

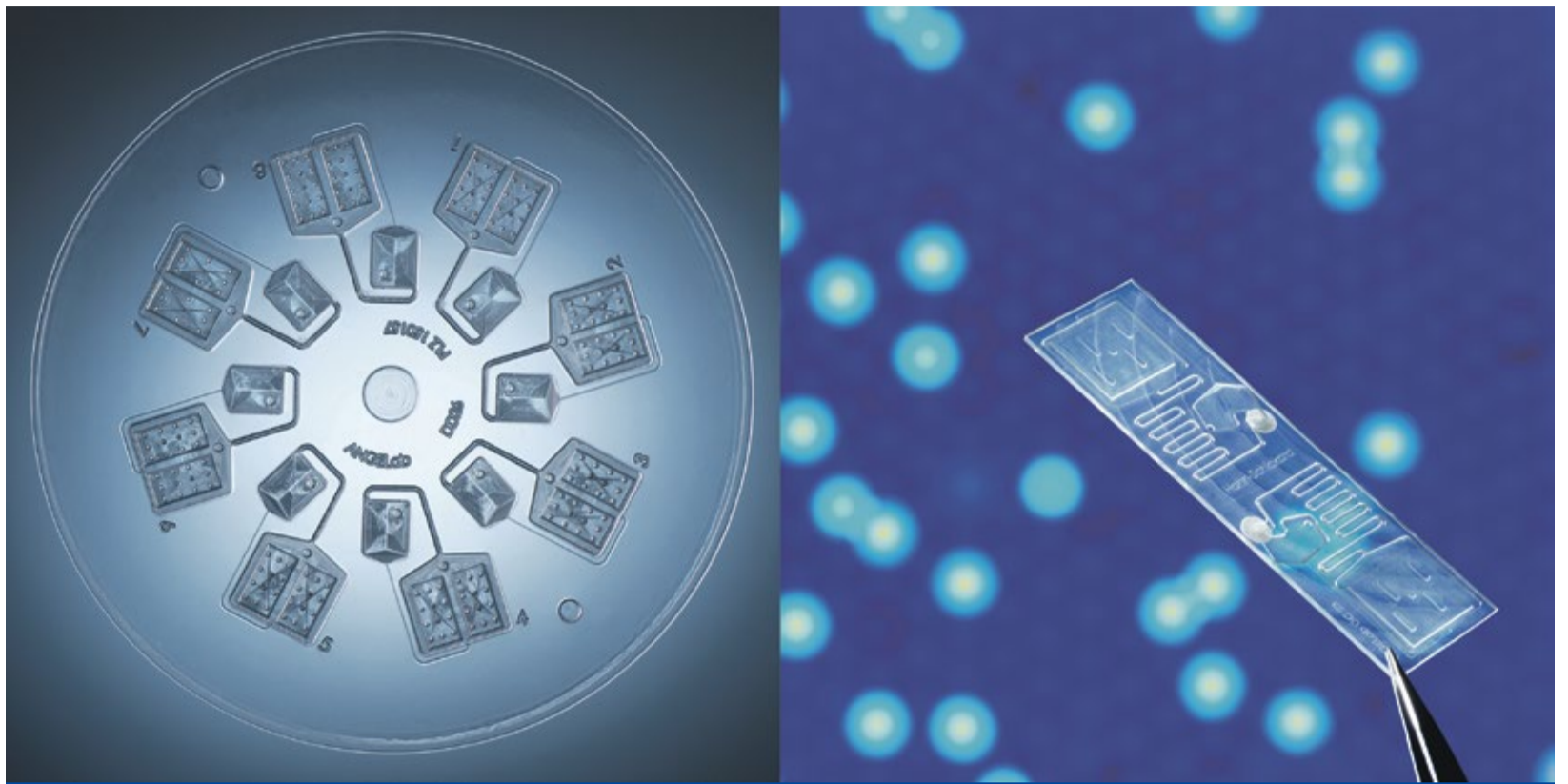
# Eine Technologieplattform für die digitale Nukleinsäureanalytik

Die Kombination digitaler Amplifikationsmethoden mit der zentrifugalen Mikrofluidik soll künftig eine quantitative und schnelle Diagnostik im Point-of-Care-Bereich ermöglichen.

Dr. Nadine Borst und Priv.-Doz. Dr. Felix von Stetten, Institut für Mikroanalyse-systeme, Hahn-Schickard, Freiburg

Komplexe Laborverfahren können mithilfe der zentrifugalen Mikrofluidik automatisiert und auf einen Kunststoffträger implementiert werden. Wenige Schnittstellen bieten ein robustes System mit einer ein-

gefüllte Kammer. An der Mündung des Kanals befindet sich eine speziell geformte Düse, an der die Tropfen automatisch gebildet werden. Die eingebrachte Probe wird zusammen mit den benötigten Reagenzien für die jeweilige Nachweisreaktion aufgeteilt. Die Verteilung erfolgt rein statistisch. Ist mindestens ein Zielmolekül im Tropfen enthalten, findet eine biochemische Reaktion statt, und ein Fluoreszenzsignal wird generiert. Am Ende wird die Anzahl an positiven und negativen Tropfen ermittelt. Dies dient zur Berechnung der absoluten Menge an Zielmolekülen in der Probe. Die Technologie bietet eine universelle Plattform für verschiedene molekulare Nachweisverfahren. Durch Kombination mit isothermen DNA-Amplifikationsmethoden kann zudem eine Gesamtprozessdauer von der Probenahme bis zum Ergebnis von 30 bis 60 Min. erreicht werden. Derzeit befinden sich mehrere Tests für klinische Anwendungen in der Entwicklung.



Testträger für die digitale Nukleinsäureanalytik: LabDisk (links, beispielhaft ohne integrierte Probenvorbereitung gezeigt) und DropChip (rechts).

Fotos: Bernd Müller



Priv.-Doz. Dr. Felix von Stetten



Dr. Nadine Borst

fachen Handhabung. Die Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung und das Institut für Mikrosystemtechnik der Universität Freiburg haben gemeinsam ein Verfahren für die digitale Nukleinsäureanalytik auf einem rotierenden Testträger, der sog. LabDisk, entwickelt. Der digitale Ansatz nutzt die Vereinzelnung von DNA-Molekülen in einer großen Anzahl getrennter Reaktionsräume. Dies erlaubt eine absolute Quantifizierung ohne den Vergleich mit Kalibratoren mittels einer Standardkurve. Das Verfahren der zentrifugalen Stufenemulsifikation (centrifugal step emulsification) erzeugt auf einfache Weise Tausende von Tropfen homogener Größe. In 70 Sekunden können bis zu 20.000 Tropfen mit einem Reaktionsvolumen von wenigen Nanolitern generiert werden. Auf dem Testträger fließt die Probenflüssigkeit, getrieben von der Zentrifugalkraft, durch kleine Kanäle in eine

## Applikation 1: Detektion resistenter Krankenhauskeime

In Deutschland infizieren sich pro Jahr rund 500.000 Menschen bei Krankenhausaufenthalten mit antibiotikaresistenten Bakterien. Bis zu 15.000 Patienten sterben an den Folgen. Ein Nachweis der Erreger dauert derzeit noch mehrere Stunden bis zu einem Tag. Die Entwicklung einer neuen LabDisk, eine runde Kunststoffscheibe von der Größe einer DVD, stellt ein besonders schnelles und mobiles Diagnostiksystem bereit. Als Probe wird ein Nasalabstrich entnommen und in die Disk eingelegt. Die Probenaufbereitung und Analyse laufen automatisiert im Prozessiergerät ab. Einzelne Bakterien bzw. deren genetische Information werden in Tröpfchen aufgeteilt, was die simultane Feststellung von Infektionserregern und deren Antibiotikaresistenzen erlaubt. Diese Zuordnung

## Applikation 2: HIV-Diagnostik

Für die therapiebegleitende HIV- und HTLV-Diagnostik wird an einer weiteren LabDisk gearbeitet. Weltweit leiden mehr als 35 Mio. Menschen an einer HIV-Infektion, die oft mit einer Koinfektion mit HTLV (Humanes T-lymphotropes Virus) einhergeht. Eine effektive antiretrovirale Therapie erfordert eine regelmäßige Analyse der vorliegenden Viruslast. Die zu entwickelnde LabDisk eröffnet die Möglichkeit einer quantitativen und sensitiven Analyse am Point-of-Care. Mit einer geplanten Gesamtprozessdauer von etwa 30 Min. kann die Untersuchung während des Arztbesuchs erfolgen und die Ergebnisse direkt in die Entscheidung über den weiteren Therapieverlauf einfließen. Auch in diesem Beispiel soll die komplette Probenvorbereitung auf der LabDisk integriert sein. Ein Tropfen

ermöglicht eine spezifische Maßnahme für den jeweiligen Patienten. Durch die Verwendung einer isothermen Nachweisreaktion, der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (recombinase polymerase amplification, RPA), liegt das Ergebnis innerhalb von einer Stunde vor. Die einfache Handhabung soll das Krankenhauspersonal in die Lage versetzen, die Diagnose selbst vor Ort in kürzester Zeit zu erstellen. Nach der Entwicklung der LabDisk und des Prozessiergeräts wird 2018 eine Verifizierung mit 1.000 klinischen Proben folgen.

## Applikation 3: Pränatal-Diagnostik

Ziel des DropChips, ein alternativer Testträger im Format eines Objektträgers, sind schonende Methoden für die

in-vitro-Pränatal-Diagnostik. In einem nicht-invasiven Verfahren wird zunächst fetale DNA aus dem Blut der Mutter extrahiert. Nach dieser Probenvorbereitung können verschiedene genetisch bedingte Krankheiten des ungeborenen Kindes mittels digitaler PCR untersucht werden. Durch die Verwendung eines Multiplex-Ansatzes können mehrere genetische Marker gleichzeitig überprüft werden. Eine quantitative Detektion der Mutation p.Phe508del, in Deutschland der häufigste Grund für die Erkrankung an cystischer Fibrose, wurde bereits mit klinischen Proben gezeigt. Ein weiteres Einsatzgebiet könnte die Bestimmung des fetalen Rhesus-D-Genotyps in der Schwangerschaft von Antigen-D-negativen Frauen werden. Hierzu findet derzeit die Verifizierung mit klinischen Proben statt. Durch

die Nutzung eines digitalen Assays wird eine gesteigerte Sensitivität im Vergleich zu bisherigen Methoden erwartet. Ein zusätzlicher Vorteil des DropChips ist die Kompatibilität mit Standard-Laborgeräten für die Prozessierung.

In der Point-of-Care-Diagnostik besteht der Anspruch, den Nachweis von krankheitsrelevanten Biomarkern verlässlich, schnell und auf einfache Weise durchzuführen. Die genannten Anwendungsbeispiele verdeutlichen die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der LabDisk und des DropChips in der Nukleinsäureanalytik. Ein digitaler Ansatz liefert zusätzlich den Mehrwert einer absoluten Quantifizierung, einer gesteigerten Sensitivität oder der Analyse auf der Basis einzelner Zellen.

| www.hahn-schickard.de |

## Bakterienprofile auf Knopfdruck

Die neue Software Traitair leitet die Eigenschaften von Bakterien aus genetischen Daten ab.

Dr. Andreas Fischer, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig

Moderne Sequenzierverfahren machen es heutzutage möglich, das gesamte Genom eines Bakteriums in kurzer Zeit zu entschlüsseln. Das Ergebnis ist eine riesige Datenmenge, in der sich Tausende Gene verbergen. Welche Eigenschaften diese Gene dem Bakterium verleihen, müssen Wissenschaftler jedoch aufwendig analysieren. Bioinformatiker des Braunschweig Integrated Centre of Systems Biology (BRICS), einer gemeinsamen Einrichtung des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) und der Technischen Universität Braunschweig, haben nun eine Software entwickelt, die aus Genomdaten insgesamt 67 Eigenschaften des Bakteriums vorhersagen kann. Zu diesen Merkmalen gehören beispielsweise bevorzugte Nahrungsquellen, bestimmte Resistenzen oder die Beweglichkeit der Bakterien. Die Software mit dem Namen „Traitair“ haben die Wissenschaftler online frei zur Verfügung gestellt und sie im Fachjournal mSystems beschrieben.

Aaron Weimann, der in der Abteilung Bioinformatik der Infektionsforschung von Prof. Alice McHardy promoviert und mit dem Team die neue Software entwickelt hat: „Bakterien besitzen meist zwischen 3.000 und 6.000 Gene, die für die Ausprägung ihrer Eigenschaften verantwortlich sind. Aus den genetischen Daten identifiziert Traitair mittels maschineller Lernverfahren bestimmte Proteinfamilien und zeigt an, zu welchem Phänotyp diese Proteine führen.“ Darüber hinaus gibt die Software auch detailliert aus, welche Proteine oder Proteinfamilien zu den vorhergesagten Eigenschaften führen. Der Name der Software ist vom englischen Wort „trait“ – zu Deutsch Eigenschaft oder Merkmal – abgeleitet. Traitair ist im Internet frei verfügbar. Dort lässt sich die Software kostenlos herunterladen und kann ohne weitere Programmierkenntnisse genutzt werden. Kleine Datenmengen können auch direkt per Online-Tool analysiert werden unter <http://research.bifo.helmholtz-hzi.de/webapps/wa-webservice/pipe.php?pr=traitair>.

Für die Entwicklung von Traitair haben Weimann und seine Kollegen zunächst in der Literatur und in Datenbanken Informationen über Phänotypen von Bakterien recherchiert, deren Genom bereits sequenziert ist. Die Genomdaten haben sie dann computergestützt mit den aufbereiteten Phänotypdaten verglichen und mithilfe maschineller Lernmethoden systematisch

nach Mustern und Kombinationen von Proteinfamilien durchsuchen lassen, die eine genaue Vorhersage von Phänotypen ermöglichen. „Für die Programmierung der Software haben wir Trainingsdaten verwendet, bei denen Genom und daraus resultierende Phänotypen bekannt waren“, erklärt Weimann. „Mit weiteren bekannten Datensätzen haben wir Traitair dann überprüft und anhand der richtigen und falschen Vorhersagen immer genauer programmieren können.“ Als Grundlage für das Training und die Überprüfung von Traitair dient die Bakterienzyklopädie Bergey's Manual of Systematic Bacteriology sowie die Datenbank GIDEON (Global Infectious Diseases and Epidemiology Online Network), die eine Vielzahl klinisch relevanter Eigenschaften von Bakterien zusammenfasst. Außerdem flossen Fördergelder des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) in das Projekt.

„Die Vorhersage ist noch nicht für alle 67 Phänotypen gleich gut, weil die Qualität der zugrunde liegenden Daten in manchen Fällen besser ist als in anderen“, sagt Dr. Andreas Bremges, Wissenschaftler im Team von Alice McHardy. „Wenn neue Daten verfügbar werden, passen wir die Software im laufenden Prozess an. Und sie kann jederzeit um zusätzliche Phänotypen erweitert werden.“

| www.helmholtz-hzi.de |

**Alere** Knowing now matters.™

Alere GmbH · Am Wassermann 28 · D-50829 Köln · Tel: +49 221 27143-0  
Fax: +49 221 27143-400 · [serviceDE@alere.com](mailto:serviceDE@alere.com) · [www.alere.com](http://www.alere.com)

© 2017 Alere GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Das Alere Logo, Alere und Knowing now matters sind Marken der Alere Unternehmensgruppe. Alle weiteren Warenzeichen und Marken sind Marken der jeweiligen Unternehmen. Abgebildete Fotos dienen nur illustrativen Zwecken. Alle in diesen Fotos dargestellten Personen sind Modelle. GMSDE-0208-01 03/17