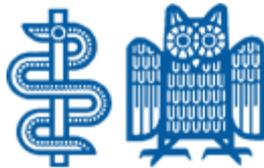


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Kommisarische Direktorin: Prof. Dr. med. B. Gärtner



# **MALDI-ToF basierte Frühdiagnostik Carbapenemase-positiver gramnegativer Bakterien**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2017**

vorgelegt von Kim Jens Bauer

geboren am 25 Juni 1990 in Speyer



# Inhaltsverzeichnis

## Inhalt

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Deutsche Fassung .....	1
1.2 Abstract.....	3
2 Einleitung .....	5
2.1 Resistenz.....	5
2.1.1 Definition und Einteilung.....	5
2.1.2 Outer-membrane-proteins (OMPs) .....	7
2.1.3 Veränderungen in den PBPs.....	7
2.1.4 Gesteigerter Efflux .....	7
2.1.5 $\beta$ -Laktamasen .....	10
2.1.6 Verbreitung Carbapenemase-positiver gramnegativer Erreger.....	14
2.1.7 Bedeutung Carbapenemase-positiver gramnegativer Bakterien .....	17
2.2 Carbapeneme .....	18
2.2.1 Aufbau und Einteilung .....	18
2.2.2 Pharmakokinetische Eigenschaften.....	19
2.2.3 Wirkmechanismus .....	20
2.2.4 Wirkspektrum und Einsatzgebiet .....	20

2.3	Diagnostik Carbapenemase-produzierender Erreger .....	21
2.3.1	Übersicht .....	21
2.3.2	MALDI-ToF .....	22
2.4	Zielsetzung .....	24
3	Material und Methoden .....	25
3.1	Ausgangspunkt .....	25
3.2	Vorversuche .....	25
3.3	Versuchsaufbau .....	26
3.4	Arbeitsprotokoll .....	28
3.4.1	Herstellung und Inkubation einer Antibiotika-Bakterien-Suspension .....	28
3.4.2	Messung .....	30
3.4.3	Auswertung .....	34
3.4.4	Software und statistische Analyse .....	36
3.5	Modifizierter Hodge-Test .....	37
3.6	MAST-CDS D70C .....	38
3.7	Targetreinigung .....	39
3.8	Aufbereitung der Matrix .....	39
3.9	Geräte, Reagenzien und Software .....	40
3.9.1	Target-Reinigung .....	40
3.9.2	Matrix-Aufbereitung .....	40
3.9.3	Kultur .....	40
3.9.4	Herstellung und Inkubation .....	40
3.9.5	Messung und Auswertung .....	41
3.9.6	Modifizierter Hodge-Test .....	42
3.9.7	MAST-CDS D70C-Set .....	42
3.10	Stammlisten .....	44

---

3.10.1	Referenzstämmе	44
3.10.2	Laboreigene Stämme	45
3.10.3	Initial verblindete Stämme	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Vorversuche	49
4.2	Messung der NRZ-Referenzstämmе	53
4.2.1	Ausgangsmessung	53
4.2.2	Replikationsmessungen	54
4.3	Referenztests	56
4.3.1	Testgütekriterien	56
4.3.2	Technische Einschränkungen	57
4.4	Laboreigene und initial verblindete NRZ-Stämme	57
4.5	Gesamtauswertung MALDI-ToF Messungen	60
4.5.1	Messzeitpunkt nach einer Stunde (1h)	60
4.5.2	Messzeitpunkt nach zwei Stunden (2h)	62
4.5.3	Messzeitpunkt nach vier Stunden (4h)	65
4.5.4	Messzeitpunkt 24 Stunden (24h)	68
4.5.5	Analyse falsch positiver und negativer Messergebnisse nach Erregergattung	70
4.5.6	Kinetik	72
4.5.7	Reproduzierbarkeit falsch-positiver Stämme	83
4.5.8	Nicht verwertbare Messergebnisse	85
4.5.9	ROC-Analyse und Cut-off Berechnung mittels Youden-Index	87
4.6	Reproduzierbarkeit der Messergebnisse	93
4.6.1	Testgütekriterien	93
4.6.2	Kinetik	96
5	Diskussion	99

6	Literaturverzeichnis.....	112
7	Anhang .....	125
8	Publikationen.....	128
9	Danksagung.....	129
10	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1 Resistenzmechanismen in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
Abb. 2-2 schematische Darstellungen verschiedener Effluxsysteme.....	9
Abb. 2-3 Hydrolytische Spaltung des $\beta$ -Laktamrings durch $\beta$ -Laktamasen .....	11
Abb. 2-4 Verbreitung Carbapenemase-positiver Enterobacteriaceae in Europa.....	15
Abb. 2-5 Verbreitung Carbapenemase-positiver <i>Acinetobacter baumannii</i> in Europa.....	16
Abb. 2-6 Carbapenemase-positiv e Enterobacteriaceae in Deutschland.....	17
Abb. 2-7 Grundstruktur verschiedener $\beta$ -Laktamantibiotika .....	19
Abb. 3-1 Versuchsaufbau .....	27
Abb. 3-2 Übersicht der Arbeitsschritte .....	28
Abb. 3-3 Anzahl getesteter Stämme nach Resistenzmechanismus .....	30
Abb. 3-4 Anzahl Proben nach genotypischem Resistenzmechanismus.....	31
Abb. 3-5 Anzahl getesteter Stämme nach Erregerfamilie.....	32
Abb. 3-6 Zuordnung der Carbapenemasen zur Erregerfamilie .....	33
Abb. 3-7 Massenspektren Cp-negativer und positiver Erreger nach 24h Inkubation .....	35
Abb. 3-8 modifizierter Hodge-Test in Schema- und Orginaldarstellung.....	37
Abb. 3-9 MAST-CDS bei VIM-1-positivem <i>Klebsiella oxytoca</i> (ID70).....	39
Abb. 4-1 Stabilität Ertapenem nach 1 und 24 Stunden Inkubation.....	50
Abb. 4-2 Vergleich Blutagar vs. Selektivnährmedium .....	51
Abb. 4-3 Cefotaximhydrolyse durch KPC-positiven <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	53
Abb. 4-4 MALDI-ToF Messung Cp-positiver NRZ-Stämme (n=30).....	54
Abb. 4-5 Vergleich Gesamtsensitivität nach dreifacher Testung.....	56
Abb. 4-6 Sensitivität Cp-positiver Proben der MALDI-ToF Messgruppen im Vergleich.....	59
Abb. 4-7 Differenzierung Cp-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 1h.....	61
Abb. 4-8 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 1h.. .....	62

---

Abb. 4-9 Differenzierung Cp-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 2h.....	64
Abb. 4-10 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 2h .....	65
Abb. 4-11 Differenzierung Cp-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 4h.....	67
Abb. 4-12 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 4h .....	68
Abb. 4-13 Differenzierung Cp-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 24h.....	69
Abb. 4-14 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 24h .....	70
Abb. 4-15 Sensitivität und Spezifität im Zeitverlauf .....	72
Abb. 4-16 Sensitivität verschiedener Carbapenemasen im Zeitverlauf .....	74
Abb. 4-17 Sensitivität nach Erregerfamilie.....	75
Abb. 4-18 Vergleich von VIM und OXA-Carbapenemase-positiver Erreger .....	76
Abb. 4-19 Kinetik verschiedener OXA-Subtypen .....	78
Abb. 4-20 Spezifität nach Erregerfamilie .....	79
Abb. 4-21 Ratiomittelwerte Carbapenemase-positiver Erreger .....	80
Abb. 4-22 Ratiomittelwerte Carbapenemase-negativer Erreger .....	82
Abb. 4-23 Reproduzierbarkeit falsch-positiver Ergebnisse .....	83
Abb. 4-24 Nicht verwertbare MALDI-ToF Messergebnisse .....	85
Abb. 4-25 Fehlmessungen nach Erregergruppe und Messzeitpunkt.....	86
Abb. 4-26 ROC-Kurven zum jeweiligen Messzeitpunkt für Cut-off Ratio R=1 (n=158) .....	88
Abb. 4-27 ROC-Kurven zum Zeitpunkt 2h und unter Ausschluss von OXA- sowie OXA-/GIM-Carbapenemasen.....	90
Abb. 4-28 Probenzusammensetzung Kontrollstämme (n=30) .....	93
Abb. 4-29 Sensitivität der Messreihen im Zeitverlauf .....	94
Abb. 4-30 Reproduzierbarkeit der Kinetik nach jeweiliger Carbapenemase.....	97
Abb. 5-1 Mögliches Vorgehen bei klinischem Verdacht auf Cp-positive Erreger .....	109
Abb. 5-2 Workflow zur MALDI-ToF basierten Diagnostik Cp-positiver Erreger .....	110

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Einteilung der $\beta$ -Laktamasen .....	12
Tab. 3-1 Stammliste Referenzstämme des NRZ .....	44
Tab. 3-2 Stammliste laboreigene Stämme.....	45
Tab. 3-3 Stammliste initial verblindete Stämme des NRZ.....	47
Tab. 4-1 Messergebnisse NRZ-Referenzstämme Ausgangsmessung und Replikate.....	55
Tab. 4-2 Anteil nicht verwertbarer Messungen verschiedener Testverfahren .....	57
Tab. 4-3 Anzahl Carbapenemasen nach Subtyp und Messgruppe .....	58
Tab. 4-4 Sensitivität nach Messgruppe und Messzeitpunkt .....	59
Tab. 4-5 Zusammensetzung der Messproben.....	60
Tab. 4-6 Auswertung Messzeitpunkt 1h .....	60
Tab. 4-7 Auswertung Messzeitpunkt 2h .....	63
Tab. 4-8 Auswertung Messzeitpunkt 4h .....	66
Tab. 4-9 Auswertung Messzeitpunkt 24h .....	68
Tab. 4-10 Prozentualer Anteil falsch-negativer/-positiver Messungen nach Erregerspektrum ....	71
Tab. 4-11 Übersicht Sensitivität und Spezifität nach Messzeitpunkt und Genotyp.....	73
Tab. 4-12 Sensitivität einzelner Carbapenemasen nach Messzeitpunkt .....	81
Tab. 4-13 Testergebnisse falsch-positiver genotypisch Cp-negativer NRZ-Stämme .....	84
Tab. 4-14 Prozentuale Verteilung nicht verwertbarer Messergebnisse.....	87
Tab. 4-15 AUC Werte nach Messzeitpunkt .....	89
Tab. 4-16 Vergleich zwischen Ratio R=1 und mittels Youden Index ermittelter Ratio .....	91
Tab. 4-17 AUC-Analyse und Berechnung optionaler Cut-off Ratios zur Differenzierung OXA-Cp-positiver (n=53) und Cp-negativer (n=46) Proben.....	92
Tab. 4-18 Sensitivität und Spezifität der Messreihen im Zeitverlauf .....	95

## Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
ABC	Adenosine triphosphate binding cassette
ACN	Acetonitril
AM	Ampicillin
AmpC	Ampicillin class C
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
CAZ	Ceftazidim
CDS	Carbapenem Detection Set
Cp	Carbapenemase
CRE	Carbapenemresistente <i>Enterobacteriaceae</i>
CTX	Cefotaxim
DNA	Desoxyribonucleic acid
DHP-1	Dehydropeptidase-1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	Extended spectrum $\beta$ -lactamase
ETP	Ertapenem
ETP <sub>+H</sub>	Reines ETP
ETP <sub>(hydr./decarb.+H)</sub>	ETP hydrolysiert und decarboxyliert
ETP <sub>(hydr./decarb.+Na)</sub>	Natriumsalz des hydrolysierten und decarboxylierten ETP
ETP <sub>+Na</sub>	Mononatriumsalz des ETP
ETP <sub>+2Na</sub>	Dinatriumsalz des ETP

GES	Guiana extended spectrum
GIM	German Imipenemase
h	Stunde
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
ID	Identifikationsnummer
IKZ	Inkubationszeit
IMI	Imipenem-hydrolyzing $\beta$ -lactamase
IMP	Active on Imipenem
IPM	Imipenem
KI	Konfidenzintervall
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MALDI-ToF	Matrix assisted laser desorption ionization - Time of flight
McF	McFarland
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MEM	Meropenem
MF	Major facilitator
MIC	Minimale inhibitorische Konzentration
ml	Milliliter
MS	Mass spectrometry
NRZ	Nationales Referenzzentrum für gramnegative Erreger
OMP	Outer membrane protein
OprD	Outer membrane protein D

OprM	Outer membrane protein M
OXA	Oxacillin-hydrolyzing
PBP	Penicillin-bindendes-Protein
PIP	Piperacillin
RND	Resistance-nodulation-cell division
RPM	Revolutions per minute
SIM	Seoul Imipenemase
SME	<i>Serratia marcescens</i> Enzym
SMR	Small multidrug resistance
SPM	Sao Paulo Metallo- $\beta$ -Lactamase
TFA	Trifluoro acetic acid
T>MIC	Zeitspanne in der die Konzentration eines Pharmakons über MIC liegt
VIM	Verona integron encoded Metallo $\beta$ -Lactamase
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\mu$ l	Mikroliter

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Fassung

Einleitung:

Die zunehmende Ausbreitung von multiresistenten Bakterien ist eine globale Herausforderung und bedarf zwingend schneller, sensitiver und einfach durchführbarer Diagnostik. MALDI-ToF basierte Diagnostik gramnegativer Carbapenemase-positiver Erreger ist eine Technologie, die in der Lage ist Carbapenemresistenzen frühzeitig zu identifizieren und wird bereits in einigen Laboratorien als Screeningmethode eingesetzt. Bisher mangelt es jedoch an standardisierten Arbeitsprotokollen, welche für einen großflächigen Einsatz dieses Testverfahrens in der Routinediagnostik notwendig sind.

Methodik:

In der vorliegenden Arbeit wurde ein standardisiertes auf „ready-to-use“ Reagenzien basierendes MALDI-ToF (Bruker Daltonics) Arbeitsprotokoll zur Einführung dieser Methode in die Routinediagnostik unter Verwendung von Ertapenem ausgearbeitet. Es erfolgte eine automatisierte bioinformatische Auswertung (Bionumerics 7.5) der Messergebnisse durch Berechnung einer Ratio anhand des Ertapenem-Reinspektrums und dem Spektrum seiner Abbauprodukte. Der Arbeitsablauf des eigens entwickelten Protokolls inklusive automatisierter bioinformatischer Auswertung wurde zunächst an 30 genotypisierten Proben des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Erreger (NRZ) in Triplikaten getestet. Die Ergebnisse wurde mit Triplikaten phänotypischer Tests (Hodge-Test; MAST-Carbapenemase-Detektionsset) verglichen. Nach Erhöhung des für die Messung verwendeten Probenmaterials pro Erreger fand eine Validierung an 64 laboreigenen, sowie weiteren 64 Stämmen des NRZ statt. Insgesamt wurden 158 verschiedene Erreger getestet, die sich aus 112 Carbapenemase-positiven (IMP-, KPC-, NDM-, VIM-, GIM-, OXA-Carbapenemasen), sowie 46 Carbapenemase-negativen Erregern zusammensetzten. In kinetischen Folgemessungen wurden optimale Messpunkte im Hinblick auf schnellstmögliche Identifizierung Carbapenemase-positiver Erreger bei höchstmöglicher diagnostischer Sicherheit identifiziert. Die „hands-on“-Zeit betrug für eine Probe etwa 20 Minuten, bei nur geringem Mehraufwand für die gleichzeitige Testung mehrerer Messproben.

## Ergebnisse

In der Vergleichsmessung mit gängigen phänotypischen Methoden in Triplikaten anhand 30 genotypisierter Stämme konnte mittels des entwickelten Verfahrens nach 24h eine Sensitivität von 91,75% erzielt werden. Die durchgeführten phänotypischen Methoden erzielten eine Sensitivität 84,71% (Hodge-Test) und 83,90% (MAST-Carbapenemase-Detektionsset). In der Gesamtanalyse aller 158 Messproben konnte bereits nach 2h Stunden für alle getesteten Carbapenemasen mit Ausnahme von OXA- und GIM-Carbapenemasen eine Sensitivität von 100% erzielt werden. Die Spezifität des Testverfahrens betrug nach 2h ebenfalls 100%. Nach 24 stündiger Inkubation lag die Sensitivität für alle Carbapenemasen einschließlich OXA- und GIM-Carbapenemasen bei 100%. Die Spezifität betrug 73,81%. Die automatisierte Auswertung mit Hilfe eines eigens entwickelten bioinformatischen Scripts (Bionumerics 7.5) erlaubte eine eindeutige Differenzierung zwischen Carbapenemase-positiven und Carbapenemase-negativen Messproben

## Schlussfolgerung

Das entwickelte Arbeitsprotokoll erlaubt mit Hilfe von ready-to-use Reagenzien, MALDI-ToF basierter Carbapenemase-Detektion und automatisierter bioinformatischer Auswertung der Massenspektren eine schnelle, reproduzierbare Carbapenemase-Identifikation mit hoher Sensitivität und Spezifität, bei gleichzeitig hohem Standardisierungsgrad und niedriger hands-on-Zeit. Das entwickelte Arbeitsprotokoll eignet sich zum Carbapenemase-Screening bei unbekanntem Erregern, da im Gegensatz zu genotypischen Methoden (PCR) alle bekannten Carbapenemasen erfasst werden.

## 1.2 Abstract

### Objektives

Spreading of multiresistant bacteria has become an increasing problem worldwide and requires fast, sensitive and reproducible detection assays. MALDI-ToF can be applied as a promising method for detection of carbapenemase-positive strains in specialized laboratories. However, standardized ready-to-use protocols are required for widespread diagnostic application.

### Methods:

In the present study we optimized a standardized workflow for routine diagnostics using ready-to-use reagents and subsequent detection of ertapenem digestion profiles using MALDI-ToF (Bruker Daltonics) followed by automated analysis of mass-spectra (digested vs. undigested antibiotic peaks) with automated reading of ertapenem digestion profiles (Bionumerics 7.5). At first 30 genotyped strains of the National Reference Laboratory for multidrug-resistant gramnegative bacteria (NRZ) were tested and compared to standard phenotypic methods (Hodge-Test; MAST-Carbapenemase-Detection-Kit). The diagnostic assay was performed in triplicates. For validation of the MALDI-ToF based workflow and automated evaluation additional 64 strains of our laboratory and further 64 strains from the NRZ were tested. Overall 158 gramnegative genotyped bacteria including 112 carbapenem-resistant strains with different genotypic resistance profiles (IMP-, KPC-, NDM-, VIM-, GIM-, OXA-Types) and 46 carbapenem-sensitive strains passed through the new MALDI-ToF assay. Time kinetics was applied to achieve best time points for future routine testing.

### Results

The hands-on time per tested strain was about 20min, with just minor additional effort for testing several strains at the same time. Comparing the new standardized MALDI-ToF assay with established phenotypic methods using 30 genotyped strains from the NRZ which were tested three times each a sensitivity of 91,75% was achieved by MALDI-ToF after 24 hours whereas Hodge-Test achieved 84,71% and MAST Carbapenemase-Detection-Kit achieved 83,90%.

Analyzing the results of all 158 tested strains after two hours of incubation a sensitivity and specificity of 100% for the majority carbapenemases was achieved while delayed carbapenemase activity was observed for OXA- and GIM-type isolates. After 24 hours of incubation the sensitivity for all carbapenemases including OXA- and GIM-type was 100%. The specificity after 24 hours was 73,81%. Automated evaluation by a custom bioinformatical script (Bionumerics 7.5) allowed unbiased discrimination between carbapenemase-positive and negative strains.

#### Conclusion:

The new established carbapenemase assay using ertapenem ready-to-use reagents, MALDI-ToF analysis of carbapenemase activity and automated evaluation of digestion profiles allows reproducible, fast, sensitive and specific detection of carbapenemase positive isolates, with a high grade of standardization and a limited hands-on-time. The workflow is suitable for universal carbapenemase-screening while genotypic methods (PCR) are focused on specific carbapenemase genotypes.

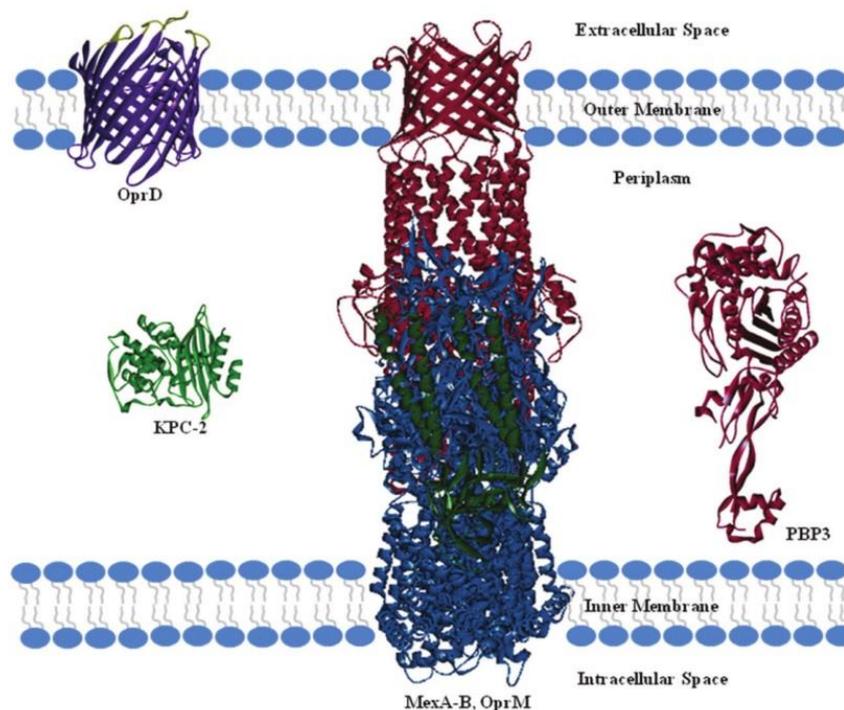
## 2 Einleitung

### 2.1 Resistenz

#### 2.1.1 Definition und Einteilung

Unter Resistenz versteht man die Lebens- oder Vermehrungsfähigkeit eines Organismus unter Bedingungen, welche für andere Vertreter seiner Art tödlich sind (Cloete, 2003). Betrachtet man Resistenzmechanismen, die Bakterien vor Antibiotika schützen, unterscheidet man prinzipiell zwischen intrinsischer und extrinsischer Resistenz. Ein intrinsischer Resistenzmechanismus bezeichnet hierbei die einer Bakterienart aufgrund struktureller oder funktioneller Eigenschaften innenwohnende „natürliche“ und damit dauerhafte Resistenz einer Spezies (Blair et al., 2011). Intrinsische Resistenz zeigt sich unter anderem im Vorliegen eines Biofilms, welcher die Diffusion des Antibiotikums erschwert (Korber et al., 1997) oder im unterschiedlichen Aufbau der Zellwand gramnegativer gegenüber grampositiver Bakterien. So ist die Zellwand gramnegativer Erreger weniger negativ geladen als die Zellwand grampositiver Bakterien. Hierdurch können bestimmte Antibiotika, wie beispielsweise das zyklische Lipopeptid Daptomycin deutlich schwerer durch die zytoplasmatische Membran in das Bakterium eindringen (Randall et al., 2013). Als extrinsische Resistenz werden diejenigen Mechanismen bezeichnet, welche ein Bakterium durch Veränderung des Genoms erwirbt oder entwickelt. Genmutationen, die Auswirkung auf Struktur oder Funktion von Antibiotikaangriffspunkten haben, sowie verstärkte Enzyminduktion zur hydrolytischen Spaltung von Antibiotika oder gesteigerte Effluxmechanismen sind Beispiele hierfür (Blair et al., 2011). Bei extrinsischer Resistenz handelt es sich häufig um Anpassungsreaktionen eines Erregers auf geänderte Umweltbedingungen. So führt oftmals die Exposition gegenüber einem Antibiotikum zur vermehrten Induktion von Effluxpumpen oder hydrolytischer Enzyme im Bakterium. Daneben kann die notwendige Information zum Erwerb von Resistenzen auch von außen in das Bakterium gelangen. Überträgt ein Bakterium Resistenzgene auf ein anderes wird dies als horizontaler Transfer bezeichnet. Solch ein Transfer kann unter anderem durch den Austausch von Plasmiden, die Aufnahme freier DNA toter Bakterien oder über Bakteriophagen stattfinden (Giedraitienė et al., 2011). In Bezug auf Carbapeneme spielen vor allem vier Mechanismen eine Rolle: Eine verminderte Permeabilität der Antibiotika in den periplasmatischen Raum durch veränderte OMPs (Outer membrane proteins), gesteigerter Efflux, Veränderung in den PBPs (Penicillin-bindende-Proteine) und die Expression von  $\beta$ -Laktamasen, die dann als Carbapenemasen bezeichnet werden (Babic et al., 2006; Blair, et al., 2011). Die verschiedenen

Mechanismen unterscheiden sich bezüglich ihrer Prävalenz in grampositiven und gramnegativen Bakterien. Grampositive Erreger verfügen hauptsächlich über PBPs assoziierte Resistenzmechanismen. Gramnegative Stämme erreichen vor allem über die Bildung von  $\beta$ -Laktamasen Antibiotikaresistenz. Daneben treten veränderte PBPs, verstärkte Effluxmechanismen und modifizierte OMPs in gramnegativen Keimen auf. Auch das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Resistenzmechanismen ist möglich. Dies führt häufig zu einer äußerst komplizierten, nur schwer medikamentös zu durchbrechenden Resistenzsituation (K. M. Papp-Wallace et al., 2011). Abbildung 2-1 zeigt die Lokalisation dieser Resistenzmechanismen innerhalb der Zellwand gramnegativer Erreger am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa*. Als OMP verbindet dessen OprD-Porin extrazellulären und periplasmatischen Raum. Im periplasmatischen Raum lokalisiert sind  $\beta$ -Laktamasen, wie die KPC-2 Carbapenemase. Von der inneren Membran aus reichen die PBPs in den periplasmatischen Raum (PBP3). Effluxpumpen, wie das MexAB-OprM-System durchspannen die gesamte Zellwand.



**Abb. 2-1 Resistenzmechanismen in *Pseudomonas aeruginosa* (K. M. Papp-Wallace et al., 2011).** Dargestellt ist der periplasmatische Raum mit Lokalisation verschiedener Resistenzmechanismen zwischen äußerer und innerer Zellmembran. *OprD*: Outer membrane protein D; *KPC-2*: Klebsiella pneumoniae Carbapenemase 2; *MexA-B*: multidrug resistance protein MexA-B; *OprM*: Outer membrane Protein M; *PBP*: Penicillin binding Protein.

### 2.1.2 Outer-membrane-proteins (OMPs)

Bevor Carbapeneme den zytoplasmatischen Raum gramnegativer Bakterien erreichen müssen sie zunächst deren äußere Membran überwinden. Dies geschieht mithilfe von Porinen, sogenannten Outer-membrane-proteins (OMPs). Hierbei handelt sich um meist nicht-selektive wassergefüllte Kanäle, welche in der äußeren Hülle gramnegativer Bakterien vorkommen (Nikaido, 1989). Sie sind unter anderem am Nährstoff- und Proteintransport, sowie an der Signaltransduktion der Bakterienzelle beteiligt (Koebnik et al., 2000). Durch verminderte Expression dieser Porine, oder den Ersatz durch selektivere Kanäle können Antibiotikaresistenzen entstehen (Blair et al., 2011). So führt bei *Pseudomonas aeruginosa* der Verlust des OprD-Porins zu Imipenemresistenz (Lambert, 2002). *Klebsiella pneumoniae* hingegen erzielt unter anderem über veränderte Porinstrukturen Resistenz gegenüber dem Gruppe 2 Carbapenem Ertapenem (Jacoby et al., 2004). Treten Veränderungen in OMPs in Kombination mit Breitspektrum  $\beta$ -Laktamasen wie ESBL und AmpC auf, stellen sie neben Carbapenemasen einen der wichtigsten Mechanismen zur Entwicklung von Carbapenemresistenz dar (Rossolini et al., 2014).

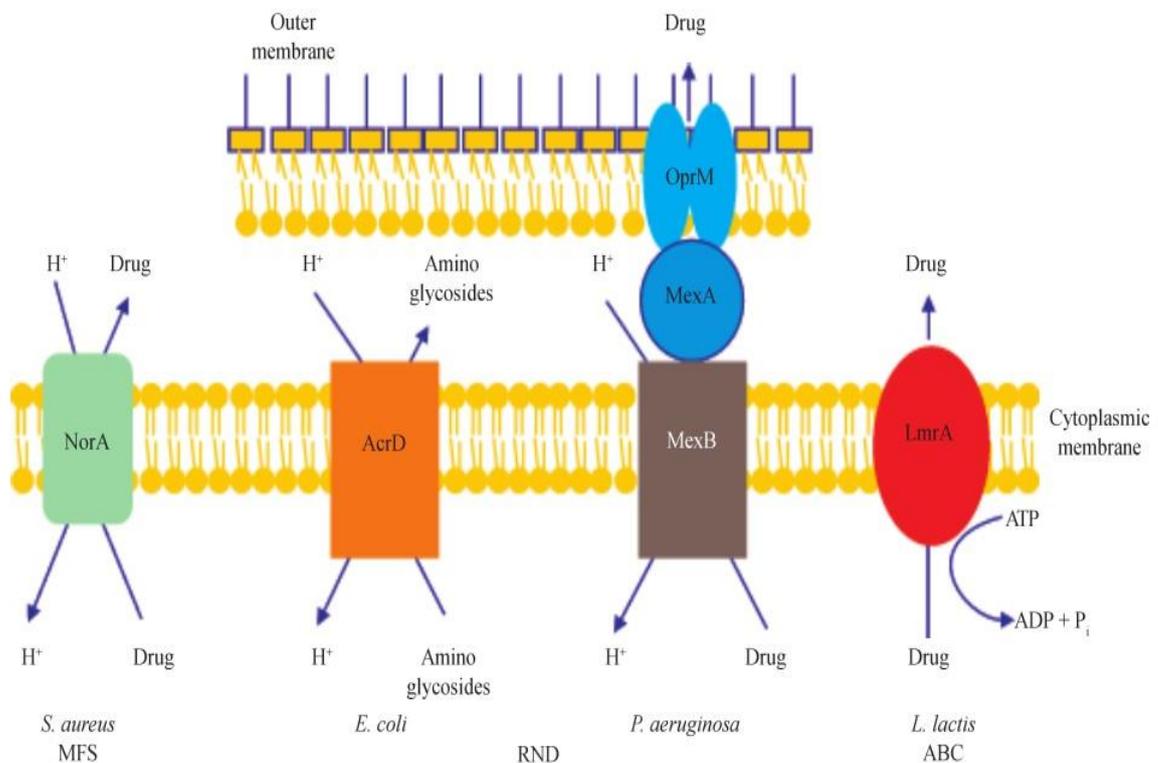
### 2.1.3 Veränderungen in den PBPs

Zielstruktur von  $\beta$ -Laktamantibiotika wie Carbapenemen sind Penicillin-bindende-Proteine, welche am Peptidoglykan-Stoffwechsel der Bakterienwand beteiligt sind. Mechanismen die über veränderte PBPs zu Carbapenemresistenz führen sind die Expression zusätzlicher PBPs mit geringer Antibiotikaaffinität, der exogene Erwerb niedrigaffiner PBPs, oder strukturelle Veränderungen vorhandener PBPs durch homologe Rekombination oder Punktmutationen (Zapun et al., 2008). Auch eine generell verminderte Expression von PBPs kann zur Resistenzentstehung beitragen (Krisztina M. Papp-Wallace et al., 2011).

### 2.1.4 Gesteigerter Efflux

Effluxpumpen sind aktive Transportmechanismen, die in zahlreichen Organismen vorkommen. In allen Bakteriengenomen können für Effluxpumpen kodierende Abschnitte nachgewiesen werden (Webber & Piddock, 2003). Des Weiteren verfügen aber auch Eukaryoten, einschließlich des Menschen über Effluxsysteme (Bambeke et al., 2000). Als fester Bestandteil des Genoms liegt ihre Funktion ursprünglich nicht in der Ausbildung von Antibiotikaresistenzen, sondern vielmehr werden eine Beteiligung am Nährstofftransport, sowie Entgiftung von Toxinen und Metaboliten diskutiert (Kumar & Schweizer, 2005). Durch Transport von Botenstoffen wird

ihnen auch eine Rolle bei interzellulären Kommunikationsvorgängen zugesprochen (Rahmati et al., 2002). Da sie integraler Bestandteil des Genoms sind, zählen Efflux vermittelte Resistenzen meist zu den intrinsischen Resistenzmechanismen. Daneben kann aber die notwendige Erbinformation mobil in Form von Plasmiden vorliegen und so zwischen verschiedenen Bakterien ausgetauscht werden (Butaye et al., 2003). Betrachtet man die Effluxsysteme in Bakterien werden fünf Gruppen unterschieden: MF- (major facilitator), SMR- (small multidrug resistance), ABC- (adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette), RND- (resistance-nodulation-cell division) und die MATE- (multidrug and toxic compound extrusion) Familie. Eine weitere Einteilung unterscheidet, ob das Effluxsystem aus einem oder mehreren Bestandteilen zusammengesetzt ist (Kumar & Schweizer, 2005). Abbildung 2-2 zeigt den schematischen Aufbau und Transportmechanismus verschiedener Effluxsysteme. Bei NorA handelt sich um einen Transporter der MF-Superfamilie (MF), wie er in *Staphylokokkus aureus* vorkommt. AcrD (*Escherichia coli*) und MexAB-OprM (*Pseudomonas aeruginosa*) gehören zur RND-Superfamilie. Der LmrA-Transporter (*Lactococcus lactis*) gehört zur ABC-Familie, welche als einzige Gruppe über ATP-Hydrolyse angetrieben wird.



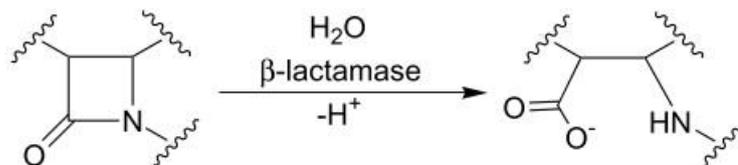
**Abb. 2-2 schematische Darstellungen verschiedener Effluxsysteme (Schweizer, 2003).** Verschiedene Effluxsysteme NorA, AcrD, MexA-B-OprD, LmrA und zugehörige Proteinfamilie. *MFS*: major facilitator superfamily; *RND*: resistance nodulation deviation; *ABC*: ATP-binding cassette.

Die für den aktiven Transportmechanismus der Pumpen benötigte Energie wird meistens durch eine Protonenpumpe bereitgestellt. Eine Ausnahme bildet hier die ABC-Superfamilie welche über ATP-Hydrolyse angetrieben wird (Paulsen et al., 1996). Generell treten Vertreter aller Effluxgruppen in gramnegativen Erreger auf, jedoch ist die RND-Superfamilie mit Abstand die häufigste Gruppe (Kumar & Schweizer, 2005). Hierbei handelt es sich um ein Effluxsystem, welches sich aus drei Bestandteilen zusammensetzt. Abbildung 2-2 zeigt unter anderem den charakteristischen Aufbau einer solchen RND-Effluxpumpe anhand des MexAB-OprM-Systems, welches in *Pseudomonas aeruginosa* vorkommt. Sie besteht aus einem Kanal, der sich durch die äußere Membran gramnegativer Erreger spannt (OprM), einem periplasmatischen Fusionsprotein, das innere und äußere Membran verbindet (MexA) und der eigentlichen Pumpe, einem

Protonen-Substrat-Antiporter (MexB) (Schweizer, 2003) (s. Abb. 2-2). Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen kann eine vermehrte Expression der Effluxpumpen beispielsweise durch gestörte Nährstofftransporte sich auch nachteilig auf ein Bakterium auswirken (Sanchez et al., 2001). Folglich unterliegt die Induktion von Effluxsystemen einer strengen Regulation. Durch lokale, den codierenden Genabschnitten vorgeschaltete Repressorgene bzw. Aktivatorgene wird ihre Expression gesteuert. Mutationen in diesen Genabschnitten führen zu veränderter Expression der Effluxsysteme (Adewoye et al., 2002; H. Wang et al., 2001). Auch globale Mechanismen, welche sich auf entfernten Genabschnitten befinden können (Kumar & Schweizer, 2005), sind an diesen Regulationsmechanismen beteiligt. Häufig liegt einer gesteigerten Induktion der Effluxmechanismen eine Anpassungsreaktion des Bakteriums an ungünstige Umweltbedingungen zu Grunde. Auf diese Weise kann ein Bakterium auch auf die Gegenwart eines Antibiotikums reagieren, indem es den Efflux des Pharmakons steigert (Masuda et al., 2000). Unter Laborbedingungen kann auch durch Selektivnährböden, osmotischen Druck und andere Stressoren Effluxsystemexpression induziert werden. Dies ist von Bedeutung, da so Bedingungen simuliert werden können, wie sie im Rahmen einer Infektion im menschlichen Körper vorliegen. Die Wirkung eines Antibiotikums am Infektionsort kann somit durch diese Rahmenbedingungen bereits abgeschwächt sein (Webber & Piddock, 2003). Ein weiteres Problem entsteht durch die fehlende Selektivität der Effluxmechanismen. Die gesteigerte Expression einer Effluxpumpe unter Einfluss eines Antibiotikums, führt häufig zu Resistenz gegenüber mehreren Antibiotikaklassen (Maseda et al., 2000). Auch andere Faktoren, wie Nährstoffmangel oder Gegenwart eines Toxin, welche auf den gleichen Transportmechanismus wie entsprechende Antibiotika angewiesen sind, führen über Effluxinduktion zu Resistenz. Über diesen Mechanismus kann es nicht nur zur Kreuzresistenz zwischen verschiedenen Antibiotika, sondern auch zwischen Antibiotika und Antiseptika wie beispielsweise Triclosan kommen (Chuanchuen et al., 2001).

### **2.1.5 $\beta$ -Laktamasen**

Bei  $\beta$ -Laktamasen handelt es sich um hydrolytische Enzyme, welche im periplasmatischen Raum lokalisiert sind. Sie sind in der Lage,  $\beta$ -Laktamantibiotika durch Spaltung der C-N-Bindung am  $\beta$ -Laktamring zu inaktivieren (s. Abb. 2-3) (Z. Wang et al., 1999).



**Abb. 2-3 Hydrolytische Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings durch  $\beta$ -Laktamasen (Z. Wang et al., 1999).** Schematische Darstellung des  $\beta$ -Laktamringes. Die Spaltung des Ringgerüsts führt zur Inaktivierung des  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums.

Eine gängige Einteilung der  $\beta$ -Laktamasen unterscheidet in Gruppe A, B, C und D anhand der Molekülstruktur (Ambler, 1980). In den Gruppen A, C und D ist ein Serin-Atom im aktiven Zentrum an der Hydrolyse beteiligt. Mitglieder der Gruppe B benötigen als Metallo- $\beta$ -Laktamasen  $Zn^{2+}$  als Kofaktor. Eine weitere funktionelle Einteilung in Gruppen 1 bis 4 nach Bush berücksichtigt hydrolytische Aktivität und Inhibitoren (Bush & Jacoby, 2010). Tabelle 2-1 liefert eine Übersicht über beide Klassifikationssysteme. Carbapenemasen sind durch die Fähigkeit gekennzeichnet, Carbapeneme und Breitbandcephalosporine zu hydrolysieren. Alle Gruppe B  $\beta$ -Laktamasen sind in der Lage Carbapeneme zu hydrolysieren (Krisztina M Papp-Wallace et al., 2011). Daneben finden sich vor allem in den Gruppen A und D zahlreiche Carbapenemasen (Blair et al., 2011). In der Klassifikation nach Bush finden sich Carbapenemasen vor allem in den Gruppen 2f und 3 wieder (s. Tab. 2-1).

**Tab. 2-1 Einteilung der  $\beta$ -Laktamasen (Bush & Jacoby, 2010).** Übersicht über verschiedene Klassifikationssysteme der  $\beta$ -Laktamasen, ihrer Substrate, Inhibitoren und spezifischen Eigenschaften.

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB <sup>a</sup>	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI <sup>b</sup>	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- $\beta$ -lactams	GCI, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- $\beta$ -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- $\beta$ -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiofime	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- $\beta$ -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- $\beta$ -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

<sup>a</sup> CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

<sup>b</sup> NI, not included.

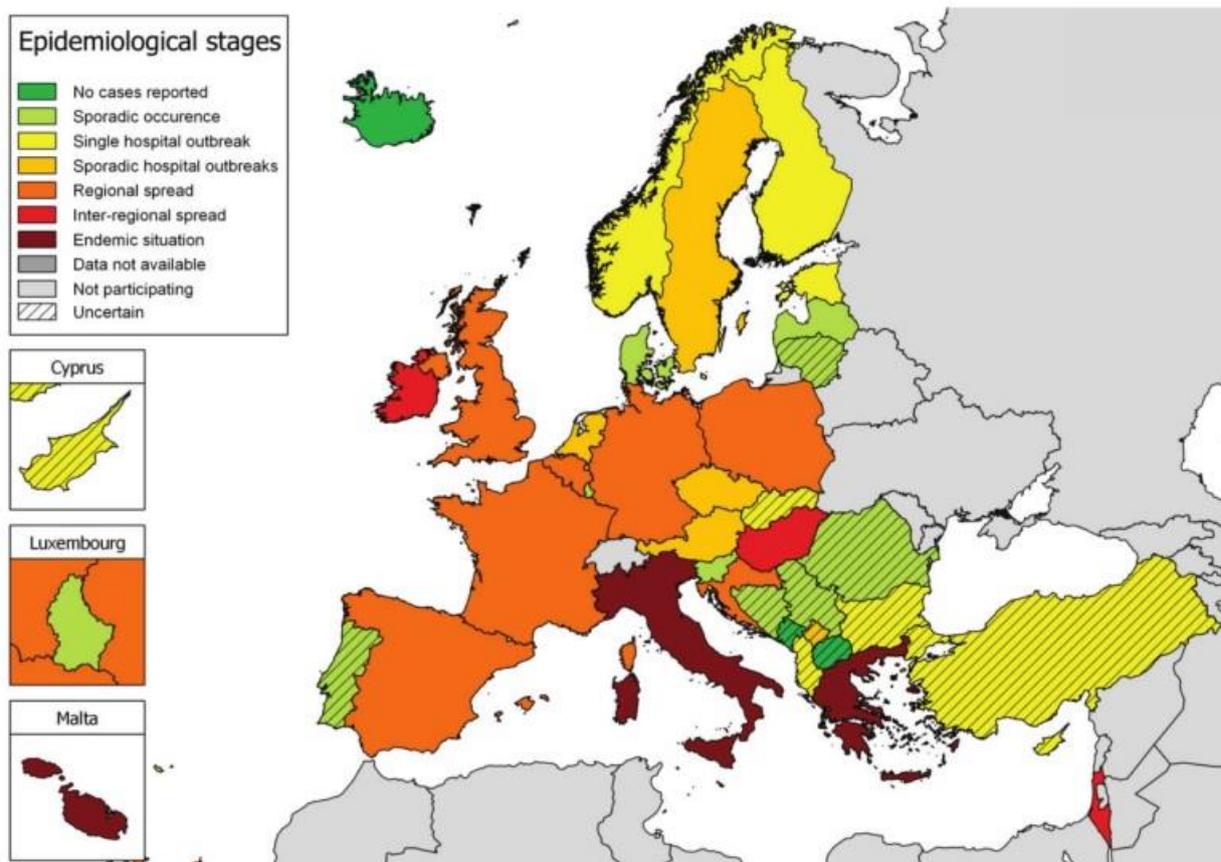
Carbapenemasen der Gruppe A sind NMC (not metalloenzyme carbapenemase), IMI (imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), GES (Guiana extended spectrum) und KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (Queenan & Bush, 2007). Sie werden funktionell in Gruppe 2f zusammengefasst, da sie ein ähnliches Substratspektrum besitzen und sich durch die  $\beta$ -Laktamaseinhibitoren Clavulansäure und Tazobactam hemmen lassen. Für Tazobactam weisen sie hierbei eine größere Sensibilität auf (Bush & Jacoby, 2010).

Sie sind mit der Ausnahme von KPC und GES vorwiegend chromosomal codiert. Die genetische Information für KPC und GES ist vorwiegend auf Plasmiden lokalisiert (Perez & Van Duin, 2013; Queenan & Bush, 2007). Dies ermöglicht einen Transfer zwischen Bakterien und damit eine schnelle Verbreitung. Klasse B Carbapenemasen werden funktionell in Gruppe 3 der Bush-Klassifikation zusammengefasst. Sie sind als Metallo- $\beta$ -Laktamasen nicht in der Lage Monobactame wie Aztreonam zu hydrolysieren. Eine Inhibition durch Tazobactam und Clavulansäure ist bei ihnen nicht möglich (Queenan & Bush, 2007). Metallo- $\beta$ -Laktamasen mit ihrem  $Zn^{2+}$ -Atom im aktiven Zentrum lassen sich in vitro durch Chelatoren wie EDTA inhibieren. Am weitesten verbreitet sind VIM- (Verona integron encoded metallo  $\beta$ -lactamase), IMP- (active on imipenem), GIM- (German imipenemase) und SIM- (Seoul imipenemase) Metallo- $\beta$ -Laktamasen (Queenan & Bush, 2007). Vertreter der Untergruppe 3a, wie VIM und IMP liegen überwiegend plasmidcodiert vor und sind somit zur potentiell schnellen Ausbreitung fähig (Bush & Jacoby, 2010). Ambler Klasse C enthält Cephalosporinasen, welche grundsätzlich nicht in der Lage sind Carbapeneme zu hydrolysieren. Allerdings konnten in *Acinetobacter baumannii* bereits AmpC (Ampicillin class C)- $\beta$ -Laktamasen mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Imipenem und Meropenem (Rodríguez-Martínez et al., 2010) und in *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Imipenem (Rodríguez-Martínez et al., 2009) nachgewiesen werden. In Klasse D werden  $\beta$ -Laktamasen zusammengefasst, welche Oxacillin bzw. Cloxacillin schneller hydrolysieren als andere klassische Penicilline (Walther-Rasmussen, 2006). Sie werden daher als OXA (Oxacillin-hydrolyzing)- $\beta$ -Laktamasen bezeichnet. Sie sind überwiegend auf Plasmiden lokalisiert und weisen nur eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Clavulansäure, Tazobactam und Chelatoren wie EDTA auf (Queenan & Bush, 2007). In der funktionellen Bush-Klassifikation gehören sie damit zur Gruppe 2d und deren Untergruppen. Subgruppe 2df enthält hierbei OXA-Carbapenemasen. Carbapenemasen der OXA- $\beta$ -Laktamasenfamilie lassen sich vorwiegend in *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa* nachweisen. Im Gegensatz zu OXA- $\beta$ -Laktamasen sind OXA-Carbapenemasen meist chromosomal codiert. Häufig ist die Fähigkeit zur Spaltung von Carbapenemen nur schwach ausgeprägt und erreicht erst durch das gleichzeitige Vorliegen anderer Resistenzmechanismen Effektivität (Walther-Rasmussen, 2006).

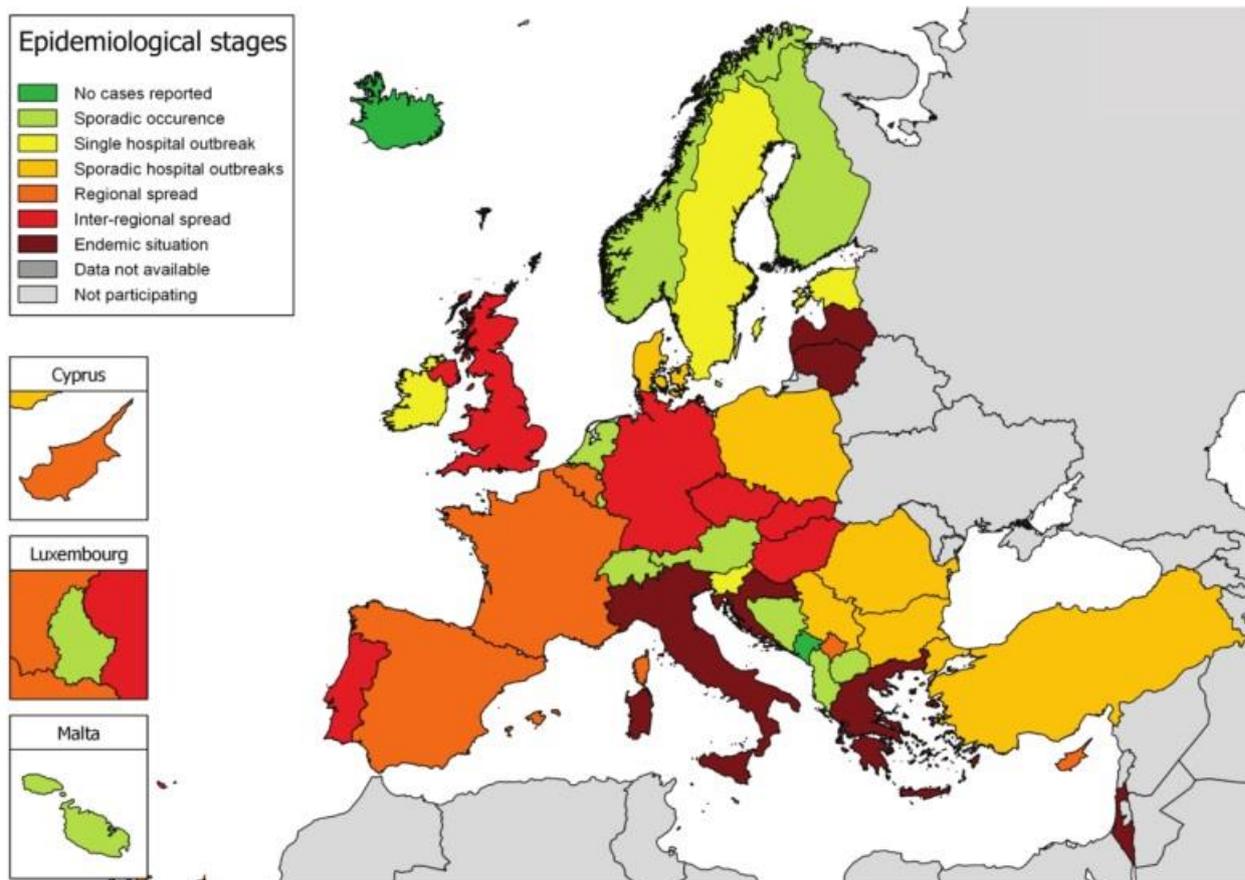
### 2.1.6 Verbreitung Carbapenemase-positiver gramnegativer Erreger

Carbapenemresistente *Enterobacteriaceae* (CRE), *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* sind die wichtigsten Erreger, die zur globalen Ausbreitung von Carbapenemasen beitragen. *Klebsiella pneumoniae* kommt hierbei unter den CRE die größte Bedeutung zu. Die am weitesten verbreiteten Carbapenemasen sind KPC (Ambler Klasse A), die Metallo- $\beta$ -Laktamasen IMP, NDM, VIM (alle Ambler Klasse B) und OXA (Ambler Klasse D). Die schnelle globale Ausbreitung dieser Carbapenemasen wird durch mehrere Faktoren begünstigt: Häufig liegen diese Carbapenemasen plasmidcodiert vor und können so über horizontalen Transfer zwischen Bakterien ausgetauscht werden. Außerdem zählen Enterobakterien zu den häufigsten humanpathogenen Erregern im stationären und ambulanten Bereich. Eine Übertragung ist nicht nur fäkal-oral zwischen erkrankten Personen möglich, sondern auch über kontaminierte Nahrung und Flüssigkeiten (Patrice Nordmann, Dortet, et al., 2012). Erste Carbapenemase-positiv *Enterobacteriaceae* wurden 1982 (London) (Yang et al., 1990) und 1984 (USA) (Rasmussen et al., 1996) nachgewiesen. KPC konnte zum ersten Mal in Amerika nachgewiesen werden, mittlerweile sind KPC-Resistenzen weltweit in Ländern wie Israel, China, Kolumbien, Puerto Rico, Südafrika und zahlreichen europäischen Ländern verbreitet. Bei den Erregern handelt es sich meistens um *Klebsiella pneumoniae* gefolgt von *Escherichia coli* (Patrice Nordmann et al., 2011). Auch die Metallo- $\beta$ -Laktamasen VIM und IMP sind global verbreitet, treten aber vorrangig in Japan, Taiwan und Griechenland auf. Besondere Aufmerksamkeit erfährt derzeit die Metallo- $\beta$ -Laktamase NDM. Sie wurde das erste Mal 2008 in Schweden bei einem indischen Patienten nachgewiesen, der zuvor aufgrund einer Harnwegsinfektion mit *Klebsiella pneumoniae* stationär in Neu-Delhi behandelt wurde (Yong et al., 2009). NDM-Carbapenemasen sind mittlerweile ebenfalls global verbreitet, jedoch besteht in der Mehrzahl der Fälle ein Zusammenhang des Auftretens mit einem Aufenthalt auf dem indischen Subkontinent. Dort konnte neben nosokomialen Infektionen auch eine Kolonisation des Wassers mit zahlreichen NDM-tragenden Stämmen nachgewiesen werden. Neben dem indischen Subkontinent konnten unabhängige Erregerreservoirs im Balkan (Kosovo) (Gecaj-Gashi et al., 2011) und mittleren Osten (Oman) (L. Poirel et al., 2011) nachgewiesen werden. Infektionen mit OXA-Carbapenemasen bildenden Stämmen konnten zuerst in der Türkei nachgewiesen werden. Mittlerweile traten Fälle in Europa, mittleren Osten und Afrika auf (Livermore, 2012). Da OXA-Carbapenemasen aufgrund ihrer schwachen hydrolytischen Aktivität nur schwer zu diagnostizieren sind, besteht jedoch die Gefahr, dass ihre Verbreitung unterschätzt wird (Patrice Nordmann et al., 2011). Vergleicht man die Resistenzsituation in Europa fällt auf, dass

*Acinetobacter baumannii*, welcher hauptsächlich über OXA-Carbapenemasen verfügt der am weitesten verbreitete Carbapenemaseträger noch vor carbapenemresistenten *Enterobacteriaceae* ist. Unter den CRE ist eine KPC-vermittelte Resistenz in Europa am weitesten verbreitet, jedoch ist auch hier eine deutliche Zunahme an OXA-Carbapenemasen (OXA-48) festzustellen (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013). Die Abbildungen 2-4 und 2-5 geben eine Übersicht über die Verbreitung carbapenemresistenter *Enterobacteriaceae* (s. Abb. 2-4) und *Acinetobacter baumannii* (s. Abb. 2-5) in Europa im Jahre 2013.

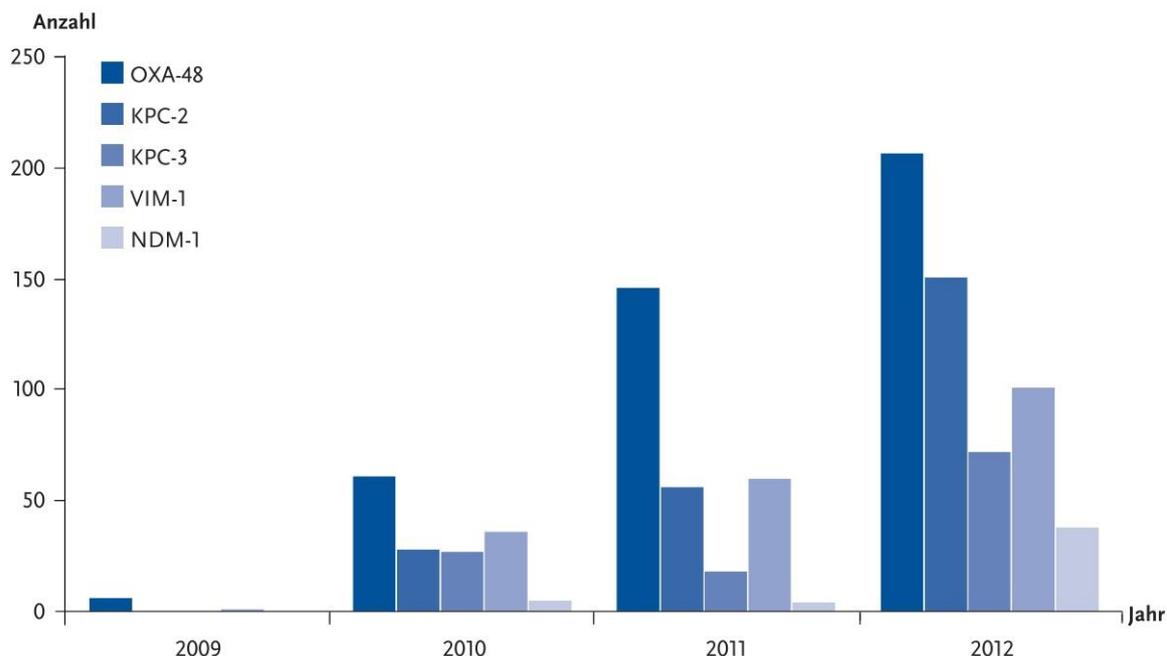


**Abb. 2-4 Verbreitung Carbapenemase-positiver Enterobacteriaceae in Europa (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).** Carbapenemase-positive Stämme treten im gesamten europäischen Raum auf. Besonders betroffen sind die Mittelmeerregion und zentraleuropäische Staaten.



**Abb. 2-5 Verbreitung Carbapenemase-positiver *Acinetobacter baumannii* in Europa (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).** Carbapenemase-positive *Ac. baumannii* Stämme sind innerhalb Europa weit verbreitet. In Deutschland ist *Ac. baumannii* der häufigste Carbapenemase-positive Erreger.

Eine Studie des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für gramnegative Erreger zur Resistenzlage in Deutschland kommt zu dem Schluss, dass Deutschland im europäischen Vergleich mit einer größeren Vielfalt an unterschiedlichen Carbapenemasen konfrontiert wird. Die häufigsten in Deutschland auftreten Carbapenemasen sind OXA (OXA48, OXA23) gefolgt von VIM (VIM1, VIM2) und KPC (KPC2, KPC3). Zudem lässt sich seit 2009 eine stetige Zunahme Carbapenemase bildender Erreger in Deutschland nachweisen (Neuhauser, 2013). Abbildung 2-6 spiegelt diese Entwicklung anhand der an das NRZ gesendeten Carbapenemase-Nachweise in *Enterobacteriaceae* im zeitlichen Verlauf wieder.



**Abb. 2-6 Carbapenemase-positive Enterobacteriaceae in Deutschland (Neuhauser, 2013).** Es ist eine deutliche Zunahme aller Carbapenemase-Typen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2009-2012 zu beobachten. Die in Deutschland häufigsten Carbapenemasen sind OXA-48 gefolgt von KPC-2 und Vim-1.

### 2.1.7 Bedeutung Carbapenemase-positiver gramnegativer Bakterien

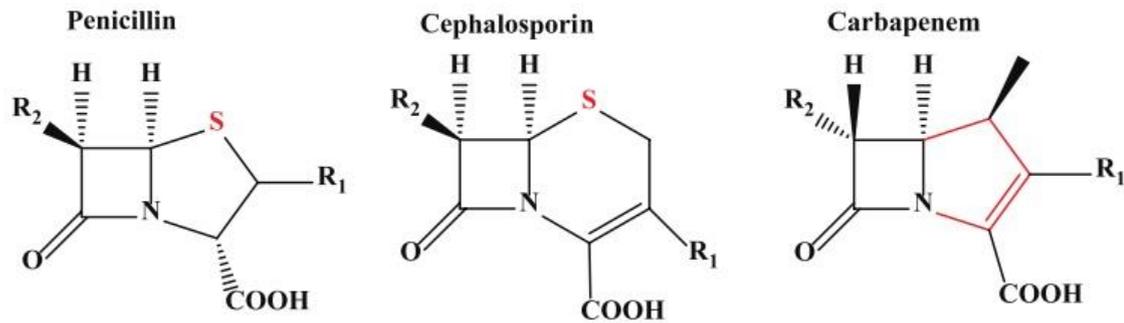
Jährlich werden im sogenannten „Global Risks Report“ des Weltwirtschaftsforums die wichtigsten ökonomischen, ökologischen, sozialen, technologischen und geopolitischen Risiken, welche unsere Erde bedrohen benannt. 2013 setzte sich dieser Bericht ausführlich mit der Ausbreitung multiresistenter Keime auseinander. Eine fortschreitende Ausbreitung antibiotikaresistenter Bakterien wurde als größte Bedrohung der Medizin und unserem Gesundheitsverständnis, wie wir es heute kennen hervorgehoben (World Economic Forum (WEF), 2013). Auch die WHO warnt vor einer postantibiotischen Ära, welche den gesamten medizinischen Fortschritt der Gegenwart gefährdet (WHO, 2014). An ihren globalen Auswirkungen gemessen, rangiert die Ausbreitung von Infektionskrankheiten aktuell auf Rang zwei der zehn wichtigsten globalen Risiken (World Economic Forum (WEF), 2015). In dieser fatalen Entwicklung nehmen gramnegative Erreger eine besondere Rolle ein. Sie zählen zu den häufigsten Erregern ambulanter und nosokomialer Infektionen (Patrice Nordmann, Dortet, et al., 2012; Talbot, 2008). Zu ihren wichtigsten assoziierten Krankheitsbildern gehören Sepsis,

beatmungsassoziierte Pneumonien, sowie intraabdominelle- und Harnwegsinfektionen (Hidron et al., 2008). Bedeutende Vertreter dieser Erregergruppe sind *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, sowie die Gruppe der *Enterobacteriaceae*. Bei der Therapie schwerer gramnegativer Infektion galten Carbapeneme lange Zeit als letztes Bollwerk. Ihre Wirksamkeit wird jedoch durch die Verbreitung verschiedener Resistenzmechanismen, allen voran der Bildung von Carbapenemasen zunehmend eingeschränkt. Resistenz gegenüber Carbapenemen führt zu signifikant erhöhter Mortalität, verlängerten Liegezeiten und einer zusätzlichen Belastung des Gesundheitssystems durch erhöhte Therapiekosten (Kaye & Pogue, 2015). Eine Ausbreitung carbapenemresistenter gramnegativer Erreger ist somit als eine der bedrohlichsten Entwicklungen der Gegenwart zu sehen.

## **2.2 Carbapeneme**

### **2.2.1 Aufbau und Einteilung**

Carbapeneme verfügen als gemeinsames Merkmal über einen  $\beta$ -Laktamring. Die Grundstruktur unterscheidet sich von anderen  $\beta$ -Laktamantibiotika wie Penicillinen und Cephalosporinen durch den Austausch des Sulfid-Atoms an C1 durch Kohlenstoff. Zusätzlich liegt eine Doppelbindung zwischen dem C2- und C3-Atom des  $\beta$ -Laktamrings vor (K. M. Papp-Wallace et al., 2011) (s. Abb. 2-7). Thienamycin wurde als erstes Carbapenem aus einer Kultur des Bakteriums *Streptomyces cattleya* isoliert (Kattan et al., 2008). Allerdings erwies sich die Verbindung als sehr instabil. 1984 wurde schließlich Imipenem als erstes synthetisches Carbapenem zur klinischen Anwendung zugelassen. Es folgte im Laufe der Zeit Meropenem und Ertapenem als weitere wichtige Vertreter. Weiterhin zählen Doripenem, sowie die in Japan und Korea zugelassenen Medikamente Biapenem und Panipenem zur Gruppe der Carbapeneme (Shah, 2008). Als erstes zur oralen Applikation geeignetes Carbapenem steht neuerdings Tebipenem zur Verfügung (Hazra et al., 2014).



**Abb. 2-7 Grundstruktur verschiedener  $\beta$ -Laktamantibiotika (K. M. Papp-Wallace et al., 2011).**  $\beta$ -Laktamring als Grundgerüst der  $\beta$ -Laktamantibiotika. *Rot:* veränderte Strukturmerkmale der Carbapeneme gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen. Ein Kohlenstoff-Atom ersetzt das Sulfidatom. Gegenüber Penicillin liegt zusätzlich eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 vor.

Eine gängige Einteilung der Carbapeneme erfolgt in zwei Gruppen. Zur ersten Gruppe gehören Imipenem, Meropenem und Doripenem. Zur zweiten Gruppe wird Ertapenem gezählt. Die Unterscheidung erfolgt vor allem anhand des Wirkprofils (Shah, 2008) und pharmakokinetischen Eigenschaften (Bodmann, K.-F. et al., 2010).

### 2.2.2 Pharmakokinetische Eigenschaften

Aufgrund fehlender Absorption im Gastrointestinaltrakt werden Carbapeneme mit Ausnahme von Tebipenem parenteral appliziert. Wie allen  $\beta$ -Laktamantibiotika liegt ihnen eine zeitabhängige Tötungskinetik zugrunde. Entscheidender Parameter für die Wirkstärke von Carbapenemen ist somit die Zeitspanne, in der die Plasmakonzentration des Antibiotikums über der minimalen inhibitorischen Konzentration liegt ( $T > MIC$ ) (Turnidge, 1998). Wesentlicher Unterschied der verschiedenen Carbapenemgruppen ist eine unterschiedliche Proteinbindung im Organismus. Bei Gruppe 1 Carbapenemen wie Imipenem, Doripenem und Meropenem liegt sie mit 25%, 8% und 2% deutlich unter der von Ertapenem mit  $>90\%$  Proteinbindung. Dies resultiert in einer deutlich kürzeren Halbwertszeit der Gruppe 1 Carbapenemen von ca. einer Stunde (Fish & Singletary, 1997; Lyon, 1985) gegenüber vier Stunden bei Ertapenem (Congeni, 2010; Cunha, 2002). Als klinische Konsequenz ist Ertapenem als einziges Carbapenem zur täglichen Einmalgabe geeignet. Imipenem unterliegt einem schnellen Abbau durch das Enzym Dehydropeptidase (DHP-1) im proximalen Nierentubulus. Um eine ausreichende Halbwertszeit

für den klinischen Einsatz zu erreichen wird es daher mit dem DHP-1-Hemmer Cilastatin kombiniert. Neuere Carbapeneme wie Meropenem und Ertapenem weisen eine höhere Stabilität gegenüber DHP-1 auf und können ohne Zusatz eines DHP-1-Hemmers verabreicht werden (Zhanel et al., 2007). Allgemein werden Carbapeneme vorwiegend renal eliminiert (Bodmann, K.-F. et al. 2010).

### 2.2.3 Wirkmechanismus

Wie alle  $\beta$ -Laktamantibiotika wirken Carbapeneme bakterizid und entfalten ihre Wirkung über die Bindung an Penicillin-bindende-Proteine (PBPs) (Zhanel et al., 2007). Um ihren Wirkort zu erreichen werden Carbapeneme durch Porine (OMPs) in den periplasmatischen Raum gramnegativer Bakterien aufgenommen. Hier kommt es zur Acetylierung von Peptidoglykanen, wodurch deren Quervernetzung inhibiert wird (Nicolau, 2008). Folge ist eine geschädigte Zellwand und Autolyse des Bakteriums (Hashizume et al., 1984). Zusätzlich können Carbapeneme  $\beta$ -Laktamasen, die nicht in der Lage sind Carbapeneme zu hydrolysieren, als falsches Substrat inhibieren (Bethel et al., 2011). Dies kann in Kombinationstherapien die Wirkung anderer Antibiotika erhöhen bzw. ermöglichen.

### 2.2.4 Wirkspektrum und Einsatzgebiet

Carbapeneme verfügen über ein äußerst breites Wirkspektrum sowohl im grampositiven, als auch im gramnegativen Bereich (Norrby, 1995). Durch ihre weitestgehende Stabilität gegenüber  $\beta$ -Laktamasen, wie ESBL und  $\beta$ -Laktamasen vom AmpC-Typ, sind sie auch bei zahlreichen multiresistenten Keimen ausreichend wirksam (Shah, 2008). Gängige Carbapeneme zeigen gegenüber *Methicillin-resistenten Staphylokokken* und *Ampicillin-resistenten Enterococcus faecium* keine ausreichende Wirkung (Bodmann, K.-F. et al., 2010). Weiterhin bestehen bei einigen *Clostridium difficile* Stämmen sowie *Stenotrophomonas maltophilia* häufig Resistenzen (Kattan et al., 2008). Ertapenem weist darüber hinaus keine therapeutisch relevante Wirksamkeit gegenüber *Enterococcus spp.* (Livermore et al., 2003) und weiteren gramnegativen Nonfermentern wie *Acinetobacter spp* (Burkhardt et al., 2007) und *Pseudomonas aeruginosa* (Bodmann, K.-F. et al., 2010) auf. Carbapeneme sind als Reserveantibiotika bei zahlreichen durch grampositive und gramnegative Erreger verursachten Erkrankungen geeignet. Gruppe 1 Carbapeneme wie Imipenem und Meropenem werden vor allem im stationären Bereich bei

schwerwiegenderen nosokomial erworbenen Infektionen und polymikrobiellen Mischinfektionen eingesetzt. Aufgrund der Einschränkungen im Wirkprofil u.a. gegen Nonfermenter ist Ertapenem hier weniger geeignet. Indikationen für Gruppe 2 Carbapeneme sind hingegen ambulant erworbene Infektionen, sowie eine ambulante intravenöse Therapie, die auf zur Einmalgabe geeignete Antibiotika angewiesen ist (Zhan et al., 2007). Alle Carbapeneme, allen voran Imipenem weisen elektogenes Potential auf, wodurch sich ihr Einsatz bei entzündlichen Prozessen im ZNS verbietet. Ausgenommen hiervon ist Meropenem, welches zur Therapie der Meningitis zugelassen ist (Bodmann, K.-F. et al., 2010).

## **2.3 Diagnostik Carbapenemase-produzierender Erreger**

### **2.3.1 Übersicht**

Die routinemäßige Detektion Carbapenemase-positiver Bakterien gestaltet sich im klinischen Alltag als schwierig. Gängige phänotypische Methoden sind Diffusionstests, bei denen das Bakterienwachstum auf Agarplatten untersucht wird. Weit verbreitet ist hierbei der modifizierte Hodge-Test. Hierbei wird das Wachstumsverhalten der Bakterienstämme in Umgebung eines Carbapenemtestplättchens auf Mueller-Hinton-Agar untersucht. Ein weiteres phänotypisches Verfahren stellt der MAST-CDS-Hemmtest dar. In Gegenwart eines Carbapenemtestplättchens in Kombination mit unterschiedlichen  $\beta$ -Laktamase-Hemmstoffen lassen sich Klasse A, B und Klasse C Carbapenemasen diagnostizieren und differenzieren. Beide Verfahren überzeugen zwar durch ihre einfache Durchführbarkeit, erweisen sich aber für eine schnelle Routinediagnostik zu zeitaufwändig (24-48h) und fehleranfällig. Der modifizierte Hodge-Test verfügt zudem im Rahmen der Carbapenemase-Detektion über nur unzureichende Sensitivität und Spezifität (Patrice Nordmann et al., 2011; Pasteran et al., 2011). Hemmtests wie MAST-CDS sind meist auf einzelne Enzymgruppen beschränkt (Osei Sekyere et al., 2015). Ein 2012 neu entwickelter und seit 2015 kommerziell erhältlicher CarbaNP-Test weist durch einen pH-bedingten Farbumschlag die Hydrolyse von Imipenem nach (Patrice Nordmann, Poirel, et al., 2012). Der Test ist einfach durchzuführen und liefert bereits in weniger als zwei Stunden erste Ergebnisse. In Kombination mit den Inhibitoren EDTA und Tazobactam ist der abgeleitete CarbaNP-Test-II auch in der Lage, verschiedene Carbapenemasengruppen in Enterobacteriaceae und *Pseudomonas aeruginosa* zu unterscheiden (Dortet et al., 2012). Zahlreiche Studien weisen dem Test eine Spezifität von nahezu 100% nach. Die Sensitivität weist je nach Studie Schwankungen zwischen 70-100 Prozent auf (Osei Sekyere et al., 2015). Der Test ist nur bedingt in der Lage

langsam hydrolysierende Carbapenemasen vom OXA-48-Typ zu diagnostizieren. Auch schleimbildende Erreger schränken die Aussagekraft des CarbaNP-Test ein (Tijet et al., 2014). Molekulare Methoden wie die PCR erzielen hervorragende Ergebnisse, bedürfen jedoch speziell geschulten Personals und sind kostenintensiv. Zudem sind sie nicht in der Lage unbekannte Resistenzgene zu detektieren (Patrice Nordmann et al., 2011). Für ein generelles Screening auf Carbapenemase-positive Erreger sind sie daher nicht geeignet.

### 2.3.2 MALDI-ToF

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) ist ein spektrometrisches Verfahren, welches zur Bakterien- und Pilzidentifikation bereits in vielen Laboratorien als Standard etabliert ist. Das Prinzip beruht auf der Ionisation molekularer Massen mittels Laser. Die ionisierten Teilchen werden im elektrischen Feld beschleunigt, wodurch sie sich anhand ihrer Masse und Ladung auftrennen lassen. Es werden charakteristische Spektren erzeugt, welche eine Erregeridentifikation ermöglichen. In der Forschung wird die Fähigkeit Proteine und Peptide zu diagnostizieren vor allem für proteomische Studien genutzt (Schubert et al., 2010). In Bezug auf Resistenzdetektion werden aktuell zahlreiche neue Anwendungsverfahren für diese Technik wissenschaftlich untersucht. Hierzu zählen unter anderem Identifikation von resistenzbildenden rRNA-Modifikationen, MRSA-Diagnostik, Aufschlüsselung des Bakterienproteoms, Untersuchung der OMPs und periplasmatischen Proteinexpression, sowie der sogenannten Minisequenzierung, welche DNA-Veränderungen anhand Änderungen deren Molekülmasse nachweist. Auch der direkte Nachweis von  $\beta$ -Laktamasen mittels MALDI-ToF ist Gegenstand der Forschung (Hrabák et al., 2013). Im Massenspektrum eines Ampicillin-resistenten *Escherichia coli* konnte beispielsweise ein spezifischer Peak dem Vorliegen einer  $\beta$ -Laktamase zugewiesen werden (Camara & Hays, 2007). Ein vielversprechendes Verfahren zur Detektion enzymatischen Antibiotikaabbaus, wie er auch bei Carbapenemasen stattfindet, beruht auf der Detektion der Antibiotikaabbauprodukte. Diese unterscheiden sich in ihrer Molekülmasse vom ursprünglichen Molekül. Inkubiert man eine antibiotische Lösung mit einer  $\beta$ -Laktamasen bzw. Carbapenemasen exprimierenden Bakterienkultur lassen sich somit im Spektrum die ursprünglichen Peaks des Antibiotikums, seiner Salze und seiner Abbauprodukte nachweisen. Je nach zugrundeliegendem Carbapenemase-Typ ist eine Detektion bereits innerhalb einer Stunde möglich (Burckhardt & Zimmermann, 2011). In vielen Studien erzielte dieses Verfahren eine Sensitivität und Spezifität

von 100% (Kempf et al., 2012; Lee et al., 2013). Auch der direkte Nachweis aus einer Blutkultur (Carvalhaes et al., 2014), sowie die Differenzierung verschiedener Carbapenemasegruppen mittels Zugabe von Inhibitoren (Álvarez-Buylla et al., 2013) sind Bestandteil gegenwärtiger Forschung. Vorteile dieses Verfahrens sind die abgesehen von der Erstanschaffung niedrigen Kosten, seine Schnelligkeit und einfache Durchführbarkeit. Zudem ist es nicht auf Carbapenemasen beschränkt, sondern auch auf andere  $\beta$ -Laktamantibiotika wie Penicilline und Cephalosporine anwendbar (Sparbier et al., 2012).

## 2.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung bestehender Arbeitsprotokolle und Etablierung eines neuen Standardprotokolls zur MALDI-ToF basierten Frühdiagnostik Carbapenemase-positiver gramnegativer Bakterien. Anforderungen hieran sind: Einfache Durchführung, geringer Arbeitsaufwand, niedrige Materialanforderungen und Kosten, sowie eindeutige automatisierte bioinformatische Auswertung zum frühestmöglichen Zeitpunkt. Als Grundlage dienten verschiedene Publikationen, die sich mit der Detektion des enzymatischen Carbapenemabbaus in gramnegativen Bakterien auseinandersetzen (Burckhardt & Zimmermann, 2011; Hrabák et al., 2012; Kempf et al., 2012; Sparbier et al., 2012) und eine Arbeitsvorlage des MALDI-ToF-MS-Microflex-Herstellers Bruker. Das Arbeitsprotokoll gliederte sich in drei Teile:

1. Inkubation und Herstellung einer Bakterien-Carbapenem-Suspension
2. Spektrometrische Messung mittels MALDI-ToF-MS
3. Automatisierte bioinformatische Auswertung

In Kooperation mit Applied-Maths wurde eine automatisierte Auswertung der Massenspektren mit Hilfe der Software BioNumerics entwickelt, um anwenderbedingte Auswertungsfehler zu reduzieren. Das entwickelte Arbeitsprotokoll wurde mit aktuellen Standardmethoden wie dem modifizierten Hodge-Test und MAST-CDS verglichen und zur Validierung an genotypisierten laboreigenen Stämmen sowie Referenzstämmen des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Erreger getestet.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Ausgangspunkt**

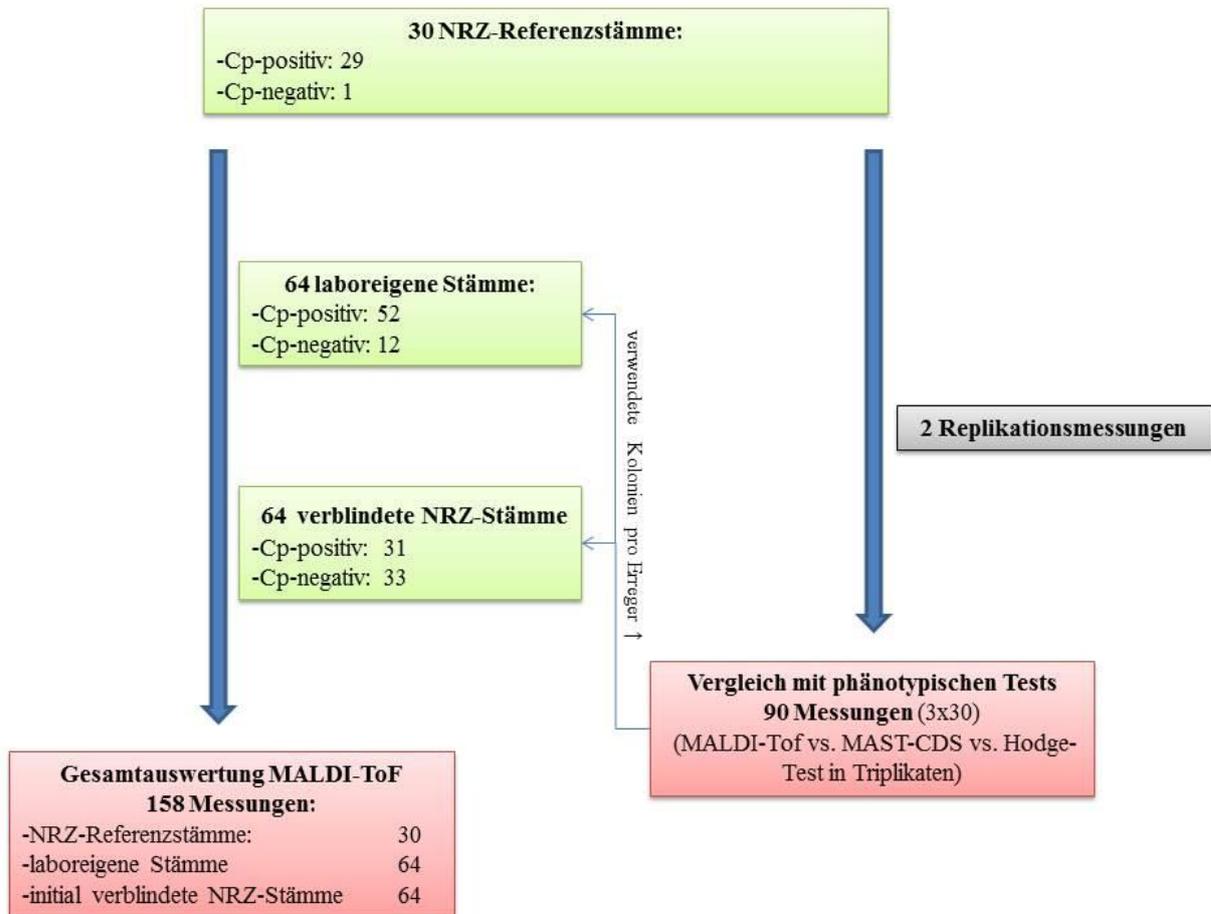
Als Ausgangspunkt für die Entwicklung des Protokolls diente eine für Forschungszwecke bereitgestellte Arbeitsvorlage zur Detektion bakterieller  $\beta$ -Laktamaseaktivität des MALDI-ToF-MS Herstellers Bruker. Des Weiteren wurden Studien zur Detektion von Carbapenemase-positiven gramnegativen Erreger mittels MALDI-ToF als Orientierung herangezogen (Burckhardt & Zimmermann, 2011; Hrabák et al., 2012; Kempf et al., 2012; Sparbier et al., 2012). Als Leitantibiotikum diente aufgrund seiner gegenüber anderen Carbapenemen langen Halbwertszeit von vier Stunden Ertapenem (Nicolau, 2008).

### **3.2 Vorversuche**

Um optimale Ergebnisse bei niedrigem Arbeits- und Materialaufwand zu erzielen wurde das Protokoll anhand der folgenden Vorversuche entwickelt: Die Überprüfung der Stabilität der hergestellten Ertapenemlösung erfolgte anhand MALDI-ToF-Messungen nach 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden Inkubation bei 37° und 900rpm. Vergleichend fanden Messungen mit Imipenem (IPM), den Penicillinen Ampicillin (AM) und Piperacillin (PIP), sowie den Cephalosporinen Ceftazidim (CAZ) und Cefotaxim (CTX) statt. Bei der Anzucht der Bakterien wurde untersucht, ob eine Erhöhung des Selektionsdrucks durch Selektivnährmedien, wie beispielsweise ein mit Cefpodoxime versetzter Agar (ESBL-Agar), oder im Agar platzierte CPO-Testplättchen die Carbapenemaseexpression steigerten. Zur Gewinnung einer geeigneten Messprobe wurde mittels einer Impföse ausreichend Bakterienmaterial aufgenommen und entsprechend des Protokolls inkubiert und gemessen. Vergleichend fanden Messungen mit verschiedenen McFarland-Standards (0,5/1/2/4McF) der Bakterien statt. Die Festlegung der optimalen Antibiotikalysedauer erfolgte anhand Variationen der Lysedauer zwischen fünf Minuten und einer Stunde. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden zur Reduzierung von Aufwand und Steigerung der Praktikabilität in ihrer Ausführung variiert und verglichen. Alle Messungen wurden mittels MALDI-ToF Micorflex LT (Bruker) durchgeführt. Eine regelmäßige Gerätekalibrierung des Microflex LT anhand des Peptidstandards II (Bruker) wurde durchgeführt.

### 3.3 Versuchsaufbau

Anhand der Messergebnisse der Vorversuche wurde das unter 3.4 (s. 3.4 Arbeitsprotokoll) beschriebene Arbeitsprotokoll entwickelt. Unter Verwendung einer einzigen Bakterienkolonie pro getesteten Erreger fand zunächst eine erste Testung des Verfahrens an 29 genotypisch Carbapenemase-positiven Proben des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Erreger statt. Die Messreihe enthielt zudem eine Negativkontrolle (s. 3.10.1 Stammliste Referenzstämmen). Nachdem durch diese Messungen die grundsätzliche Tauglichkeit des Testprotokolls bestätigt wurde, fanden zwei weitere Replikationsmessungen mit neu angezüchteten Erregerkulturen statt, sodass die Messung der Referenzstämmen in Triplikaten vorlag. Die Messergebnisse wurden mit Triplikaten phänotypischer Tests verglichen (MAST-CDS D70C-Set; modifizierter Hodge-Test). Ausgehend von den Messergebnissen wurde durch Erhöhung des Probenmaterials von einer Bakterienkolonie auf drei bis fünf Kolonien (abhängig von Koloniegröße) versucht die Teststärke des entwickelten MALDI-ToF-Arbeitsprotokolls weiter zu steigern. Zur Validierung fanden weitere Messungen unter Verwendung von jeweils drei bis fünf Bakterienkolonien pro Erreger mit 64 laboreigenen genotypisierten (s. Stammliste laboreigene Stämme 3.10.2), sowie 64 weiteren, initial verblindeten NRZ-Erregern (s. Stammliste initial verblindete Stämme 3.10.3) statt (s. Abb. 3-1). Erreger und Genotyp in Bezug auf das Vorliegen einer Carbapenemase der verblindeten Proben wurden erst nach Vorliegen der MALDI-ToF Messergebnisse vom NRZ übermittelt.



**Abb. 3-1 Versuchsaufbau.** *Grün:* Messgruppen; *rot:* Auswertungsgruppen; *grau:* Messungen mit gleicher Stammgruppe; *Cp-positiv/negativ:* Genotyp. Zunächst Testung der 30 Referenzstämmе. *Rechts:* zweifache Wiederholung der Messung und Vergleich mit phänotypischen Testverfahren in Triplikaten. *Links:* nach Erhöhung des Probenvolumens pro Erreger auf drei bis fünf Kolonien (zuvor eine Kolonie) weitere Testung an 64 laboreigenen und 64 initial verblindeten NRZ-Stämmеn.

### 3.4 Arbeitsprotokoll

Das Arbeitsprotokoll setzt sich aus der Herstellung und Inkubation einer Antibiotika-Bakteriensuspension, der Probenmessung mittels MALDI-ToF MS und der Softwarevermittelten Auswertung der Ergebnisse zusammen. Abbildung 3-2 liefert sich eine Übersicht über die wichtigsten Arbeitsschritte des Protokolls.



**Abb. 3-2 Übersicht der Arbeitsschritte.** Der Grundaufbau des Protokolls besteht aus vier Schritten (s. Grafik). Die Inkubationszeit kann variiert und spezifischen Fragestellungen angepasst werden; Folgemessungen einer Probe zu mehreren Zeitpunkten sind möglich.

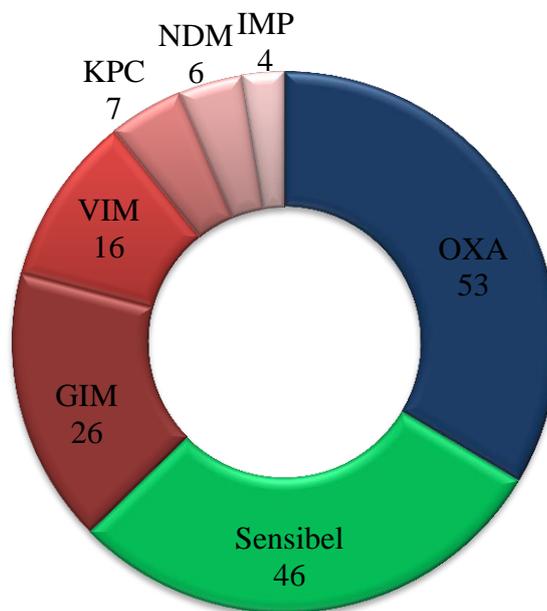
#### 3.4.1 Herstellung und Inkubation einer Antibiotika-Bakterien-Suspension

Drei Ertapenem-Sensi-Disc-Blättchen wurden mittels Pinzette in ein 0,5ml Elution-Tube Reagenzgefäß gegeben. Die Elution-Tubes wurden zuvor mittels erhitzter Impfnadel (alternativ erhitzter Draht) am unteren Pol eröffnet. Anschließend wurde das 0,5ml Elution Tube in eine

1,5ml Micro-Schraubröhre gestellt. Die Lyse der Ertapenemblättchen erfolgte über eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur durch pipettieren von 210µl NaCl (45%) in die Elution-Tubes. Am Ende der Lysedauer wurde die Antibiotikallösung für zwei Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Durch die am Boden eröffneten Elution-Tubes gelangte hierdurch die Lösung in die Micro-Schraubröhre, während die Ertapenem-Sensi-Disc-Blättchen im Elution-Tube zurück gehalten wurden. Die aus einem Ansatz gewonnene Antibiotikallösung reichte für die Messung von insgesamt vier Bakterienproben aus. Wurden mehrere Lyseansätze benötigt erfolgte nach dem Abzentrifugieren eine Vermischung der verschiedenen Ertapenemlysate, um gleiche Antibiotikakonzentrationen für alle Proben zu gewährleisten. Nach Gewinnung der Ertapenemlösung wurden pro getesteten Bakterienstamm 50µl Antibiotikalyt in ein Eppendorfgefäß gegeben. Mittels Stäbchenöse wurden initial eine Kolonie (Testung der Referenzstämme), sowie bei allen sich anschließenden Versuchen 3-5 Kolonien einer Übernachtskultur (mindestens 16h, 35-37°C, 5% CO<sub>2</sub>) der Bakterienstämme entnommen und mit den 50µl Ertapenemlyt im Eppendorfgefäß vermischt. Als Nährmedium für die Bakterienkultur diente ein mit einem Cefpodoxim-Sensi-Disc versehener Blutagar. Die Probenentnahme erfolgte aus unmittelbarer Umgebung des Sensi-Disc-Blättchens. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 900rpm über insgesamt 24 Stunden.

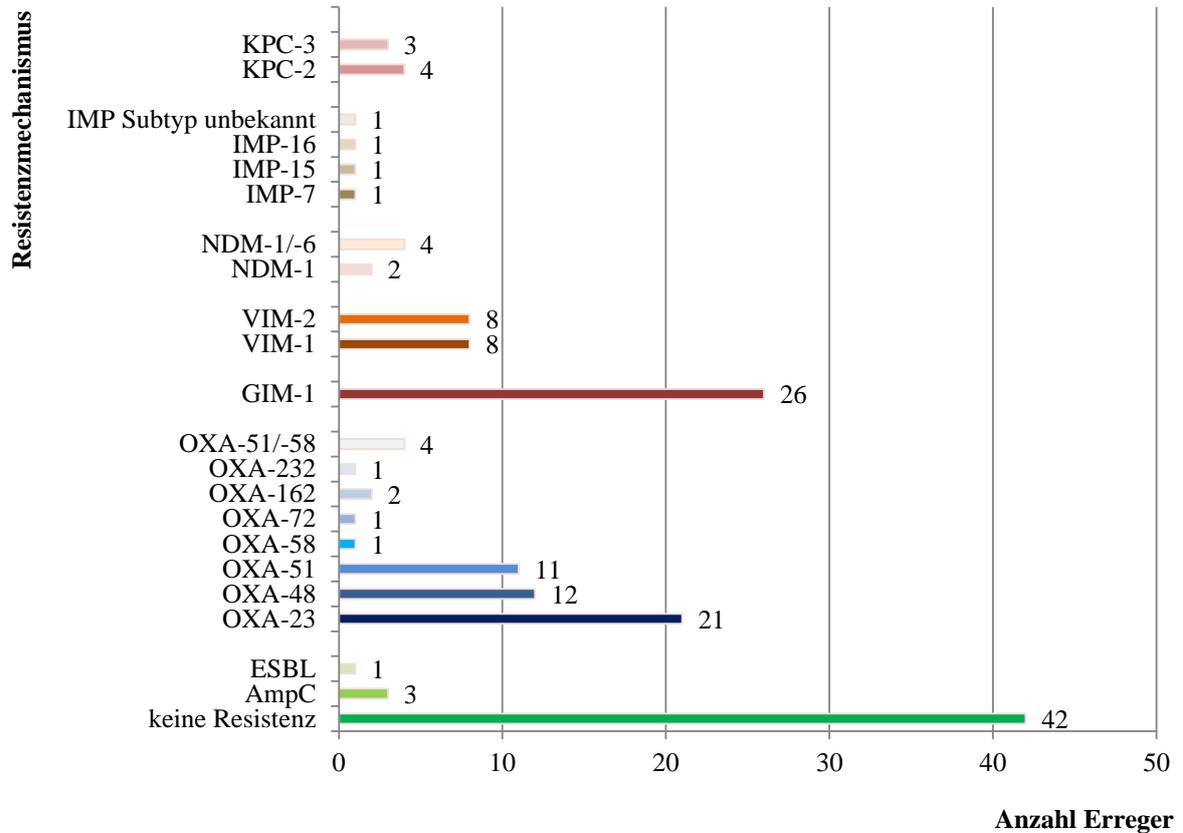
### 3.4.2 Messung

Eine Validierung des Protokolls erfolgte an insgesamt 158 genotypisch charakterisierten Proben. Die Proben setzten sich aus 30 Referenzstämmen des NRZ, 64 laboreigenen Stämmen, sowie 64 zunächst verblindeten Carbapenemase-positiven und -negativen Stämmen des NRZ zusammen. Genotypisch handelte es sich um 46 Carbapenemase-negative und 112 Carbapenemase-positive Proben. Die resistenten Stämme setzten sich aus 52 OXA-Carbapenemasen (Ambler-Klasse C) bildenden Stämme und 59 Proben mit Klasse A und B Carbapenemasen bildenden Erregern zusammen (s. Abb. 3-3).



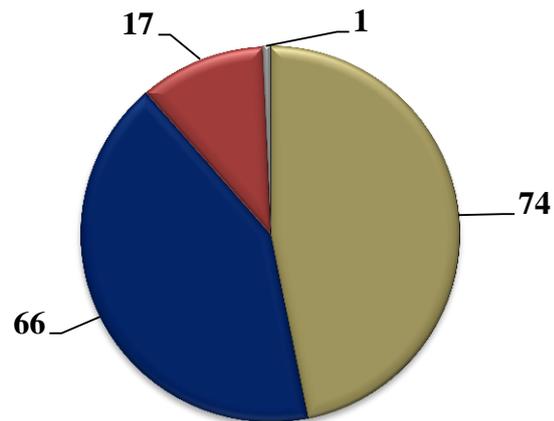
**Abb. 3-3 Anzahl getesteter Stämme nach Resistenzmechanismus.** Die Zusammensetzung der Proben lässt sich in Gruppen aus jeweils ca. einem Drittel sensibler Stämme, OXA-positiver, sowie Erreger mit Nicht-OXA-Carbapenemasen zusammenfassen.

Diese Unterscheidung ist aufgrund der nur schwach ausgeprägten hydrolytischen Aktivität und damit erschwerten Diagnostik der OXA-Carbapenemasen von Bedeutung. Die einzelnen Carbapenemasen-Klassen setzten sich aus Proben verschiedener Subtypen zusammen, welche sich Abbildung 3-4 entnehmen lassen.



**Abb. 3-4 Anzahl Proben nach genotypischem Resistenzmechanismus.** Aufschlüsselung der Carbapenemasen-Subtypen. Die größte homogene Carbapenemasegruppe stellen GIM-1-Carbapenemasen und OXA-23-Carbapenemasen dar.

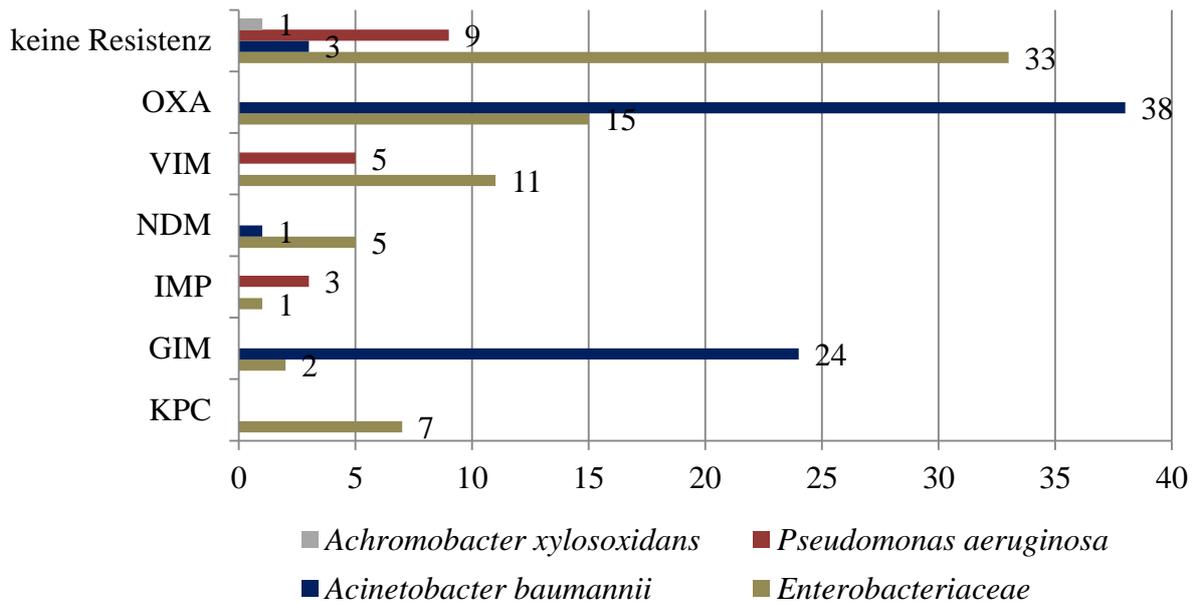
Die verwendeten gramnegativen Erreger setzten sich aus 74 Stämmen der *Enterobacteriaceae*-Familie, 66 zum *Acinetobacter baumannii*-Komplex gehörenden Stämmen, 17 *Pseudomonas aeruginosa* und einem *Achromobacter xylosoxidans* zusammen (s. Abb. 3-5)



■ Enterobacteriaceae      ■ Acinetobacter baumannii  
■ Pseudomonas aeruginosa      ■ Achromobacter xylosoxidans

**Abb. 3-5 Anzahl getesteter Stämme nach Erregerfamilie.** Es überwiegten Enterobacteriaceae (braun) und *Ac. baumannii* (blau).

Die *Acinetobacter baumannii* Proben verfügten vor allem über Carbapenemase vom OXA- und GIM-Typ. Die Enterobacteriaceae-Erreger verfügten über ein breiteres Carbapenemasespektrum, welches neben OXA-Carbapenemase hauptsächlich Carbapenemase vom VIM-Typ, aber auch zahlreiche weitere Carbapenemase wie KPC und NDM enthielt. Resistente *Pseudomonaden* besaßen Carbapenemase vom IMP und VIM-Typ. Die sensiblen Erreger setzten sich aus 33 Vertretern der *Enterobacteriaceae*, neun *Pseudomonaden*, drei *Acinetobacter baumannii*-Stämmen, sowie einem *Achromobacter xylosoxidans* Stamm zusammen (s. Abb. 3-6).



**Abb. 3-6 Zuordnung der Carbapenemasen zur Erregerfamilie.** Proben ohne Carbapenemaseresistenz gehören überwiegend zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Während *Enterobacteriaceae* (braun) ein breites Carbapenemasespektrum aufweisen, verfügt *Ac. baumannii* (blau) vorwiegend über Carbapenemasen vom OXA- und GIM-Typ.

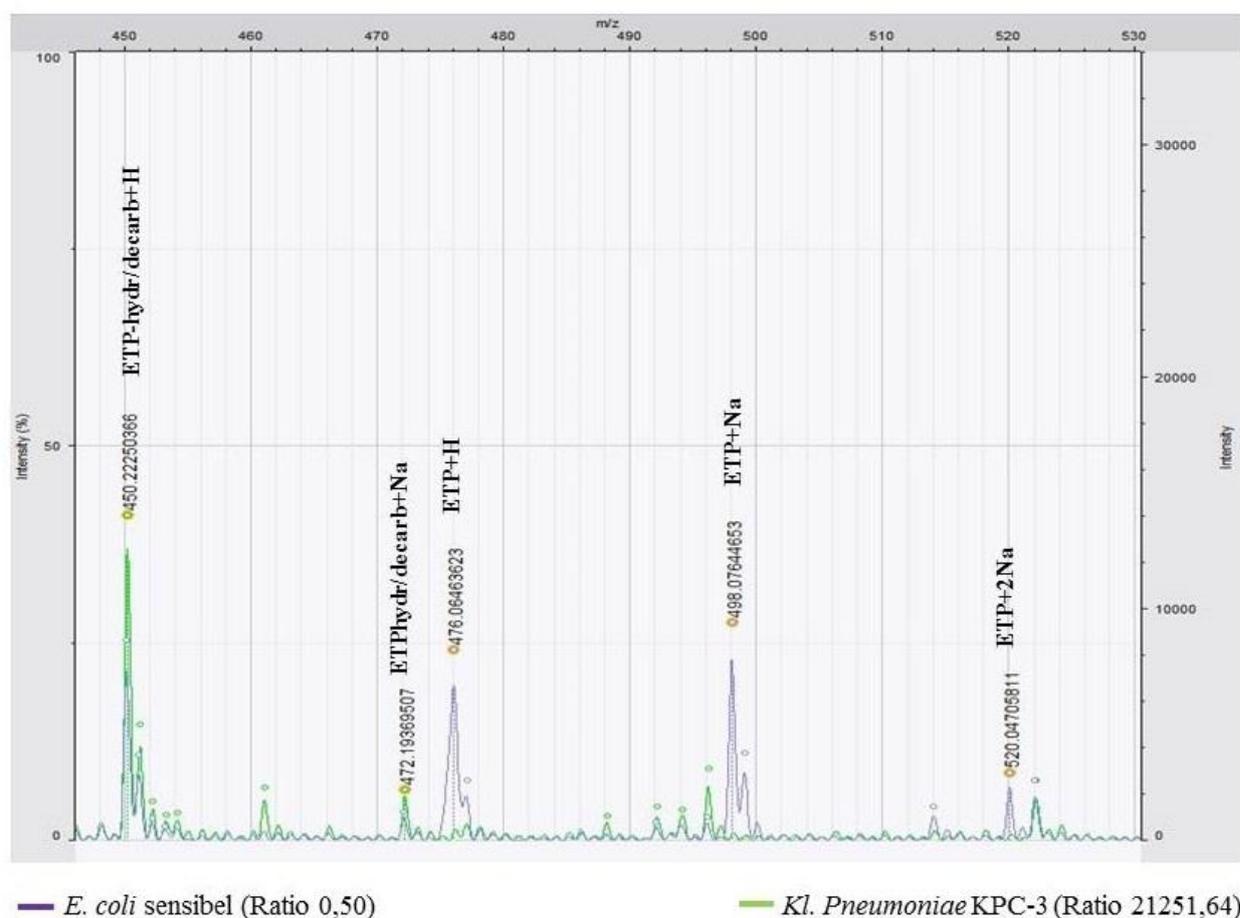
Eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse fand anhand der 30 Referenzstämme statt, welche anhand neuer Kultivierung insgesamt drei Mal das Arbeitsprotokoll durchliefen. Messungen erfolgten bei allen Versuchen nach 1, 2, 4 und 24 Stunden Inkubation mittels Microflex LT (Bruker). Hierfür wurden die Proben zum jeweiligen Messzeitpunkt zunächst für zwei Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Je 1,25µl des Überstandes wurden auf jeweils einen Messspot eines MALDI-ToF Steel-Targets übertragen. Anschließend wurde der Messspot mit 1,25µl HCCA-Matrix überlagert und luftgetrocknet. Der Messbereich lag zwischen 100 und 1200 Dalton. Es erfolgten drei Messungen pro Spot. Insgesamt belief sich somit die Messung pro Probe auf zwei Spots mit je drei Messungen für jeden Messzeitpunkt. Bei jeder Einzelmessung wurde der Spot automatisiert mit 240 Laserschüssen mit einer Frequenz von 60/min und einer Intensität von 20-26% beschossen.

### 3.4.3 Auswertung

Eine Auswertung der Messspektren erfolgte automatisiert mittels der Software Bionumerics (Applied Maths). In Kooperation mit dem Herausgeber Applied Maths wurde ein Algorithmus entwickelt, welcher anhand Ursprungs- und Abbaupicks des Antibiotikums eine Unterscheidung in Carbapenemase-positive und negative Stämme ermöglichte. Die mathematische Berechnung erfolgte angelehnt an eine Publikation von Jung et al. (Jung et al., 2014) anhand der folgenden Formel:

$$Ratio = \log \frac{\sum \text{Intensität der hydrolysierten Antibiotikapeaks}}{1 + \sum \text{Intensität der nicht hydrolysierten Antibiotikapeaks}}$$

Folgende Peakintensitäten des Abbauspektrums von Ertapenem wurden berücksichtigt:  $ETP_{\text{hydr./decarb.+H}}$  (450Da) und  $ETP_{\text{hydr./decarb.+Na}}$  (472Da). Auf Seite des nicht hydrolysierten Spektrums wurden folgende Peakintensitäten in die Berechnung mit eingeschlossen:  $ETP_{+H}$  (476Da),  $ETP_{+Na}$  (498Da) und  $ETP_{+2Na}$  (520Da). Die Peaks wurden mit einer Toleranz von 1Da automatisiert aus dem Massenspektrum ausgelesen. Zur Kalibrierung der Intensitäten griff der Algorithmus auf einen HCCA-Matrixpeak bei 379 Dalton zurück. Berechnete Ratio-Werte < 1 zeigten keinen, bzw. einen unvollständigen Ertapenemabbau an und wurden als Carbapenemase-negativ/sensibel gewertet. Werte > 1 entsprachen einem Ertapenemabbau und wurden als Carbapenemase-positiv/resistent gewertet. Werte, welche der Algorithmus mit Ratio R=0 auswertete, wurden als nicht verwertbar von der Auswertung zum jeweiligen Zeitpunkt ausgeschlossen. Abbildung 3-7 zeigt beispielhaft die Ergebnisse einer MALDI-ToF Messung eines sensiblen *Escheria coli*, sowie eines genotypisch KPC-3 positiven *Klebsiella pneumoniae* Stamms nach 24 Stunden Inkubation einer Ertapenem-Bakterien-Suspension. Im Spektrum des resistenten Erregers (violett) lässt sich der nahezu vollständige Abbau des Ertapenems anhand des verschwundenen Peaks bei 476Da, 498Da und 520Da erkennen. Der Carbapenemase-negative Stamm (grün) weist deutliche Peaks des Ertapenem-Reinspektrums auf. Im Verhältnis von nicht hydrolysierten und hydrolysierten Peaks betrug die Ratio für den sensiblen Stamm 0,50 und 21251,64 für den Carbapenemase-positiven Erreger, womit eine eindeutige Differenzierung beider Erreger in Carbapenemase-negativ (*E. coli* R=0,50) bzw. Carbapenemase-positiv (*Klebsiella pneumoniae* R=2151,64) gelang.



**Abb. 3-7 Massenspektren Carbapenemase-negativer und positiver Erreger nach 24h Inkubation.** *m/z*: Masseladungsverhältnis (~Molekülmasse [Da]). *Violett*: Massenspektrum eines Carbapenemase-negativen Erregers nach ETP-Inkubation. Die ETP-Peaks bei 476Da (ETP+H), 498Da (ETP+Na), sowie 520Da (ETP+2Na) sind deutlich sichtbar. *Grün*: Massenspektrum nach ETP-Hydrolyse durch Carbapenemasen. ETP-Peaks sind weitgehend abgebaut, es dominieren die Peaks der Abbauprodukte bei 450Da (ETP<sub>hydr/decarb</sub>+H) und 472Da (ETP<sub>hydr/decarb</sub>+Na).

Eine Analyse der 158 Messproben erfolgte für jeden Messzeitpunkt einzeln. Zusätzlich fand eine Auswertung der Ergebnisse mit und ohne Einbezug von Ambler-Klasse C Carbapenemasen (OXA) zu den einzelnen Messzeitpunkten statt. Es erfolgte eine getrennte Analyse nach Enzymklasse und Erreger zu den Einzelmesspunkten, sowie eine Betrachtung der Enzymkinetik im Zeitverlauf einzelner Carbapenemase-Klassen. Die Reproduzierbarkeit falsch-positiver Messergebnisse wurde stichprobenartig getestet. Aufgrund der Ergebnisse fand eine weitere unabhängige Untersuchung falsch-positiver Proben der NRZ-Stämme mittels Hodge-Test, E-Test und Vitek-Analyse durch das mikrobiologische Labor der Universität des Saarlandes statt. Von den insgesamt drei Replikationsmessungen der 30 Referenzstämmen wurden die Ergebnisse des ersten Messdurchlaufs in die Gesamtberechnung miteinbezogen. Es erfolgte zudem eine Berechnung der Einzel- und Gesamtspezifität und Sensitivität der drei Messdurchläufe, sowie

ein Abgleich auf die Reproduzierbarkeit der Messungen. Die Ergebnisse aus den Messungen der Referenzstämme wurden den Ergebnissen eines ebenfalls dreifach durchgeführten modifizierten Hodge-Test und D70C-MAST-CDS-Test gegenübergestellt.

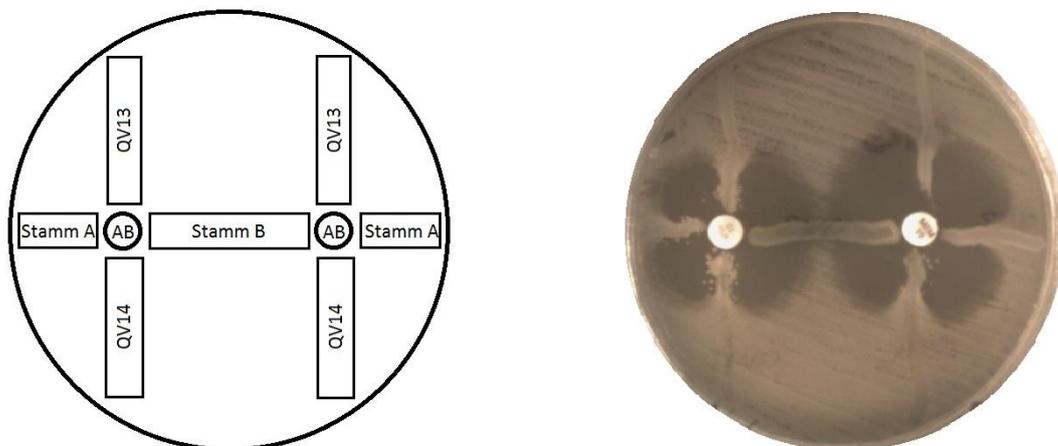
### 3.4.4 Software und statistische Analyse

Nach Formatierung der Messdaten wurden die Messspektren in Bionumerics (Applied Maths) eingelesen und ausgewertet. Neben der optischen Analyse erfolgte mit Hilfe eines bereitgestellten Scripts (Applied Maths) die automatisierte Berechnung der Cut-off Ratio ( $Ratio = \log \frac{\sum \text{Intensität der hydrolysierten Antibiotikapeaks}}{1 + \sum \text{Intensität der nicht hydrolysierten Antibiotikapeaks}}$ ). In Rücksprache mit dem Institut für medizinische Biometrie des UKS wurde für statistische Auswertung neben Microsoft Excel auf die Statistik-Software „R“ (R Foundation for Statistical Computing) zur Erstellung von Boxplots, sowie die Software SPSS (IBM) für die Erstellung von Receiver-Operating-Characteristic-Kurven (ROC-Kurven), die Berechnung des AUC-Wertes (Area under curve) und Ermittlung des Youden-Index zurückgegriffen. Die Boxplots wurden mit erstem und dritten Quartil, sowie dem 1,5fachen Interquartilsabstand als oberer und unterer Whisker erstellt. Konfidenzintervalle wurden ohne Kontinuitätskorrektur anhand der Formel  $p_G = p \pm (1,96 * \sqrt{\frac{p*(1-p)}{n}})$  berechnet ( $p_G$ =obere/untere Intervallgrenze;  $p$ =Punktschätzer;  $n$ =Stichprobenumfang).

Anhand der ROC-Kurven erfolgte eine Analyse der Testqualität mittels des AUC –Wertes (Hanley & McNeil, 1982). Der AUC-Wert kann für klinische Tests Werte zwischen 0,5 und 1,0 annehmen. Wert von 0,5 bedeuten hierbei eine schlechte, 1,0 eine hervorragende Trennschärfe eines Testes zwischen zwei Merkmalsausprägungen (Hajian-Tilaki, 2013; Park et al., 2004). Die aus der verwendeten Formel hervorgehende Cut-off Ratio von  $R=1$  gibt einen Abbau der Ertapenempeaks, sowie einen Anstieg der Abbauprodukte wieder. Da aber neben Abbau durch Carbapenemasen auch weitere Mechanismen zu einem Anstieg des Ratiowertes führen können (z.B. Autolyse des Antibiotikums) erfolgte eine Bestimmung des aus statistischer Sicht optimalen Cut-offs. Neben des aus der zur Berechnung der Ratio hervorgehenden Cut-offs von  $R=1$  zur Differenzierung Carbapenemase-positiver und negativer Stämme erfolgte hierfür anhand der ROC-Analyse eine Berechnung des maximalen Youden-Index (Youden, 1950) zum jeweiligen Messpunkt. Die aus der Analyse hervorgehenden Cut-off-Werte wurden hinsichtlich Sensitivität und Spezifität mit dem Cut-off-Wert  $R=1$  auf verglichen.

### 3.5 Modifizierter Hodge-Test

Ausgangsmaterial für die Durchführung des modifizierten Hodge-Test waren TSA-Blutagar-Reinkulturen der 30 Referenzstämmen des NRZ. Es erfolgte die Herstellung einer 0,5McF Lösung des Indikatorstammes *Escherichia coli* DSM11003 (ATCC25922) mit 0,9%NaCl-Lösung. Der Indikatorstamm wurde mittels Wattetupfer in einem Drei-Ebenen-Ausstrich gleichmäßig deckend auf Müller-Hinton-Nährböden aufgetragen. Zwei Carbapenem-Testplättchen (ETP, IPM oder MEM) Testblättchen (BD Sensi Disc, 10µg) wurden auf dem Nährmedium platziert. Die Indikatorstämme ID14 *Klebsiella pneumoniae* (NRZ-00103) und Indikatorstamm ID13 *Enterobacter cloacae* (NRZ-00239) wurden strichförmig vertikal zu beiden Antibiotika-Testplättchen (AB) ausgestrichen. ID14 verfügt über eine KPC-2 Carbapenemase, ID13 über eine VIM-1 Metallo-Betalaktamase. Pro Agarplatte wurde ein Teststamm horizontal vom Rand zum jeweiligen Testplättchen und ein zweiter Teststamm horizontal zwischen beiden Antibiotika-Testplättchen aufgetragen (s. Abb. 3-8).



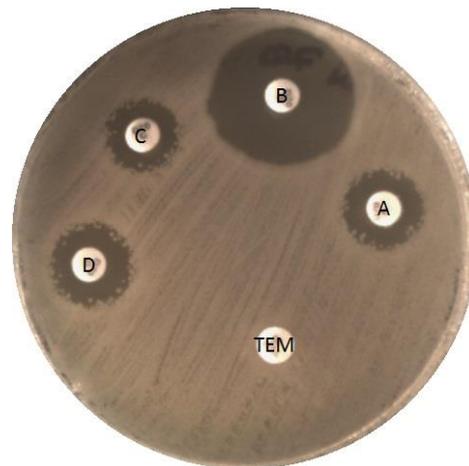
**Abb. 3-8 modifizierter Hodge-Test in Schema- und Orginaldarstellung.** In der Originaldarstellung entspricht Stamm A einem VIM-1 positiven *Enterobacter cloacae* Stamm (ID 62), Stamm B einem VIM-2 positiven *Pseudomonas aeruginosa* (ID63). Es zeigt sich eine eindeutige positive Reaktion der beiden Indikatorstämme, sowie des *Enterobacter cloacae* (Stamm A). *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm B) zeigt ein grenzwertiges Testergebnis.

Eine Auswertung fand nach 24 Stunden Inkubation der Agarplatten bei 35-37°C statt. Das Ergebnis wurde als positiv gewertet, wenn ein Bakterienwachstums des Teststammes in die

Antibiotikahemmhöfe hinein in ähnlichen Ausmaß, wie bei den Kontrollstämmen ID13 und 14 stattgefunden hatte. Der Test wurde analog zu den jeweiligen MALDI-ToF-Messungen insgesamt dreifach durchgeführt und entsprechend ausgewertet.

### 3.6 MAST-CDS D70C

Aus Reinkulturen der 30 zu testenden Referenzstämme wurde durch Verwendung einer 0,9%igen NaCl-Lösung eine 0,5McF-Suspension hergestellt. Mit Hilfe eines Wattetupfers wurden die Stämme in Form eines Drei-Ebenen-Ausstrichs deckend auf einen Müller-Hinton-Agar aufgetragen. Auf dem Ausstrich erfolgte die Platzierung der folgenden Testplättchen: Plättchen A (Carbapenem 10 $\mu$ g), B (Carbapenem 10 $\mu$ g + MBL-Inhibitor), C (Carbapenem 10 $\mu$ g + KPC-Inhibitor), D (Carbapenem 10 $\mu$ g + AmpC-Inhibitor) und TEM (Temocillin 30 $\mu$ g) (s. Abb. 3-9). Es fand eine Inkubation bei 35-37°C für 24 Stunden statt. Zur Auswertung wurden die jeweiligen Hemmhöfe um die Testplättchen ausgemessen. Fehlende Hemmhöfe wurden entsprechend der Anleitung (MAST) als 6mm gewertet. Die Auswertung wurde wie folgt durchgeführt: Ausschließlich *Hemmhof Plättchen B – Hemmhof Plättchen A > 5mm* entspricht dem Vorliegen einer Metallo-Betalaktamase (B-A>5mm). Ausschließlich *Hemmhof Plättchen C – Hemmhof Plättchen A > 4mm* entspricht einem KPC-positiven Befund (C-A>4mm). Eine AmpC Resistenz lag vor, wenn gleichzeitig *Hemmhof Testplättchen C*, sowie *Hemmhof Testplättchen D > 4mm* größer ausgeprägt waren, als *Hemmhof Testplättchen A* (C-A>4mm und D-A>4mm). Das Fehlen eines Hemmhofes um das Temocillinplättchen wurde als OXA-48-positiv interpretiert. Der Test wurde dreifach durchgeführt und den entsprechenden Ergebnissen aus MALDI-ToF-Messungen und modifiziertem Hodge-Test gegenüber gestellt.



**Abb. 3-9 MAST-CDS bei VIM-1-positivem *Klebsiella oxytoca* (ID70).** A: Carbapenem 10 $\mu$ g; B: Carbapenem 10 $\mu$ g + MBL-Inhibitor; C: Carbapenem 10 $\mu$ g + KPC-Inhibitor, D: Carbapenem 10 $\mu$ g + AmpC-Inhibitor; TEM: Temocillin 30 $\mu$ g. Gemessene Hemmhofdifferenz: B-A=7cm; C-A=1cm; D-A=1cm. Hieraus ergibt sich der positive Nachweis einer Metallo- $\beta$ -Laktamase (B-A>5cm).

### 3.7 Targetreinigung

Zur Säuberung der MALDI-ToF-Targets wurden diese im ersten Schritt mit 70% Ethanol beschichtet, anschließend mit heißem Wasser abgespült. Es folgte eine zweite Reinigung mit 70% Ethanol und einem Präzisionswisch Tuch (KimWipe). Das Target wurde erneut mit heißem Wasser abgespült. Mit Hilfe eines Präzisionswisch Tuchs wurden durch die Gabe von 100 $\mu$ l 80%-iger Trifluoressigsäure auf das Target eventuell verbleibende Verschmutzungen entfernt. Gegebenenfalls fand eine Wiederholung aller zuvor durchgeführten Schritte statt, bis alle Verunreinigungen entfernt waren. Abschließend wurde das Target mit Reinstwasser abgespült und luftgetrocknet.

### 3.8 Aufbereitung der Matrix

MALDI-ToF-MS benötigt zur korrekten Messung stets eine zusammengesetzte Probe aus dem zu analysierenden Material und einer Trägermatrix. Zur Aufbereitung der Matrix wurde 250 $\mu$ l einer 0,1% TFA-Lösung (Trifluoro acetic acid) mit 250 $\mu$ l Acetonitril (ACN) vermischt. 250 $\mu$ l der Lösung wurden 2,5mg HCCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers vermischt.

### 3.9 Geräte, Reagenzien und Software

#### 3.9.1 Target-Reinigung

80% Trifluoressigsäure	Chemikalienlager UdS
70% Ethanol	Chemikalienlager UdS
HPLC-Reinstwasser	Sigma-Aldrich
KimWipe-Präzisionswischtuch	Kimberly-Clark

#### 3.9.2 Matrix-Aufbereitung

2,5mg HCCA portioned	Bruker
Acetonitril	Sigma-Aldrich
HPLC-Reinstwasser	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich
Vortexer	Scientific Industries

#### 3.9.3 Kultur

TSA-Blutagar	BD-BBL
ESBL-Agar	BD-BBL
10µg CPO BD Sensi-Disc	BD-BBL
Brutschrank Typ B 6200	Heraeus

#### 3.9.4 Herstellung und Inkubation

Bakterienreinkultur	
Elution-Tubes 0,5ml	Promega

---

Micro-Schraubröhre 1,5ml	Sarstedt
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt
10µg AM BD Sensi-Disc	BD-BBL
30µg CAZ BD Sensi-Disc	BD-BBL
30µg CTX BD Sensi-Disc	BD-BBL
10µg ETP BD Sensi-Disc	BD-BBL
10µg IPM BD Sensi-Disc	BD-BBL
10µg MEM BD Sensi-Disc	BD-BBL
100µg PIP BD Sensi-Disc	BD-BBL
45% NaCL-Lösung	Chemikalienlager UdS
McFarland-Densiometer	Biomerieux
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf
Zentrifuge	

### 3.9.5 Messung und Auswertung

Bakterium-Antibiotika-Zentrifugat (Überstand)

HCCA-Matrix (aufbereitet)

MALDI-ToF Microflex MS (inkl. Herstellersoftware) Bruker

MicroScout Target (MSP 96 target polished steel) Bruker

FlexAnalysis (Software) Bruker

Bionumerics (Software) AppliedMaths

Excel 2007/2010 (Software) Microsoft

Word 2010 (Software) Microsoft

R R Foundation for Statistical Computing

SPSS IBM

### 3.9.6 Modifizierter Hodge-Test

Müller-Hinton Agar Institut für Mikrobiologie, Hygiene und Infektiologie der UdS

10µg ETP BD Sensi-Disc BD-BBL

10µg IPM BD Sensi-Disc BD-BBL

10µg MEM BD Sensi-Disc BD-BBL

0,9% NaCl Chemikalienlager UdS

Brutschrank Typ B 6200 Heraeus

Densitometer

Indikatorstamm *Escherichia coli* DSM1103/ATCC25922

Kontrollstamm *Enterobacter cloacae* NRZ-00239

Kontrollstamm *Klebsiella pneumoniae* NRZ-00103

### 3.9.7 MAST-CDS D70C-Set

Müller-Hinton-Agar Institut für Mikrobiologie, Hygiene und Infektiologie der UdS

Kartusche A (Carbapenem 10µg) MAST

Kartusche B (Carbapenem 10µg + MBL-Inhibitor)	MAST
Kartusche C (Carbapenem 10µg + KPC-Inhibitor)	MAST
Kartusche D (Carbapenem 10µg + AmpC-Inhibitor)	MAST
30µg TEM BD Sensi-Disc	BD-BBL
Brutschrank Typ B 6200	Heraeus

### 3.10 Stammlisten

Alle Stammlisten sind im Folgenden nach genotypischer Resistenz/Carbapenemase sortiert. Die farbliche Markierung dient zur Erregergruppierung. Erreger ohne ID (laboreigene Identifikationsnummer) und NRZ-Kennziffer (Kennziffer des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Erreger) erhielten zur zweifelsfreien Identifizierung während der Testung spezifische Kennziffern.

#### 3.10.1 Referenzstämme

**Tab. 3-1 Stammliste Referenzstämme des NRZ**

Referenzstämme				
ID	NRZ	Erreger	Carbapenemase	sonstige Resistenzen
ID77	614	<i>Enterobacter cloacae</i>	GIM-1	/
ID76	196	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-16	/
ID75	638	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-7	/
ID78	302	<i>Escherichia coli</i>	NDM-1	/
ID65	313	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1	/
ID69	401	<i>Escherichia coli</i>	VIM-1	/
ID70	405	<i>Klebsiella oxytoca</i>	VIM-1	/
ID71	535	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-1	/
ID68	452	<i>Citrobacter freundii</i>	VIM-1	/
ID62	239	<i>Enterobacter cloacae</i>	VIM-1	/
ID72	293	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-2	/
ID74	441	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	VIM-2	/
ID73	714	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2	/
ID63	425	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2	/
ID80	281	<i>Escherichia coli</i>	KPC-2	/
ID66	103	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	/
ID79	280	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	/
ID83	222	<i>Escherichia coli</i>	KPC-3	/
ID81	223	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3	/
ID82	506	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3	/
ID64	1058	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
ID87	361	<i>Escherichia coli</i>	OXA-126	/
ID86	472	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-126	/
ID88	66	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
ID89	330	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
ID85	176	<i>Escherichia coli</i>	OXA-48	/
ID67	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
ID84	432	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
ID90	518	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-58	/
ID91	449	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-72	/

## 3.10.2 Laboreigene Stämme

Tab. 3-2 Stammliste laboreigene Stämme

laboreigene Stämme				
ID	NRZ	Erreger	Carbapenemase	sonstige Resistenzen
/	1952318	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GIM-1	/
/	1902212	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1902767	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1902197	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1639232	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	2147476	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1902856	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	2148101	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	2148099	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1900498	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1902975	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	2148591	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1902765	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1904532	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1639405	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	2148589	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	2148110	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1639273	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	2148206	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1902901	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1632250	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	GIM-1	/
/	1903052	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1638255	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1902263	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1902269	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM-1	/
/	1837844	<i>Enterobacter cloacae</i>	IMP	/
ID 14	103	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2	/
/	1956679	<i>Citrobacter freundii</i>	negativ	AmpC/Porinverlust
/	1965019	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	AmpC/Porinverlust
/	1989966	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	AmpC/Porinverlust
/	1900171	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	ESBL/Porinverlust
/	1639670	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	/
/	1640497	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	/
/	1951081	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	negativ	/
/	1959421	<i>Escherichia coli</i>	negativ	/
/	1961397	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	1628967	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	negativ	/
/	1840736	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	negativ	/
/	1638968	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	negativ	/

laboreigene Stämme (Fortsetzung)				
ID	NRZ	Erreger	Carbapenemase	sonstige Resistenzen
/	1954975	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	OXA-23	/
/	1654423-2	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	OXA-23	/
/	1654428	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	OXA-23	/
/	1969168	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	1841103	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	OXA-23	/
/	1954899	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	1941082	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	1948135	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	1654423-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51/OXA-58	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51/OXA-58	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51/OXA-58	/
/	/	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51/OXA-58	/
/	1961753	<i>Klebsiella oxytoca</i>	VIM-2	/

## 3.10.3 Initial verblindete Stämme

Tab. 3-3 Stammliste initial verblindete Stämme des NRZ

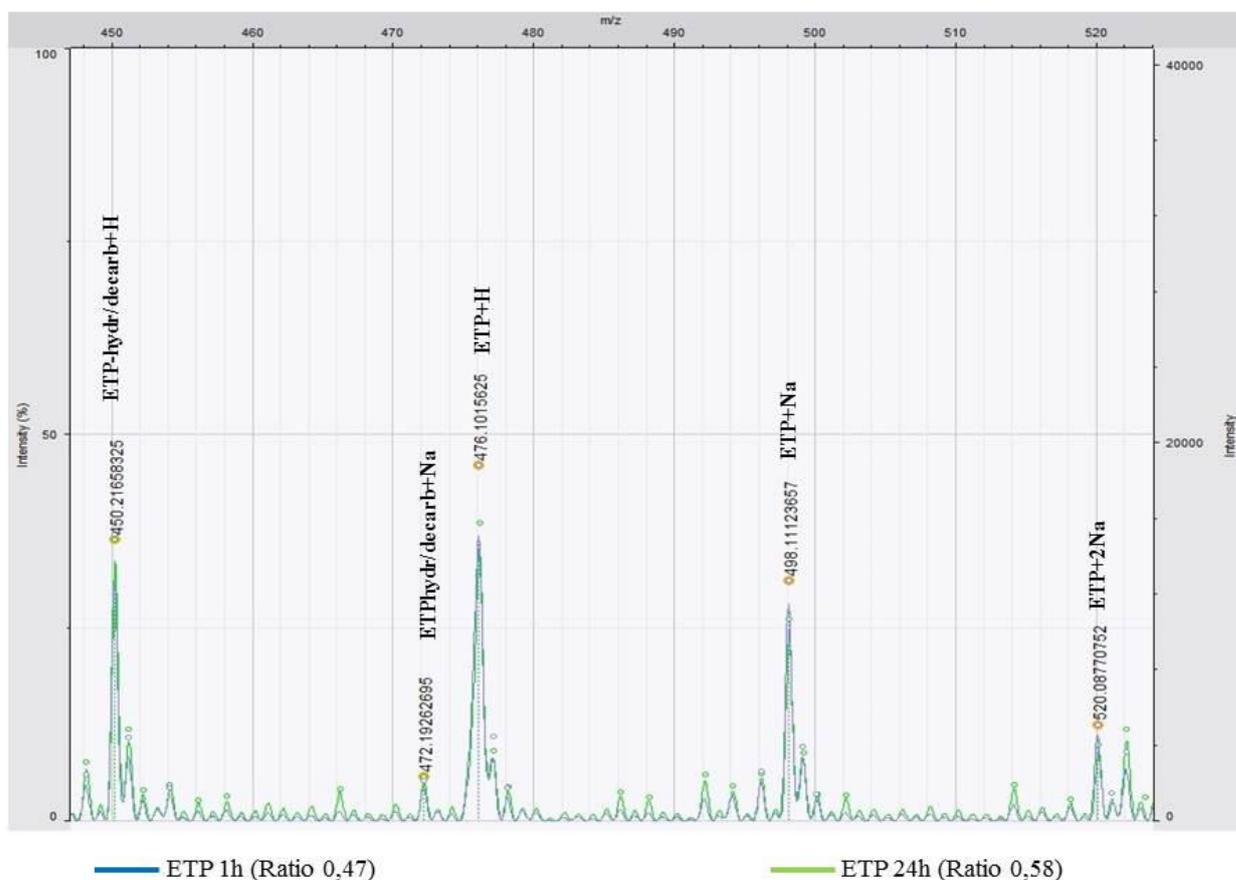
Initial verblindete Stämme				
ID	NRZ	Erreger	Carbapenemase	sonstige Resistenzen
/	17893	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-15	/
/	17860	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM-1/-6	/
/	17866	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1/-6	/
/	17869	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1/-6	/
/	17885	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1/-6	/
/	17656	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17691	<i>Escherichia coli</i>	negativ	CYM-30
/	17755	<i>Enterobacter aerogenes</i>	negativ	/
/	17778	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	/
/	17787	<i>Enterobacter aerogenes</i>	negativ	/
/	17818	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17822	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17840	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17841	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17842	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17845	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17849	<i>Escherichia coli</i>	negativ	/
/	17851	<i>Enterobacter aerogenes</i>	negativ	/
/	17852	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	/
/	17854	<i>Enterobacter aerogenes</i>	negativ	/
/	17856	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17857	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17867	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	OXA-1-Gruppe
/	17870	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17872	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17874	<i>Escherichia coli</i>	negativ	/
/	17875	<i>Escherichia coli</i>	negativ	OXA-1-Gruppe
/	17876	<i>Citrobacter freundii complex</i>	negativ	/
/	17877	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17878	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17879	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17887	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/
/	17888	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	OXA-1-Gruppe
/	17889	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	/
/	17891	<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	/
/	17892	<i>Enterobacter aerogenes</i>	negativ	/
/	17899	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	/
/	17906	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	/

Initial verblindete Stämme (Fortsetzung)				
ID	NRZ	Erreger	Carbapenemase	sonstige Resistenzen
/	17900	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17882	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17919	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17920	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17921	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17923	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17924	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17925	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17926	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17927	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17859	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17861	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17863	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17864	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	/
/	17658	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-232	/
/	17686	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	17815	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	17819	<i>Citrobacter freundii complex</i>	OXA-48	/
/	17839	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	17844	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	/
/	17827	<i>Klebsiella oxytoca</i>	VIM-1	ACC-1/-4
/	17850	<i>Enterobacter cloacae</i>	VIM-1	/
/	17855	<i>Enterobacter cloacae</i>	VIM-1	/
/	17858	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2	/
/	17880	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2	/
/	17901	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2	/

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorversuche

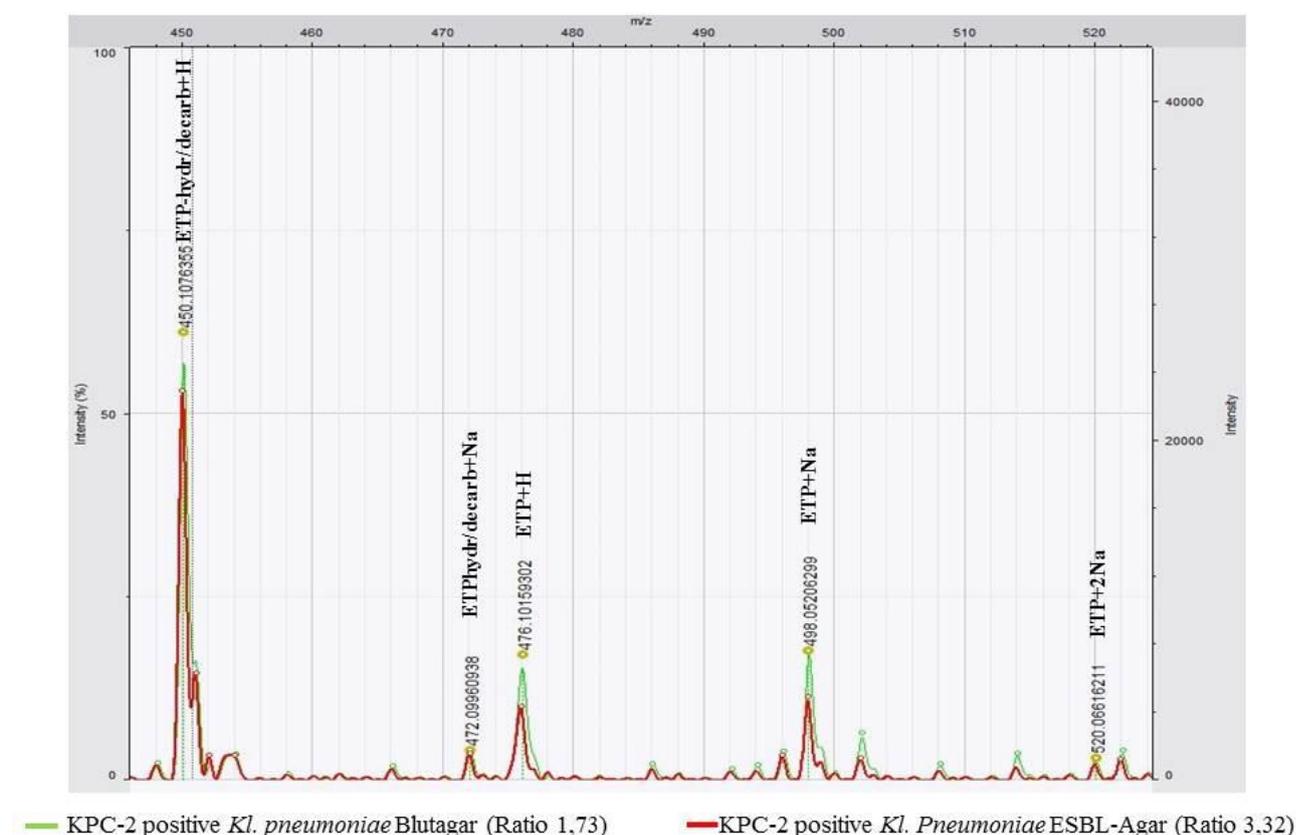
In Bezug auf die Stabilität erwies sich Ertapenem unter Inkubation bei 37°C und 900rpm gegenüber den anderen getesteten Antibiotika im Messzeitraum von 24 Stunden als die stabilste Verbindung. Messungen einer reinen Ertapenemlösung lieferten nach einer und 24 Stunden Inkubation nahezu identische Messspektren (s. Abb. 4-1). Die Ratiowerte lagen mit 0,47 für die Messung nach einer Stunde und 0,58 nach 24 Stunden deutlich im Bereich Carbapenemase-negativer Proben. Im Verlauf der Protokollentwicklung traten aber bei Kontrollmessungen einer reinen Ertapenemlösung nach 24 Stunden Inkubation ebenfalls Werte im leicht Carbapenemase-positiven Bereich ( $\text{Maximum Ratio}_{\text{ETP24h}}=1,19$ ) auf.



**Abb. 4-1 Stabilität Ertapenem nach 1 und 24 Stunden Inkubation.** *m/z*: Masseladungsverhältnis (~Molekülmasse [Da]); *blau*: Massenspektrum reines ETP nach 1h Inkubation; *grün*: Massenspektrum reines ETP nach 24h Inkubation. ETP-Peaks 476Da (ETP+H), 498Da (ETP+Na), sowie 520Da (ETP+2Na). Peaks der ETP-Abbauprodukte bei 450Da (ETP<sub>hydr/decarb</sub>+H) und 472Da (ETP<sub>hydr/decarb</sub>+Na). Ratio<sub>ETP1h</sub>=0,47; Ratio<sub>ETP24h</sub>=0,58. Nahezu identisches und daher in der Abbildung überlagertes Peakspektrum nach 1h und 24h.

Bakterienkulturen, welche auf Selektivnährböden wie Cefpodoxime versetztem Agar (ESBL-Agar) angezüchtet wurden, oder entlang Cefpodoxime-Testplättchen entnommen wurden zeigten gegenüber reinen Blutagarkulturen einen stärkeren Antibiotikaabbau. Abbildung 4-2 zeigt beispielhaft das Messspektrum einer KPC-2 positiven Klebsielle, welche auf Blutagar (grün) bzw. einem Selektivnährmedium (rot) angezüchtet wurde. Die Messung erfolgte mit einer Übernachtskultur (mindestens 16h, 35-37°C, 5% CO<sub>2</sub>) nach zwei Stunden Inkubation der Ertapenem-Bakterien-Suspension. Das Spektrum des auf Selektivnährboden angezüchteten Erregers zeigt im Vergleich zur Blutagarkultur eine stärkere Reduktion der Ertapenempeaks bei

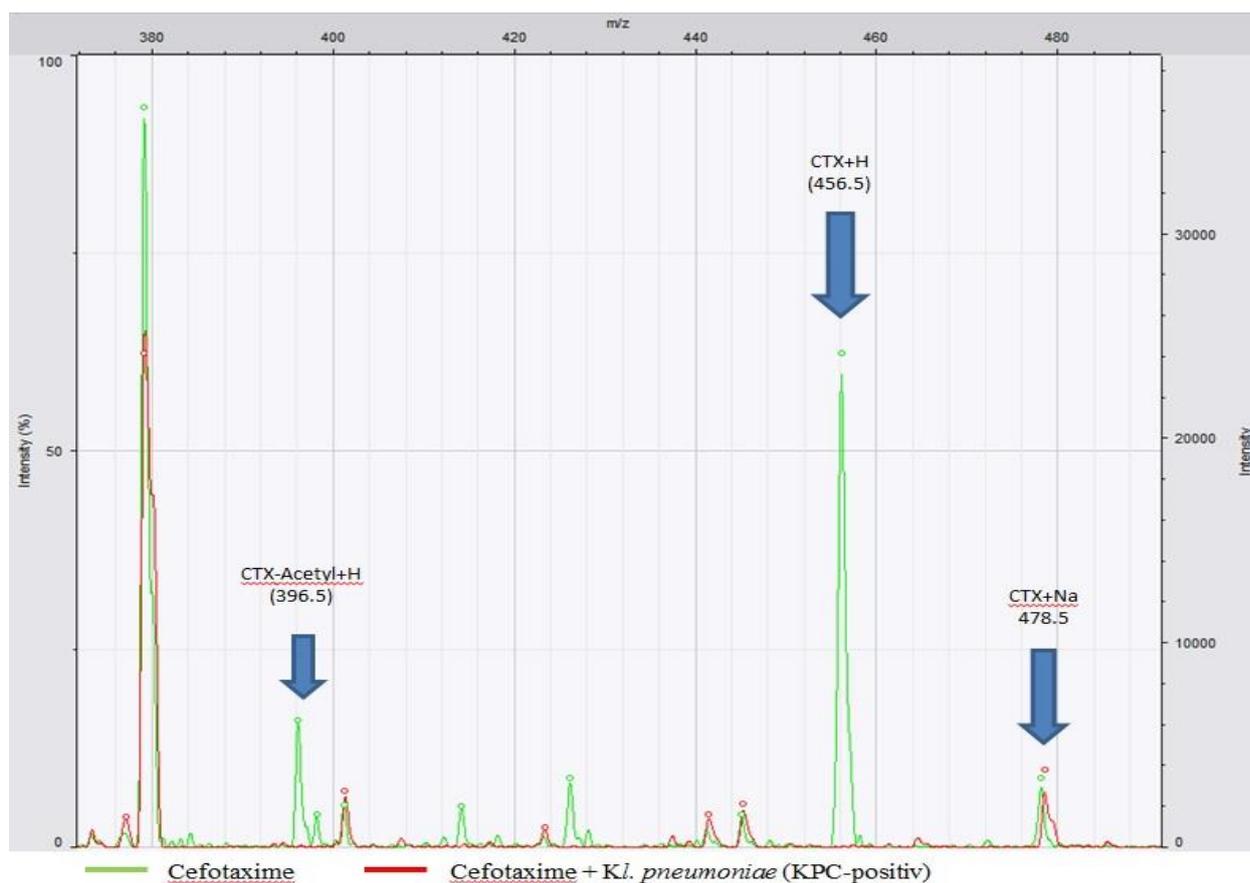
476Da (ETP+H) und 498Da (ETP+Na). Die Ratiowerte betragen für die Blutagarprobe 1,73 und für den auf ESBL-Agar gezüchteten Stamm 3,32. Beide Proben wurden somit als Carbapenemase-positiv identifiziert.



**Abb. 4-2 Vergleich Blutagar vs. Selektivnährmedium.** *m/z*: Masseladungsverhältnis (~Molekülmasse [Da]); *grün*: Massenspektrum ETP nach 2h Inkubation mit einem KPC-2 positiven *Kl. pneumoniae* Stamm nach Anzucht auf Blutagar; *rot*: Massenspektrum reines ETP nach 2h Inkubation mit einem KPC-2 positiven *Kl. pneumoniae* Stamm nach Anzucht auf ESBL-Agar (Selektivnährmedium). Deutlicher ETP-Hydrolyse durch Verwendung eines Selektivnährmediums (*rotes* Spektrum). *Ratio*: Verhältnis ETP-Abbauprodukte/ETP-Peaks. ETP-Peaks 476Da (ETP+H), 498Da (ETP+Na), sowie 520Da (ETP+2Na); Peaks der ETP-Abbauprodukte bei 450Da (ETP<sub>hydr/decarb</sub>+H) und 472Da (ETP<sub>hydr/decarb</sub>+Na).

Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurde bei Folgeversuchen auf die Platzierung von CPO-Testplättchen im Agar zurückgegriffen. Zu berücksichtigen gilt, dass sich unter Verwendung von ESBL-Agar der Arbeitsaufwand reduziert, da das Platzieren der CPO-Testplättchen auf die Agarplatten mittels Pinzette entfällt. Je höher der McFarland Standard gewählt wurde, desto ausgeprägter fand ein Abbau des Antibiotikums statt. Hohe McF-Standards (4,0McF) zeigten

keinen signifikanten Unterschied der Ergebnisse gegenüber einer nicht standardisierten Probenmenge (3-5 Kolonien, initial eine Kolonie), welche direkt mittels Öse gewonnen und mit ETP vermischt wurden. Aufgrund des deutlich geringeren Arbeits- und Materialaufwandes wurde somit im Verlauf das Probenmaterial mittels Öse ohne Herstellung eines einheitlichen McF-Standards entnommen. Eine 15-minütige Lyse von drei 10µg ETP BD Sensi-Disc in 210µg 0,45%-iger NaCl zur Gewinnung einer Antibiotikalösung stellte einen optimalen Kompromiss zwischen Dauer und ausreichender Antibiotikakonzentration im Lysat dar. Die Resultate führten zur Entwicklung des unter Kapitel 3.4 genauer beschriebenen Arbeitsprotokolls, welcher die Grundlage für die sich anschließenden Versuche darstellt. Bei der Übertragung der Arbeitsschritte auf andere Antibiotika wie Imipenem (IPM), Ampicillin (AM), Piperacillin (PIP), Ceftazidim (CAZ) und Cefotaxim (CTX) zeigte die optische Auswertung der Messspektren bei resistenten Stämmen ähnliche Hydrolysemuster, wie bei der Carbapenemasedetektion mittels Ertapenem. Abbildung 4-3 stellt beispielhaft die nahezu vollständige Hydrolyse von Cefotaxim durch einen KPC-positiven *Klebsiella pneumoniae* Stamm dar. Der nahezu vollständige Verlust des CTX+H- und CTX-Acetyl+H-Peak (rotes Spektrum) spiegeln den Cefotaximabbau wieder.



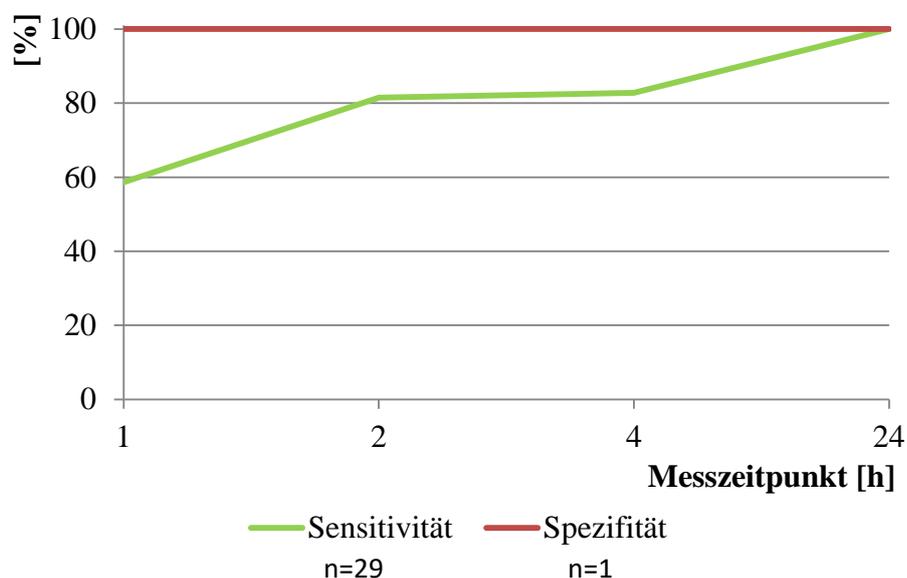
**Abb. 4-3 Cefotaximhydrolyse durch KPC-positiven *Klebsiella pneumoniae*.** Ergebnisse nach 24h Inkubation entsprechend dem auf ETP-basierenden Protokoll. *m/z*: Masseladungsverhältnis (~Molekülmasse [Da]); *grün*: reines CTX; *rot*: CTX nach Inkubation mit einem KPC-positiven *Kl. pneumoniae* Stamm. Verlust des CTX+H- (369,5) und CTX-Acteyl+H-Peak (456,5) durch Cefotaximhydrolyse.

## 4.2 Messung der NRZ-Referenzstämmen

### 4.2.1 Ausgangsmessung

Die Messung 30 genotypisierter Referenzstämmen des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Erreger zeigte für die 29 Carbapenemase-positiven Proben einen deutlichen Anstieg der Sensitivität mit steigender Inkubationszeit. Nach einer Stunde Inkubation wurden 17 Erreger als Carbapenemase-positiv identifiziert (Sensitivität<sub>1h</sub>: 58,62%). Nach zwei bzw. vier Stunden Inkubation stieg die Anzahl korrekt identifizierter Carbapenemase-positiver Proben auf 22 (Sensitivität<sub>2h</sub>: 81,49%) bzw. 24 (Sensitivität<sub>4h</sub>: 82,76%). Nach 24 stündiger Inkubation konnten 27 Carbapenemasen detektiert werden (Sensitivität<sub>24h</sub>: 100%). Zwei Proben zeigten zum Zeitpunkt 2h und 24h nicht verwertbare Messspektren und wurden von der Auswertung

ausgeschlossen. Die Negativkontrolle wurde über alle Messzeitpunkte korrekt als Carbapenemase-negativ eingestuft (Spezifität<sub>1h; 2h; 4h; 24h</sub>: 100%) (s. Abb. 4-4).



**Abb. 4-4 MALDI-ToF Messung Cp-positiver NRZ-Stämme (n=30).** Sensitivitätsanstieg (*grün*) mit fortschreitender Inkubationszeit (Sensitivität 1h; 2h; 4h; 24h: 58,62%; 81,49%; 82,76; 100%). Negativ-Kontrolle (*rot*) über alle Messzeitpunkte korrekt diagnostiziert (Spezifität<sub>1h; 2h; 4h; 24h</sub>: jeweils 100%).

#### 4.2.2 Replikationsmessungen

Insgesamt fanden zwei Wiederholungen der Messung mit jeweils neu angezüchteten Erregerkulturen statt. Tabelle 4-1 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Messreihen. Die gemittelte Sensitivität zum Messzeitpunkt 1h lag bei 63,70% und stieg nach zwei- und vierstündiger Inkubation auf 73,78% und 77,91%. Zum Messzeitpunkt 24h lag die Sensitivität aller Messdurchläufe bei 91,75% mit insgesamt 7 nicht identifizierten Carbapenemase-positiven Proben in beiden Replikationsmessungen zu diesem Messzeitpunkt. Aufgrund der vermehrt falsch negativen Messergebnisse dieser Versuchsreihe wurde in allen folgenden Versuchen das verwendete Probenvolumen von einer Kolonie pro Erreger auf ca. 3-5 Kolonien angehoben (abhängig von Koloniegröße).

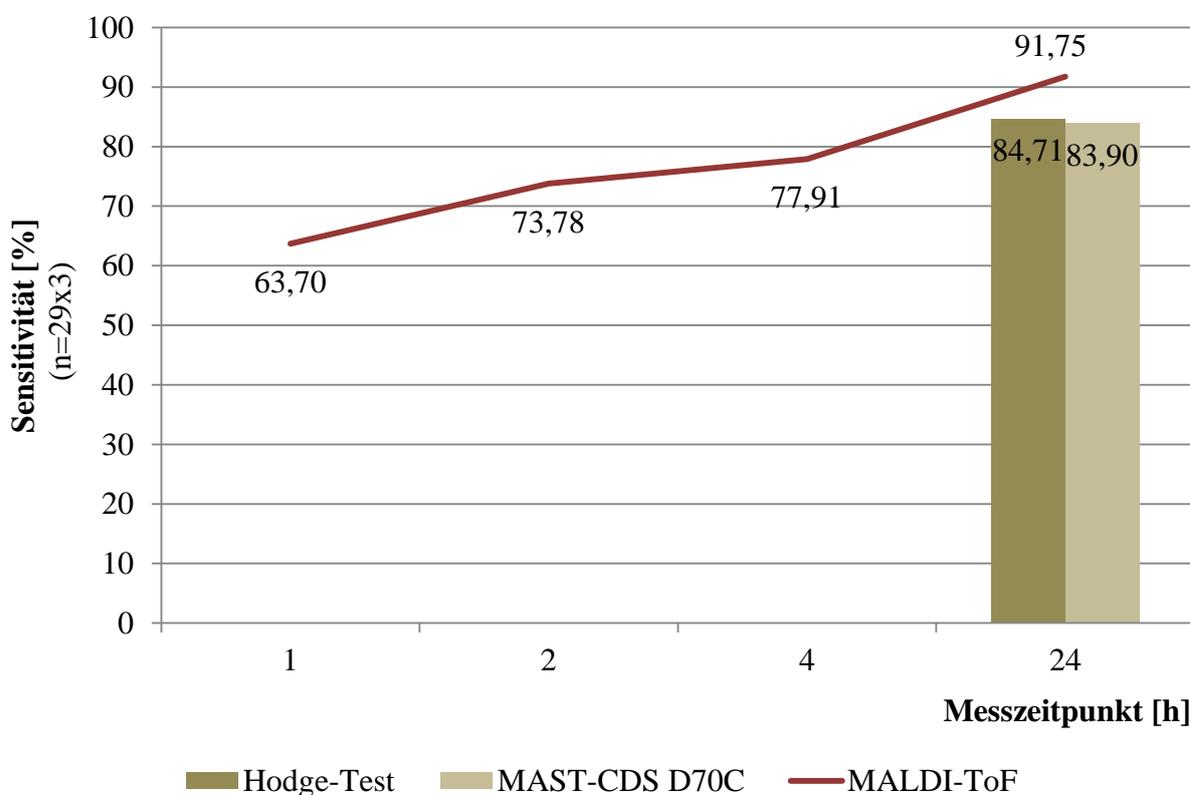
**Tab. 4-1 Messergebnisse NRZ-Referenzstämme Ausgangsmessung und Replikate.** *n/a*: nicht auswertbar. Die Sensitivität der Ausgangsmessung zum Zeitpunkt 24h beträgt 100%. Abfall der Sensitivität durch Einschluss der Replikationsmessungen auf eine Gesamt-Sensitivität von 91,75%. Replikat 1 mit nicht verwertbarer Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt 1h und 24h, Replikat 2 mit falsch-positiver Negativ-Kontrolle zum Zeitpunkt 24h.

<b>Genotyp Cp-positiv (n=29)</b>	<b>Ausgangsmessung</b>	<b>Replikat 1</b>	<b>Replikat 2</b>	<b>Gesamt</b>
<b>1h</b>				
<b>Test Cp-positiv</b>	17	21	15	53
<b>Test Cp-negativ</b>	12	5	14	31
<b>nicht verwertbar</b>	0	3	0	3
<b>Summe</b>	29	29	29	87
<b>Sensitivität [%]</b>	58,62	80,77	51,72	63,70
<b>Negativ-Kontrolle (n=1)</b>	richtig negativ	n/a	richtig negativ	/
<b>2h</b>				
<b>Test Cp-positiv</b>	22	21	18	61
<b>Test Cp-negativ</b>	5	6	11	22
<b>nicht verwertbar</b>	2	2	0	4
<b>Summe</b>	29	29	29	87
<b>Sensitivität [%]</b>	81,49	77,78	62,07	73,78
<b>Negativ-Kontrolle (n=1)</b>	richtig negativ	richtig negativ	richtig negativ	/
<b>4h</b>				
<b>Test Cp-positiv</b>	24	22	21	67
<b>Test Cp-negativ</b>	5	6	8	19
<b>nicht verwertbar</b>	0	1	0	1
<b>Summe</b>	29	29	29	87
<b>Sensitivität [%]</b>	82,76	78,57	72,41	77,91
<b>Negativ-Kontrolle (n=1)</b>	richtig negativ	richtig negativ	richtig negativ	/
<b>24h</b>				
<b>Test Cp-positiv</b>	27	27	23	77
<b>Test Cp-negativ</b>	0	2	5	7
<b>nicht verwertbar</b>	2	0	1	3
<b>Summe</b>	29	29	29	87
<b>Sensitivität [%]</b>	100	93,1	82,14	91,75
<b>Negativ-Kontrolle (n=1)</b>	richtig negativ	n/a	falsch positiv	/

## 4.3 Referenztests

### 4.3.1 Testgütekriterien

Im Vergleich zur MALDI-ToF Messung standen die Messergebnisse der phänotypischen Referenztests (Hodge-Test und MAST-CDS D70C) erst nach 24 Stunden Inkubation der Agarplatten zur Verfügung. Die gemittelte Sensitivität nach dreifacher Testung der Referenzstämme betrug 84,71% für den Hodge-Test und 83,90% für das MAST-Carbapenemase-Detektionsset. Damit lagen beide Tests unter der Sensitivität des MALDI-ToF Verfahrens zum Zeitpunkt 24h (91,75%) (s. Abb. 4-5). Der Carbapenemase-negative *Pseudomonas*-Stamm wurde von beiden Referenztests durchgängig korrekt negativ diagnostiziert. Das MALDI-ToF abhängige Arbeitsprotokoll erzielte Gesamtspezifitäten von jeweils 100% zu den Messzeitpunkten 1h, 2h, 4h. Zum Messzeitpunkt 24h lag die Gesamtspezifität mit einer korrekten, sowie einer falsch-positiven und einer nicht auswertbaren Negativ-Kontrolle bei 50%.



**Abb. 4-5 Vergleich der Gesamtsensitivität nach dreifacher Testung.** Getestet wurden 29 Cp-positive Stämme. Jede Probe wurde dreimal angezchtet und eigenständig getestet (n=29x3). Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messdurchläufen dargestellt. MALDI-ToF zeigt sich nach

24 Stunden gegenüber den Referenztests überlegen und ermöglicht zusätzlich frühzeitige Messergebnisse.

#### 4.3.2 Technische Einschränkungen

Durch abgefallene Antibiotikatestplättchen oder doppelte Hemmhöfe waren zwei Hodge-Tests und fünf MAST-CDS-Tests nicht verwertbar. Damit betrug der Anteil nicht verwertbarer Testungen beim Hodge-Test 2,22% und 5,56% beim MAST-CDS. Das Arbeitsprotokoll erzielte in Bezug auf die Testung der 30 Referenzstämmen mit insgesamt 13 Fehlmessungen über alle Messzeitpunkte eine Fehlerrate von 3,61%. Betrachtet man isoliert den Zeitpunkt 24h zu dem alle Testverfahren verfügbar sind, traten bei MALDI-ToF drei Fehlmessungen auf, was einem Anteil von 3,33% entspricht (s. Tab. 4-2).

**Tab. 4-2 Anteil nicht verwertbarer Messungen verschiedener Testverfahren. MALDI-ToF 24h:** eingeschlossen sind nur Messungen zum Zeitpunkt 24h. 90 Messungen setzten sich aus den 30 Referenzstämmen zusammen, welche dreifach das Messprotokoll durchliefen (30x3Messungen). Die 360 MALDI-ToF Messungen setzten sich aus 30x3 Messungen über jeweils vier Messzeitpunkte nach 1, 2, 4 und 24h zusammen (30x3x4Messungen).

	<b>Gesamtmessungen nicht auswertbar Anteil</b>		
<b>MALDI-ToF gesamt</b>	360	13	3,61%
<b>MADLI-ToF 24h</b>	90	3	3,33%
<b>Hodge-Test</b>	90	2	2,22%
<b>MAST-CDS D70C</b>	90	5	5,56%

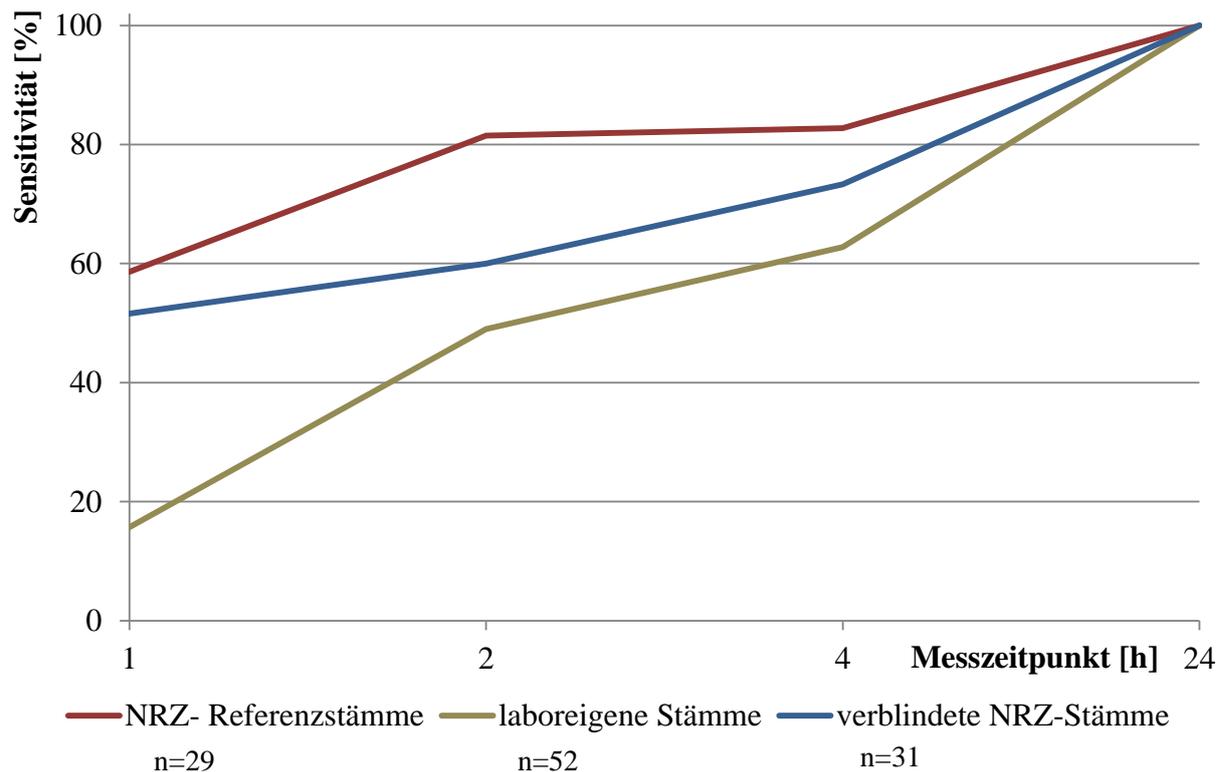
#### 4.4 Laboreigene und initial verblindete NRZ-Stämme

Es fanden neben den 29 Carbapenemase-positiven NRZ-Referenzstämmen weitere MALDI-ToF Messungen an 52 laboreigenen und 31 initial verblindeten Carbapenemase-positiven Erregerproben statt. Tabelle 4-3 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der Messproben nach Carbapenemase-Subtyp.

**Tab. 4-3 Anzahl Carbapenemasen nach Subtyp und Messgruppe.** Inhomogene Verteilung der Carbapenemasen über die verschiedenen Messgruppen. NRZ-Stämme mit nur einer Cp-negativen Verlaufskontrolle. Bei den laboreigenen Stämmen überwiegen OXA- und GIM-Carbapenemasen, bei den initial verblindeten NRZ-Stämmen dominieren Cp-negative und OXA-positive Proben.

<b>Cp-Genotyp</b>	<b>NRZ-Referenzstämme</b>	<b>laboreigene Stämme</b>	<b>verblindete NRZ-Stämme</b>	<b>Gesamt</b>
<b>GIM</b>	1	25	0	26
<b>IMP</b>	2	1	1	4
<b>NDM</b>	2	0	4	6
<b>VIM</b>	9	1	6	16
<b>KPC</b>	6	1	0	7
<b>OXA</b>	9	24	20	53
<b>negativ</b>	1	12	33	46
<b>Gesamt</b>	30	64	64	

Während alle Carbapenemasen nach 24 Stunden Inkubation identifiziert wurden (Sensitivität<sub>24h</sub>: 100%), zeigten sich zu den vorausgegangenen Messzeitpunkten deutliche Unterschiede bei der Carbapenemase-Detektion (s. Abb. 4-6). Die niedrigste Sensitivität zu den Zeitpunkten 1h, 2h und 4h ergab sich bei der Testung der aus überwiegend GIM- und OXA-Carbapenemasen bestehenden laboreigenen Stämme (s. Tab. 4-4). Die eher heterogene Gruppe der NRZ-Referenzstämme (s. Tab. 4-3) erzielte zu den ersten drei Messzeitpunkten die höchste Sensitivität.



**Abb. 4-6 Sensitivität Cp-positiver Proben der MALDI-ToF Messgruppen im Vergleich.** Laboreigene Stämme mit hohem Anteil an GIM- und OXA-Carbapenemasen. Verblindete NRZ-Stämme mit überwiegend OXA-Carbapenemasen. NRZ-Stämme mit heterogener Carbapenemasen-Zusammensetzung (s. Tab. 4-3).

**Tab. 4-4 Sensitivität nach Messgruppe und Messzeitpunkt.** NRZ-Stämme über alle Messzeitpunkte mit der höchsten Sensitivität. Zum Messzeitpunkt 24h erzielen alle Messgruppen eine Sensitivität von 100%.

Messzeitpunkt [h]	1	2	4	24
	<b>Sensitivität [%]</b>			
NRZ- Referenzstämmen(n=29)	58,62	81,49	82,76	100
laboreigene Stämme(n=52)	15,69	49,02	62,75	100
verblindete NRZ-Stämme(n=31)	51,61	60	73,33	100

## 4.5 Gesamtauswertung MALDI-ToF Messungen

Insgesamt wurden 158 unterschiedliche Messproben anhand des entwickelten MALDI-ToF Protokolls getestet. Die Proben setzten sich aus drei Gruppen zusammen (s. Tab. 4-3). Es wurden 112 genotypisch Carbapenemase-positive und 46 Carbapenemase-negative Erreger getestet.

**Tab. 4-5 Zusammensetzung der Messproben.** *Cp-positiv/negativ*: Genotyp. Anzahl der Proben nach Messgruppe.

	NRZ-Referenzstämmen	laboreigene Stämme	verblindete NRZ-Stämme	Gesamt
<b>Cp-positiv</b>	29	52	31	112
<b>Cp-negativ</b>	1	12	33	46
<b>Gesamt</b>	30	64	64	158

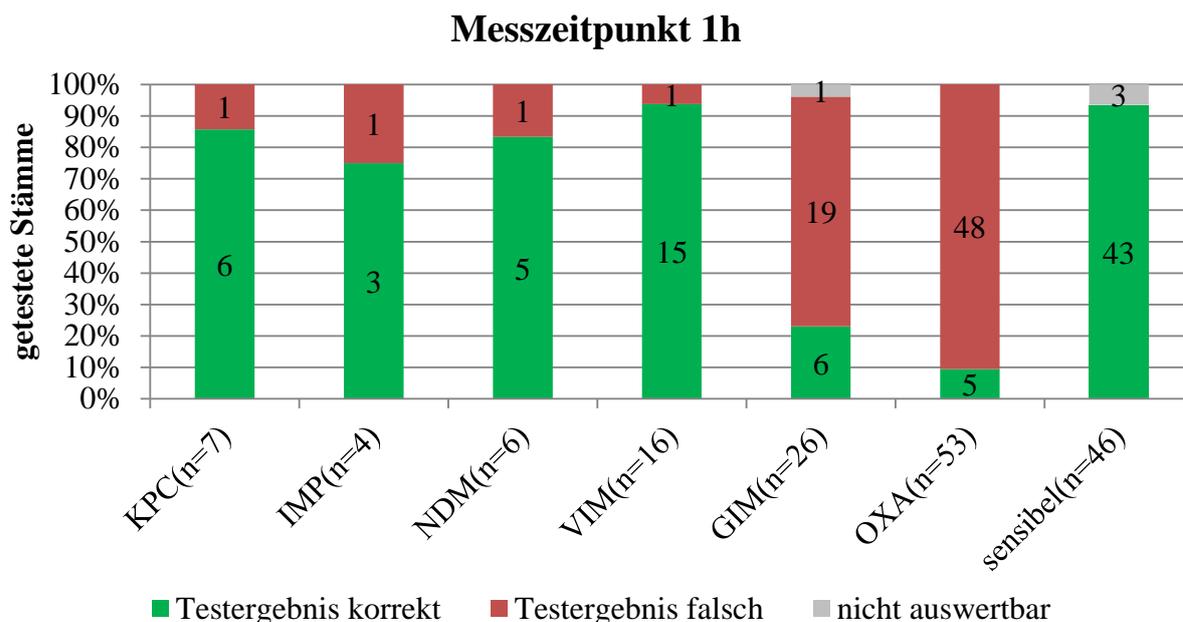
### 4.5.1 Messzeitpunkt nach einer Stunde (1h)

Zum Messzeitpunkt nach einer Stunde (1h) konnten unabhängig vom Resistenztypus durch Anwendung des Protokolls 83 der 158 Erreger (52,5%) korrekt in resistente und sensible Stämme differenziert werden. 43 der 46 sensiblen Stämme (93,5%) wiesen eine Ratio<1 auf und wurden somit korrekt als Carbapenemase-negativ diagnostiziert. Drei sensible Stämme zeigten fehlerhafte Spektren und wurden somit zu diesem Messzeitpunkt von der Auswertung ausgeschlossen. 40 Carbapenemase-bildende Erreger konnten bereits nach einer Stunde korrekt diagnostiziert werden. 71 Carbapenemase-positive Erreger wurden mit einer Ratio<1 fälschlicherweise als Carbapenemase-negativ eingestuft. Ein positiver Stamm konnte nicht automatisiert ausgewertet werden (s. Tab. 4-6).

**Tab. 4-6 Auswertung Messzeitpunkt 1h.** *n=112*: Anzahl genotypisch Carbapenemase-positive Erreger; *n=46*: Anzahl genotypisch Carbapenemase-negativer Erreger; *n=158*: Anzahl aller getesteten Erreger.

Messzeitpunkt 1h	positive Erreger (n=112)	[%]	negative Erreger (n=46)	[%]	[%]gesamt (n=158)
<b>Ergebnis richtig-positiv (n=112)</b>	40	35,71%	/	/	25,32%
<b>Ergebnis richtig-negativ (n=46)</b>	/	/	43	93,48%	27,22%
<b>Ergebnis falsch-positiv (n=112)</b>	/	/	0	0%	0%
<b>Ergebnis falsch-negativ (n=46)</b>	71	63,39%	/	/	44,94%
<b>nicht auswertbar</b>	1	0,89%	3	6,52%	2,53%

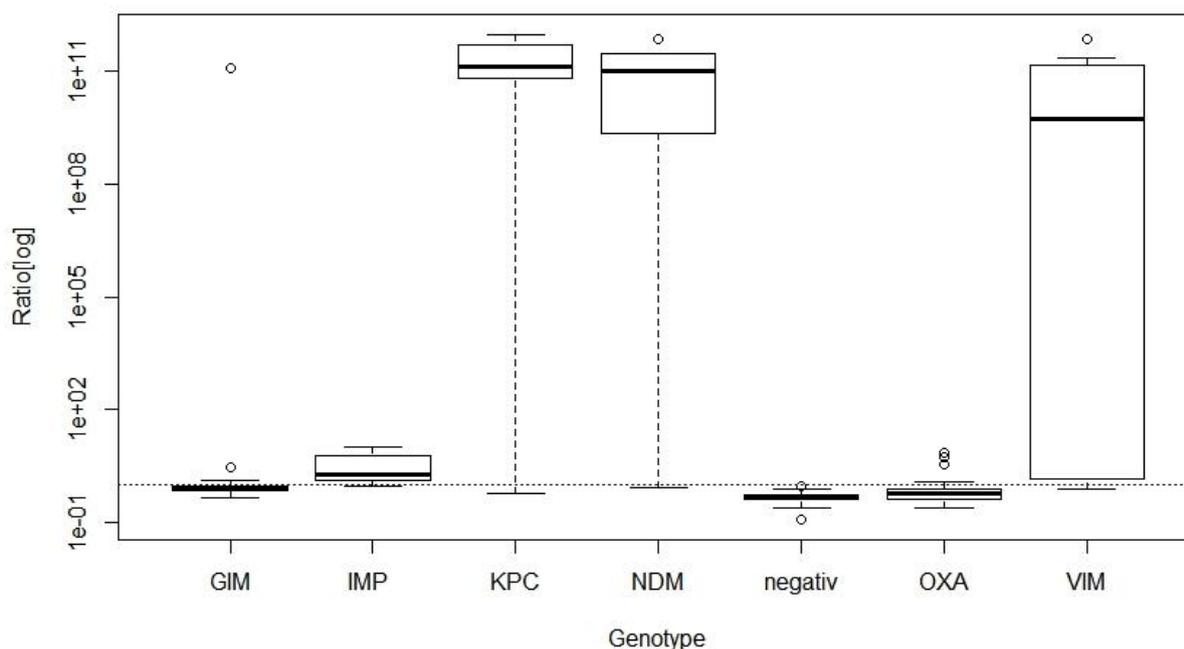
Betrachtet man einzelne Carbapenemasegruppen wurde nach einer Stunde bei Carbapenemasen vom KPC-, IMP-, NDM- und VIM-Typ jeweils nur ein Erreger fälschlicherweise als Carbapenemase-negativ eingestuft. Der Großteil der 71 falsch-negativ diagnostizierten Stämme verteilte sich auf Carbapenemasen vom GIM- (19 aus 26) und OXA-Carabapenemasen (48 aus 53). Alle verwertbaren Messspektren Carbapenemase-negativer Erreger konnten als sensibel diagnostiziert werden (s. Abb. 4-7).



**Abb. 4-7 Differenzierung Carbapenemase-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 1h.** *Getestete Stämme:* Prozentuale Darstellung getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase (z.B. KPC); *n:* Gesamtanzahl getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase. Weitgehend korrekte Identifizierung KPC-, IMP-, NDM- und VIM-positiver Stämme. GIM- und OXA-positive Stämme mit überwiegend falsch negativen Messergebnissen. Korrekte Identifizierung Carbapenemase-negativer Stämme.

Abbildung 4-8 stellt die Verteilung der Ratiowerte zum Messzeitpunkt 1h dar. Anhand der gepunkteten horizontalen Linie ist eine Unterscheidung in Carbapenemase-positive und negative Messergebnisse möglich (Ratio=1). Ratiowerte für genotypisch GIM- und OXA-Carbapenemase-positive Erreger lagen überwiegend im Carbapenemase-negativen Bereich. Unter den GIM-Carbapenemasen trat ein einzelner deutlich positiver Ausreiser auf, während der obere Whisker bereits einige Carbapenemase-positive Werte auf niedrigem Niveau einschloss. Unter den genotypisch OXA-positiven Stämmen befanden sich ebenfalls vereinzelt positive Ausreiser jenseits des oberen Whisker. Das Maximum OXA-positiver Stämme befand sich nur

geringfügig über dem Grenzwert  $R=1$ . KPC-, NDM- und VIM-Carbapenemasen zeigten deutlich Carbapenemase-positive Werte. IMP-Carbapenemasen zeigten zwar überwiegend positive Werte, aber auf deutlich niedrigerem Niveau als Carbapenemasen des KPC-, NDM-, und VIM-Typs. Der untere Whisker schloss bei KPC-, NDM-, VIM- und IMP-Carbapenemasen jeweils einen falsch-negativ getesteten Erreger ein. Alle genotypisch negativen Erreger erzeugten Messergebnisse mit einer  $\text{Ratio} < 1$  (s. Abb. 4-8).



**Abb. 4-8 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 1h.** Aufbau Boxplot (von unten nach oben): unterer Whiskers=Minimum; unteres Quartil=25% Perzentil; Median; oberes Quartil=75% Perzentil; oberer Whiskers=Maximum; *Kreise*: Ausreißer; *horizontale gepunktete Linie*: Cut-off Ratio  $R=1$ . IMP-, KPC-, NDM- und VIM-Carbapenemasen weisen bereits nach 1h Inkubation Ratiowerte deutlich  $> 1$  auf.

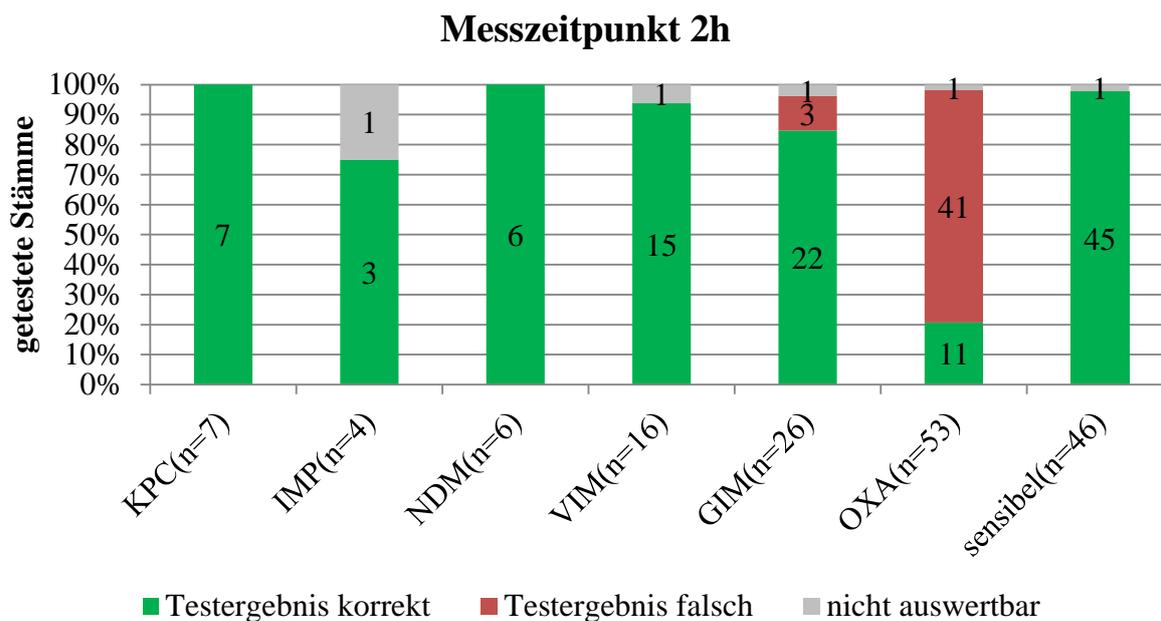
#### 4.5.2 Messzeitpunkt nach zwei Stunden (2h)

Zum Messzeitpunkt 2h stieg der Anteil detektierter Carbapenemaseträger auf 57,14% der 112 positiven Proben. 44 Carbapenemasen wiesen keine ausreichend hohen Ratiowerte auf, um als resistent eingestuft zu werden. Vier positive Proben waren nicht auswertbar. Auch nach zwei Stunden wurden mit Ausnahme der nicht auswertbaren Spektren alle Carbapenemase-negativen Erreger als negativ eingestuft (s. Tab. 4-7).

**Tab. 4-7 Auswertung Messzeitpunkt 2h.** *n=112*: Anzahl genotypisch Carbapenemase-positive Erreger; *n=46*: Anzahl genotypisch Carbapenemase-negativer Erreger; *n=158*: Anzahl aller getesteten Erreger.

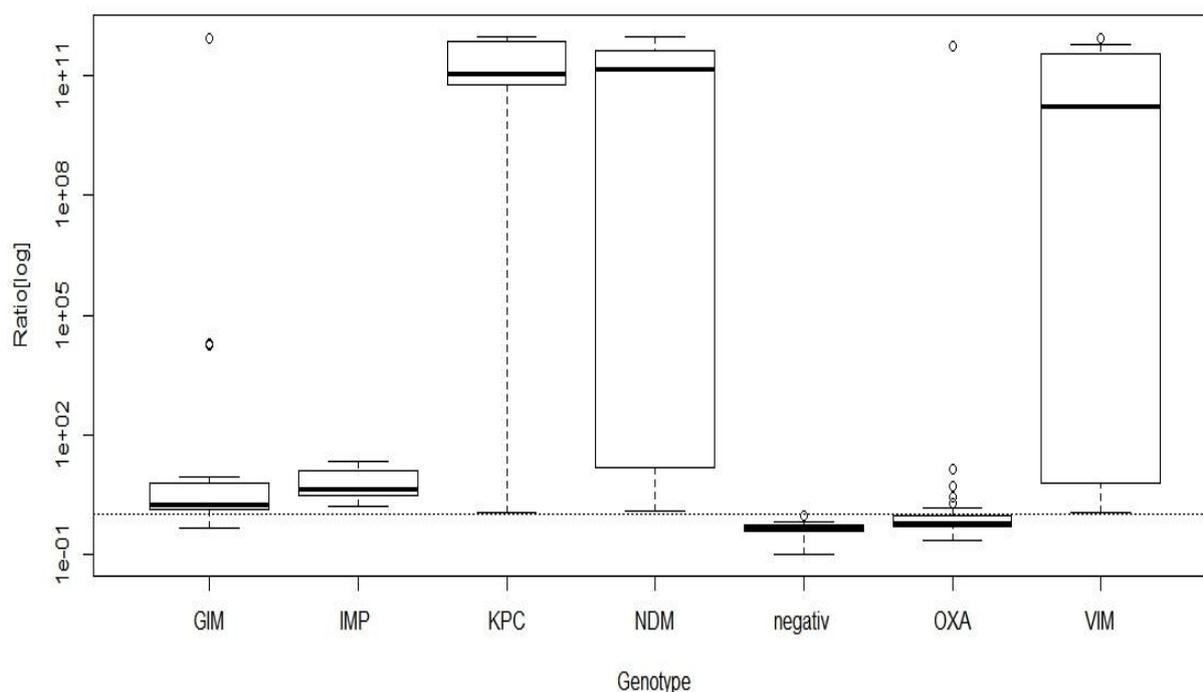
Messzeitpunkt 2h	positive Erreger		negative Erreger		Anteil gesamt (n=158)
	(n=112)	[%]	(n=46)	[%]	
<b>Ergebnis richtig positiv (n=112)</b>	64	57,14%	/	/	40,51%
<b>Ergebnis richtig negativ (n=46)</b>	/	/	45	97,83%	28,48%
<b>Ergebnis falsch positiv (n=112)</b>	/	/	0	0%	0%
<b>Ergebnis falsch-negativ (n=46)</b>	44	39,29%	/	/	27,85%
<b>nicht auswertbar</b>	4	3,57%	1	2,17%	3,16%

In der Aufschlüsselung der positiven Erreger zum Zeitpunkt 2h zeigte sich das alle verwertbaren Spektren Carbapenemase-positiver Proben mit Ausnahme von Carbapenemasen des GIM- und OXA-Typs korrekt als positiv diagnostiziert wurden. Unter den GIM-positiven Erregern stieg der Anteil detektierter Stämme von sechs zum Zeitpunkt 1h auf 22 der 26 Stämme zum Zeitpunkt 2h. Unter den OXA-Carbapenemaseträgern konnten im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt sechs weitere Stämme detektiert werden, womit elf der 53 positiven Stämme erkannt wurden. 41 der insgesamt 44 falsch-negativen Proben konnten Carbapenemasen vom OXA-Typ zugeschrieben werden (s. Abb. 4-9).



**Abb. 4-9 Differenzierung Carbapenemase-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 2h.** *Getestete Stämme:* Prozentuale Darstellung getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase (z.B. KPC); *n:* Gesamtanzahl getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase. Korrekte Diagnose KPC-, IMP-, NDM- und VIM-positiver Stämme. Diagnose GIM-positiver Stämme mit deutlichem Anstieg gegenüber dem ersten Messpunkt. Weiterhin geringe Anzahl identifizierter OXA-positiver Stämme. Korrekte Identifizierung Carbapenemase-negativer Stämme.

Das erste Quartil der Ratiowerte GIM-positiver Stämme lag nach zwei Stunden Inkubation bereits größtenteils über der Cut-off Ratio von 1. Somit konnte ein Großteil der GIM-tragenden Erreger korrekt als Carbapenemase-positiv identifiziert werden. OXA-Carbapenemasen zeigten weiterhin überwiegend Werte  $< 1$  an, auch wenn im Vergleich zum Messpunkt 1h bereits mehr Proben als Carbapenemase-positiv identifiziert werden konnten. KPC-, NDM-, VIM- und IMP-Carbapenemasen lieferten eine ähnliche Werteverteilung wie zum Zeitpunkt 1h, wobei sämtliche Ratiowerte dieser Carbapenemasen oberhalb des Cut-offs lagen. Alle Carbapenemase-negativen Erreger erzielten weiterhin Ratiowerte unterhalb des Carbapenemase-positiven Grenzwertes (s. Abb. 4-10).



**Abb. 4-10 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 2h.** Aufbau Boxplot (von unten nach oben): unterer Whiskers=Minimum; unteres Quartil=25% Perzentil; Median; oberes Quartil=75% Perzentil; oberer Whiskers=Maximum; Kreise: Ausreißer; horizontale gepunktete Linie: Cut-off Ratio  $R=1$ . Im Vergleich zum Messpunkt 1h liegt auch der Median der GIM-Carbapenemasen  $> R=1$ . OXA-Carbapenemasen weiterhin überwiegend im Carbapenemase-negativen Bereich von  $R<1$ .

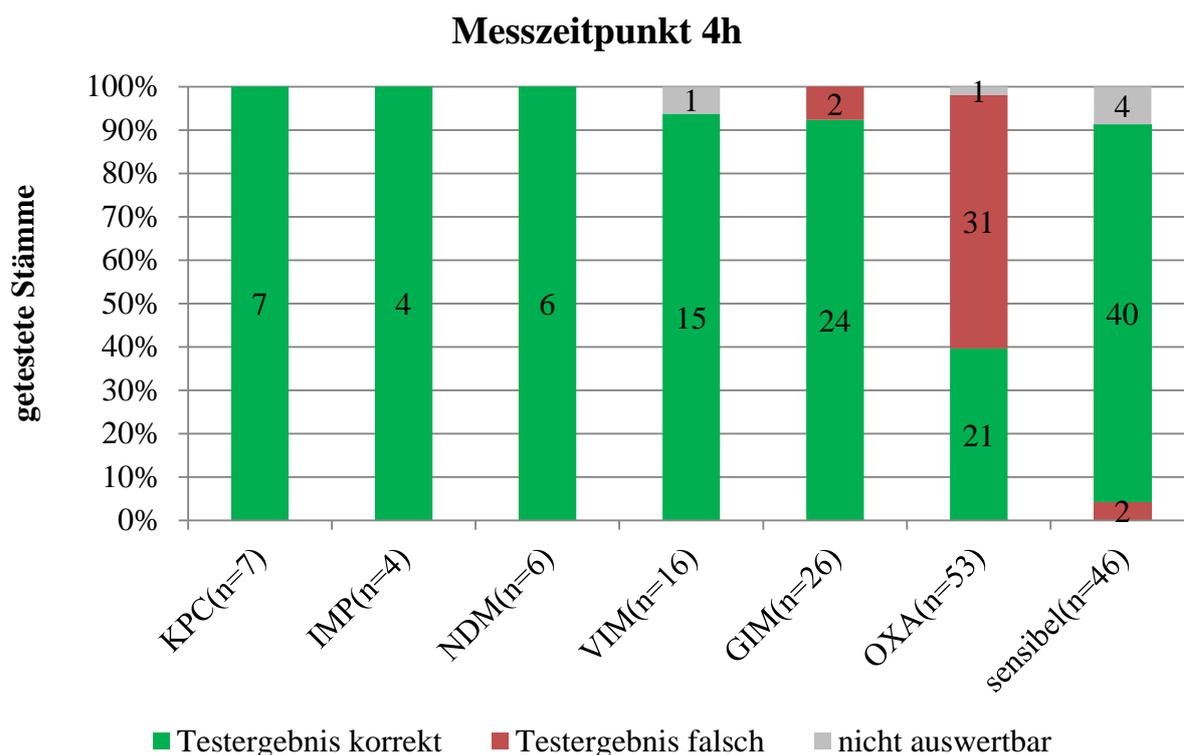
#### 4.5.3 Messzeitpunkt nach vier Stunden (4h)

Nach vier Stunden Inkubation der Ertapenem-Bakterien-Suspension stieg die Anzahl korrekt diagnostizierter Carbapenemaseträger auf 77. Zum ersten Mal während der Messung traten nach vier Stunden falsch-positive Ergebnisse auf, indem zwei Carbapenemaseträger Ratiowerte  $> 1$  aufwiesen. 33 positive Erreger konnten auch zu diesem Zeitpunkt nicht identifiziert werden. Insgesamt 6 der 158 Messungen erzeugen fehlerhafte Messspektren (s. Tab. 4-8).

**Tab. 4-8 Auswertung Messzeitpunkt 4h.** *n=112*: Anzahl genotypisch Carbapenemase-positive Erreger; *n=46*: Anzahl genotypisch Carbapenemase-negativer Erreger; *n=158*: Anzahl aller getesteten Erreger.

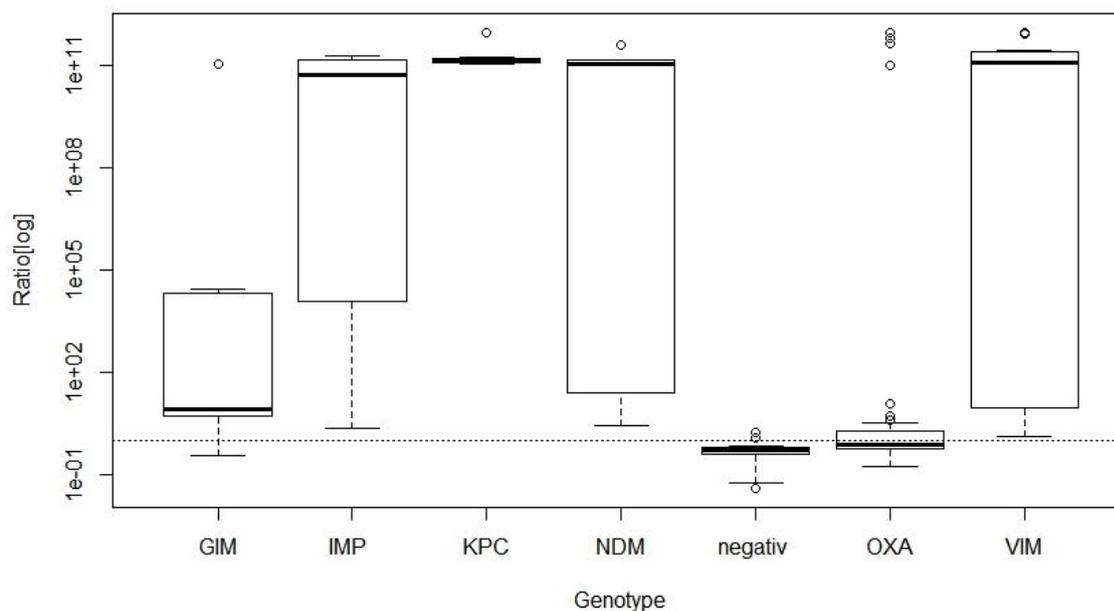
Messzeitpunkt 4h	positive Erreger (n=112)	[%]	negative Erreger (n=46)	[%]	[%]gesamt (n=158)
<b>Ergebnis richtig positiv (n=112)</b>	77	68,75%	/	/	48,73%
<b>Ergebnis richtig negativ (n=46)</b>	/	/	40	86,96%	25,32%
<b>Ergebnis falsch positiv (n=112)</b>	/	/	2	4%	1%
<b>Ergebnis falsch-negativ (n=46)</b>	33	29,46%	/	/	20,89%
<b>nicht auswertbar</b>	2	1,79%	4	8,70%	3,80%

Ähnlich den Messungen zum Zeitpunkt 2h handelte es sich auch nach vier Stunden bei den nicht detektierten Carbapenemaseträgern vorrangig um Carbapenemasen vom OXA-Typ. Zwar stieg der Anteil von elf auf 21 korrekt diagnostizierter OXA-Carbapenemaseträger im Vergleich zur Messung nach zwei Stunden, aber weiterhin blieben ca. 58% der OXA-Carbapenemasen unentdeckt. Daneben zeigten zwei Carbapenemasen vom GIM-Typ einen unzureichenden Ertapenemabbau mit Ratiowerten im sensiblen Bereich. Der Anteil nicht erkannter Carbapenemasen unter allen 112 resistenten Stämmen belief sich auf ca. 29%. Alle verwertbaren Spektren der Carbapenemasen vom KPC, IMP, NDM und VIM-Typ konnten identifiziert werden (s. Abb. 4-11).



**Abb. 4-11 Differenzierung Carbapenemase-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 4h.** *Getestete Stämme:* Prozentuale Darstellung getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase (z.B. KPC); *n:* Gesamtanzahl getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase. Korrekte Diagnose KPC-, IMP-, NDM- und VIM-positiver Stämme. Weitere Zunahme an korrekt diagnostizierten GIM-positiven Stämmen gegenüber den vorherigen Messpunkten. Weiterhin unzureichende Diagnose OXA-positiver Stämme. Erstmals falsch-positive Messungen bei genotypisch Carbapenemase-negativen Stämmen.

Bei den erzielten Ratiowerten kam es im Vergleich zum Messzeitpunkt 2h zu einem sichtbaren Anstieg der IMP-Ratiowerte innerhalb des Carbapenemase-positiven Wertebereichs auf das Niveau der KPC-, NDM-, und VIM-Carbapenemasen. Unter den GIM-Carbapenemasen wurden ebenfalls höhere Werte als nach zwei Stunden Inkubation erzielt. Ähnlich dem Messzeitpunkt 2h verlief die Cut-off-Grenze bei GIM-tragenden Erregern zwischen dem Minimum und dem ersten Quartil. Trotz insgesamt deutlich höherer Ratiowerte konnten somit in Bezug auf die Messung nach zwei Stunden nur zwei weitere GIM-Carbapenemasen identifiziert werden. Bei OXA-Carbapenemaseträgern lag der erzielt Mittelwert der Ratio weiterhin unterhalb der Detektionsgrenze. Das dritte Quartil schloss nach vier Stunden aber bereits Ratiowerte  $> 1$  mit ein. Unter den Carbapenemase-negativen Erregern lagen die Ergebnisse innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstand weiterhin unterhalb des Cut-offs. Zwei positive Ausreiser ergaben jedoch falsch-positive Werte  $> 1$  (s. Abb. 4-12).



**Abb. 4-12 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 4h.** Aufbau Bloxplot (von unten nach oben): unterer Whiskers=Minimum; unteres Quartil=25% Perzentil; Median; oberes Quartil=75% Perzentil; oberer Whiskers=Maximum; Kreise: Ausreißer; horizontale gepunktete Linie: Cut-off Ratio  $R=1$ . Im Vergleich zum Messpunkt 2h erste falsch-positive Ausreißer.

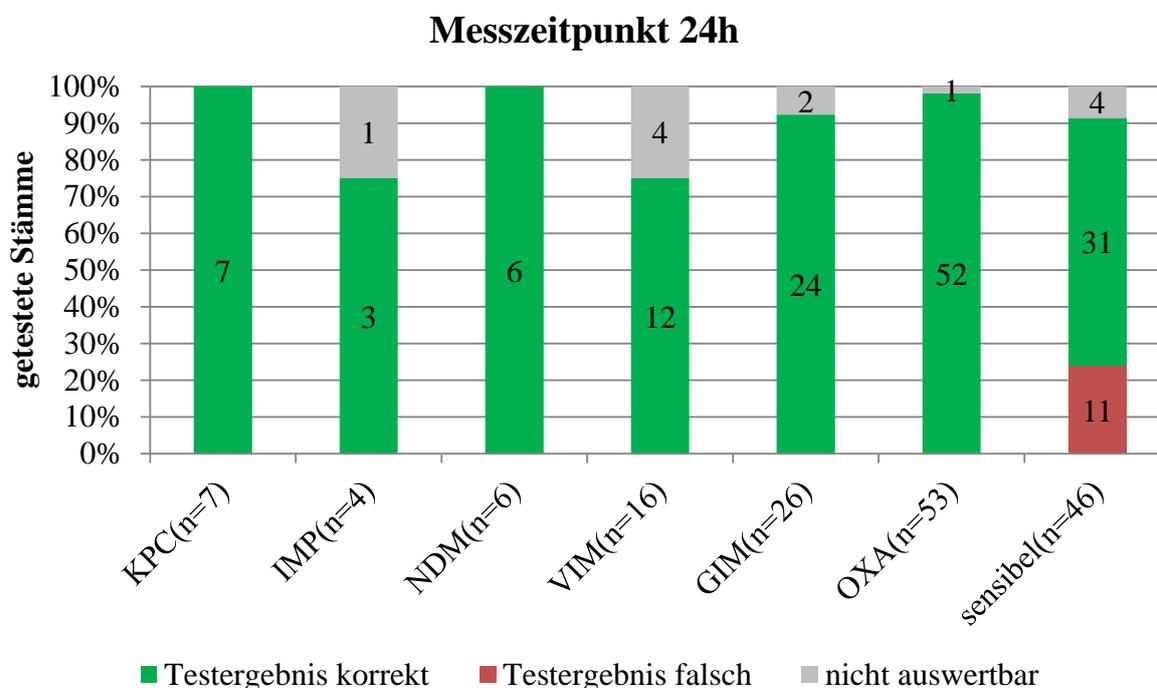
#### 4.5.4 Messzeitpunkt 24 Stunden (24h)

Nach 24 Stunden Inkubation zeigten mit Ausnahme von acht nicht verwertbaren Spektren alle Carbapenemaseträger Ratiowerte im resistenten Bereich  $> 1$  an. Die Anzahl falsch-positiver Erreger stieg auf elf Stämme an. Vier der sensiblen Proben waren nicht auswertbar (s. Tab. 4-9).

**Tab. 4-9 Auswertung Messzeitpunkt 24h.**  $n=112$ : Anzahl genotypisch Carbapenemase-positive Erreger;  $n=46$ : Anzahl genotypisch Carbapenemase-negative Erreger;  $n=158$ : Anzahl aller getesteten Erreger.

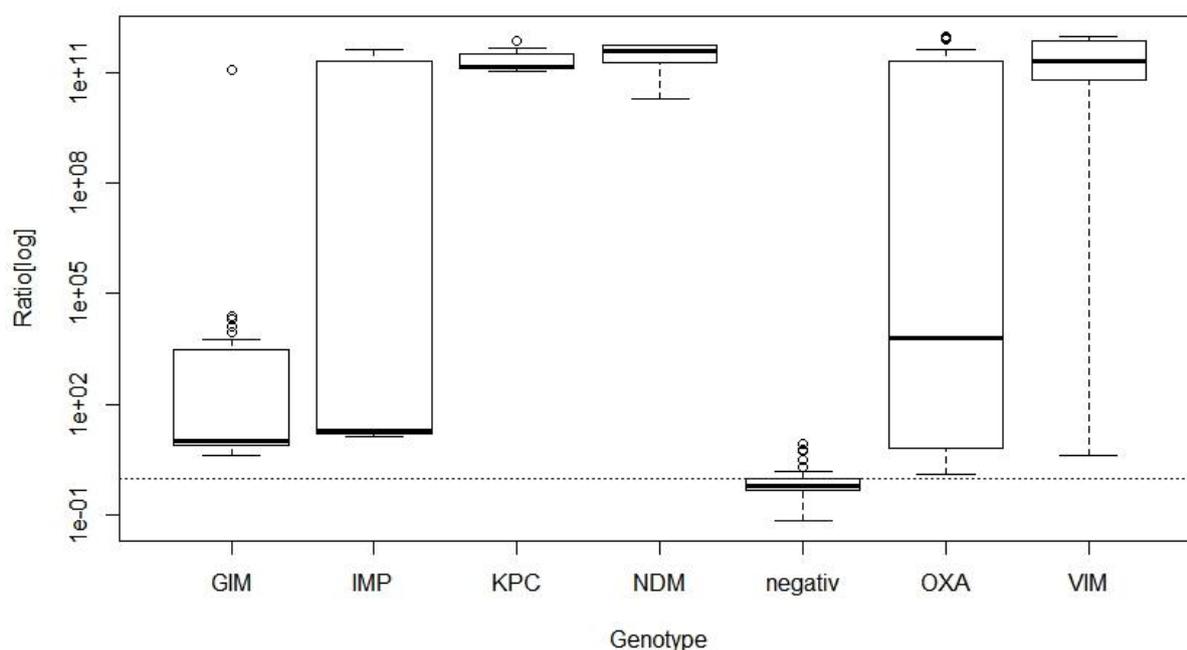
Messzeitpunkt 24h	positive Erreger (n=112)		negative Erreger (n=46)		[%]gesamt (n=158)
		[%]		[%]	
Ergebnis richtig positiv (n=112)	104	92,86%	/	/	65,82%
Ergebnis richtig negativ (n=46)	/	/	31	67,39%	19,62%
Ergebnis falsch positiv (n=112)	/	/	11	24%	7%
Ergebnis falsch-negativ (n=46)	0	0,00%	/	/	0,00%
nicht auswertbar	8	7,14%	4	8,70%	7,59%

Gegenüber der Messung zum Zeitpunkt 4h zeigten nach 24 Stunden sämtliche verwertbare OXA- und GIM-Carbapenemase-Spektren eine deutliche Ertapenemhydrolyse (s. Abb. 4-13).



**Abb. 4-13 Differenzierung Carbapenemase-positiver und negativer Proben zum Messzeitpunkt 24h.** *Getestete Stämme*: Prozentuale Darstellung getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase (z.B. KPC); *n*: Gesamtanzahl getesteter Stämme einer spezifischen Carbapenemase. Korrekte Diagnose aller Carbapenemase-positiven Stämme. Anstieg falsch-positiver Messungen bei genotypisch Carbapenemase-negativen Stämmen.

Die berechnete Ratio aller genotypischen Carbapenemase-positiven Stämme lag nach 24 Stunden über der Detektionsgrenze. KPC-, NDM-, und VIM-Carbapenemasen erzielten auch nach 24 Stunden höhere Werte als IMP-, GIM-, und OXA-Carbapenemasen. Der obere Whisker Carbapenemase-negativer Erreger schloss Werte  $> 1$  ein, wobei das obere Quartil unterhalb des Cut-offs lag (s. Abb. 4-14)



**Abb. 4-14 Boxplot Ratio nach Genotyp zum Zeitpunkt 24h.** Aufbau *Bloxplot* (von unten nach oben): unterer Whiskers=Minimum; unteres Quartil=25% Perzentil; Median; oberes Quartil=75% Perzentil; oberer Whiskers=Maximum; *Kreise*: Ausreißer; *horizontale gepunktete Linie*: Cut-off Ratio  $R=1$ . Im Vergleich zum Messpunkt 4h alle Carbapenemasen mit Ratiowerten  $> 1$ ; Zunahme falsch-positiver Ergebnisse.

#### 4.5.5 Analyse falsch positiver und negativer Messergebnisse nach Erregergattung

Zum Zeitpunkt 1h wurden insgesamt 14 *Enterobacteriaceae* als falsch-negativ diagnostiziert. Darunter befanden sich zwölf OXA-Carbapenemaseträger (80% der OXA-positiven *Enterobacteriaceae*;  $n=15$ ), sowie je ein Erreger mit einer Carbapenemase vom KPC- und VIM-Typ. 56 Carbapenemase-positive *Acinetobacter baumannii* Stämme wiesen Werte von  $R < 1$  auf. Sie setzten sich aus 36 OXA-Carbapenemasen (94,74% der OXA-positiven *Ac. baumannii* Stämme) 19 GIM-Carbapenemasen (79,17%) und einer NDM-Carbapenemase zusammen. Ein IMP-positiver *Pseudomonas aeruginosa* Stamm zeigte ebenfalls sensible Werte nach einer Stunde Inkubation. Nach zwei Stunden reduzierten sich die phänotypisch falsch-negativ diagnostizierten *Enterobacteriaceae* auf sechs (40%) genotypisch OXA-positive Proben. Weitere 35 OXA-Carbapenemaseträger (92,11%) des *Acinetobacter baumannii* Komplex, sowie drei GIM-positiv (12,50%) Stämme dieses Erregers blieben ebenfalls negativ. Zum Messzeitpunkt 4h blieben noch zwei (13,33%) OXA-positive *Enterobacteriaceae*, zwei (76,32%) OXA-positiv

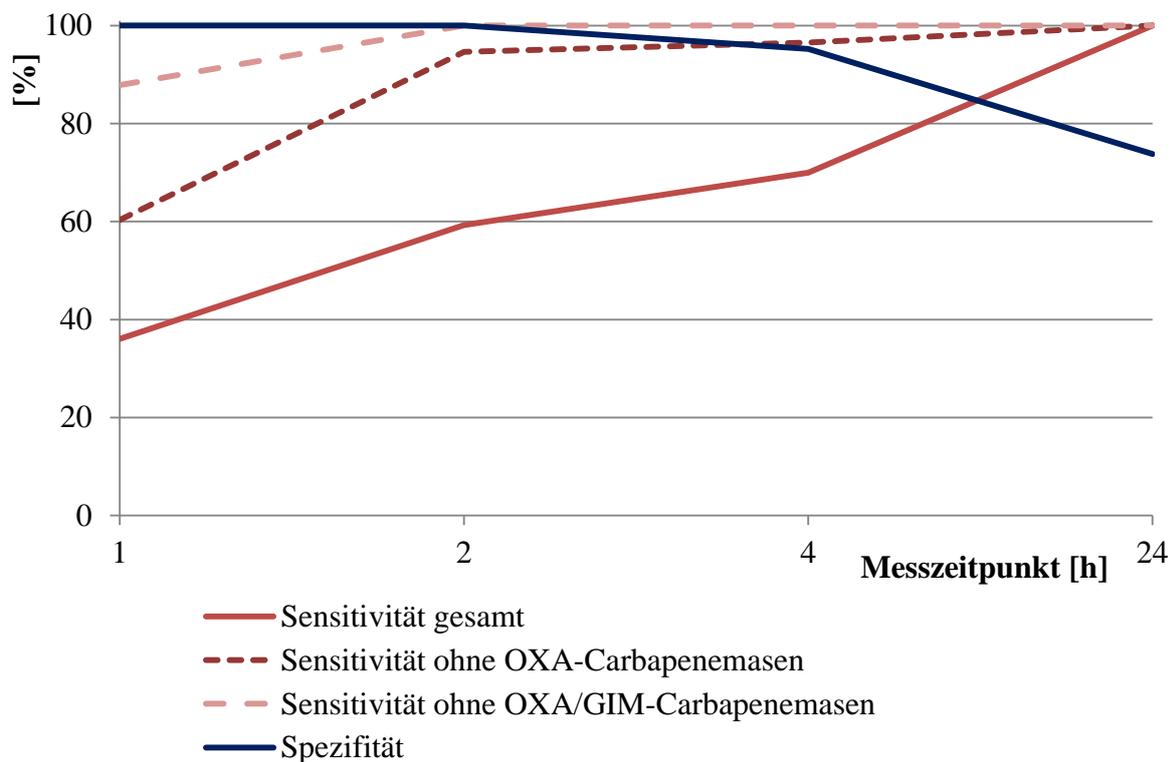
und zwei (8,33%) GIM-positive *Acinetobacter baumannii*-Proben unerkannt. Nach 24 Stunden konnten alle Carbapenemase-positiven Stämme richtig diagnostiziert werden. Bei den elf genotypisch sensiblen Stämmen, die nach 24 Stunden als resistent angezeigt wurden handelte es sich um neun *Enterobacteriaceae* (27,27%) und zwei der drei sensiblen *Acinetobacter baumannii* (66,67%) Stämme (s. Tab. 4-10).

**Tab. 4-10 Prozentualer Anteil falsch-negativer/-positiver Messungen nach Erregerspektrum.** Eingeschlossen sind zum jeweiligen Messzeitpunkt nur Carbapenemasen/Erreger bei denen es zu falsch-positiven/negativen Messergebnissen kam.  $n_{ges}$ : Probenumfang der jeweiligen Carbapenemasen;  $n$ : Anzahl Carbapenemaseträger der jeweiligen Erregerfamilie. Ein Carbapenemase-negativer *Achromobacter xylosoxidans* zeigte als eigene Erregergruppe zu allen Messpunkten richtig-negative Ergebnisse und ist somit nicht dargestellt.

Genotyp	Phänotyp falsch-negativ/positiv Enterobacteriaceae	Phänotyp falsch-negativ/positiv <i>Ac. baumannii</i>	Phänotyp falsch-negativ/positiv Pseudomonas
<b>Messzeitpunkt 1h</b>			
KPC ( $n_{ges}=7$ )	14,29% (n=7)	/	/
IMP ( $n_{ges}=4$ )	0,00% (n=1)	/	33,33% (n=3)
NDM ( $n_{ges}=6$ )	0,00% (n=5)	100,00% (n=1)	/
VIM ( $n_{ges}=16$ )	9,09% (n=11)	/	0,00% (n=5)
GIM ( $n_{ges}=26$ )	0,00% (n=2)	79,17% (n=24)	/
OXA ( $n_{ges}=53$ )	80,00% (n=15)	94,74% (n=38)	/
Sensibel ( $n_{ges}=46$ )	0,00% (n=33)	0,00% (n=3)	0,00% (n=9)
<b>Messzeitpunkt 2h</b>			
GIM ( $n_{ges}=26$ )	0,00% (n=2)	12,50% (n=24)	/
OXA ( $n_{ges}=53$ )	40,00% (n=15)	92,11% (n=38)	/
Sensibel ( $n_{ges}=46$ )	0,00% (n=33)	0,00% (n=3)	0,00% (n=9)
<b>Messzeitpunkt 4h</b>			
GIM ( $n_{ges}=26$ )	0,00% (n=2)	8,33% (n=24)	/
OXA ( $n_{ges}=53$ )	13,33% (n=15)	76,32% (n=38)	/
Sensibel ( $n_{ges}=46$ )	3,03% (n=33)	33,33% (n=3)	0,00% (n=9)
<b>Messzeitpunkt 24 h</b>			
Sensibel ( $n_{ges}=46$ )	27,27% (n=33)	66,67% (n=3)	0,00% (n=9)

#### 4.5.6 Kinetik

Unter Anwendung des Arbeitsprotokolls konnte nach einer Stunde Inkubation mittels MALDI-ToF-Messung eine vom Carbapenemase-Typ unabhängige Sensitivität von 36,04% erzielt werden. Unter Ausschluss von Carbapenemasen des OXA-Typs betrug die Sensitivität nach einer Stunde 60,34% und unter Ausschluss von Carbapenemasen vom OXA- und GIM-Typ 87,88% (s. Abb. 4-15 und Tab. 4-11).



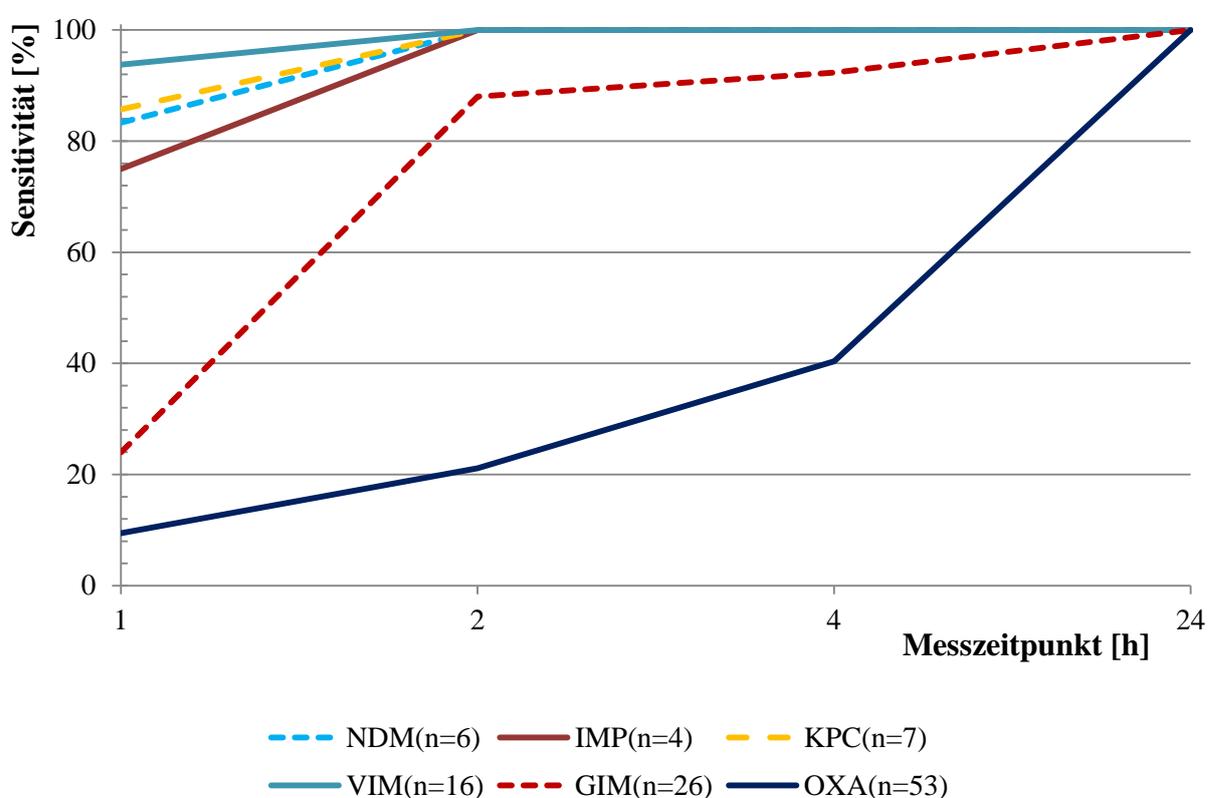
**Abb. 4-15 Sensitivität und Spezifität im Zeitverlauf.** Durch Ausschluss von OXA-, bzw. OXA- und GIM-Carbapenemasen kann eine Steigerung der Sensitivität zu frühen Messzeitpunkten erzielt werden. Gesamt-Sensitivität/Spezifität weisen eine gegenläufige Kinetik auf.

**Tab. 4-11 Übersicht Sensitivität und Spezifität nach Messzeitpunkt und Genotyp.** Nach 2h Inkubation lässt sich durch Ausschluss von OXA-/GIM-Carbapenemasen eine Sensitivität von 100% bei einer Spezifität von ebenfalls 100% erzielen. Nach 24h konnte auch ohne Ausschluss eine Sensitivität für alle Carbapenemasen von 100%, bei gleichzeitig niedriger Spezifität (73,81%) erzielt werden.

	<b>Sensitivität</b> [%]	<b>95%-KI</b> [%]	<b>Spezifität</b> [%]	<b>95%-KI</b> [%]
<b>1h</b>				
Gesamt (n=158)	36,04	27,10-44,97	100	100-100
ohne OXA (n=105)	60,34	47,76-72,93	100	100-100
ohne GIM/OXA (n=79)	87,88	76,74-99,01	100	100-100
<b>2h</b>				
Gesamt (n=158)	59,26	49,99-68,53	100	100-100
ohne OXA (n=105)	94,64	88,75-100,54	100	100-100
ohne GIM/OXA (n=79)	100	100-100	100	100-100
<b>4h</b>				
Gesamt (n=158)	70,00	61,44-78,56	95,24	88,80-101,68
ohne OXA (n=105)	96,55	91,89-101,25	95,24	88,80-101,68
ohne GIM/OXA (n=79)	100	100-100	95,24	88,80-101,68
<b>24h</b>				
Gesamt (n=158)	100	100-100	73,81	60,51-87,11
ohne OXA (n=105)	100	100-100	73,81	60,51-87,11
ohne GIM/OXA (n=79)	100	100-100	73,81	60,51-87,11

Nach zwei Stunden stieg die Gesamt-Sensitivität auf 59,26% an. Ohne Berücksichtigung von OXA-Carbapenemasen lag sie bei 94,64%. Wurden zusätzlich zu OXA-Carbapenemasen auch Carbapenemasen vom GIM-Typ von der Berechnung ausgeschlossen, konnte eine Sensitivität von 100% nach zwei Stunden Inkubation erzielt werden. Nach vier Stunden lag sie Sensitivität bei 70% unter Betrachtung aller Carbapenemasen, 96,55% unter Ausschluss der OXA-Carbapenemasen und 100% ohne Miteinbeziehung von OXA- und GIM-Carbapenemasen. 24 Stunden nach Inkubationsbeginn konnte unabhängig vom Carbapenemase-Typ eine Sensitivität von 100% erzielt werden. Bei der Betrachtung der Spezifität konnte eine gegenläufige Entwicklung betrachtet werden. Betrug die Spezifität nach ein und zwei Stunden Inkubation jeweils 100%, lag sie nach vier Stunden bei 95,24% und nach 24 Stunden bei 73,81%. Betrachtet man die Kinetik einzelner Carbapenemase-Typen konnten für VIM, KPC, NDM und IMP-Carbapenemasen bereits nach einer Stunde eine vergleichsweise hohe Sensitivität von 93,75% (VIM), 85,71% (KPC), 83,33% (NDM) und 75,00% (KPC) erzielt werden. Ab zwei

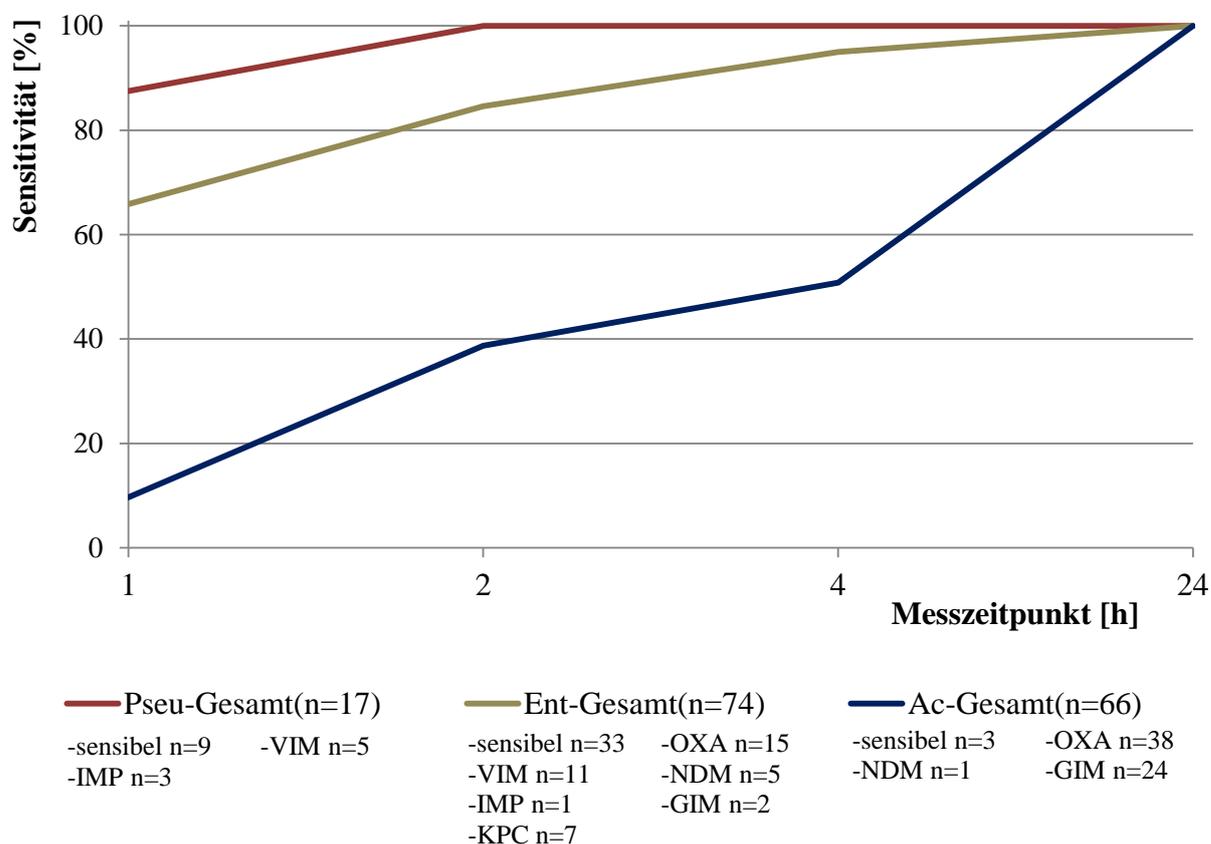
Stunden Inkubation erreichte das Verfahren zur Identifizierung dieser Carbapenemasen eine Sensitivität von 100%. GIM-Carbapenemasen zeigten eine schwächere Ertapenemhydrolyse. Nach einer Stunde betrug die Sensitivität 24%, stieg nach zwei Stunden aber bereits auf 88%, nach vier Stunden auf 92,31% und erreichte nach 24 Stunden Inkubation ebenfalls 100%. Die mit Abstand geringste Detektionsraten wiesen OXA-Carbapenemasen auf. Unter Einbezug aller OXA-Subtypen betrug die Sensitivität nach einer Stunde unter 9,43%. Auch nach zwei und vier Stunden lag sie mit 21,15% und 49,38% deutlich unter der Sensitivität anderer Carbapenemase-Typen. Zur letzten Messung nach 24 Stunden konnte auch bei OXA-Carbapenemasen eine Sensitivität von 100% erzielt werden (s. Abb. 4-16).



**Abb. 4-16 Sensitivität verschiedener Carbapenemasen im Zeitverlauf.** NDM-; IMP-; KPC-; und VIM-Carbapenemasen mit ähnlicher Kinetik, deutlich niedrigere Ausgangswerte bei GIM- und OXA Carbapenemasen. OXA-Carbapenemasen erst nach 24h mit deutlichem Anstieg der Sensitivität.

Nach Erregerfamilie betrachtet betrug die Sensitivität für die getesteten *Pseudomonas* Stämme, nach einer Stunde 87,5%. In allen Folgemessungen konnte für *Pseudomonaden* eine Sensitivität von 100% erzielt werden (s. Abb. 4-17). Bei den in *Pseudomonas* vorkommenden

Carbapenemasen handelte es sich um fünf Carbapenemasen vom VIM-Typ, drei Carbapenemasen vom IMP-Typ, sowie neun sensible Stämme ohne Carbapenemase.

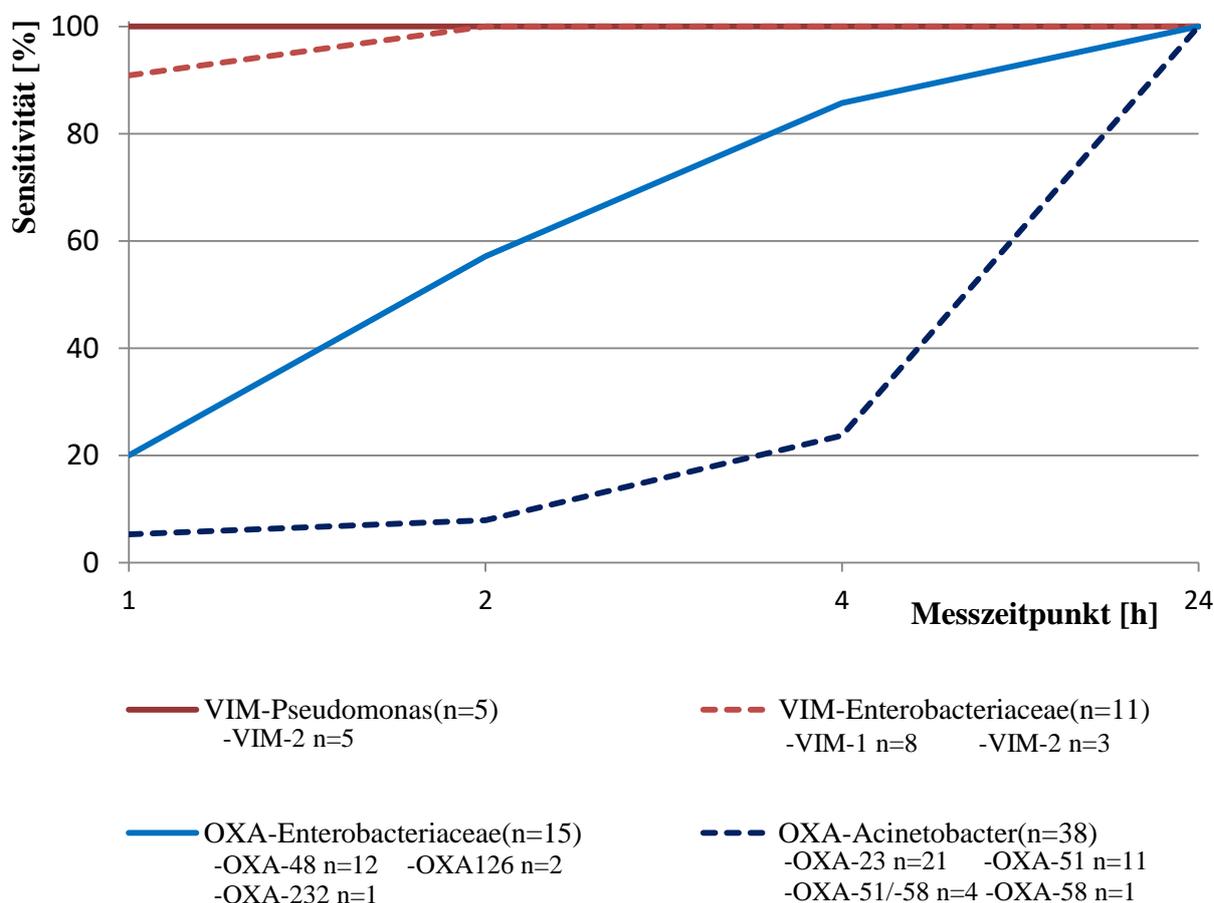


**Abb. 4-17 Sensitivität nach Erregerfamilie.** *Pseu*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Ent*: *Enterobacteriaceae*; *Ac*: *Acinetobacter baumannii*. *Ac. baumannii* mit Sensitivitätswerten auf deutlich niedrigerem Niveau. Zu beachten gilt die unterschiedliche Carbapenemase-Verteilung: Messproben von *Ac. baumannii* setzen sich überwiegend aus OXA- (n=38) und GIM- (n=24) Carbapenemasen zusammen. Auch die *Enterobacteriaceae*-Familie schließt 15 OXA-Carbapenemase-positive Erreger mit ein.

Für *Enterobacteriaceae*, welche überwiegend OXA-, VIM-, und KPC-Carbapenemasen aufwiesen, konnte nach einer Stunde eine Sensitivität von 65,85% erzielt werden. Eine Verlängerung der Inkubation auf zwei Stunden führte zu einem Anstieg der Sensitivität auf 84,62%. Vier Stunden Inkubation führten bei *Enterobacteriaceae* zu einer weiteren Sensitivitätssteigerung auf 95%. Nach 24 Stunden Inkubation lag die Sensitivität bei 100%. Proben des *Acinetobacter baumannii* Komplexes, welche überwiegend GIM und OXA-

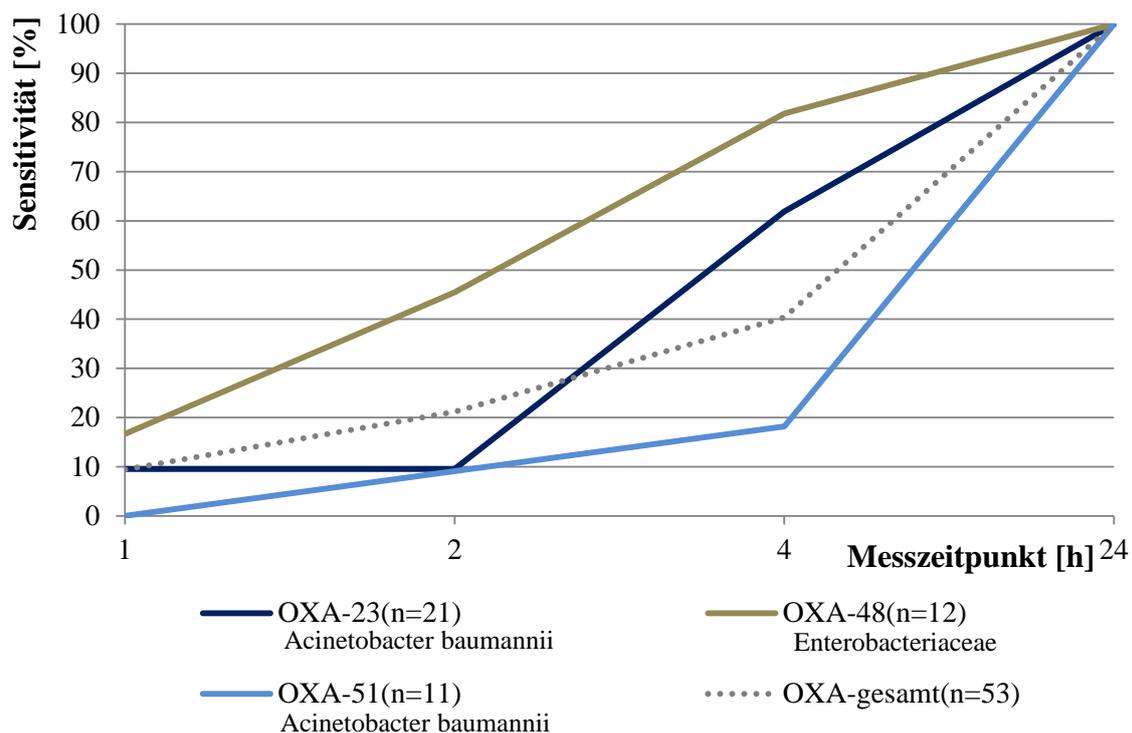
Carbapenemasen exprimieren zeigten nach einer Stunde mit 9,68%, nach zwei Stunden mit 38,71% und vier Stunden mit 50,71% die niedrigste Sensitivität. Nach 24 Stunden Inkubation lag auch bei *Acinetobacter baumannii* die Sensitivität bei 100%.

In der Betrachtung vergleichbarer Carbapenemasen verschiedener Erregergruppen lag die Sensitivität für VIM- Carbapenemasen bei den untersuchten *Pseudomonaden* nach einer Stunde bei 100% und bei *Enterobacteriaceae* mit einem falsch-negativen Erreger bei 90,91%. Ab zwei Stunden Inkubation betrug für beide Erregergruppen die Sensitivität 100%. Alle einbezogenen *Pseudomonas aeruginosae* besaßen hierbei VIM-2 Carbapenemasen, bei den *Enterobacteriaceae* überwogen Carbapenemasen vom VIM-1 Subtyp (s. Abb. 4-18).



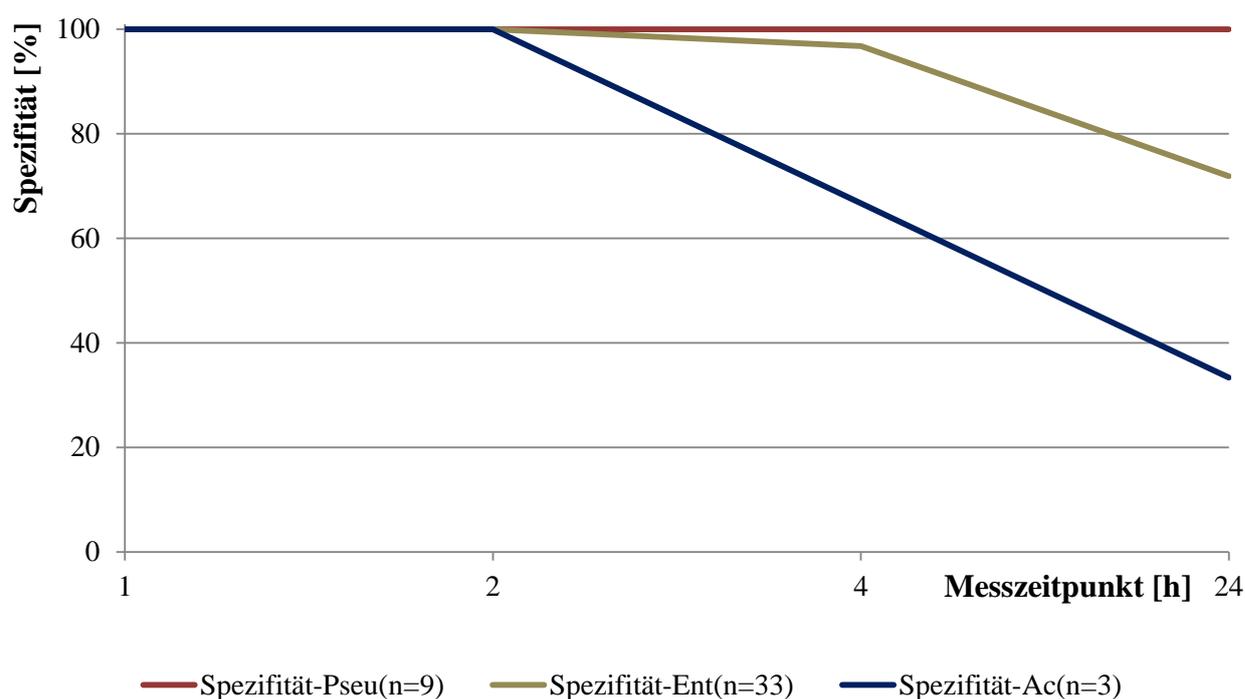
**Abb. 4-18 Vergleich von VIM und OXA-Carbapenemase-positiven Erregern.** VIM-Carbapenemasen mit ähnlicher Kinetik. Bei OXA-positiven Erregern zeigt sich zwischen *Enterobacteriaceae* und *Ac. baumannii* eine deutlich abweichende Kinetik. Bei *Enterobacteriaceae* dominiert OXA-48, *Ac. baumannii* setzt sich überwiegend aus OXA-23 und OXA-51 zusammen.

Im Vergleich von OXA-Carbapenemasen konnten für *Enterobacteriaceae* zu den Messzeitpunkten 1h, 2h, 4h, 24h Sensitivitätswerte von 20%; 57,14%; 85,71% und 100% erzielt werden. Bei OXA-positiven *Acinetobacter baumannii* Stämmen ergaben sich Werte von 5,26%; 7,89%; 23,68% und 100%. *Enterobacteriaceae* verfügten hierbei überwiegend über OXA-Carbapenemasen vom OXA-Subtyp OXA-48, bei *Acinetobacter baumannii* dominierten OXA-23 und OXA-51 Carbapenemasen (s. Abb. 4-19). Unter den Subtypen der OXA-Carbapenemasen wiesen die in *Enterobacteriaceae* auftretenden OXA-48 Carbapenemasen die schnellste Kinetik auf. Nach einer Stunde Inkubation konnten OXA-48-positive Stämme mit einer Sensitivität von 16,67%, OXA-23-positiver Erreger mit 9,52% als Carbapenemase-positiver Erreger diagnostiziert werden. Keine OXA-51-Carbapenemase konnte nach einstündiger Inkubation detektiert werden. Auch bei den Messungen nach zwei und vier Stunden konnte bei OXA-48-positiven Stämmen mit 45,45% und 81,82% die höchste Sensitivität unter den OXA-Carbapenemasen erreicht werden. Die ausschließlich in *Acinetobacter baumannii* Proben vorhandenen OXA-51-positiven Stämme wiesen mit 9,09% und 18,18% nach zwei und vier Stunden die schwächste hydrolytische Aktivität auf. Unabhängig von Erreger und OXA-Subtyp erzielten alle OXA-Carbapenemasen nach 24 Stunden eine Sensitivität von 100% (s. Abb. 4-19).



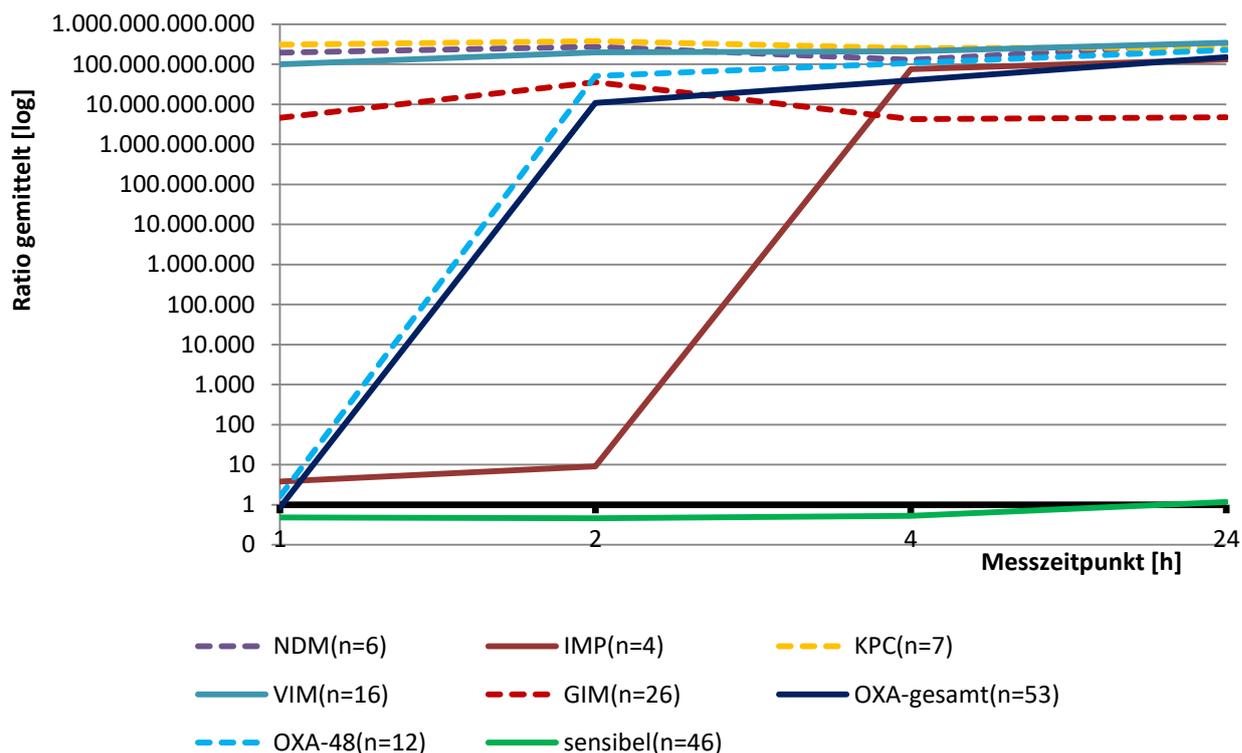
**Abb. 4-19 Kinetik verschiedener OXA-Subtypen.** OXA-48 zeigte unter den getesteten OXA-Carbapenemasen die größte, OXA-51 die geringste hydrolytische Aktivität.

Nach ein und zwei Stunden Inkubation ließ sich für alle Erreger eine Spezifität von 100% erzielen. Die Spezifität für Pseudomonaden blieb auch bei allen Folgemessungen bei 100%. Zum Messzeitpunkt 4h konnte für *Enterobacteriaceae* eine Spezifität von 96,77% und für *Acinetobacter baumannii* Stämmen von 66,67% erzielt werden. Nach 24 Stunden sank die Spezifität für *Enterobacteriaceae* auf 71,88% und bei *Acinetobacter baumannii* bei 2 falsch-positiven von insgesamt drei sensiblen Stämmen auf 33,33% (s. Abb. 4-20).



**Abb. 4-20 Spezifität nach Erregerfamilie.** *Pseu*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Ent*: *Enterobacteriaceae*; *Ac*: *Acinetobacter baumannii*. Geringe Spezifität bei *Ac. baumannii* auch bedingt durch geringen Probenumfang von n=3 bei 2 falsch positiven Proben zum Zeitpunkt 24h.

In der Analyse der Ratio-Mittelwerte zeigte sich für Carbapenemasen vom NDM, KPC und VIM-Typ eine ähnliche Enzymkinetik (s. Abb. 4-21). Bereits nach einer Messung erzielten diese Enzyme im Mittel Werte im zwölfstelligen Bereich, die sich über alle Folgemessungen auf ähnlichem Niveau bewegten. Dies deckt sich mit hohen Sensitivitätswerten von 85,71% (KPC), 83,33% (NDM) und 93,75% (VIM) (s. Tab. 4-12), welche sich bei diesen Carbapenemasen bereits nach einer Stunde erzielen ließen und nach zwei Stunden auf 100% anstiegen. IMP-Carbapenemasen zeigen bei ähnlich hohen Sensitivitätswerten einen deutlich schwächeren Ertapenemabbau. Erst nach vier Stunden Inkubation erreichte der Ratio-Mittelwert der IMP-Enzyme ebenfalls Werte im Bereich von  $10^{11}$ .



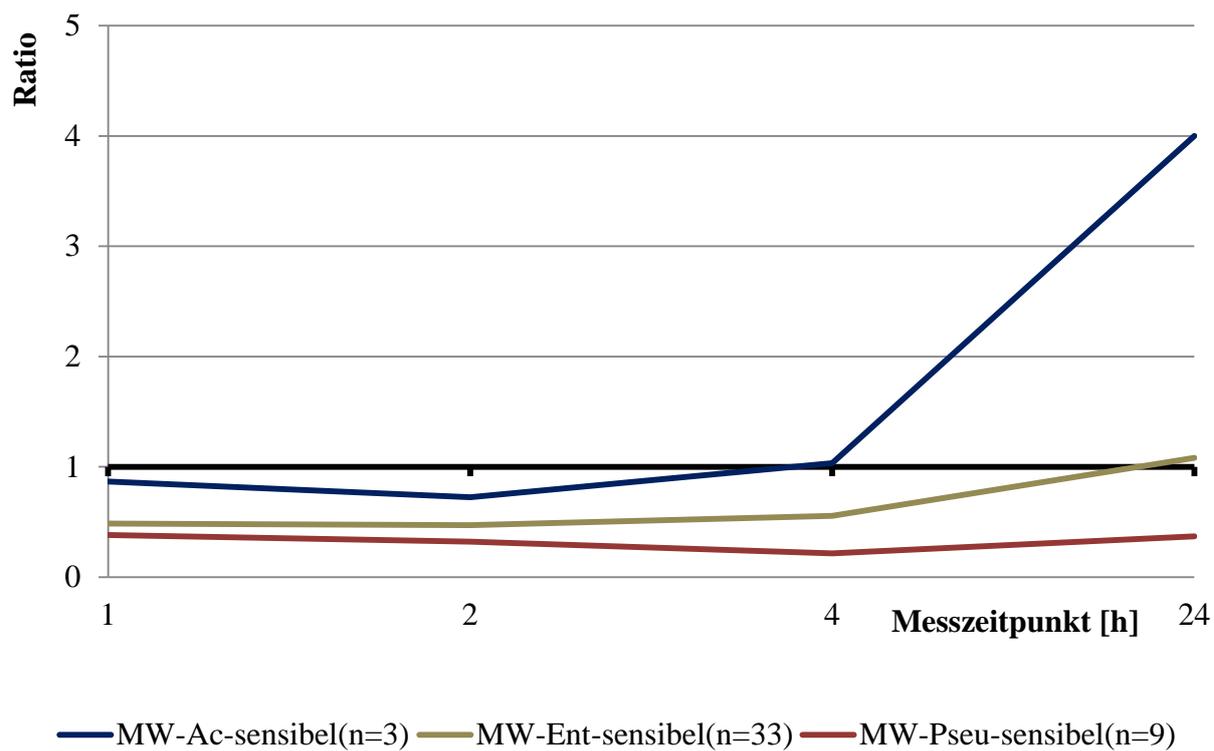
**Abb. 4-21 Ratiomittelwerte Carbapenemase-positiver Erreger.** *x*-Achse: R= (Cut-off Ratio). NDM-; IMP-; KPC-; und VIM-Carbapenemasen mit ähnlicher Kinetik, OXA-Carbapenemasen zeigen bei höheren Ratiomittelwerten nach 2h gegenüber GIM-Carbapenemasen eine niedrigere Sensitivität (vgl. Tab. 4-12). Mittelwert Carbapenemase-negativer Erreger nach 24h leicht oberhalb der Cut-off Ratio.

GIM-Carbapenemasen zeigten in Bezug auf die Ratio eine relativ konstante Kinetik mit ähnlichen Werten über alle Messzeitpunkten. Der Wertebereich lag zwischen  $10^9$  und  $10^{11}$ , jedoch unter dem der KPC, NDM und VIM-Carbapenemasen. Die insgesamt hohen Ratiomittelwerte der GIM-Carbapenemasen nach einer Stunde Inkubation stehen im Gegensatz zur vergleichsweise niedrigen Sensitivität bei der Diagnostik dieser Carbapenemasen von 24%. Nach 24 Stunden Inkubation erzielten GIM-Carbapenemasen den niedrigsten Mittelwert. OXA-Carbapenemasen lagen nach einer Stunde Inkubation als einzige Carbapenemasen mit einem Mittelwert von 0,87 unterhalb der Carbapenemase-Detektionsgrenze. Ihre Kinetik zeigte einen starken Anstieg der Ratio zwischen den Messungen nach einer und zwei Stunden auf. Nach 24 Stunden lagen die Ratiowerte im Bereich der KPC-, NDM-, VIM- und IMP-Carbapenemasen.

**Tab. 4-12 Sensitivität einzelner Carbapenemasen nach Messzeitpunkt.** Mit Ausnahme von OXA- und GIM-Carbapenemasen konnte nach zwei Stunden eine Sensitivität von 100% erzielt werden. Nach 24 Stunden zeigen alle Carbapenemasen eine Sensitivität von 100%. OXA-Carbapenemasen zeigen bei höheren Ratiomittelwerten nach 2 Stunden gegenüber GIM-Carbapenemasen eine niedrigere Sensitivität (vgl. Abb. 4-21).

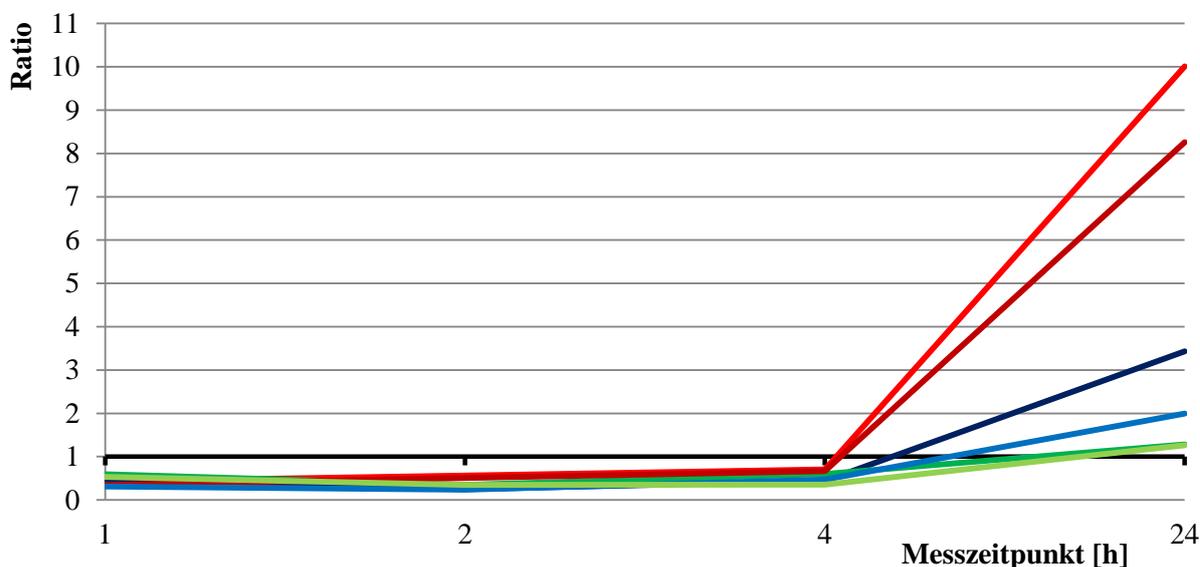
	Sensitivität (95%-KI) [%] 1h	Sensitivität (95%-KI) [%] 2h	Sensitivität (95%-KI) [%] 4h	Sensitivität (95%-KI) [%] 24h
<b>IMP</b> (n=4)	75,00 (32,56-117,44)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)
<b>KPC</b> (n=7)	85,71 (59,79-111,64)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)
<b>NDM</b> (n=6)	83,33 (53,51-113,15)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)
<b>VIM</b> (n=16)	93,75 (81,89-105,61)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)	100,00 (100-100)
<b>GIM</b> (n=26)	24,00 (7,26-40,74)	88,00 (75,26-100,74)	92,31 (82,06-102,55)	100,00 (100-100)
<b>OXA-48</b> (n=12)	16,67 (-4,42-37,75)	45,45 (16,03-74,88)	81,82 (59,03-104,61)	100,00 (100-100)
<b>OXA-gesamt</b> (n=53)	9,43 (1,56-17,30)	21,15 (10,05-32,25)	40,38 (27,05-53,73)	100,00 (100-100)

Die gemittelte Ratio der Carbapenemase-negativen Proben lag bei den Messungen nach einer, zwei und vier Stunden im sensiblen Bereich, stieg jedoch nach 24 Stunden mit 1,18 leicht in den Carbapenemase-positiven Bereich an. Der Mittelwert aller sensiblen Erreger lag nach einer, zwei und vier Stunden im Carbapenemase-negativen Bereich. Nach 24 Stunden zeigte *Acinetobacter baumannii* mit zwei falsch-positiv getesteten Erregern bei insgesamt drei sensiblen Stämmen eine Ratio von 4,00. Mit neun positiv getesteten Proben, einer nicht verwertbaren Messung, sowie 23 sensiblen Ratiowerten lag der Mittelwert der *Enterobacteriaceae* nach 24 Stunden bei 1,08 und somit ebenfalls leicht im Carbapenemase-positiven Bereich (s. Abb. 4-22).



**Abb. 4-22 Ratiomittelwerte Carbapenemase-negativer Erreger.** *Pseu*: *Pseudomonas aeruginosae*; *Ent*: *Enterobacteriaceae*; *Ac*: *Acinetobacter baumannii*. *Ac. baumannii* mit deutlich falsch-hohen Ratiowerten >1.

#### 4.5.7 Reproduzierbarkeit falsch-positiver Stämme



##### Erreger nach NRZ-Referenznummer:

<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
— NRZ17892-A	— NRZ17876-A	— NRZ17889-A
— NRZ17892-B	— NRZ17876-B	— NRZ17889-B

**Abb. 4-23 Reproduzierbarkeit falsch-positiver Ergebnisse.** NRZ-XXXXX: Erreger-ID; -A/-B: Testlauf A/B. Drei verschiedene genotypisch Carbapenemase-negative Erreger mit falsch-positivem Messergebnis im ersten Testlauf (-A) wurden jeweils nach neuer kultureller Anzucht nachgetestet (-B). Reproduzierbarkeit der falsch-positiven Messergebnisse nach 24h und ähnliche Kinetik bei Betrachtung des Ausmaßes der hydrolytischen Aktivität.

Bei einzelnen Erregern ließen sich Ratiowerte im Carbapenemase-positiven Bereich reproduzieren. Abbildung 4-23 zeigt exemplarisch drei als genotypisch Carbapenemase-negativ charakterisierte Erreger, welche anhand ihrer Referenznummer identifiziert und zweifach gemessen wurden (Messung-A und -B). Sämtliche Messungen zeigten bis einschließlich vier Stunden Inkubation unauffällige Carbapenemase-negative Ratiowerte. Nach 24 Stunden Inkubation traten bei allen drei Erregern wiederholt falsch-hohe Ratiowerte  $> 1$  auf. Auffällig ist, dass sich die Ratio bei allen Erregern bei Wiederholungsmessungen auf ähnlichem Wert-Niveau reproduzieren ließ. Der *Enterobacter aerogenes* Stamm NRZ17892 zeigte in beiden Messungen nach 24 Stunden die höchsten Ratiowerte (Messung A:  $R=10,00$ ; Messung B:  $R=8,26$ ). NRZ17876, ein Erreger aus dem *Citrobacter freundii* Komplex wies in Messung A

zum Zeitpunkt 24h eine Ratio von 3,44 auf, in Messung B eine Ratio von 1,99. Der *Enterobacter cloacae* Stamm NRZ17889 zeigte in beiden Messungen nach 24 Stunden Inkubation nahezu identische falsch-positive Werte (Messung A: R=1,28; Messung B: R=1,26) (s. Abb 4-23).

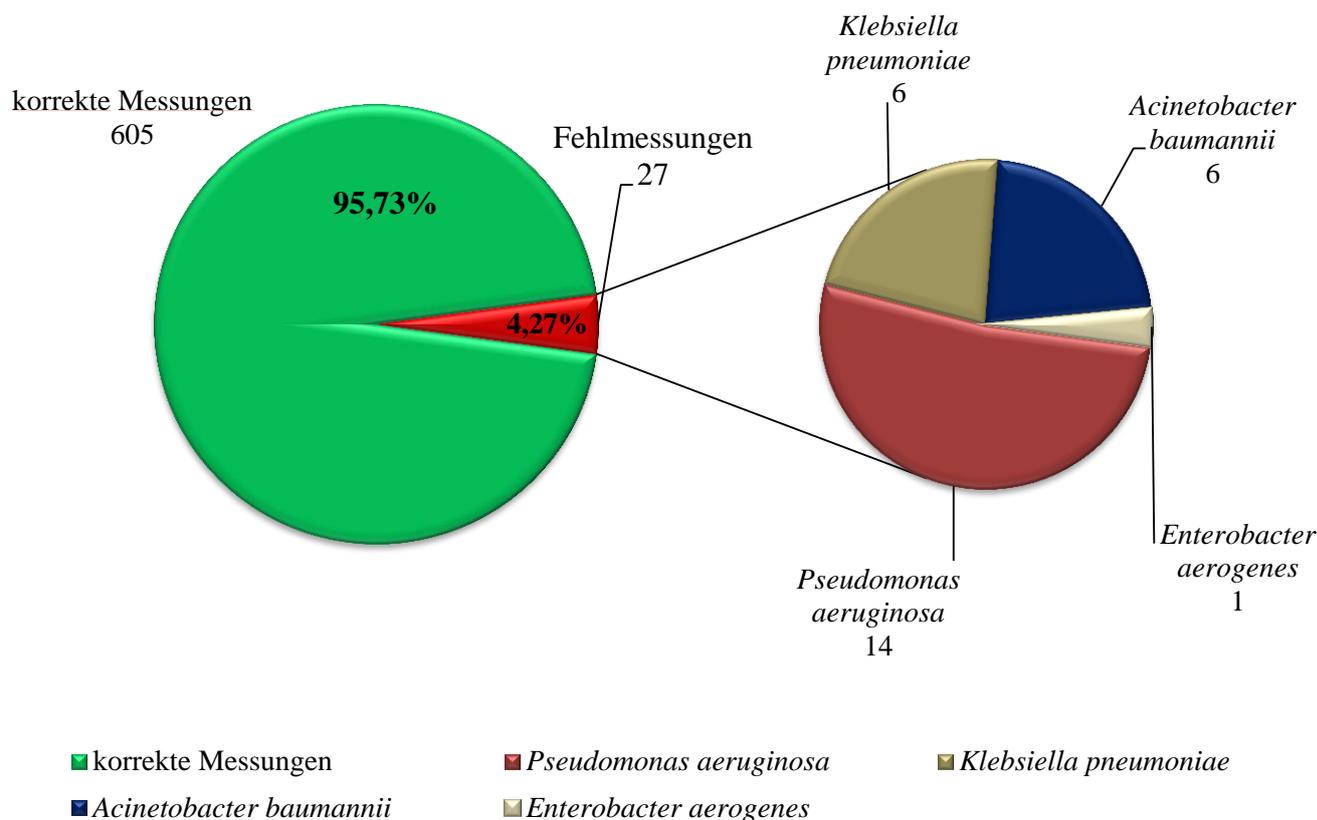
Tabelle 4-13 zeigt die Ergebnisse der Testung aller nach 24 stündiger Inkubationszeit falsch-positiven genotypisch Carbapenemase-negativen NRZ Stämme. Es erfolgte eine Testung mittels Hodge-Test, E-Test und Vitek.

**Tab. 4-13 Testergebnisse falsch-positiver genotypisch Carbapenemase-negativer NRZ-Stämme.** *ETP*: Ertapenem; *MEM*: Meropenem; *IMP*: Imipenem; *E-Test-[mm]*: Durchmesser Hemmhof (Resistenzkriterien nach EUCAST: *ETP* < 22mm, *MEM* < 16mm (EUCAST, 2016)); *R* (Vitek): Resistent; *I* (Vitek): Indifferent. Alle nachgetesteten genotypisch Carbapenemase-negativen Stämme mit falsch-positiven MALDI-ToF-Messungen nach 24h zeigen in einem oder mehreren extern durchgeführten Referenztest ebenfalls resistenzsuspekte Befunde.

ID	Stamm	MALDI-ToF		E-Test [mm]		Vitek		
		Ratio (IKZ=24h)	Hodge-Test	ETP	MEM	ETP	IMP	MEM
NRZ17778	<i>E. cloacae</i>	1,04	negativ	>32	>32	R	R	R
NRZ17787	<i>E. aerogenes</i>	3,13	negativ	>32	>32	R	R	I
NRZ17876	<i>C. freundii</i>	1,26	leicht positiv	>32	>32	R	R	I
NRZ17889	<i>E. cloacae</i>	8,26	negativ	>32	3	R	I	I
NRZ17892	<i>E. aerogenes</i>	1,99	positiv	>32	>32	R	I	I
NRZ17906	<i>Kl. pneumoniae</i>	1,00	MEM leicht positiv IMP negativ	>32	>32	R	I	I

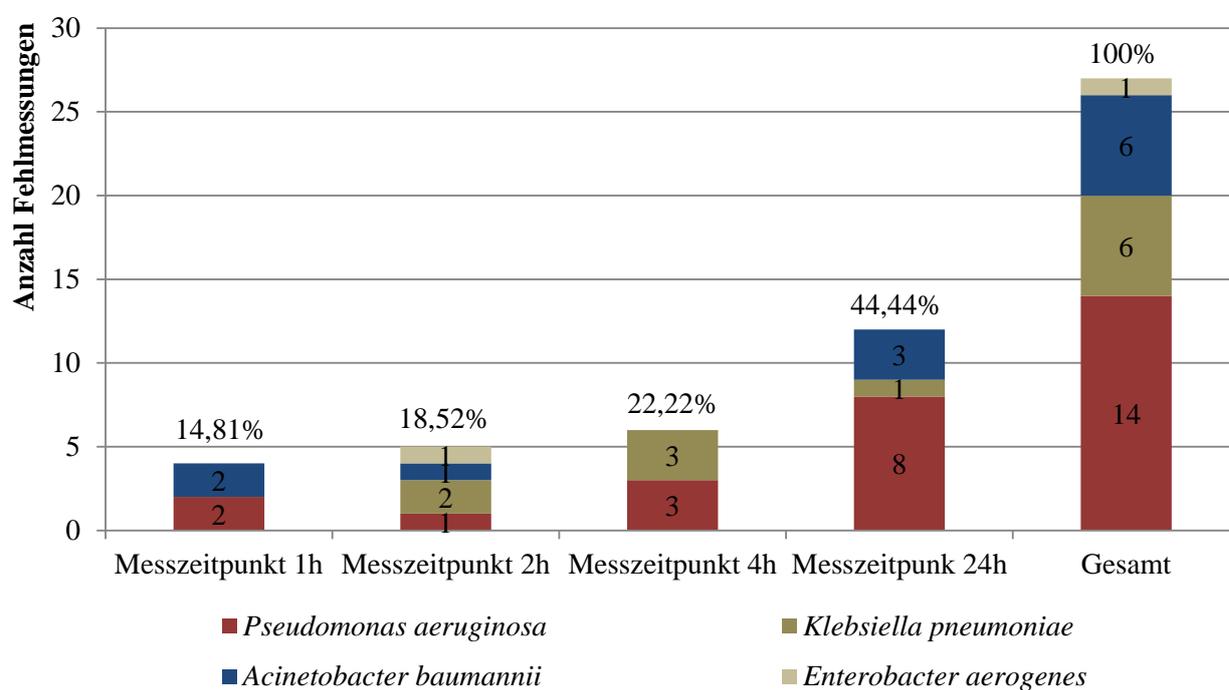
Der durchgeführte Hodge-Test zeigte für 3 der getesteten Stämme negative Ergebnisse. Ein Stamm wurde positiv und ein weiterer schwach positiv auf Carbapenemresistenz getestet. Der Stamm NRZ 17906 (*Kl. pneumoniae*) zeigte eine Resistenz gegenüber Meropenem, aber reagierte sensibel gegenüber Imipenem. E-Tests für Meropenem zeigten für einen Stamm (NRZ17889) eine MHK von 3 µg/ml. Die MHK der übrigen Proben lag für Ertapenem und Meropenem über 32 µg/ml. In der Analyse mittels Vitek zeigte keine der Proben sensible Ergebnisse für die Carbapeneme Ertapenem, Imipenem und Meropenem. Alle Proben wurden als resistent gegenüber Ertapenem diagnostiziert. Der Stamm NRZ 17778 (*Enterobacter cloacae*) wurde gegenüber allen drei Carbapenemen als resistent eingestuft. Die Stämme NRZ 17876 (*Citrobacter freundii*) und 17787 (*Enterobacter aerogenes*) zeigten Resistenzen gegenüber Ertapenem und Imipenem.

#### 4.5.8 Nicht verwertbare Messergebnisse



**Abb. 4-24 Nicht verwertbare MALDI-ToF Messergebnisse.** Linkes Kreisdiagramm: Anteil technischer Fehlmessungen an Gesamtmessungen; rechtes Kreisdiagramm: Verteilung technischer Fehlmessungen auf verschiedene Erreger. Als technische Fehlmessung werden von der automatisierten Auswertung nicht erfasste/leere Messspektren gewertet, für die keine Ratioberechnung erfolgte. 14 der 27 Fehlmessungen betreffen *Pseudomonas aeruginosa*.

Insgesamt wurden durch Messungen der 158 Proben zu vier Messzeitpunkten 632 MALDI-ToF Messungen durchgeführt. 605 (95,73%) Messungen konnten ausgewertet werden. 27 (4,27%) Messungen lieferten fehlerhafte oder leere Messspektren und waren somit nicht verwertbar (s. Abb 4-24). 51,85% der 27 Fehlmessungen betrafen *Pseudomonas aeruginosa*. Jeweils 22,22% der 27 Fehlmessungen betrafen mit je sechs nicht auswertbaren Spektren *Klebsiella pneumoniae* und *Acinetobacter baumannii* Stämme. Einmal trat ein nicht verwertbares Spektrum bei *Enterobacter aerogenes* auf (3,70% der Fehlmessungen). Sieben Erreger, darunter 5 *Pseudomonaden*, eine *Klebsielle* und ein *Acinetobacter baumannii* erzeugten Fehlmessungen zu zwei Zeitpunkten. Somit verteilten sich die 27 nicht auswertbaren MALDI-ToF-Spektren auf insgesamt 20 verschiedene Erreger.



**Abb. 4-25 Fehlmessungen nach Erregergruppe und Messzeitpunkt.** *Gesamt:* Anteil aller Fehlmessung über alle Messzeitpunkte. Zunahme der Fehlmessungen pro Messzeitpunkt mit fortschreitender Inkubationsdauer.

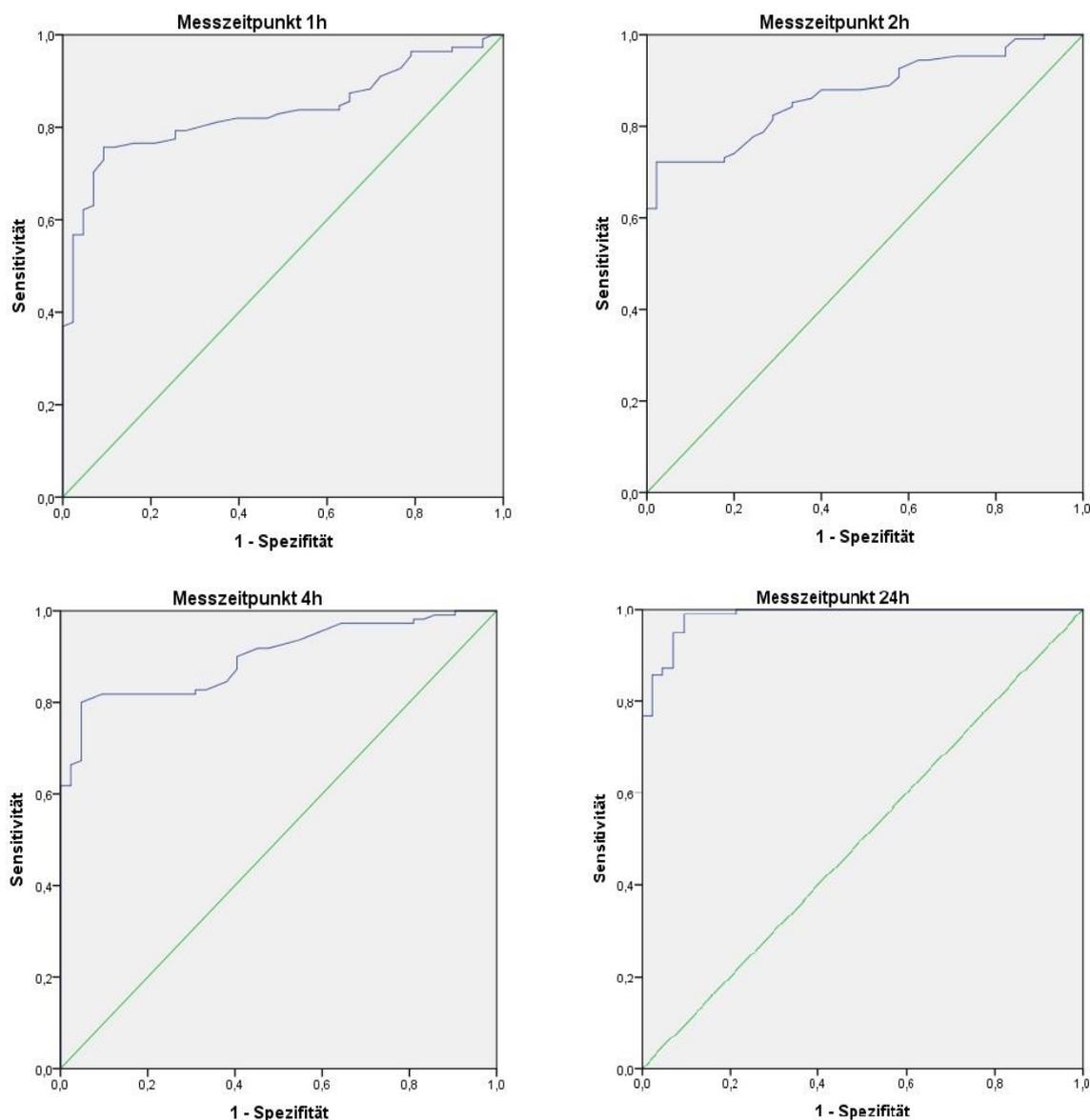
Die Anzahl der Fehlmessungen nahm mit fortschreitender Inkubationszeit zu. Zum ersten Messpunkt wurden vier, zum zweiten Messpunkt fünf und zum dritten Messpunkt nach vier Stunden sechs Messungen fehlerhaft gemessen. Von vier auf 24 Stunden Inkubationszeit verdoppelte sich die Anzahl der Fehlmessungen auf zwölf. Abbildung 4-25 zeigt eine Zuordnung der Fehlmessungen zur Erregergruppe zum jeweiligen Messzeitpunkt. Damit fielen 44,44% der 27 Fehlmessungen auf den Messzeitpunkt 24h. Dies entspricht 7,59% der 158 Einzelmessungen nach 24 Stunden Inkubation, wohingegen nach einer Stunde nur 2,53% der 158 Erreger keine verwertbaren Daten erzeugten (s. Tab. 4-14).

**Tab. 4-14 Prozentuale Verteilung nicht verwertbarer Messergebnisse.**  $n_{\text{fehl}}$ : Fehlmessungen zum jeweiligen Messzeitpunkt;  $n_{\text{fehl-ges}}$ : Fehlmessungen gesamt;  $n_{\text{ges}}$ : Messungen gesamt. Zunahme der Fehlmessungen mit fortschreitender Inkubationsdauer. Verdopplung der Fehlmessungen bei Verlängerung der Inkubationsdauer von 4h auf 24h.

	Anteil Fehlmessungen ( $n_{\text{fehl-ges}}=27$ )	Anteil alle Messungen zum Messzeitpunkt ( $n_{\text{ges}}=158$ )
<b>Messzeitpunkt 1h</b> ( $n_{\text{fehl}}=4$ )	14,81%	2,53%
<b>Messzeitpunkt 2h</b> ( $n_{\text{fehl}}=5$ )	18,52%	3,16%
<b>Messzeitpunkt 4h</b> ( $n_{\text{fehl}}=6$ )	22,22%	3,80%
<b>Messzeitpunkt 24h</b> ( $n_{\text{fehl}}=12$ )	44,44%	7,59%

#### 4.5.9 ROC-Analyse und Cut-off Berechnung mittels Youden-Index

Zur weiteren Überprüfung der Testgüte erfolgte eine Analyse der Messzeitpunkte mittels ROC-Analyse. Abbildung 4-26 zeigt die ROC-Kurven zum jeweiligen Messzeitpunkt für alle gemessenen Proben unter Verwendung der Cut-off Ratio  $R=1$ . Die ROC-Analyse ergab mit zunehmender Inkubationszeit höhere AUC-Werte und damit eine steigende Testqualität (s. Abb. 4-26 und Tab. 4-15)



**Abb. 4-26 ROC-Kurven zum jeweiligen Messzeitpunkt für Cut-off Ratio  $R=1$  ( $n=158$ ).** *blau*: ROC-Kurve des jeweiligen Messzeitpunktes; *grün*: Diagonale. Kurven nahe der Diagonalen deuten auf zufällige Messergebnisse hin und sind zur Diagnosestellung ungeeignet. Je ferner die Kurve oberhalb der Diagonalen, desto besser die Testgüte. Es zeigt sich bereits nach einer Stunde eine deutliche Differenzierungsfähigkeit des Testverfahrens, welche mit steigender Inkubationszeit weiter zunimmt.

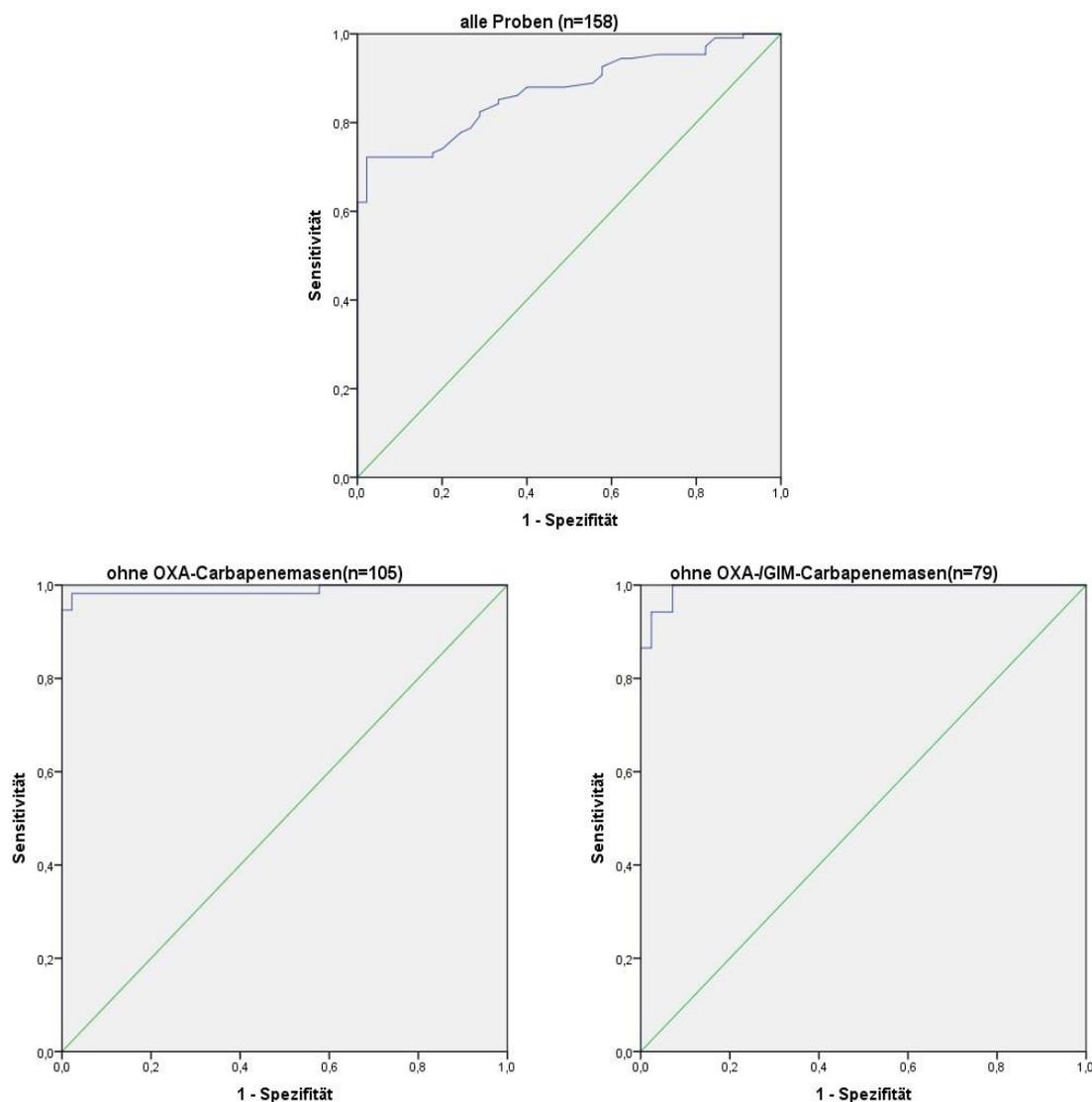
Die AUC-Werte lagen bei Betrachtung aller Messproben zwischen 0,83 nach einer Stunde und 0,99 nach 24 Stunden. Durch Ausschluss aller OXA-Carbapenemasen von der Berechnung des AUC-Wertes konnte zu den ersten drei Messpunkten deutliche Steigerungen erzielt werden, sodass der AUC über alle Messungen zwischen 0,98 und 0,99 lag. Durch zusätzlichen

Ausschluss der Carbapenemasen vom GIM-Typ konnte zu allen Messpunkten ein AUC-Wert von 0,99 erzielt werden (s. Tab. 4-15).

**Tab. 4-15 AUC Werte nach Messzeitpunkt.** *links*: alle Proben; *mittig*: Ausschluss genotypisch OXA-positiver Stämme; *rechts*: Ausschluss genotypisch OXA- und GIM-positiver Stämme. Für alle Proben zeigt sich bereits nach einer Stunde Inkubation ein hoher AUC-Wert, welcher über die Zeit weiter zunimmt. Nach 24 Stunden für alle Proben, sowie über alle Messzeitpunkte unter Ausschluss von OXA- bzw. OXA- und GIM-positiven Stämmen lässt sich eine hervorragende Differenzierungsfähigkeit des Testverfahrens ablesen.

alle Proben (n=158)		ohne OXA-Typ-Cp (n=105)		ohne OXA/GIM-Typ-Cp (n=79)	
Messzeitpunkt [h]	AUC	Messzeitpunkt [h]	AUC	Messzeitpunkt [h]	AUC
<b>1</b>	0,83	<b>1</b>	0,98	<b>1</b>	0,99
<b>2</b>	0,87	<b>2</b>	0,99	<b>2</b>	0,99
<b>4</b>	0,90	<b>4</b>	0,98	<b>4</b>	0,99
<b>24</b>	0,99	<b>24</b>	0,99	<b>24</b>	0,99

Abbildung 4-27 gibt die Veränderung der ROC-Kurve durch Ausschluss von OXA und OXA-/GIM-Carbapenemasen im Vergleich zur Analyse aller Proben am Beispiel der Messung nach zwei Stunden Inkubation wieder.



**Abb. 4-27 ROC-Kurven zum Zeitpunkt 2h und unter Ausschluss von OXA- sowie OXA-/GIM-Carbapenemasen.** *blau*: ROC Kurve; *grün*: Diagonale (s. Abb. 4-23). Zum gleichen Messzeitpunkt (2h) zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Testgüte durch Ausschluss von OXA-positiven Proben. Eine Steigerung der Testaussagkraft kann durch den zusätzlichen Ausschluss GIM-positiver Proben erzielt werden.

Zur Überprüfung der Ratio  $R=1$  erfolgte eine Berechnung des maximalen Youden Indexes. Tabelle 4-16 stellt die anhand des Youden Index ermittelte Ratio bezüglich Sensitivität und Spezifität der Ratio  $R=1$  gegenüber. Um den Anforderungen eines Suchtestes gerecht zu werden wurde eine maximale Sensitivität des Testverfahrens gegebenenfalls auch zu Lasten der Spezifität angestrebt. In der Betrachtung aller Proben zeigte sich, dass die statistisch ermittelte

Ratio nach einer, zwei und vier Stunden unterhalb der verwendeten Ratio  $R=1$  lag. Durch Senkung der Ratio konnte zu den genannten Messzeitpunkten zum Teil deutlich erhöhte Sensitivitätswerte erzielt werden. Nach ein und zwei Stunden erzielte die berechnete Cut-off Ratio jedoch eine geringere Spezifität als die Vergleichsratio. Nach 24 Stunden Inkubation lag der ermittelte Cut-off bei 2,0 und damit oberhalb des angewandten Wertes  $R=1$ . Bei geringem Abfall der Sensitivität konnte nach 24 Stunden mittels des Cut-off  $R=2,0$  ein Anstieg der Spezifität von 73,81% auf 90,48% erreicht werden (s. Tab 4-16).

**Tab. 4-16 Vergleich zwischen Ratio  $R=1$  und mittels Youden Index ermittelter Ratio.** *linke Tabellenhälfte:* Werte für mittels Youden Index errechnete Cut-off Ratio; *rechte Tabellenhälfte:* Werte für Cut-off Ratio  $R=1$ ; *Cut-off Ratio (opt):* optionale, mittels Youden Index berechnete Ratio; *Cut-off Ratio:* standardmäßig verwendete Ratio von  $R=1$ . Eine maximale Sensitivität von 100% lässt sich für alle Proben erst nach 24 Stunden unter Verwendung der Cut-off-Ratio  $R=1$  erzielen. Unter Ausschluss von OXA- und GIM-positiven Stämmen lässt sich bereits nach 2h eine Sensitivität von 100% bei einer Spezifität von 100% erzielen. Hierbei sind die berechnete Ratio, sowie die standardmäßig verwendete Cut-off Ratio nahezu identisch.

IKZ	Youden's Index (Max)	Cut-off Ratio (opt)	Sensitivität	Spezifität	IKZ	Cut-off Ratio	Sensitivität	Spezifität
<b>alle Proben (n=158)</b>					<b>alle Proben (n=158)</b>			
1h	0,66	0,61	75,68%	90,70%	1h	1	36,04%	100%
2h	0,70	0,69	72,22%	97,78%	2h	1	59,26%	100%
4h	0,75	0,71	80,00%	95,24%	4h	1	70,00%	95,24%
24h	0,90	2,00	99,04%	90,48%	24h	1	100%	73,81%
<b>ohne OXA-Cp (n=105)</b>					<b>ohne OXA-Cp (n=105)</b>			
1h	0,89	0,61	98,28%	90,70%	1h	1	60,34%	100%
2h	0,96	0,71	98,21%	97,78%	2h	1	94,64%	100%
4h	0,94	1,31	96,55%	97,62%	4h	1	96,55%	95,24%
24h	0,93	3,68	100,00%	92,86%	24h	1	100%	73,81%
<b>ohne OXA-/GIM-Typ-Cp (n=79)</b>					<b>ohne OXA-/GIM-Cp (n=79)</b>			
1h	0,95	0,77	96,97%	97,67%	1h	1	87,88%	100%
2h	1,00	1,04	100,00%	100,00%	2h	1	100%	100%
4h	0,98	1,32	100,00%	97,62%	4h	1	100%	95,24%
24h	0,96	11,05	96,43%	100,00%	24h	1	100%	73,81%

Durch Ausschluss von OXA-Carbapenemasen von der Auswertung ließ sich nach zwei, vier und 24 Stunden ein Anstieg der berechneten Cut-off Ratio feststellen. Bis einschließlich zwei

Stunden Inkubation lag die ermittelte Ratio unterhalb der Standard-Ratio  $R=1$ , nach vier und 24 Stunden oberhalb dieses Cut-offs. Nach zwei und vier Stunden lagen die Unterschiede in Sensitivität und Spezifität der beiden Cut-off-Werte in einem Bereich  $<5\%$ . Durch eine Anhebung der Ratio von 1 auf 3,68 konnte bei konstanter Sensitivität von 100% ein Anstieg der Spezifität von 73,81% auf 92,86% erzielt werden. Ein zusätzlicher Ausschluss der GIM-Carbapenemasen führte zu einem weiteren Anstieg der ermittelten Ratio. Zum Messzeitpunkt zwei Stunden waren beide Cut-off nahezu identisch ( $R=1,04$  vs.  $R=1,00$ ). Nach 24 Stunden Inkubation lag der berechnete Cut-off mit 11,05 deutlich über  $R=1$  und erzielte eine Spezifität von 100% bei einer etwas geringeren Sensitivität von 96,43% (Sensitivität bei  $R=1$ : 100%).

Eine ROC-Analyse unter Einschluss von ausschließlich Carbapenemase-negativen und OXA-Carbapenemase-positiven Proben bestätigte die schwierige Detektion von OXA-Carbapenemaseträgern nach ein, zwei und vier Stunden (s. Tab 4-17). Bei vergleichsweise niedrigen AUC Werten konnten auch mittels Youden Index berechneter Cut-off Werte zu Messpunkten  $\leq 4$ h Inkubation lediglich eine Sensitivität unter 60% erzielt werden. Erst nach 24 Stunden Inkubation kam es zu einem starken Anstieg der Testgüte (AUC 0,98), welche sich in einer deutlich höherer Sensitivität und Spezifität zu diesem Messzeitpunkt widerspiegelte.

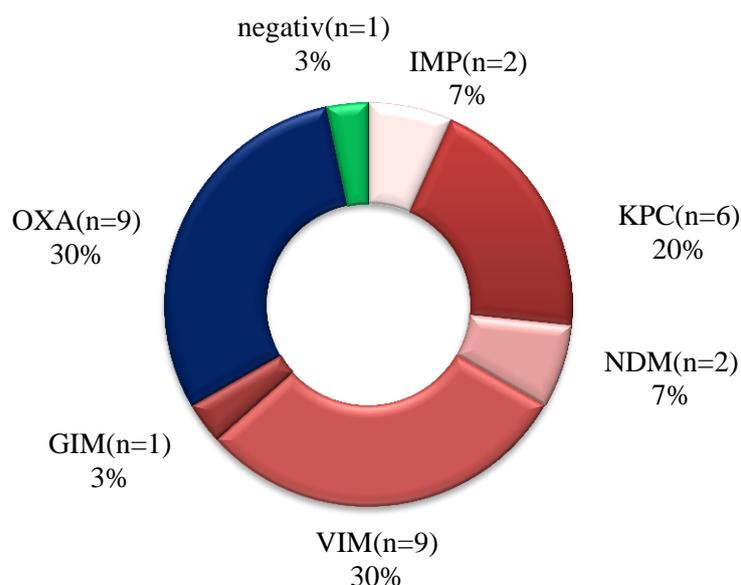
**Tab. 4-17 AUC-Analyse und Berechnung optionaler Cut-off Ratios zur Differenzierung OXA-Cp-positiver (n=53) und Cp-negativer (n=46) Proben.** Eine eindeutige Differenzierung zwischen Carbapenemase-negativen und OXA-positiven Stämmen mittels des Testverfahrens gelingt erst nach 24 stündiger Inkubation.

IKZ	Youden's Index				
	AUC	(Max)	Ratio	Sensitivität	Spezifität
1	0,68	0,42	0,61	50,94%	90,70%
2	0,75	0,42	0,69	44,23%	97,78%
4	0,80	0,55	0,71	59,62%	95,24%
24	0,98	0,89	2,00	98,08%	90,48%

## 4.6 Reproduzierbarkeit der Messergebnisse

### 4.6.1 Testgütekriterien

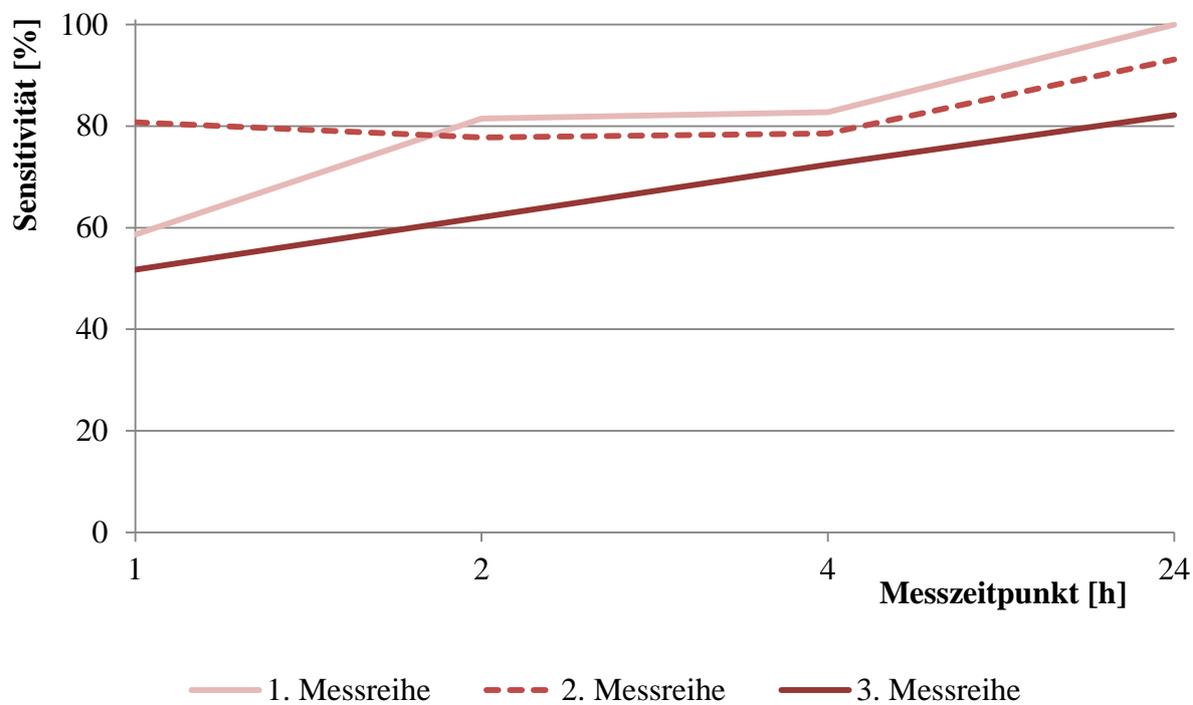
30 genotypisch differenzierte Erreger des NRZ wurden zur Validierung der Testergebnisse dreifach anhand des Arbeitsprotokolls auf Carbapenemaseaktivität (Cut-off: R=1) getestet. Abbildung 4-28 lässt sich die genaue genotypische Probenzusammensetzung der Messreihe entnehmen.



**Abb. 4-28 Probenzusammensetzung Kontrollstäme (n=30).** Die genotypisierten Kontrollstäme setzten sich überwiegend aus OXA-, VIM-, und KPC-positiven Proben zusammen. Eine Negativkontrolle wurde ebenfalls eingeschlossen.

Im ersten Messdurchlauf, welcher in die Gesamtauswertung miteingeschlossen wurde ließen sich inklusive OXA-positiver Stämme Sensitivitätswerte von 58,62%, 81,48%, 82,76% und 100% (1h, 2h, 4h, 24h) erzielen (s. Abb. 4-29 und Tab. 4-18). Die zweite Messreihe zeigte eine im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt deutlich höhere Sensitivität von 80,77% bei drei nicht verwertbaren Messspektren. Zum Zeitpunkt 2h und 4h lag sie bei 77,88% und 78,57%. Nach 24 Stunden stieg sie auf 93,10%. Die dritte Messreihe erzielte zu allen Messzeitpunkten mit 51,72%, 62,07%, 72,41% und 82,14% die niedrigsten Messergebnisse. Der einzige Carbapenemase-negativer Erreger (*Pseudomonas aeruginosa*) wurde in der ersten Messreihe vollständig korrekt differenziert. Innerhalb der zweiten Messreihe traten zum Messzeitpunkt 1h und 24h nicht verwertbare Messspektren auf, während zum Zeitpunkt 2h und 4h eine korrekte

Einstufung als Carbapenemase-negativ gelang. Im dritten Messdurchlauf wurde die Probe bei den ersten drei Messpunkten korrekt negativ diagnostiziert. Nach 24 Stunden wurde sie falsch-positiv gemessen (s. Tab 4-18).

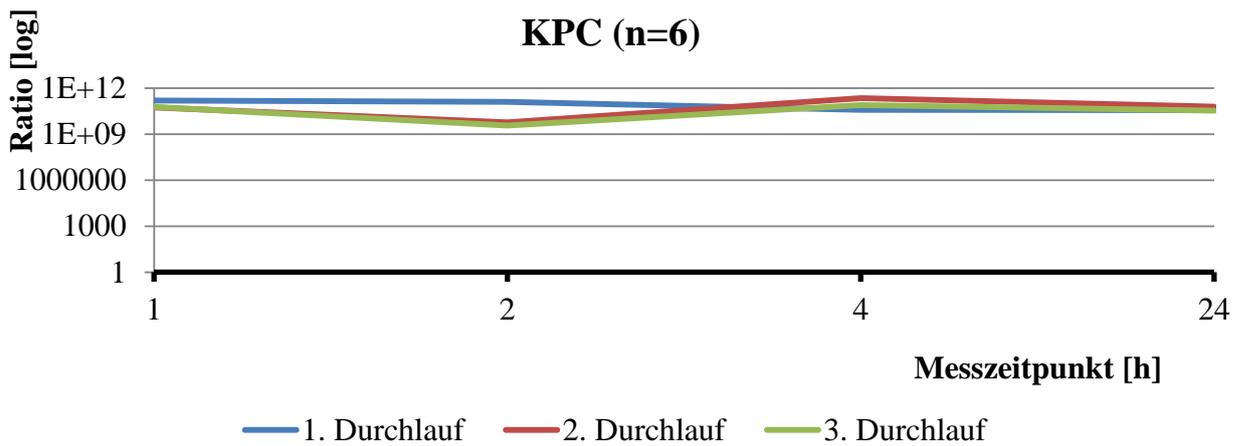
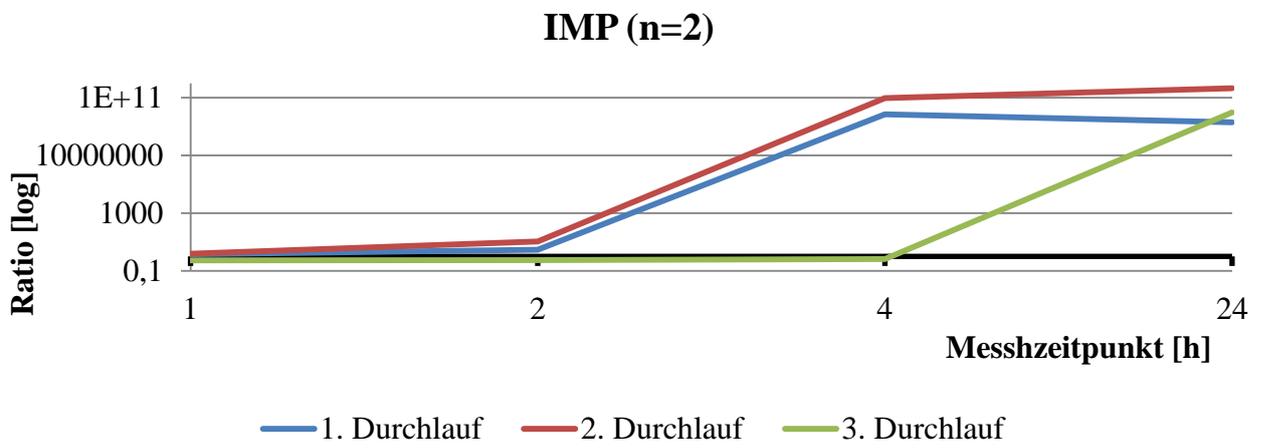
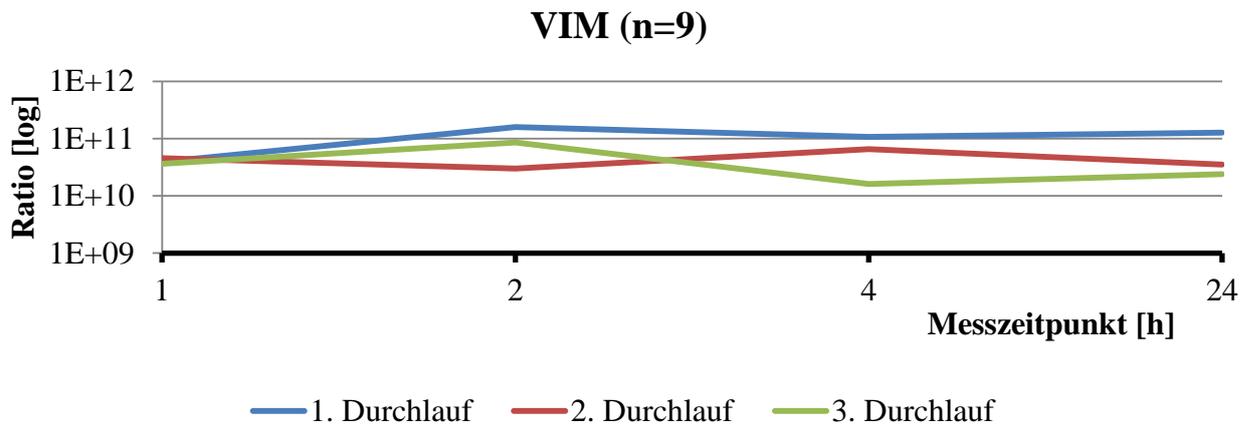


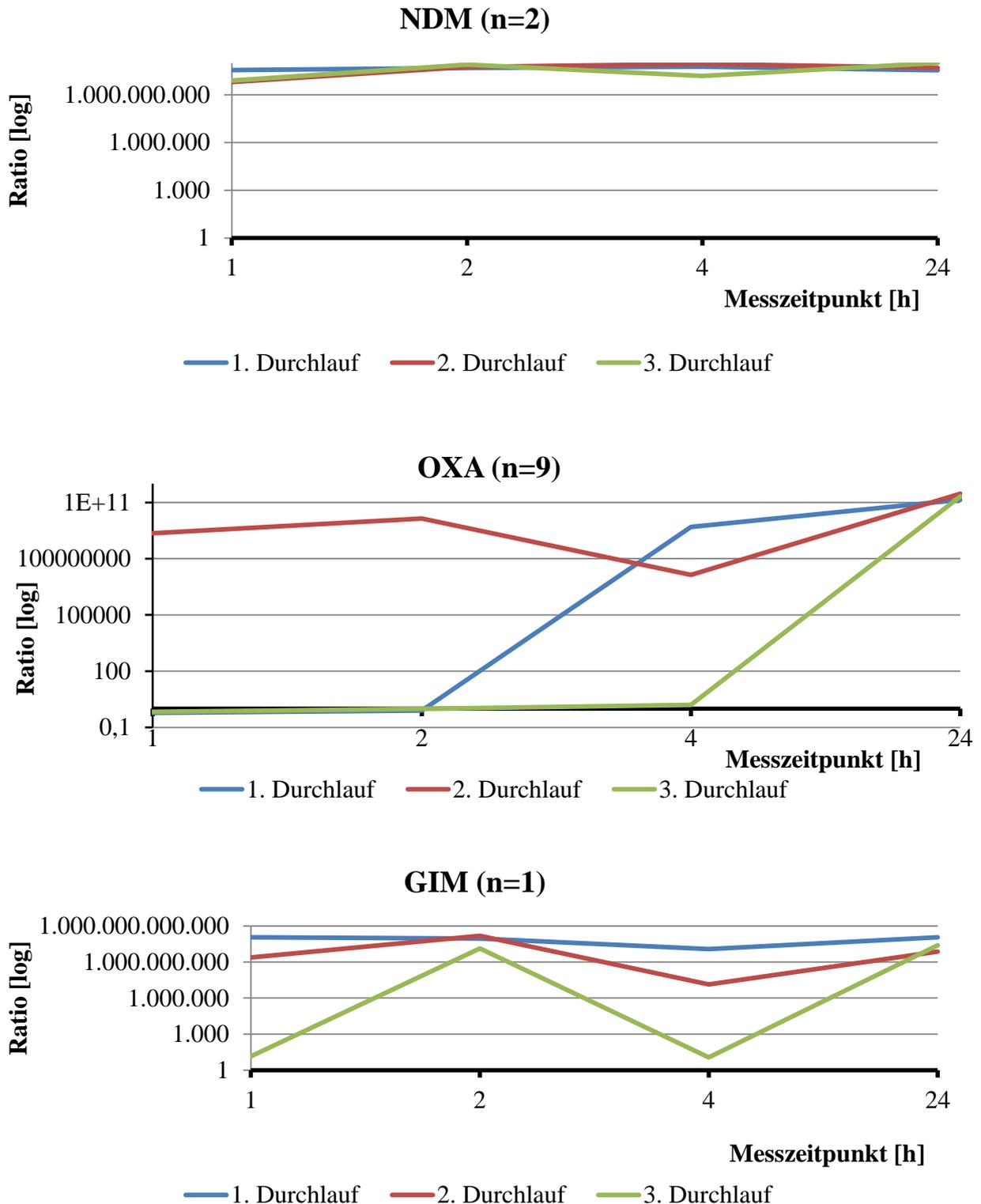
**Abb. 4-29 Sensitivität der Messreihen im Zeitverlauf.** Zu berücksichtigen sind ausgeschlossene Proben zum jeweiligen Messzeitpunkt (s. Tab 4-18).

**Tab. 4-18 Sensitivität und Spezifität der Messreihen im Zeitverlauf.** *Oben:* Sensitivität; *unten:* Spezifität; *n:* Anzahl getesteter Stämme; *n-x:* Anzahl nach Abzug ausgeschlossener Proben (technische Fehlmessung); *KI:* 95%-Konfidenzintervall. In die Berechnung der Sensitivität fließen ausschließlich Cp-positive Stämme ein (n=29). In die Berechnung der Spezifität fließen ausschließlich Cp-negative Proben ein (n=1).

<b>Sensitivität</b>	<b>Messzeitpunkt 1h</b>	<b>Messzeitpunkt 2h</b>	<b>Messzeitpunkt 4h</b>	<b>Messzeitpunkt 24</b>
	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>
<b>1. Messreihe</b> <b>(n=29)</b>	58,62	81,48 (n-2)	82,76	100,00 (n-2)
KI	40,7-76,55	66,83-96,13	69,01-96,51	100-100
<b>2. Messreihe</b> <b>(n=29)</b>	80,77 (n-3)	77,78 (n-2)	78,57 (n-1)	93,10
KI	65,62-95,93	62,10-93,46	63,39-93,77	83,33-102,33
<b>3. Messreihe</b> <b>(n=29)</b>	51,72	62,07	72,41	82,14 (n-1)
KI	33,54-69,91	44,41-79,73	56,15-88,68	67,96-96,33
<b>Spezifität</b>	<b>Messzeitpunkt 1h</b>	<b>Messzeitpunkt 2h</b>	<b>Messzeitpunkt 4h</b>	<b>Messzeitpunkt 24</b>
	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>
<b>1. Messreihe</b> <b>(n=1)</b>	100	100	100	100
KI	100-100	100-100	100-100	100-100
<b>2. Messreihe</b> <b>(n=1)</b>	/	100	100	/
KI	/	100-100	100-100	/
<b>3. Messreihe</b> <b>(n=1)</b>	100	100	100	0
KI	100-100	100-100	100-100	0-0

## 4.6.2 Kinetik





**Abb. 4-30 Reproduzierbarkeit der Kinetik nach jeweiliger Carbapenemase.** Dargestellt sind Ratiomittelwerte des jeweiligen Durchlaufs; drei Durchläufe pro Carbapenemase. VIM-, KPC- und NDM-Carbapenemasen mit reproduzierbarer Kinetik. IMP ebenfalls tendenziell reproduzierbar (mit Ausnahme des Zeitversatzes im 3. Durchlauf). OXA-Carbapenemasen mit der größten Schwankung zwischen den Durchläufen. GIM-Carbapenemasen mit auffälligem Abfall des Ratiomittelwertes vom Zeitpunkt 2h auf 4h in allen 3 Messdurchläufen.

Die Abbildung 4-30 stellt die Kinetik getesteter Carbapenemasen in den drei Messdurchläufen gegenüber. VIM-, KPC- und NDM-Carbapenemasen zeigten in allen Messungen eine ähnliche Kinetik in Bezug auf das jeweilige Enzym. Alle drei Carbapenemasen zeigen eine ausgeprägte Hydrolyse bereits nach einer Stunde Inkubation in allen Messdurchläufen. Bei IMP-Carbapenemasen fällt die zunächst niedrig ausgeprägte Hydrolyse des Ertapenems auf, welche nach zwei bzw. vier Stunden deutlich anstieg. Die drei Messungen der OXA-Carbapenemase-Proben zeigen ein eher uneinheitliches Aktivitätsmuster der Carbapenemase. Im ersten und zweiten Messdurchgang fand erst nach zwei bzw. vier Stunden ein verstärkter Ertapenemabbau statt. In der zweiten Messung zeigten sich bereits nach einer Stunde hohe Ratiowerte. Die GIM-positive Messprobe erzielte vor allem im dritten Messdurchlauf deutlich niedrige Ratiowerte. Bei allen drei Messungen des Erregers kam es vom Messzeitpunkt 2h auf 4h zu einer Abnahme der Ratiowerte.

## 5 Diskussion

Die frühzeitige Diagnostik Carbapenemase-exprimierender gramnegativer Erreger gestaltet sich bis heute als schwierig und beruht auf zahlreichen nicht einheitlich angewandten Verfahren. Etablierte diagnostische Werkzeuge sind molekulare Testverfahren (PCR) oder funktionelle Tests (Hodge-Test, MAST-CDS). Vielversprechend sind neue enzymatische Verfahren, wie der CarbaNP-Test, welcher bereits kommerziell verfügbar ist, oder spektroskopische Verfahren wie MALDI-ToF. Nach wie vor besteht Bedarf an einem standardisierten, für die Routinediagnostik geeigneten Verfahren, welches sich problemlos in klinischen Laboratorien integrieren lässt. Wichtige Anforderung hierfür sind eine eindeutige, objektive diagnostische Aussagekraft zum frühestmöglichen Zeitpunkt und eine für das Personal möglichst einfache, wenig fehleranfällige Durchführung bei möglichst geringem Kostenaufwand. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden wurde in dieser Arbeit ein MALDI-ToF basiertes Arbeitsprotokoll entwickelt, welches auf ready-to-use Reagenzien zurückgreift und sich aufgrund der einfachen Durchführung schnell in Laboratorien einführen lässt. Das Protokoll wurde an genotypisierten Erregern getestet und mit gängigen Referenztests (Hodge-Test; MAST-CDS) verglichen.

Agardiffusionstest, wie der Hodge-Test und MAST-CDS, werden aktuell häufig routinemäßig zur Identifizierung Carbapenemase-positiver gramnegativer Erreger eingesetzt (NRZ für gramnegative Krankenhauserreger, 2012), jedoch belegen zahlreiche Studien ihre unzureichende diagnostische Wertigkeit (Patrice Nordmann et al., 2011; Pasteran et al., 2011). Auch sind sie nur bedingt als Schnelltest geeignet, da ein Ergebnis in der Regel erst 48 Stunden nach Probeneingang zu erwarten ist. Auch in den vorliegenden Versuchen zeigten sich sowohl MAST-CDS (Sensitivität: 83,90%; n=30; Messung in Triplikaten), als auch der modifizierte Hodge-Test (Sensitivität: 84,71%; n=30; Messung in Triplikaten) dem entwickelten auf MALDI-ToF basierenden Verfahren zeitlich und qualitativ (Sensitivität: 91,75%; n=30; Messung in Triplikaten) unterlegen.

Molekulare Methoden allen voran PCR-basierte Verfahren zeigen eine ausgezeichnete Sensitivität (Monteiro et al., 2012; Laurent Poirel et al., 2011), sind jedoch kostenintensiv und auf geschultes Personal angewiesen (P. Nordmann et al., 2012). Des Weiteren sind Verfahren, wie die Multiplex-PCR auf die Detektion bereits bekannter Carbapenemasegene beschränkt. Bisher nicht bekannte Carbapenemasen entgehen somit der Diagnostik. Zum grundlegenden Carbapenemase-Screening scheinen sie daher nicht geeignet, jedoch können sie einen wichtigen Beitrag bei epidemiologischen Fragestellungen und im Zuge des Ausbruchmanagement leisten.

Bei bekanntem Erreger und Resistenzgen eignen sie sich zum gezielten Screening auf weitere Infektionen des gleichen Erregers. So konnte beispielsweise eine PCR-basierte Identifizierung Carbapenemase-positiver Erreger maßgeblich zur Diagnostik und Management eines stationären KPC-2 positiven *Klebsiella pneumoniae*-Ausbruchs innerhalb eines deutschen Klinikums beitragen (Knaust et al., 2015).

Zum breitgefächerten Screening auf unbekannte Erreger scheinen enzymatische Verfahren wie MALDI-ToF oder der CarbaNP-Test am besten geeignet. Beide Tests sind schnell und einfach durchführbar. Zudem sind sie, abgesehen von der Erstananschaffung im Falle von MALDI-ToF, kostengünstig durchzuführen. Der Nachteil beider Verfahren liegt darin, dass sie sich nur zur Testung auf Carbapenemase-vermittelter Carbapenemresistenz eignen und andere Resistenzmechanismen, wie beispielsweise Porinverlust unerkannt bleiben. Der bereits kommerziell und in verschiedenen Varianten erhältliche CarbaNP-Test (Dortet et al., 2015) zeigt in Studien eine schwankende Sensitivität von 70% (Tijet et al., 2013) bis 100% (Patrice Nordmann, Poirel, et al., 2012) und Probleme bei der Diagnostik OXA-48, GES und SME-positiver Proben (Mitra et al., 2015; Tijet et al., 2014). Dennoch ist der CarbaNP gängigen Referenztests in Sensitivität und Spezifität, sowie in seiner praktikablen Durchführung überlegen und stellt ein kostengünstiges und schnelles Verfahren zum Carbapenemasescreening dar (Bayramoğlu et al., 2016; Kabir et al., 2016; Vasoo et al., 2013). Vergleichende Studien zwischen CarbaNP-Test und auf MALDI-ToF basierende Verfahren zeigen, dass sich mittels MALDI-ToF gleichwertige (Knox et al., 2014) oder sogar bessere (Chong et al., 2015) Detektionsraten erzielen lassen. Nachteilig sind die initial hohen Gerätekosten, die somit die Verfügbarkeit des Verfahrens je nach Region einschränken. Eine Studie von Mirande et al. sieht MALDI-ToF-MS in naher Zukunft nicht routinetauglich (Mirande et al., 2015). Als problematisch wird die unterschiedliche Enzymkinetik der verschiedenen Carbapenemasen und ihr unterschiedliches Ansprechen auf verschiedenen Carbapeneme gesehen. Mirande et al. sieht die Notwendigkeit individueller Arbeitsprotokolle für verschiedene Enzym-Antibiotika-Kombinationen, die sich in Inkubationszeit und Reagenzien unterscheiden. Tatsächlich verwenden aktuelle Studien stets individuelle auf ihre Fragestellung abgestimmte Versuchssettings, die sich in Wahl des Antibiotikums, Inkubationsdauer und Reaktionspuffer unterscheiden (Burckhardt & Zimmermann, 2011; Hooff et al., 2012; Hrabák et al., 2011; Johansson et al., 2014; Kempf et al., 2012).

Unsere Arbeit konnte jedoch zeigen, dass auch MALDI-ToF basierte Verfahren für alle gängigen Carbapenemasen routinetauglich sind und eine einheitliche spektrometrische

Carbapenemasedetektion mit Standardreagenzien durchführbar ist. Im Vergleich zu vielen anderen MALDI-ToF Studien wurde der Versuchsablauf vereinfacht und Arbeitsschritte reduziert. Ein wichtiger Faktor zur Zeitersparnis stellt die direkte Lyse fertig konfektionierter Antibiotika-Testplättchen in NaCl und anschließender Beigabe eines großzügigen Bakterieninokulums mittels Impföse dar. Die bei großer Probenanzahl aufwändige Herstellung spezifischer McFarland-Standards für jede einzelne Messprobe entfällt somit. Zudem zeigen die Vorversuche, dass die Ertapenemhydrolyse bei hohem McFarland-Standard (McF 4,0) einer Ertapenemhydrolyse bei nicht standardisierter Probenentnahme mittels Öse (3-5 Kolonien) nicht überlegen ist. Ein weiterer Vorteil unseres Verfahrens ist die Übertragbarkeit auf verschiedene Antibiotika durch Herstellung der gewünschten Antibiotikasuspension mittels Antibiotikatestplättchen. Das Arbeitsprotokoll ist grundsätzlich nicht an die Verwendung eines bestimmten Carbapenems gebunden, sodass im Verdachtsfall isolierte Resistenzen gegen einzelne Vertreter diagnostiziert werden können. Ertapenem verfügt als Gruppe 2 Carbapenem keine ausreichende Wirksamkeit gegenüber *Acinetobacter*, *Enterokokken* und *Pseudomonaden* (Bodmann, K.-F. et al., 2010). Die durchgeführten Versuche zeigen zwar, dass Ertapenem grundsätzlich geeignet ist Carbapenemasen bei Pseudomonaden und *Acinetobacter* Stämmen zu detektieren, jedoch bietet sich bei bekanntem Erreger zur besseren Diagnostik eine Umstellung des Protokolls auf Imipenem oder Meropenem an. Die in der Literatur gängigen Messzeiten von zwei bis vier Stunden wurden analysiert, um einen optimalen Inkubationszeitraum zur Detektion aller Carbapenemasen festzulegen (s.u.). Mit 0,45% NaCl wurde ein einheitlicher Reaktionspuffer gewählt, der sich prinzipiell zur Diagnostik aller Enzymklassen und Antibiotika eignet. Neben der generellen Eignung für die unspezifische Carbapenemasedetektion sind Versuche zur Detektion des enzymatischen Abbaus anderer  $\beta$ -Laktamantibiotika mit dem entworfenen Protokoll ebenfalls vielversprechend. Eine Diagnostik weniger potenter  $\beta$ -Laktamasen (z.B. Cephalosporinasen) scheint somit möglich und könnte nach Anpassung der Software automatisiert ausgewertet werden. Somit bietet das entwickelte Protokoll möglicherweise das Potential ein alternatives Allroundverfahren für die Detektion enzymatischen Antibiotikaabbaus in der Routinediagnostik darzustellen.

Mit Hilfe der Überführung der Messdatenspektren in absolute Ratiowerte bietet MALDI-ToF gegenüber anderen Testverfahren nicht nur den Vorteil einer eindeutigen Differenzierung sensibler und resistenter Proben, sondern erlaubt zudem Aussagen über Ausmaß und Qualität des enzymatischen Antibiotikaabbaus. Anhand der Höhe der berechneten Ratio lassen sich stark aktive Enzyme, wie KPC-2 von solcher mit geringer katalytischer Aktivität unterscheiden. Dies

kann gegebenenfalls hilfreich bei Dosisanpassung und Planung der Dauer einer gezielten antibiotischen Therapie sein. Gerade bei langen Inkubationszeiten erlauben die berechneten Ratiowerte auch eine korrekte Einordnung des Testergebnisses. Während sehr hohe Ratiowerte eindeutig auf Carbapenemase-positive Erreger zurückzuführen sind, sollte bei Werten im einstelligen Bereich trotz der hohen Sensitivität die Möglichkeit falsch-positiver Testergebnisse berücksichtigt werden. Eine individuelle Abwägung zur Notwendigkeit eines Bestätigungstest kann somit gestellt werden.

Wichtigstes Kriterium für eine erfolgreiche Diagnostik durch MALDI-ToF stellt die korrekte Wahl des Inkubationszeitraumes dar. Bei wissenschaftlichen Fragestellungen kann dieser frei variiert werden und erlaubt durch Mehrfachmessungen über verschiedene Zeitpunkte die Erstellung von Kinetiken einzelner Carbapenemasen. Zukünftig wäre eine Klassifizierung einer genotypisch unbekanntem Carbapenemase anhand ihrer Kinetik denkbar. Auch wenn die Erstellung detaillierter Enzymkinetiken nicht primäres Ziel der Arbeit ist, zeigen die Messungen zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 4h und 24h das Potential des MALDI-ToF Verfahrens zur genaueren Analyse einzelner Carbapenemasen. KPC-, NDM- und VIM-Carbapenemasen erzielen durchgehend ab der ersten Messung konstant hohe Ratiowerte. Dies gilt ebenso für Carbapenemasen des GIM-Typs, welche zwar konstant hohe Werte über alle Messungen, aber auf deutlich niedrigerem Niveau als die anderen 3 Carbapenemasen erzielten. Andere Carbapenemasen wie OXA-Carbapenemasen hingegen zeigen erst mit fortschreitender Zeit einen ausgeprägten Anstieg der Ratiowerte, steigen dann aber auf ähnliche Werte wie KPC-, NDM-, und VIM-Carbapenemasen an.

Bei der Wahl des Inkubationszeitraumes finden sich in der Literatur Zeitspannen von 15 Minuten zur Diagnostik KPC-2 positiver Erreger (Johansson et al., 2014) über 2-4h (Carvalhoes et al., 2013) bis hin zu 24 Stunden bei OXA-48 positiven Erregern (Johansson et al., 2014). Um einen optimalen Kompromiss zwischen möglichst geringer Inkubationsdauer und hoher Sensitivität bzw. Spezifität des Verfahrens zu erreichen fand eine Untersuchung zu den verschiedenen Messpunkten nach ein, zwei, vier und 24 Stunden Inkubation statt. Anhand der Kinetik zeigt sich in Bezug auf Sensitivität und Spezifität mit zunehmender Inkubationszeit eine gegenläufige Entwicklung. Während die Sensitivität zunehmend anstieg, fiel die Spezifität des Verfahrens durch falsch-positive Messergebnisse nach vier und 24 Stunden ab (s. Abb. 4-15). Bei der Wahl des richtigen Messpunktes stellte die Diagnostik von OXA-Carbapenemaseträgern erwartungsgemäß eine besondere Herausforderung dar, da sie häufig erst nach langen Inkubationszeiten (24 Stunden) korrekt diagnostiziert werden konnten (Johansson et al., 2014).

Der hohe Anteil (33,54%) OXA-positiver Erreger am Messprobenumfang resultiert somit in der vergleichsweise niedrige Sensitivität von 36,04% (95%-KI: 27,10-44,97) zum ersten Messzeitpunkt und 59,26% (95%-KI: 49,99-68,53) zum zweiten Messpunkt (s. Tab. 4-11). Auch ohne OXA-Carbapenemasen lag die Sensitivität nach einer Stunde Inkubation bei unzureichenden 60,34% (95%-KI 47,76-72,93). Hieraus empfiehlt sich für die Routinediagnostik für die frühestmögliche Diagnostik eine Inkubationszeit von zwei Stunden einzuhalten. Vorteil dieses Messpunktes sind eine hohe Sensitivität von 94,64% (95%-KI 88,75-100,54) ohne OXA-Carbapenemasen und 100% (95%-KI 100-100) ohne OXA- und GIM-Carbapenemasen bei einer Spezifität von 100%. Der Messzeitpunkt nach zwei Stunden Inkubation deckt sich mit den von Burckhardt et. al erhobenen Daten wonach Carbapenemasen vom KPC, NDM, IMP und VIM-Typ je nach Subtyp 1-2,5h Inkubation zur Hydrolyse von Ertapenem benötigen (Burckhardt & Zimmermann, 2011). Gegenüber einer vierstündigen Inkubation bietet der Messzeitpunkt 2h den Vorteil des deutlich schnelleren Testergebnisses bei nur gering niedriger Sensitivität (96,55; 95%-KI 91,89-101,25 nach 4h ohne OXA) und höherer Spezifität (95,24%; 95%-KI 91,89-101,25 nach 4h). Als ausschlaggebende Cut-off-Ratio empfiehlt sich eine Ratio von R=1 nach zwei Stunden Inkubation beizubehalten. Ein Cut-off von R=1 deckt sich mit dem mittels Youden-Index berechneten statistisch optimalen Cut-off unter Ausschluss von OXA und GIM-Carbapenemasen (s.Tab. 4-16). Die unzureichende OXA-Carbapenemasedetektion muss nach kurzer Inkubationsdauer berücksichtigt werden (Lee et al., 2013). Unter Einschluss aller Proben lässt sich durch Senkung des Cut-offs bei einer IKZ von 2h eine Erhöhung der Sensitivität vor allem für OXA und GIM-Carbapenemasen erzielen. Dies würde jedoch mit einem Abfall der Spezifität einhergehen und ist somit für die Entwicklung eines Screeningverfahrens nicht zielführend. Um den Anforderungen eines Schnelltests gerecht zu werden empfiehlt sich für das entwickelte Protokoll daher zur Diagnostik aller Carbapenemase-Subtypen die Etablierung einer zweizeitigen Messungen abhängig vom Messergebnis. Für alle Messproben sollte initial eine Messung nach zwei Stunden Inkubation mit einem Cut-off von R=1 erfolgen. Aus der sich hierfür ergebenden Spezifität von 100% kann im klinischen Alltag bei einem positiven Befund nach zweistündiger Inkubation der Erreger als eindeutiger Carbapenemaseträger gewertet werden. Weitere Messpunkte sind bei positivem Ergebnis somit nicht notwendig. Für ein nach zwei Stunden negatives Messergebnis empfiehlt sich eine weitere Inkubation und Messung der Probe bis zum Messzeitpunkt 24 Stunden, um falsch-negative Messergebnisse, insbesondere OXA-positiver Erreger auszuschließen. Da nach 24 Stunden Inkubation eine Beeinflussung des Ratiowertes durch Autolyse des Ertapenems nicht auszuschließen ist (s. Vorversuche Kap. 4-1), sollte für dieses Messzeitpunkt ein Bereich grenzwertiger Messergebnisse diskutiert werden. Die

ROC-Analyse ergab das durch Erhöhung des Cut-offs auf  $R=2$  nach 24 stündiger Inkubation einer Steigerung der Spezifität von 73,81% auf 90,48% bei einem geringen Sensitivitätsabfall von ca. 1% auf 99,04% möglich ist (s. Tab. 4 11). Erzielt eine Probe Ratiowerte in diesem definierten Grenzbereich ( $1 < R < 2$ ) sollte eine wiederholte Testung bzw. eine erweiterte Messung mittels Referenztests erfolgen (z.B. CarbaNP/Hodge-Test/MAST-CDS). Einer exakten Bestimmung eines geeigneten Bereiches zur Einteilung grenzwertig positiver Befunde sollten ROC-Analysen größeren Stichprobenumfanges vorrausgehen. Auch auf eine definierte Zusammensetzung verschiedener Carbapenemasen, sowie einer vergleichbaren Anzahl sensibler Stämme sollte hierbei geachtet werden.

Eine Detektion von OXA-Carbapenemase vermittelter Carbapenemresistenz gelang in anderen Studien bereits frühzeitig mit hoher Sensitivität. In einer Arbeit von Kempf et al. (Kempf et al., 2012) konnten OXA-Carbapenemasen bereits nach vier Stunden mit einer Sensitivität von 100% diagnostizieren, wohingegen im angewandten Testverfahren nach vier Stunden für OXA-positive Erreger nur eine Sensitivität von 40,38% erzielt wurde. Die deutliche Diskrepanz der Ergebnisse könnte vor allem durch die Wahl des Antibiotikums begründet sein. Während im vorliegenden Messverfahren Ertapenem aufgrund seiner hohen Stabilität verwendet wurde, bezieht sich die Studie von Kempf et al. auf die Verwendung von Imipenem zur OXA-Carbapenemasedetektion. Imipenem verfügt unter den Carbapenemen den höchsten Turn-over für OXA-Carbapenemasen vom OXA-23 Subtyp (Smith et al., 2013) und wird durch Enzyme der OXA-48-Klasse stärker hydrolysiert als andere Carbapeneme (L. Poirel et al., 2003). Imipenem gilt als das zur OXA-Carbapenemasedetektion geeignetste Carbapenem, weist allerdings gleichzeitig bei Testung aller Carbapenemasen unter anderem in Agardiffusionstests, wie dem modifizierten Hodge-Test, die niedrigste Spezifität auf. Ursächlich hierfür sind vor allem falsch-positive Befunde durch AmpC-produzierende Erreger (Thomson, 2010). Daneben wird in der von Kempf et al. vorgelegten Studie zur Messung auf ein Ultraflex I Massenspektrometer zurückgegriffen, welches sich gegenüber dem verwendeten Microflex durch seine höhere Sensitivität und Auflösung kennzeichnet (Kempf et al., 2012). Weiteren Einfluss auf die vergleichsweise geringe Sensitivität für OXA-Carbapenemasen hat möglicherweise der Einschluss von Carbapenemasen der OXA-51-Klasse. Diese Carbapenemasen sind Bestandteil der intrinsischen Resistenz von *Acinetobacter baumannii* (Evans & Amyes, 2014) und sind gegenüber anderen OXA-Carbapenemasen vor allem durch ihre nur schwache hydrolytische Aktivität gekennzeichnet. Auch OXA-51-Carbapenemasen zeigen höhere enzymatische Aktivität für Imipenem als andere Carbapeneme (Brown et al., 2005). Ebenfalls auf Imipenem basiert eine Studie von Sauget et al.

(Sauget et al., 2014) die sich mit der Identifizierung OXA-48 positiven Erregern beschäftigte. Die Studie verwendete, wie im vorliegenden Versuchsaufbau, ebenfalls ausschließlich NaCl als Lyse-Reagenz und erreichte für OXA-Carbapenemase nach nur einer Stunde Inkubation eine Sensitivität von 98.9%. Hierfür kalkulierten Sauget et. al. anhand der 372 getesteten Stämme mittels ROC-Analyse eine optimale Cut-off-Ratio. Stämme unterhalb dieser Ratio wurden als OXA-48-positiv gewertet. Eine Verlängerung der Inkubationszeit, sowie Änderungen am Reagenz (z.B. Zugabe von Tris-HCL) führten zu keiner weiteren Verbesserung. Eine weitere Verbesserung der OXA-Carbapenemasedetektion lässt sich womöglich durch die Zugabe von Bikarbonat zum Reaktionsansatz erzielen. Um möglichst geringe Anforderungen an Material und Methoden in Hinblick auf Alltagstauglichkeit des Protokolls zu stellen wurde im Versuchsaufbau ausschließlich auf NaCl zur Antibiotikalyse zurückgegriffen. In neueren Arbeiten, die auf einen von Hrabák et al. etablierten Versuchsaufbau unter der zusätzlichen Verwendung von Tris-HCL zurückgreifen (Hrabák et al., 2012) konnte die Sensitivität zur Diagnostik OXA-48-positiver Stämme durch Zugabe von  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für Meropenem deutlich gesteigert werden (Papagiannitsis et al., 2015). Die Aktivität der Carbapenemase vom OXA-Typ ist vor allem von der Carboxylierung des Lysins im aktiven Zentrum abhängig (Vercheval et al., 2010), sodass durch die Gegenwart von Bikarbonat die MIC der Carbapenemase gegenüber einigen Antibiotika gesteigert werden können (Leonard et al., 2008). Unter den Carbapenemen zeigen sich in Gegenwart von Bikarbonat erhöhte MIC für Ertapenem wie Meropenem, wohingegen die MIC für Imipenem unverändert bleibt oder sinkt (Studentova et al., 2015). Eine kombinierte Verwendung von Imipenem und  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  scheint somit wenig sinnvoll. Es bleibt zu prüfen, ob durch Verwendung von Imipenem anstelle von Ertapenem eine Verkürzung des zweiten Messzeitpunktes von 24 auf vier Stunden ohne Einbußen an Sensitivität und Spezifität möglich ist. Ein denkbarer auf Imipenem basierender Messalgorithmus wäre somit eine zweizeitige Messung nach zwei Stunden für alle Proben, sowie zusätzlich nach vier Stunden für zuvor negativ getestete Erreger. Auch die Reduzierung auf nur einen Messpunkt nach vier Stunden Inkubation unter der Verwendung von Imipenem sollte Gegenstand zukünftiger Testung in Hinblick auf Praktikabilität und Testgüte sein. Eine Alternative mit Ziel einer reduzierten Inkubationszeit stellen mit  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  versetzte Probenansätze unter Berücksichtigung der auf bestimmte Antibiotika begrenzten Anwendung und gesteigertem Arbeitsaufwand dar.

Neben einer stetigen Verbesserung der Testvalidität bleibt auch der Arbeitsablauf für zukünftige Verbesserungen offen. Eine grundsätzliche Optimierung mit dem Ziel eines ready-to-use-Tests stellen vorgefertigte Antibiotikallösungen dar. Zukünftig könnte gegebenenfalls mit Hilfe

vorgefertigter Antibiotikallösungen der 15 minütige Lyseprozess entfallen, und somit der damit verbundene Arbeitsaufwand reduziert werden. Als ebenfalls zeitintensiv stellte sich der Trocknungsvorgang der mit HCCA-Matrix überlagerten Messspots dar. Eine vollständige Trocknung benötigte häufig 10-20 Minuten. Hier konnte experimentell bereits eine moderate Wärmeapplikation mittels handelsüblicher Lichtquelle zu einer deutlichen Zeitersparnis beitragen. Vor einer Einführung in die Routinediagnostik bedarf es zudem weiterer Optimierungen im Softwarebereich. Aktuell bedarf es für die automatisierte bioinformatische Auswertung der Daten mittels der Software Bionumerics einer Formatierung der mit der MALDI-ToF-Systemsoftware FlexAnalysis erhobenen Messdaten. Hier besteht großes Potential die Software aufeinander abzustimmen und Arbeitsschritte zu vereinfachen. Eine direkte automatisierte Ausgabe der berechneten Ratio als Ausgabeformat der MALDI-ToF Messung sollte angestrebt werden. Zu empfehlen ist zudem eine eindeutige optische Differenzierung resistenter und sensibler Messwerte innerhalb der Software. Eine farbliche Codierung (z.B. rot=Carbapenemase-positiv, gelb=grenzwertiger Befund, grün=Carbapenemase-negativ) bietet sich hier an. Ein weiteres zukünftiges Ziel des Verfahrens sollte die direkte Gewinnung des Probenmaterials aus Blutkulturen sein. Das Testergebnis wäre innerhalb kurzer Zeit nach Probeneingang verfügbar. In verschiedenen Studien gelang bereits die Detektion verschiedener  $\beta$ -Laktamasen mit Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation (Jung et al., 2014) und ESBL-bildenden Stämmen (Oviaño et al., 2014) aus Blutkulturen. In einer aktuellen Studie erzielten Ghebremedhin et al. bei der Testung Carbapenemase-positiver *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonaden* eine Sensitivität von 96% unter Verwendung von Blutkulturen. Bei der Untersuchung positiver *Acinetobacter baumannii* Stämme konnte jedoch nur eine Sensitivität von 63.2 % erreicht werden (Ghebremedhin et al., 2016). Carvalhaes et al. gelang es nach vier Stunden Inkubation alle getesteten KPC-2 und SPM-1 Erreger mittels MALDI-ToF direkt aus Blutkulturen zu diagnostizieren (Carvalhaes et al., 2014). Bei gleicher Inkubationszeit konnten nur drei von elf OXA-positiven *Acinetobacter baumannii* Stämmen diagnostiziert werden. Mit einem auf Ertapenem basierenden Versuchsaufbau gelang die Identifizierung Carbapenemase-positiver Erreger aus Blutkulturen innerhalb 4,5 Stunden mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 90% (Hoyos-Mallecot et al., 2014). Allerdings enthielt der Probenumfang dieser Studie nur drei OXA-positive Stämme aus insgesamt 19 Carbapenemase-positiven Proben.

Trotz aktueller Probleme bei der Diagnostik OXA-Carbapenemase-positiver Proben ist ein zuverlässiges MALDI-ToF basiertes Screening auf Carbapenemasen unabhängig vom Subtyp als

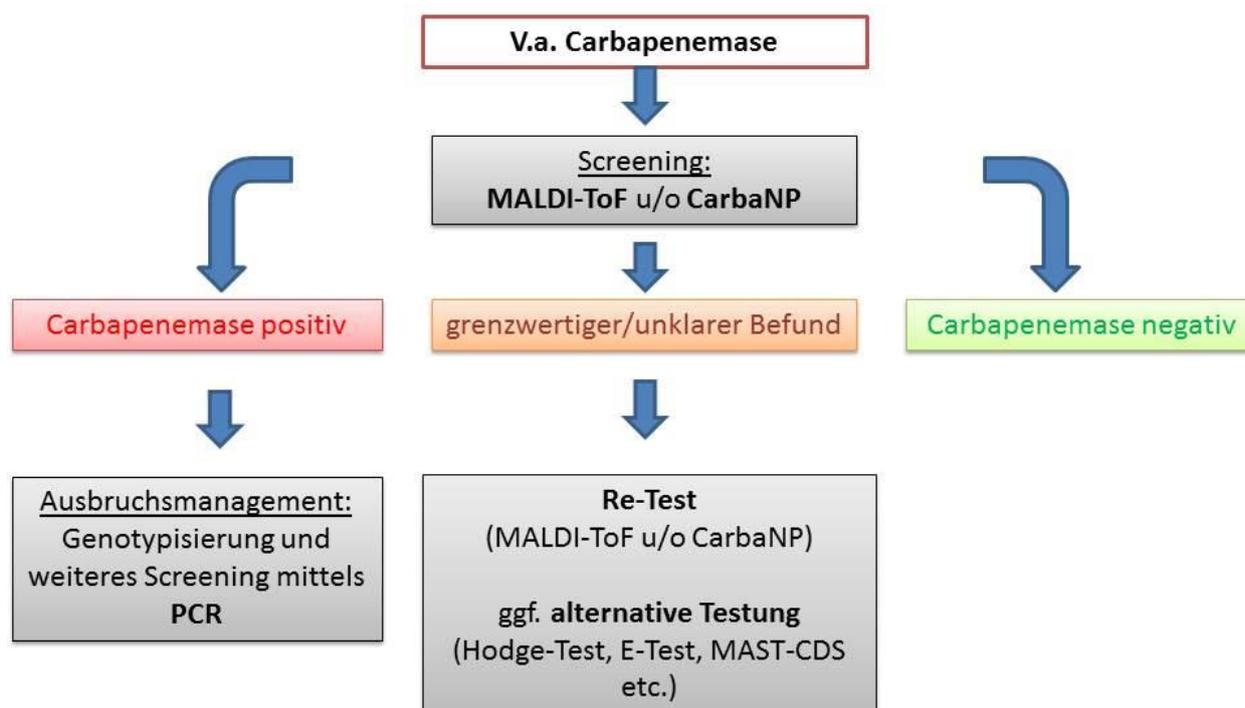
neuer Standard in Laboratorien für die Zukunft denkbar. Dies wird durch die hohen AUC-Werte der ROC-Analysen bestätigt (s. Tab. 4-15). Die AUC-Werte betragen nach zwei Stunden 0,87 und nach 24 Stunden 0,99 für die Detektion aller Carbapenemasen. Unter Ausschluss der OXA-Carbapenemasen konnte zu beiden Messzeitpunkten AUC-Werte von 0,99 erzielt werden. Eine vergleichbare Studien erreicht ähnlich hohe AUC-Werte für die auf MALDI-ToF basierte Carbapenemasedetektion (Lasserre et al., 2015). Ähnliche Werte erzielen auch Vergleichstests, wie der modifizierten Hodge-Test (AUC=0,99), jedoch beziehen sich die vorliegenden Studien häufig nur auf die Diagnostik eines Carbapenemase-Subtyps wie beispielsweise KPC-Carbapenemasen (Ribeiro et al., 2014), oder IMP-Carbapenemasen (Notake et al., 2013), sodass keine Rückschlüsse auf die Teststärke zur Detektion unbekannter Carbapenemasen verschiedenen Subtyps insbesondere unter Einschluss von OXA-Carbapenemasen möglich sind.

Während der Versuchsdurchführung traten bei 27 der insgesamt 632 (4,27%) MALDI-ToF-Messungen nicht auswertbare Messspektren auf. Hierbei handelte es sich entweder um vollständig fehlende Spektren, oder stark inhomogene Spektren. Die Auswertungssoftware war somit nicht in der Lage die zur Berechnung notwendigen Peaks zu identifizieren. Eine Berechnung der Ratio war somit nicht möglich. Häufig lagen solche Fehlmessungen nur zu einem Messzeitpunkt der Versuchsreihe vor während vorangegangene und nachfolgende Messungen problemlos auszuwerten waren und daher mit in die Gesamtanalyse einbezogen wurden. Bei leeren Messspektren, die weder Antibiotikum noch Matrix anzeigen ist davon auszugehen, dass kein Probenmaterial während der Messung vom Laser erfasst wurde. Ursache hierfür kann ein zu geringer Materialtransfer durch Pipettierfehler auf einzelne Messspots sein. Kommt eine zu geringe Materialmenge nicht zentriert sondern peripher auf der Messspotfläche zum Trocknen kann sie während der automatisierten Messung gegebenenfalls dem Laserbeschuss entgehen. In Vorversuchen konnte durch Erhöhung der Pipettiermenge von 2µg auf 3µg eine deutliche Reduktion leerer Messspektren erzielt werden. Eine korrekte Einhaltung der Pipettiermenge (1,5µg Probenmaterial + 1,5µg Matrix) auf das MALDI-ToF-Target ist somit unabdingbar. Auffällig ist der hohe Anteil an Pseudomonaden unter den fehlerhaften Messspektren (51,85%), wodurch sich die Frage stellt, ob neben Methodenfehlern nicht auch erregerspezifische Ursachen für inhomogene Messspektren verantwortlich sind. Die Resistenzsituation in Pseudomonaden ist häufig komplex und nicht ausschließlich Carbapenemase-vermittelt (El Amin et al., 2005; Livermore, 2002; Meletis et al., 2012). Dies führt gerade für Ertapenem zu einer häufig unzureichenden Wirksamkeit gegenüber Pseudomonaden (Bodmann, K.-F. et al., 2010). Auch andere Studien belegen eine schwierige

Diagnostik Carbapenemase-exprimierender Pseudomonaden in Kombination mit Ertapenem durch MALDI-ToF basierte Verfahren und vermuten hierfür komplexe Resistenzmuster wie zusätzlicher Porinverlust als Ursache (Johansson et al., 2014).

Zu den Messzeitpunkten nach zwei und vier Stunden traten jeweils falsch-positive Messergebnisse auf. Durch Wiederholung einzelner Messungen konnte bei einigen Erregern eine Reproduzierbarkeit falsch-positiver Befunde nachgewiesen werden (s. Abb. 4-23). Die durch diese Ergebnisse veranlasste Überprüfung aller falsch positiven gemessenen vom NRZ Carbapenemase-negativ genotypisierten Erreger zeigte bei allen Proben resistente Befunde (s. Tab. 4-13) in mindestens einem der durchgeführten Tests (Vitek, E-Test und Hodge-Test.). Aufgrund dieser Ergebnisse muss hinterfragt werden, ob es sich hierbei tatsächlich um falsch-positive Ergebnisse handelt. Naheliegender wäre, dass in den getesteten Proben genetisch nicht diagnostizierte Enzyme schwach ausgeprägter Carbapenemaseaktivität vorliegen, die zu einer schwachen Lyse des Ertapenems und damit einem Anstieg der Ratio führen. Die vergleichsweise niedrige Spezifität von 73,81% (Cut-off R=1) zum Zeitpunkt 24h ist somit zu relativieren. Sollte sich dieser Verdacht bestätigen, hätte somit ein MALDI-ToF basiertes Carbapenemase-Screening durch die Detektion bisher unbekannter Carbapenemasen einen deutlichen Vorteil gegenüber anderen Standardverfahren. Auf diese Weise kann durch MALDI-ToF neben klinisch relevanten Fragestellungen ein wichtiger Beitrag zur Erforschung und Diagnostik von neuen Resistenzmechanismen geliefert werden.

Die abschließende Betrachtung der durchgeführten Versuchsreihen, sowie die kritische Auseinandersetzung mit den aufgeführten vergleichbaren Studien legen nahe, dass alte etablierte Verfahren, wie der modifizierte Hodge-Test in naher Zukunft von neueren schnelleren und effizienteren Verfahren abgelöst werden. Am vielversprechendsten gelten hierbei weithin enzymatische Verfahren, wie der CarbaNP-Test oder MALDI-ToF. Abbildung 5-2 stellt eine alternative Vorgehensweise zur Diagnostik Carbapenemase-positiver gramnegativer Erreger dar, welche auf diesen neuen Verfahren aufbaut.



**Abb. 5-1 Mögliches Vorgehen bei klinischem Verdacht auf Carbapenemase-positive Erreger.** MALDI-ToF bzw. CarbaNP stellen die neue Basis der Carbapenemasediagnostik dar; PCR dient zum Ausbruchsmanagement bei bekanntem Erreger; gängige Referenztest sollten bei unklaren Befunden hinzugezogen werden.

Der CarbaNP-Test hat seine Alltagstauglichkeit zur Diagnostik bereits unter Beweis gestellt (Bayramoğlu et al., 2016; Dortet et al., 2015; Yan et al., 2016). Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch MALDI-ToF basierte Methoden den Anforderungen eines Standardtests im Hinblick auf Effizienz und Durchführbarkeit gerecht werden. Beide Verfahren zeigen Probleme bei der Diagnostik Carbapenemasen mit geringer katalytischer Aktivität (Lee et al., 2013; Mitra et al., 2015; Tijet et al., 2014). Modifizierungen des CarbaNP-Test versuchen dem entgegen zu treten (Dortet et al., 2014). Bei MALDI-ToF basierten Verfahren bietet sich hierfür neben Modifikation des Lysepuffers (Papagiannitsis et al., 2015) und Anpassung des Antibiotikums (Kempf et al., 2012) ein zweizeitiger Versuchsaufbau als eine naheliegende Lösung. Abbildung 5-1 stellt hierfür den nach Auswertung der Messungen erarbeiteten Testaufbau dar.

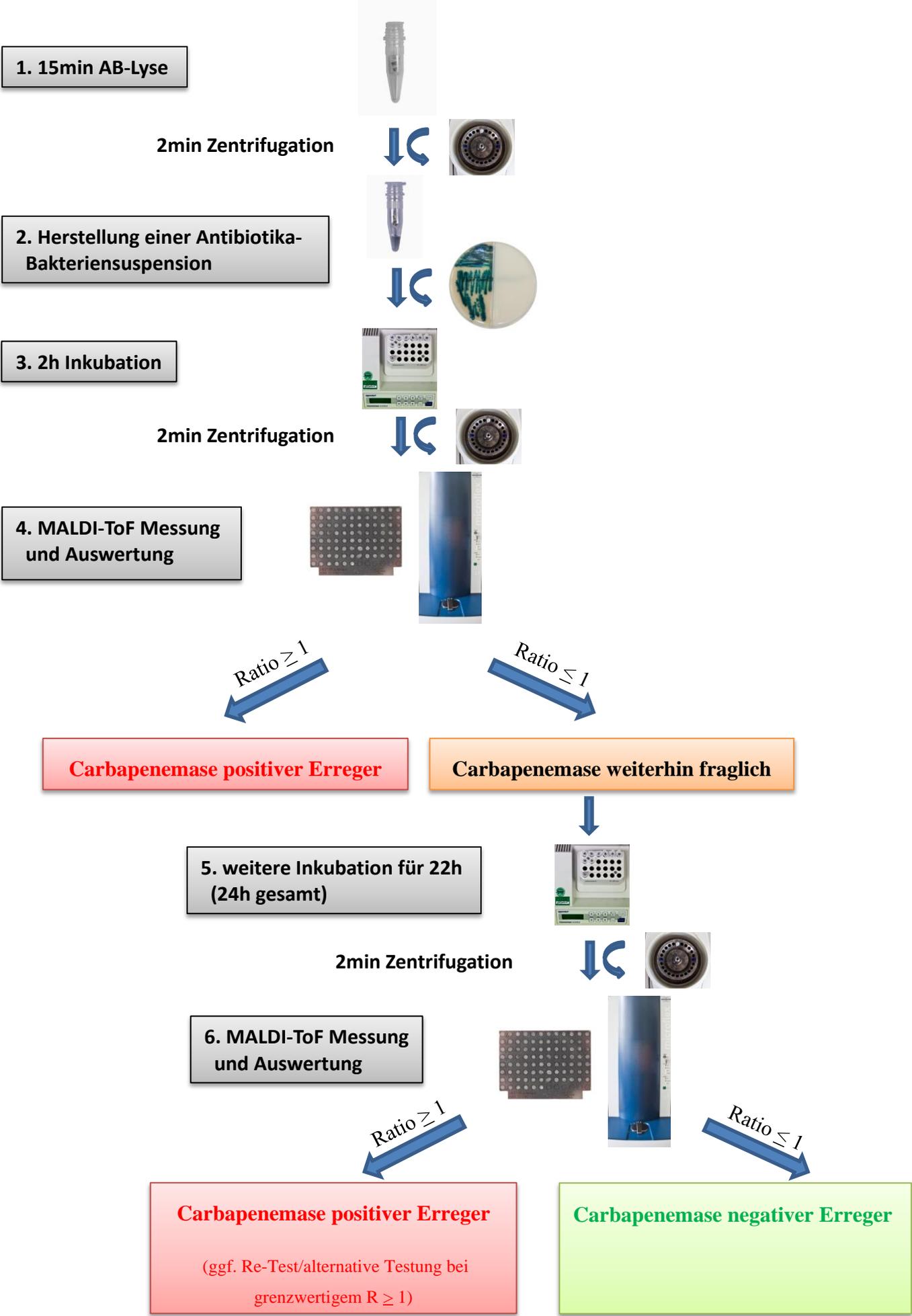


Abb. 5-2 Workflow zur MALDI-ToF basierten Diagnostik Carbapenemase-positiver Erreger

Der dargestellte Versuchsaufbau wurde anhand Ertapenem validiert und eignet sich zur Differenzierung Carbapenemase-positiver, wie auch Carbapenemase-negativer Proben unabhängig des Carbapenemase-Subtyps. Vorteil des Verfahrens ist die einfache und kostengünstige Durchführbarkeit bei hoher Testgüte. Gleichzeitig zeichnet sich der Versuchsaufbau durch seine Flexibilität aus und zeigt neben Carbapenemasen auch in der Diagnostik anderer  $\beta$ -Laktamasen (s. Abb. 4-3) und Detektion unbekannter Carbapenemasen vielversprechende Ergebnisse.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass:

1. MALDI-ToF basierte Schnelldiagnostik Carbapenemase-positiver Erreger ein zuverlässiges Verfahren mit herausragender Sensitivität zur zukünftigen Resistenzdiagnostik in Akutkrankenhäusern darstellt und etablierten Standardverfahren überlegen ist. Hierbei lassen sich durch eine zweizeitige Messung alle gängigen Carbapenemase-Typen inklusiver OXA-Carbapenemasen sicher diagnostizieren. Durch die Verwendung von ready-to-use Reagenzien und automatisierte Auswertung benötigt das Verfahren einen geringen Arbeitsaufwand.
2. MALDI-ToF einen wichtigen Beitrag zur Erforschung von enzymatischen Antibiotikaabbau beitragen kann. Massenspektroskopische Messung kann Hinweise auf unbekannte Carbapenemasen liefern und ermöglicht zukünftig gegebenenfalls anhand kinetischer Messungen deren Differenzierung und Klassifizierung.
3. MALDI-ToF basierte Resistenzdiagnostik eine flexible Methode darstellt, welche zur Diagnostik verschiedener  $\beta$ -Laktamasen beitragen kann.
4. Das Verfahren weiterhin über Optimierungspotential verfügt (beispielsweise durch veränderte Pufferansätze), flexibel an spezifische Fragestellungen angepasst werden kann und somit langfristig zukunftsfähig ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R., & Poole, K. (2002). The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *Journal of Bacteriology*, 184(15), 4308–12.
- Álvarez-Buylla, A., Picazo, J. J., & Culebras, E. (2013). Optimized method for *acinetobacter* species carbapenemase detection and identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5), 1589–1592.
- Ambler, R. P. (1980). The Structure of  $\beta$ -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 289(1036), 321–331.
- Babic, M., Hujer, A., & Bonomo, R. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9(3), 142–156.
- Bambeke, F. Van, Balzi, E., & Tulkens, M. (2000). Antibiotic Efflux Pumps Franc. *Biochemical Pharmacology*, 60(0), 457–470.
- Bayramoğlu, G., Uluçam, G., Gençoğlu Özgür, Ç., Kılıç, A. O., & Aydın, F. (2016). Comparison of the modified Hodge test and the Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 50(1), 1–10.
- Bethel, C. R., Taracila, M., Shyr, T., Thomson, J. M., Distler, A. M., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Endimiani, A., Papp-Wallace, K., Bonnet, R., Bonomo, R. A. (2011). Exploring the Inhibition of CTX-M-9 by  $\beta$ -Lactamase Inhibitors and Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3465–3475.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O, Piddock, L. V. J. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 42(13), 42–51.
- Bodmann, K.-F., Grabein, B., & Paul-Ehrlich-Gesellschaft. (2010). Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Antibiotikatherapie. *Chemother J 2010;19:179–255*.

- Brown, S., Young, H. K., & Amyes, S. G. B. (2005). Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*, *11*(1), 15–23.
- Burckhardt, I., & Zimmermann, S. (2011). Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(9), 3321–4.
- Burkhardt, O., Derendorf, H., & Welte, T. (2007). Ertapenem: the new carbapenem 5 years after first FDA licensing for clinical practice. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *8*(2), 237–56.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3), 969–976.
- Butaye, P., Cloeckaert, A., & Schwarz, S. (2003). Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *22*(3), 205–10.
- Camara, J. E., & Hays, F. A. (2007). Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *389*(5), 1633–8.
- Carvalhoes, C. G., Cayô, R., Visconde, M. F., Barone, T., Frigatto, E. a M., Okamoto, D., Assis, M. D., Juliano, L., Machado, A. M. O., Gales, A. C. (2014). Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(8), 2132–6.
- Chong, P. M., McCorrister, S. J., Unger, M. S., Boyd, D. A., Mulvey, M. R., & Westmacott, G. R. (2015). MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *Journal of Microbiological Methods*, *111*, 21–23.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., & Schweizer, H. P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(2), 428–32.

- Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 277–282.
- Congeni, B. L. (2010). Ertapenem. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(4), 669–72.
- Cunha, B. A. (2002). Ertapenem. A review of its microbiologic, pharmacokinetic and clinical aspects. *Drugs of Today (Barcelona, Spain : 1998)*, 38(3), 195–213.
- Dortet, L., Agathine, A., Naas, T., Cuzon, G., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(11), 3014–3022.
- Dortet, L., Poirel, L., Errera, C., & Nordmann, P. (2014). CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2359–64.
- Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* by using a biochemical test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6437–40.
- El Amin, N., Giske, C. G., Jalal, S., Keijser, B., Kronvall, G., & Wretling, B. (2005). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 113(3), 187–96.
- EUCAST. (2016). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version , 0–91.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). *Carbapenemase-producing bacteria in Europe*.
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–63.
- Fish, D. N., & Singletary, T. J. (1997). Meropenem, a new carbapenem antibiotic.

- Pharmacotherapy*, 17(4), 644–69.
- Gecaj-Gashi, A., Hasani, A., Bruqi, B., & Mulliqi-Osmani, G. (2011). Balkan NDM-1: escape or transplant? *The Lancet. Infectious Diseases*, 11(8), 586.
- Ghebremedhin, B., Halstenbach, A., Smiljanic, M., Kaase, M., & Ahmad-Nejad, P. (2016). MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 5.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Paviolis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137–46.
- Hajian-Tilaki, K. (2013). Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4(2), 627–35.
- Hanley, A. J., & McNeil, J. B. (1982). The Meaning and Use of the Area under a Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve. *Radiology*, 143, 29–36.
- Hashizume, T., Ishino, F., Nakagawa, J., Tamaki, S., & Matsushashi, M. (1984). Studies on the mechanism of action of Imipenem in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in E.coli assay for binding affinity to PB. *The Journal of Antibiotics*, 37(4), 394–400.
- Hazra, S., Xu, H., & Blanchard, J. S. (2014). Tebipenem, a new carbapenem antibiotic, is a slow substrate that inhibits the  $\beta$ -lactamase from mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry*, 53(22), 3671–3678.
- Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., & Fridkin, S. K. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 29(1559–6834 (Electronic)), 996–1011.
- Hooff, G. P., van Kampen, J. J. A., Meesters, R. J. W., van Belkum, A., Goessens, W. H. F., & Luidier, T. M. (2012). Characterization of  $\beta$ -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 11(1), 79–84.
- Hoyos-Mallecot, Y., Riazzo, C., Miranda-Casas, C., Rojo-Martín, M. D., Gutiérrez-Fernández,

- J., & Navarro-Marí, J. M. (2014). Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *Journal of Microbiological Methods*, *105*, 98–101.
- Hrabák, J., Chudácková, E., & Walková, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(1), 103–114.
- Hrabák, J., Studentová, V., Walková, R., Zemlicková, H., Jakubu, V., Chudácková, E., Gniadkowski, M., Pfeiffer, Y., Perry, J. D., Wilkinson, K., Bergerová, T. (2012). Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(7), 2441–3.
- Hrabák, J., Walková, R., Studentová, V., Chudácková, E., & Bergerová, T. (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(9), 3222–7.
- Jacoby, G. A., Mills, D. M., & Chow, N. (2004). Role of  $\beta$ -Lactamases and Porins in Resistance to Ertapenem and Other  $\beta$ -Lactams in *Klebsiella pneumoniae*, *48*(8), 3203–3206.
- Johansson, A., Ekelöf, J., Giske, C. G., & Sundqvist, M. (2014a). The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiology*, *14*, 89.
- Johansson, A., Ekelöf, J., Giske, C. G., & Sundqvist, M. (2014b). The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiology*, *14*(1), 89.
- Jung, J. S., Popp, C., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., & Schubert, S. (2014). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(3), 924–930.
- Kabir, M. H., Meunier, D., Hopkins, K. L., Giske, C. G., & Woodford, N. (2016). A two-centre evaluation of RAPIDEC<sup>®</sup> CARBA NP for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,

dkv468.

- Kattan, J. N., Villegas, M. V, & Quinn, J. P. (2008). New developments in carbapenems. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(12), 1102–11.
- Kaye, K. S., & Pogue, J. M. (2015). Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria : Epidemiology and Management.
- Kempf, M., Bakour, S., Flaudrops, C., Berrazeg, M., Brunel, J.-M., Drissi, M., Mesli, E., Touati, A., Rolain, J.-M. (2012). Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PloS One*, 7(2), e31676.
- Knaust, A., Lu, C., & Eckmanns, T. (2015). Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* : investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction, 89.
- Knox, J., Jadhav, S., Sevier, D., Agyekum, A., Whipp, M., Waring, L., Iredell, J., Palombo, E. (2014). Phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 4075–7.
- Koebnik, R., Locher, K. P., & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37(2), 239–253.
- Korber, D. R., Choi, A., Wolfaardt, G. M., Ingham, S. C., & Caldwell, D. E. (1997). Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to trisodium phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3352–8.
- Kumar, A., & Schweizer, H. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486–1513.
- Lambert, P. A. (2002). Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, 95(41), S22-26.
- Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., Naas, T., Tandé, D. (2015). Efficient Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less

- Than 30 Minutes. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2163–71.
- Lee, W., Chung, H.-S., Lee, Y., Yong, D., Jeong, S. H., Lee, K., & Chong, Y. (2013). Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aerug.* *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 227–30.
- Leonard, D. a, Hujer, A. M., Smith, B. a, Schneider, K. D., Bethel, C. R., Hujer, K. M., & Bonomo, R. a. (2008). The role of OXA-1 beta-lactamase Asp(66) in the stabilization of the active-site carbamate group and in substrate turnover. *The Biochemical Journal*, 410(3), 455–462.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(5), 634–40.
- Livermore, D. M. (2012). Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean Journal of Internal Medicine*, 27(2), 128–142.
- Livermore, D. M., Sefton, A. M., & Scott, G. M. (2003). Properties and potential of ertapenem. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(3), 331–44.
- Lyon, J. A. (1985). Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy*, 19(12), 895–9.
- Maseda, H., Yoneyama, H., & Nakae, T. (2000). Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 658–64.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000). Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2242–6.
- Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D., & Diza, E. (2012). Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*, 16(4), 303–7.
- Mirande, C., Canard, I., Buffet Croix Blanche, S., Charrier, J. P., van Belkum, A., Welker, M., &

- Chatellier, S. (2015). Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(11), 2225–2234.
- Mitra, S., Kazi, M., Panchal, M., Rodrigues, C., & Shetty, A. (2015). Evaluation of Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(4), 603–6.
- Monteiro, J., Widen, R. H., Pignatari, A. C. C., Kubasek, C., & Silbert, S. (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 906–909.
- Neuhauser, H. (2013). Epidemiologisches Bulletin. *Robert Koch Institut*, (13), 105–114.
- Nicolau, D. P. (2008). Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(1), 23–37.
- Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(11), 1831–1836.
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263–272.
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V., Akova, M., Naas, T., Seidert, H., Livermore, D., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., Canton, R., Rossolini, G. M., Gieske, C., Adler, A. Carmeli, Y., Navon-Venezia, S., Samuelsen, O., Cornaglia, G. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 432–438.
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Disease*, 17(10), 1791–1798.
- Nordmann, P., Poirel, L., & Dortet, L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9), 1503–7.
- Norrby, S. R. (1995). Carbapenems. *The Medical Clinics of North America*, 79(4), 745–59.
- Notake, S., Matsuda, M., Tamai, K., Yanagisawa, H., Hiramatsu, K., & Kikuchi, K. (2013). Detection of IMP metallo- $\beta$ -lactamase in carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae*

- and non-glucose-fermenting gram-negative rods by immunochromatography assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1762–1768.
- NRZ für gramnegative Krankenhauserreger. (2012). Retrieved April 23, 2016, from [http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de/nrz/nrz\\_FAQs.html#](http://memiserf.medmikro.ruhr-uni-bochum.de/nrz/nrz_FAQs.html#)
- Osei Sekyere, J., Govinden, U., & Y. Essack, S. (2015). Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, n/a-n/a.
- Oviaño, M., Fernández, B., Fernández, A., Barba, M. J., Mouriño, C., & Bou, G. (2014). Rapid detection of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(11), 1146–57.
- Papagiannitsis, C. C., Studentova, V., Izdebski, R., Oikonomou, O., Pfeifer, Y., Petinaki, E., & Hrabak, J. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1731–1735.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960.
- Park, S. H., Goo, J. M., & Jo, C.-H. (2004). Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. *Korean Journal of Radiology*, 5(March), 11–8.
- Pasteran, F., Veliz, O., Rapoport, M., Guerriero, L., & Corso, A. (2011). Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4301–3.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Skurray, R. a. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, 60(4), 575–608.
- Perez, F., & Van Duin, D. (2013). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 80(4), 225–33.
- Poirel, L., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). NDM-1-

- producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(2), 304–306.
- Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V., & Nordmann, P. (2003). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 15–22.
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–23.
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–58, table of contents.
- Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A. L., & Zechiedrich, E. L. (2002). Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Molecular Microbiology*, 43(3), 677–85.
- Randall, C. P., Mariner, K. R., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 637–9.
- Rasmussen, B. A., Bush, K., Keeney, D., Yang, Y., Hare, R., O'Gara, C., & Medeiros, A. A. (1996). Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(9), 2080–6.
- Ribeiro, V. B., Linhares, A. R., Zavascki, A. P., & Barth, A. L. (2014). Performance of quantification of modified Hodge test: An evaluation with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae isolates. *BioMed Research International*, 2014.
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Nordmann, P., Ronco, E., & Poirel, L. (2010). Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), 3484–8.
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

53(5), 1766–71.

- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., & Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 56–60.
- Sanchez, P. Ruiz Diez, B. Campanario, E. Navas, A. Martinez, J. Baquero, F. (2001). Hyperexpression of pumps in nalB and nfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa* decreases virulence in the *Caenorhabditis elegans* nematode model.
- Sauget, M., Cabrolier, N., Manzoni, M., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2014). Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 105, 88–91.
- Schubert, S., Wieser, A., & Für. (2010). MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum*, 7, 760–762.
- Schweizer, H. P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*, 2(1), 48–62.
- Shah, P. M. (2008). Parenteral carbapenems. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(SUPPL. 1), 175–180.
- Smith, C. A., Antunes, N. T., Stewart, N. K., Toth, M., Kumarasiri, M., Chang, M., Mobashery, S., Vakulenko, S. B. (2013). Structural basis for carbapenemase activity of the OXA-23  $\beta$ -lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *Chemistry & Biology*, 20(9), 1107–15.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 927–37.
- Studentova, V., Papagiannitsis, C. C., Izdebski, R., Pfeifer, Y., Chudackova, E., Bergerova, T., Gniadkowski, M., Hrabak, J. (2015). Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiologica*, 60(2), 119–129.
- Talbot, G. H. (2008). What is in the pipeline for Gram-negative pathogens? *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.*, 6(1744–8336 (Electronic)), 39–49.

- Thomson, K. S. (2010). Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1019–25.
- Tijet, N., Boyd, D., Patel, S. N., Mulvey, M. R., & Melano, R. G. (2013). Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4578–80.
- Tijet, N., Boyd, D., Patel, S. N., Mulvey, M. R., & Melano, R. G. (2014). Reply to “further proofs of concept for the Carba NP test”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1270.
- Turnidge, J. D. (1998). The Pharmacodynamics of. *Clinical Infectious Diseases*, 10–22.
- Vasoo, S., Cunningham, S. A., Kohner, P. C., Simner, P. J., Mandrekar, J. N., Lolans, K., Hayden, M. K., Patel, R. (2013). Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 3097–101.
- Vercheval, L., Bauvois, C., di Paolo, A., Borel, F., Ferrer, J.-L., Sauvage, E., Matagne, A., Frère, J.-M., Charlier, P., Galleni, M., Kerff, F. (2010). Three factors that modulate the activity of class D  $\beta$ -lactamases and interfere with the post-translational carboxylation of Lys70. *The Biochemical Journal*, 432(3), 495–504.
- Walther-Rasmussen, J. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 373–383.
- Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M., & Levy, S. B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1515–21.
- Wang, Z., Fast, W., Valentine, A. M., & Benkovic, S. J. (1999). Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(5), 614–622.
- Webber, M. a., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11.
- WHO. (2014). Antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(3), 383–94.

- World Economic Forum (WEF). (2013). *Global Risks Report 2013 Eighth Edition*.
- World Economic Forum (WEF). (2015). *Global Risks 2015. 10th Edition*.
- Yan, Q., Liu, Q., Li, Y., Li, H., Liang, X., Zou, M., & Liu, W.-E. (2016). Detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria using a simplified Carba NP test. *Journal of Microbiological Methods*, *123*, 1–3.
- Yang, Y. J., Wu, P. J., & Livermore, D. M. (1990). Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *34*(5), 755–8.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(12), 5046–54.
- Youden, W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, *3*(1), 32–35.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(2), 361–385.
- Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Norredin, A. M., Karlowsky, J. A. (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, *67*(7), 1027–52.

## 7 Anhang

### Kurzanleitung

#### MALDI-ToF basierte Frühdiagnostik Carbapenemase-positiver gramnegativer Bakterien

##### 1.1. Benötigte Materialien

###### 1.1.1 Materialien zur Herstellung einer Antibiotika-Lösung

- Elution Tubes 0,5ml
- Micro-Schraubröhre 1,5ml
- Antibiotika Testplättchen (10µg ETP BD Sensi-Disc)
- 45% NaCl-Lösung

###### 1.1.2 Materialien für Inkubation und Messung

- Bakterienkolonien auf Blutagar inkl. Cefpodoxim Testplättchen/ESBL Agar
  - 16h-24h, 35-37°C, 5% CO<sub>2</sub>
- Eppendorfgefäß 1,5ml
- Impfösen
- Antibiotika-Lösung
- HCCA-Matrix
- MALDI-ToF Target

## 1.2 Vorbereitung

1.2.1 Durchbohren des Bodens der Elution Tubes (z.B. mit einer erhitzten Impfnadel)

## 2. AB-Lösung herstellen

2.1 Jeweils drei Antibiotikaplättchen in ein Elution-Tube 0,5ml geben

→ ggf. die Plättchen fest mit einer Pinzette auf den Boden des Gefäßes pressen

2.2 Elution Tube 0,5ml in Micro-Schraubröhre 1,5ml stellen

2.2 Die Antibiotikaplättchen im Elution Tube mittels 210µl NaCl (45%) lysieren

→ aus **einem** Ansatz lässt sich für ca. **vier** Proben Antibiotikalösung gewinnen

2.3 **15min** Inkubation bei Raumtemperatur

2.4 Zentrifugieren (2min/13000rpm)

→ Das Elution Tube inkl. Antibiotika-Plättchen nach der Zentrifugation entsorgen

2.5 Die gewonnene Antibiotika-Lösung aus verschiedenen Ansätzen in ein Gefäß pipettieren

→ z.B. Micro-Schraubröhre 1,5ml

→ Durch kurzes An- und Abpipettieren die Lösung durchmischen

2.6 Jeweils 50µl der Antibiotikalösung in bereitgestellte Eppendorf-Gefäße pipettieren

### 3. Inkubation und Messung

3.1 Mit Hilfe einer Impföse c.a. 3-5 Bakterienkolonien in die bereitgestellte 50µl Antibiotikallösung einrühren

3.2. Inkubation bei 37°/ 900rpm für 2h

3.3. Nach Inkubationsende Inkubationslösung 2min bei 13.000rpm zentrifugieren

3.4 1,5µl des Überstandes auf den Messpunkt eines MALDI-ToF polished steel target pipettieren (2 Spots pro Erreger)

→ Bakteriensuspension vortexen und weiter inkubieren bis Messergebnis vorliegt

→ positives Messergebnis: Test abgeschlossen

→ negatives Messergebnis: erneute Messung nach 24 Stunden Inkubation

3.5. Messpunkt mit 1,5µl HCCA-Matrix überlagern

3.6. Lufttrocknen lassen

### 4. MALDI-ToF Messung und Analyse mittels Bionumerics

4.1 Automatisierte 3fache MALDI-ToF Messung pro Messspot mit 240 Laserschüssen, einer Frequenz von 60/min und einer Intensität von 20-26%

4.2 Formatierung und Import der Datensätze in Bionumerics und automatisierte Ratioberechnung

## 8 Publikationen

### 2014

#### **VAAM-Jahrestagung 2014, 66. Jahrestagung der DGHM. Dresden.**

Poster und Abstract:

Bauer, K. J., Ruffing, U., Ulucam, G., Velten, D., Kaase, M., von Müller, L., Herrmann, M. (2014). Fast and standardized detection of carbapenemase activity using MALDI-ToF in combination with an optimized workflow using ready-to-use reagents and an automated interpretation software. *Biospektrum Tagungsband 2014*, DVP37 222-223.

### 2015

#### **ECCMID 2015. Kopenhagen.**

Abstract:

Bauer, K. J., Vranckx, K., Ruffing, U., Ulucam, G., Kaase, M., Herrmann, M., von Müller, L. (2015). Ready-to-use analysis of carbapenemase activity using MALDI-ToF in combination with an automated interpretation software. P0153.

### 2017

Manuskript in Ausarbeitung

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die mich Rahmen meiner Promotion auf vielfältige Art und Weise unterstützt und gefördert haben meinen Dank aussprechen. Hervorzuheben sind hierbei:

Herrn Prof. Dr. Lutz von Müller für die Aufnahme als Doktorand, sowie die kontinuierliche und zuverlässige Betreuung während der gesamten Promotionsphase. Ihre Begeisterung für die Thematik und Ihre stetige Motivation haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Diana Velten und Anna Nimmesgern, sowie allen weiteren beteiligten Laborkräften, die mich während Einarbeitungs- und Versuchsphase unterstützt haben und bei Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Herrn Dr. Martin Kaase vom NRZ für gramnegative Erreger für die Bereitstellung der Erregerproben.

Frau Katleen Vranckx von Applied Maths für die tatkräftige Unterstützung bei der automatisierten Datenauswertung mittels Bionumerics.

Meiner Familie, allen voran meinen Eltern. Der Erfolg meines Studiums und dieser Promotion basiert auf eurer uneingeschränkten Unterstützung. Meinen Freunden für die Verlässlichkeit und Vertrautheit, die wir über Jahre hinweg aufgebaut haben. Meiner Partnerin dafür, dass sie unseren gemeinsamen Weg, wie auch jeden Umweg Seite an Seite mit mir geht.