Point-of-Care-Diagnostik: Biochip spürt Sepsis auf

Manuel Kemmler, Albrecht Brandenburg
Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik IPM

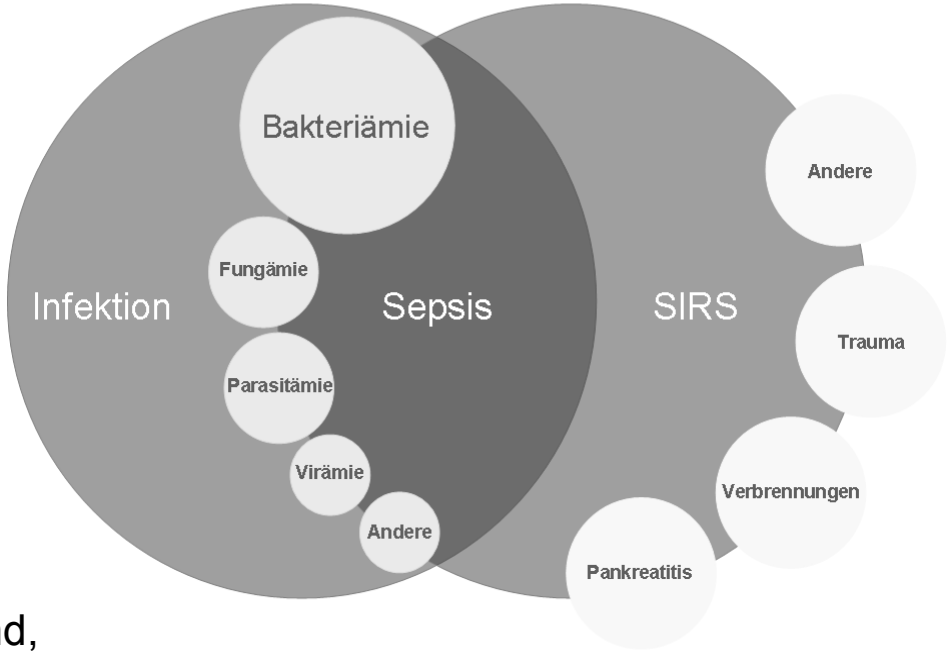
Forum Biotechnologie, Freiburg, 19. 9. 2012

Sepsis
Anforderungen an Point-of-Care-Test
Messsystem
Ergebnisse
Zusammenfassung

Fraunhofer
IPM

Sepsis

- Sepsis: Komplexe systemische Entzündungsreaktion mit einer Infektion („Blutvergiftung“)
- Infektion durch Bakterien, Pilze, Parasiten, Viren, etc. im Blut
- Drei Schweregrade: Sepsis, Schwere Sepsis und Septischer Schock
- 150.000 Erkrankungen und 56.000 Todesfälle pro Jahr in Deutschland, dritthäufigste Todesursache
- Stündliche Abnahme der Überlebens-chance um 6 %



Definition Sepsis

SIRS: Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (systemische Entzündungsreaktion)

Quellen

RC Bone, Chest101 (1992) 1644-1655
F. M. Brunkhorst, Zentralbl Chir 127 (2002) 165-173

Fraunhofer IPM

Sepsis

Lösungsansatz

Point-of-Care-Testing: schnelle Diagnose nah am Patienten

Parameter

C-reaktives Protein (CRP): Unterscheidung bakteriell/viral

Klinisch relevanter Bereich: 5000-500 000 ng/ml

Bei c > 40 000 ng/ml: Bakterielle Sepsis wahrscheinlich

Procalcitonin (PCT): Bakteriell/viral und Schweregrad

Klinisch relevanter Bereich: 0.05-50 ng/ml

c < 0,1 ng/ml: SIRS ohne Infekt oder virale Sepsis, c = 2-10 ng/ml: Lebensbedrohliche Sepsis wahrscheinlich

c > 10 µg/l: Bakterielle Sepsis wahrscheinlich

Interleukin 6 (IL-6): Indikator für Komplikationen, Frühmarker

Klinisch relevanter Bereich: 0,04-1,5 ng/ml

Schwellwert bei 1ng/ml, c > 1ng/ml: Mortalität: 47,1%, c < 1ng/ml: Mortalität: 26,8 %

Neopterin (NPT): Unterscheidung bakteriell/viral, Marker für Komplikationen

Klinisch relevanter Bereich ungefähr : 2,5-50 ng/ml

Schwellwert bei 18 ng/ml, c > 18ng/ml: erhöhte Mortalität, bakterielle Infektion

Quellen:
G. Gauglitz, P. B. Luppa, Chemie in unserer Zeit, Vol. 43, No. 5, (2009), pp. 308-318.
S. Tallia, J. E. Kunicka, Siemens Diagnostic Trends, Perspectives - Spring 2009, (2009), pp. 6-11.
S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und (DIVI), (2010).

Anforderungen an Point-of-Care-Test

Anforderungen an das System

- Hohe Empfindlichkeit (z.B. 40pg/ml für IL-6)
- Hohe Dynamik (max. 500 µg/ml für CRP)
  Konzentrationswerte über 7 Dekaden
- Messung in komplexer Matrix (Blutplasma)
- Probenvolumina kleiner 100 µl
- Testzeit unter 30 Minuten
- Unpräzision und Unrichtigkeit kleiner als 15 %
  Parallele Messung mehrere Analyten
- Kompakt und preiswert

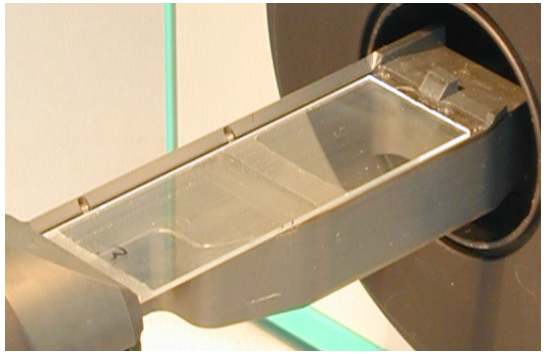
Welt – online, Das flüssige Lebenselixier, Foto: PA

Fraunhofer IPM

Biochip-Technologie
"Labor in der Westentasche"

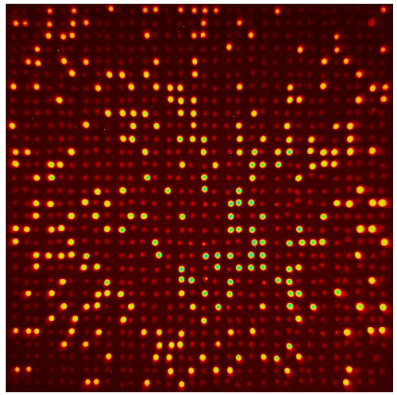
Quelle: affymetrix.com

Affymetrix
Gene Chip

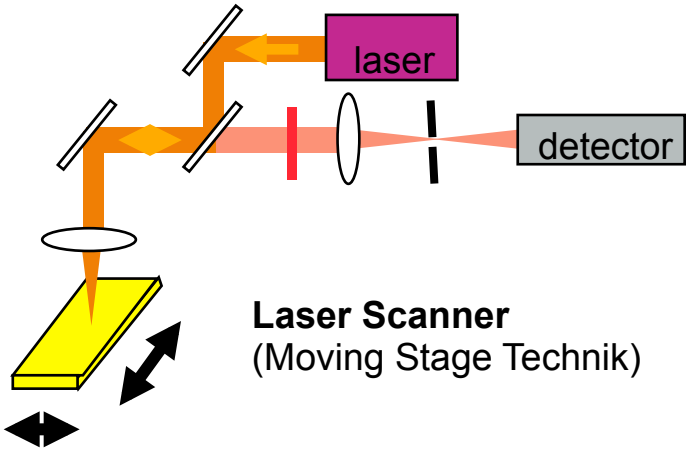


Standardformat Objektträger

(www.perkinelmer.com)



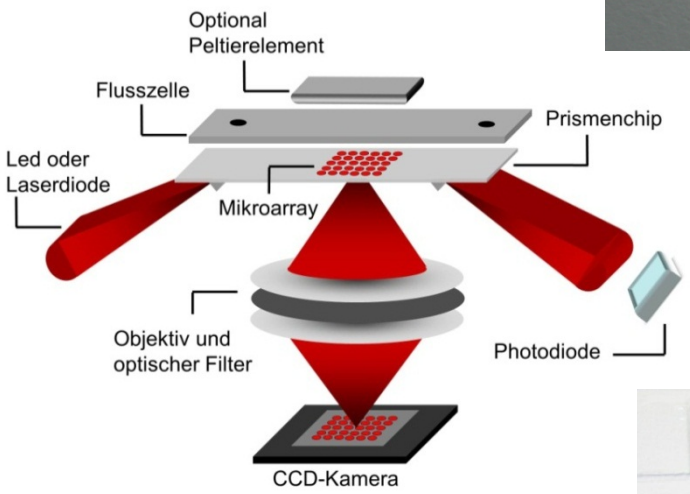
Fluoreszenzbild
eines Biochips



Laser Scanner
(Moving Stage Technik)

Fraunhofer
IPM

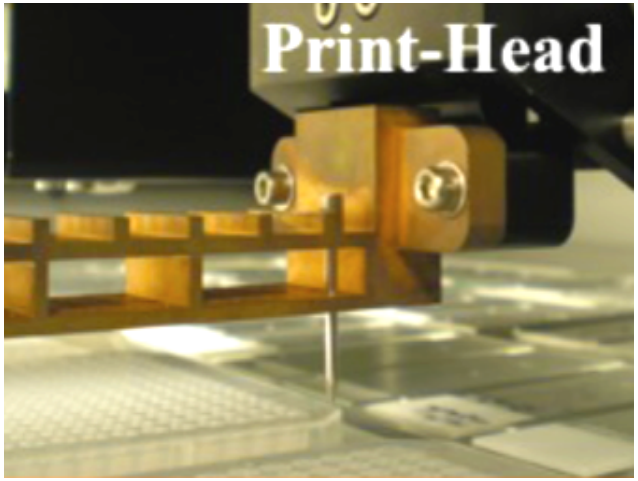
Messsystem: Übersicht

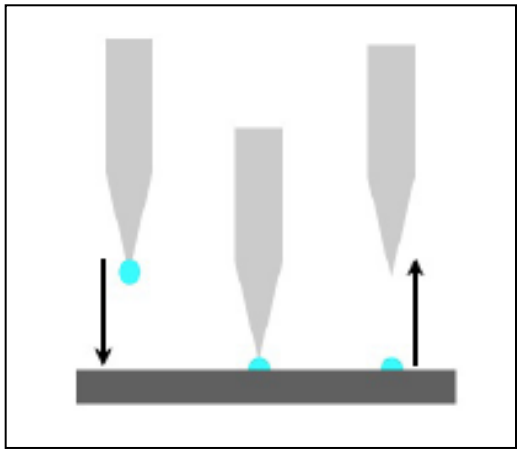


Fraunhofer
IPM

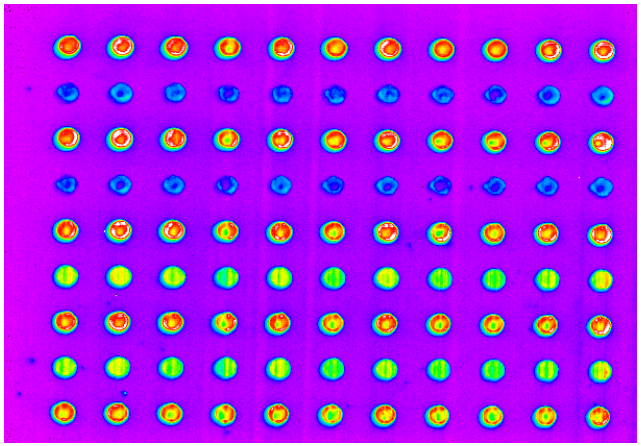
Messsystem: Spotting

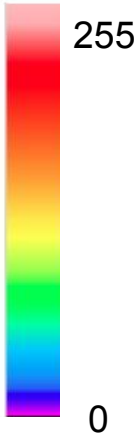
Spotting (Kontakt-verfahren)





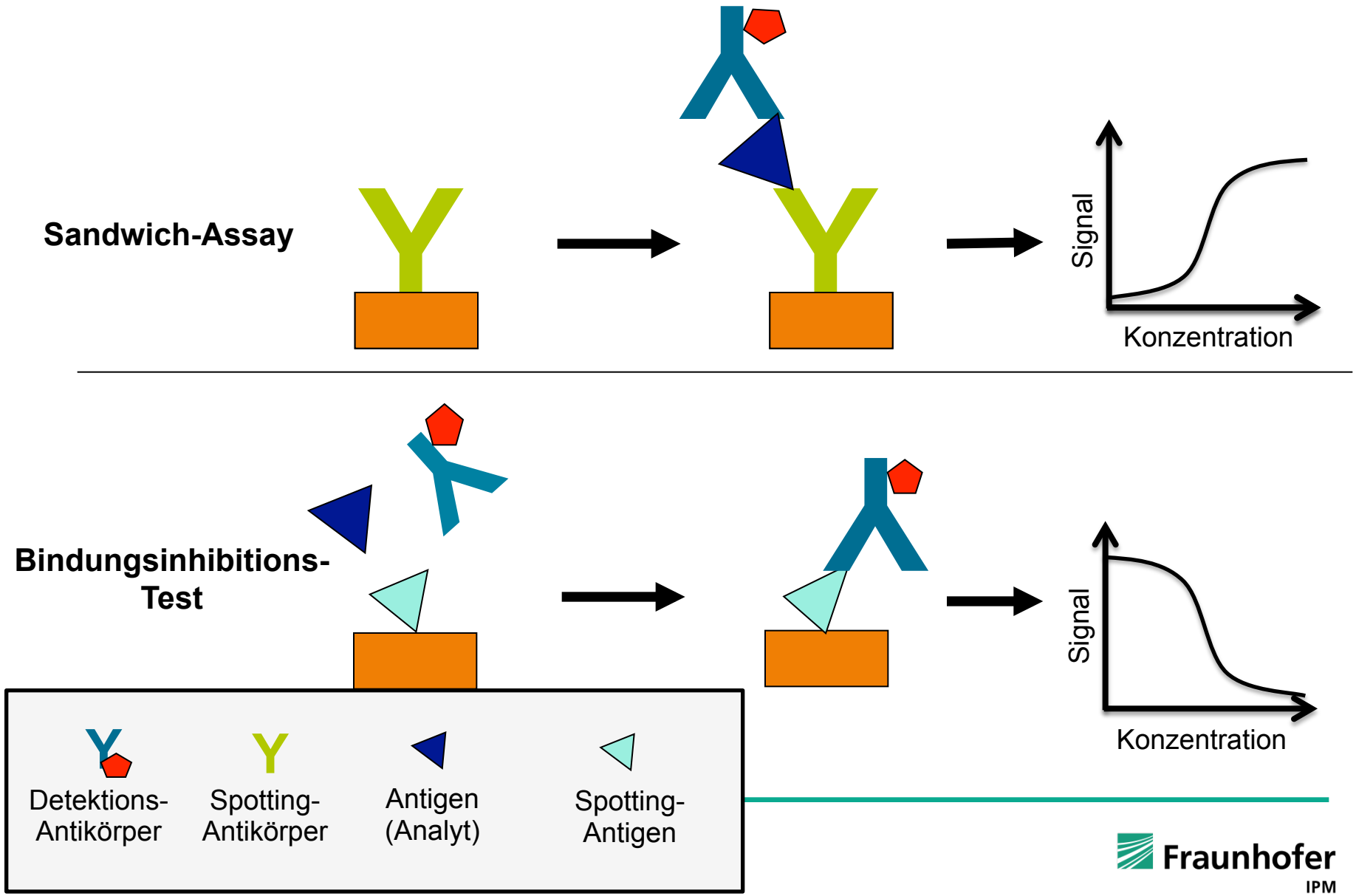
Protein Microarray (Fluoreszenz Bild)





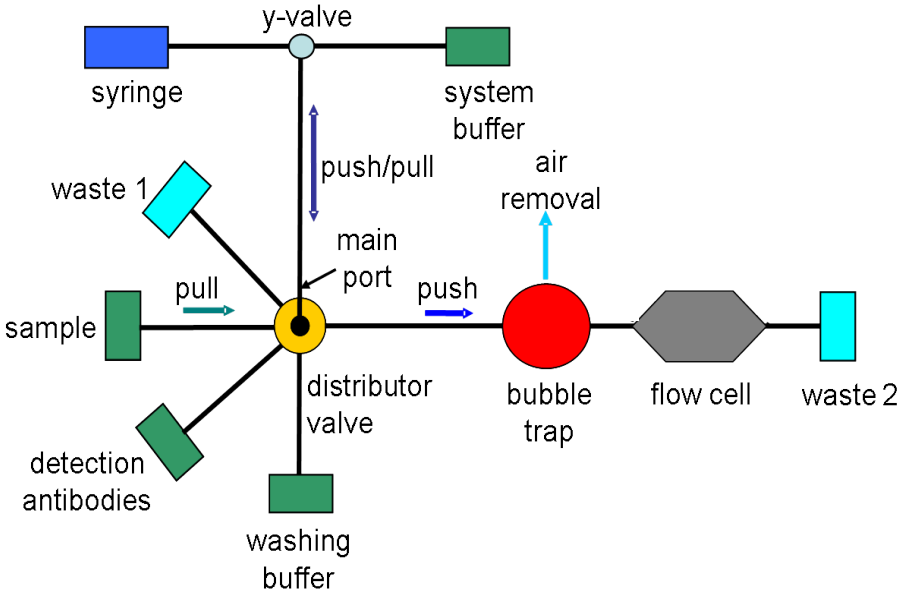
Fraunhofer IPM

Messsystem: Fluoreszenz Immun-Tests



Fraunhofer IPM

Messsystem: Fluidik-Einheit



- Vielzahl von fluidischen Abläufen mit einfachem Flussschema möglich
- Verdünnen, Mischen und Vorinkubation durch Taylor-Dispersion und Multilamination
- Probenvolumen: 75 µl oder 25 µl
- Automatisch und schnell, Dauer eines gesamten Assays: 18-25 Minuten
- Parallele Durchführung von Sandwich- und Bindungsinhibitions-Tests

Fraunhofer IPM

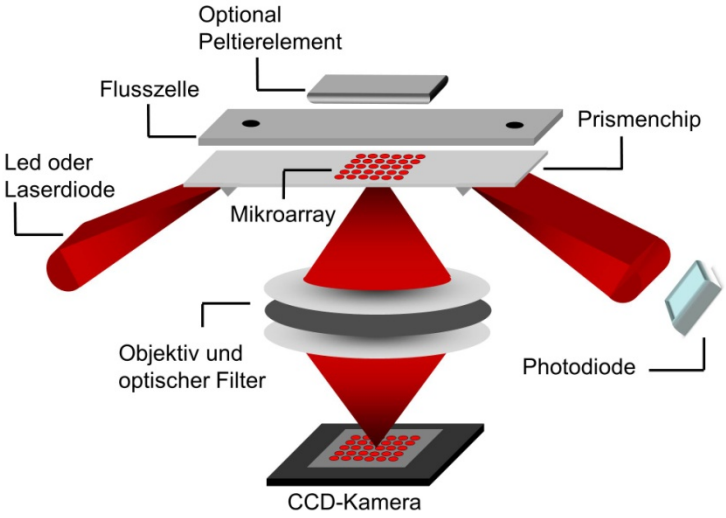
Messsystem: Optik-Einheit

Dünne Polymer Folie als Biochip

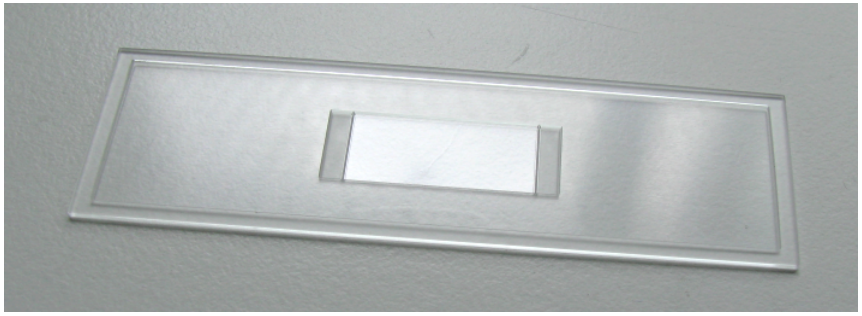
- Hohe Empfindlichkeit durch TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) mit Vielfachreflexion
- Kostengünstige Herstellung (Spritzguss)
- Integrierte Prismen für die Lichteinkopplung

System

- Fluoreszenz-Anregung mit LED oder Halbleiterlaser
- Detektion mit ungekühlter CCD-Kamera
- Nachweisgrenze (Fluorochrome/µm²) vergleichbar mit Laser-Scannern (z.B. Axon Genepix)



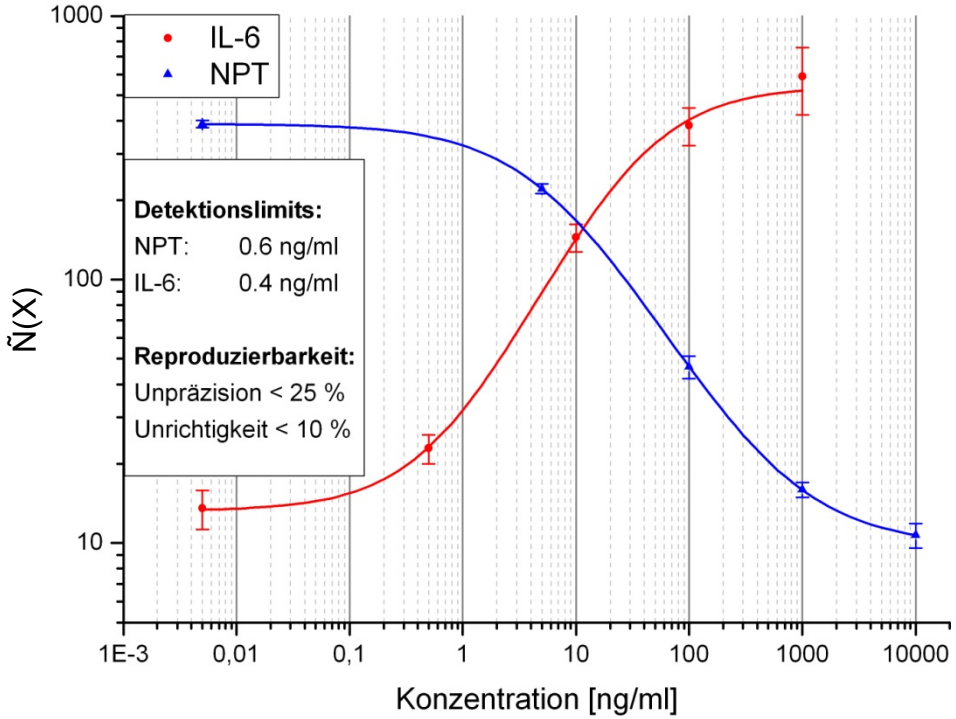
Optisches System



TIRF - Chip

Fraunhofer IPM

Ergebnisse: Standard-Kurve



- Drei Chips je Konzentration
- Paralleler Test von IL-6 und NPT mit Standardlösungen
- 25 µl Probe, Verdünnung 1:3
- Automatischer Ablauf von Assay und Read-Out

Klinische Relevanz:

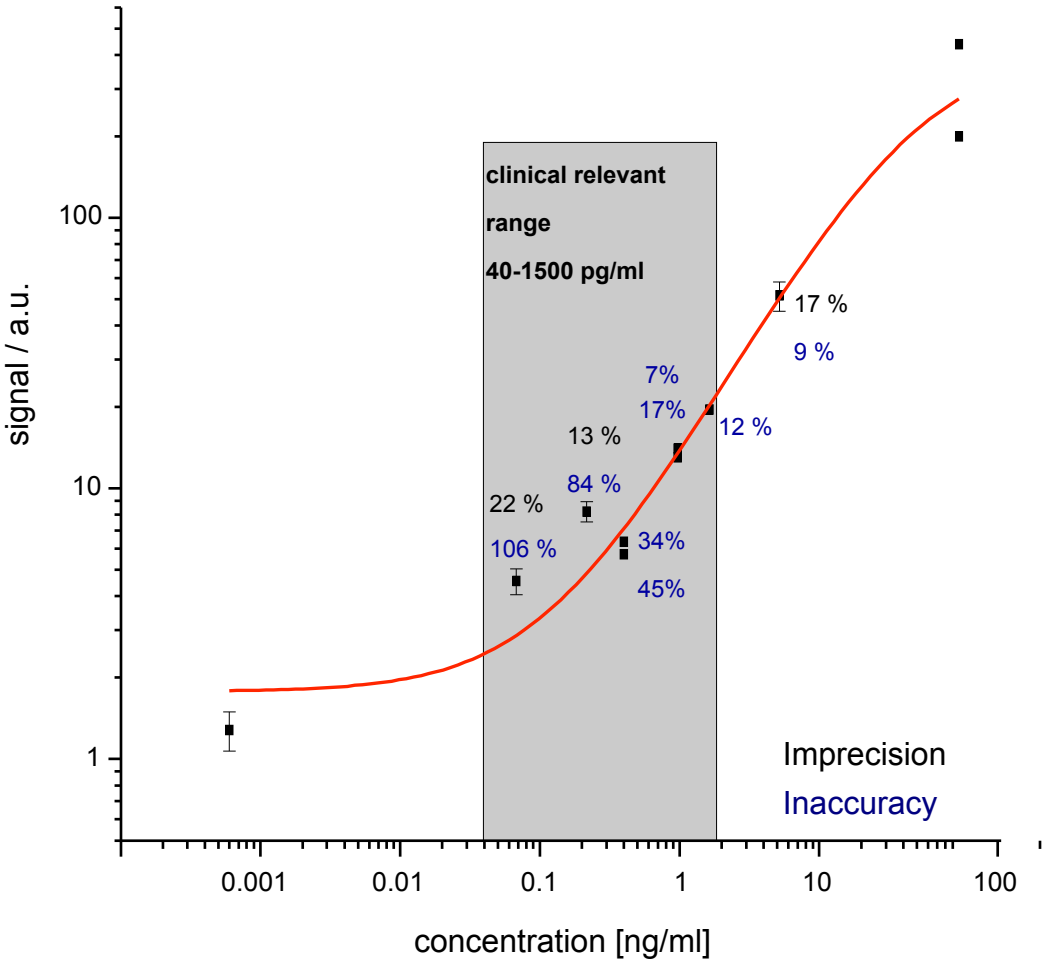
- IL-6: Schwellwert bei 1ng/ml
  → Optimierung des Messbereichs nötig.
- NPT: Schwellwert bei 18 ng/mL
  → Schwellwert wird aufgelöst.

Quellen:

F. M. Brunkhorst, Zentralbl Chir 127 (2002), pp. 165-173
JC. Mitaka,, Clinica Chimica Acta, Vol. 351, (2005), pp. 17-19

Fraunhofer IPM

Ergebnisse: Tests mit Realproben
Interleukin 6 Assay mit Referenzierung

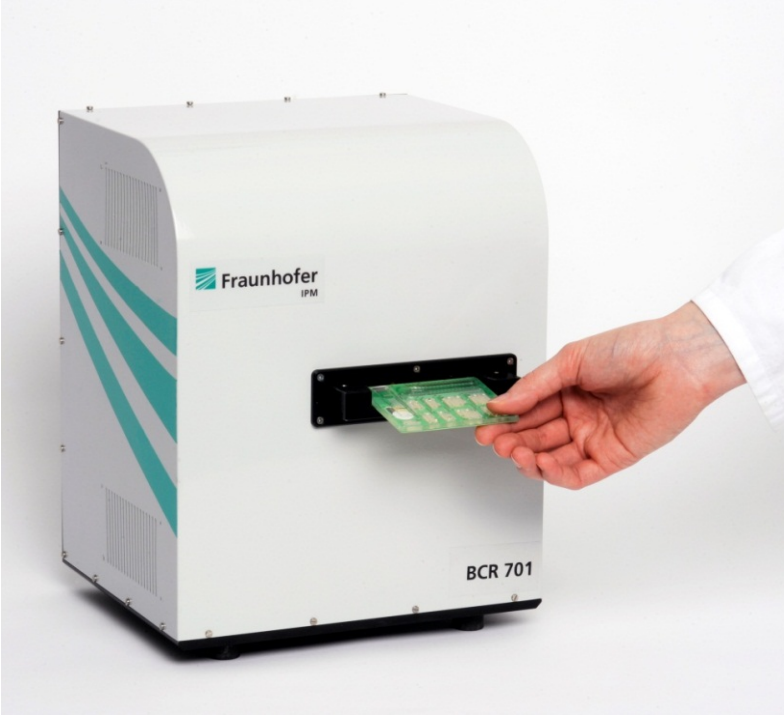


- Prüfung mit Realproben, Universitätsklinik Tübingen, Referenz: Siemens Immulite 2000
- Glas-Chips mit Tantaloxid-Wellenleitern
- Kalibrationskurve mit Realproben
- Test ist funktional in humanem Plasma (25 µl Probe, Verdünnung 3:1)
- Bei geringen Konzentrationen erhöhte Fehler, vermutlich aufgrund von interferierenden Blutbestandteilen, z.B. Bilirubin, Hämolyse, Blutfette

Fraunhofer IPM

Zusammenfassung

- Kompaktes und portables System mit kostengünstigen Komponenten
- Kostengünstige Disposables
- Schnelle, automatische Durchführung der Assays in 25 Minuten
- Parallele Durchführung von Nicht-kompetitiven- und Bindungsinhibitions-Tests
- Multiparameter-Test parallel durch Mikroarrays
- Als Plattform für viele diagnostische und analytische Fragestellungen geeignet



Fraunhofer IPM

Dank an Kollegen und Kooperationspartner

Fraunhofer IPM
Stefan Adolph
Bastian Lutz
Jens Scherer
Sarah Schickinger
Carlo Strebel

Austrian Institute of Technology
Claudia Preininger
Ursula Sauer

Universitätsklinik Tübingen
Prof. Erwin Schleicher

Klinikum rechts der Isar
Prof. Peter Luppa

Danke

für Ihre

Aufmerksamkeit

Fraunhofer IPM