz-IPHT) durchgeführt.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Raman-spektroskopischen Verfahrens zur unverzüglichen Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit von aus Patientenmaterial isolierten Bakterien. Diese Untersuchungen dienen als Grundlage für einen neuen Schnelltest zur Identifizierung und Empfindlichkeitstestung, der die mikrobiologische

Diagnostik innerhalb weniger Stunden gewährleisten soll. Eine schnellere Methode zur Empfindlichkeitstestung ist von höchstem klinischem Interesse, um eine zielgerichtete und schonende Antibiotika-Therapie bei lebensbedrohlichen Infektionen schneller zu starten sowie die Entstehung von Resistenzen zu reduzieren.

Zunächst wurden verschiedene Zeitpunkte zwischen 30 und 120 Minuten der Antibiotika-Pathogen-Interaktion getestet, um einen frühestmöglichen Test-Zeitpunkt für spektrale, Antibiotika-induzierte Effekte aufzudecken. Dabei konnten schon nach 30 min Interaktionszeit Effekte in den Raman-Spektren der Bakterien nachgewiesen werden. Die spektralen Unterschiede mit und ohne Antibiotika-Behandlung wurden verwendet, um ein Klassifikationsmodell zu trainieren, welches eine effektive Antibiotika-Behandlung anzeigt. Die Qualität und Robustheit des statistischen Klassifikationsmodells zur Detektion der Interaktion konnte durch einen unabhängigen Testdatensatz, der von einem anderen Experimentator erstellt wurde, mit einer Vorhersage-Genauigkeit von über 90 % evaluiert werden. Als Referenz zur spektroskopischen Methode wurden Wachstumskurven mit und ohne Antibiotikum anhand der optischen Dichte aufgenommen. [JK1]

Anschließend wurde der Fokus auf die Detektion von Antibiotika-Resistenzen bei dem häufig multiresistenten gramnegativen (MRGN) Bakterium *Escherichia coli* gerichtet. Für die Untersuchungen wurde ein Quadrupol-Dielektrophorese-Chip (DEP) verwendet, mit welchem lebende Bakterien im

Urin isoliert werden können. Auf dem Chip werden die Bakterien einer Suspension mittels eines inhomogenen elektrischen Feldes in einem kleinen Bereich gesammelt und können direkt Raman-spektroskopisch analysiert werden. Dadurch wird Vorbereitungs- und Messzeit gespart. Damit sich die Testkulturen im exponentiellen Wachstum befinden, wurden sie für 60 min vorkultiviert, dann erfolgte die Gabe von Antibiotika, oder die Kultur blieb als Kontrolle unbehandelt. Proben für die Raman-spektroskopische Analyse wurden über einen Zeitraum von 2 h nach der Antibiotika-Gabe entnommen. Nach einer minimalen Probenvorbereitung von etwa 10 min wurden die Bakterien auf dem Chip gefangen und innerhalb von Sekunden Raman-spektroskopisch analysiert. Mit multivariaten statistischen Analysen wurden Markerbanden in den Spektren identifiziert, die der Differenzierung der Antibiotika-Empfindlichkeit und damit zur schnellen Erkennung von resistenten Stämmen dienen. So konnte mit dem kombinierten DEP-Raman-Setup bei E. coli Resistenz gegen das Antibiotikum Ciprofloxacin nach 60 min Interaktionszeit anhand eines robusten Klassifikationsmodells verlässlich detektiert werden. Beobachtete spektrale Effekte korrelieren mit dem Wirkmechanismus des Fluorchinolons Ciprofloxacin, welches die DNA-Synthese hemmt. Die Spektren der unbehandelten Kontrollen und der behandelten resistenten E. coli reflektieren die typischen Wachstumsphasen einer Bakterienkultur. Als Referenz für die Ciprofloxacin-induzierte Wachstumshemmung dienten Wachstumskurven,

die anhand der optischen Dichte aufgenommen wurden. [JK2]

Um eine potentielle klinische Anwendbarkeit zu demonstrieren, wurde die Prozedur des Quadrupol-DEP-Chips in ein DEP-basiertes Mikrofluidik-System integriert, welches die Raman-spektroskopische Analyse von Bakterien in Suspension automatisiert ermöglicht. Der integrierte DEP-basierte Mikrofluidik-Chip ist ein geschlossenes Chip-System, welches den einfachen und sicheren Umgang mit dem infektiösen Probenmaterial gewährleistet und sich einfach in ein Raman-Mikroskop integrieren lässt. Analog zu den Experimenten mit dem Quadrupol-DEP-Chip wurden ein sensitiver und ein resistenter E.-coli-Stamm nach einer 60-minütigen Vorkultivierung mit Ciprofloxacin behandelt, oder die Kulturen blieben als Kontrolle unbehandelt. Über einen Zeitraum von 120 min wurden die Bakteriensuspensionen über ein Spritzenpumpensystem in den Mikrofluidik-Chip gegeben, wo die Bakterien aufgrund der dielektrophoretischen Kräfte in zehn mikroskopisch kleinen Bereichen gesammelt werden. Die Raman-spektroskopische Analyse erfolgt ebenfalls innerhalb von Sekunden. Die spektralen Daten der Bakterien des Mikrofluidik-Chips wurden in das statistische Klassifikationsmodell projiziert, welches mit den Daten des sensitiven Stammes anhand des Quadrupol-DEP-Chips erstellt wurde. Bei beiden Setups mit den verschiedenen Chips zeigte die Analyse der Spektren die gleichen Effekte, welche die Wirkung des Antibiotikums widerspiegeln. Durch die Anwendung des Mikrofluidik-Chips kann

ten, innerhalb von insgesamt 3,5 h Analysezeit und mit minimalem manuellem Aufwand, Ciprofloxacin-resistente *E. coli* mit einer statistischen Sensitivität von über 90 % detektiert werden. Diese Ergebnisse besagen, dass sich die Prozedur und das Klassifikationsmodell zur Detektion von Resistenzen zwischen verschiedenen Geräten übertragen lässt und bedienerunabhängig ist, was wichtige Aspekte für eine potentielle Anwendung in der klinischen Diagnostik sind. [JK2]

Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurde in dieser Arbeit ein schnelles und einfaches spektroskopisches Verfahren zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) entwickelt und exemplarisch für *E. coli* und Ciprofloxacin demonstriert. Zur Zeitersparnis wurde auf die 60-minütige Vorkultivierung verzichtet. Die Bedingungen für den Test wurden anhand von Laborstämmen mit bekannter MHK festgelegt. Die Bakterien wurden direkt aus der stationären Phase entnommen und in frisches Nährmedium mit klinisch relevanten Ciprofloxacin-Konzentrationen gegeben. Nach 90 min Kultivierung wurden die *E. coli*-Suspensionen auf den Quadrupol-DEP-Chip gegeben und Raman-spektroskopisch analysiert. Herkömmliche standardisierte Tests zur Bestimmung der MHK werden nach 16 bis 20 h ausgewertet, während die Raman-Spektren nahezu in Echtzeit aufgenommen und sofort analysiert werden. Die gesamte Prozedur der Raman-spektroskopischen MHK-Bestimmung kann innerhalb von 2 h ausgeführt werden. Die Testparameter für die spektroskopische Empfindlichkeitstestung wurden so de-

finiert und optimiert, dass die Ergebnisse mit den standardisierten phänotypischen Tests korrelieren, wobei eine maximale Zeitersparnis zu den herkömmlichen Tests angestrebt wurde. Eine Hauptkomponentenanalyse wurde verwendet, um die spektralen Unterschiede der Reaktion auf die unterschiedlichen Ciprofloxacin-Konzentrationen zu beschreiben. Zwei spektrale Markerbanden, die der Differenzierung einer sensitiven (Wachstumshemmung) beziehungsweise resistenten Reaktion (Wachstum) dienen, wurden definiert. Das Intensitätsverhältnis dieser Markerbanden reflektiert deutlich den konzentrationsabhängigen Effekt von Ciprofloxacin auf das Wachstum von *E. coli* nach 90 min Interaktion. In einem Balkendiagramm, welches das Intensitätsverhältnis der Markerbanden darstellt, können subinhibitorische und inhibitorische Konzentrationen unterschieden werden, und die MHK kann einfach unter dem so definierten Schwellenwert von 1 abgelesen werden. Die Validierung der 90-min-MHK-Methode erfolgte mit Ciprofloxacin-sensitiven und resistenten klinischen *E. coli*-Isolaten, die aus Blut von Sepsis-Patienten stammen. Alle resistenten Stämme wurden mit dem Raman-spektroskopischen 90-min-MHK-Test detektiert. Als Referenz wurden herkömmliche Tests zur MHK-Bestimmung (Mikrodilutionstest, Lebendzellzahlbestimmung) verwendet. Die Raman-spektroskopischen MHK-Werte, die innerhalb von 2 h ermittelt wurden, sind in guter Übereinstimmung mit den ermittelten MHK-Werten der Referenztests, die am nächsten Tag ausgewertet werden. [JK3]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Grundlage für einen optisch-spektroskopischen Schnelltest zur Detektion von Antibiotika-Resistenzen bilden und das Potential der Raman-Spektroskopie als schnelle und verlässliche mikrobiologische Analyse-methode zeigen. Die markierungsfreie biophotonische Methode charakterisiert die phänotypische Antwort der Mikroorganismen, wodurch auch unbekannte Bakterien und neue antimikrobielle Wirkstoffe getestet werden können. Der Innovationsgehalt besteht vor allem in einer drastischen Verkürzung der Diagnosezeit einschließlich einer schnellen quantitativen Resistenzbestimmung (MHK).

In an diese Arbeit anschließende Projekte wird das spektroskopische Verfahren auf weitere Antibiotika und weitere pathogene Bakterien erweitert. Die DEP-basierten Chips werden hinsichtlich einer schnellen, automatisierten diagnostischen Methode weiterentwickelt und optimiert. Ziel hierbei ist die Translation der Technologie zu einer patientennahen, flexiblen, universell einsetzbaren und anwenderfreundlichen Labordiagnostik. Als Produkt kann sie miniaturisiert zu einem kompakten, mobilen Diagnosegerät internationale Märkte erschließen.

Referenzen aus der kumulativen Dissertation:

[JK1] Cora Assmann*, Johanna Kirchhoff*, Claudia Beleites, Jessica Hey, Sophia Kostudis, Wolfgang Pfister, Peter Schlattmann, Jürgen Popp, Ute Neugebauer (2015). **Identification of vancomycin interaction with *Enterococcus faecalis* within 30 min of interaction time using Raman spectroscopy.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(27), 8343-8352. doi:10.1007/s00216-015-8912-y

(*geteilte Erstautorenschaft)

[JK2] Ulrich-Christian Schröder*, Johanna Kirchhoff*, Robert Nißler, Uwe Hübner, Günther Mayer, Uwe Glaser, Thomas Henkel, Wolfgang Pfister, Wolfgang Fritzsche, Jürgen Popp, Ute Neugebauer (2017). **On-chip spectroscopic assessment of microbial susceptibility to antibiotics within 3.5 hours.** *Journal of Biophotonics*. doi:10.1002/jbio.201600316

(*geteilte Erstautorenschaft)

[JK3] Johanna Kirchhoff, Uwe Glaser, Jürgen Bohnert, Jürgen Popp, Ute Neugebauer (2018). **Simple Ciprofloxacin Resistance Test and Determination of Minimal Inhibitory Concentration within 2 h Using Raman Spectroscopy.** *Analytical Chemistry*, 90(3): p. 1811-1818. doi:10.1021/acs.analchem.7b03800