

Schlussbericht

Förderkennzeichen: 13GW0329

Laufzeit des Vorhabens: 01.08.19 – 31.12.22

Verbundprojekt: Outbreak Checker

Lab-on-a-Chip Analysesystem zur Detektion und Resistenzbestimmung von *Acinetobacter baumannii*

Teilvorhaben: Diagnostisches Testsystem zum Nachweis von *A. baumannii* und seiner Resistenzgene

Teil I: Kurze Darstellung des Projektes

Das Ziel der inno-train innerhalb des Verbundprojektes ist die Erarbeitung einer Isolation bakterieller DNA aus Abstrichtupfern sowie eines Systems zum Nachweis von *Acinetobacter baumannii* spezifischen Sequenzen und Sequenzen von relevanten Resistenzgenen, welche anschließend auf einem mit zu erarbeitenden mikrofluidischen Chip etabliert werden. Die zu erarbeitende Auswertesoftware gewährleistet die Verarbeitung und Auswertung der generierten Daten.

Für die geplanten Arbeiten stand eine ausreichende Laborausstattung und Personal bei inno-train zur Verfügung. Die Planung des Projektes fand während der Antragsphase statt und wurde im Spezifikationssheet zu Beginn des Projektes weiter konkretisiert. Der Ablauf des Projektes verlief weitestgehend planmäßig.

Das Projekt knüpft an den folgenden wissenschaftlichen und technischen Stand an:

Bei den konventionellen Nachweissystemen zur Detektion von Antibiotika-resistenten Bakterien wird auf kulturbasierte Methoden zurückgegriffen. Anschließend werden diese phänotypisch und massenspektrometrisch untersucht. Diese Methoden erfordern eine entsprechende Laborausstattung und Fachkompetenz, welche nur in spezialisierten Laboren gegeben ist. Lange Wachstumszeiten von bis zu 72 h resultieren in einem deutlichen zeitlichen Verzug von der Probenentnahme bis zum Ergebnis, obwohl für eine zeitnahe Behandlung ein schnelles Ergebnis von Bedeutung ist.

inno-train bietet den Kunden schon aktuell in-vitro Diagnostika an, die entweder das Potential zur Automation besitzen oder schon automatisiert sind. Aufgrund des hohen Innovationsdrucks innerhalb des Marktsegments klinische Diagnostik in Richtung Vollautomation kann die im Projekt zu realisierende Technologieplattform als Basis zur Automation bestehender Systeme genutzt werden.

Während der Projektlaufzeit wurden die regulatorischen Anforderungen mit den für die in vitro Diagnostik-Zulassung verantwortlichen benannten Stellen besprochen und diese Anforderungen im Projekt berücksichtigt.

Teil II: Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung

Inno-train hatte folgende wissenschaftlich-technischen Ziele, die während der Projektlaufzeit bearbeitet wurden:

- Erstellung eines Spezifikationssheets
- Erarbeitung eines Protokolls zur DNA-Extraktion aus Abstrichtupfern von Haut-, Anal/Rektalabstrichen
- Erstellung eines *A. baumannii* Probenpanels
- Design des Amplifikationssystems zur Resistenzdetektion
- Erarbeitung von PCR-Multiplexen
- Design des Amplifikationssystems zur Ausbruchs-Screeningplattform
- Evaluierung des Assays für die Ausbruchs-Detektion
- Etablierung des Assays auf dem Chip
- Entwicklung einer Datenauswerte-Software
- Systemintegration
- Systemvalidierung

Wie nachfolgend ersichtlich wird, wurden alle Ziele innerhalb der Projektlaufzeit erreicht.

1. AP1: Spezifikation der Testplattform

Zu Beginn des Projektes wurden die Spezifikationen für die Testplattform definiert und im Laufe des Projektes entsprechend erweitert und angepasst. Die definierten Spezifitäten sind dem entsprechenden Anforderungsprofil zu entnehmen.

Fazit: Spezifikationsheet liegt vor.

2. AP2: Erarbeitung einer DNA Isolation

2.1 Erarbeitung eines Protokolls zur DNA-Extraktion aus Abstrichtupfern von Haut-Anal/Rektalabstrichen

Zur Erarbeitung eines Protokolls zur DNA Extraktion aus Abstrichtupfern von Haut- und Anal/Rektalabstrichen wurde der Tupfer in folgenden Lösungen für die Resuspension des Tupfers getestet (je 500 µL):

- dH₂O
- dH₂O und 1% SDS
- dH₂O und 1% Tween 20
- dH₂O und 10 µL Proteinase K
- dH₂O + Tween 20 (verschiedene Konzentrationen) + Proteinase K (verschiedene Konzentrationen)

Die einzelnen Ergebnisse zu den untersuchten Parametern sind in den jeweiligen Zwischenberichten dokumentiert. Die Proben wurden unverdünnt / 1:2 / 1:10 / 1:20 / 1:50 in die PCR eingesetzt. Die besten Ergebnisse zeigten sich bei den unverdünnten Proben bei

Verwendung von reinem Wasser bzw. dH₂O mit 1% Tween20 und 0,004 µg/µL Proteinase K.

Das finale Protokoll sieht wie folgt aus:

- Abstrich Entnahme an der Wangen-Innenseite
- Trocknung des Tupfers für 5 min bei Raumtemperatur
- Inkubation des Tupfers in einer Lösung aus dH₂O und 1 % Tween 20 und 0,004 µg/µL Proteinase K für 10 min bei 56 °C im Wasserbad
- PCR (unverdünnter Probeneinsatz)
- Fluoreszenzbasierte Auswertung

Auch der häufig in Krankenhäusern verwendete Amies-Puffer konnte zur DNA Freisetzung verwendet werden.

Fazit: Es konnte eine Methode zur DNA-Freisetzung aus Abstrichtupfern evaluiert werden.

3 AP3: Konzeption und Evaluierung PCR-basierter *A. baumannii*-Assay

Design des Amplifikationssystems

Für den gezielten Nachweis von Antibiotika-resistenten *A. baumannii* wurden die PCR-Reaktionen unter Verwendung von standardisierten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien etabliert. Dazu wurden die bei inno-train verwendeten Standards für einen TaqMan-Assay verwendet: Real-Time-Gerät, weiße 96-well PCR-Platten aus Polypropylen, PCR-Mastermix (inkl. DNA-Polymerase, dNTPs, diverse Pufferkomponenten). Hierfür wurden mittels Referenzsequenzdatenbanken Oligonukleotide (Primer und Sonden) zur Bestimmung verschiedener erregerspezifischer DNA-Loci und Resistenzgen-Sequenzen designt. Die Nachweisreaktionen der Resistenzgene wurden zunächst im Singleplex vorgenommen und anschließend als Multiplexe zusammengefasst. Die nachzuweisenden Gene wurde wie folgt festgelegt:

Tabelle 1: Überblick über die abgedeckten Resistenzgene der Singleplexreaktionen

| | Gen | Beschreibung | Allel | Ziel |
|----|----------------|--|-------------------|---------------------|
| 1 | rpoB | Haushaltsgen | rpoB | <i>A. baumannii</i> |
| 2 | blaOXA-51-like | Oxacillinasen | blaOXA-51-like | <i>A. baumannii</i> |
| 3 | | | blaOXA-51-like | Resistenzgen |
| 4 | | | blaOXA-23-like | Resistenzgen |
| 5 | | | blaOXA-24/40-like | Resistenzgen |
| 6 | | | blaOXA-58-like | Resistenzgen |
| 7 | | | blaOXA-143-like | Resistenzgen |
| 8 | | | mcr-1, -2, -6 | Resistenzgen |
| 9 | mcr | Phosphoethanol-amintransferase | mcr-3, -7 | Resistenzgen |
| 10 | | | mcr-4 | Resistenzgen |
| 11 | | | mcr-5 | Resistenzgen |
| 12 | | | mcr-8 | Resistenzgen |
| 13 | | | mcr-9, -10 | Resistenzgen |
| 14 | blaADC | Acinetobacter-derived Cephalosporinase | blaADC | Resistenzgen |

| | | | | | |
|----|----------|-----------------------------------|---------------------|------------------|--|
| 15 | blaNDM | Metallo-Beta-Laktamasen | blaNDM | Resistenzgen | |
| 16 | blaGIM | | blaGIM | Resistenzgen | |
| 17 | blaVIM | | blaVIM Gruppe 1+2 | Resistenzgen | |
| 18 | | | blaVIM Gruppe 3 | Resistenzgen | |
| 19 | blaIMP | | blaIMP Gruppe 1 | Resistenzgen | |
| 20 | | | blaIMP Gruppe 2+3 | Resistenzgen | |
| 21 | | | blaIMP Gruppe 4a | Resistenzgen | |
| 22 | | | blaIMP Gruppe 4b | Resistenzgen | |
| 23 | | | blaIMP Gruppe 5 | Resistenzgen | |
| 24 | | | blaIMP Gruppe 6 | Resistenzgen | |
| 25 | blaGES | | blaGES | Resistenzgen | |
| 26 | blaPER | extended-spectrum-Beta-Laktamasen | blaPER | Resistenzgen | |
| 27 | blaTEM | | blaTEM | Resistenzgen | |
| 28 | blaSHV | | blaSHV | Resistenzgen | |
| 29 | blaVEB | | blaVEB | Resistenzgen | |
| 30 | blaCTX-M | | blaCTX-M Gruppe 1 | Resistenzgen | |
| 31 | | | blaCTX-M Gruppe 2.1 | Resistenzgen | |
| 32 | | | blaCTX-M Gruppe 2.2 | Resistenzgen | |
| 33 | | | blaCTX-M Gruppe 2.3 | Resistenzgen | |
| 34 | | | blaCTX-M Gruppe 3 | Resistenzgen | |
| 35 | | | blaCTX-M Gruppe 4 | Resistenzgen | |
| 36 | blaKPC | | blaKPC | Resistenzgen | |
| 37 | rbcMT-T | Fluidikkontrolle | rbcMT-T | Fluidikkontrolle | |

Das Amplifikationsprotokoll und PCR-Volumen der TaqMan-PCR wurden dazu an das Betriebsgerät für das Chip-System angepasst (siehe AP6). Die Versuche wurden mit unterschiedlichen DNA Konzentrationen von positiven und negativen Proben aus dem Panel durchgeführt. Zur Testung der Sensitivität wurde eine Verdünnungsreihe positiver Proben (10-10.000 Kopien) eingesetzt. Zur Überprüfung der Spezifität wurden viele negative Proben mit hoher Kopienzahl (10.000 Kopien) getestet. Für die PCR-Reaktion der Fluidikkontrolle wurde ein Sequenzabschnitt der Tabakpflanze synthetisiert und der Nachweis einer N-Methyltransferase etabliert. Da z.B. auch Nachweise für Resistenzgene der Phosphoethanolamintransferase designt wurden, welche meist noch nicht in *A. baumannii* vorkommen, konnten nicht alle Reaktionen mit natürlichen Proben aus dem Panel positiv getestet werden. Dazu wurden Sequenzabschnitte für die synthetische Herstellung der Resistenzgene definiert.

Da die Anzahl der Kavitäten im mikrofluidischen System auf 12 Kammern beschränkt ist, wurden Überlegungen für das Multiplexing der PCR-Reaktionen durchgeführt (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Folgende Kriterien wurden berücksichtigt: Kombination von Reaktionen ohne Tendenz zu Dimerbildung, Verhindern von Kreuzreakтивität durch homologe Sequenzeigenschaften, Anzahl der Oligos. Zunächst konnte ein Multiplexing von Allelgruppen eines Resistenzgens (z.B. alle Reaktionen zur Detektion von VIM) innerhalb einer Farbe vorgenommen werden. Anschließend erfolgt

das Multiplexing von zwei Resistenzgenen (z.B. alle Alle von VIM mit Oxa-23) mit zwei Fluorophoren, damit die Reaktionen der beiden Resistenzgene voneinander getrennt detektiert werden können.

Multiplex-PCRs innerhalb einer Farbe: Reduktion auf max. 22 Reaktionen

Auf dem Chip möglich: → 12 Kavitäten mit 2 Farben = 24 Reaktionen (davon min. 3x Fluidikkontrolle)

| PCR-Reaktion | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | | 9 | | | 10 | | 11 | | | | | |
|--------------|------|---------|-----------------------------|--------|-----------|--------|---------|-----------------|-------|-------|---------|-------|----------|--------------------------|---------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|-----|
| Target | rpoB | OXA-51 | ISAbat/ISAbat825+ OXA-51 | OXA-23 | OXA-24/40 | OXA-58 | Oxa-143 | mcr-1,-2, -6 | mcr-4 | mcr-5 | mcr-3,7 | mcr-8 | Mcr-9,10 | ISAbat/ISAbat825+ ADC | NDM | | | | | | |
| PCR-Reaktion | 12 | 13 | 14 | | | 15 | | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | | 22 | | | | | |
| Target | GIM | VIM 1+2 | VIM 3 | IMP 1 | IMP 2+3 | IMP 4a | IMP 6 | IMP 4b | IMP 5 | GES | PER | TEM | SHV | VEB | CTX-M 1 | CTX-M 2,1 | CTX-M 2,2 | CTX-M 2,3 | CTX-M 3 | CTX-M 4 | KPC |

Multiplex-PCRs mit 2 Farben: Reduktion auf 12 Reaktionen

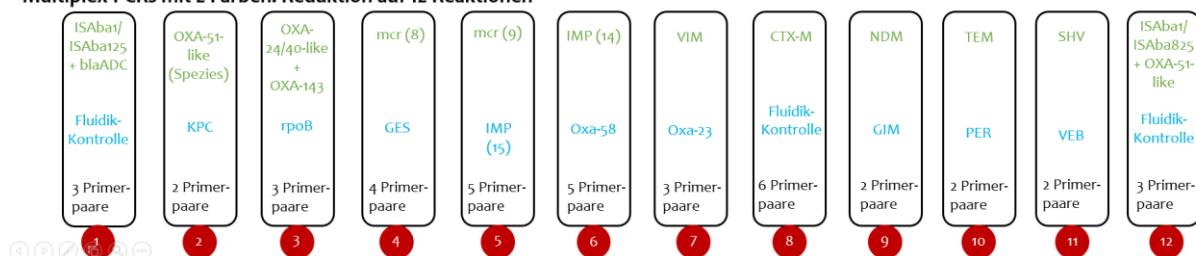


Abbildung 1: Übersicht über Single- und Multiplexreaktionen

Die 36 Reaktionen zur Resistenz- und Speziesdetektion wurden zunächst zu 22 Reaktionen zusammengefasst, indem Allelgruppen zu Multiplexen einer Farbe kombiniert wurden. Anschließend wurden die 22 Resistenzgen- und Spezies- Reaktionen mit 3 Fluidikkontroll-Reaktionen in zwei Farben auf 12 Kavitäten aufgeteilt.

Alle Singleplexreaktionen konnten auf die 12 Kavitäten in Multiplexen aufgeteilt werden. Die Detektion und Differenzierung der einzelnen Resistenzgene war sowohl im Singleplex (Abb. 2), als auch im Multiplex (Abb. 3) möglich. Es war möglich, verschiedene Allele in einer Farbe oder verschiedene Resistenzgene in zwei Farben zu detektieren.

Fazit: Alle im Spezifikationssheet festgelegten Resistenzgene konnten detektiert werden. Die Reaktionen wurden sowohl im Singleplex, als auch im Multiplex etabliert.

4 AP4: Konzeption eines Assays zum Nachweis eines Ausbruchsklons

Am IFH wurden verschiedene bioinformatische Tools zur Detektion von Ausbruchs-spezifischen SNPs verglichen. (Single Nucleotide Polymorphism-Based Real-Time PCR Screening Assay for Rapid Tracking of Bacterial Infection Clusters To Complement Whole-Genome Sequencing Efforts during Outbreak Investigations, Treffon et al., 2022) SeqSphere und RUCS eigneten sich am besten für die Identifikation SNP-spezifischer Sequenzen. Die identifizierten Sequenzen wurden inno-train bereitgestellt. Primer und Sonden für die Detektion von zwei Ausbruchsclustern wurden designt und ans IFH übergeben.

Fazit: Das Konzept des Assays zur Ausbruchscluster-Detektion wurde erfolgreich erstellt.

5 AP5: Evaluierung eines Assays zum Nachweis eines Ausbruchsklons

Die Primer-Sonden-Mixe für zwei Ausbruchscluster wurden ans IFH übergeben. Dort wurde die Evaluierung durchgeführt. Für beide Ausbruchscluster konnte jeweils mindestens ein Primer-Sonden-Mix positive von negativen Proben diskriminieren.

Fazit: Ein Softwaretool, sowie Primer und Sonden zur Detektion von Ausbruchsklonen wurde etabliert und am IFH evaluiert. Zudem wurde eine Publikation über des Ausbruchsklon-Assay veröffentlicht (Single Nucleotide Polymorphism-Based Real-Time PCR Screening Assay for Rapid Tracking of Bacterial Infection Clusters To Complement Whole-Genome Sequencing Efforts during Outbreak Investigations, Treffon et al., 2022).

6 AP6: Konzeption und Realisierung eines mikrofluidischen Systems

Die mikrofluidische Umsetzung fand überwiegend bei MFCS statt. IT stand beratend zur Seite. Es wurde in Telefonkonferenzen ein Chipdesign diskutiert. Das Design der Multiplexreaktionen fand anhand des Chipdesigns statt, sodass die Singleplexreaktionen entsprechend des Chips in zwei Farben auf 12 Kavitäten aufgeteilt wurden (siehe Abschnitt 3). Die PCR-Reaktionen wurden im Standard System bei inno-train etabliert und an das Chip System angepasst.

Fazit: Ein Prototyp eines mikrofluidischen Systems inklusive aller PCR-Reagenzien konnte erstellt und produziert werden.

7 AP7: Reagenzenvorlagerung

Die Eintrocknung bei 37°C und anschließende Lagerung bei -20°C von Primern und Sonden wurde bei inno-train über einen Zeitraum von bis zu drei Jahren untersucht. Die Reagenzien bleiben über diesen Zeitraum stabil. Auch die Polymerase wird lyophilisiert vorgelagert werden können. Entsprechende Studien werden/wurden bei MFCS durchgeführt.

Fazit: Die getrockneten Reagenzien sind bei -20 °C mindestens bis zu drei Jahren haltbar.

8 AP8: Software-Entwicklung

Die Generierung von Ct-Werten wurde durch die Gerätesoftware realisiert, welche direkt am Gerät installiert ist. Nach Testungen bei inno-train sind Probleme in der Berechnung der Ct-Werte bekannt geworden, die an MFCS weitergeleitet und dort entsprechend bearbeitet worden sind. Eine weiterführende Analyse der Rohdaten anhand der Ct-Werte zur Beurteilung, ob *A. baumannii* als Erreger in der Probe vorliegt bzw. welche Resistenzgene ausgeprägt sind wird von der Gerätesoftware ebenfalls durchgeführt.

Fazit: Die Gerätesoftware ist in der Lage zu zeigen, welche Resistenzgene in der Probe ausgeprägt sind, und ob *A. baumannii* in der Probe vorliegt.

9 AP9: Systemintegration

Die Planung der Testvalidierung auf dem Chip wurde gemeinsam mit allen Partnern vorgenommen und daraufhin die Chip-Produktion geplant.

Im Rahmen von AP3 wurden schon erste Versuche durchgeführt, die etablierten Reaktionen statt auf einer 96-well Platte im Chip durchzuführen. Der Nachweis im Chip hat grundsätzlich funktioniert, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die etablierten Reaktionen ohne weitere Optimierungen in das System integriert werden können. Es stehen ausreichend Reagenzien zur Verfügung, sodass Primer-Sonden-Mixe für die Integration in den Chip produziert werden können. Die Reagenzien wurden an den Chip angepasst und an MFCS zur Systemintegration übergeben. Die Chips befinden sich in Produktion, oder sind bereits zur Testung beim IFH.

Fazit: Die Primer-Sonden-Mixe konnten in den Chip integriert und erste Chips produziert werden. Die Chips werden am IFH validiert.

10 AP10: Systemvalidierung

Die Systemvalidierung fand am IFH statt. Inno-train stand im regelmäßigen Austausch mit den offiziellen Behörden, um die Regularien bezüglich der Zertifizierung und Vermarktung zu erfahren und entsprechend in die Entwicklungsarbeiten zu integrieren.

Fazit: Die Systemvalidierung fand am IFH statt.

11 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Nachfolgend sind die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises zusammengefasst:

Tabelle 1: Vorhabenspezifische Kosten

| | Plan (Antrag) | Ist |
|-----------------------|----------------------|-------------------|
| Material (0813) | 41.710,00 | 41.543,51 |
| Personalkosten (0837) | 479.885,00 | 489.265,94 |
| Reisekosten (0838) | 8.600,00 | 473,50 |
| Summe | 530.195,00 | 531.282,95 |

Der Finanzierungsplan konnte weitgehend eingehalten werden, die Mittel konnten ausgeschöpft werden. Im Projekt wurden vorwiegend Personalkosten für die genannten Entwicklungsarbeiten ausgegeben. Weiterhin fielen Kosten für Verbrauchsmaterialien an, diese waren z.B. Oligonukleotide, Chemikalien und diverse Labor-Verbrauchsmaterialien. Durch die Corona-Pandemie konnten die Reisekosten nicht aufgebracht werden, da Projekttreffen über Zoom, oder Skype stattgefunden haben und keine Kongresse/messen in Präsenz gehalten wurden. Es wurden beantragte und nicht verwendete Reisekosten auf die Personalkosten umgewidmet.

2. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die einzelnen im Projekt durchgeführten Arbeiten gingen deutlich über die Kernkompetenzen des Unternehmens hinaus. Durch die Ausführung dieses Vorhabens im Rahmen eines Verbundprojekts wurde durch intensive Diskussion und Kooperation der Partner untereinander die Kompetenz entsprechend erweitert. Die Realisierung des geplanten Vorhabens stellte ein deutliches wirtschaftliches Risiko für das Unternehmen dar und erforderte ein erhebliches Mehr an Kosten und Investitionen sowie

Verwaltungsaufwand über das Projektvolumen hinaus. Die Risiken und die damit verbundenen Schwierigkeiten zur Vermeidung von Produktions- oder Leistungsausfällen konnten durch die Zuwendung gemildert werden. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die geleisteten Arbeiten den Zielstellungen des Projektes angemessen waren.

3. Voraussichtlicher Nutzen

Inno-train war hauptsächlich für die Entwicklung des neuen Testverfahrens verantwortlich, welche einen PCR-basierten Nachweis von *A. baumannii* und dessen Resistenzgenen ermöglichen soll. Zudem wurden Testsysteme für den SNP-spezifischen Nachweis von Ausbruchsklonen etabliert.

Eine Wertschöpfung der aus eigener Tätigkeit erworbenen Erkenntnisse ist für inno-train im großen Umfang möglich. Auf die in diesem Projekt erarbeiteten Kenntnisse und Fertigkeiten soll in weiteren Projekten aufgebaut werden. Es ist eine Produkteinführung im 96-Well Plattenformat geplant. Eine Publikation wurde veröffentlicht und ein bis zwei weitere Publikationen sind in Planung. Zudem wurde ein Folgeprojekt beantragt, welches sich mit weiteren Resistenzgenen beschäftigt. Dieses wird vorrausichtlich im Laufe dieses Jahres starten.

4. Bekannt gewordener Fortschritt während der Projektlaufzeit bei anderen Stellen

Uns ist nicht bekannt, dass das von uns definierte Projektziel von anderen Stellen zwischenzeitlich erreicht wurde.

5. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Im Laufe des Projektes wurde eine Veröffentlichung vorgenommen (Single Nucleotide Polymorphism-Based Real-Time PCR Screening Assay for Rapid Tracking of Bacterial Infection Clusters To Complement Whole-Genome Sequencing Efforts during Outbreak Investigations, Treffon et. al 2022). Weitere Veröffentlichungen befinden sich beim IFH in Planung.

Kurzer inhaltlicher Bericht

Förderkennzeichen: 13GW0329
Laufzeit des Vorhabens: 01.08.19 – 31.12.22

| | |
|------------------------|--|
| Verbundprojekt: | Outbreak Checker Lab-on-Chip Analysesystem zur Detektion und Resistenzbestimmung von <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| Teilvorhaben: | Diagnostisches Testsystem zum Nachweis von <i>A. baumannii</i> und seiner Resistenzgene |

Kurzer inhaltlicher Bericht

Das Ziel der inno-train innerhalb des Verbundprojektes ist die Erarbeitung einer Isolation bakterieller DNA aus Abstrichtupfern sowie eines Systems zum Nachweis von *Acinetobacter baumannii* spezifischen Sequenzen und Sequenzen von relevanten Resistenzgenen, welche anschließend auf einem mit zu erarbeitenden mikrofluidischen Chip etabliert werden. Die zu erarbeitende Auswertesoftware gewährleistet die Verarbeitung und Auswertung der generierten Daten.

Für die Isolation bakterieller DNA aus Tupferabstrichen wurden umfassende Testungen zur Extraktionslösung vorgenommen. Es wurde die Resuspension in Lösungen bestehend aus Wasser, SDS, Tween20, oder Proteinase K einzeln, oder in Kombination ausgetestet. Zusätzlich wurden verschiedene Trocknungszeiten und –dauern miteinander verglichen. Das finale Protokoll zur DNA Extraktion aus Abstrichtupfern und Einsatz in die PCR sieht wie folgt aus:

- Abstrich Entnahme an der Wangen-Innenseite
- Trocknung des Tupfers für 5 min bei Raumtemperatur
- Inkubation des Tupfers in einer Lösung aus dH₂O und 1 % Tween 20 und 0,004 µg/µL Proteinase K für 10 min bei 56 °C im Wasserbad
- PCR (unverdünnter Probeneinsatz)

Auch der in Krankenhäusern häufig verwendetet Amies-Puffer eignet sich für die DNA-Isolation.

Es wurde ein System zum PCR-basierten Nachweis von *A. baumannii* konzipiert und evaluiert. Die Entwicklung des Testsystems fand auf weißen 96-Well aus Polypropylen statt. Es wurden zunächst Primer und Sonden für den Nachweis verschiedener Antibiotika-Resistenz- und *A. baumannii* Spezies-Gene designt. Die Primer-Sonden Mixe wurden anhand verschiedener isolierter DNA Proben, bereitgestellt vom IFH, auf ihre Reaktion überprüft. Bei Positivproben wurden dabei zwischen 10-10.000 Kopien und für Negativproben 10.000 Kopien eingesetzt.

Die Evaluierung der Reaktionen erfolgte zunächst als Singleplex. Anschließend wurden die einzelnen Singleplexreaktionen für die Systemintegration auf dem Chip in Multiplexen

zusammengefasst (Abb. 1). Hierfür wurden Singleplexe verschiedener Allele eines Resistenzgens als Multiplexe in einer Farbe und verschiedene Resistenzgene in Multiplexen in zwei Farben etabliert. Insgesamt konnten die 36 Reaktionen zur Resistenz- und Speziesdetektion mit 3 Fluidikkontrollen auf 12 Kavitäten aufgeteilt werden (Abb. 1).

Singleplex-PCRs → 36 Reaktionen + min. 3x Fluidikkontrolle = 39 Reaktionen

| PCR-Reaktion | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
|--------------|-------|---------|-----------------------|--------|-----------|--------|---------|-------------|----------|-------|-------|---------|-----------|--------------------|-----------|---------|---------|-------|
| Target | rpoB | OXA-51 | ISAb1/ISAb125+ OXA-51 | OXA-23 | OXA-24/40 | OXA-58 | Oxa-143 | mcr-1,-2,-6 | mcr-3,-7 | mcr-4 | mcr-5 | mcr-8 | mcr-9,-10 | ISAb1/ISAb125+ ADC | NDM | GIM | VIM 1+2 | VIM 3 |
| Target | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 |
| | IMP 1 | IMP 2+3 | IMP 4a | IMP 4b | IMP 5 | IMP 6 | GES | PER | TEM | SHV | VEB | CTX-M 1 | CTX-M 2.1 | CTX-M 2.2 | CTX-M 2.3 | CTX-M 3 | CTX-M 4 | KPC |

Multiplex-PCRs innerhalb einer Farbe: Reduktion auf max. 22 Reaktionen

Auf dem Chip möglich: → 12 Kavitäten mit 2 Farben = 24 Reaktionen (davon min. 3x Fluidikkontrolle)

| PCR-Reaktion | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | | | 9 | | | | 10 | | 11 |
|--------------|------|---------|-----------------------|--------|-----------|--------|---------|-------------|-------|-------|---------|-------|----------|--------------------|---------|-----------|-----------|---------|
| Target | rpoB | OXA-51 | ISAb1/ISAb125+ OXA-51 | OXA-23 | OXA-24/40 | OXA-58 | Oxa-143 | mcr-1,-2,-6 | mcr-4 | mcr-5 | mcr-3,7 | mcr-8 | mcr-9,10 | ISAb1/ISAb125+ ADC | | NDM | | |
| Target | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | |
| | GIM | VIM 1+2 | VIM 3 | IMP 1 | IMP 2+3 | IMP 4a | IMP 6 | IMP 4b | IMP 5 | GES | PER | TEM | SHV | VEB | CTX-M 1 | CTX-M 2.1 | CTX-M 2.2 | CTX-M 4 |

Multiplex-PCRs mit 2 Farben: Reduktion auf 12 Reaktionen

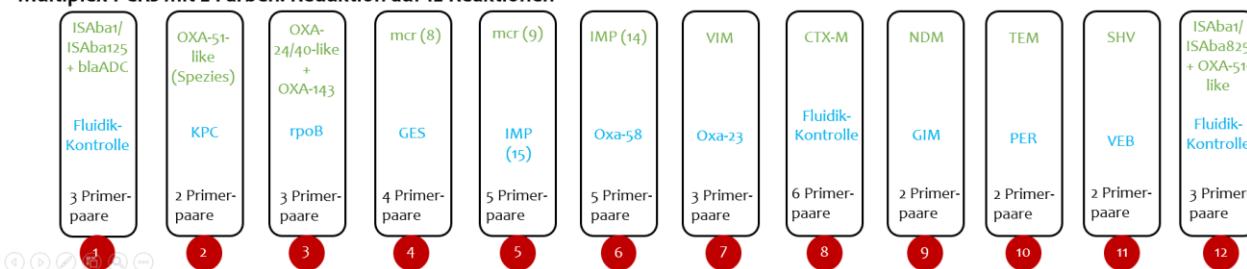


Abbildung 1: Übersicht über Single- und Multiplexreaktionen

Die 36 Reaktionen zur Resistenz- und Speziesdetektion wurden zunächst zu 22 Reaktionen zusammengefasst, indem Allelgruppen in Multiplexen einer Farbe kombiniert wurden. Anschließend wurden die 22 Reaktionen mit 3 Fluidikkontroll-Reaktionen in zwei Farben auf 12 Kavitäten aufgeteilt.

Für den Nachweis der *A. baumannii* Ausbruchsklone wurden vom IFH mit bioinformatischen Tools ermittelte Sequenzen mit SNPs an IT übermittelt. Primer und Sonden zur Detektion dieser Ausbruchsklon-spezifischen SNPs wurden designet und zur Evaluierung ans IFH übergeben.

Die Systemintegration der Primer-Sonden-systeme in den Chip fand bei MFCS statt. Hierfür wurden entsprechende Reagenzien zur Verfügung gestellt.

Die Gerätesoftware wurde soweit weiterentwickelt, dass die Daten in Form von Ct-Werten ausgegeben werden.

Es wurde keine zu entwickelnde Software benötigt, da die Daten in dem von MFCS bereitgestellte System bereits in Form von Ct-Werten ausgegeben werden.

Nutzen & Anwendungsmöglichkeiten

Inno-train war hauptsächlich für die Entwicklung des neuen Testverfahrens verantwortlich, welches einen PCR-basierten Nachweis von *A. baumannii* und dessen Resistenzgenen ermöglichen soll. Diese Arbeiten wurden erfolgreich abgeschlossen (s.o.).

Eine Wertschöpfung der aus eigener Tätigkeit erworbenen Erkenntnisse ist für inno-train im großen Umfang möglich. Auf die in diesem Projekt erarbeiteten Kenntnisse und

Fertigkeiten soll in weiteren Projekten aufgebaut werden. Es findet eine Marktbewertung mit anschließender Verifizierung und Validierung um eine CE-Zertifizierung zu erreichen. Das Kit soll zunächst im 96-Well Format vermarktet werden.

Zudem ist ein Nachfolgeprojekt (MREvital) beim Bundesministerium für Bildung und Forschung beantragt, bei dem es um den Nachweis mehrerer Multiresistenter Erreger und deren Vitalität geht. Somit werden die bereits durch das Outbreak-Checker Projekt entwickelten Ergebnisse auf weitere Bakterien ausgeweitet.