

Markus A. Seeger¹, Peter M. Keller²

Schnellere Diagnostik dank lebendig eingefangenen Bakterien

Der Nachweis von bakteriellen Erregern einer Blutstrominfektion (Sepsis) dauert häufig zu lange. Alleine die Blutkultur zur Vermehrung der Bakterien dauert ein bis sieben Tage. In diesem Zeitfenster der Ungewissheit werden Patienten mit empirischen Breitspektrumantibiotika behandelt. Neue Technologien, die Bakterien direkt aus Patientenblut isolieren und nachweisen können, sind daher sehr gefragt. Dieser Artikel beschreibt neueste Entwicklungen der translationalen Forschung in diesem Gebiet. Insbesondere wird eine neuartige Strategie basierend auf kleinen Antikörperfragmenten, sogenannten Nanobodies, als Keimfänger vorgestellt, die im Rahmen des Nationalen Forschungsprogramms «Antimikrobielle Resistenz» (NFP 72) entwickelt werden.

Antibiotikaresistenz ist eines der drängendsten medizinischen Probleme unserer Zeit. Insbesondere im Zusammenhang von Blutstrominfektionen kann ein schneller diagnostischer Nachweis des Erregers und dessen Antibiotikaresistenzprofil über Leben oder Tod entscheiden [1]. In der gängigen Praxis müssen die Erreger im Blut mittels sogenannter Blutkulturen zunächst vermehrt werden, danach identifiziert und abschliessend einer phänotypischen Resistenztestung unterzogen werden. Dabei verstreichen je nach Fall bis zu sieben wertvolle Tage, für die der Arzt ein empirisches Breitspektrumantibiotikum verschrieben hat. Aufgrund der bedrohlichen weltweiten Zunahme von Antibiotikaresistenzen, insbesondere gegenüber den verbreitet eingesetzten Cephalosporinen und Carbapenemen bei gramnegativen Keimen, sind die empirischen verabreichten Antibiotika der Erstlinientherapie immer häufiger wirkungslos [2]. Die Folgen sind ein mögliches Therapieversagen einhergehend mit erhöhter Morbidität, Liegedauer und letztlich auch erhöhter Mortalität bei Infektionen mit resistenten Erregern.

Molekulardiagnostische Methoden

Um dieser Entwicklung zu begegnen, wurden in den letzten Jahrzehnten in der Molekulardiagnostik grosse Fort-

schritte erzielt. Diagnostisch verfügbare molekulardiagnostische Methoden basieren auf einem hochsensitiven Nachweis von bakterieller DNA, um sowohl die Erregerspezies als auch gängige Resistenzgene (z.B. β -Laktamasen und Carbapenemasen) direkt aus Patientenblut nachzuweisen. Während die technologischen Vorteile dieser Methode unbestritten sind in Bezug auf Geschwindigkeit und Sensitivität, gibt es dennoch zwei wichtige Schwachstellen: Erstens lassen sich mit DNA-basierten Methoden lebendige und tote Zellen nicht unterscheiden, was zu einer relevanten Zahl von falsch-positiven Testergebnissen führt. Zweitens sind die molekularen Mechanismen, die zu Antibiotikaresistenz führen, sehr komplex, teilweise überlagernd und können nur unvollständig durch die Sequenzierung von Antibiotikaresistenzgenen abgebildet werden. Insbesondere in Fällen, in denen Cephalosporin- und/oder Carbapenemresistenzen molekularbiologisch nachgewiesen werden, braucht es eine erweiterte Resistenztestung auf andere Antibiotikaklassen (z.B. Aminoglykoside und Fluoroquinolone), die nur mittels phänotypischer Methoden abschliessend abgeklärt werden können. Die molekularen Nachweisverfahren sind aktuell in den Routine-IVD-Verfahren hinsichtlich des nachweisbaren Erregerpanels begrenzt (z.B. auf die sogenannten ESKAPE-Bakterien). Die vertriebenen Tests sind gegenüber den kulturbasier-

Un diagnostic plus rapide grâce à des bactéries capturées vivantes

Le dépistage d'agents pathogènes bactériens et de leur résistance dans le cadre des infections du sang est une urgence, car le succès des thérapies dépend fortement des résistances aux antibiotiques. C'est pourquoi les nouvelles technologies permettant d'isoler les bactéries directement du sang des patients et de prouver leur présence sont très recherchées. Face à cette évolution, le diagnostic moléculaire a avancé à grands pas ces dernières décennies en vue de démontrer la présence d'espèces pathogènes et même de gènes de résistance (p. ex. les β -lactamases et les carbapénémases) directement depuis le sang des patients. Malheureusement, les méthodes basées sur l'ADN ne permettent pas de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes, ce qui entraîne un nombre non négligeable de tests aux résultats faussement positifs. En outre, les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'antibiorésistance sont particulièrement complexes et ne peuvent être reproduits que partiellement par le séquençage des gènes responsables de l'antibiorésistance. La capture d'agents pathogènes dans le sang des patients au moyen de petits fragments d'anticorps stables (nanobodies) constitue une alternative très prometteuse aux tests de biologie moléculaire traditionnels. Dans le cadre du programme national de recherche «Résistance aux antimicrobiens» (PNR 72), nous travaillons sur les procédés d'enrichissement basés sur les nanobodies pour détecter directement les bactéries vivantes dans le sang des patients.

ten Nachweisverfahren deutlich teurer mit Kosten von CHF 180.– bis 360.– pro Patientenprobe. Diese hohen Kosten sind ein deutliches Implementierungshemmnis vor dem Hintergrund des steigenden Kostendrucks im Gesundheitswesen.

Bakterienzellen enkapsulieren oder einfangen

Messtechnisch sieht sich die Analytik vor einer gewaltigen, jedoch lösbaren Herausforderung: Im Patientenblut stehen bei Bakteriämie nur wenige Bakterienzellen (Schätzungen zufolge sind es zwischen 10 und 1000 Keime pro Milliliter) einer sehr grossen Anzahl roten Blutkörperchen (10^9 pro Milliliter) gegenüber. Die Blutkultur dient daher primär der Anreicherung der bakteriellen Zellen für nachgeschaltete phänotypische Analysen wie die Erregeridentifikation mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und die Antibiotikaresistenztestung. Würde es gelingen, die raren bakteriellen Keime anderweitig einzufangen

1 Universität Zürich, Institut für Medizinische Mikrobiologie

2 Universität Bern, Institut für Infektionskrankheiten



und damit gegenüber den Blutzellen anzureichern, könnte auf die zeitaufwendige Blutkultur verzichtet werden. In den letzten Jahren wurden technologische Konzepte entwickelt, die Bakterienzellen entweder spezifisch enkapsulieren [3] oder mittels magnetischer Nanopartikel einfangen [4]. Ein ungelöstes Problem bei diesem Vorgehen ist, dass die Bakterien dabei zerstört werden, womit weitere Resistenztestungen auf phänotypischer Basis verunmöglicht werden.

Antikörper, die Bakterien mit hoher Spezifität und Affinität binden, stellen eine bereits erprobte Variante dar, um Keime lebendig einzufangen. In diesem Zusammenhang stellen sich aber zwei grundsätzliche Probleme. Erstens stammen solche Antikörper typischerweise aus immunisierten Mäusen oder Hasen und sind demnach polyklonal und nicht erneuerbar. Zweitens erkennen solche Antikörper

in der Regel hochvariable Zucker- und Proteinstrukturen (sogenannte O- und H-Antigene), die sich zwischen Stämmen verschiedener Serotypen der gleichen Spezies unterscheiden. Alleine schon für die Spezies des häufigen Blutstromerregers *Escherichia coli* wurden 157 verschiedene O-Antigene und 57 H-Antigene beschrieben [5]. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass sich aufgrund dieser Komplexität in Bezug auf verschiedene Serotypen antikörperbasierte Methoden bislang nicht etablieren konnten.

Gramnegative Bakterien verfügen neben O- und H-Antigenen auch über Proteine in der äusseren Membran – sogenannte «outer membrane proteins» (OMP) –, welche zum Teil sehr konserviert sind und sich daher kaum zwischen Stämmen der gleichen Spezies unterscheiden. Die zugänglichen Bindungsstellen von OMP verstecken sich jedoch tief in der äusseren Memb-

ran und werden durch die Zuckerstrukturen der O-Antigene abgeschirmt. Daher sind OMP für konventionelle Antikörper schwer zugänglich.

Natürliche und künstliche Nanobodies

In den letzten Jahren wurden grosse Fortschritte im Gebiet der Antikörpertechnologie verzeichnet. Eine wichtige Errungenschaft war die Entdeckung kleiner Antikörperfragmente aus Kamelen, Lamas und Alpakas, sogenannte Nanobodies [6]. Nanobodies sind ca. 12-mal kleiner als konventionelle Antikörper, und dennoch verfügen sie über identische Eigenschaften in Bezug auf Spezifität und Affinität [7]. Aufgrund ihrer bescheidenen Grösse sind Nanobodies bestens geeignet, um an OMP im zellulären Kontext der lebenden Bakterienzelle zu binden. Zudem sind Nanobodies sehr stabil und lassen sich in grossen Mengen günstig herstellen.

In einem Projekt, das im Rahmen des Nationalen Forschungsprogramms «Antimikrobielle Resistenz» (NFP 72) gefördert wird, entwickeln wir zurzeit natürliche als auch künstlich erzeugte Nanobodies gegen hochkonservierte OMP der wichtigen drei gramnegativen Pathogene *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* [8]. Mit der Flycode-Technologie haben wir ein patentiertes Verfahren entwickelt, das ein Screening einer grossen Anzahl von Nanobodies direkt im zellulären Kontext gegen OMP ermöglicht [9].

Zurzeit arbeiten wir an einem technischen Verfahren, um Bakterien mittels dieser Nanobodies direkt aus Patientenblut einzufangen, und zwar in lebendigem Zustand. Das unmittelbare Ziel ist es, die Blutkultur überflüssig zu machen, um möglichst rasch mit der phänotypischen Resistenztestung beginnen zu können. Ein wichtiger Aspekt dieses Vorhabens ist, dass die Routineabläufe im Diagnostiklabor möglichst nicht verändert werden, um die Eintrittshürden für die Implementation möglichst tief zu halten.

Wir hoffen, dass wir mit unserem Projekt einen wichtigen Beitrag zur Resistenztestung von gefährlichen gramnegativen Keimen leisten werden. Die

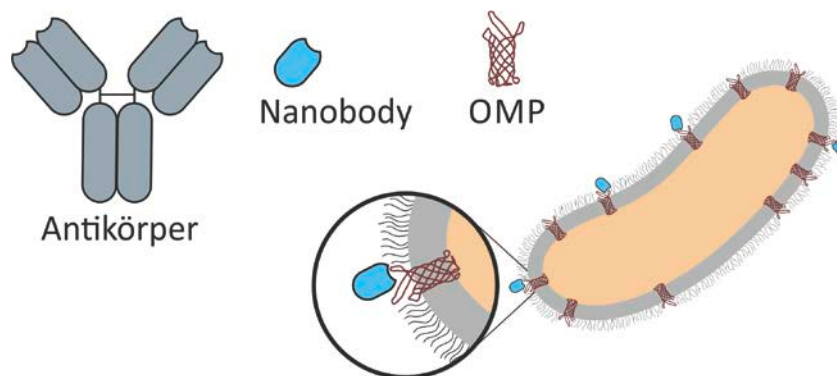


Bild 1: Bakterien mittels Nanobodies lebendig einfangen. Die Nanobodies sind ca. 12-mal kleiner als konventionelle Antikörper und binden an ein hochkonserviertes Protein in der äusseren Membran (OMP).

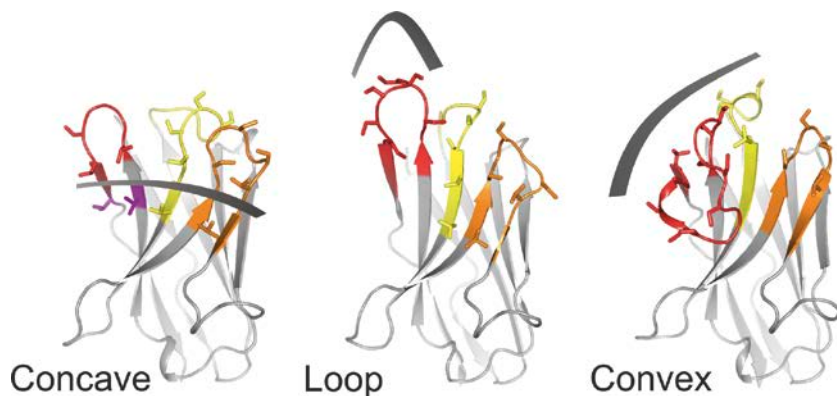


Bild 2: Sybodies – synthetische Nanobodies (aus Zimmermann et al., eLife, 2018). Von den Autoren wurde eine Technologieplattform entwickelt, um rasch und zuverlässig synthetische Nanobodies (genannt Sybodies) gegen OMP zu generieren, die letztlich im zellulären Kontext binden.

speziesspezifischen Nanobodies haben zudem ein grosses Potenzial, um in weiteren Gebieten der Forschung und Diagnostik eine wichtige Rolle zu spielen. Insbesondere wäre unsere nanobodybasierte Anreicherungsmethode auch für die Molekulardiagnostik von hohem Nutzen, da so die Sensitivität von schnellen Sequenziermethoden massiv erhöht werden könnte. Daneben liessen sich die Nanobodies auch mit schnellen Diagnostikmethoden kombinieren, etwa der Glasfaser-Laser Technologie [10]. Nicht zuletzt könnten die entwickelten Nanobodies verwendet werden, um Pathogene zu Forschungszwecken lebend aus heterogenem Patientenmaterial zu isolieren.

Korrespondenz
m.seeger@imm.uzh.ch
peter.keller@ifik.unibe.ch

Referenzen

1. Kumar, A., D. Roberts, K.E. Wood, B. Light, J.E. Parrillo, S. Sharma, R. Suppes, D. Feinstein, S. Zanotti, L. Taiberg, D. Gurka, A. Kumar, and M. Cheang, Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*, 2006. 34(6): p. 1589–1596.
2. Maurer, F.P., C. Castelberg, C. Quiblier, G.V. Bloemberg, and M. Hombach, Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with Enterobacteriaceae and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol*, 2015. 53(1): p. 95–104.
3. Kang, D.K., M.M. Ali, K.X. Zhang, S.S. Huang, E. Peterson, M.A. Digman, E. Gratton, and W.A. Zhao, Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nat Commun*, 2014. 5.
4. Lee, J.J., K.J. Jeong, M. Hashimoto, A.H. Kwon, A. Rwei, S.A. Shankarappa, J.H. Tsui, and D.S. Kohane, Synthetic Ligand-Coated Magnetic Nanoparticles for Microfluidic Bacterial Separation from Blood. *Nano Letters*, 2014. 14(1): p. 1–5.
5. Orskov, F. and I. Orskov, Escherichia coli serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol*, 1992. 38(7): p. 699–704.
6. Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E.B. Songa, N. Bendahman, and R. Hamers, Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993. 363(6428): p. 446–8.
7. De Genst, E., K. Silence, K. Decanniere, K. Conrath, R. Loris, J. Kinne, S. Muyldermans, and L. Wyns, Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(12): p. 4586–91.
8. Zimmermann, I., P. Egloff, C.A. Hutter, F.M. Arnold, P. Stohler, N. Bocquet, M.N. Hug, S. Huber, M. Siegrist, L. Hetemann, J. Gera, S. Gmur, P. Spies, D. Gygax, E.R. Geertsma, R.J. Dawson, and M.A. Seeger, Synthetic single domain antibodies for the conformational trapping of membrane proteins. *Elife*, 2018. 7.
9. Egloff, P., I. Zimmermann, F.M. Arnold, C.A.J. Hutter, D. Morger, L. Opitz, L. Poveda, H.A. Keserue, C. Panse, B. Roschitzki, and M.A. Seeger, Engineered peptide barcodes for in-depth analyses of binding protein libraries. *Nat Methods*, 2019.
10. Stupar, P., O. Oputa, G. Longo, G. Prod'hom, G. Dietler, G. Greub, and S. Kasas, Nanomechanical sensor applied to blood culture pellets: a fast approach to determine the antibiotic susceptibility against agents of bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 2017. 23(6): p. 400–405.

Register Now!

29 OCTOBER 2020 SWISS SYMPOSIUM IN POINT-OF-CARE DIAGNOSTICS

Theater and Congress Center “La Poste”
Visp, Switzerland

Keynote and invited speakers from Medicine, Science and Industry
Product and Technology Exhibition
Poster session & Awards



More information & registration
www.pocdx.ch

Hes-so
Haute école spécialisée
de Suisse occidentale
Fédérale de la Haute Vallée
University of Applied Sciences and Arts
Western Switzerland

csem

SWISS BIOTECH
National Thematic Network
Thematic Platform
IVD

the **ark**

biotechnet
SUISSE