

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Direktor: Prof. Dr. Lohoff

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchungen zur Resistenzbestimmung von Bakterien  
mittels Massenspektrometrie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin bzw. Zahnmedizin, Humanbiologie oder  
Naturwissenschaften, Medizinwissenschaften  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Lisa Klute aus Lüdenscheid

Regensburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 12.05.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: PD Dr. Frank Sommer

1. Korreferent: PD Dr. Thomas Stief

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Abbildungs-, Abkürzungs- und Tabellenverzeichnisse.....</b>             | <b>4</b>  |
| <b>2. Einleitung.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2.1. Einleitung in die Thematik.....</b>                                   | <b>6</b>  |
| <b>2.2. Resistenztestung.....</b>   | <b>10</b> |
| 2.2.1. Agardiffusionstest .....   | 11        |
| 2.2.2. Epsilon-Meter-Test („E-Test“).....                                     | 13        |
| 2.2.3. MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionsmethoden.....                     | 14        |
| <b>2.3. Massenspektrometrie.....</b>  | <b>15</b> |
| 2.3.1. MALDI-TOF-Prinzip und Aufbau .....                                     | 15        |
| 2.3.2. Erregeridentifizierung mittels MALDI-TOF .....                         | 18        |
| 2.3.3. Resistenztestung mittels MALDI-TOF .....                               | 19        |
| <b>2.4. Verwendete Bakterien .....</b>  | <b>21</b> |
| 2.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....  | 21        |
| 2.4.2. <i>Proteus mirabilis</i> .....   | 22        |
| <b>2.5. Verwendete Antibiotika.....</b>                                       | <b>23</b> |
| 2.5.1. Ampicillin .....   | 23        |
| 2.5.2. Ciprofloxacin .....  | 24        |
| <b>2.6. Resistenzmechanismen.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>2.7. Fragestellung .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>3. Material und Methoden.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>3.1. Materialien, Proben.....</b>  | <b>28</b> |
| 3.1.1. Chemikalien .....  | 28        |
| 3.1.2. Antibiotika.....   | 29        |
| 3.1.3. Agarplatten.....   | 29        |
| 3.1.4. E-Test-Streifen .....  | 29        |
| 3.1.5. Materialien.....   | 30        |
| 3.1.6. Bakterien .....  | 30        |
| <b>3.2. Medien und Lösungen .....</b>   | <b>31</b> |
| 3.2.1. McFarland-Standard.....  | 31        |
| <b>3.3. Geräte.....</b>   | <b>31</b> |
| 3.3.1. Laborgeräte.....   | 31        |
| 3.3.2. Software .....   | 32        |
| <b>3.4. Methoden .....</b>  | <b>33</b> |
| 3.4.1. Durchführung MALDI-TOF Messung.....                                    | 33        |
| 3.4.2. Herstellung einer standardisierten Bakteriensuspension .....           | 33        |
| 3.4.3. Herstellung der Ampicillin-Lösung.....                                 | 34        |
| 3.4.4. Herstellung der Ciprofloxacin-Lösung .....                             | 34        |
| 3.4.5. Einfrieren und Auftauen von Bakterien.....                             | 34        |
| 3.4.6. Methode „Messung in Mikrotiterplatten“ .....                           | 35        |
| 3.4.7. Messung von Resistenzen mittels MALDI-TOF als „Standard Methode“ ..... | 35        |
| <b>4. Ergebnisse.....</b>   | <b>38</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.1. Vorversuche .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>4.1.1. Vorversuche mit Mikrotiterplatten.....</b>                             | <b>38</b> |
| 4.1.1.1. Vorversuche Mikrotiterplatten mit <i>E. coli</i> .....                  | 38        |
| 4.1.1.2. Vorversuche mit Mikrotiterplatten mit <i>Klebsiella pneumonia</i> ..... | 39        |
| <b>4.1.2. Vorversuche in größeren Volumina .....</b>                             | <b>39</b> |
| <b>4.2. Versuchsreihe <i>E. coli</i> und Ampicillin .....</b>                    | <b>42</b> |
| 4.2.1. Versuche zur Ermittlung der optimalen <i>E. coli</i> -Konzentration ..... | 43        |
| 4.2.2. Ampicillin-Konzentration .....  | 45        |
| 4.2.3. Kinetik <i>E. coli</i> und Ampicillin .....                               | 47        |
| 4.2.4. Versuche mit und ohne Inkubationsschüttler .....                          | 49        |
| 4.2.5. Resistenztestung von <i>E. coli</i> -Isolaten mit Ampicillin .....        | 51        |
| <b>4.3. Versuchsreihe <i>E. coli</i> und Ciprofloxacin .....</b>                 | <b>54</b> |
| 4.3.1. McFarland-Wert <i>E. coli</i> .....                                       | 55        |
| 4.3.2. Ciprofloxacin-Konzentration .....   | 57        |
| 4.3.3. Kinetik .....   | 59        |
| 4.3.4. Resistenztestung von <i>E. coli</i> -Isolaten mit Ciprofloxacin .....     | 61        |
| <b>4.4. Versuche mit <i>P. mirabilis</i>.....</b>                                | <b>64</b> |
| 4.4.1. McFarland-Wert <i>P. mirabilis</i> .....                                  | 65        |
| 4.4.2. Kinetik .....   | 67        |
| <b>4.5. Résumé .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>5. Diskussion .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>6. Zusammenfassung .....</b>  | <b>78</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>82</b> |
| <b>8. Anhang .....</b>   | <b>90</b> |
| 8.1. Danksagung .....  | 90        |
| 8.2. Liste akademischer Lehrer .....   | 91        |
| 8.3. Ehrenwörtliche Erklärung.....   | 92        |



# 1. Abbildungs-, Abkürzungs- und Tabellenverzeichnisse

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1:  | Bild einer beimpften Agarplatte  | 7  |
| Abbildung 2:  | Zeittafel Einführung Antibiotika und Entdeckung Resistenzen  | 8  |
| Abbildung 3:  | Bild eines beispielhaften Agardiffusionstests  | 12 |
| Abbildung 4:  | Bild eines beispielhaften Epsilometer-Tests  | 13 |
| Abbildung 5:  | Bild eines MALDI-TOF   | 15 |
| Abbildung 6:  | Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF   | 16 |
| Abbildung 7:  | Beispiel eines Massenspektrums eines MALDI-TOF   | 18 |
| Abbildung 8:  | Graphische Darstellung des Zusammenhangs von der Dauer der Hypotension vor Initiieren einer effektiven Antibiose und statistischem Überleben | 26 |
| Abbildung 9:  | Bild eines MALDI-TOF Massenspektrums von <i>E. coli</i>  | 27 |
| Abbildung 10: | Schematische Darstellung der Hauptmethode der Versuche   | 37 |
| Abbildung 11: | Schematische Darstellung einer Spektralanalyse   | 41 |
| Abbildung 12: | Verdünnungsreihe <i>E. coli</i> mit Ampicillin   | 43 |
| Abbildung 13: | Verdünnungsreihe Ampicillin und <i>E. coli</i>   | 45 |
| Abbildung 14: | Kinetik <i>E. coli</i> und Ampicillin  | 47 |
| Abbildung 15: | Inkubation im Inkubationsschüttler   | 49 |
| Abbildung 16: | Resistenztestung von <i>E. coli</i> mit Ampicillin   | 51 |
| Abbildung 17: | Resistenztestung von <i>E. coli</i> ohne Ampicillin  | 52 |
| Abbildung 18: | Verdünnungsreihe <i>E. coli</i> mit Ciprofloxacin  | 55 |
| Abbildung 19: | Verdünnungsreihe Ciprofloxacin und <i>E. coli</i>  | 57 |
| Abbildung 20: | Kinetik <i>E. coli</i> und Ciprofloxacin   | 59 |
| Abbildung 21: | Resistenztestung von <i>E. coli</i> mit Ciprofloxacin  | 61 |
| Abbildung 22: | Resistenztestung von <i>E. coli</i> ohne Ciprofloxacin   | 62 |
| Abbildung 23: | Verdünnungsreihe <i>P. mirabilis</i> mit Ampicillin  | 65 |
| Abbildung 24: | Kinetik <i>P. mirabilis</i> und Ampicillin   | 67 |

| Abkürzung           | Bedeutung  |
|---------------------|--|
| Abb.                | Abbildung  |
| ATP                 | Adenosintriphosphat  |
| a.u.                | artificial unit (artifizielle Einheit)   |
| BHI                 | Brain-Heart-Infusion   |
| DNA                 | Deoxyribonucleic Acid  |
| E-Test              | Epsilometertest  |
| <i>E. coli</i>      | <i>Escherichia Coli</i>  |
| EHEC                | Enterohämorrhagischer <i>Escherichia coli</i>  |
| EIEC                | Enteroinvasiver <i>Escherichia coli</i>  |
| EPEC                | Enteropathogener <i>Escherichia coli</i>   |
| ETEC                | Enterotoxischer <i>Escherichia coli</i>  |
| EUCAST              | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing   |
| g                   | Gramm  |
| h                   | Stunden  |
| HCCA                | $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid   |
| HNO                 | Hals-Nase-Ohren-Heilkunde  |
| m/z                 | Masse pro Ladung   |
| MALDI-TOF MS        | Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) mit Flugzeitanalyse/ Time Of-Flight (TOF) Massenspektrometrie (MS) |
| MBT-ASTRA           | MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay  |
| mg                  | Milligramm   |
| MHK                 | Minimale Hemmkonzentration   |
| ml                  | Milliliter   |
| MPCC                | Minimal Profile Changing Concentration   |
| RNA                 | Ribonucleic Acid   |
| $\mu$ g             | Mikrogramm   |
| <i>P. mirabilis</i> | <i>Proteus mirabilis</i>   |



## 2. Einleitung

„Der Zufall begünstigt nur den vorbereiteten Geist.“

Louis Pasteur (1822 - 1895)

### 2.1. Einleitung in die Thematik

Mit dem Fortschritt der Wissenschaft nimmt auch das Wissen über Infektionskrankheiten und deren Therapiemöglichkeiten zu. Seit Entdeckung des Penicillins 1928 (13) als erstes Antibiotikum und dessen Verwendung seit 1943 kam es zur rasanten Weiterentwicklung in der medikamentösen Therapie von bakteriellen Infektionen (36).

Anfang September 1928 kehrte der Bakteriologe Alexander Fleming nach seinem Urlaub in das Labor des St. Mary's Hospital in London zurück und bemerkte dort eine vor der Abwesenheitszeit beimpfte Agarplatte mit *Staphylococcus aureus* (55). Auf dieser Agarplatte konnte der Wissenschaftler zusätzlich das Wachstum eines Pilzes erkennen, um dessen Wachstumszone herum keine Vermehrung des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* zu verzeichnen war. Fleming gelang es, den Pilz als Schimmelpilz der Gattung *Penicillium* zugehörig zu identifizieren (13). 1929 veröffentlichte der Bakteriologe sodann seine Beobachtung im „British Journal of Experimental Pathology“ (13), um dort auf die wachstumshemmende Fähigkeit des Schimmelpilzes *in vitro* aufmerksam zu machen. Dies animierte 10 Jahre später Forscher der Universität Oxford Penicillin als Wirkstoff zu isolieren und nach Durchführung von *in vivo* Versuchen große Erfolge in der Therapie von erkrankten Soldaten im zweiten Weltkrieg verzeichnen zu können (2). Als natürlicher biologischer Vorgang zeigte sich die Zunahme von Resistenzen

der Keime gegenüber Antibiotika bereits kurz nach Beginn des großflächigen Einsatzes dieses Wirkstoffes. Schon Ende des Jahres 1940 berichteten Chain und Abraham, zwei Forscher der Universität Oxford über ein Enzym, welches Penicillin inaktiviert und dieses insbesondere in der Therapie für *Escherichia Coli* unwirksam macht (36).

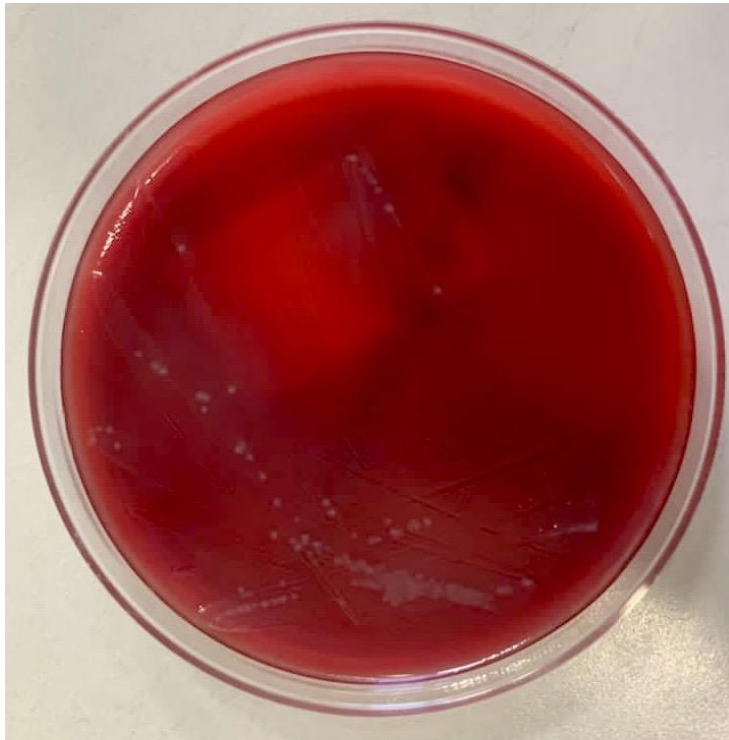


Abb.1: Bild einer beimpften Agarplatte, entsprechend der aktuell in der Routinediagnostik standardisierten Durchführung. Das Bild zeigt mehrere Kolonien eines Enterobakteriums nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C.

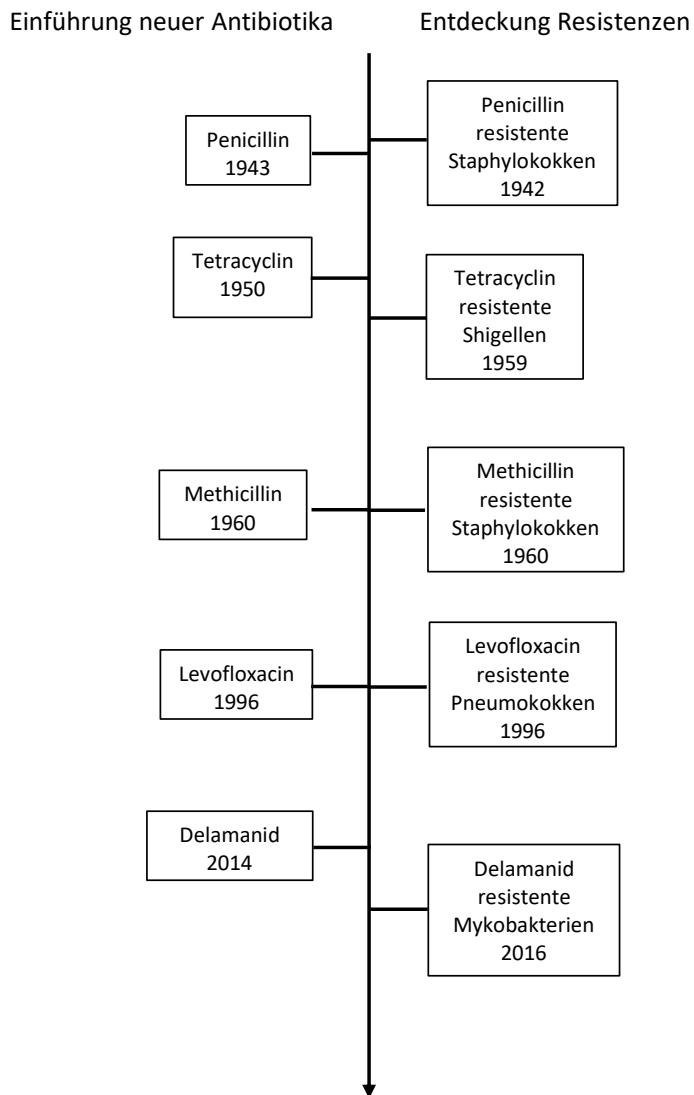


Abb. 2: Zeittafel mit Beispielen für Einführungen von Antibiotika und Entdeckungen der entsprechenden Resistenzen. Diese Abbildung veranschaulicht die schnelle Resistenzentwicklung nach Einführung bestimmter Antibiotika und zeigt außerdem, dass in einigen Fällen schon vor der offiziellen Einführung Resistenzen entdeckt wurden (modifiziert nach Högberg et al. (20)).

Die gleiche Forschungsgruppe berichtete zwei Jahre später von vier klinischen Fällen, in denen Penicillin gegenüber *Staphylococcus aureus* Infektionen versagte (36). Zurückzuführen sei dies am ehesten auf die Fähigkeit der Bakterien ein Enzym (später Penicillinase genannt) zu produzieren. Penicillinase spaltet den  $\beta$ -Laktam-Ring des Penicillins hydrolytisch und macht es somit unwirksam. Bereits 20 Jahre nach Einführung des therapeutischen Einsatzes von Penicillin bei Infektionen hatten 80% der *Staphylococcus aureus*-Stämme Resistenzen gegenüber Penicillin entwickelt (36). Seitdem wurde eine große Anzahl weiterer Antibiotika entwickelt, die aber auch bald nach breitem Einsatz Resistenzen aufwiesen. Die Anzahl an Einführungen neuer antibiotischer Medikamente war zwischen 1980-1999 am höchsten, seitdem ist die Zahl der jährlichen neuen Antibiotikazulassungen stagniert (62). Damit konnte die Zunahme an Resistenzen immer weniger durch die Zulassung neuer Substanzen kompensiert werden. Nicht zuletzt deswegen entstanden in den letzten Jahren massive Probleme, die immer mehr Schwierigkeiten bei der Therapie von bakteriellen Infektionen bereiten. So müssen heutzutage häufig Reserveantibiotika eingesetzt werden, die nicht selten starke Nebenwirkungen zeigen (27). Außerdem nimmt die Zahl an Patienten zu, deren bakterielle Infektionen mit resistenten Erregern nicht mehr durch Antibiose heilbar sind (64). Mittlerweile ist es zu einem regelrechten Wettlauf zwischen der fortschreitenden Resistenzentstehung und der Entwicklung neuer Antibiotika gekommen. Die genauen Ursachen der Resistenzproblematik sind nicht vollständig verstanden. Eine Rolle hierbei spielen zum Beispiel natürliche biologische Vorgänge der Bakterien, inkorrekte Verwendung von Antibiotika (51), Anwendung in der Tiermast und die Hochleistungsmedizin mit hohem Antibiotika-Einsatz. Die Kosten für hospitalisierte Patienten mit multiresistenten Erregern sind immens hoch im Vergleich zum Kostenaufwand, den ein Patient verursacht, der an einem Antibiotika-sensiblen Bakterium erkrankt ist (64). Wegen der Resistenzproblematik ist heutzutage bei der Therapie schwerer Infektionen eine Analyse der Resistenz essentiell. Von der Probenabnahme bis zum

Vorliegen des Antibiogramms vergehen in der Regel mindestens 48 Stunden. Das hat folgende Ursachen: Zunächst muss der Erreger aus der Untersuchungsprobe angezüchtet werden. Das allein benötigt ungefähr 24 Stunden. Die Resistenztestung des Erregers nimmt dann meistens weitere 18 Stunden in Anspruch, sodass der Kliniker erst 2 Tage nach Abnahme der Probe einen Bericht über die Resistenzlage erhält. Auch vollautomatisierte Prozesse benötigen heutzutage in der Regel 7,5-14 Stunden für eine Resistenzbestimmung. Mittlerweile existieren auch moderne Methoden, wie zum Beispiel molekularbiologische Verfahren, die eine schnellere Testung mit einer Dauer von 2-4 Stunden ermöglichen. Allerdings verursachen diese „Schnellverfahren“ einen viel höheren Kostenaufwand (54) und werden daher nur ergänzend in der Routine zum Beispiel für Notfälle eingesetzt. Ein Zeitraum von 48 Stunden bis zum Vorliegen des Antibiogramms ist in vielen klinischen Fällen zu lang, da bei schweren Infektionen eine frühe und korrekte Antibiose der entscheidende Faktor ist, um die Chance für ein Überleben zu verbessern (31). Die Entwicklung von Methoden, die zu einer schnelleren Resistenz-Testung führen, ist daher von immenser Bedeutung, besonders in Fällen, in denen eine schnelle Einleitung der antibiotischen Therapie bedeutenden Einfluss auf die Überlebenschancen des Patienten hat, wie zum Beispiel bei einem septischen Schock (31).

## 2.2. Resistenztestung

Zur Überprüfung, ob ein Keim bestimmte Resistenzen gegenüber einem Antibiotikum aufweist, existieren spezielle diagnostische Tests, deren Ergebnis durch ein sogenanntes Antibiogramm angezeigt wird. Es gibt verschiedene Testverfahren, die im Weiteren näher erläutert werden. Hochwertige Testverfahren bestimmen heutzutage die „minimale Hemmkonzentration“ (MHK). Das ist diejenige Konzentration eines

Antibiotikums, die mindestens benötigt wird, um ein Isolat am Wachstum zu hemmen. Die MHK erlaubt in der Regel eine Aussage über die klinische Wirksamkeit eines Antibiotikums bei einer Infektion. Grundsätzlich sind aber für eine solche Aussage nicht nur die MHK des Erregers, sondern auch die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Antibiotikums, sowie Patientenfaktoren, wie etwa das Gewicht zu berücksichtigen. Die Zusammenhänge zwischen diesen Faktoren sind sehr komplex und sollen im Folgenden an einem Beispiel erläutert werden. Bei den  $\beta$ -Laktam Antibiotika erfolgt die therapeutische Wirkung ausschließlich während die Serumkonzentration im Blut die minimale Hemmkonzentration übersteigt (33). Daher ist die sogenannte „Zeit über der MHK“ ein entscheidender Parameter für die Wirksamkeit aller  $\beta$ -Laktam Antibiotika. Aus diesem Grund werden diese Antibiotika mittlerweile als Kurz- oder Dauerinfusion eingesetzt. Hat ein Antibiotikum eine sehr hohe Hemmkonzentration, also eine MHK über einer gewissen Schwelle, wird es als resistent angegeben. Dieser Schwellenwert wird von Normen festgelegt, die für Labore bindend sind. In Europa werden mittlerweile überwiegend die Kriterien der EUCAST verwendet (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (18).

### 2.2.1. Agardiffusionstest

Das älteste Verfahren zur Bestimmung der Resistenz eines isolierten Bakteriums stellt der Agardiffusionstest dar. Dafür wird ein spezieller Agar, der sogenannte „Müller-Hinton-Agar“, der mit dem zu untersuchenden Bakterium beimpft wird, verwendet. Runde Papierblättchen, die mit einer definierten Menge des Antibiotikums getränkt sind, werden auf die Platte gesetzt. Dann erfolgt die Inkubation bei 37° Celsius über mindestens 18 Stunden. Durch Diffusion des Medikamentes in den Agar wird ein Konzentrationsgefälle um das Plättchen herum aufgebaut. Ist das

Bakterium sensibel, wird sein Wachstum gehemmt. Es bildet sich dann eine wachstumsfreie Zone um das Antibiotikaplättchen herum (sogenannter Hemmhof). Diese Zone kann gemessen werden und in einen linearen Zusammenhang mit der MHK gestellt werden (24). Grundsätzlich ist die Methode der Agardiffusion einfach durchführbar und kostengünstig. Mit einer Testung können auf einem Agar mehrere Antibiotikaplatten verwendet werden und somit verschiedene Antibiotika für diesen Keim untersucht werden (18). Ein Nachteil des Verfahrens ist, dass es nur eine Näherung an die tatsächliche MHK darstellt und somit in seiner Genauigkeit und Vorhersagekraft eingeschränkt ist. Das Verfahren der Agardiffusion ist heutzutage größtenteils durch Verfahren mit direkter Bestimmung der MHK ersetzt worden.

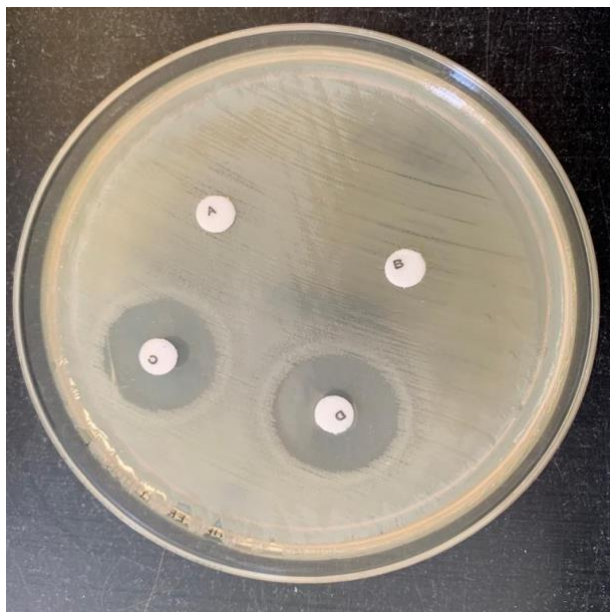


Abb.3: Bild eines beispielhaften Agardiffusionstests wie er in der Routinediagnostik durchgeführt wird.

Das Bild zeigt ein Isolat mit hoher Empfindlichkeit (große Hemmhöfe) um die Plättchen C und D und Resistenz (keine Hemmhöfe) für die Wirkstoffe der Plättchen A und B.

### 2.2.2. Epsilometer-Test („E-Test“)

Der Epsilometer-Test® („E-Test“) ist ein manueller Test, der auf Bestimmung des MHK-Wertes anhand von Wachstumshemmung auf einer Agar-Platte basiert. Hierbei wird ein Plastik-Streifen mit einer das Antibiotikum betreffenden ablesbaren Konzentrationskala auf einen mit dem Bakterium beimpften Agar gelegt und für 18-24 Stunden inkubiert. Nach Inkubation kann man dann im Falle einer stattgefundenen Wachstumshemmung einen elliptisch geformten Hemmhof erkennen und anhand der Skala auf dem Streifen die Antibiotikakonzentration und damit auch die entsprechende MHK des Bakteriums ablesen. Entlang des E-Test-Streifens entsteht ein Konzentrationsgradient mit einer sehr viel höheren Auflösung, als dies beim Agardiffusionstest der Fall ist.

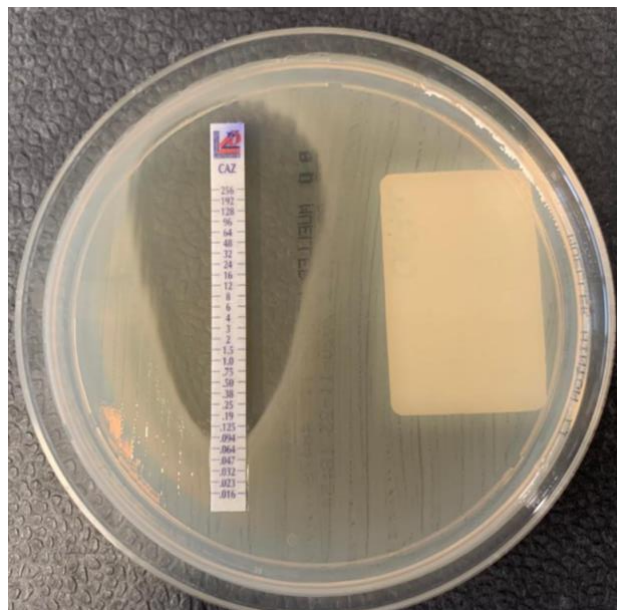


Abb.4: Bild eines beispielhaften Epsilometer-Tests wie er in der Routinediagnostik durchgeführt wird.

Das Bild zeigt eine mit einem Isolat beimpfte Agarplatte, auf welche ein E-Test gelegt wurde. Nach Inkubation kann anhand der Skala auf dem Streifen die Antibiotikakonzentration und damit auch die entsprechende MHK des Bakteriums abgelesen werden.



### 2.2.3. MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionsmethoden

Die Dilutionsmethode beschreibt grundsätzlich Verdünnungsreihen von Antibiotikakonzentrationen, um die MHK zu bestimmen. Es wird also das Wachstum des Bakteriums in verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums getestet. In einer aufsteigenden Verdünnungsreihe ist die erste Konzentration des Antibiotikums, in der kein Wachstum mehr stattfindet, die sogenannte minimale Hemmkonzentration. Bouillondilutionstests werden mit großen Volumina in Kulturröhrchen durchgeführt, während Mikrodilutionsmethoden in Mikrotiterplatten angelegt werden. Die Mikrodilutionsmethode stellt die Resistenztestung in Form einer Verdünnungsreihe in einer Mikrotiterplatte oder noch kleineren Formaten dar. Vorteil der Dilution in Mikrotiterplatten ist die Möglichkeit der automatischen Auswertung. Ein Beispiel für ein automatisiertes mikrobiologisches Testverfahren (und auch im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendetes Gerät) ist das 1983 eingeführte MicroScan®-Walkaway (42). Hier wird eine Mikrotiterplatte mit vorgefertigten Vertiefungen und einer schon angelegten Verdünnungsreihe des Antibiotikums mit dem zu untersuchenden Keim beimpft und im Gerät selbst inkubiert. Nach Übernachts-Bebrütung wird dann am nächsten Tag automatisiert das Wachstum in den verschiedenen Vertiefungen abgelesen und mit bewachsenen Kontroll-Näpfchen in Beziehung gesetzt. Ein angeschlossener Computer wertet nach vorgegebenen Algorithmen die Wachstumskurve aus und berechnet die MHK für jedes einzelne Antibiotikum.

## 2.3. Massenspektrometrie

### 2.3.1. MALDI-TOF-Prinzip und Aufbau

Die Massenspektrometrie bezeichnet eine analysierende Methode, mit der man die molekulare Masse von Stoffen bestimmen kann. Die Kombination aus einer Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-(MALDI)-Ionenquelle und einem „Time-of-Flight“ (TOF) Flugzeitanalysator wird abgekürzt als „MALDI-TOF“ bezeichnet. Der Aufbau eines MALDI-TOFs besteht wie in der Graphik (siehe unten Abb. 6) dargestellt aus drei wesentlichen Einheiten: der Desorptions-/Ionisations-Einheit, in der die Proben mittels Laser ionisiert und in die Gasphase überführt werden, dem Analysator, durch den Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung aufgeteilt werden und einem Detektor, der die einzelnen Ionen in ein elektrisches Signal umwandelt.



Abb.5: Bild eines MALDI-TOF wie es in der Routinediagnostik verwendet wird.

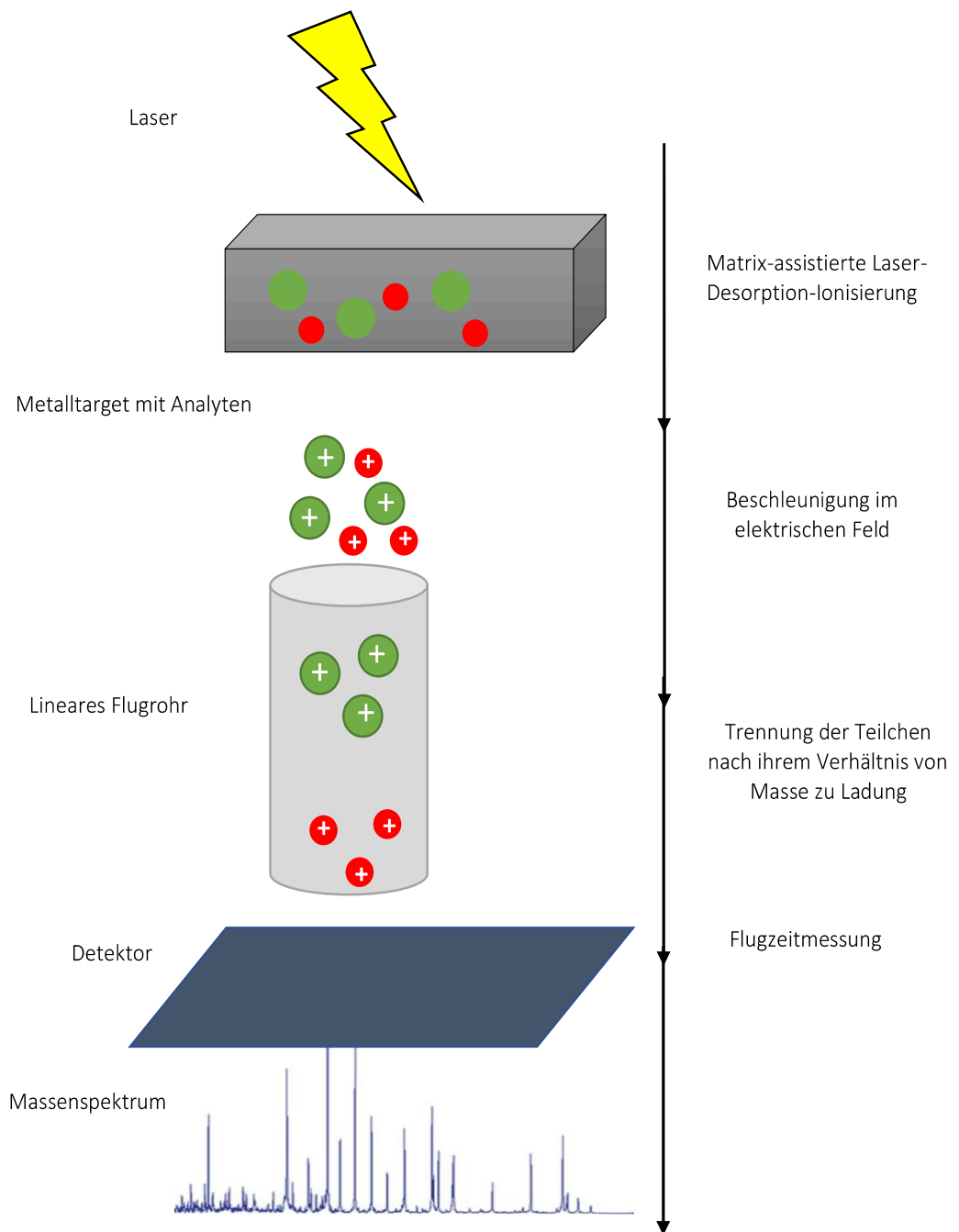


Abb.6 Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF (37).

Im Folgenden wird der Prozess der MALDI-TOF-Analyse kurz skizziert, der im Wesentlichen drei Schritte umfasst (analog zu den drei Funktionseinheiten des Gerätes). Zuerst wird die Probe eines zu untersuchenden Erregers auf ein Feld der sogenannten Target-Metallplatte gegeben und mit einer Matrix-Lösung überschichtet. Diese Matrix besteht aus kleinen sauren Molekülen und führt zur Kokristallisierung der Erreger- und Matrixmoleküle. Die Matrix absorbiert außerdem die für die Desorption des Analysats benötigte Energie vom Laser und verhindert somit den Zerfall der Erregermoleküle.

Als nächstes wird die Erregerprobe auf einer Metallplatte dem Gerät zugeführt und mit dem Laser in die Gasphase überführt; dieser Übergang von Molekülen aus einem Feststoff oder einer Flüssigkeit in die Gasphase wird als Desorption bezeichnet. Dann wird die Probe durch Protonierung ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. In der Flugröhre bewegen sich leichtere Moleküle im Vakuum schneller als große Moleküle bis sie den Detektor erreichen. Die Fluggeschwindigkeit hängt außerdem noch von der Ladung der Moleküle ab. Ein Detektor misst den Einschlag jedes Teilchens am Ende der Beschleuniger-Röhre. Dadurch kann die jeweilige Flugzeit des einzelnen Ions bestimmt werden.

Sodann werden die Ionen abhängig von ihrer Flugzeit sortiert und in einem mit dem Massenspektrum verbundenen Computer graphisch dargestellt, wodurch das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) zu den verschiedenen Peak-Intensitäten veranschaulicht wird (11). Das spezifische Spektrum eines Stoffes setzt sich dann aus verschiedenen Peaks zusammen, die meist von 1000 bis 20.000  $m/z$  variieren (11).

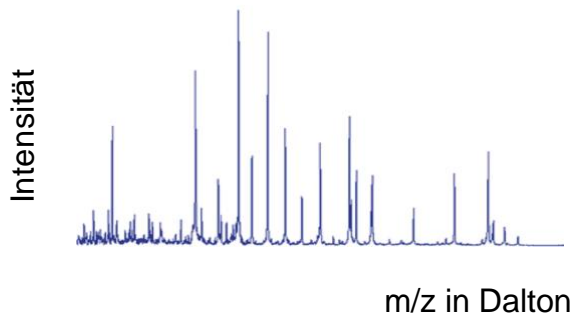


Abb.: 7. Beispiel eines Massenspektrums eines MALDI-TOF.

### 2.3.2. Erregeridentifizierung mittels MALDI-TOF

In der Identifizierung bakterieller Erreger hat sich das MALDI-TOF bereits als Standard in der klinischen Routine durchgesetzt (4;18). Das Prinzip ist dabei, dass verschiedene Arten von Bakterien jeweils charakteristische, unterscheidbare Spektren im MALDI-TOF ergeben. Das Verfahren funktioniert folgendermaßen: Durch den Abgleich zwischen dem analysierten Spektrum eines unbekanntem Erregers mit Spektren einer Datenbank, kann nach adäquater Übereinstimmung charakteristischer Peaks im gemessenen Spektrum der Keim identifiziert werden. Dies geschieht innerhalb von wenigen Minuten (11). Vor allem zeitlich und arbeitstechnisch bringt diese Methode viele Vorteile im Gegensatz zu herkömmlichen mikrobiologischen Untersuchungsmethoden, die auf charakteristischen biochemischen Reaktionen basieren, wie zum Beispiel die sogenannte „bunte Reihe“. In einer im Mai 2018 veröffentlichten Studie wurde beschrieben, wie die Kombination von Strategien zum rationalen Einsatz von Antiinfektiva und schneller Diagnostik von Bakteriämien mittels MALDI-TOF zu bedeutenden Verbesserungen im Bereich von Mortalität, Krankenhausaufenthaltsdauer und Kosteneffizienz führten (46).

### 2.3.3. Resistenztestung mittels MALDI-TOF

In den letzten Jahren wuchs auch das Interesse an möglicher Resistenztestung der Bakterien gegenüber bestimmten Antibiotika mittels MALDI-TOF; nicht zuletzt durch die globale Zunahme an Resistenzen. Eine Idee für eine Herangehensweise hierbei ist die Aufdeckung spezifischer Proteine, die sensible von resistenten Bakterienstämmen unterscheiden. So wird seit einigen Jahren versucht unterschiedliche Massenspektren in Methicillin resistenten und sensiblen *Staphylococcus aureus*-Stämmen als standardisierte Analyseverfahren zu etablieren (29; 53). Dies wurde auch für Vancomycin-resistente Enterokokken untersucht (15). Außerdem konnten durch MALDI-TOF Messungen Aussagen über das Vorhandensein von *cfiA*-Genen bei *Bacterioides fragilis*-Stämmen getroffen werden und dadurch Voraussagen über Carbapenem-Resistenzen gemacht werden (40; 65). Ein Ansatz zur Resistenztestung mittels MALDI-TOF ist also der Spektrenvergleich im Massenspektrum verschiedener Keime, durch welche Rückschlüsse auf den Genotypen beziehungsweise Resistenztypen gezogen werden können. Wenn ein solches Verfahren in bestimmten Fällen, beziehungsweise bei bestimmten Stämmen, prinzipiell möglich erscheint, hat es sich im Alltagslabor als sehr komplex erwiesen und wird bisher daher kaum in der Routinediagnostik verwendet. Obschon vieler Herausforderungen konnte Camara et al. im Jahr 2007  $\beta$ -Laktam-Aktivität in Ampicillin resistenten *E. coli* mittels MALDI-TOF nachweisen (6). Andere Projekte untersuchten wie Camara et al. die direkte enzymatische Aktivität verschiedener  $\beta$ -Laktamasen mittels MALDI-TOF. Hierbei wurde das Massenspektrum verschiedener  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nach Inkubation mit dem zu untersuchenden Stamm (52) verglichen. Durch enzymatische Spaltung des  $\beta$ -Laktam-Rings nahm zum Beispiel das Molekulargewicht von Ampicillin um 18 Dalton zu, was im MALDI-TOF messbar ist.  $\beta$ -Laktamase negative Stämme hingegen beeinflussten das Molekulargewicht des Antibiotikums nicht. Dabei wird jedoch nicht das Massenspektrum des Bakteriums nach MALDI-TOF Messung analysiert, sondern die

Veränderung des Antibiotikums. Diese Testung führt nur zu aussagekräftigen Ergebnissen, wenn keine anderen Resistenzmechanismen zusätzlich vorliegen, wie zum Beispiel Porindefekte oder bestimmte Efflux-Pumpen (47).

Eine weitere Methode ist die Untersuchung von Veränderungen des Massenspektrums von Keimen nach Behandlung mit einem Antibiotikum und dabei auftretenden Unterschieden zwischen resistenten und sensiblen Keimen. Die ersten Versuche dafür wurden mit Hefen und einer Verdünnungsreihe von Fluconazol durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubation konnte durch MALDI-TOF Messung ein Unterschied in den Proteinspektren der Hefen, die verschiedenen Fluconazol-Konzentrationen ausgesetzt waren, festgestellt werden (38). Die geringste Fluconazol-Konzentration, die dabei noch Unterschiede zum bloßen Hefespektrum anzeigt, wird auch als „minimal profile changing concentration (MPCC)“ bezeichnet (38).

Die Idee dieser experimentellen Arbeit beruht ebenso auf der Betrachtung von Unterschieden in den Proteinspektren nach Inkubation von Bakterien mit beziehungsweise ohne Antibiotika durch funktionelle Interaktion. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Verfahren sollte ein Ansatz gewählt werden, bei dem untersucht wird, inwiefern Antibiotika in Inkubationsversuchen das Spektrum eines Isolates verändern. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob dabei Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Resistenz gezogen werden können.

## 2.4. Verwendete Bakterien

### 2.4.1. *Escherichia coli*

Im Jahre 1885 wurde das Bakterium *Escherichia coli* als erster spezifischer Darmkeim von seinem Namensgeber Theodor Escherich erwähnt (18). Als bekannter Fäkalindikator kommt das gramnegative, sporenlöse Bakterium regelmäßig im Darm als wichtiger Bestandteil der bakteriellen Flora vor. In extraintestinalen Infektionen manifestiert sich *E. coli* zum Beispiel durch Harnwegsinfekte, Sepsis, Cholangitis, Wundinfektionen, als Beteiligung bei der Peritonitis oder bei Neugeborenen auch als Meningitis (18). Außer diesen „normalen“ *E. coli* Stämmen gibt es noch Stämme mit besonderen Pathogenitätsfaktoren, die mit bestimmten Erkrankungen assoziiert sind. Dazu gehört zum Beispiel der *ETEC* (enterotoxischer *E. coli*), der ein Enterotoxin produziert und unter anderem die Reisediarrhoe verursacht. Von hoher klinischer Relevanz ist auch der *EHEC* (enterohämorrhagischer *E. coli*), welcher Erreger einer Colitis und auch des sogenannten Hämolytisch-urämischen Syndroms sein kann. *EIEC* steht für „enteroinvasiver *E. coli*“ und dieser *E. coli* Stamm kann beim Menschen eine Shigellen-ähnliche Enteritis verursachen. Der *EPEC* (enteropathogener *E. coli*) kann zum Beispiel Verursacher von schweren Durchfallerkrankungen bei Neugeborenen sein. In der klinischen Diagnostik können diese Stämme, beziehungsweise ihre typischen Pathogenitätsfaktoren, durch eine PCR aus dem Stuhl nachgewiesen werden. Die Therapie ist primär symptomatisch in Form von Wasser- und Elektrolytsubstitution. Wichtig sind hier vor allem die prophylaktischen Hygienemaßnahmen, da der Keim oral aufgenommen wird. Vor Therapieinitiierung empfiehlt sich bei extraintestinalen Manifestationen das Anlegen eines Antibiotogramms, um bei vorhandener Resistenzlage eine erfolgreiche Antibiotikatherapie durchführen zu können (18). Neben den oben genannten Erkrankungen ist *Escherichia coli* im klinischen Alltag von immenser Bedeutung, da er einer



der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen ist (12). Hinzu kommt, dass sich die Resistenzlage bezüglich des *E. coli* in Europa in den letzten Jahren besorgniserregend entwickelt hat. Bei 57,2% der *E. coli*-Isolate wurden Resistenzen gegen Aminopenicilline in der EU-Bevölkerung gefunden (12). Resistenzen gegen Aminoglykoside stiegen bis zum Jahr 2015 auf 10,4% an; bei Fluorchinolonen wurde im gleichen Jahr bei 22,8% der *E. coli*-Isolate eine Resistenz festgestellt (12). Aktuell liegt die Resistenzrate von *E. coli* bei Cephalosporinen der dritten Generation zwischen 9 und 12% (49).

#### 2.4.2. *Proteus mirabilis*

Ein weiterer Keim, der in den Versuchen zu dieser Doktorarbeit verwendet wurde, ist *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*). 1885 in Erlangen von dem Pathologen Gustav Hauser entdeckt, deutet Proteus mit seinem Namen auf den griechischen Gott des Meeres Proteus hin, der seine Gestalt je nach Willen ändern kann. Wie auch *Escherichia coli* zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehörend, ist *P. mirabilis* ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Bakterium, das 90% der humanen Proteus-Infektionen auslöst (3). Häufig ist er bei Harnwegsinfekten als Erreger zu identifizieren, besonders bei lang andauernder Blasenkatheter-Anwendung (50). Zur Kolonisierung der ableitenden Harnwege zeigt *P. mirabilis* Urease- und Protease-Bildung, Biofilm-Entwicklung, Fimbriae und andere Virulenzfaktoren (50). Neben Harnwegsinfektionen kann *P. mirabilis* auch Auslöser für Infektionen der oberen Atemwege, Haut-, Knochen- oder Weichteilinfektionen sein. Bei Immungeschwächten oder älteren Patienten kann ein fulminanter Krankheitsverlauf auch zur lebensgefährlichen Urosepsis führen (50). Zur geeigneten antibiotischen Therapie sollte ein Resistogramm angefertigt werden, auch wenn der Proteus auf den Großteil der Antibiotika empfindlich reagiert (18).

## 2.5. Verwendete Antibiotika

### 2.5.1. Ampicillin

Das Aminopenicillin Ampicillin gehört zur Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und wirkt bakterizid. Das bedeutet es wirkt auf ein Bakterium abtötend (18). Seit seiner Einführung 1961 wird das Antibiotikum gegen bestimmte grampositive Keime eingesetzt. Mit einer zusätzlichen Amino-Gruppe, ist es diesem Antibiotikum auch möglich, durch die Porine der äußeren Zellwand von einigen *Enterobacteriaceae* wie zum Beispiel *E. coli*, *Salmonella* oder *P. mirabilis* zu gelangen (17). Damit erweitert sich das Wirkspektrum der Aminopenicilline um diese Vertreter der gramnegativen Keime. Ampicillin bewirkt eine bakterielle Lyse durch irreversible Hemmung des Enzyms Transpeptidase, welches von Bakterien zum Aufbau der eigenen Zellwand verwendet wird (41). Die Transpeptidase wird benötigt zur Bildung der Mureinschicht, die für die bakterielle Zellwand charakteristisch ist. Durch die Enzymhemmung kann die Zellwand der Bakterien zum Beispiel nicht vor Wassereinstrom von extrazellulär schützen. Durch Osmose geleitet, kann also Wasser in die Zelle einfließen und so die Zelle über Lyse zum Zelluntergang führen. Die Aminopenicilline haben mit den älteren Penicillinen gemein, dass sie anfällig gegenüber  $\beta$ -Laktamasen sind, was dazu führt, dass eine bedeutende Anzahl gramnegativer Keime, die ursprünglich sensibel auf die Wirkung von Ampicillin waren, eine Resistenz entwickelt haben (17). Eingesetzt wird es als Mittel der Wahl präventiv oder therapeutisch zum Beispiel gegen Streptokokkeninfektionen im HNO-Bereich, Listeriose, Harnwegsinfektionen oder Infekte der Atemwege. Ampicillin ist im Jahr 2017 auf die „World Health Organization's List of Essential Medicines“ gesetzt worden, einer Auflistung der effektivsten und sichersten Medikamente auf dieser Welt (63).

### 2.5.2. Ciprofloxacin

Das 1987 eingeführte Fluorchinolon der zweiten Generation inhibiert als Gyrasehemmer die bakterielle Zellteilung und wirkt so als Breitspektrum-Antibiotikum gegen gramnegative und grampositive Keime. Besonders wirksam ist es durch seine ausgezeichnete Hohlraum- und Gewebegängigkeit und ist daher bei zahlreichen Infektionen indiziert. Außerdem hat es eine ausgesprochen gute Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* (18). Da es eine gute Bioverfügbarkeit hat und im Magen-Darm-Trakt eine hohe Konzentration des Wirkstoffes gemessen werden kann, wird Ciprofloxacin auch gegen Infektionen des Magen-Darm-Traktes eingesetzt. Im Jahre 2002 war es das am häufigsten verschriebene Antibiotikum für Erwachsene in den USA, mit einer nachgewiesenen hohen Rate an falsch indizierten Therapien, woraufhin die Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin stark zunahmen (35). Mittlerweile werden die Chinolone aufgrund ihrer vielen Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Sehnen- und Knorpelschäden, kritischer gesehen und ihr Einsatzgebiet ist limitiert worden.

### 2.6. Resistenzmechanismen

Grundsätzlich unterscheidet man bei Resistenzen zwischen primären und sekundären Resistenzen. Primäre Resistenz bedeutet, dass ein Antibiotikum prinzipiell eine Wirkungslücke gegenüber einer Bakterienart besitzt. So sind diese Antibiotika grundlegend nicht wirksam für bestimmte Keime. Ein Beispiel sei die sogenannte „Enterokokkenlücke“ von Cephalosporinen. Hier besteht von vornherein eine Unwirksamkeit der Cephalosporine für den Einsatz in der Therapie von Enterokokken. Der Begriff „sekundäre Resistenz“ hingegen beschreibt eine durch verschiedene Vorgänge erworbene Resistenz. Es gibt eine Vielzahl von

Mechanismen, derer sich Bakterien bedienen, um die Effekte von Antibiotika zu umgehen. Eine der ältesten Mechanismen ist die Produktion eines Enzyms, welches das Antibiotikum unwirksam macht, wie die bereits erwähnten  $\beta$ -Laktamasen.  $\beta$ -Laktamasen spalten den  $\beta$ -Laktamring hydrolytisch und verhindern dadurch, dass diese sich an die Zellwand des Bakteriums binden können. Ein weiteres Beispiel für Resistenzentwicklung ist aktiver Efflux. Hier werden Antibiotika, die in die bakterielle Zelle gelangt sind durch ein Pumpensystem wieder hinausbefördert. Das betrifft zum Beispiel solche Bakterien, die gegenüber Tetrazyklinen oder Makroliden resistent sind (18; 34). Durch verringerten Zugang in die Bakterienzelle hinein wirkt hingegen ein weiterer Resistenzmechanismus, die Permeabilitätsbarriere, um letztendlich niedrigere Antibiotikakonzentrationen innerhalb der Zelle zu erreichen. Entweder ist der aktive Transport oder die passive Diffusion in die Zelle gestört (18). Nahezu alle gramnegativen Bakterien zeigen eine charakteristische äußere Zellwand auf, die kein Benzylpenicillin passieren lässt. Ampicillin hingegen kann diese Barriere häufig überwinden (18). Des Weiteren kann durch enzymatische Modifikation oder spontane Mutation eines Gens die Veränderung der Zielstruktur in der Zelle erreicht werden. Zum Beispiel wurde beobachtet, dass die antibakteriellen Angriffsstellen von *Staphylococcus aureus* oder Enterokokken chemisch verändert sein können. Modifiziert sind in diesen Fällen zum Beispiel die Penicillin-bindende Proteine (30).

## 2.7. Fragestellung

Wie bereits aufgeführt, benötigt eine konventionelle Resistenzbestimmung 7,5-14 Stunden (14), sodass die Ergebnisse durch herkömmlich angewandte diagnostische Verfahren in der Regel erst am nächsten Tag vorliegen. In vielen klinischen Fällen, zum Beispiel dem einer bakteriellen Sepsis, wäre aber eine schnellere Bestimmung der Resistenzlage wünschenswert, da das Überleben des Patienten mit der Zeitspanne bis zum Ansetzen eines wirksamen Antibiotikums korreliert (31).

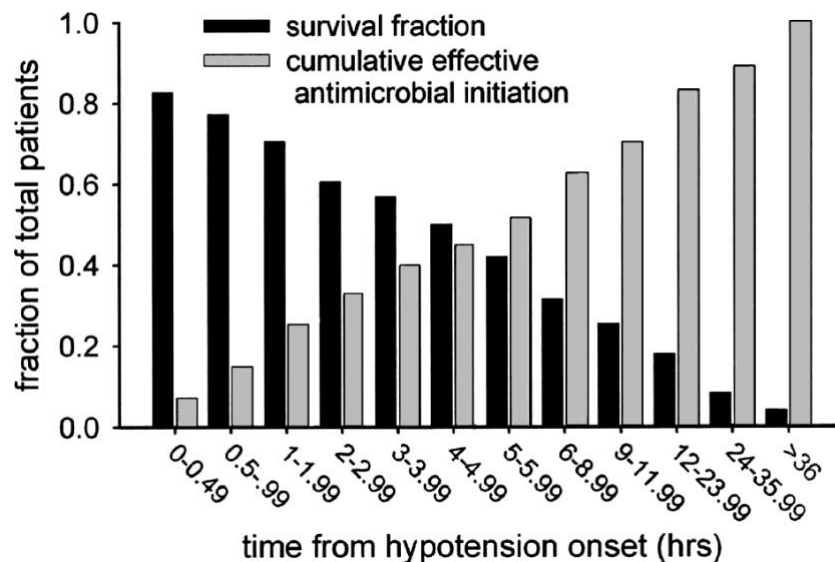


Abb.8: Graphische Darstellung des Zusammenhangs von der Dauer der Hypotension vor Initiieren einer effektiven Antibiose und statistischem Überleben (31).

Daher wurde in dieser Arbeit analysiert, ob mittels MALDI-TOF eine schnellere Resistenzbestimmung im Vergleich mit herkömmlichen Standardmethoden möglich ist. Die grundlegende Idee der Experimente war dabei, dass die zu testenden Bakterien und ein Antibiotikum für kurze

Zeit miteinander inkubiert werden. Das Bakterium wird im sensiblen Fall im Wachstum gehemmt und stirbt ab. Die Hemmung oder Abtötung eines Bakteriums durch Antibiotika ist häufig mit der Induktion bestimmter Proteine sowie zum Beispiel des bakteriellen Autolyse-Systems durch  $\beta$ -Lactamen verbunden. Im Falle einer Resistenz wird das Bakterium wachsen und die entsprechende „Vermehrungs-Maschinerie“ beginnen. Daher entstand die Idee, ob Wachstum, Abtötung oder Hemmung nicht schon früher als durch bisher etablierte Methoden anhand eines MALDI-Spektrums des untersuchten Bakteriums erkennbar sind. Da nach Zugabe eines Antibiotikums bereits nach kürzester Zeit die Entscheidung zwischen Wachstum oder Absterben fällt, ist zu erwarten, dass die Expression bestimmter Proteine unterschiedlich ist. Daher stellte sich die Frage, ob diese Unterschiede in einem Massenspektrum darstellbar sind. Es sollte also untersucht werden, ob durch den Vergleich von gemessenen Spektren verschiedener Bakterienstämme zu identischen Bedingungen auf die Antibiotika-Empfindlichkeit rückgeschlossen werden kann.

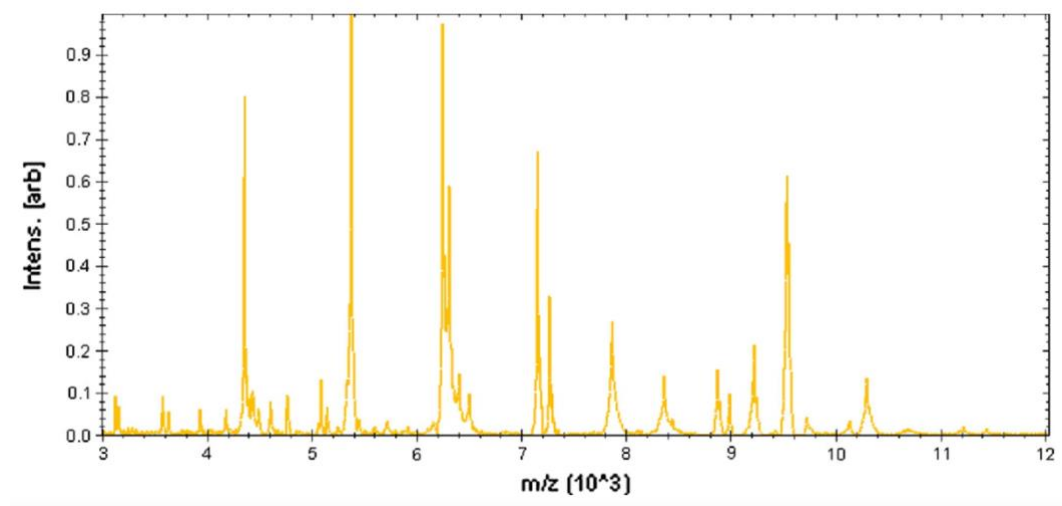


Abb. 9: Beispiel eines MALDI-TOF Massenspektrums von *Escherichia Coli* (37).

### 3. Material und Methoden

*„Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben. Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer, es noch einmal zu versuchen.“*

Thomas Alva Edison (1847-1931)

#### 3.1. Materialien, Proben

##### 3.1.1. Chemikalien

| Chemikalie                 | Hersteller und Bestellnummer          |
|----------------------------|---------------------------------------|
| Acetonitril                | Fluka, 34967                          |
| Ameisensäure               | Fluka, 94318                          |
| Bacterial Standard Test    | Bruker, 8290190                       |
| Ethanol absolut            | Sigma-Aldrich, 32205-AL               |
| Trifluoressigsäure 99%     | Sigma Aldrich, 302031                 |
| Matrix für MALDI-TOF       | Bruker, 8255344                       |
| BHI Bouillon               | Brain-Heart-Infusion Oxid,<br>TV5090E |
| Wasser deionisiert         | Fluka, 39253-AL                       |
| Prompt MicroScan® Lösung   | Siemens, B1026-10D                    |
| McFarland Trübungsstandard | Oxid, R20421                          |
| API NaCl 0,85% Medium      | Biomérieux, 20230                     |

### 3.1.2. Antibiotika

| Antibiotikum  | Hersteller und Bestellnummer                 |
|---------------|--|
| Ciprofloxacin | Fresenius Kabi Deutschland GmbH,<br>03277624 |
| Ampicillin    | Ratiopharm GmbH, 02036611                    |
| Meronem       | Pfizer Pharma GmbH, 07147114                 |
| Imipenem      | Actavis Group PTC, 07414839                  |

### 3.1.3. Agarplatten

| Agarplatte              | Hersteller und Bestellnummer |
|-------------------------|------------------------------|
| Columbia Blutagar 5% SB | Oxoid, PB012317              |
| MacConkey II            | Oxoid, CM0813                |

### 3.1.4. E-Test-Streifen

| Antibiotikum  | Hersteller und Bestellnummer |
|---------------|------------------------------|
| Ampicillin    | Biomérieux, 501558           |
| Ciprofloxacin | Biomérieux, 508658           |



### 3.1.5. Materialien

| Material                                  | Hersteller           |
|---|----------------------|
| Eppendorf-Cup 1,5 ml                      | Eppendorf            |
| MicroScout Target (MSP 96 polished steel) | Bruker Daltonik GmbH |
| Panel MIC 40 Mikrotiterplatten            | Beckmann Coulter     |
| Pipettenspitzen, verschiedene Größen      | Eppendorf            |
| Pipetten, verschiedene Größen             | Eppendorf            |
| Schraubröhrchen 2 ml                      | Deltalab             |

### 3.1.6. Bakterien

Die Bakterienisolate stammen von verschiedenen Patientenmaterialien aus der Routinediagnostik des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene in Marburg. Grundsätzlich wurde jedes verwendete Isolat dokumentiert, eingefroren und aus diesem Zustand heraus 24 Stunden vor Verwendung für dieses Projekt auf entweder MacConkey Agar oder Columbia-Blutagar überimpft und über Nacht im Brutschrank (37° Celsius) inkubiert. Die Keimidentifizierung war bereits im Rahmen der klinischen Routine des Institutes erfolgt. Hiernach wurde die Identifizierung aber erneut per MALDI-TOF im Rahmen dieses Projektes überprüft. Resistenzbestimmungen wurden manuell durch E-Test-Bestimmung oder automatisiert durch MicroScan® Walkaway-Testung durchgeführt. Die Auswertung der Resistenzen erfolgte nach der europäischen Norm (EUCAST). Die so ermittelten Resistenzen waren der „Goldstandard“, mit dem die neue Methode der Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF verglichen wurde. Neben den Bakterienstämmen aus Patientenproben wurde auch ein Kontrollstamm (*E. coli* ATCC 25922) untersucht. Von jedem Patienten wurde nur ein Isolat untersucht. Gesammelt wurden Stämme von *E. coli*, *P. mirabilis* und *Klebsiella pneumoniae*.

## 3.2. Medien und Lösungen

### 3.2.1. McFarland-Standard

Zur Aufbereitung von Bakteriensuspensionen wurde in dieser Arbeit der McFarland-Standard verwendet, welcher als Referenzwert dient, um durch Trübungsmessung die ungefähre Keimzahl in einer Lösung zu ermitteln. Der Trübungswert des Standards von 0,5 McFarland Units entspricht etwa einer Anzahl von  $1,5 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten pro Milliliter.

## 3.3. Geräte

### 3.3.1. Laborgeräte

| Gerät   | Hersteller               |
|---|--------------------------|
| Begasungsbrutschrank BB16                     | Heraeus Instruments      |
| Mikrowaage, BP 61                             | Sartorius                |
| Inkubationsschüttler Certomat S               | Sartorius                |
| Massenspektrometer microflex <sup>TM</sup> LT | Bruker Daltonik GmbH     |
| Photometer Ultrospec 3100 pro (600 nm)        | Amersham Biosciences     |
| Sterilwerkbank Hera safe                      | Heraeus                  |
| Tischzentrifuge, 5417R                        | Eppendorf                |
| Tischzentrifuge, 5804                         | Eppendorf                |
| MicroScan® Walkaway 96 Si                     | Siemens/Beckman Coulter  |
| Densitometer McFarland IDN011081              | Biomérieux Biotechnology |

### 3.3.2. Software

| Software                        | Hersteller              |
|---------------------------------|-------------------------|
| flexAnalysis 3.4                | Bruker Daltonik, Bremen |
| flexControl 3.3 Vers. 3.3.108.0 | Bruker Daltonik, Bremen |
| Excel 2016                      | Microsoft               |

## 3.4. Methoden

### 3.4.1. Durchführung MALDI-TOF Messung

Die MALDI-TOF Messungen im Labor des Institutes für Mikrobiologie wurden alle mit einem Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics durchgeführt. Die Bedienung des MALDI-TOF Gerätes erfolgte an einem PC mit dem installierten Betriebssystem „Windows XP“ und der MALDI-Bedienungsoberfläche „FlexControl“. Die durchgeführten Analysen der detektierten Massen erfolgten innerhalb eines Bereichs von 2000 - 20.000 Dalton (= m/z). Vor jedem Messdurchgang wurde eine Standardlösung zur Kalibrierung auf das erste Feld des Metalltargets gegeben. Auf die darauffolgenden Felder wurden dann 1 µl der vorbehandelten Proben gegeben und nach Trocknung jeweils 1 µl der Matrix. Jedes Feld wurde an drei verschiedenen Punkten mit je 60 Laserschüssen getroffen, sodass sich das Spektrum eines Feldes aus einem Durchschnitt der 240 Messungen zusammenstellte. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software „flexAnalysis“. Dort wurde die sogenannte „Baseline-Correction“, also eine Angleichung der Nulllinien angewandt. Außerdem erfolgte die Glättung der Spektren durch Anwendung der „smoothing“-Funktion. Mittels Alignment-Funktion konnten Phasendifferenzen ausgeglichen werden, die durch Schwankungen in Temperatur oder pH-Wert verursacht wurden. Ein Vergleich der verschiedenen Spektren erfolgte nach Auswertung in einer aus diesen Daten generierten Excel-Tabelle.

### 3.4.2. Herstellung einer standardisierten Bakteriensuspension

Die Lagerung des Kulturmediums (BHI) erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Röhrrchen mit BHI-Lösung aus dem Kühlschrank genommen und bei Raumtemperatur gelagert. In jedem verwendeten BHI Röhrrchen befanden sich 10 ml Lösung. Das hier als „Standardmethode“ beschriebene Vorgehen wurde in diesen 10 ml BHI-

Röhrchen durchgeführt. Das Endvolumen betrug stets 10 ml. Zur Einstellung der Bakterienzahl wurden Kolonien von den Agarplatten abgenommen und in API NaCl-Lösung suspendiert. Mit Hilfe eines Densitometers wurde die benötigte Keimzahl in McFarland Einheiten eingestellt. Vor Inkubation wurde das Kulturmedium mit Bakterium ausgiebig geschüttelt.

#### 3.4.3. Herstellung der Ampicillin-Lösung

Das Ansetzen der Antibiotikum-Lösung mit Ampicillin erfolgte mit 5 g Infusions-Durchstechflaschen durch zunächst Penetration des Gummideckels der Flasche mittels Injektionsnadel und 10 ml Spritzen. Hierdurch wurden insgesamt schrittweise 50 ml BHI-Lösung zugegeben bis sich das Pulver in der Flasche vollständig aufgelöst zeigte. Sodann wurde mit einer 1 ml Spritze Flüssigkeit aus der Flasche entnommen und 1 ml dieser Lösung in jeweils ein Plastikgefäß gefüllt. Es ergab sich aus dem Vorgang eine Ampicillin Stock-Lösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml, welche dann eingefroren wurde.

#### 3.4.4. Herstellung der Ciprofloxacin-Lösung

Das Ansetzen dieser Lösungen erfolgte äquivalent, wie oben für Ampicillin beschrieben.

#### 3.4.5. Einfrieren und Auftauen von Bakterien

Jedes hier verwendete Bakterienisolat wurde dokumentiert, isoliert und initial auf einer Agarplatte über 24 Stunden angezchtet. Am Folgetag erfolgte dann das Einfrieren zur Stammhaltung und Wiederverwendung.

Mittels steriler Plastiköse wurden mehrere Bakterienkolonien in gebrauchsfertige Schraubröhrchen mit kryokonservierender Bouillon sowie porösen Kunststoffperlen gegeben und bei -20° Celsius eingefroren. 24 Stunden vor dem jeweiligen Versuch wurden die isolierten Bakterienstämme mit einer sterilen Plastiköse aus dem Einfriergefäß entnommen und die für den jeweiligen Keim benötigte Blut-Agarplatte beimpft.

#### 3.4.6. Methode „Messung in Mikrotiterplatten“

Initial und zeitweise parallel zu dem oben beschriebenen Ansatz in 10 ml Röhrchen, erfolgte die Untersuchung eines weiteren Versuchsaufbaus zur Ermittlung des geeigneten Verhältnisses von Bakterium und Antibiotikum. Hierbei wurde zunächst ein McFarland-Standard von 0,5 von den jeweiligen Bakterienstämmen eingestellt und davon jeweils 200 µl pro Well einer Mikrotiterplatte gegeben und mit Abdeckplatte in einem Brutschrank inkubiert. Pro Keim wurde jeweils eine Mikrotiterplatte verwendet und das Well für die Wachstumskontrolle befüllt sowie die jeweilige Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Antibiotikums. Nach Abwarten der untersuchten Inkubationszeit wurden die vorher explizit befüllten Wells abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorf-Cups gegeben. Darauf folgte die im Anschluss beschriebene „Standard Methode“ der Versuche.

#### 3.4.7. Messung von Resistenzen mittels MALDI-TOF als „Standard Methode“

Allen Versuchen war ein ähnlicher Aufbau der Versuche gemein. Zuerst wurde die Antibiotika-Stocklösung aus dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut. Diese wurde mit der benötigten Menge BHI-Lösung verdünnt, um die gewünschte Konzentration des Antibiotikums zu erreichen. Dann wurde

die erforderliche Menge an Bakterium hinzugegeben (Herstellung der standardisierten Bakteriensuspension siehe 3.4.2.). Das Endvolumen betrug in allen Röhren 10 ml. Die Probenröhren wurden mit einem Deckel verschlossen und für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert. Dies geschah entweder in einem Probenständer im Brutschrank oder in einem Schüttler im Brutschrank. Zum jeweiligen Zeitpunkt erfolgte die Entnahme aus dem Brutschrank und das Zentrifugieren der Proben bei 3.000 Umdrehungen pro Minute ( $2,250 \times g$ ) für 10 Minuten. Daraufhin wurde der Überstand verworfen, das Pellet bei 37°C getrocknet und diesem 300 µl Wasser und 900 µl Ethanol absolut resuspendiert. Nach guter Mischung wurde umgefüllt in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup und 2 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute ( $25.000 \times g$ ) in einer Epifuge zentrifugiert. Hiernach wurde erneut der Überstand verworfen, das Pellet bei 37°C getrocknet und 50 µl 70%-ige Ameisensäure sowie 50 µl Acetonitril hinzugegeben. Auch dies wurde gut vermischt und 2 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute ( $25.000 \times g$ ) epifugiert. Von diesem Überstand wurden dann jeweils 1 µl auf ein eingezeichnetes Feld auf das MALDI-Target pipettiert und nach Trocknung auf das gleiche Feld 1 µl Bruker Matrix gegeben. Nach Trocknen wurde diese dann dem Bruker MALDI-TOF zugeführt und die Messung durchgeführt.

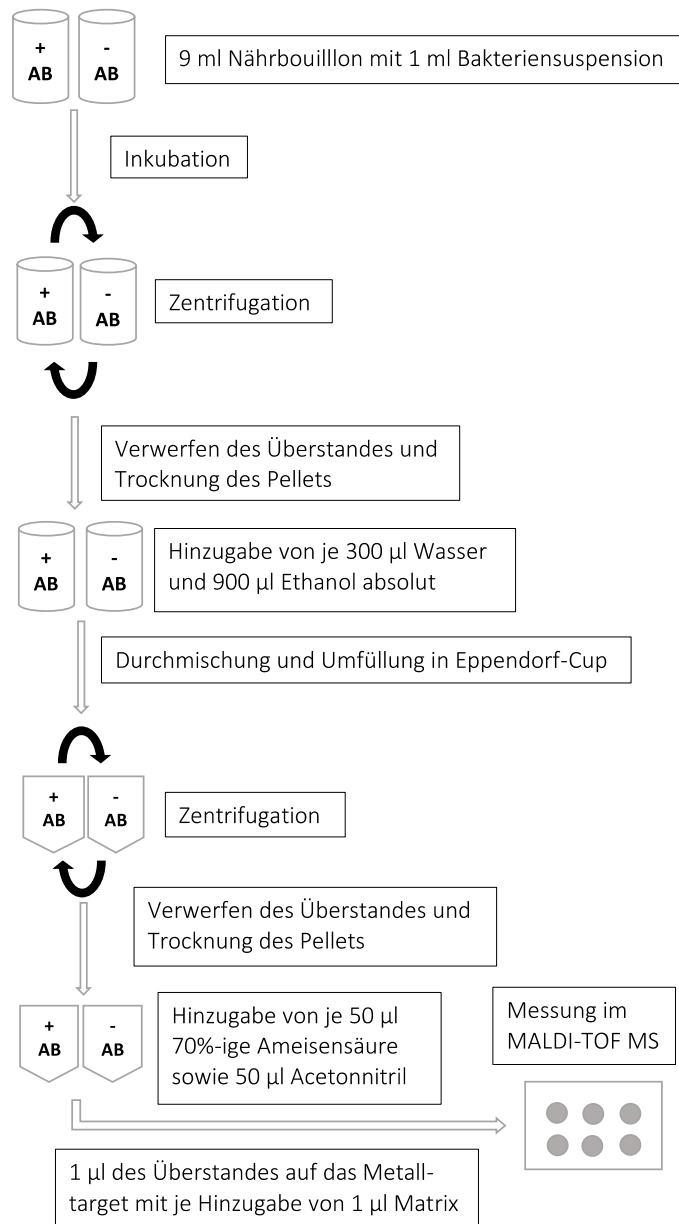


Abb.10: Schematische Darstellung der Hauptmethode der Versuche.



## 4. Ergebnisse

*„Wir neigen viel zu sehr dazu, Dingen, die das Ergebnis vieler Ursachen sind, einer einzigen zuzuschreiben.“*

Justus von Liebig (1803-1873)

### 4.1. Vorversuche

#### 4.1.1. Vorversuche mit Mikrotiterplatten

##### 4.1.1.1. Vorversuche Mikrotiterplatten mit *E. coli*

Wie zuvor erläutert, stellte sich die Frage, ob man mittels MALDI-TOF Resistenzen bestimmen kann. Dazu sollten bestimmte Erreger mit ausgewählten Antibiotika inkubiert werden. Ausgehend von der als Routinediagnostik etablierten Resistenztestung in vorgefertigten Mikrotiterplatten mit vorgefüllten Antibiotikaverdünnungsreihen führten wir Vorversuche mittels dieser vorgefertigten Platten durch (siehe 3.4.6.). Hierbei wurden die Spektren von *E. coli* unter Einfluss von Ampicillin nach einer Stunde Inkubation untersucht. Im Anschluss an die Inkubation wurden die MALDI-TOF Messungen durchgeführt. Da hierbei trotz multipler Versuche mit Änderung der Keimkonzentration und Inkubationszeit entweder kein Unterschied im Proteinspektrum nach MALDI-TOF Messung mit und ohne Antibiose festgestellt werden konnte oder sogar kein Proteinspektrum gemessen werden konnte, wurde folglich auf ein System

(4.1.2.) umgestellt, in welchem die Rahmenbedingungen neben der Änderung der Keimkonzentration auch eine Variierung der Antibiotikamenge und -konzentration sowie des Verhältnisses von Antibiotikum und Keimmenge zuließen. Durchgeführte Vergleiche im Spektrum der Keime ohne Inkubationszeit zeigten außerdem ebenfalls keine reproduzierbaren Unterschiede. Die Daten werden hier aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt.

#### 4.1.1.2. Vorversuche mit Mikrotiterplatten mit *Klebsiella pneumonia*

Versuche mit *Klebsiella pneumonia* (analog zu 4.1.1.1.) auf Resistenzen gegenüber Meropenem wurden zusätzlich in Mikrotiterplatten ausgeführt wie in den Versuchen von Lange et al. beschrieben (32). Diese konnten nach 1 Stunde Inkubation mittels MALDI-TOF Messung Resistenztestungen gegenüber Meropenem durchführen. In unseren Versuchen konnten wir diese Ergebnisse jedoch nicht reproduzieren (Daten hier nicht gezeigt).

#### 4.1.2. Vorversuche in größeren Volumina

Erste reproduzierbare Ergebnisse stellten sich ein, als statt Mikrotiterplatten die Versuche in größeren Volumina (10 ml Röhrchen) durchgeführt wurden. Dies erlaubte auch, die Konzentration an Antibiotika in den einzelnen Ansätzen zu variieren. Die vorher verwendeten kommerziellen Mikrotiterplatten enthielten feste, nicht veränderbare Antibiotika-Konzentrationen. Ziel dieser Arbeit war es, wie oben beschrieben, zu untersuchen, ob mittels MALDI-TOF eine schnelle Bestimmung der Resistenzen von Bakterien möglich ist. Dabei sollte möglichst die Zeit unterboten werden, die bisherige Standardverfahren in der Resistenztestung benötigen. Nach zahlreichen Vorversuchen (Daten nicht gezeigt), in welchen die Annäherungswerte für Keimmenge,

Antibiotikakonzentration, Inkubationszeit und Inkubationsmöglichkeiten untersucht wurden, fanden die im folgenden präsentierten Versuchsreihen statt. Hierbei wurden die Versuchsbedingungen erforscht, welche verlässlich und valide Differenzen im Spektrum eines Antibiotika-sensiblen Keimes nach Zugabe des Antibiotikums im Vergleich zum Spektrum ohne Antibiotikum aufzeigten. Alle hier verwendeten Bakterienisolate wurden außerdem auf ihre Resistenz gegenüber dem untersuchten Antibiotikum mittels eines Vollautomaten sowie dem E-Test getestet.

Durch Spektrumanalysen wurden zunächst die verschiedenen Charakteristika der einzelnen Keime verzeichnet und die Peaks im Spektrum der untersuchten Keime dem veränderten Spektrum gegenüber gestellt, welche ein Keim nach Zugabe des Antibiotikums aufweist. Zur besseren Beurteilbarkeit wurden dazu die Messdaten direkt exportiert und in „Excel“ dargestellt. Hierbei ließen sich rasch einige Peaks identifizieren, deren Intensität im Spektrum von der Empfindlichkeit des Stammes gegenüber dem Antibiotikum abhängig ist.

Bei *E. coli* zeigte sich ein interessanter Unterschied zum Beispiel bei einem Peak von 9.700 Dalton. Dieser Peak wurde dann in den weiteren Versuchsreihen als Marker weiter untersucht. Bei *P. mirabilis* wurde aufgrund der verzeichneten Unterschiede in den Vorversuchen das Verhalten mit und ohne Antibiotikum bei einem Peak von 8.370 Dalton verglichen.

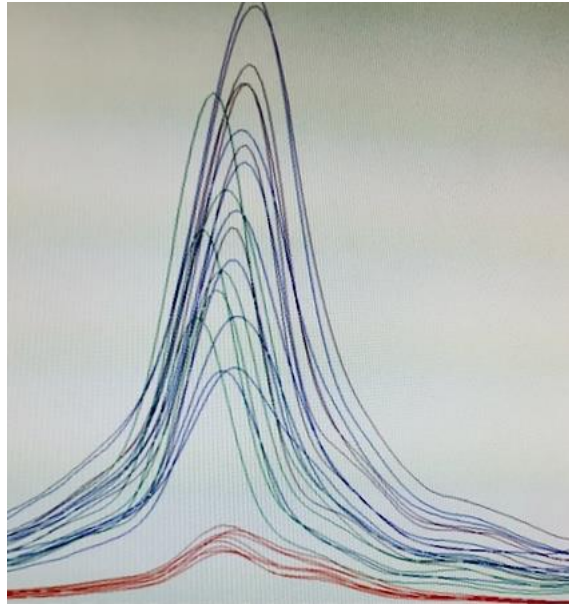


Abb. 11: Schematische Darstellung einer Spektrumanalyse nach MALDI-TOF Messung mit Amplitudendifferenz zum Beispiel bei einem *E. coli* mit Ampicillin beim Peak 9.700 Dalton nach 4 Stunden Inkubation im Inkubationsschüttler. Der sensible Keim mit Antibiose ist hier durch die roten Graphen dargestellt, der sensible Keim ohne Antibiose grün, der resistente Keim mit Antibiose blau und der resistente Keim ohne Antibiose violett. Zwei verschiedene Stämme von *E. coli* wurden für 4 Stunden in einem Inkubationsschüttler mit oder ohne Ampicillin inkubiert. Die Abbildung zeigt schematisch einen Ausschnitt aus dem gesamten Spektrum in Höhe des Peaks 9700 Dalton.

## 4.2. Versuchsreihe *E. coli* und Ampicillin

Auf Basis des Ergebnisses der Vorversuche, dass der Peak 9700 ein möglicher Marker für die Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber Antibiotika ist, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um diese These zu erhärten. Zunächst wurden Versuche mit einem Ampicillin resistenten und einem Ampicillin sensiblen *E. coli* jeweils mit und ohne Zugabe von Ampicillin durchgeführt, um eine mögliche Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF zu untersuchen. Auf Basis von weiteren Vorversuchen wurden hierzu schon Annäherungswerte für die hier verwendeten Mengenangaben und -konzentrationen ermittelt. Allen Versuchen ist die Standardmethode der Versuche gemein (siehe Abbildung 10).

Aufgebaut wurde dieser Teil der Arbeit in mehreren Versuchsreihen, welche in folgender Auflistung aufeinander aufbauend durchgeführt wurden:

- Untersuchung der geeigneten Keimkonzentration des Bakteriums *E. coli*
- Verdünnungsreihe der benötigten Antibiotika-Konzentration von Ampicillin
- Kinetik-Versuche zur Bestimmung der optimalen Bebrütungszeit
- Vergleich der Bebrütung im Brutschrank mit und ohne Schüttler-System
- sowie letztendlich die bisherigen Ergebnisse zusammenfassenden Versuche der Resistenzbestimmung von mehreren Keimen

#### 4.2.1. Versuche zur Ermittlung der optimalen *E. coli*-Konzentration

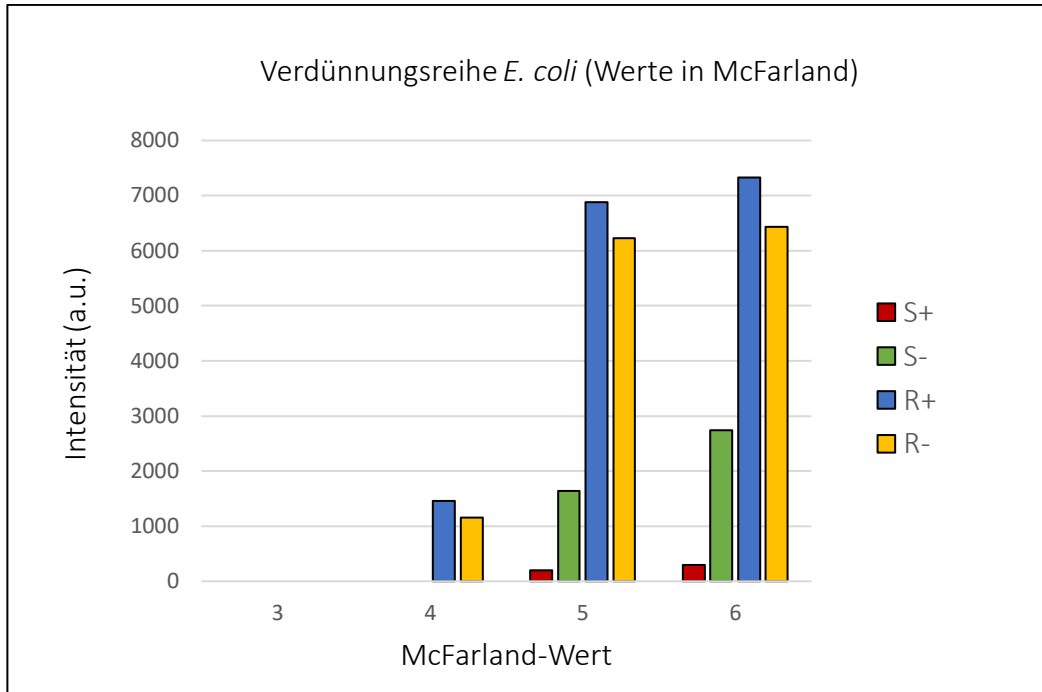


Abb. 12: Verdünnungsreihe zur Ermittlung der optimalen *E. coli*-Konzentration (McFarland-Wert) unter Zugabe von Ampicillin und Intensität des Peaks 9.700. S+ = Ampicillin sensibler *E. coli* mit Ampicillin. S- = Ampicillin sensibler *E. coli* ohne Ampicillin. R+ = Ampicillin resistenter *E. coli* mit Ampicillin. R- = Ampicillin resistenter *E. coli* ohne Ampicillin. Diese Abbildung ist repräsentativ für 5 Versuche dieser Art.

Zur Ermittlung der geeigneten Keimkonzentration (hier angegeben in McFarland) wurden Versuche unter Zugabe von Ampicillin und Analyse des Peaks 9.700 nach 4 Stunden Inkubation durchgeführt.

Bei dieser Verdünnungsreihe zur Ermittlung des optimalen *E. coli* McFarland-Wertes, welcher im Vergleich die bessere Aussage zur Unterscheidung in der MALDI-TOF Messung zur Resistenztestung gibt, zeigte sich ein McFarland-Wert von 5 als geeigneter als die weiteren Werte, die hier untersucht wurden. Bei einem McFarland-Wert von 4 und kleiner

fanden sich in mehreren Versuchen nur sehr geringe Intensitäten des Peaks 9700. Ein McFarland-Wert von 5 erschien optimal, sodass in dieser Arbeit die weiteren Versuche mit diesem Wert durchgeführt wurden.

#### 4.2.2. Ampicillin-Konzentration

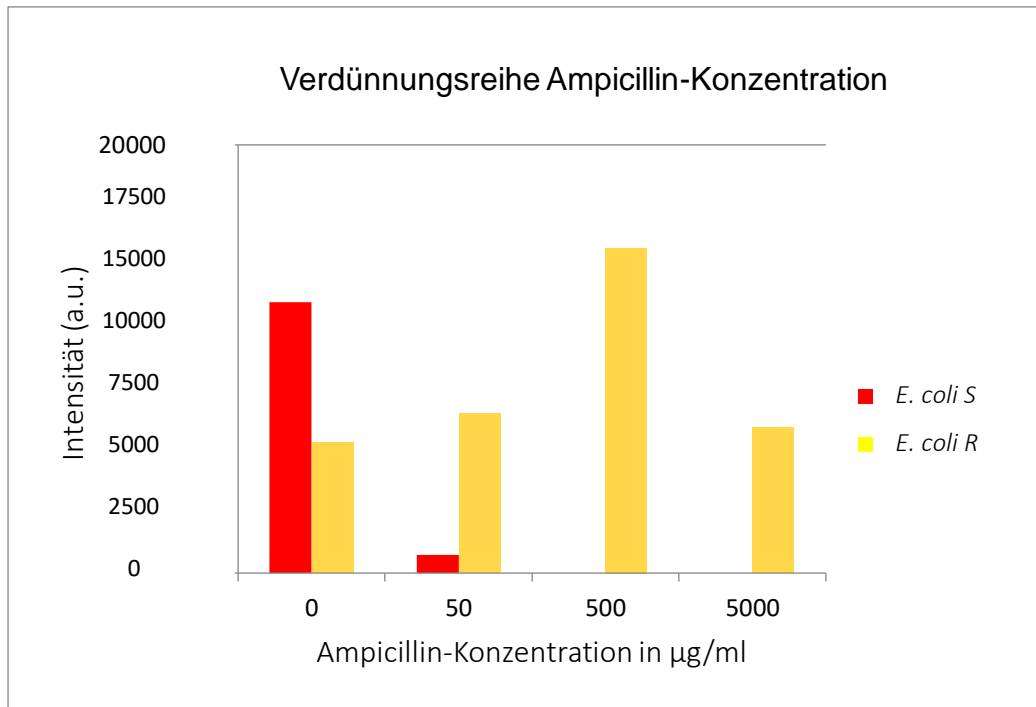


Abb.13: Verdünnungsreihe von Ampicillin (in µg/ml). Ampicillin sensibler sowie Ampicillin resistenter *E. coli* Stamm nach 4 Stunden Inkubation; betrachtet wird der Peak 9.700 Dalton.

*E. coli* S = Ampicillin sensibler *E. coli* mit Ampicillin. *E. coli* R = Ampicillin resistenter *E. coli* mit Ampicillin. Diese Abbildung ist repräsentativ für 7 Versuche dieser Art.

Um festzustellen, welche Antibiotikakonzentration notwendig ist, um Unterschiede im MALDI-TOF optimal zu detektieren, erfolgten Versuche mit Verdünnung der Ampicillin-Konzentration (in µg/ml) unter Analyse des Peaks 9700 nach 4 Stunden Inkubation. Während der in dieser Arbeit durchgeführten Verdünnungsreihe der Ampicillin-Konzentration erwies sich der Wert von 50 µg/ml als am besten aussagekräftig. Ohne Zugabe von Ampicillin war die Intensität des sensiblen *E. coli* bei 9.700 Dalton höher als die des resistenten Isolates. Die Verwendung von höheren Dosen des



Antibiotikums als 50 µg/ml zeigte in verschiedenen Versuchen kein besseres Diskriminierungsvermögen, sodass in weiteren Versuchen eine Dosierung von 50 µg/ml verwendet wurde.

#### 4.2.3. Kinetik *E. coli* und Ampicillin

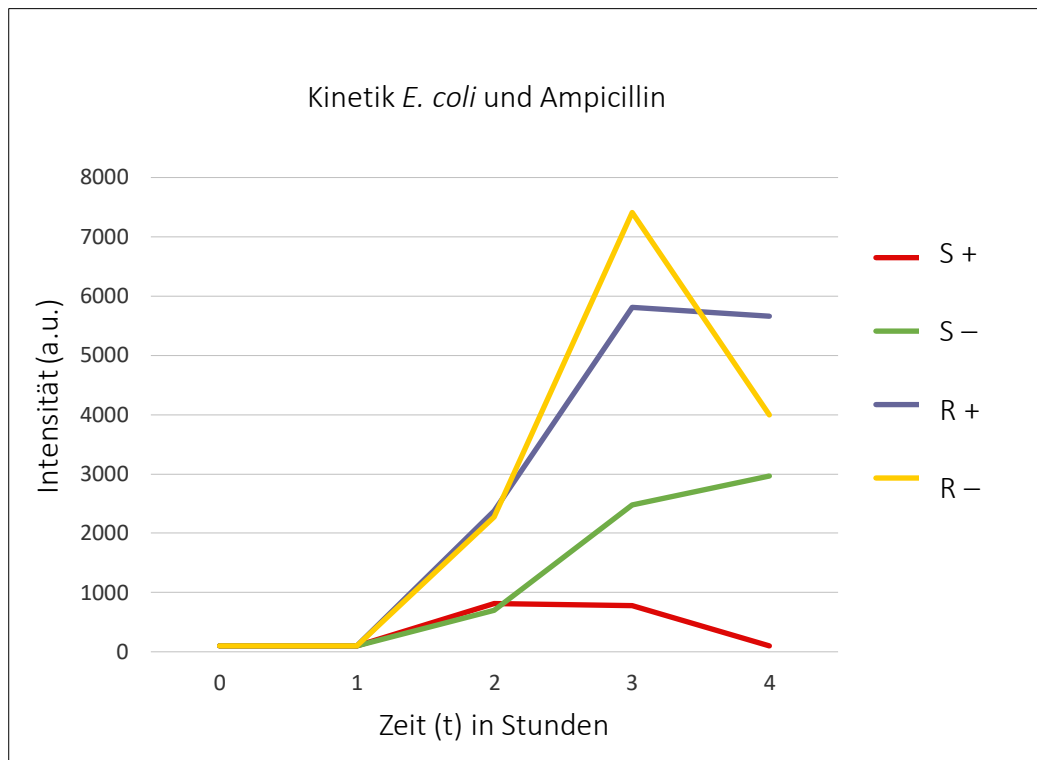


Abb.14: Kinetik-Versuch mit einem Ampicillin resistenten und einem Ampicillin sensiblen *E. coli* Isolat jeweils mit und ohne Ampicillin, stündlich gemessen zu den Zeitpunkten (t) 0, 1, 2, 3 und 4 Stunden (Messung der Intensität des Peaks 9700). S+ = Ampicillin sensibler *E. coli* mit Ampicillin. S- = Ampicillin sensibler *E. coli* ohne Ampicillin. R+ = Ampicillin resistenter *E. coli* mit Ampicillin. R- = Ampicillin resistenter *E. coli* ohne Ampicillin. Diese Abbildung ist repräsentativ für 6 Versuche dieser Art.

Außerdem wurden multiple Versuche durchgeführt, um die Inkubationszeit zu ermitteln, nach welcher der Unterschied mit und ohne Antibiotikum bei 9.700 Dalton am deutlichsten war. Zwar ließ sich schon nach drei Stunden eine Aussage über das Resistenzverhalten der untersuchten Isolate tätigen, jedoch zeigte sich nach 4 Stunden Inkubationszeit eine deutliche Zunahme der Differenz der verschiedenen Peaks bei 9.700 Dalton. So wurde nach

mehrfacher Wiederholung dieser Versuche mit unter anderem weiterer stündlicher Inkubationszeitmessung bis zu 24 Stunden eine Inkubationszeit von 4 Stunden als ideal erachtet und für die weiteren Versuche ausgewählt.

#### 4.2.4. Versuche mit und ohne Inkubationsschüttler

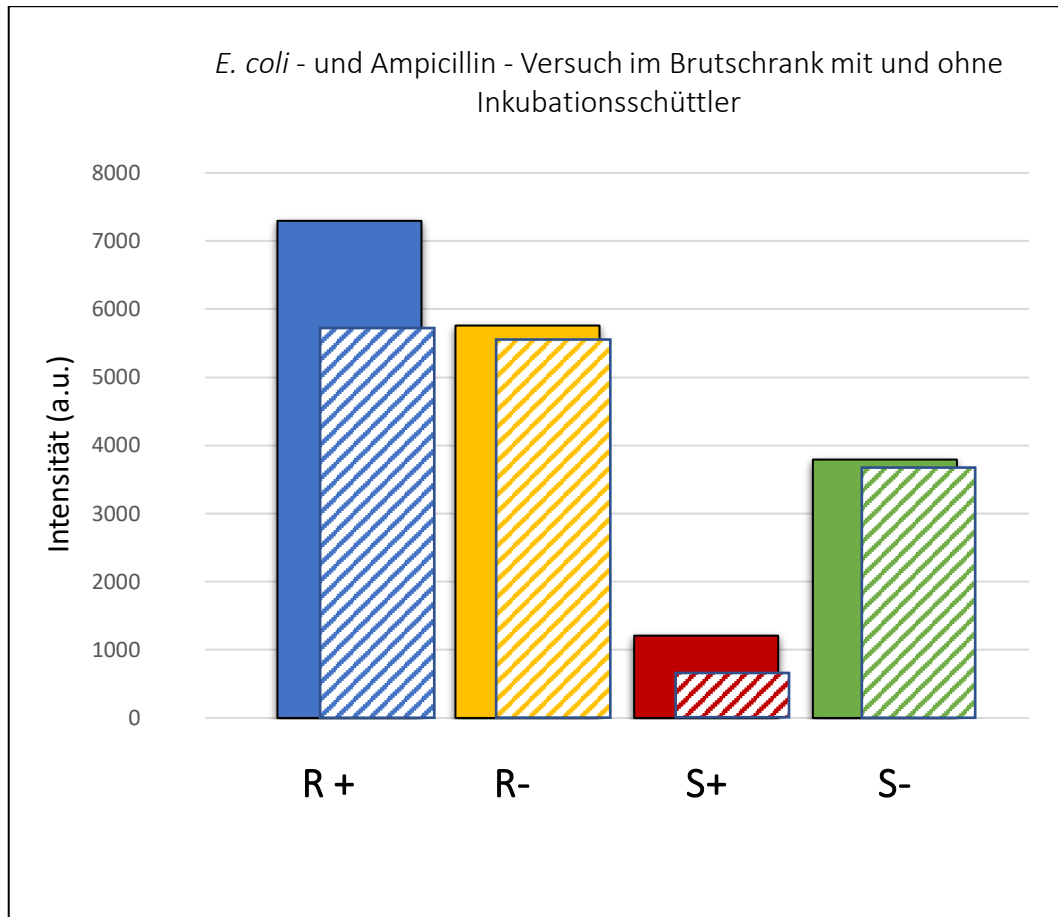


Abb.15: Inkubation von *E. coli* mit (Balken diagonal gestreift) und ohne (Balken gefärbt) Inkubationsschüttler im Brutschrank bei 37°C mit und ohne Zugabe von Ampicillin nach 4 Stunden Inkubation. Verglichen wurde die Intensität des Peaks 9.700 Dalton. S+ = Ampicillin sensibler *E. coli* mit Ampicillin. S- = Ampicillin sensibler *E. coli* ohne Ampicillin. R+ = Ampicillin resistenter *E. coli* mit Ampicillin. R- = Ampicillin resistenter *E. coli* ohne Ampicillin. Die Abbildung zeigt einen von 2 verschiedenen Versuchen.

Um herauszustellen, ob eine Optimierung der Resistenztestung und somit eine deutlichere Differenz der Spektren durch Veränderung einiger

Parameter oder Methoden während der Inkubation erreicht werden kann, wurde folgend die Inkubation nach herkömmlichem Standard im Brutschrank mit der Inkubation in einem Inkubationsschüttler verglichen. Analysiert wurde wieder die Intensität bei Peak 9.700 Dalton. Hierbei zeigte sich, in verschiedenen Experimenten kein deutlicher Unterschied in der Intensität der verschiedenen Peaks (siehe Abbildung 15). Da aber eine Tendenz einer größeren Differenz bei den Peaks im Versuch mit Inkubationsschüttler beobachtet werden konnte, wurde bei allen weiteren Versuchen die Inkubation im Inkubationsschüttler durchgeführt.

#### 4.2.5. Resistenztestung von *E. coli*-Isolaten mit Ampicillin

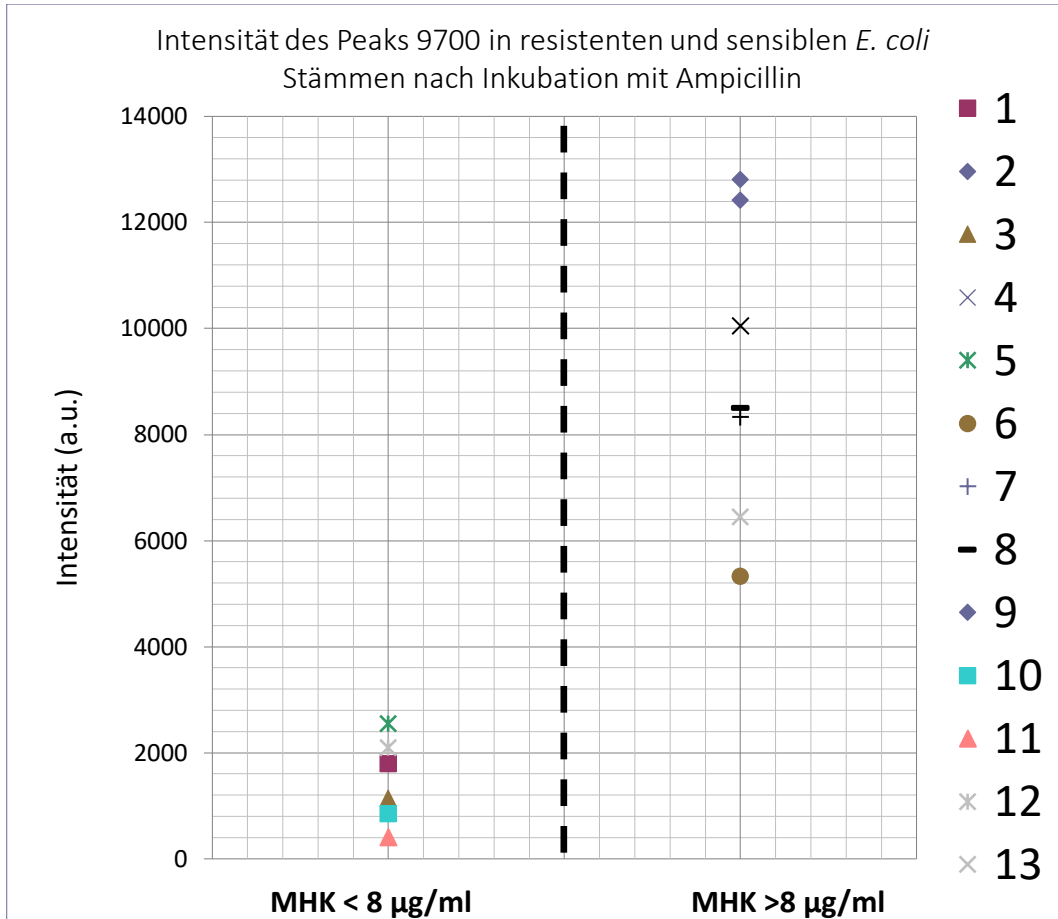


Abb.16: Resistenztestung verschiedener *E. coli*-Stämme gegenüber Ampicillin. Intensität der Spektren von 13 *E. coli*-Isolaten bei Peak 9.700 Dalton nach Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin und 4-stündiger Inkubation im Inkubationsschüttler.

1= *E. coli* Isolat V9108, 2= *E. coli* Isolat V0960, 3= *E. coli* Isolat V9822, 4= *E. coli* Isolat V8186, 5= *E. coli* Isolat V3890, 6= *E. coli* Isolat U2128, 7= *E. coli* Isolat V0377, 8= *E. coli* Isolat V0377, 9= *E. coli* Isolat V9946, 10= *E. coli* Isolat V9122, 11= *E. coli* Isolat V8188, 12= *E. coli* Isolat V0555, 13= *E. coli* Isolat V8174.

Die *E. coli* Stämme waren im E-Test auf Ampicillin getestet worden und dann nach EUCAST Kriterien in sensible Stämme (MHK <8 mg/ml; linke Seite der Grafik) und resistente Stämme (MHK >8 mg/ml; rechte Seite der Grafik) eingeteilt worden.

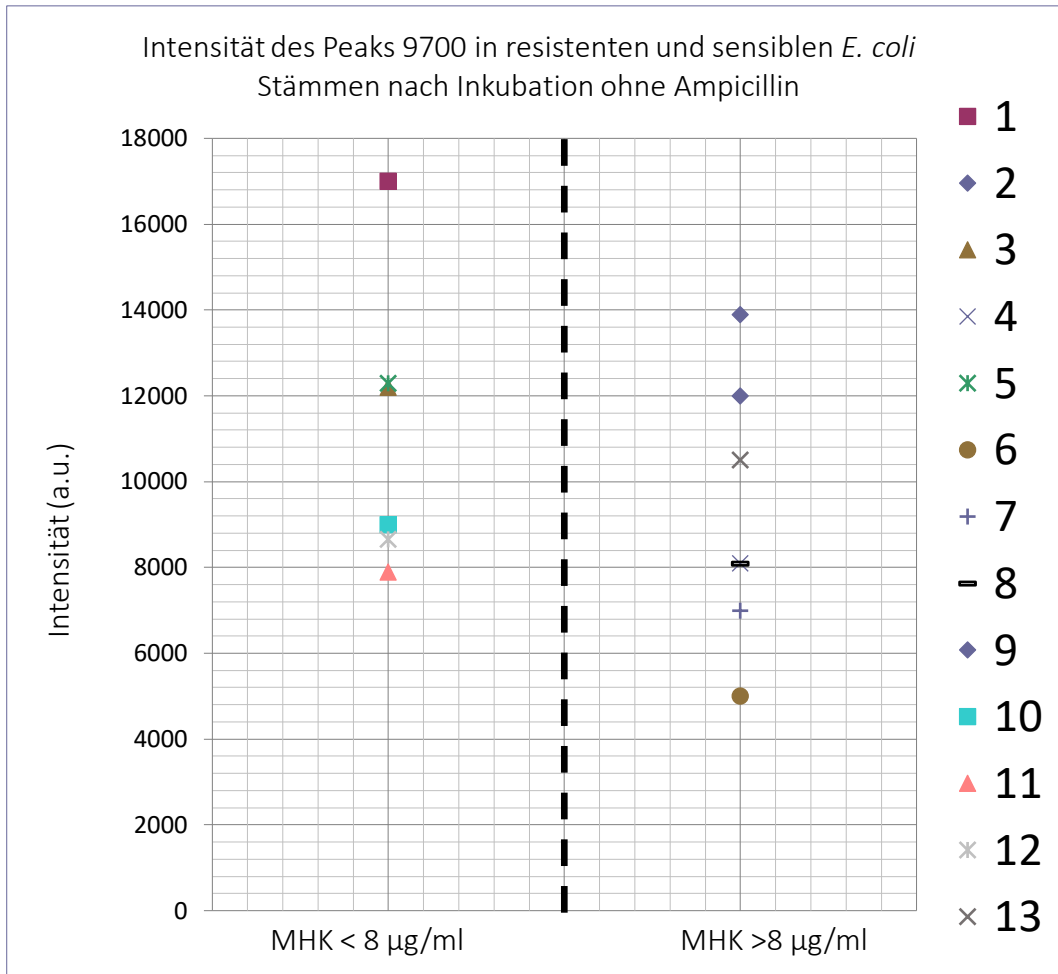


Abb.17: Versuche mit *E. coli*-Stämmen ohne Ampicillin als Kontrollversuch zu Abbildung 16. Intensität der Spektren von 13 *E. coli*-Isolaten bei Peak 9.700 Dalton ohne Zugabe von Ampicillin und nach 4-stündiger Inkubation im Inkubationsschüttler.

1= *E. coli* Isolat V9108, 2= *E. coli* Isolat V0960, 3= *E. coli* Isolat V9822, 4= *E. coli* Isolat V8186, 5= *E. coli* Isolat V3890, 6= *E. coli* Isolat U2128, 7= *E. coli* Isolat V0377, 8= *E. coli* Isolat V0377, 9= *E. coli* Isolat V9946, 10= *E. coli* Isolat V9122, 11= *E. coli* Isolat V8188, 12= *E. coli* Isolat V0555, 13= *E. coli* Isolat V8174.

Die *E. coli* Stämme waren im E-Test auf Ampicillin getestet worden und dann nach EUCAST Kriterien in sensible Stämme (MHK <8 mg/ml; linke Seite der Grafik) und resistente Stämme (MHK >8 mg/ml; rechte Seite der Grafik) eingeteilt worden.

Für die Versuchsreihe von *E. coli* mit Ampicillin mündeten alle durchgeführten Vorversuche in den hier dargestellten Ansatz, bei welchem die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode in Vergleich gestellt werden sollte mit den herkömmlich angewandten Resistenztestungen. Untersucht werden sollte also, ob die neue Methode geeignet ist, um *E. coli* Stämme korrekt als Ampicillin sensibel oder resistent zu klassifizieren. Verglichen wurde die Intensität der Peaks bei 9.700 Dalton (in den oben aufgeführten Diagrammen auf der y-Achse nach Messung im MALDI-TOF). Dies wurde in Relation gesetzt zu den Ergebnissen, welche nach 24 Stunden Inkubation mittels E-Test Verfahren ermittelt wurden und nach EUCAST-Richtlinien ausgewertet wurden. Eine MHK von 8 µg/ml bei Ampicillin war hierbei der Grenzwert zur Unterscheidung zwischen sensiblen und resistenten Isolaten. In Abbildung 16 gezeigt sind die Ergebnisse von 13 *E. coli*-Isolaten, die nach dem neuen Verfahren und mittels E-Test gemessen wurden. Die Isolate, welche nach EUCAST-Kriterien als sensibel getestet wurden (MHK kleiner als 8) zeigten im MALDI-TOF nur einen kleinen Peak bei 9.700 Dalton. Im Gegensatz dazu war bei den im E-Test geltenden Ampicillin resistenten Isolaten mit einer MHK größer als 8 ein deutlicher Peak bei 9.700 Dalton nachzuweisen. Bei einem willkürlich festgelegten Cut-Off der Peak Intensität bei 4000 wäre also hier mittels der MALDI-TOF Messung eine Trennung in Ampicillin sensible und Ampicillin resistente Stämme möglich. Dabei würden alle 13 Isolate korrekt als empfindlich oder resistent klassifiziert werden, es gäbe keine „Ausreißer“. Selbstverständlich muss dies durch weitere prospektive Experimente mit einer größeren Anzahl von Stämmen verifiziert werden. Insbesondere müsste auch in prospektiven Untersuchungen noch analysiert werden, ob ein Cut-Off Wert in jedem Versuch neu festgelegt werden muss. In einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, dass die Unterschiede zwischen sensiblen und resistenten Stämmen beim Peak 9700 nicht primär vorhanden sind (Abbildung 17), sondern erst in Anwesenheit des Antibiotikums (Abbildung 16) sichtbar werden.



### 4.3. Versuchsreihe *E. coli* und Ciprofloxacin

Nachdem die Versuche mit Ampicillin sich als erfolgreich darstellten, wurde die Frage fokussiert, ob dieses Verfahren ausschließlich kompatibel ist mit  $\beta$ -Laktamen oder ob man es auch auf weitere Antibiotika anwenden kann. Als zweite Gruppe wurden die Chinolone und als ein Vertreter dieser Gruppe Ciprofloxacin ausgewählt.

Folgend wurden also Versuche mit einem Ciprofloxacin resistenten und einem Ciprofloxacin sensiblen *E. coli* als Keime jeweils mit und ohne Zugabe von Ciprofloxacin durchgeführt, um eine mögliche Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF zu untersuchen. Auf Basis von weiteren Vorversuchen wurden hierzu die Annäherungswerte für die hier verwendeten Mengenangaben und -konzentrationen ermittelt. Allen Versuchen ist der Aufbau der Versuche gemein (siehe Abbildung 10).

Aufgebaut wurde dieser Teil der Arbeit in mehreren Versuchsreihen, welche in folgender Auflistung aufeinander aufbauend durchgeführt wurden:

- Untersuchung der geeigneten McFarland-Konzentration des Bakteriums *E. coli*
- Verdünnungsreihe der benötigten Antibiotika-Konzentration von Ciprofloxacin
- Kinetik-Versuche zur Bestimmung der optimalen Bebrütungszeit
- sowie letztendlich die bisherigen Ergebnisse zusammenfassenden Versuche der Resistenzbestimmung von mehreren Keimen

#### 4.3.1. McFarland-Wert *E. coli*

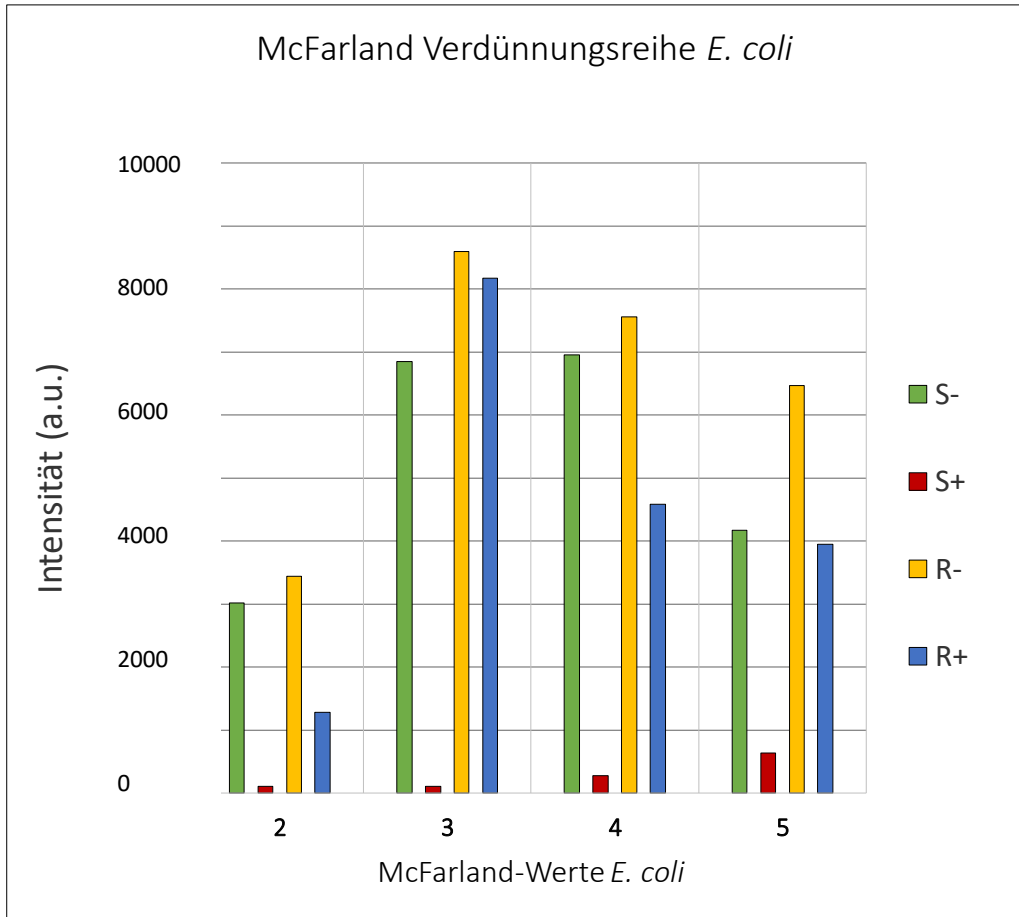


Abb.18: Verdünnungsreihe verschiedener *E. coli*-Stämme (in McFarland Werten). Intensität des Peaks 9700 Dalton nach 4 Stunden Inkubation mit oder ohne Zugabe von Ciprofloxacin. Diese Abbildung ist repräsentativ für 4 Versuche. S+ = Ciprofloxacin sensibler *E. coli* mit Ciprofloxacin. S- = Ciprofloxacin sensibler *E. coli* ohne Ciprofloxacin. R+ = Ciprofloxacin resistenter *E. coli* mit Ciprofloxacin. R- = Ciprofloxacin resistenter *E. coli* ohne Ciprofloxacin.

Auch hier stellte sich die Frage, welche Konzentration bakterieller Zellen (McFarland-Wert) optimal ist, um eine Resistenztestung mittels MALDI-TOF

durchzuführen. In den entsprechenden Verdünnungsreihen zeigte sich ein McFarland-Wert von 3 als bester Wert. Bei dieser Konzentration war das „Auflösungsvermögen“, also der Unterschied in der Intensität des Peaks 9700 zwischen resistenten und sensiblen Stämmen am größten. Auch höhere McFarland-Werte (zum Beispiel 4 und 5) zeigten noch passable Werte (siehe Abbildung 18). In der weiteren Arbeit wurde dementsprechend mit einem Wert von McFarland 3 weitergearbeitet. Bei einem McFarland-Wert von 2 zeigten sich sehr kleine Peaks.

#### 4.3.2. Ciprofloxacin-Konzentration

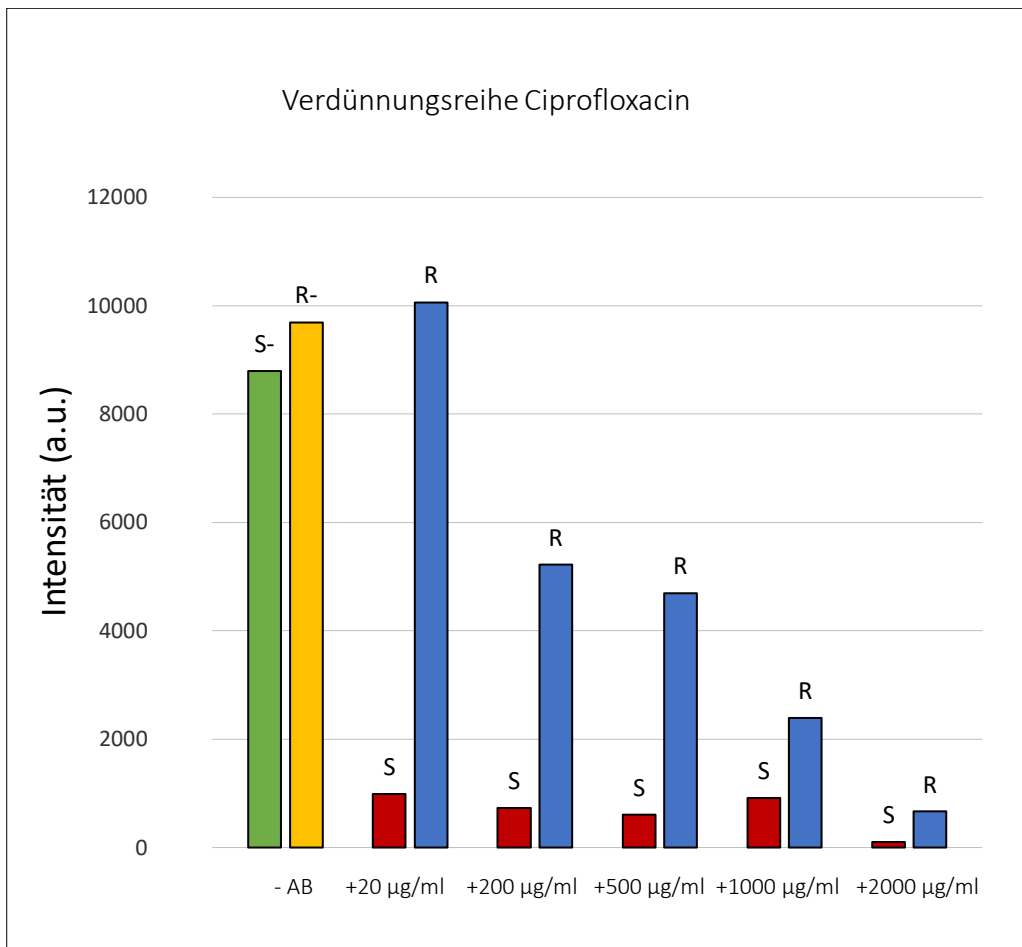


Abb.19: Verdünnungsreihe von Ciprofloxacin (Konzentration in µg/ml) eines Ciprofloxacin sensiblen sowie eines Ciprofloxacin resistenten *E. coli* Stammes nach 4 Stunden Inkubation; betrachtet wird Peak 9.700 Dalton. Diese Abbildung ist repräsentativ für 3 Versuche. S = Ciprofloxacin sensibler *E. coli* mit Ciprofloxacin. S- = Ciprofloxacin sensibler *E. coli* ohne Ciprofloxacin. R = Ciprofloxacin resistenter *E. coli* mit Ciprofloxacin. R- = Ciprofloxacin resistenter *E. coli* ohne Ciprofloxacin. -AB = ohne Zugabe von Ciprofloxacin. + X mg/ml = Ciprofloxacin Konzentration in µg/ml.

Entsprechend wie bei den mit Ampicillin durchgeführten Versuchen wurde in diesen Versuchen die optimale Konzentration von Ciprofloxacin ermittelt. Eine Antibiotikakonzentration von 20 µg/ml schien bereits ausreichend zu

sein, um deutliche Differenzen in der Messung im MALDI-TOF nachzuweisen. Erst bei einer Konzentration von 2000 µg/ml zeigte sich kein Peak mehr bei 9700 Dalton (kein resistenter Stamm). In weiteren Versuchen wurde dementsprechend die Konzentration von 20 µg/ml Ciprofloxacin verwendet.

### 4.3.3. Kinetik

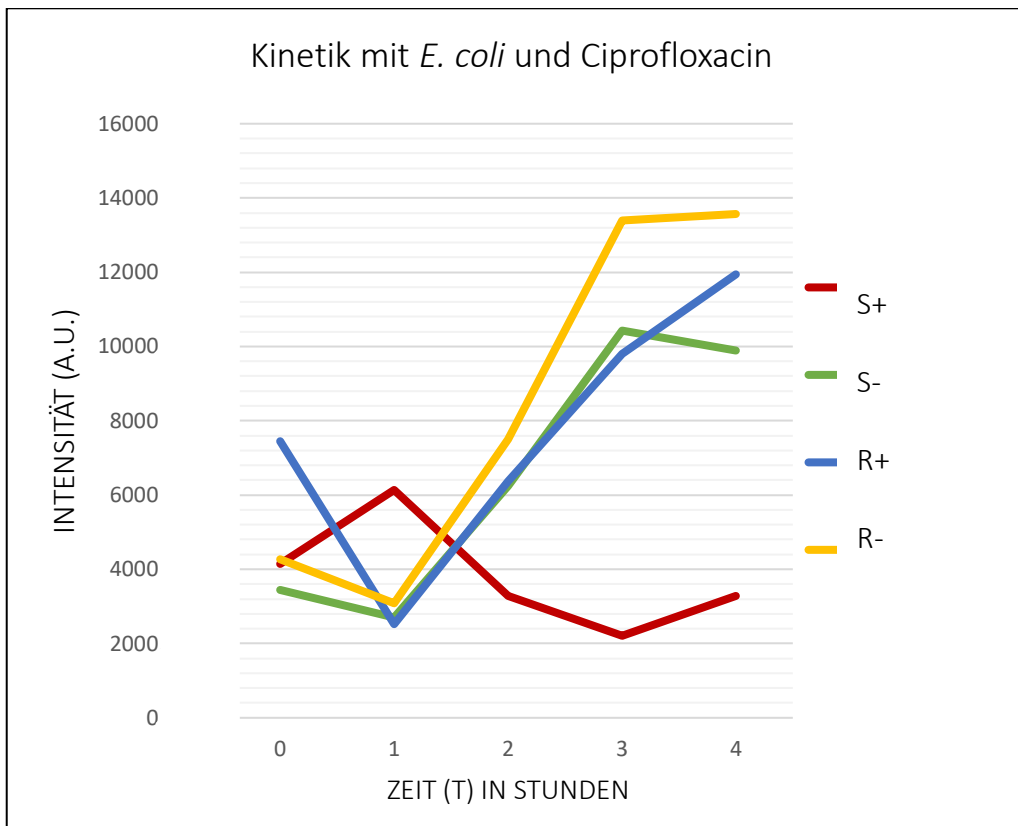


Abb.20: Kinetik von jeweils einem Ciprofloxacin resistenten und Ciprofloxacin sensiblen *E. coli*-Stamm mit und ohne Ciprofloxacin zu den Messzeitpunkten 0,1,2,3 und 4 Stunden. Analyse der Differenzen bei Peak 9.700 Dalton. Diese Abbildung ist repräsentativ für 4 Versuche. S+ = Ciprofloxacin sensibler *E. coli* mit Ciprofloxacin. S- = Ciprofloxacin sensibler *E. coli* ohne Ciprofloxacin. R+ = Ciprofloxacin resistenter *E. coli* mit Ciprofloxacin. R- = Ciprofloxacin resistenter *E. coli* ohne Ciprofloxacin.

Auch in der Kombination von *E. coli* und Ciprofloxacin wurden multiple Versuche durchgeführt, um die Inkubationszeit zu ermitteln, nach welcher die Unterschiede in Bezug auf den Peak 9.700 Dalton am deutlichsten waren. Schon nach zwei Stunden ließ sich eine Aussage über das Resistenzverhalten der untersuchten Isolate tätigen, jedoch zeigte sich nach 3 Stunden Inkubationszeit eine deutliche Zunahme der Differenz der

verschiedenen Peaks bei 9.700 Dalton. So wurde nach mehrfacher Wiederholung dieser Versuche mit unter anderem weiterer stündlicher Inkubationszeitmessung bis zu 24 Stunden eine Inkubationszeit von 3 Stunden als ideal zur Resistenzbestimmung erachtet.

#### 4.3.4. Resistenztestung von *E. coli*-Isolaten mit Ciprofloxacin

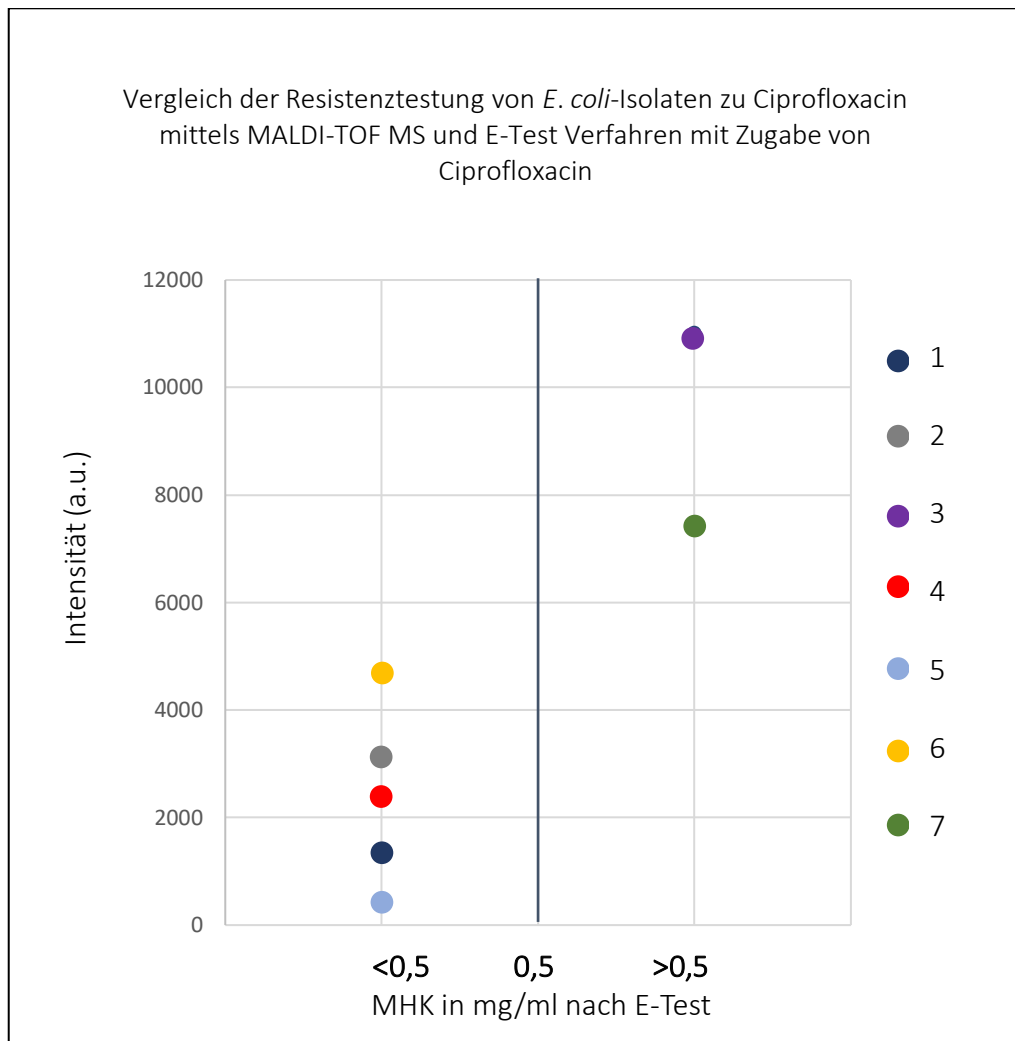


Abb.21: Resistenztestung von *E. coli*-Isolaten mit Ciprofloxacin. Relative Intensität der Spektren von 7 *E. coli*-Isolaten nach Zugabe von 20 µg/ml Ciprofloxacin und 3-stündiger Inkubation im Inkubationsschüttler.

1= *E. coli* Isolat V8956, 2 = *E. coli* Isolat V1685, 3= *E. coli* Isolat V8188, 4= *E. coli* Isolat V9064, 5= *E. coli* Isolat V0957, 6= *E. coli* Isolat V9848, 7= *E. coli* Isolat V9066.

Die *E. coli* Stämme waren im E-Test auf Ciprofloxacin getestet worden und dann nach EUCAST-Kriterien in sensible Stämme (MHK <0,5 mg/ml; linke Seite der Grafik) und resistente Stämme (MHK >0,5 mg/ml; rechte Seite der Grafik) eingeteilt worden.



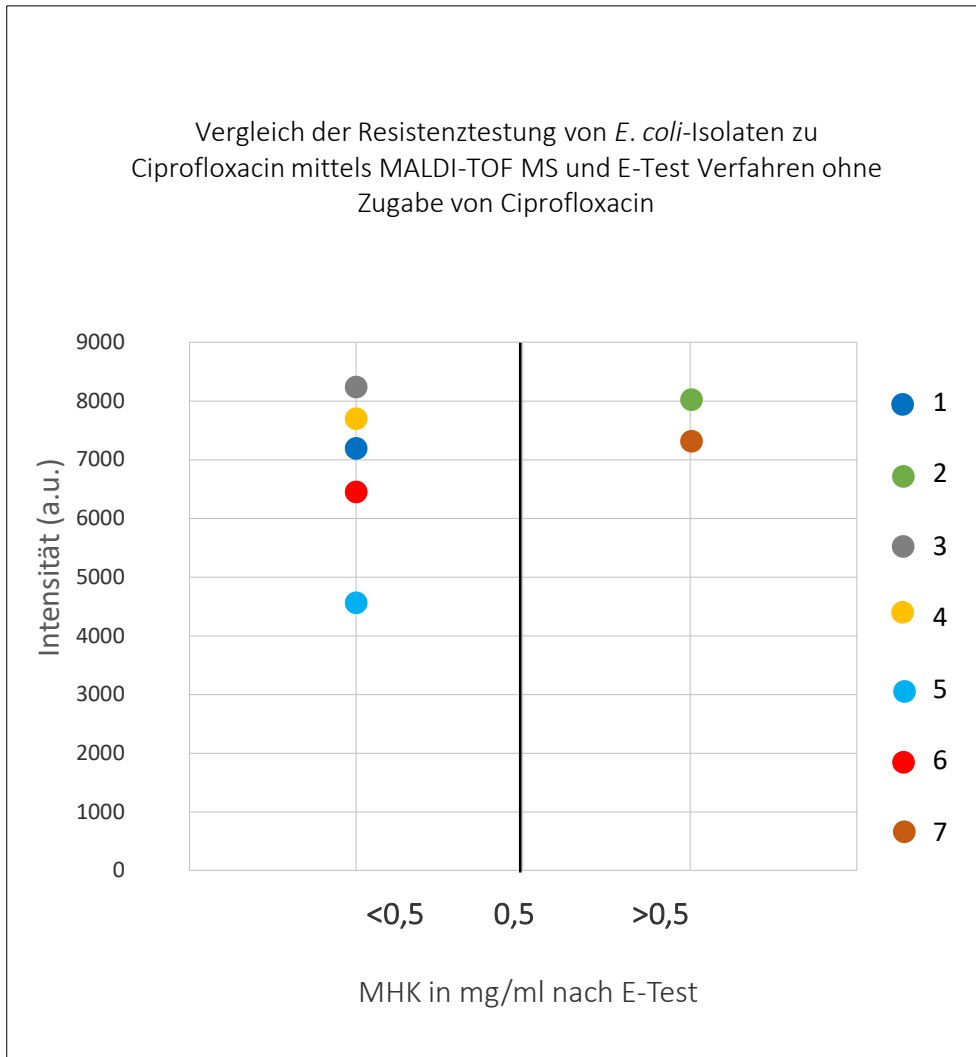


Abb.22: Resistenztestung von *E. coli*-Isolaten ohne Ciprofloxacin als Kontrollversuch zu Abbildung 21. Relative Intensität der Spektren von 7 *E. coli*-Isolaten ohne Zugabe von 20 µg/ml Ciprofloxacin und 3-stündiger Inkubation im Inkubationsschüttler.

1= *E. coli* Isolat V8956, 2 = *E. coli* Isolat V1685, 3= *E. coli* Isolat V8188, 4= *E. coli* Isolat V9064, 5= *E. coli* Isolat V0957, 6= *E. coli* Isolat V9848, 7= *E. coli* Isolat V9066.

Die *E. coli* Stämme waren im E-Test auf Ciprofloxacin getestet worden und dann nach EUCAST-Kriterien in sensible Stämme (MHK <0,5 mg/ml; linke Seite der Grafik) und resistente Stämme (MHK >0,5 mg/ml; rechte Seite der Grafik) eingeteilt worden.

Nach dem Abschluss der Vorexperimente wurde das nun entwickelte Verfahren wieder mit der Referenzmethode verglichen. Dies war das E-Test Verfahren nach EUCAST-Richtlinien. Eine MHK von 0,5 µg/ml bei Ciprofloxacin ist hierbei der Grenzwert zur Unterscheidung zwischen sensiblen und resistenten Isolaten. In Abbildung 21 dargestellt sind die Ergebnisse von Resistenzbestimmungen von 7 *E. coli*-Isolaten nach Zugabe von Ciprofloxacin im MALDI-TOF und E-Test-Verfahren. Die Isolate, welche nach EUCAST-Kriterien als sensibel getestet wurden, also eine MHK kleiner als 0,5 aufweisen, zeigten in der Messung im MALDI-TOF nur einen geringen Peak bei 9.700 Dalton nach Zugabe des Antibiotikums. Im Gegensatz dazu war bei Ciprofloxacin resistenten Isolaten mit einer MHK größer als 0,5 mg/ml ein deutlich erhöhter Peak im MALDI-TOF bei 9.700 Dalton nachzuweisen im Sinne einer Ciprofloxacin Resistenz. Auch wenn die Anzahl der hier getesteten Stämme klein ist, so weisen die Ergebnisse doch darauf hin, dass die Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF bei *E. coli* nicht auf  $\beta$ -Laktam Antibiotika beschränkt ist, sondern auch mit anderen Antibiotika funktioniert.

#### 4.4. Versuche mit *P. mirabilis*

An dieser Stelle der experimentellen Arbeit stellte sich die Frage, ob die bereits erzielten Ergebnisse „keimspezifisch“ für die bisher verwendete Spezies *E. coli* sind oder auf andere Spezies übertragbar sind. Daher wurden Versuche mit einer anderen Spezies aus der Familie der Enterobakterien, *P. mirabilis*, begonnen. In den durchgeführten Vorversuchen zeigten sich interessante Unterschiede insbesondere bei einem Peak von 8370 Dalton, weswegen bei den unten dargestellten Versuchsreihen die Vergleiche vornehmlich hierbei gezogen wurden. Der bei *E. coli* entscheidende Peak bei 9700 Dalton zeigte kaum relevante Amplitudenunterschiede im Vergleich von sensiblen und resistenten Stämmen unter Einfluss von Antibiotika.

In einer Versuchsreihe wurden Ampicillin resistente und Ampicillin sensible Isolate von *P. mirabilis* jeweils mit und ohne Zugabe von Ampicillin analysiert, um eine mögliche Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF zu untersuchen. Auf Basis von weiteren Vorversuchen wurden hierzu wieder die Annäherungswerte für die hier verwendeten Mengenangaben und -konzentrationen ermittelt. Analog zu den Versuchen mit *E. coli* wurde getestet:

- Untersuchung der geeigneten McFarland-Konzentration des Bakteriums *P. mirabilis*
- Kinetik-Versuche zur Bestimmung der optimalen Bebrütungszeit

#### 4.4.1. McFarland-Wert *P. mirabilis*

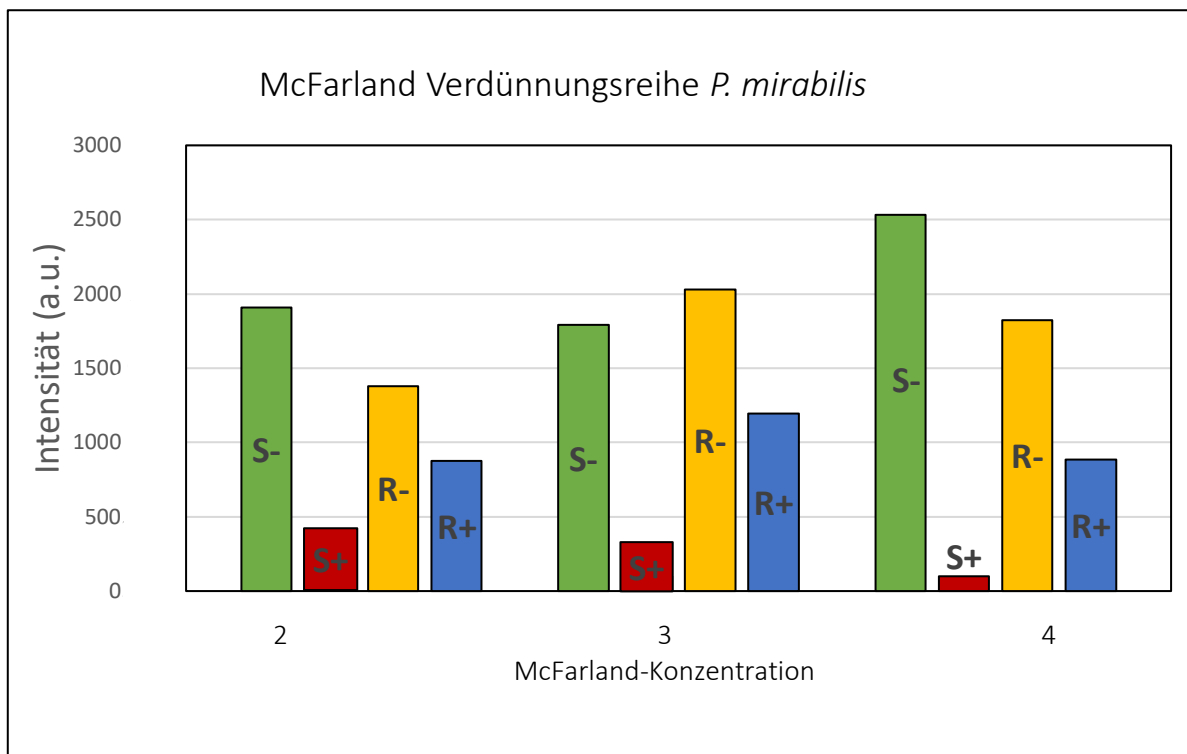


Abb. 23: Verdünnungsreihe verschiedener *P. mirabilis*-Stämme (Werte in McFarland). Intensität des Peaks 8370 Dalton nach 4 Stunden Inkubation mit und ohne Ampicillin. Diese Abbildung ist repräsentativ für 4 Versuche.

S+ = Ampicillin sensibler *P. mirabilis* mit Ampicillin. S- = Ampicillin sensibler *P. mirabilis* ohne Ampicillin. R+ = Ampicillin resistenter *P. mirabilis* mit Ampicillin. R- = Ampicillin resistenter *P. mirabilis* ohne Ampicillin.

Initial wurde hier die Verdünnungsreihe zur Ermittlung der benötigten Keimmenge des *P. mirabilis* (gemessen in McFarland-Werten) durchgeführt, welche im Vergleich die bessere Aussage zur Unterscheidung in der Messung mittels MALDI-TOF zur Resistenztestung gibt. Hier zeigte sich ein McFarland-Wert von 4 als am besten geeignet, um Resistenzunterschiede mittels MALDI-TOF Messung darzustellen. Im Vergleich zu den außerdem untersuchten McFarland-Werten erbrachte der

Wert von 4 die deutlichsten Messunterschiede (Peak von 8.370 Dalton), sodass in dieser Arbeit die weiteren Versuche mit einer Keimkonzentration von McFarland 4 durchgeführt wurden.

#### 4.4.2. Kinetik

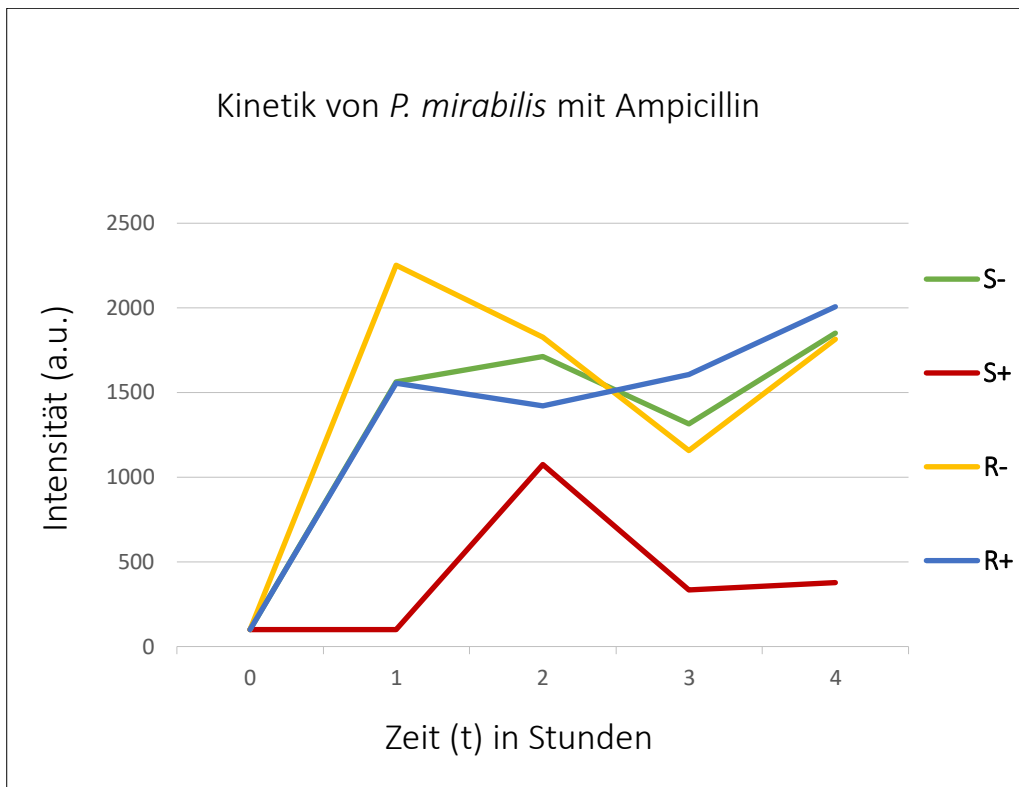


Abb. 24: Versuch der Kinetik von jeweils einem Ampicillin resistenten und Ampicillin sensiblen *P. mirabilis* Isolates mit und ohne Ampicillin zu den Messzeitpunkten 0,1,2,3 und 4 Stunden. Analyse der Differenzen am Peak 8.370 Dalton. Diese Abbildung ist repräsentativ für 3 Versuche. S+ = Ampicillin sensibler *P. mirabilis* mit Ampicillin. S- = Ampicillin sensibler *P. mirabilis* ohne Ampicillin. R+ = Ampicillin resistenter *P. mirabilis* mit Ampicillin. R- = Ampicillin resistenter *P. mirabilis* ohne Ampicillin.

Entsprechend wie schon mit *E. coli* untersucht, wurde auch hier eine Versuchsreihe zur Frage der notwendigen Inkubationszeit durchgeführt. Hierbei erwiesen sich die Werte von 3 und auch 4 Stunden als aussagekräftig, um die Beurteilbarkeit des Unterschiedes in der Ionenmenge mit und ohne Antibiotikum bei 8.370 Dalton deutlich darzustellen. Wenn sich auch bei 4 Stunden der deutlichste Unterschied

zeigte, so waren hier in mehreren Versuchen die 3 Stunden Werte bereits aussagekräftig. Sodann wurde eine Inkubationszeit von 3 Stunden gewählt, um Differenzen zwischen sensiblen und resistenten Stämmen darzustellen. Diese Daten aus den Versuchen mit *P. mirabilis* weisen darauf hin, dass diese Methode nicht prinzipiell auf *E. coli* beschränkt ist. Die Annahme, dass Peak 9700 ein universeller Marker ist, erwies sich aber als falsch; bei *P. mirabilis* musste ein neuer Marker (Peak 8730) verwendet werden. Wenn auch nicht systematisch mit verschiedenen Stämmen untersucht, so spricht doch vieles dafür, dass die Methode auch mit anderen Enterobakterien (zum Beispiel *P. mirabilis*) funktioniert.

#### 4.5. Résumé

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Ziel dieser Arbeit, also die Etablierung einer möglichen Resistenztestung von Keimen mittels MALDI TOF mit der hier entwickelten Methode möglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass mittels Marker Peaks (9700 Dalton) eine Resistenzbestimmung von *E. coli* mittels MALDI-TOF in 4 Stunden durchführbar ist. Die hier etablierte Methode ist somit schneller als die herkömmlichen Standardmethoden.

Außerdem weisen in dieser Arbeit erbrachte Resultate darauf hin, dass die Methode auch mit anderen Enterobakterien (zum Beispiel *P. mirabilis*) erfolgswahrscheinlich ist. Allerdings musste hierbei ein anderer Marker (Peak 8370) verwendet werden. Als wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist letztlich noch zu erwähnen, dass der Peak 9700 bzw. 8370 keinen universellen Marker für Resistenzbestimmungen darstellt, sondern eventuell für jeden Erreger ein oder mehrere Marker definiert werden müssen.



## 5. Diskussion

*„Wo echter Hang zum Nachdenken, nicht bloß zum Denken dieses oder jenes Gedankens, herrschend ist, da ist auch Progressivität.“*

Georg Philipp Friedrich Leopold Freiherr von Hardenberg (1772 - 1801)

Eines der Gesundheitsprobleme unserer Zeit ist zweifellos die Resistenzproblematik in der Antibiotikatherapie, welche aktuell schon dazu geführt hat, dass bakterielle Infektionen schwer heilbar oder sogar unheilbar sind (61). Dem zufolge ist die aktuelle Relevanz von Antibiotikaresistenzen unumstritten (57). Ein regelrechter Wettlauf zwischen der Zulassung neuer Präparate und dem Auftreten neuer Resistenzen hat eingesetzt (44). Laut der WHO drohen uns bei Eskalation dieser Situation Verhältnisse wie in der präantibiotischen Ära, in welcher Menschen an simplen bakteriellen Infektionen verstarben (61). Die Gründe für diese erschreckende Entwicklung sind multifaktoriell und bedürfen einer globalen Verhaltensumstrukturierung in der Human- und Veterinärmedizin (1). Im Jahr 2019 betrug zum Beispiel die Menge an abgegebenen Antibiotika in der Tiermedizin in Deutschland 670 Tonnen, welches zwar im Vergleich zu 2011 einem Rückgang von 60,7% entspricht (5), aber ungeachtet dessen einen extrem hohen Wert darstellt. Außerdem stellt der massive Einsatz von Antibiotika im ambulanten Bereich ein Problem dar. In der Humanmedizin werden 85% der Antibiotika im ambulanten Sektor verschrieben und

appliziert (19), in einigen europäischen Staaten benötigt ein Patient nicht einmal eine ärztliche Verordnung zur ambulanten antibiotischen Therapie. Zudem ist zu erwähnen, dass in der modernen Hochleistungsmedizin der begleitende Einsatz von Antibiotika unabdingbar ist bei komplexen Therapien, wie zum Beispiel in der Onkologie und bei Organtransplantationen (16). Der Einsatz von Antibiotika ist jedoch prinzipiell bei allen hospitalisierten Patienten hoch. Laut einer deutschen Prävalenzstudie 2016 wurde an 21,5% der stationär behandelten Patienten Antibiose verabreicht (48).

Die Lage wird dadurch erschwert, dass in Europa kaum noch neue Antibiotika entwickelt und zugelassen werden. Das ist zum einen durch extrem komplexe Zulassungsregulationen und zum anderen durch die schlechten lukrativen Aussichten bedingt (59). Um einer Resistenzentwicklung gegen die neuen Antibiotika vorzubeugen, werden neu zugelassene Antibiotika aus Präventionsgründen seltener verschrieben und zuerst herkömmliche Medikamente eingesetzt. Das führt dazu, dass diese essentiellen neuen Antibiotika sparsam verwendet werden und deswegen zu Beginn der Umsatz dieses Medikamentes gering ausfällt (59). Es wird dadurch zunehmend schwieriger für Pharmafirmen, die hohen Entwicklungskosten für neue Antibiotika wieder zu generieren oder gar einen Gewinn zu erzielen. Die Resistenzproblematik wird weiterhin verschärft dadurch, dass Breitspektrum-Antibiotika weitflächig im Sinne einer sogenannten kalkulierten Therapie eingesetzt werden. Die kalkulierte antibiotische Therapie hat für den individuellen Patienten den Vorteil, dass noch vor einem Erregernachweis eine frühzeitige Behandlung mittels Breitspektrum-Antibiotika initiiert werden kann. Die Auswahl des Antibiotikums basiert dabei auf dem klinischen Bild und dem damit verbundenen zu erwartenden Erregerspektrum. Nach Erhalt der mikrobiologischen Ergebnisse muss im Falle eines Bakteriennachweises mit der gezielten Antibiose begonnen werden. Die vielfach eingesetzte ungezielte Breitspektrum-Therapie hat mittlerweile zur Entwicklung weiterer

Resistenzen geführt, womit heutzutage selbst eine Breitspektrum-Antibiose nicht mehr sicher wirksam ist.

Ein schnelles Umstellen der Antibiotikatherapie auf ein schmales und optimal wirksames Präparat ist jedoch essentiell für den Therapieerfolg. Insbesondere bei zeitkritischen Situationen zum Beispiel bei immunkomprimierten Patienten, Infektionen durch hochvirulente Erreger oder implantatassoziierten Infektionen muss eine zeitnahe und spezifische Erregerdiagnostik mit Antibiotogramm erfolgen (8; 26). Im Falle eines septischen Schocks ist das therapeutische Zeitfenster besonders eng bemessen, da mit jeder Verzögerung der wirksamen Antibiose die Mortalität zunimmt (31). Problem ist aber, dass eine mikrobiologische Routinediagnostik mindestens 48 Stunden bis zum Vorliegen eines Antibiotogramms benötigt. Die kritische Phase einer schweren Infektion ist da aber schon vorüber. Deswegen ist die Beschleunigung der Resistenztestung in den letzten Jahren in den Fokus vieler Wissenschaftler gelangt (39).

Ziel dieser Arbeit war daher eine schnelle Methode der Resistenztestung zu entwickeln und dazu die Massenspektrometrie zu verwenden. Die prinzipielle Idee dabei war, dass bei Inkubation von Bakterien mit Antibiotika, Resistenzen oder Empfindlichkeit schon früh in einem Massenspektrum sichtbar werden. Die neue Methode sollte Ergebnisse schneller als herkömmliche Antibiotika-Testungen liefern, ein Zeitfenster von unter 8 Stunden wurde angestrebt. Hierbei getestete Antibiotika waren Ampicillin und Ciprofloxacin in ihrer Wirkung auf die bakteriellen Spezies *E. coli* und *P. mirabilis*.

Die genannten Keime wurden aufgrund ihrer Relevanz für nosokomiale Infektionen ausgewählt. Auch heutzutage ist *E. coli* für den Großteil der von gramnegativen Keimen ausgelösten Blutstrominfektionen verantwortlich (23). Der in dieser Arbeit außerdem verwendete *P. mirabilis* ist für ungefähr 4% der Harnwegsinfektionen auslösend (43). In Kombination mit diesen

beiden gramnegativen Erregern wurden hauptsächlich zwei Antibiotika getestet, welche auch im klinischen Alltag in der Therapie dieser Erreger angewandt werden. Die beiden Antibiotika wurden ausgewählt als typische Vertreter zweier relevanter Antibiotika-Klassen; das Ampicillin als Vertreter der sogenannten  $\beta$ -Laktame und das Ciprofloxacin als Vertreter der Chinolone. Die Testung dieser Antibiotika ist unzweifelhaft relevant, da die Resistenzen dieser Substanzen stetig zunehmen. Die Resistenzlage des *E. coli* zu Ampicillin beträgt ungefähr 30% und zu Ciprofloxacin bei komplizierten Harnwegsinfektionen bis zu 16% (28). Für *P. mirabilis* liegen die Werte der Resistenz gegenüber Ampicillin bei bis zu 60% und gegenüber Ciprofloxacin bei ungefähr 30% (21).

In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit den oben genannten Kombinationen von Keimen und Antibiotika eine Resistenztestung mittels MALDI-TOF innerhalb von 3-4 Stunden möglich ist. Damit ist das Verfahren wesentlich schneller als die herkömmlichen Resistenztestungen, welche Ergebnisse in der Regel „über Nacht“ liefern. Mit dem hier entwickelten Verfahren wäre eine Aussage über die Resistenz eines Erregers also noch am selben Tag (nach Anzucht des Erregers) möglich. In dem hier vorgestellten neuen Verfahren verwendeten wir sogenannte „Marker-Peaks“ im MALDI-TOF Spektrum, die das Vorliegen einer Resistenz bzw. Empfindlichkeit besonders gut anzeigen. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass nicht das komplette Spektrum eines Versuches ausgewertet werden muss. Bei *E. coli* stellte sich dabei besonders ein Peak von ca. 9.700 Dalton nach 4 Stunden Inkubation im Inkubationsschüttler als aussagekräftiger Marker heraus. Dieser Peak wird unter Einfluss des Antibiotikums bei empfindlichen Keimen schnell (1 bis 4 Stunden) sehr klein, während er bei resistenten Bakterien unbeeinflusst bleibt. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei *P. mirabilis*, dass ein Peak bei 8730 ein guter Marker für den Einfluss des Antibiotikums auf die Bakterien ist. Sicherlich ist in diesem Zusammenhang die Frage von großer Bedeutung, welches Protein sich hinter dem Peak 9.700 Dalton bei *E. coli* und 8.370 Dalton bei

*P. mirabilis* verbirgt. Hiernach könnte genauer beleuchtet werden, was das Antibiotikum im Proteinspektrum des Keims auslöst. Insbesondere wäre ebenso interessant, ob diese Proteine auch bei anderen Bakterien „Marker“ für die schnellen identifizierbaren Resistenzen sind. Müsste für jede Spezies ein „spezieller Marker“ definiert werden, wäre das Verfahren natürlich sehr komplex.

Nachdem dieses Verfahren entwickelt und reproduziert werden konnte, stellte sich noch die Frage, ob diese Methode einer Überprüfung mit den Referenzmethoden (zum Beispiel „E-Test“ und automatisierten Verfahren (MicroScan Walkaway)) standhält. Daher wurden verschiedene *E. coli*- und *P. mirabilis*-Isolate auf ihr Resistenzverhalten gegenüber Ampicillin und Ciprofloxacin mittels MALDI-TOF getestet, analysiert und mit den genannten Referenzmethoden verglichen. Wenn auch die Zahl der untersuchten Stämme wegen des hohen technischen Aufwandes klein war, so konnte doch eine gute Korrelation zwischen Messung mittels MALDI-TOF und herkömmlicher Resistenztestung (E-Test und MicroScan Walkaway) erzielt werden. Im Vergleich mit den Referenzmethoden zeigt die neue Methode also eine hohe Übereinstimmung. Wie bereits erwähnt ist eine Limitation dieser Arbeit aber die geringe Anzahl an Isolaten, die für diese Vergleiche verwendet wurden. Da die Versuche mit Pipettierarbeit und individueller (nicht EDV-gestützter) Analyse der MALDI-TOF-Spektren verbunden war, stellte sich der Arbeitsaufwand pro untersuchtem Keim als sehr hoch dar und somit war die Anzahl der Stämme limitiert. Eine Automatisierung könnte hier einen höheren Durchsatz erzielen und die neue Methode müsste somit noch mit einer größeren Anzahl von Stämmen validiert werden. Außerdem muss festgehalten werden, dass die hier gezeigten Ergebnisse nur mit gramnegativen Bakterien erzielt wurden und die Frage stellt sich natürlich, ob ein ähnliches Verfahren auch mit grampositiven Erregern oder sogar Pilzen möglich ist.

Natürlich ist die Idee „schnellerer“ Resistenzmessungen nicht neu. Man hat in den letzten Jahren versucht, mit verschiedenen Ansätzen solche Schnelltestungen zu entwickeln, zum Beispiel mittels molekularbiologischer Techniken. Diese beruhen auf dem Nachweis veränderter Gene oder auf dem Nachweis zusätzlicher Gene, welche für eine Resistenz kodieren. Eine Standardmethode hierfür ist die Polymerase-Kettenreaktion, welche schon nach wenigen Stunden und ohne Anzucht einer Bakterienkultur Ergebnisse liefern kann, ob zum Beispiel in einer Probe das Gen für einen bestimmten Resistenzmechanismus vorliegt. Ein Beispiel dafür ist die Detektion von Oxacillin-Resistenz bei *Staphylococcus aureus* (45). Diese Verfahren weisen jedoch einige Limitationen auf und sind daher nicht generell einsetzbar. Falls hierbei bestimmte Mutationen oder gewisse genetische Elemente nachgewiesen werden sollen, so müssen diese im Vorfeld bekannt sein. Außerdem können keine neu auftretenden, beziehungsweise unbekanntem Veränderungen von Resistenzgenen erfasst werden. Des Weiteren muss bei molekularbiologischem Nachweis eines bestimmten Genes nicht immer die phänotypische Ausprägung einer Resistenz vorhanden sein. Ziel dieser Arbeit war daher eine schnelle Resistenztestung auf phänotypischer Basis zu entwickeln und dazu das MALDI-TOF zu benutzen.

Insgesamt hat die Verwendung des MALDI-TOF in den letzten Jahren im mikrobiologischen Laboralltag als Instrument der Erregerdiagnostik stetig zugenommen und vor allem durch die praktische, sichere und kostengünstige Anwendbarkeit an Aufmerksamkeit gewonnen (4; 60). Das MALDI-TOF wird heutzutage im mikrobiologischen Labor hauptsächlich zur schnellen Identifizierung angezüchteter Bakterien eingesetzt. Zuletzt wuchs aber stark das Interesse an der Erforschung weiterer Verwendungszwecke für das MALDI-TOF, wie zum Beispiel der Resistenztestung (56; 7). Parallel zur Entwicklung der hier vorgestellten Methode wurden 2014 zum Beispiel die Ergebnisse von Lange et al. veröffentlicht, welche nach einer Stunde Inkubationszeit von *Klebsiella pneumoniae* mit oder ohne Zugabe von

Meropenem Unterschiede in den Peaks mittels MALDI-TOF detektieren konnten und somit Rückschlüsse auf das Resistenzverhalten ziehen konnten. Im Zuge unserer Vorversuche erfolgten sodann Versuche in Anlehnung an die Publikation von Lange et al., welche jedoch bei uns keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten (Daten nicht gezeigt) (32).

Ein anderer methodischer Ansatz ist, die Empfindlichkeitstestung mittels MALDI-TOF zur Detektion spezifischer Resistenzmechanismen anzuwenden. Prinzip ist dabei, dass sich das Massenspektrum von Antibiotika durch die Wirkung bakterieller  $\beta$ -Laktamasen ändern kann (52). Dies konnte zum Beispiel für die Aktivität von Carbapenemasen in Enterobakterien gezeigt werden (66). Hierbei wird also der Zerfall eines bestimmten Antibiotikums durch bakterielle Enzyme gemessen. Verfahren, die auf der Detektion von bestimmten Resistenzmechanismen im MALDI-TOF beruhen, haben den Vorteil, dass sie rascher Ergebnisse aufzeigen können als Verfahren, die auf längere Inkubation angewiesen sind. Jedoch sind sie dahingehend limitiert, dass sie nur bei bestimmten Keimen mit bestimmten Resistenzmechanismen anwendbar sind. Nach Fertigstellung des experimentellen Teils unserer Arbeit folgten weitere Publikationen, die eine Resistenztestung von Bakterien mittels MALDI-TOF beschrieben. Darunter sind auch Arbeiten, die Verfahren verwenden, die dem hier untersuchten ähneln. Diese Verfahren verwenden dementsprechend ebenso das MALDI-TOF, um durch wachstumsbasierte Differenzierungsanalyse Rückschlüsse auf das Resistenzverhalten zu ziehen (22). Ein Beispiel für ein solches Verfahren ist der „MBT ASTRA“ (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay) (54, 58), eine Weiterentwicklung des Verfahrens von Lange et al (32). Mittels dieses Verfahrens konnten Resistenzen in Pilzen nachgewiesen werden (58), mittlerweile aber auch in verschiedenen Kombinationen von Bakterien und Antibiotika (54). Der Unterschied zu unserer Arbeit ist jedoch, dass in diesen Arbeiten nicht einzelne Peaks analysiert wurden, sondern das gesamte Spektrum mit

mathematischen Methoden ausgewertet wurde. Eine andere Arbeit zeigte, dass die Inkubation der bakteriellen Isolate in kleinen Tröpfchen direkt auf dem Metalltarget des MALDI-TOF-Gerätes durchgeführt werden kann. Dieses von Correa-Martinez et al. entwickelte Verfahren („direct on target microdroplet growth assay“) kann bereits Ergebnisse nach 1 bis 4 Stunden zur Resistenztestung liefern (9; 10). Allerdings wurde diese Methode nur zum Nachweis bestimmter bakterieller  $\beta$ -Laktamasen (z.B. sogenannte „extended spectrum  $\beta$ -Lactamases, ESBL“) eingesetzt.

Zusammengefasst ist also zu konstatieren, dass das MALDI-TOF ein sicheres, kostengünstiges und schnelles Verfahren sein könnte, um Resistenzen zu detektieren. Weitere Forschungsarbeiten müssen zeigen, ob der hier gewählte Ansatz (Definition von Marker Peaks) oder eine gesamte Auswertung des MALDI-Spektrums zu besseren Ergebnissen führt. Unklar ist auch noch, ob und wie die Resistenztestung mittels MALDI-TOF in die Routinediagnostik eines mikrobiologischen Labors integriert werden kann. Diese Fragen könnten Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.



## 6. Zusammenfassung

*„Wenn die anderen glauben, man ist am Ende, so muss man erst richtig anfangen.“*

Konrad Adenauer (1876 - 1967)

Aufgrund des mittlerweile hohen Grades von Antibiotikaresistenzen und den damit verbundenen wachsenden Schwierigkeiten bei der Antibiotikatherapie im klinischen Alltag rückt die Entwicklung von schnellen und kostengünstigen Resistenztestungen immer mehr in den Fokus des Forschungsinteresses.

Die hier präsentierte Arbeit untersuchte daher ob mittels MALDI-TOF eine schnellere Resistenzbestimmung möglich ist als mit konventionellen Verfahren.

Die grundlegende Idee war, ob das Vorliegen einer Resistenz eines bestimmten Isolates unter Einfluss des Antibiotikums sehr früh in einem Massenspektrum erkannt werden kann. Dazu wurden Bakterien für kurze Zeit (1-4 Stunden) mit einem Antibiotikum inkubiert und dann ein Spektrum mittels MALDI-TOF Messung erstellt. Die Hypothese war also, dass

Hemmung des Wachstums (beziehungsweise Abtötung) oder beginnendes Wachstum sehr früh in einem Massenspektrum erkannt werden können.

Die Versuche wurden mit zwei klinisch relevanten Keimen (*E. coli* und *P. mirabilis*) durchgeführt. In Vorversuchen wurde getestet, wie sich die Keimmenge, die Antibiotikakonzentration, die Inkubationszeit und sonstige Bedingungen auf die Spektren auswirkten. Es zeigte sich, dass Änderungen bestimmter Peaks im Massenspektrum (9700 bei *E. coli* und 8370 bei *P. mirabilis*) als Surrogatmarker für Resistenzen beziehungsweise Empfindlichkeit verwendet werden können. Das Verfahren wurde mit den Referenzmethoden der Resistenztestung (E-Test und MicroScan®-Walkaway) verglichen und zeigte eine gute Übereinstimmung.

Je nach untersuchtem Keim konnte bereits nach drei beziehungsweise vier Stunden Inkubation eine zuverlässige Aussage über die Wirksamkeit des jeweiligen Antibiotikums getroffen werden. Als Erkenntnis dieser Arbeit geht eindeutig hervor, dass das MALDI-TOF ein verlässliches und schnelles Verfahren ist, um Resistenzen zu detektieren, zumindest bei den in dieser Arbeit untersuchten Kombinationen von Keimen und Antibiotika.

Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob das hier entwickelte Verfahren auch für andere bakterielle Spezies einsetzbar ist und ob es für die Routineanwendung geeignet ist.

## Conclusion

Due to the current relevance of antibiotic resistances and the associated growing challenge of therapy limitations in everyday clinical practice, the development of rapid and cost-effective resistance tests is increasingly becoming the focus of research interest.

The work presented here investigates the development of a method to quickly and reliably determine the resistance of bacteria to antibiotics by analyzing and evaluating the spectra after MALDI-TOF measurement of the incubated isolates with or without added antibiotics.

The basic idea was whether the presence of resistance of a certain isolate can be detected very early in a mass spectrum under the influence of the antibiotic. For this purpose, bacteria were incubated with and without an antibiotic for a short time (3-4 hours) and then a spectrum was generated using MALDI-TOF measurement. The hypothesis was that inhibition of growth, killing or the beginning of growth could be detected very early in a mass spectrum.

The experiments were carried out with two clinically relevant bacteria (*E. coli* and *P. mirabilis*). In preliminary experiments it was analysed how the

amount of bacteria, antibiotic concentration, incubation time and other conditions affected the spectra. It was shown that differences at specific peaks (9700 for *E. coli* and 8370 for *P. mirabilis*) could be used as surrogate markers for resistance or susceptibility for antibiotics in bacteria. The results were compared with the reference methods of resistance testing (E-Test and MicroScan® Walkaway) and showed equal findings.

Depending on the bacteria examined, reliable information on the efficacy of the antibiotic could be obtained after only three or four hours of incubation. As a result of this work it is clear that MALDI-TOF is a reliable and rapid method for detecting resistance, at least for the combinations of germs and antibiotics investigated in this work.

Further experiments must now show whether the method developed here can be used for other bacteria and whether it is suitable for routine application.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Antão EM**, Wagner-Ahlf C. (2018). Antibiotikaresistenz: Eine gesellschaftliche Herausforderung [Antibiotic resistance : A challenge for society]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2018;61(5):499-506. doi:10.1007/s00103-018-2726-y.
2. **Aminov, R. I.** (2010). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol*, 1. 2010 Dec 8;1:134. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134. PMID: 21687759; PMCID: PMC3109405.
3. **Armbruster, C. E.**, Mobley, H. L. T., & Pearson, M. M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*, 8(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.
4. **Bizzini, A.**, & Greub, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*, 16(11), 1614-1619. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03311.
5. **Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit** (2020). Retrieved from [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/05\\_tierarz\\_neimittel/2020/2020\\_07\\_29\\_PI\\_Antibiotikaabgabe.html](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/05_tierarz_neimittel/2020/2020_07_29_PI_Antibiotikaabgabe.html) 12.09.2020 15:08 Uhr.
6. **Camara JE**, Hays FA (2007). Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Nov;389(5):1633-8. doi: 10.1007/s00216-007-1558-7. Epub 2007 Sep 12. PMID: 17849103.
7. **Charretier, Y.**, & Schrenzel, J. (2016). Mass spectrometry methods for predicting antibiotic resistance. *Proteomics Clin Appl*, 10(9-10), 964-981. doi:10.1002/prca.201600041.
8. **Clarridge, J. E.** (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17(4), 840-862, table of contents. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.

9. **Correa-Martínez CL**, Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. (2019). Rapid Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) and AmpC  $\beta$ -Lactamases in *Enterobacterales*: Development of a Screening Panel Using the MALDI-TOF MS-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. *Front Microbiol.* 2019 Jan 24;10:13. doi: 10.3389/fmicb.2019.00013. PMID: 30733710; PMCID: PMC6353820.
10. **Correa-Martínez CL**, Idelevich EA, Sparbier K, Kuczius T, Kostrzewa M, Becker K. (2020). Development of a MALDI-TOF MS-based screening panel for accelerated differential detection of carbapenemases in *Enterobacterales* using the direct-on-target microdroplet growth assay. *Sci Rep.* 2020 Mar 19;10(1):4988. doi: 10.1038/s41598-020-61890-7. PMID: 32193431; PMCID: PMC7081182.
11. **Croxatto, A.**, Prod'hom, G., Greub, G., & Institute of Microbiology, U. H. C. a. U. o. L., Lausanne, Switzerland. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 380-407.
12. **European Centre for Prevention and Disease Control (ECDC)**, E. C. f. D. P. a. (2017). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015*. Retrieved from <http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2015>. 03.08.2020 07:54.
13. **Fleming, A.** (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*, 10(3), 226-236.
14. **Gherardi G**, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, Avola A, Fico L, Palazzo C, Sapia GF, Visaggio D, Dicuonzo G. (2011). Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Jan;72(1):20-31. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.015. Epub 2011 Oct 24. PMID: 22030102.
15. **Griffin, P. M.**, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D. (2012). Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012 Sep;50(9):2918-31. doi: 10.1128/JCM.01000-12. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22740710; PMCID: PMC3421795.

16. **Hacker, Jörg;** Kumm, Sandra (2015). Antibiotika und Antibiotikaresistenzen: Vorkommen und Perspektiven. Deutsches Ärzteblatt 2015; 112(23): A-1046 / B-874 / C-848.
17. **Hauser, A. R.** (2013). *Antibiotic Basics for Clinicians*. In: Hauser AR, editor. 2nd ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 91–92.
18. **Herbert Hof, R. D.** (2017). Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 6. Ausgabe, unveränderte Auflage; Stuttgart Georg Thieme Verlag KG. pp. 340-450.
19. **Hicks LA,** King LM, Fleming-Dutra KE (2019). Improving outpatient antibiotic prescribing. *BMJ*. 2019;364:l289. Published 2019 Feb 12. doi:10.1136/bmj.l289.
20. **Högberg LD,** Heddini A, Cars O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol Sci*. 2010 Nov;31(11):509-15. doi: 10.1016/j.tips.2010.08.002. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20843562.
21. **Hussein, E. I.,** Al-Batayneh, K., Masadeh, M. M., Dahadhah, F. W., Al Zoubi, M. S., Aljabali, A. A., & Alzoubi, K. H. (2020). Assessment of Pathogenic Potential, Virulent Genes Profile, and Antibiotic Susceptibility of. *Int J Microbiol*, 2020, 1231807. doi:10.1155/2020/1231807.
22. **Idelevich, E. A.,** Reischl, U., & Becker, K. (2018). New Microbiological Techniques in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *Dtsch Arztebl Int*, 115(49), 822-832. doi:10.3238/arztebl.2018.0822.
23. **Javaloyas, M.,** Garcia-Somoza, D., & Gudiol, F. (2002). Epidemiology and prognosis of bacteremia: a 10-y study in a community hospital. *Scand J Infect Dis*, 34(6), 436-441. doi:10.1080/00365540110080629.
24. **Jorgensen J,** Turnidge J. (2015). Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods\*. In Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*. ASM Press, Washington, DC. pp 1253-1273. doi: 10.1128/9781555817381.ch71.
25. **Jung J.S.,** Eberl T, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S, Wieser A. (2013). Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes | SpringerLink. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. doi:10.1007/s10096-013-2031-5.

26. **Kerremans, J. J.**, Verboom, P., Stijnen, T., Hakkaart-van Roijen, L., Goessens, W., Verbrugh, H. A., & Vos, M. C. (2008). Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother*, 61(2), 428-435. doi:10.1093/jac/dkm497.
27. **Klein, E. Y.**, Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens H., Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 115, pp. E3463-3470).
28. **Klingeberg, A.**, Noll, I., Willrich, N., Feig, M., Emrich, D., Zill, E., . . . Eckmanns, T. (2018). Antibiotic-Resistant E. coli in Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Dtsch Arztebl Int*, 115(29-30), 494-500. doi:10.3238/arztebl.2018.0494.
29. **Kostrzewa, M. S.**, Katrin. Maier, Thomas. Schubert, Sören. (2013). MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms - Kostrzewa - 2013 - PROTEOMICS – Clinical Applications. doi:10.1002/prca.201300042.
30. **Krüger M.**, T. Seidler (2007): Allgemeine Bakteriologie. In: Rolle M.,A. Mayr, Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 344 – 392.
31. **Kumar, A.**, Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., . . . Cheang, M. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*, 34(6), 1589-1596. doi:10.1097/01.ccm.0000217961.75225.e9.
32. **Lange, C.**, Schubert, S., Jung, J., Kostrzewa, M., Sparbier, K. (2014). Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Resistance Detection. *J Clin Microbiol*. 2014 Dec; 52(12): 4155-4162. doi: 10.1128/JCM.01872-14.
33. **Langgartner, J.**, Klebl, F., & Schölmerich, J. (2014). Neue Aspekte in der Applikation von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 39(6), 503-508. doi:doi:10.1007/s00390-002-0257-z.
34. **Leclercq, R.**, & Courvalin, P. (2002). Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(9), 2727-2734. doi:10.1128/aac.46.9.2727-2734.2002.



35. **Linder, J. A.**, Division of General Medicine, B. a. W. s. H. a. H. M. S., Boston, Massachusetts, Huang, E. S., Section of General Internal Medicine, U. o. C., Illinois, Steinman, M. A., . . . Program on Prevention Outcomes and Practices, S. P. R. C., Stanford, California. (2005). Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *The American Journal of Medicine*, 118(3), 259-268. doi:10.1016/j.amjmed.2004.09.015.
36. **Lobanovska, M.**, & Pilla, G. (2017). Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*, 90(1), 135-145.
37. **Loff, M.**, Mare, L., de Kwaadsteniet, M., & Khan, W. (2014). 3M™ Molecular detection system versus MALDI-TOF mass spectrometry and molecular techniques for the identification of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* spp. & *Listeria* spp. *J Microbiol Methods*, 101, 33-43. doi:10.1016/j.mimet.2014.03.015.
38. **Marinach, C.**, Alanio, A., Palous, M., Kwasek, S., Fekkar, A., Brossas, J. Y., . . . Mazier, D. (2009). MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics*, 9(20), 4627-4631. doi:10.1002/pmic.200900152.
39. **Maurer, F. P.**, Christner, M., Hentschke, M., & Rohde, H. (2017). Advances in Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory: Implications for Patient Care and Antimicrobial Stewardship Programs. *Infect Dis Rep*, 9(1), 6839. doi:10.4081/idr.2017.6839.
40. **Treviño M**, Areses P, Peñalver MD, Cortizo S, Pardo F, del Molino ML, García-Riestra C, Hernández M, Llovo J, Regueiro BJ (2012). Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group and characterisation of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF. *Anaerobe*. 2012 Feb;18(1):37-43. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.12.022. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22261518.
41. **Moore, B. A.**, Jevons, S., & Brammer, K. W. (1979). Inhibition of Transpeptidase Activity in *Escherichia coli* by Thienamycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 15(6), 831-833. 1979 Jun;15(6):831-3. doi: 10.1128/aac.15.6.831. PMID: 383012; PMCID: PMC352767.

42. **Neumeister, B.** (2009). Mikrobiologische Diagnostik. 1.2 *Automatisierung in der Mikrobiologie (Identifizierung und antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung)*: Thieme Verlag. Hrsg. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. doi:10.1055/b-002-19462. pp. 13-15.
43. **Nicolle, L. E.** (2014). Catheter-related urinary tract infection: practical management in the elderly. *Drugs Aging*, 31(1), 1-10. doi:10.1007/s40266-013-0089-5.
44. **Nordmann, P.,** Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med*, 18(5), 263-272. doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003.
45. **Palavecino EL** (2014). Rapid methods for detection of MRSA in clinical specimens. *Methods Mol Biol*. 2014;1085:71-83. doi: 10.1007/978-1-62703-664-1\_3. PMID: 24085689.
46. **Pliakos EE,** Andreatos N, Shehadeh F, Ziakas PD, Mylonakis E. (2018). The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. *Clin Microbiol Rev*. 2018 May 30;31(3):e00095-17. doi: 10.1128/CMR.00095-17. PMID: 29848775; PMCID: PMC6056844.
47. **Poole K.** (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Jan;10(1):12-26. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x. PMID: 14706082.
48. **Robert-Koch-Institut** (2017). Abschlussbericht der Punktprävalenzerhebung 2016 zum Vorkommen von nosokomialen Infektionen und zur Anwendung von Antibiotika an Akutkrankenhäusern in Deutschland. [https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Krankenhausinfektionen-und-Antibiotikaresistenz/FAQ\\_Liste.html](https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Krankenhausinfektionen-und-Antibiotikaresistenz/FAQ_Liste.html) ; 14.11.2017 15:56 Uhr.
49. **Robert-Koch-Institut** (2020). Antibiotic Resistance Surveillance. Retrieved from <https://ars.rki.de/Content/Database/ResistanceDevelopment.aspx> 16.11.2020 11:47.
50. **Schaffer, J. N.,** & Pearson, M. M. (2015). *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr*, 3(5). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013.

51. **Silva, B. N.**, Andriolo, R. B., Atallah, A. N., & Salomao, R. (2013). De-escalation of antimicrobial treatment for adults with sepsis, severe sepsis or septic shock. *Cochrane Database Syst Rev*(page 3), Cd007934. doi:10.1002/14651858.CD007934.pub3.
52. **Sparbier, K.**, Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., & Kostrzewa, M. (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*, 50(3), 927-937. doi:10.1128/JCM.05737-11.
53. **Sparbier, K.**, Lange, C., Jung, J., Wieser, A., Schubert, S., & Kostrzewa, M. (2013). MALDI Biotyper-Based Rapid Resistance Detection by Stable-Isotope Labeling. *Journal of Clinical Microbiol*, 51(11), 3741-3748. doi:10.1128/jcm.01536-13.
54. **Sparbier, K.**, Schubert, S., & Kostrzewa, M. (2016). MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods*, 104, 48-54. doi:10.1016/j.ymeth.2016.01.008.
55. **Swann, JP.** (1983). The Search for Synthetic Penicillin during World War II. *The British Journal for the History of Science*, 16(2), 154-190. doi: 10.1017/s0007087400026789. PMID: 11611199.
56. **Toprak NU**, Akgul O, S3ki J, Soyletir G, Nagy E; ESCMID Study Group for Anaerobic Infections (ESGAI). (2020) Detection of beta-lactamase production in clinical *Prevotella* species by MALDI-TOF MS method. *Anaerobe*. 2020 Oct;65: 102240. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102240. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32768494.
57. **Trevas D**, Caliendo AM, Hanson K, Levy J, Ginocchio CC. (2020). Diagnostic Tests Can Stem the Threat of Antimicrobial Resistance: Infectious Disease Professionals Can Help. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 18:ciaa1527. doi: 10.1093/cid/ciaa1527. Epub ahead of print. PMID: 33206946.
58. **Vatanshenassan, M.**, Boekhout, T., Lass-Fl3rl, C., Lackner, M., Schubert, S., Kostrzewa, M., & Sparbier, K. (2018). Proof of Concept for MBT ASTRA, a Rapid Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)-Based Method To Detect Caspofungin Resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*, 56(9). doi:10.1128/JCM.00420-18.

59. **Ventola, C. L.** (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015 Apr;40(4):277-83. PMID: 25859123; PMCID: PMC4378521.
60. **Wang Y,** Jin Y, Bai Y, Song Z, Chu W, Zhao M, Hao Y, Lu Z. (2020). Rapid method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Exp Ther Med.* 2020 Dec;20(6):235. doi: 10.3892/etm.2020.9365. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33178337; PMCID: PMC7651779.
61. **World Health Organisation.** (2012) Self-prescription of antibiotics boosts superbugs epidemic in the European Region retrieved from <https://www.euro.who.int/de/media-centre/sections/press-releases/2012/11/self-prescription-of-antibiotics-boosts-superbugs-epidemic-in-the-european-region/antibiotic-resistance>. 14.07.2018, 16:17.
62. **World Health Organisation.** (2016). *Global report on surveillance 2014.* Retrieved from <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/infographic-antimicrobial-resistance-20140430.pdf?ua=1>; 21.04.2019, 18:34.
63. **World Health Organisation.** (2017). *WHO | WHO Model Lists of Essential Medicines.* Retrieved from <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>; 18.01.2020, 14:23.
64. **World Health Organisation.** (2018). Antibiotic resistance. Retrieved from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>;12.12.2019, 09:12.
65. **Wybo, I.,** De Bel, A., Soetens, O., Echahidi, F., Vandoorslaer, K., Van Cauwenbergh, M., & Piérard, D. (2011). Differentiation of cfiA-Negative and cfiA-Positive *Bacteroides fragilis* Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry ▽. *J Clin Microbiol*, 49(5), 1961-1964. doi:10.1128/jcm.02321-10.
66. **Yu, J.,** Liu, J., Li, Y., Zhu, W., Liu, Y., & Shen, L. (2018). Rapid detection of carbapenemase activity of Enterobacteriaceae isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 17(1), 22. doi:10.1186/s12941-018-0274-9.

## 8. Anhang

### 8.1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meiner Familie und Freunden danken für die stetige Unterstützung und Motivation für diese Dissertation. Besonders meinem Vater, Eliane, Alexandra und Philipp bin ich sehr dankbar, dass ihr nie daran zweifelt, dass ich die Herausforderungen erfolgreich meistere, die mir im Leben begegnen. Danke an meine Verwandten und Freunde, die mich immer wieder angespornt und inspiriert haben. Vielen Dank für PD Dr. Frank Sommer für die gute Betreuung und die vielen Anregungen. Auch möchte ich gerne den Mitarbeitern aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene danken für jegliche Hilfe. Meiner Mutter bin ich sehr dankbar, dass sie mich trotz der kurzen gemeinsamen Zeit so geprägt hat. Soli Deo Gloria.

## 8.2. Liste akademischer Lehrer

Meine Professoren und Dozenten in Marburg waren:

Adamkiewicz, Al Fakhri, Arenz, Arndt, Baranovski, Baranovski, Bartsch, Baum, Becker, Becker, Bepler, Berger, Best, Bette, Bertoune, Bien, Brehm, Brödje, Burchert, Carl, Cetin, Czubayko, Dannlowski, Decher, Del Rey, Dodel, Donner-Banzhoff, Efe, Eickmann, El-Zayat, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Feuser, Fölsch, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Galambos, Garn, Götze, Gress, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Haberhausen, Helwig-Rolig, Hertl, Herz, Heyse, Höffken, Hofmann, Hoyer, Hundt, Jerrentrup, Kann, Kappus, Kerwat, Kill, Kinscherf, Kircher, Knipper, König, Konrad, Koolman, Krones, Kruse, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisner, Möller, Moll, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oberthür, Oertel, Oliver, Opitz, Ossendorf, Pagenstecher, Pantazis, Peterlein, Plant, Plöger, Preisig-Müller, Quint, Reese, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Riße, Ritter, Ritz, Rivera Gil, Roelcke, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schönbauer, Schratt, Schüttler, Schütz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Shams-Eldin, Sherwood, Skwara, Sommer, Sprenger, Stahl, Steininger, Steinmetzer, Steitz-Naumann, Stibane, Stief, Stiewe, Strik, Strüwer, Subtil, Thieme, Thum, Thursar, Timmesfeld, Toussaint, Völlger, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Wahl, Weber, Weihe, Weisser, Werner, Westermann, Wilhelm, Wittig, Wulf, Wrocklage, Zavorotnyy.

### 8.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Untersuchungen zur Resistenzbestimmung  
von Bakterien mittels Massenspektrometrie**

im Institut für Mikrobiologie und Hygiene unter Leitung von Herrn Prof. Lohoff mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. Sommer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer