

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum

**Schnelle Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels
Massenspektrometrie und Isotop-Markierung am Beispiel
Pseudomonas aeruginosa und *Escherichia coli***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Theresa Anna Eberl
aus Starnberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Sören Schubert
Mitberichterstatter:	PD Dr. Stefan Odenbreit Prof. Dr. med. Michael Vogeser
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. Jette Jung
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	30.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	2
1.1.1. Geschichte	2
1.1.2. Prinzip.....	3
1.1.3. Isolatdifferenzierung.....	4
1.1.4. Resistenzbestimmung.....	5
1.1.4.1. Stammtypisierung zur Resistenzprädiktion	5
1.1.4.2. Funktionelle Tests.....	6
1.1.4.3. SILAC	7
1.2. Verwendete Antibiotika.....	8
1.2.1. β -Laktam-Antibiotika (Beispiele: Meropenem und Ertapenem)	9
1.2.2. Gyrasehemmer (Beispiel: Ciprofloxacin).....	9
1.2.3. Aminoglykoside (Beispiel: Tobramycin)	10
1.3. Resistenzmechanismen	10
1.3.1. Strukturelle Veränderung des Antibiotikums	10
1.3.2. Verhinderung der Aktivierung des Antibiotikums.....	11
1.3.3. Veränderung der Zielstruktur	11
1.3.4. Impermeabilität und Efflux-System.....	12
1.4. Erreger	12
1.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	14
1.5. Ziel der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Chemikalien	16
2.1.2. Antibiotika	16
2.1.3. Aminosäuren.....	17
2.1.4. Agarplatten.....	17
2.1.5. Etest-Streifen	18
2.1.6. Geräte.....	18
2.1.7. Software.....	18

2.1.8. Bakterien	19
2.2. Herstellung von Medien/Lösungen	19
2.2.1. SILAC-Assay	19
2.2.1.1. Kulturmedium	19
2.2.1.2. Lysin	19
2.2.1.3. Antibiotika	20
2.2.1.4. LB-Medium	20
2.2.1.5. Standard	20
2.2.2. β -Laktamase-Assay	20
2.2.2.1. SDS	20
2.2.2.2. Antibiotikum	20
2.2.2.3. Standard	21
2.2.3. Matrix	21
2.3. Methoden	21
2.3.1. Konventionelle Resistenztestung	21
2.3.2. SILAC	22
2.3.2.1. Wachstumsphasen	23
2.3.2.2. Verarbeitung von Blutkulturen	23
2.3.3. β -Laktamase-Assay	24
2.3.4. Messungen und Kalibration	24
2.3.5. Auswertung	25
2.3.5.1. flexAnalysis	25
2.3.5.2. R	25
2.3.5.3. Ermittlung von Indikatorpeaks zur automatisierten Auswertung	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Auswertung	27
3.1.1. Massen-Shifts	27
3.1.2. Automatisierte Auswertung	29
3.2. Etablierung der Test-Protokolle	30
3.2.1. Vorinkubation in LB-Medium	30
3.2.2. Antibiotikakonzentration und Inkubationszeit	31
3.2.3. Vorinkubation	34
3.2.4. Reproduzierbarkeit	36
3.3. Evaluierung der Testprotokolle	37

3.3.1. <i>P. aeruginosa</i>	37
3.3.2. <i>E. coli</i>	39
3.3.3. Blutkulturen	39
3.4. β -Laktamase-Assay	40
4. Diskussion	41
4.1. Test-Protokolle	41
4.2. MHK-Bestimmung	43
4.3. Vorteile der SILAC-Methode	46
4.4. Ausblick.....	47
5. Zusammenfassung	51
Literaturverzeichnis	53
Publikation.....	58
Abkürzungsverzeichnis.....	59
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	62
Danksagung	63

1. Einleitung

Im Jahre 1929 entdeckte der schottische Bakteriologe Alexander Fleming durch einen Zufall die antibiotische Wirksamkeit von Penicillinen [1]. Seither gehören Antibiotika zu den wichtigsten und am häufigsten eingesetzten Therapeutika; für die moderne Medizin sind sie unentbehrlich. Auf Europas Intensivstationen erhalten beispielsweise 64% der Patienten Antibiotikatherapien. Bei nur 37% der so behandelten Patienten wurde dabei eine bakterielle Infektion mikrobiologisch nachgewiesen [2].

Mit dem zunehmenden Einsatz von Antibiotika und ihrer Auswahl nach Empirie steigt auch die Anzahl an Isolaten, die Resistenzen gegen eine oder sogar mehrere dieser Antibiotikaklassen ausbilden. Besonders letztere stellen immer häufiger ein zentrales Problem in der Infektionsbehandlung dar und erfordern die Einhaltung spezieller Hygienemaßnahmen, deren einheitliche Durchführung nur durch standardisierte Einteilung der Isolate nach Resistenzmuster gewährleistet werden kann. Der lediglich epidemiologischen Zwecken dienlichen Einteilung in MDR (multi-), XDR (extended-) und PDR (pan-drug-resistant) für häufige grampositive und gramnegative Erreger durch Experten der ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) und CDC (Center for Disease Control and Prevention), die heute nur noch für *Mycobacterium tuberculosis* gebräuchlich ist, folgte bald eine neue Nomenklatur ausschließlich für klinisch relevante gramnegative Erreger und als Grundlage für deren Prävention. Diese Unterteilung in 3MRGN und 4MRGN (multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen drei bzw. vier der vier Antibiotikaklassen) durch die KRINKO (Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention) ist übersichtlich, ausschließlich phänotypisch und erlaubt die Ableitung einheitlicher Hygienemaßnahmen anhand eines einfachen Algorithmus [3, 4].

Zur Behandlung von Krankheitsbildern mit dringlicher Einleitung einer Therapie steht besonders zeitnahe Resistenzbestimmung im Mittelpunkt des Interesses. Die Sepsis beispielsweise stellt mit 35% auf europäischen Intensivstationen ein Krankheitsbild mit hoher Prävalenz dar und rangiert auf Platz 10 der Todesursachen in den USA. Antibiotikatherapie beeinflusst hier maßgeblich Verweildauer im Krankenhaus, Behandlungskosten und Mortalitätsrate im positiven Sinne [2, 5].

Bisherige Routinemethoden, wie zum Beispiel der Agardiffusionstest, benötigen Übernachtkulturen. Automatisierte Verfahren hingegen, die die Untersuchungsdauer auf bis zu 6 - 8 Stunden reduzieren, sind kostenintensiv [6].

Häufiger Einsatz von Antibiotika, aber auch die Wahl ungeeigneter Antibiotika auf Grundlage empirischer Daten, sind bedeutende Gründe für die zunehmende Entwicklung von Resistenzen. Diese Gegebenheit macht es wünschenswert, wenn nicht notwendig, die Ergebnisse der Resistenzbestimmung von Infektionserregern frühestmöglich zu erhalten [7].

1.1. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

In der mikrobiologischen Diagnostik sind vor allem Schnelligkeit, Präzision, einfache Handhabung und Kosteneffizienz von Bedeutung, weshalb sich die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) in den letzten Jahren im Bereich der Differenzierung von Bakterien und Pilzen durchgesetzt hat und nach und nach konventionelle Methoden ablöst [8, 9].

1.1.1. Geschichte

Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Massenbestimmung von Molekülen; sie hielt in den 50er Jahren Einzug in die Labore. Damals konnten nur niedermolekulare organische Substanzen analysiert werden. Elektronenstoßionisation und Chemische Ionisation wurden zunächst zur Untersuchung thermisch stabiler und verdampfbarer niedermolekularer Verbindungen genutzt. Später dann, nach chemischer Modifizierung der Analyte, wurde die Massenspektrometrie auch zur Untersuchung schwerflüchtiger und polarer organischer Verbindungen eingesetzt. Bis Ende der 60er Jahre war es lediglich möglich, größere organische Moleküle nach thermischem Abbau durch indirekte Messung ihrer Pyrolysebruchstücke zu messen. Über die Entwicklung verschiedener Ionisationsmethoden wie beispielsweise *fast atom bombardment*, Felddesorption, Sprayionisation und Laserdesorption entwickelte man schließlich 20 Jahre später die MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionisation*). Dieses schonende Verfahren verhindert die Pyrolyse des Analyten, wie sie bei herkömmlichen Verfahren durch den hochenergetischen Laserstrahl stattfindet, wodurch die direkte Messung polarer nichtflüchtiger und höhermolekularer Stoffe ermöglicht wird. Die Entdeckung der TOF-Analyse (*time of flight*) eröffnete der

Massenspektrometrie schließlich Zugang zu einem unbegrenzten Massenbereich. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit, Auflösung, Stabilität, Effizienz, Sensitivität und dem geringen Zeitbedarf wurde MALDI-TOF MS zu einer bedeutenden Analyse­methode von Polymeren und Makromolekülen [10].

1.1.2. Prinzip

Ein Massenspektrometer besteht aus Ionenquelle, Analysator und Detektor.

Zu Beginn wird der Analyt in der Ionenquelle durch MALDI ionisiert. Dafür wird er dünn auf einen Probenträger aufgebracht, der gleichzeitig als geladene Metall­elektrode dient. Nach der Trocknungszeit wird er mit einer Matrix überschichtet, die im Verhältnis zum Analyten im Überschuss vorliegen muss. Das Gemisch kristallisiert aus und die Analytmoleküle werden positiv geladen. Im Gerät eingebracht wird das Analyt-Matrix-Gemisch unter Vakuum mit einem kurzwelligem Laser beschossen, woraufhin die Matrix verdampft und der ionisierte Analyt in einem elektrischen Feld im Analysator beschleunigt werden kann. Am Detektor wird schließlich das Eintreffen der Ionen registriert.

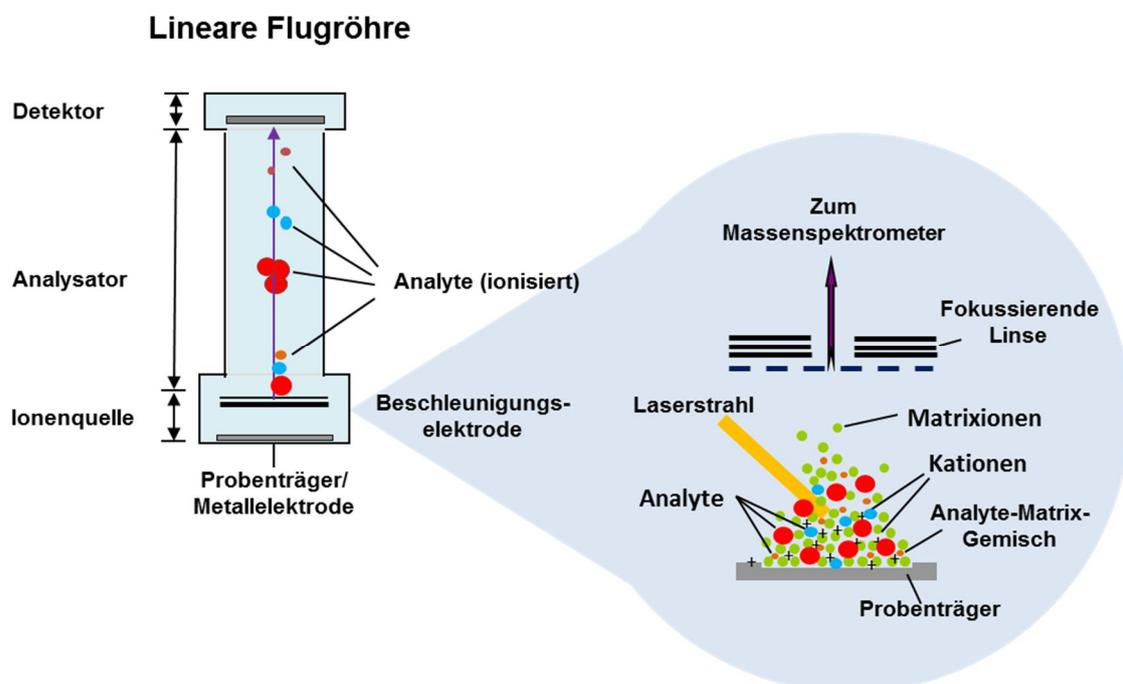


Abbildung 1 Aufbau und Prinzip von MALDI-TOF MS (verändert nach [9]).

Je nach Anwendungsgebiet eignen sich verschiedene Substanzen als Matrix:

Für die Analyse von Biopolymeren zum Beispiel werden häufig α -Cyano-4-hydroxycimtsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder Trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxycimtsäure verwendet.

Ionenerzeugung, Beschleunigung und Trennung werden in kurzen Zeitabständen mit einer Pulsbreite von 3 ns wiederholt, was als diskontinuierliche Methode bezeichnet wird. Die Geschwindigkeit der Moleküle und somit auch ihre Flugzeit sind abhängig von ihrer Ladung und Masse. Bei gleicher Ladung (vorzugsweise einfach positiv) weisen kleinere Moleküle eine kürzere Flugzeit auf als größere. Mit Hilfe von TOF-Analysatoren können so durch Messung der Flugzeit am Detektor Rückschlüsse auf die Masse der Moleküle getroffen werden.

Für den Detektor stehen zwei Konfigurationen zur Verfügung. Der Lineardetektor, an dem die Ionen direkt ohne Umleitung gemessen werden und der Reflektordetektor mit verbesserter Auflösung. Bei letzterem werden die Ionen vor dem Lineardetektor durch einen Ionenreflektor, bestehend aus einem geringfügig stärkeren elektrischen Feld, umgelenkt. Hierbei werden die Teilchen nicht mehr nur nach ihrer Masse, sondern auch nach ihrer kinetischen Energie aufgetrennt. Die Sensitivität wird mit dieser Einstellung jedoch verringert, da Moleküle, die vor dem Reflektor zerfallen, nicht detektiert werden können.

Die graphische Darstellung der Messergebnisse liefert sodann analytisch spezifische Massenspektren [10, 11].

1.1.3. Isolatdifferenzierung

Die Identifikation von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS beruht auf der Analyse ribosomaler Proteine, deren Peaks hauptsächlich im Messbereich von 2 kDa bis 20 kDa nachweisbar sind und einen für den jeweiligen Mikroorganismus charakteristischen „molekularen Fingerabdruck“ liefern. Ein automatisierter Abgleich dieser Spektren mit einer Datenbank führt in wenigen Minuten zu Erregeridentität [9].

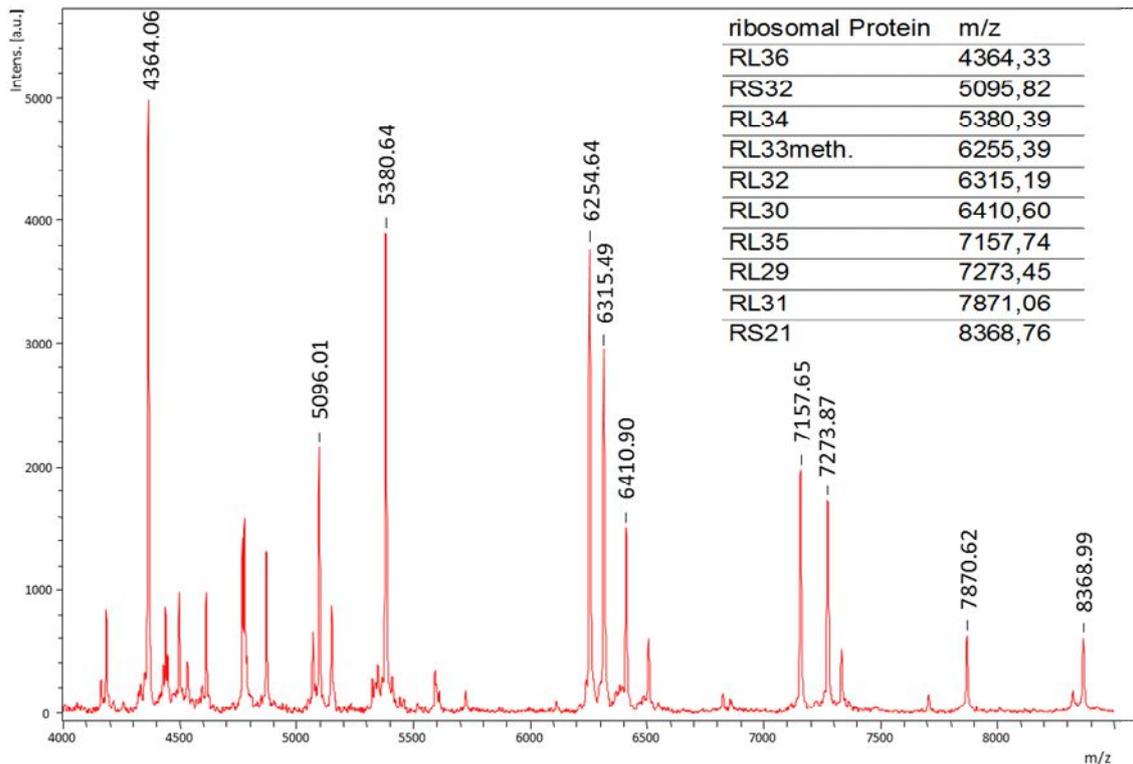


Abbildung 2 Massenspektrum von *Escherichia coli* mit Markierung ribosomaler Proteine.

1.1.4. Resistenzbestimmung

In den vergangenen Jahren wuchs das Interesse, MALDI-TOF MS auch für andere mikrobiologische Untersuchungen, etwa die Resistenzbestimmung von Bakterien, einzusetzen. Im Folgenden sollen verschiedene Möglichkeiten hierfür vorgestellt werden.

1.1.4.1. Stammtypisierung zur Resistenzprädiktion

Sehr früh versuchte man MRSA- (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) und MSSA- (Methicillin-sensitiver *S. aureus*) Stämme anhand ihrer Peak-Muster zu unterscheiden [12-14]. Ziel dieser Arbeiten war es eine Korrelation des Auftretens bestimmter Peaks mit der Anwesenheit bestimmter Oberflächenproteine, die mit Antibiotikaresistenz assoziiert werden, nachzuweisen. In erster Linie konzentrierten sich die Arbeiten auf den Nachweis des MRSA-spezifischen Penicillin-Bindeproteins PBP2a.

Früh wurde deutlich, dass die Ergebnisse nicht vollständig mit denjenigen von konventionellen Methoden übereinzustimmen schienen, da die untersuchten Peaks

nicht direkt PBP2a nachwiesen sondern eher, analog zur Speziesidentifikation, eine Einteilung in klonale Stammlinien ermöglichten. So konnten zwei Gruppen unterschieden werden, diejenigen mit und die ohne das für das Protein PBP2a Protein kodierende *mecA*-Gen. Bald stellte sich heraus, dass auch Klone, die das *mecA*-Gen verloren hatten, auf Basis ihres Massenspektrums als resistent detektiert wurden. Darüber hinaus fand man fälschlicherweise als empfindlich eingeordnete Isolate, welche nicht zu bekannten *mecA*-Klonen gehörten [8, 15].

Auch bei gramnegativen Erregern wurde versucht eine schnelle Resistenzbestimmung mittels morphologischer Tests zu entwickeln. Hier erwies sich z.B. die Korrelation der Metallo- β -Laktamase *cfiA* von *Bacteroides fragilis* mit dem kodierenden *cfiA*-Gen als wesentlich stabiler als die von PBP2a Protein mit dem *mecA*-Gen. Der Nachweis über die Zugehörigkeit zur klonalen Gruppe mit *cfiA*-Gen gibt allerdings keinen Hinweis auf die Enzymaktivität [16-18].

Die alleinige Mustererkennung zur Klassifizierung in Resistenzgruppen erwies sich somit als zu ungenau und ein nächstes Ziel war es, mit MALDI-TOF MS die Proteine direkt nachzuweisen, die für den Resistenzphänotyp verantwortlich sind. Ein Beispiel hierfür ist der direkte Nachweis von β -Laktamasen nach entsprechender Extraktion aus der Bakterienzelle und anschließender Aufreinigung. Dieses Verfahren bleibt allerdings aufgrund des hohen Arbeitsaufwands Forschungslaboratorien vorbehalten und ist für den Routine-Diagnostik-Betrieb zu zeitraubend [19].

Offen bleibt wie zuverlässig die große Vielfalt an β -Laktamasen mit ihren unterschiedlichen Mutationskombinationen, die sich in ihrem Molekulargewicht nicht oder nur wenig unterscheiden, durch ihre Massenspektren identifiziert werden können.

1.1.4.2. Funktionelle Tests

Eine andere Möglichkeit bieten für β -Laktam-Antibiotika etablierte funktionelle Tests. Im Unterschied zu dem oben beschriebenen Verfahren, werden hier in einem Massenbereich von 100 bis 1.000 Da die Massen des Antibiotikums und dessen Abbauprodukte nachgewiesen. Bakterien, die eine β -Laktamase besitzen, spalten bei Inkubation mit jeweiligem Antibiotikum den β -Laktamring auf. Es entstehen neue Peaks des hydrolysierten Antibiotikums, die durch Anlagerung von Wasser um 18 Da schwerer und durch spontane Decarboxylierung wiederum um 44 Da leichter werden und dadurch in anderen Massenbereichen nachweisbar werden [20, 21].

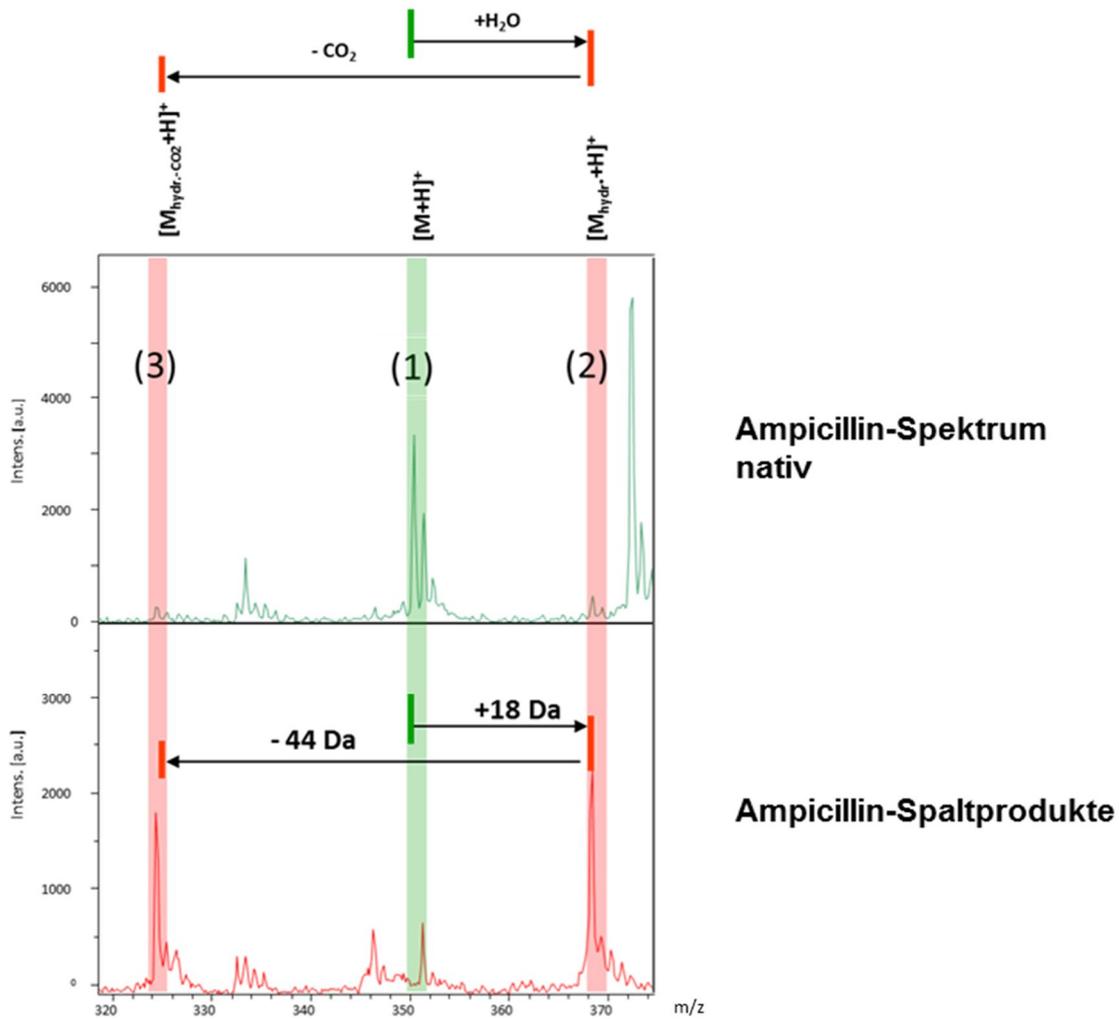


Abbildung 3 Veränderung des Peak-Musters von Ampicillin (1) durch Hydrolyse (2) und anschließende Decarboxylierung (3).

Diese Methode ermöglicht allerdings nur den Nachweis von Resistenzen, die auf der Modifikation (z.B. Spaltung) von Antibiotika beruhen und damit zu Veränderungen der Molekülmassen der Antibiotika führen.

1.1.4.3. SILAC

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf eine neuartige Methode zur Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF MS, die auf SILAC (*stabel isotope labeling by amino acids in cell culture*) basiert und in Bezug auf oben genannte Nachteile den bisherigen Methoden überlegen ist. So ist sie schnell und einfach durchzuführen, kosteneffizient und ermöglicht die Resistenzbestimmung anhand des Wachstumsverhaltens; begrenzt sich also nicht auf den Nachweis eines einzelnen

Resistenzmechanismus oder Gens, der möglicherweise keine korrekten Aussagen über den tatsächlichen Resistenz-Phänotyp ermöglicht.

Die 2002 erstmals beschriebene SILAC-Methode ergänzt die Untersuchungen zur Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden und Proteinen mittels Massenspektrometrie um den Nachweis der *in-vivo*-Aufnahme von Aminosäuren in Zellen und deren Einbau in Proteine. So können Veränderungen der Proteinexpression während bestimmter Stoffwechselfvorgänge in einer Zelle nachgewiesen werden [22].

Ihre Anwendung beschränkt sich nicht nur auf Zellkulturen, sondern wird auch zur Untersuchung von Hefen, Bakterien und Pflanzen genutzt. Des Weiteren lassen sich sogar Protein-Protein- sowie DNA-Protein-Interaktionen nachweisen.

Die beschriebene Methode wurde in der vorliegenden Arbeit dazu genutzt das Wachstum bzw. die Hemmung des Wachstums von Bakterienzellen durch Antibiotika nachzuweisen.

SILAC beruht auf dem folgenden Prinzip: Zellkulturen werden in zwei verschiedenen Medien inkubiert, wovon eines normale Aminosäuren, das andere eine oder mehrere mit stabilen Isotopen markierte Aminosäure(n) enthält. Bei anschließender massenspektrometrischer Messung und Vergleich der beiden Spektren ist eine Massenverschiebung der Protein-Peaks um eine für die Isotop-markierte Aminosäure typisches Gewicht oder dessen Vielfaches zu beobachten [23].

In den hier beschriebenen Versuchen wurde Stickstoff- und Kohlenstoff-markiertes Lysin verwendet, dessen einfacher Einbau in ein Polypeptid zu einem Massen-Shift von jeweils 8 Da führt.

1.2. Verwendete Antibiotika

85 Jahre nach Flemings Entdeckung sind eine Vielzahl antibiotisch wirksamer Substanzen bekannt, die durch ihre unterschiedlichen Strukturen auf verschiedenste Weisen in die Stoffwechselfvorgänge der Bakterienzelle eingreifen.

Die Auswahl der Antibiotika für diese Arbeit erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten: große Potenz bezüglich der verwendeten Isolate, vermehrter Einsatz in der Therapie und steigende Resistenzlage.

Es wurden schließlich drei Antibiotika untersucht, die jeweils eine klinisch relevante Stoffklasse repräsentieren und verschiedene Angriffspunkte im bakteriellen Stoffwechsel besitzen.

1.2.1. β -Laktam-Antibiotika (Beispiele: Meropenem und Ertapenem)

Meropenem und Ertapenem sind vor allem im gramnegativen aber auch im grampositiven Bereich wirksame Antibiotika, sie zählen zu den Breitspektrum-Antibiotika, wobei Ertapenem im Vergleich ein etwas schmaleres Spektrum aufweist, das *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) nicht mit einschließt [24]. Zur Therapie bei Infektionen mit diesem Erreger eignet sich Ertapenem folglich nicht. Das Antibiotikum wurde in dieser Arbeit dennoch in einigen Untersuchungen verwendet, in denen es lediglich galt Resistenzen nachzuweisen (vgl. 1.4.1. und 4.3.).

Als Carbapeneme gehören beide Stoffe zu den β -Laktam-Antibiotika und wirken durch Störung der bakteriellen Zellwandsynthese bakterizid. Durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat der an der Zellwandbiosynthese beteiligten Penicillin-Binde-Proteine (PBP) können β -Laktam-Antibiotika kovalent am katalytischen Zentrum der PBP binden und dieses inaktivieren. Je nach Bindung an eines der PBP, für *Enterobacteriaceae* wurden zum Beispiel sechs wichtige definiert [25], verhindern sie durch verschiedenen Mechanismen die Peptidoglycanbiosynthese und führen zum Arrest des bakteriellen Wachstums, zur Zellwandlyse und somit zur Bakterienzellyse.

Die Gruppe der β -Laktam-Antibiotika ist gut verträglich und zählt zu den am häufigsten verwendeten Antibiotika bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien [26, 27].

1.2.2. Gyrasehemmer (Beispiel: Ciprofloxacin)

Ciprofloxacin ist ein 2. Generation-Fluorchinolon und wie Meropenem ein Breitspektrumantibiotikum, dabei aber hauptsächlich im gramnegativen Bereich bakterizid wirksam. Es weist in der Gruppe der Chinolone, die durch Inhibition der Topoisomerase II (Gyrase) und IV in die DNA-Replikation eingreifen, die größte Wirksamkeit gegen *E. coli* (*Escherichia coli*) und *P. aeruginosa* auf. Wobei die Wirksamkeit von Ciprofloxacin gegen *P. aeruginosa* im Vergleich zu der gegen *Enterobacteriaceae* etwas niedriger einzustufen ist [26, 27].

1.2.3. Aminoglykoside (Beispiel: Tobramycin)

Die Gruppe der Aminoglykoside wird durch Tobramycin vertreten, das die Proteinbiosynthese an den bakteriellen Ribosomen hemmt. Aminoglykoside werden zur Behandlung von nosokomialen Infektionen mit gramnegativen Erregern meist mit β -Laktam-Antibiotika oder Chinolonen kombiniert.

Ihre Angriffspunkte sind vielfältig. Sie inhibieren die Proteinbiosynthese durch Eingriff in Initiation, Elongation und Termination der Translation an der ribosomalen RNA von Bakterien, stören den Elektronentransport der Atmungskette und führen so zu Ionenverschiebungen, sie greifen die bakterielle Zellwand an und indirekt in die DNA-Replikation ein [26, 27].

1.3. Resistenzmechanismen

So vielfältig die Angriffspunkte der Antibiotika sind, so divers sind auch die verschiedenen Möglichkeiten der Bakterien, diese Antibiotika zu inaktivieren oder sich auf andere Weise vor ihnen zu schützen. Zum einen kommt intrinsische Resistenz gegenüber Antibiotika vor, eine stabile chromosomal codierte Eigenschaft, die bei allen Vertretern einer Spezies verankert ist, zum anderen können Bakterien extrinsische Resistenz durch Veränderung ihres Genoms durch Mutationen oder Austausch von Plasmiden erwerben [26].

In folgendem Abschnitt sollen kurz die wichtigsten bisher bekannten Resistenzmechanismen beschrieben werden.

1.3.1. Strukturelle Veränderung des Antibiotikums

Die Inaktivierung durch bakterielle Enzyme ist einer der häufigsten und effizientesten Mechanismen der Resistenzvermittlung gegen Antibiotika, wobei zwei Gruppen von Enzymen von besonderer Bedeutung sind.

β -Laktamasen spalten β -Laktam-Antibiotika hydrolytisch, wodurch diese nicht mehr an die PBP in der Zellwand binden können. Aminoglykosidasen modifizieren Hydroxy- oder Aminogruppen des Antibiotikums und verhindern so die Bindung des Antibiotikums an seine ribosomale Zielstruktur. Ähnliche Enzyme wurden beschrieben, die zum Beispiel Makrolide, Fosfomycin oder Tetracyclin inaktivieren können [26, 28].

1.3.2. Verhinderung der Aktivierung des Antibiotikums

Manche Antibiotika, darunter auch die zwei häufig eingesetzten Antituberkulotika Isoniazid und Ethionamid, bedürfen einer Aktivierung durch bakterielle Enzyme um ihre Wirksamkeit zu erreichen. Mutationen, die die Aktivität dieser Enzyme heruntersetzen oder ihre Expression vermindern, führen zu geringerer oder fehlender Antibiotika-Aktivierung [26]. Isoniazid zum Beispiel muss zunächst durch eine Katalase-Peroxidase aktiviert werden, um gegen *Mycobacterium tuberculosis* wirksam zu sein. Vor allem *Missense*-Mutationen, sowie kompletter oder partieller Verlust des für dieses Enzym kodierenden *katG* Gens führen zu einer Isoniazid-Resistenz durch stark reduzierte Katalase-Peroxidase-Aktivität und geringerer Hitzestabilität des Enzyms [29].

1.3.3. Veränderung der Zielstruktur

Ein anderer Weg zur Resistenz zeigt sich in der Veränderung der Zielstruktur eines Antibiotikums durch enzymatischen Umbau oder spontane Mutationen, die zum Affinitätsverlust führen. Häufig kommt es zur Methylierung der RNA, doch auch Veränderungen der Peptidoglycan-Schicht wurden beschrieben, die zum Beispiel bei Enterokokken eine Vancomycin- oder Teicoplanin-Resistenz hervorruft [26, 28].

Vancomycin-resistente Enterokokken beispielsweise besitzen Enzyme, die Peptide mit veränderten Molekül-Seitenketten in die Zellwand der Bakterien einbauen. Der daraus resultierende Verlust einer einzigen Wasserstoffbrückenbindung zwischen Vancomycin und Zellwand vermindert die Vancomycin-Bindung bereits um den Faktor 1.000; das Antibiotikum ist somit wirkungslos [30].

Protektionsmechanismen, bei denen stabile Komplexe zwischen Schutzproteinen und Antibiotika oder der Zielstruktur gebildet werden, sind unter anderem für β -Laktam-Antibiotika und Tetracyclin beschrieben [26]. Tetracyclin-resistente Bakterien können das Repressorprotein *TetR* besitzen, das spezifisch Tetracyclin in seiner aktiven Form bindet. Diese Bindung ist um ein vielfaches stärker als diejenige zwischen Tetracyclin und seiner Zielstruktur, den Ribosomen. Zusätzlich bewirkt dieser Vorgang die Expression eines Membranproteins *TetA*, welches Tetracyclin aktiv aus der Zelle ausschleust [31].

1.3.4. Impermeabilität und Efflux-System

Ein weiterer wichtiger Resistenzmechanismus ist die Verminderung der Antibiotikakonzentration in der Bakterienzelle. Hierfür sind zwei Möglichkeiten bekannt. Zum einen kann durch Erniedrigung der Menge an Porinen die Membranpermeabilität verringert werden. Das bedeutet: Weniger Antibiotika-Moleküle können passiv in Richtung des Konzentrationsgefälles durch die äußere Membran der Bakterienzelle hinein diffundieren. Zum anderen können Antibiotika auch aktiv durch Efflux-Systeme, aus der Zelle gepumpt werden [26, 28]. Diese Efflux-Systeme bestehen aus vier Proteinen, die als eine Einheit fungieren. Zwei dieser Proteine sind in die Zytoplasma-Membran integriert und bilden einen Kanal, durch den Antibiotika aktiv aus der Zelle gepumpt werden können. Die hierfür benötigte Energie liefern zwei weitere Proteine an der Innenseite der Zytoplasma-Membran durch Hydrolyse der energieliefernden Substanz ATP. Dieser Vorgang war namensgebend für diese ABC-Transporter (ATP-binding-casette-Transporter) [32].

1.4. Erreger

Analog zu den Antibiotika wurde bei der Auswahl der Erreger auf eine hohe klinische Relevanz und das häufige Auftreten von Resistenzen Wert gelegt.

Gramnegative Erreger sind im Vergleich zu grampositiven Erregern in Bezug auf Resistenzentwicklung und eingeschränkte Therapieoptionen derzeit die klinisch relevantere Erregergruppe und werden dies vermutlich auch bleiben. Diese Arbeit beschränkt sich auf *P. aeruginosa* und *E. coli*, die mit jeweils ca. 14% die am häufigsten nachgewiesenen gramnegativen Erreger in Blutkulturen darstellen [2].

1.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium, das aufgrund seiner polaren Begeißelung beweglich ist. In der Gruppe der Nonfermenter zählt es zu den wichtigsten humanpathogenen Vertretern.

Wie alle Nonfermenter kann *P. aeruginosa* Energie nur in Anwesenheit von Sauerstoff gewinnen und ist somit obligat aerob. Durch seinen geringen Nährstoffanspruch kommt er vor allem im Erdboden, auf Wasseroberfläche und auf Pflanzen vor, wo er

bei der Zersetzung organischen Materials eine wichtige Rolle als Umweltbakterium spielt.

Er befindet sich oft in wässrigen Lösungen und kann so sehr leicht auf hospitalisierte Patienten übertragen werden, wo er mit zunehmender Liegedauer zur Besiedelung der Schleimhäute führt. Als klassischer Opportunist verursacht er dann verschiedenste Krankheitsbilder, die häufig mit infizierten Fremdkörpern oder Immunsuppression der Patienten assoziiert sind. So wird er oft bei Haut- und Wundinfektionen, Otitis externa, Meningitis, Harnwegsinfekten vor allem bei Patienten mit Blasenkatheter sowie aus Hornhautulzera bei Kontaktlinsenträgern isoliert. Bei beatmeten Patienten ist er ein häufiger Erreger der nosokomial erworbenen Pneumonie. Im ambulanten Bereich ruft er bei kontinuierlicher Peritonealdialyse häufig Peritonitis hervor. Besonders gefürchtet ist er bei der Versorgung von Verbrennungswunden, da Infektion hier häufig zur Sepsis führen [33].

P. aeruginosa besitzt eine ausgeprägte intrinsische Resistenz gegen verschiedene Antibiotika-Klassen, vor allem gegen β -Laktam-Antibiotika. So produziert er konstitutiv in geringer Menge eine Cephalosporinase, die bei Überproduktion Resistenz gegen die meisten Penicilline und Cephalosporine bewirkt. Seine hohe Zellwandimpermeabilität gegen hydrophobe Substanzen und stets vorhandene Efflux-Systeme erhöhen in Kombination mit anderen Mechanismen, wie Modifikation von Porinen, seine natürlichen Resistenzen.

Bezüglich der erworbenen Resistenzmechanismen sind vor allem die β -Laktamasen mit auf 3. und 4. Generation-Cephalosporine und Carbapeneme erweitertem Spektrum zu erwähnen.

Die verschiedenen Resistenzmechanismen können alleine oder kombiniert auftreten, welches die Bedeutung der Resistenztestung für jedes einzelne Isolat unterstreicht, die molekulare und Mechanismus spezifische Resistenztestung hingegen erschwert und damit einen besonderen Grund für die Wahl von *P. aeruginosa* als unseren Haupt-Testbakterium liefert [26].

Hinsichtlich der Verwendung von Ertapenem in dieser Arbeit soll an dieser Stelle noch einmal erwähnt sein, dass *P. aeruginosa* im Gegensatz zu den älteren Carbapenemen, Imipenem und Meropenem, generell als Ertapenem-resistent angesehen wird. Vermutlich beruht die Resistenz des Erregers auf einer Kombination aus mutationsbedingtem Porin-Verlust und der Struktur des Ertapenem-Moleküls.

Ertapenem besitzt eine vergleichsweise lange anionischen Seitenkette, die den Einstrom durch Porine verringert, gleichzeitig aber die Affinität für Effluxpumpen erhöht [24]. Bei den entsprechenden Untersuchungen mit Ertapenem galt es lediglich dieses Resistenzverhalten anhand unterschiedlicher Methoden nachzuweisen (vgl. 4.3.).

Die allgemeine Resistenzrate von *P. aeruginosa* stieg innerhalb der letzten Jahre stetig an und zeigte besonders hohe Werte im Bereich nosokomial erworbener Infektionen. So sind in Europa 17,1% der Stämme gegen Carbapeneme, 21% gegen Fluorchinolone und 18,4% gegen Aminoglykoside resistent [34].

Diese Tatsache macht es zusammen mit seinen geringen Wachstumsansprüchen zu einem bedeutenden Problembakterium im Krankenhaus [26].

1.4.2. *Escherichia coli*

E. coli ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes bewegliches Stäbchenbakterium und der wichtigste Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae*. Im Darm von Mensch und Tier gehört es zur physiologischen Flora und wird in der Trinkwasser-Hygiene als Indikator für fäkale Verunreinigung genutzt.

Als fakultativ humanpathogenes Bakterium verursacht es extraintestinale Infektionen. Häufig wird es bei Harnwegsinfektionen, Septikämien, Pneumonien, Wundinfektionen und neonataler Meningitis isoliert. EHEC (*enterohämorrhagischer E. coli*), ETEC (*enterotoxischer E. coli*), EPEC (*enteropathogener E. coli*), EIEC (*enteroinvasiver E. coli*) und EAEC (*enteroaggregativer E. coli*) sind Beispiele für darm-pathogene *E. coli*, deren Infektionen jedoch bis auf wenige Ausnahmen keiner Antibiotika-Therapie bedürfen [26, 33].

In den letzten Jahren wurde bei *E. coli*-Isolaten europaweit ein starker Anstieg der Resistenzrate gegen häufig eingesetzte Antibiotikaklassen beobachtet. Für Fluorchinolone lag sie beispielsweise im Jahr 2012 schon bei 22,3%. In den Jahren 2009 bis 2012 konnte ein signifikanter Anstieg der Aminoglykosid-Resistenz von 8,6% auf 10,3% beobachtet werden. Die Resistenz von *E. coli* gegenüber Tobramycin erweist sich, wie auch bei *P. aeruginosa*, vor allem auf Intensivstationen als Problem [34].

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es eine neue, schnelle Methode zur Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF-MS am Modell zweier klinisch relevanter Bakterienspezies, *P. aeruginosa* und *E. coli*, und drei verschiedener Antibiotikaklassen zu etablieren.

Hierfür wurde eine auf den Untersuchungen mit *S. aureus* [6] basierende Methode auf unsere Untersuchungen mit gramnegativen Erregern adaptiert und ein optimiertes Vorgehensprotokoll entwickelt. Weiterhin stand die Bildung einer Datenbank zur automatischen Auswertung exemplarisch für *E. coli* und *P. aeruginosa* im Vordergrund. Es folgte die Durchführung des Tests an je 30 Isolaten pro Antibiotikum.

Um seine klinische Relevanz bezüglich der Zeitersparnis zu untermauern, wurde der Test zusätzlich direkt aus Blutkulturflaschen angewendet und – um die Vorteile der neuen Methode bezüglich seiner Unabhängigkeit von Resistenzmechanismen zu veranschaulichen – exemplarisch mit einem Hydrolyse-Assay für β -Laktam-Antibiotika verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	CAS
Acetonitril	Fluka	75-05-8
Ameisensäure	Merck	64-18-6
Bacterial Test Standard	Bruker Daltonik	
Dulbeco's modified Eagle medium (DMEM) für SILAC-Anwendungen ohne Argine, Leucine, Lysine	Sigma Aldrich	
Fe(II)SO ₄	Sigma Aldrich	7720-78-7
Glucose	Sigma Aldrich	50-99-7
Hefeextrakt	MP Biomedicals	8013-01-2
Lysepuffer	Bruker Daltonik	
NaCl	Sigma Aldrich	7647-14-5
SDS	Carl Roth	151-21-3
Trifluoressigsäure 99%	Sigma Aldrich	76-05-1
Trypton	Sigma Aldrich	10020-94-58
α-HCCA-Matrix	Bruker Daltonik	

2.1.2. Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	PZN
Ciprofloxacin Infusionslösung (200 mg/100 ml)	Fresenius Kabi	3277618
Ertapenem	MSD	2648320
Meronem	AstraZeneca GmbH	7147108
Tobramycin (RTC)	Sigma Aldrich	32986-56-54

2.1.3. Aminosäuren

Aminosäure	Hersteller	CAS
L-Alanin	Sigma Aldrich	56-41-7
L-Arginin		74-79-3
L-Asparagin		70-47-3
L-Aspartat Säure		1835-52-5
L-Cystein		52-89-1
L-Glutamat Säure		6899-05-4
L-Glutamin		6899-04-3
Glycin		56-40-6
L-Histidin		71-00-1
L-Isoleucin		73-32-5
L-Leucin		61-90-5
L-Lysin		657-27-2
L-Methionin		3226-65-1
L-Phenylalanin		63-91-2
L-Prolin		344-25-2
L-Serin		56-45-1
L-Threonin		1114-81-4
L-Tryptophan		73-22-3
L-Tyrosin	7662-51-3	
L-Valin	72-18-4	
13C6-15N2 L-Lysine x2HCl	Thermo Scientific	88-20-9

2.1.4. Agarplatten

Agarplatte	Hersteller
Columbia Blutagar 5% SB	BD
MacConkey II	
Mueller-Hinton-Agar	Oxoid

2.1.5. Etest-Streifen

Antibiotikum	Hersteller
Ciprofloxacin	Liofilchem
Meropenem	
Tobramycin	

2.1.6. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Blutkultursystem	Bactec FX	BD
Brutschrank		Heraeus
Halbmikrowaage	BP 61	Sartorius
Inkubationsschüttler	Certomat S	
MALDI-TOF-MS	Microflex LT	Bruker Daltonik
pH-Meter	PB-11	Sartorius
Photometer	Ultrospec 3100 pro (600nm)	Amersham Biosciences
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	5417R	
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific

2.1.7. Software

Programm	Hersteller
flexAnalysis 3.4	Bruker Daltonik
flexControl 3.3	
R 3.0.1	
Excel 2010	Microsoft

2.1.8. Bakterien

Die Bakterienisolate stammen von verschiedenen Patientenmaterialien aus der Routinediagnostik des Max von Pettenkofer-Institut. Dort erfolgte die Differenzierung mittels MALDI-TOF MS. Die Resistenzbestimmungen wurden sowohl automatisiert (Phoenix, BD) als auch manuell durch Agardiffusionstests bestimmt und nach den EUCAST-Richtlinien ausgewertet.

Zusätzlich wurden zwei Kontrollstämme mitgeführt.

P. aeruginosa ATCC 27853

E. coli ATCC 25922

Alle Isolate wurden am Vortag des Versuches frisch auf Blut- oder MacConkey Agar überimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2. Herstellung von Medien/Lösungen

2.2.1. SILAC-Assay

2.2.1.1. Kulturmedium

Zur Herstellung des Kulturmediums wurden jeweils 15 mg der proteinogenen Aminosäuren (mit Ausnahme von Lysin), 200 mg Glucose und 3 mg Fe(II)SO₄ abgewogen und vollständig in 50 ml DMEM gelöst.

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 7 eingestellt. Im Anschluss wurde diese in der Sicherheitswerkbank steril filtriert, um eine Kontamination zu vermeiden. Die Lagerung des Kulturmediums erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

2.2.1.2. Lysin

Für beide Lysine (normales und schweres) wurden jeweils 10 mg/ml in DMEM ohne Zusätze gelöst und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung aufgetaut und durch Schütteln im Vortex-Gerät durchmischt.

2.2.1.3. Antibiotika

Die gewünschte Menge Tobramycin bzw. Meropenem wurden jeweils vor Gebrauch abgewogen und in 1 ml DMEM ohne Zusätze gelöst.

Ciprofloxacin wurde direkt aus einer Infusionsflasche entnommen und unverändert verwendet.

2.2.1.4. LB-Medium

200 g Trypton, 100 g Hefeextrakt und 100 g NaCl wurden mit dest. H₂O auf 2 l aufgefüllt und anschließend der pH der Lösung mit NaOH auf 7,4 - 7,6 eingestellt. Nach Autoklavieren wurde diese Stocklösung bei Raumtemperatur gelagert.

Um die Gebrauchslösung zu erhalten, wurde die Stocklösung mit dest. H₂O zehnfach verdünnt und erneut autoklaviert.

2.2.1.5. Standard

5 µg BTS-Standard-Pulver wurden in 50 µl Stammlösung gelöst, in 5 µl-Portionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.2. β -Laktamase-Assay

2.2.2.1. SDS

Zur Herstellung der 0,1%igen SDS-Stocklösung wurden 6 mg SDS abgewogen und in 6 ml H₂O gelöst. Nachdem die Lösung steril filtriert wurde, wurde das Medium bei Raumtemperatur gelagert.

Die 0,01%ige SDS-Gebrauchslösung wurde vor Gebrauch durch zehnfache Verdünnung der Stocklösung hergestellt.

2.2.2.2. Antibiotikum

Vor Gebrauch wurde die gewünschte Menge Ertapenem abgewogen und in SDS-Gebrauchslösung gelöst.

2.2.2.3. Standard

Die Standardlösung war bereits gebrauchsfertig bei -20°C eingefroren.

2.2.3. Matrix

5 mg der Matrix Substanz 4-HCCA (α -Cyano-4-hydroxycimtsäure) wurden in 500 μ l Stocklösung, bestehend aus 4750 μ l dest. H₂O, 250 μ l 99% TFA (Metalltrifluoracetat) und 5 ml Acetonitril gelöst und zu 100 μ l Portionen bei -20°C eingefroren. Die aufgetaute Matrixgebrauchslösung wurde lichtgeschützt bei Zimmertemperatur gelagert und ist so eine Woche haltbar.

Diese Mischung eignet sich besonders zur Analyse von Biopolymeren. TFA wurde zur verbesserten Protonierung von Proteinen und Peptiden zugegeben. Dieses führt zur Bildung von Ionen, die sich an schlecht protonierbare Substanzen anlagern und sogenannte Pseudo-Molekülonen bilden. Zudem wird eine Verfälschung der Ergebnisse durch Verunreinigung z.B. durch Metalle unterdrückt [10].

2.3. Methoden

2.3.1. Konventionelle Resistenztestung

Der Etest oder auch Gradientendiffusionstest ist ein Agardiffusionstest zur phänotypischen Bestimmung der Sensibilität schnell und langsam wachsender Erreger. Er ermöglicht die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Zur Durchführung und Auswertung des Tests wurde die standardisierte EUCAST-Methode angewendet. Zur Vorbereitung des Inokulums wurden mehrere Kolonien des Isolats in 2-5 ml Ringerlösung suspendiert und ein McFarland von 0,5 durch optischen Vergleich der Trübung mit einem McFarland-Standard (bioMèrieux, Nürtingen, Deutschland) eingestellt. Innerhalb von 15 Minuten wurde die Bakterium-Suspension nun mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig auf einer Mueller-Hinton-Agarplatte aufgebracht. Um einen konfluenten Wachstumsrasen zu erhalten wurde die Flüssigkeit gitterförmig in 3 Richtungen ausgestrichen. Nach einer kurzen Trocknungszeit wurde der Etest-Streifen mit der Beschriftung nach oben aufgelegt. Dabei wurde darauf geachtet, einen dichten und gleichmäßigen Kontakt zur Platte herzustellen und den Streifen nachträglich nicht mehr zu bewegen. Die Agarplatten

wurden nun innerhalb von maximal 15 Minuten in den Brutschrank gegeben. Nach 16- bis 20-stündiger aerober Bebrütung bei $35\pm 1^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 -Gehalt wurde der Test abgelesen.

Der MHK-Wert wird am Schnittpunkt des elliptischen Hemmhofs mit der Skala abgelesen.

Zur Interpretation wurden folgende Grenzwerte nach EUCAST berücksichtigt:

<i>P. aeruginosa</i>	mg/l	mg/l
Ciprofloxacin	$E \leq 0,5$	$R > 1$
Meropenem	$E \leq 2$	$R > 8$
Tobramycin	$E \leq 4$	$R > 4$

<i>E. coli</i>	mg/l	mg/l
Ciprofloxacin	$E \leq 0,5$	$R > 1$

[35, 36]

2.3.2. SILAC

Pro Stamm wurden 3 verschiedene Ansätze vorbereitet:

Medium N: 500 μl Kulturmedium plus 5 μl „normales“ Lysin

Medium H: 500 μl Kulturmedium plus 5 μl „schweres“ Lysin

Medium AB: 500 μl Kulturmedium plus 5 μl „schweres“ Lysin und Antibiotikumlösung.

Um die gewünschte Bakterienmenge per OD zu bestimmen wurde eine 1 μl -Impföse mit Bakterien gefüllt und in 100 μl DMEM ohne Zusätze verrieben. 20 μl der Zellsuspension wurden mit 980 μl H_2O verdünnt und die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ bestimmt. Das einzusetzende Volumen in μl errechnet sich aus: $1/\text{OD}_{600\text{nm}} \times 5$. Dies entspricht dann 5×10^7 Zellen/ml im Ansatz.

Nun wurde das berechnete Volumen an Zellsuspension in die vorbereiteten Ansätze gegeben, gemischt und unter Schütteln (650 rpm) bei 37°C für 2,5 h inkubiert.

Für Meropenem wurde eine Vorinkubation von 30 min ohne Lysin abgewartet und nach Zugabe des Lysins weitere 2,5 h inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Pellets wurden mit 100 μl dest. H_2O gewaschen und anschließend in 6 μl 70%iger Ameisensäure und 6 μl Acetonitril lysiert.

Nach Zentrifugation der Lysate wurde der Überstand zur Weiterverarbeitung für die Messung verwendet.

2.3.2.1. Wachstumsphasen

Einige Kolonien der verwendeten Isolate wurden in LB-Medium gegeben und die OD_{600nm} gegen den Leerwert des LB-Mediums ohne Isolat gemessen. Nun wurde so weit verdünnt, dass eine OD_{600nm} von ca. 0,05 erreicht wurde. 200 ml dieser Bakteriensuspension wurde in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C und unter Schütteln (120 rpm) inkubiert.

Der SILAC-Test folgte aus dieser Zellsuspension mit verschiedenen Vorinkubationszeiten: Sofort, nach 45 min, 90 min und 4 h. Dazu wurden jeweils 6 ml entnommen und bei 14.000 rpm 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zügig aber vorsichtig dekantiert und das Pellet mit der Restflüssigkeit aufgeschüttelt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde der Überstand abpipettiert und fünfmal mit dest. H₂O gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 100 µl DMEM ohne Zusätze gelöst und zur Testung auf den Probenträger aufgetragen.

2.3.2.2. Verarbeitung von Blutkulturen

Zur Testdurchführung wurde aus einer mit *E. coli* positiv gemeldeten Blutkultur 1 ml Blut entnommen und mit 200 µl Lysepuffer vermischt. Danach wurde die Flüssigkeit bei 14.000 rpm 1 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Daraufhin wurde das Pellet fünfmal mit dest. H₂O gewaschen. Hierzu wurde das Pellet erneut in 1 ml dest. H₂O resuspendiert, unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Zuletzt wurden 5 µl des Pellets in 100 µl DMEM ohne Zusätze suspendiert. Ab diesem Schritt folgte die gleiche Verarbeitung wie für den SILAC-Test von Agarplatten (siehe 2.3.2.).

Als Kontrolle wurde eine Blutkulturflasche mit dem ATCC-Stamm beimpft. Dazu wurde eine Kolonie des Isolats einmal mit einer 1 µl-Öse angetippt und in 1 ml EDTA-Blut geimpft und am Vortex-Gerät geschüttelt. 100 µl hiervon wurden zusammen mit 5 ml EDTA-Blut in die Blutkulturflasche injiziert. Die so befüllte Flasche wurde im Blutkultursystem bebrütet und nach Positivmeldung wie oben beschrieben weiter verarbeitet.

2.3.3. β -Laktamase-Assay

Zunächst wurde eine Arbeitskonzentration von 0,5 mg Ertapenem/ml SDS-Gebrauchslösung hergestellt. In 10 μ l dieser Lösung wurde nun je eine 1 μ l Öse des Isolats suspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C und 900 rpm Schütteln wurden die Ansätze 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

2.3.4. Messungen und Kalibration

Pro Position der Target-Platte wurde 1 μ l des Überstandes aufgetragen. Nach vollständigem Trocknen wurde wiederum mit 1 μ l Matrix überschichtet und ebenfalls vollständig und vor Sonnenlicht geschützt getrocknet. Die Messung erfolgte mit folgenden Einstellungen:

Linear positiv mode

Laserfrequenz	60 Hz
Accelerations voltage	20 kV
IS2 voltage	18,6 kV

SILAC:

Massenbereich	2 bis 20 kDa
Extraction delay time	200 ns

β -Laktamase-Assay:

Massenbereich	100 bis 1.000 Da
Extraction delay time	30 ns

Die Kalibration des Geräts erfolgte jeweils vor den Messungen mit Hilfe eines der beiden Standards mit bekanntem Molekulargewicht im Messbereich, auf die das Gerät kalibriert wird.

Der BTS-Standard enthält zusätzlich zu den für *E. coli* typischen ribosomalen Proteinen (RL36, RS22, RL34, RL33meth, RL29, RS19) RNase A und Myoglobin.

Der für den β -Laktamase-Assay verwendete Standard enthält Bradykinin(1-5), Bradykinin (1-7), HCCA, 2-HCCA.

2.3.5. Auswertung

2.3.5.1. flexAnalysis

Die optische Auswertung erfolgte mit flexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik).

Zur Optimierung wurden die Spektren auf Nullniveau gesetzt und mit einem Savitzky-Golay-Filter (0,2 m/z, cycle number 1) geglättet.

2.3.5.2. R

Die automatisierte Auswertung erfolgte mit einer von der Firma Bruker Daltonik als Prototyp zur Verfügung gestellten Software R.

Für den SILAC-Assay wird hier der Quotient (RQ) aus der Summe der Intensitäten ausgewählter „schwerer Peaks“ und der Summe der Intensitäten der dazugehörigen „normalen“ Peaks gebildet. Aus diesen Daten lassen sich verschiedene Auswertungsansätze ableiten.

Zur Beurteilung können zum einen die RQ-Werte aus den Spektren des Medium AB mit den Werten aus Medium H und N verglichen werden. Liegt der Wert für Medium AB näher an Medium H, so ist das Isolat als resistent, liegt er näher an Medium N, als empfindlich einzustufen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Berechnung des Quotienten aus der Differenz der Intensitäten von Medium AB und N und Medium H und AB.

$$\frac{\text{Medium mit AB und schweren AS} \frac{\sum_{i(1-10)} \text{schwere peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normale peaks}} - \text{Medium mit normalen AS} \frac{\sum_{i(1-10)} \text{schwere peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normale peaks}}}{\text{Medium mit schweren AS} \frac{\sum_{i(1-10)} \text{schwere peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normale peaks}} - \text{Medium mit AB und schweren AS} \frac{\sum_{i(1-10)} \text{schwere peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normale peaks}}}$$

So ergeben sich für empfindliche Isolate Werte kleiner als 1 und für resistente Isolate Werte größer als 1.

Analog zu diesem Vorgehen wurden beim β -Laktamase-Assay Peaks des hydrolysierten und nicht-hydrolysierten Antibiotikums verwendet.

$$\log \left(\frac{\sum \text{peak-Intensität}_{\text{hydrolysiert}}}{\sum \text{peak-Intensität}_{\text{nicht-hydrolysiert}}} \right)$$

2.3.5.3. Ermittlung von Indikatorpeaks zur automatisierten Auswertung

Um die Peaks zu ermitteln, anhand derer das Programm R auswertet, wurden ungefähr 15 Isolate nach Inkubation in Medium N und H gemessen. Es wurden 10 Peaks für *E. coli* und 14 für *P. aeruginosa* ermittelt, die möglichst keine anderen Peaks im näheren Umfeld und einen gut sichtbaren dazugehörigen schweren Peak aufwiesen. Zusätzlich wurde auf ausreichende Peak-Intensität, geringes Hintergrundrauschen, gute Reproduzierbarkeit für verschiedene Isolate und alle verwendeten Antibiotika geachtet.

Die genaue Lage der Peaks wurde in flexAnalysis ermittelt und der Median aus den jeweiligen Werten gebildet.

Pro Isolat wurde auch ein Kalibrations-Peak ermittelt, der eine möglichst hohe Intensität und geringe Variabilität unter den verschiedenen Isolaten haben sollte.

Zuletzt wurden diese Werte für die leichten bzw. schweren Peaks in R eingegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Auswertung

Um eine automatisierte Auswertung der Tests und graphische Darstellung der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden zunächst Analysen durchgeführt, die die Berechnungsgrundlagen für das Programm R liefern.

3.1.1. Massen-Shifts

Verschiedene *P. aeruginosa* und *E. coli* Stämme wurden in Medium N und Medium H, wie in 2.3.2. beschrieben, inkubiert und ihre Spektren mit den Einstellungen der SILAC-Methode, siehe 2.3.4., mittels MALDI-TOF MS aufgenommen. Bei der optischen Auswertung mit flexAnalysis konnte man im Massenbereich von 2 bis 10 kDa gut sichtbare Peaks bestimmen, bei denen im Medium H ein Massen-Shift stattfand. Der Begriff Massen-Shift beschreibt die Entstehung eines neuen „schweren“ Peaks (rot markiert) neben dem ursprünglichen Peak aus Medium N (grün markiert).

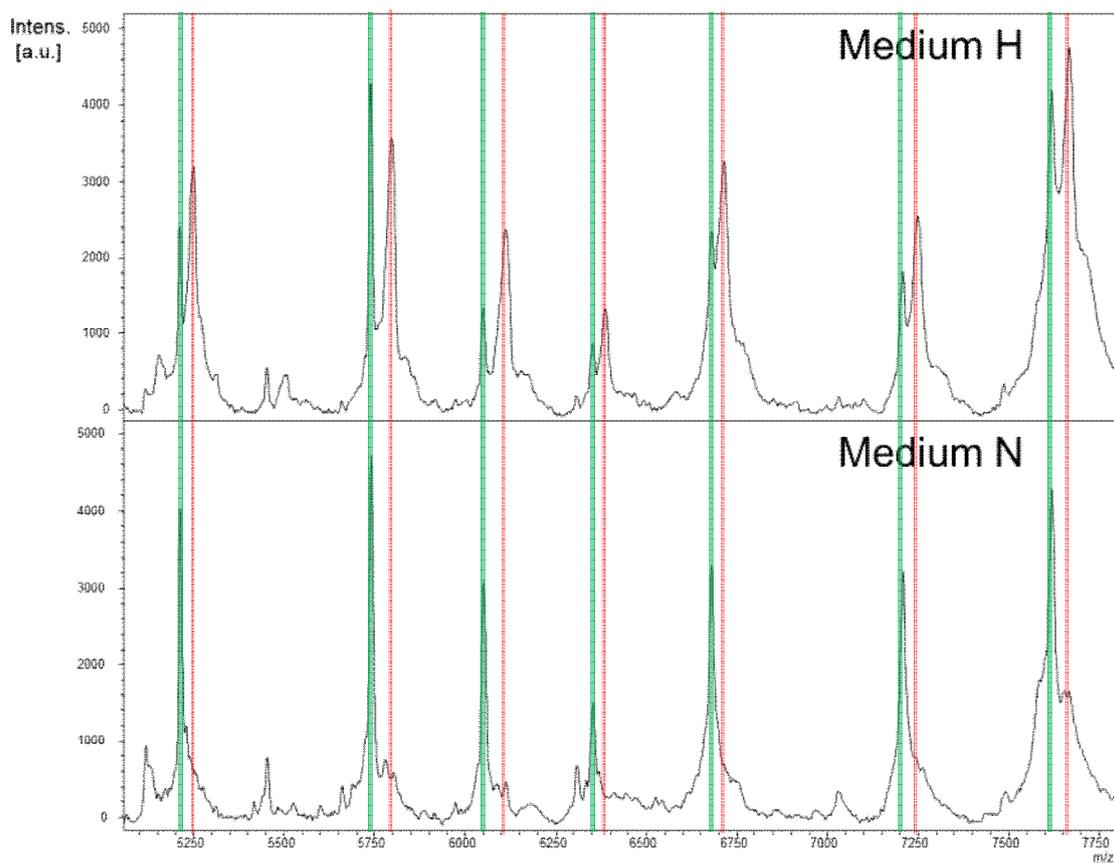


Abbildung 4 Spektren aus Medium N und H, native Peaks in grün und geshiftete in rot markiert.

Diese neu entstandenen Peaks wiesen bei *P. aeruginosa* Verschiebungen um 16 bis 64 Da und bei *E. coli* maximal 104 Da auf. Die Verschiebungsmasse stellte immer ein Vielfaches von 8 Da dar (vgl. 1.1.4.3.). Bei Inkubation im Medium AB war dieser Massen-Shift ebenso zu beobachten, jedoch bei resistenten Isolaten intensiver und bei empfindlichen Isolaten entsprechend weniger stark ausgeprägt.

Bei Inkubation in allen Medien, die schweres Lysin enthalten, konnten zweigipflige oder sogar dreigipflige Peaks beobachtet werden.

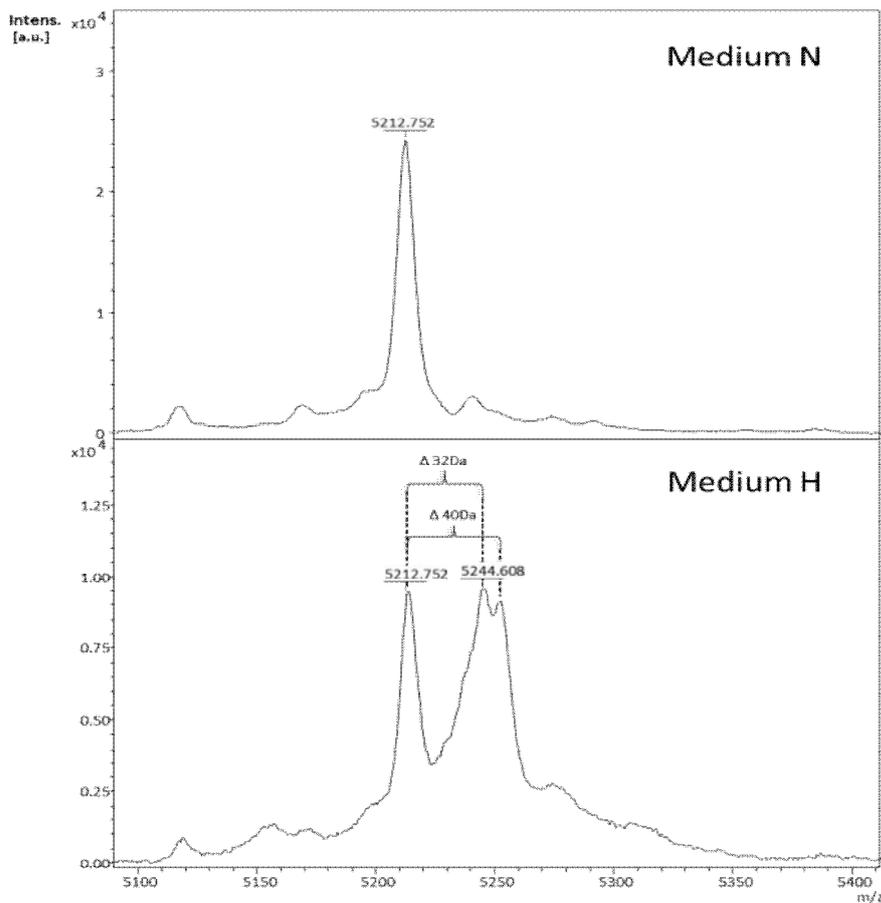


Abbildung 5 Mehrgipfliger Peak in Medium H.

Dieses Phänomen lässt sich damit erklären, dass nicht nur Isotop-markiertes Lysin eingebaut wird. Zum einen ist in der Zelle noch natives Lysin vorhanden, zum anderen kann dieses auch von Bakterienzellen neu synthetisiert werden [37].

3.1.2. Automatisierte Auswertung

Wie in 2.3.5.3. beschrieben wurden Peaks zur automatisierten Auswertung bestimmt.

Peak no	<i>P.aeruginosa</i> biomarker mass native [Da]	<i>P.aeruginosa</i> biomarker mass with ^{13}C - ^{15}N labeled lysine [Da]	<i>E.coli</i> biomarker mass native [Da]	<i>E. coli</i> biomarker mass with ^{13}C - ^{15}N labeled lysine [Da]
1	3337	3353	3444	3500
2	4545	4577	4044	4076
3	4996	5020	4306	4378
4	5212	5244	4447	4496
5	5737	5793	4815	4864
6	6048	6104	5033	5097
7	6350	6382	5525	5613
8	6677	6709	6426	6482
9	7205	7245	6892	6996
10	9091	9155	9629	9725

Tabelle 1 Massenspektren der zur automatisierten Auswertung gewählten Peaks.

Als Kalibrations-Peak wurde der Peak der Masse 9.067 Da für *E. coli* und 5.212 Da für *P. aeruginosa* ausgewählt.

Bei der automatisierten Auswertung, siehe 2.3.5.2., wird deutlich, dass bei Inkubation in Medium AB die Werte für empfindliche Isolate näher an denen aus Medium N, die Werte resistenter Isolate näher an denen aus Medium H liegen. In der Boxplot-Darstellung stellt die dicke Linie den Median dar, die Box beinhaltet 25. bis 75. Perzentile, Minimum und Maximum werden durch Whisker angezeigt.

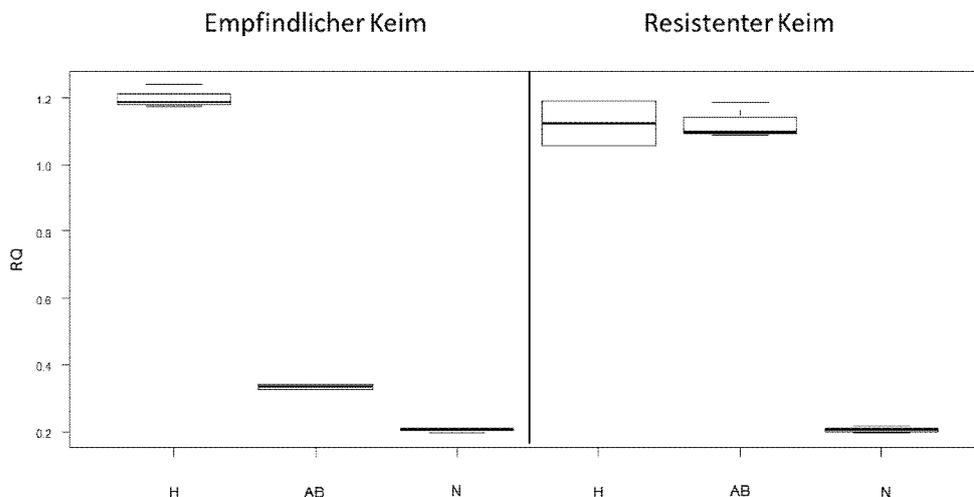


Abbildung 6 Boxplot-Darstellung eines empfindlichen und resistenten Isolats.

Im Säulendiagramm zeigen Werte < 1 Empfindlichkeit und Werte > 1 Resistenz an.

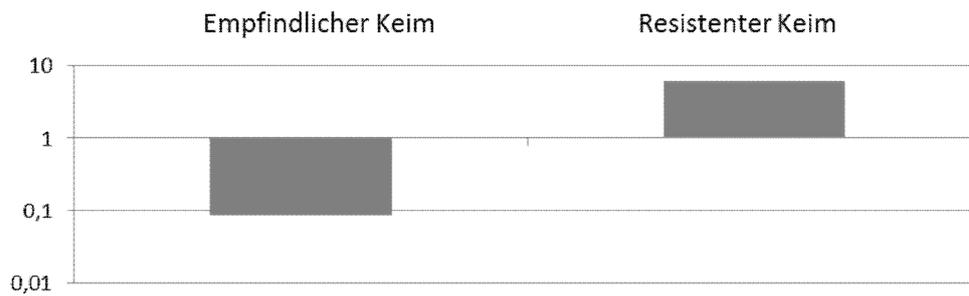


Abbildung 7 Säulendiagramm eines empfindlichen und resistenten Isolats.

3.2. Etablierung der Test-Protokolle

Um Protokolle zur Durchführung des SILAC-Tests für *P. aeruginosa* und *E. coli* mit den verschiedenen Antibiotika zu entwickeln, wurden anhand einiger Testisolate mit MHK-Werten nahe dem EUCAST-Grenzwert (vgl. 2.3.1.) mehrere Vorversuche bezüglich Vorinkubationen, gesamte Inkubationszeit, Konzentration der Antibiotika, verschiedene Ausgangsnährmedien und auch unterschiedlicher Hersteller der Reagenzien durchgeführt. In das endgültige Protokoll wurden Bedingungen aufgenommen, die bei möglichst kurzer und einfacher Durchführung optimale Ergebnisse erzielten und eine sichere Einteilung dieser Isolate in resistent und empfindlich zuließen.

Zur Veranschaulichung wird diese Vorgehensweise in den folgenden Abschnitten exemplarisch am Beispiel *P. aeruginosa* dargestellt.

3.2.1. Vorinkubation in LB-Medium

Wie in 2.3.2.1. beschrieben wurde der SILAC-Test durchgeführt nachdem *P. aeruginosa* und *E. coli* zuvor in LB-Medium, welches alle notwendigen Wachstumsfaktoren enthält, inkubiert wurde. Dies hatte zum Ziel festzustellen, ob es die Ergebnisse beeinflusst, wenn sich das Isolat schon vor Beginn des Tests im Wachstum befindet. Es wurden mehrere Vorinkubationszeiten von 0 bis 11 h verglichen.

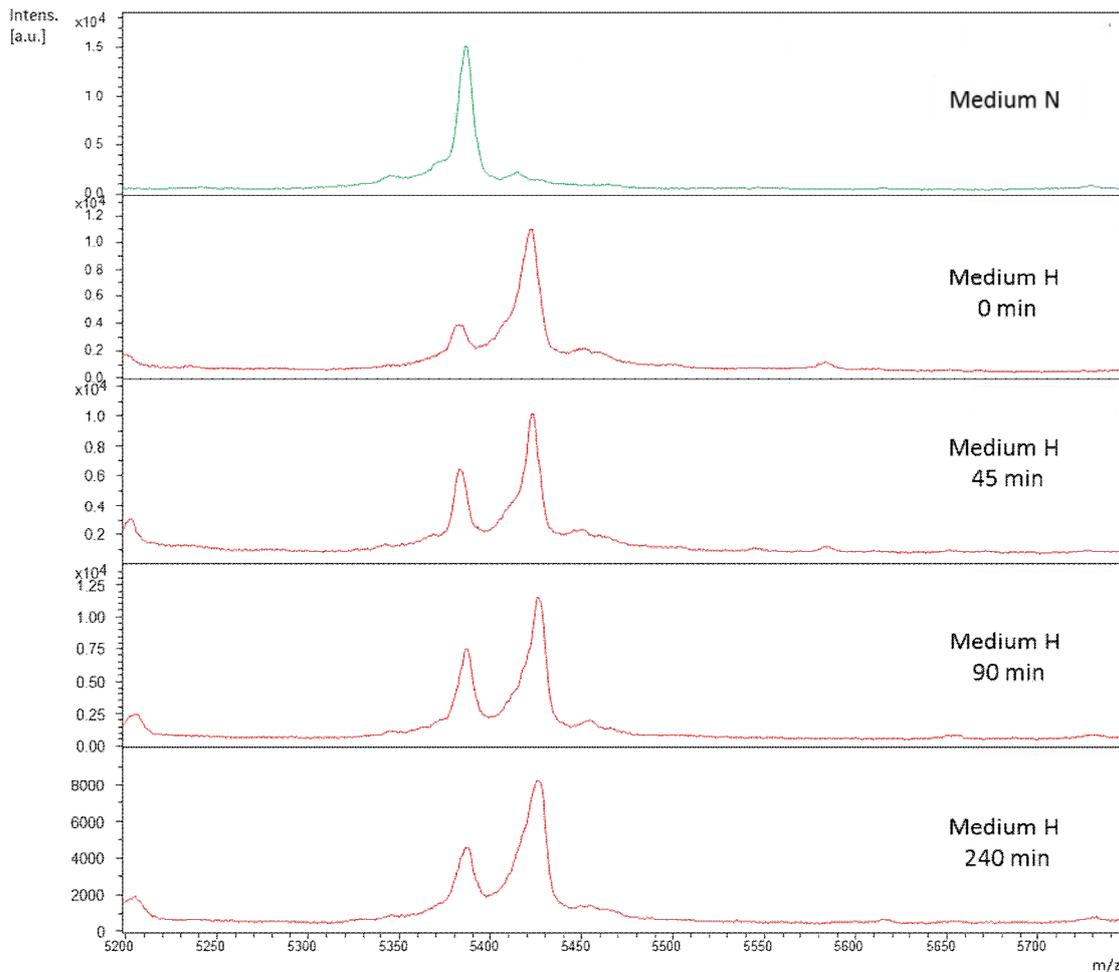


Abbildung 8 Repräsentativer Peak aus Medium H nach 0, 45, 90 und 240 min und aus Medium N zum Vergleich.

Es zeigte sich, dass sich der Lysin-Einbau bei Inkubation in Medium H bereits zum Zeitpunkt 0, also ohne Vorinkubation in LB-Medium nachvollziehen lässt. Aus diesem Grund wurde bei den weiteren Versuchen von einer Vorinkubation in LB-Medium abgesehen.

3.2.2. Antibiotikakonzentration und Inkubationszeit

Bezüglich der Antibiotika-Konzentrationen und Gesamtinkubationszeiten wurden verschiedene Kombinationen getestet. Einen Überblick verschafft Tabelle 2. Das Thema Vorinkubation wird in Abschnitt 3.2.3. besprochen.

Erreger	Antibiotikum	Konzentration mg/l	Vorinkubation min	Inkubation gesamt h	
<i>P. aeruginosa</i>	Meropenem	290	0	1,5 2 2,5 3	
			30	1,5 2 2,5 3	
			60	2,5 3	
			90	3	
			390	0	3 4
			30	2 2,5 3	
		Tobramycin	120	0	1,5 2 2,5 3
				30	3
			Ciprofloxacin	30	30
		40		30	3
		60		0	1,5 2 2,5 3
			30	3	
	<i>E. coli</i>	Ciprofloxacin	30	0	1 1,5 3
				40	0

Tabelle 2 Zusammenstellung der durchgeführten Testparameterkombinationen.

Um einen Richtwert für die jeweilige Antibiotika-Konzentration zu erhalten, haben wir die von Sparbier et al. [6] eingesetzte Menge an Cefoxitin und Oxacillin für *S. aureus* mit der EUCAST MHK Grenzwerttabelle [36] verglichen und dieses Verhältnis auf die von uns verwendeten Antibiotika übertragen. Nach einigen Durchläufen mit Konzentrationen nahe dem errechneten Wert wählten wir die Verdünnungsstufe mit der geringsten Konzentration, bei welcher noch eine gute Diskrimination in empfindlich und resistent ermöglicht wurde. Im folgenden Beispiel soll anhand von Ciprofloxacin die Veränderung der Ergebnisse durch Steigerung der Antibiotikum-Konzentration veranschaulicht werden.

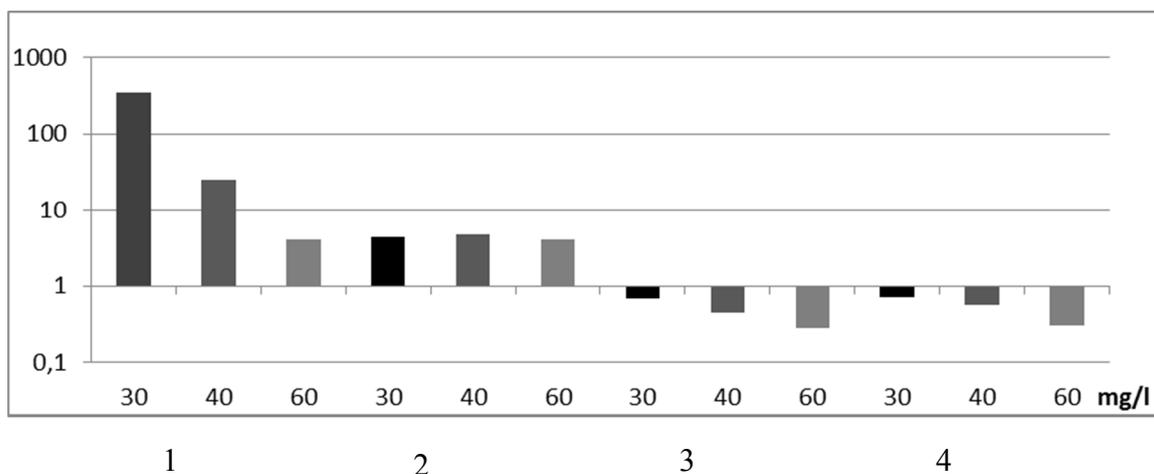


Abbildung 9 Resistente (1 und 2) und empfindliche (3 und 4) *P. aeruginosa* bei Ciprofloxacin-Konzentrationen von 30, 40 und 60 mg/l und einer Inkubationszeit von 3 h.

Die Konzentration von 60 mg/l Ciprofloxacin erlaubt eine gute Diskrimination von resistenten wie empfindlichen Isolaten.

In Zusammenschau aller Ergebnisse ergaben sich schließlich die optimalen Bedingungen bei 60 mg/l Ciprofloxacin und einer minimalen Inkubationszeit von 2,5 h, 290 mg/l Meropenem über 3 h und 120 mg/l Tobramycin über 1,5 h.

Zur Veranschaulichung des Einflusses der Gesamtinkubationszeit auf die Ergebnisse wurden in Abbildung 10 verschiedenen Inkubationszeiten bei oben genannten Konzentrationen der drei Antibiotika gegenübergestellt.

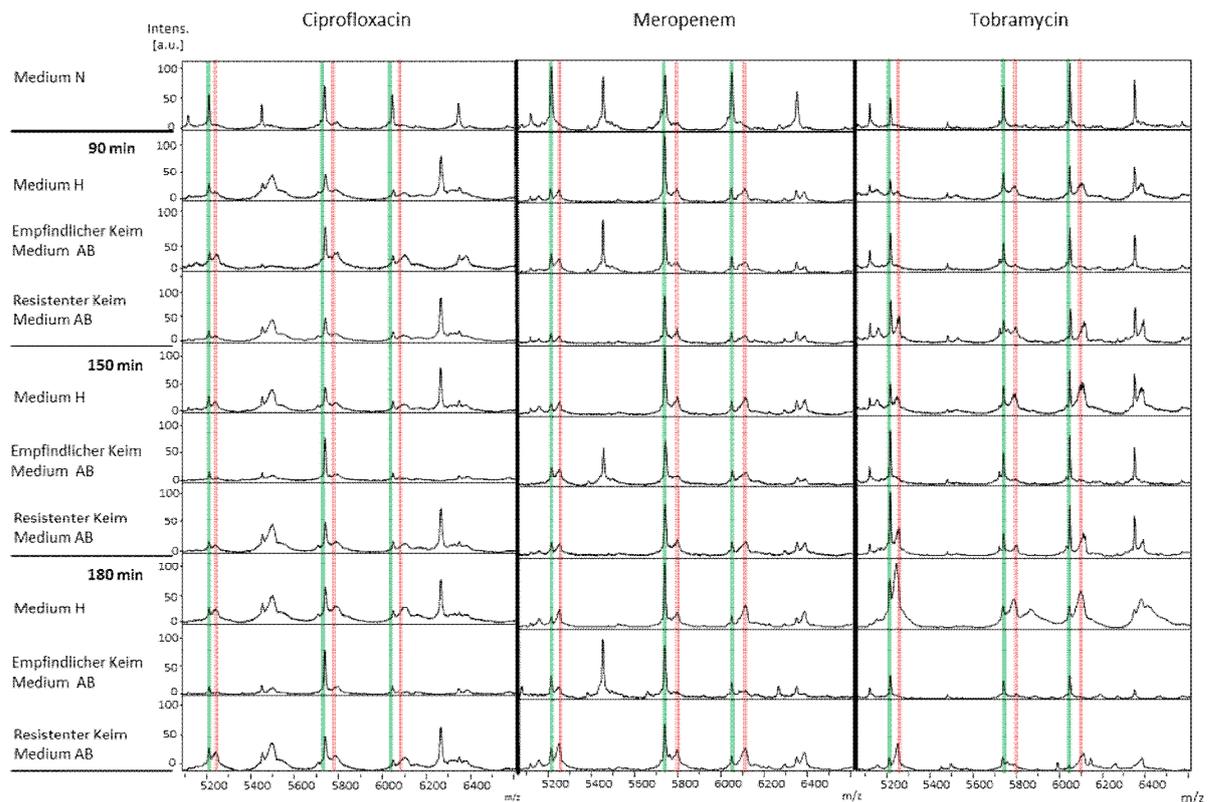


Abbildung 10 Repräsentative Spektren resistenter und empfindlicher *P. aeruginosa*-Isolate in Medium H und AB nach 90, 150 und 180 min.

Zum Vergleich in der ersten Zeile das jeweilige Spektrum aus Medium N.

Zur automatischen Auswertung gewählte Peaks in grün (nativ) bzw. rot (mit schwerem Lysin) markiert. Antibiotika-Konzentrationen: Ciprofloxacin 60 mg/l, Meropenem 290 mg/l, Tobramycin 120 mg/l.

3.2.3. Vorinkubation

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, dass die Proteinbiosynthese bei empfindlichen Erregern, insbesondere bei Inkubation mit Meropenem, offenbar erst verzögert sistiert; so kam es bei diesen zunächst noch zu einem relevanten Einbau von schwerem Lysin. Aus diesem Grund wurde untersucht ob eine Vorinkubationszeit mit Antibiotikum aber ohne Lysin die Ergebnisse verbessern kann, indem den Antibiotika die nötige Zeit gegeben wird, die Proteinbiosynthese der empfindlichen Bakterien zu hemmen. Die angewandten Vorinkubationszeiten sind für beide Erreger ebenfalls in

Tabelle 2 zusammengefasst. Bei Ciprofloxacin und Tobramycin ließen sich die Resultate durch eine Vorinkubation nicht weiter verbessern. Für Meropenem jedoch erwies sich dieses Vorgehen als vorteilhaft.

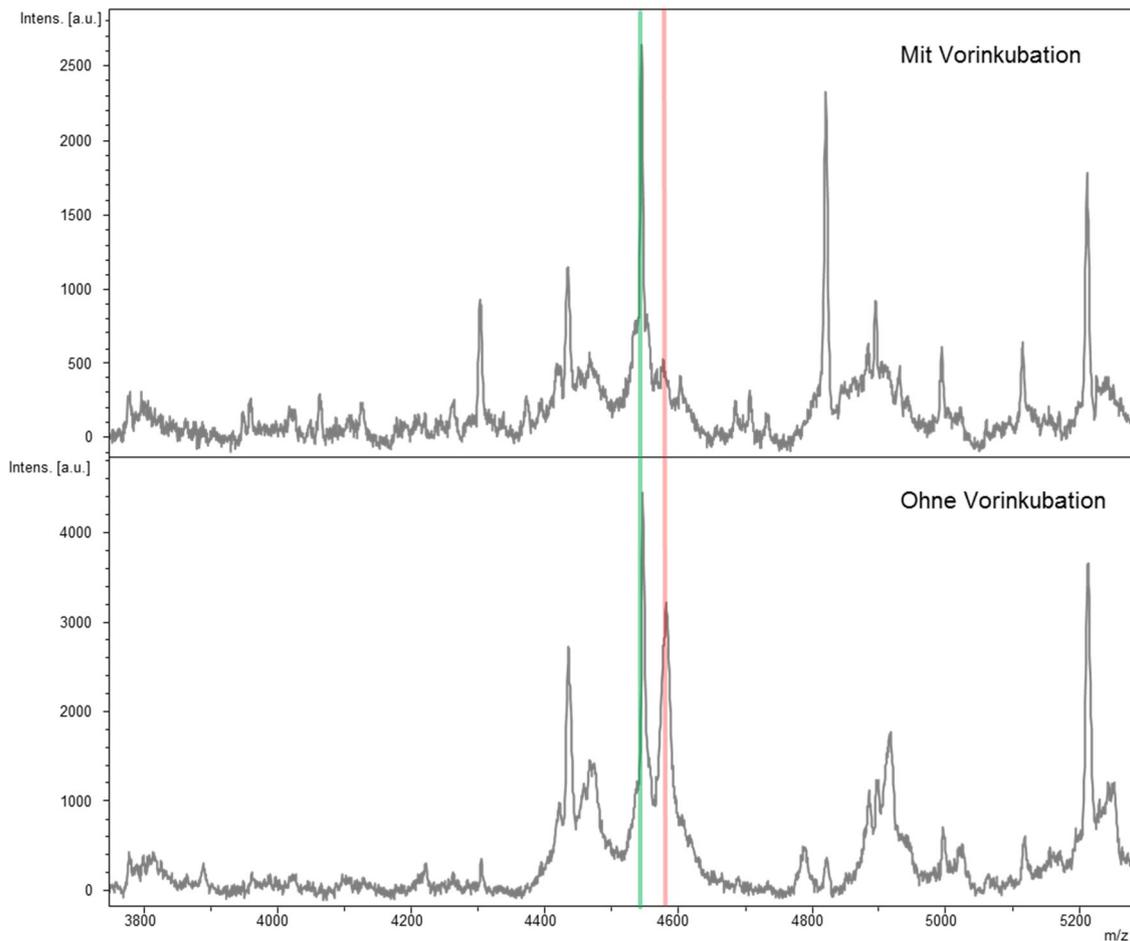


Abbildung 11 Meropenem-empfindlicher *P. aeruginosa* aus Medium AB, oben mit und unten ohne Vorinkubation ohne Lysin. Repräsentativer Peak in grün (nativ) bzw. rot (mit schwerem Lysin) markiert.

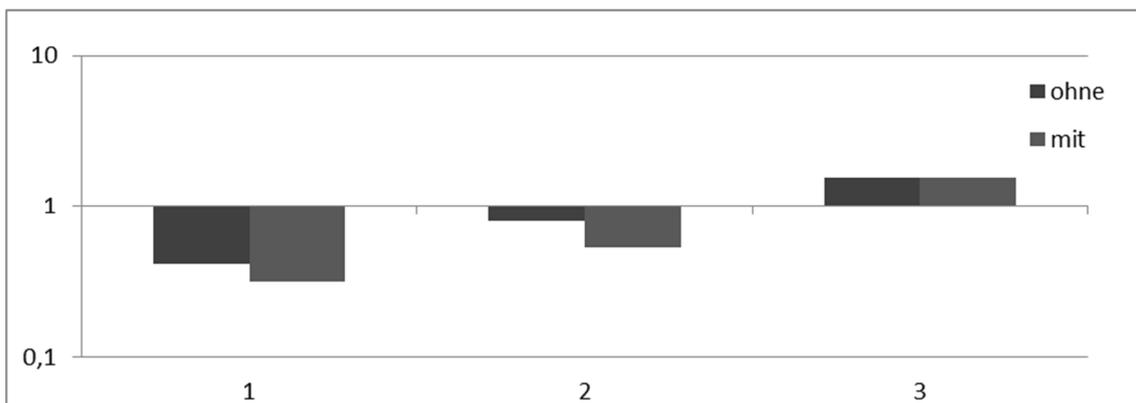


Abbildung 12 Empfindliche (1 und 2) und resistenter (3) *P. aeruginosa* ohne und mit Vorinkubation mit Meropenem, aber ohne Lysin.

3.2.4. Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit des SILAC-Tests zu überprüfen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen biologische Replikate von *P. aeruginosa* erstellt. Dabei wurden die Isolate zuvor jeweils auf Blut- und MacConkey-Agar angezüchtet um mögliche Auswirkungen der Entnahmeplatte auf die Testergebnisse festzustellen.

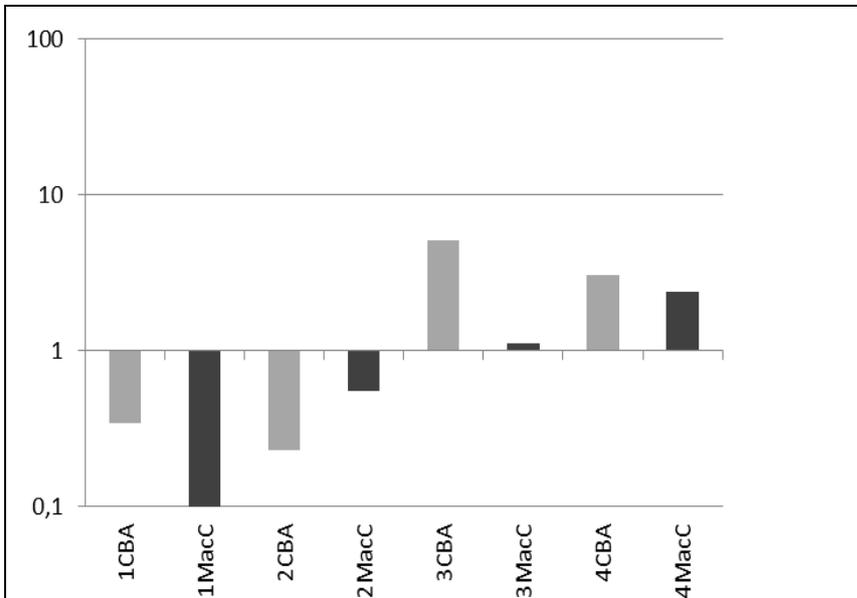


Abbildung 13 Tag 1: SILAC-Assay von zwei empfindlichen und zwei resistenten *P. aeruginosa*-Isolaten, jeweils von Blut- (CBA) und MacConkey-Agar (MacC).

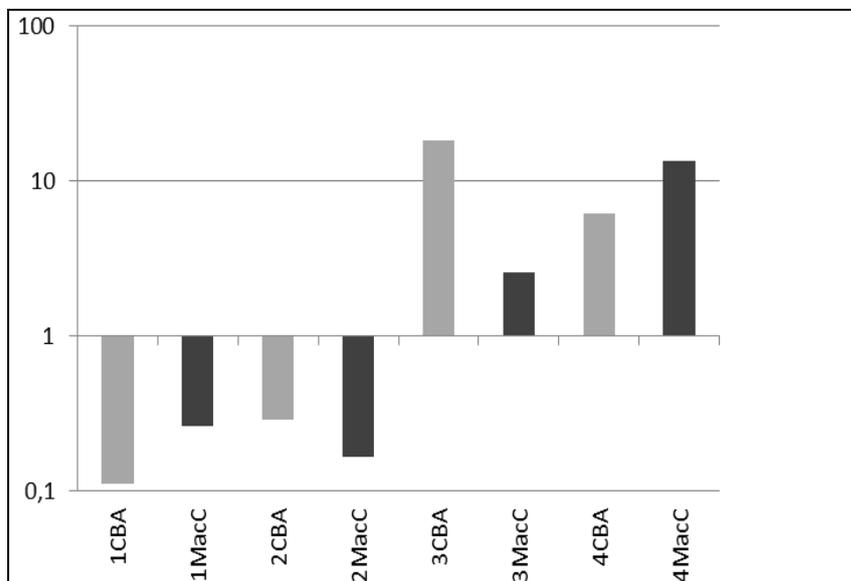


Abbildung 14 Tag 2: Biologische Replikate der Isolate von Tag 1 (vgl. Abbildung 13).

Die Reproduzierbarkeit des Tests konnte anhand dieses Versuchs bestätigt werden. So zeigt sich in den Diagrammen, dass alle Isolate wiederholt zutreffend in resistent und sensibel eingeteilt werden konnten. Durch die Anzucht der Isolate auf

unterschiedlichen Nährmedien konnte keine einheitliche Veränderung festgestellt werden, die sich auf die verschiedenen Wachstumsbedingungen zurückführen ließe. In einem weiteren Versuch wurde am Beispiel von Meropenem gezeigt, dass die Verwendung von Antibiotika verschiedener Hersteller (AstraZeneca und Hexal) keine unterschiedlichen Ergebnisse liefert.

3.3. Evaluierung der Testprotokolle

3.3.1. *P. aeruginosa*

Um die Validität des SILAC-Protokolls zu überprüfen, wurden die in den Vorversuchen als geeignet ermittelten Testbedingungen an einer zweiten, unabhängigen Auswahl von je 30 *P. aeruginosa* Stämmen (15 empfindliche und 15 sensible) pro Antibiotikum bestätigt.

Vorinkubation (nur Meropenem):	30 min
Inkubationszeit:	2,5 h
Antibiotika-Konzentrationen:	Meropenem 290 mg/l
	Ciprofloxacin 60 mg/l
	Tobramycin 120 mg/l

In den folgenden Diagrammen wurden die Ergebnisse der einzelnen Isolate ihren MHK-Werten gegenübergestellt.

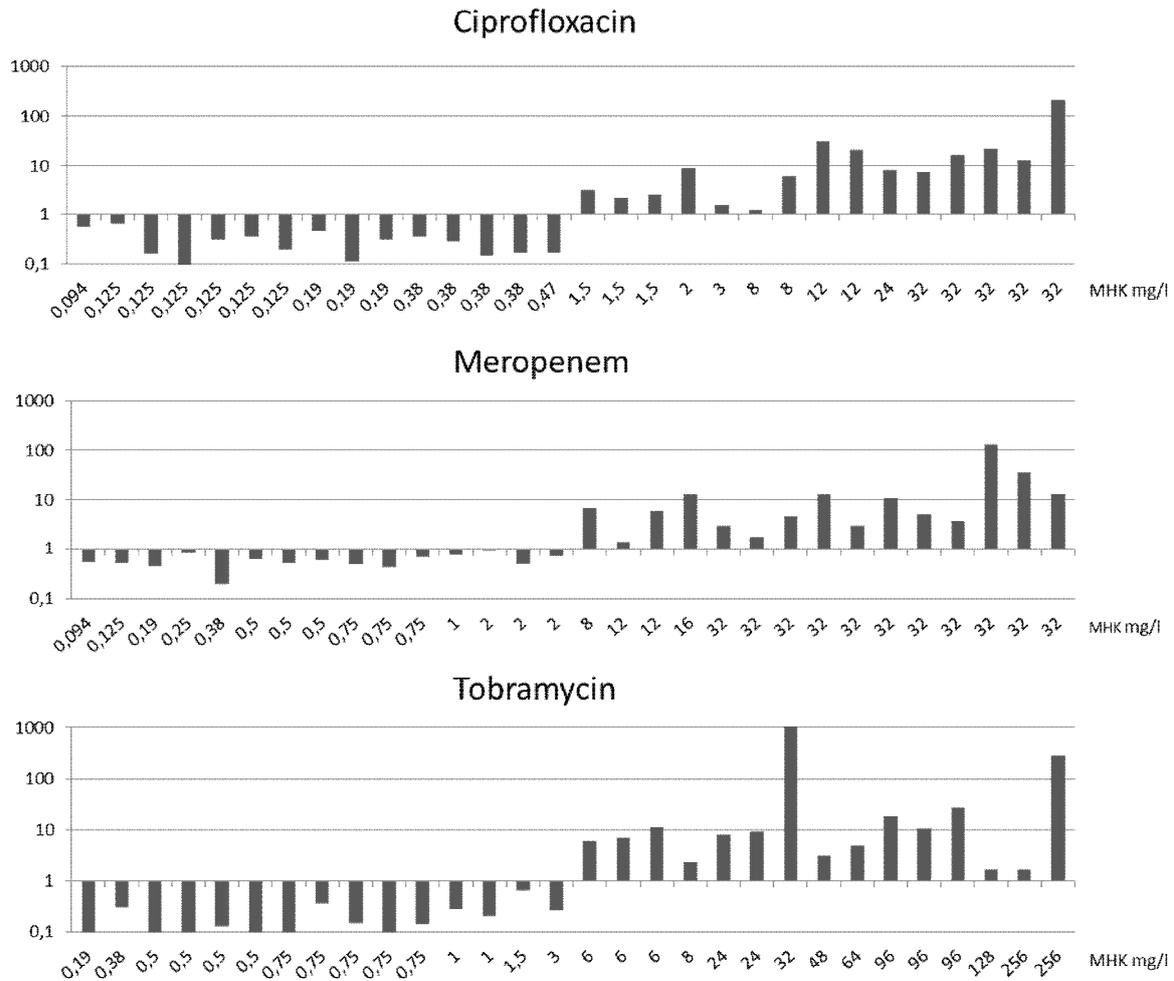


Abbildung 15 Evaluierung der Protokolle mit den drei Antibiotika an je 15 sensiblen und 15 resistenten *P. aeruginosa*-Isolaten, Ergebnisse aufgetragen gegen die jeweiligen MHK-Werte. EUCAST Grenzwerte siehe 2.3.1.

Es zeigt sich, dass die SILAC-Methode eine korrekte Trennung in empfindliche und resistente Isolate ermöglicht, auch wenn die MHK-Werte der getesteten Isolate nahe dem Grenzwert liegen (vgl. 2.3.1.). Die Höhe der mit der SILAC-Methode gemessenen Werte korreliert jedoch nicht mit der Höhe der MHK.

Bei Betrachtung der Diagramme fällt auf, dass die Ergebnisse für Substanzen, die in die Proteinbiosynthese eingreifen, wie Ciprofloxacin und Tobramycin, eine deutlichere Diskrimination zulassen als die des zellwandaktiven Meropenems. Die Untersuchungen Meropenem-sensibler Isolate liefern meist Werte, die nur knapp unter 1 liegen.

3.3.2. *E. coli*

Die Etablierung des Tests für *E. coli* und Ciprofloxacin verlief analog zum Vorgehen bei *P. aeruginosa*.

Als Versuchsbedingungen für das endgültige Protokoll wurde festgelegt:

Inkubationszeit: 1,5 h
Ciprofloxacin-Konzentration: 30 mg/l

Es wurden 12 Isolate (6 empfindliche und 6 resistente) nach diesem Protokoll getestet und auch hier konnten alle richtig eingestuft werden, jedoch ebenfalls ohne Korrelation der SILAC-Werte mit den MHK-Werten.

3.3.3. Blutkulturen

Schnelle Resistenztestungsverfahren haben insbesondere für die Sepsis-Diagnostik eine hohe klinische Relevanz. Daher wurde eine „proof of concept“-Studie mit 8 Blutkulturen von Patienten mit *E. coli*-Sepsis durchgeführt. Es konnte am Beispiel Ciprofloxacin gezeigt werden, dass sich das SILAC-Verfahren auch mit direkt aus Blutkulturflaschen isolierten Erregern ohne vorherige Kultivierung auf Agarplatten durchführen lässt (vgl. 2.3.2.2.).

Als Referenz wurde zusätzlich eine Blutkulturflasche mit dem auf Ciprofloxacin-empfindlichen *E. coli* ATCC-Stamm beimpft und getestet. Das folgende Diagramm zeigt die Ergebnisse der Tests in Zusammenschau mit den gemessenen MHK-Werten.

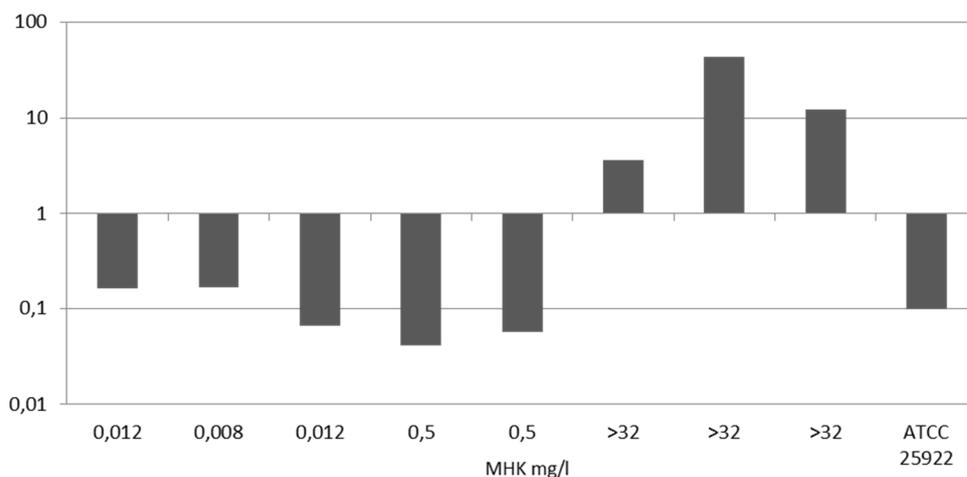


Abbildung 16 SILAC-Assay aus Blutkulturflaschen, 5 empfindliche und 3 resistente *E. coli*, empfindlicher ATCC-Stamm als Referenz. EUCAST Grenzwert siehe 2.3.1.

3.4. β -Laktamase-Assay

In einem letzten Teilprojekt sollte die SILAC-Methode mit dem β -Laktamase-Assay verglichen werden. Vier *P. aeruginosa* Stämme, nach konventioneller MHK-Testung Meropenem-resistent, wurden mit beiden Methoden getestet.

Im Vorfeld wurden alle Isolate durch Real-Time PCR (Polymerase Kettenreaktion) mit dem TaqMan[®]-Verfahren auf das Vorhandensein von Carbapenemasen untersucht. Bei den Isolaten 1 und 2 ließen sich keine Carbapenemasen, bei Isolat 3 eine vom VIM-Typ, bei Isolat 4 eine vom IMP-Typ nachweisen.

Als Markersubstanz für das Vorhandensein von Carbapenemasen im β -Laktamase-Assay wurde Ertapenem gewählt (siehe 4.3.).

Isolate Nr.	MHK mg/l	Carbapenemase Typ	β -Laktamase Assay	SILAC Meropenem
1	>32	-	-	resistent
2	>32	-	-	resistent
3	>32	VIM	-	resistent
4	>32	IMP	+	resistent

Tabelle 3 Vergleich verschiedener Testsysteme zum Nachweis von Resistenzen gegenüber β -Laktam-Antibiotika/Carbapenemen (Etest, PCR, β -Laktamase- und SILAC-Assay).

Die Isolate 1 und 2 besitzen keine Carbapenemasen. Dies konnte auch mit dem β -Laktamase-Assay gezeigt werden. Durch andere Resistenzmechanismen sind die Isolate jedoch trotzdem gegen Meropenem resistent, was mit dem SILAC-Test richtig detektiert wurde, da der Test unabhängig von Resistenzmechanismen funktioniert.

Isolat 3 besitzt zwar eine Carbapenemase, diese konnte jedoch im β -Laktamase-Test nicht nachgewiesen werden. Im Resistenzmechanismus-unabhängigen SILAC-Test konnte das Isolat jedoch richtig als resistent eingestuft werden.

Beim ebenfalls Carbapenemase-positiven Isolat 4 waren beide Tests erfolgreich.

4. Diskussion

4.1. Test-Protokolle

Im Jahr 2003 haben Pineda et al. zur Identifizierung von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS erstmals ausschließlich die Spektren der häufigsten ribosomalen Proteine untersucht [38]. Im Gegensatz zur Peptidmassen-Fingerprint-Methode werden nicht mehr die kompletten Massenspektren miteinander verglichen, da dies ein sehr störanfälliges Verfahren ist, das durch Unterschiede in der Durchführung oft von Labor zu Labor abweichende Ergebnisse lieferte. Die Verwendung der Sequenzen ribosomaler Proteine als Biomarker, welche in sehr hoher Zahl in den Bakterienzellen vorhanden sind, erhöht die Signifikanz der Ergebnisse durch geringere Spektrenvariabilität.

Lysin ist eine Aminosäure, die in den betrachteten ribosomalen Proteinen sehr häufig vorkommt, weshalb wir sie als Isotop-markierten Baustein zum Nachweis der Proteinbiosynthese einsetzten [6]. Für Säuger zählt Lysin zwar zu den essentiellen Aminosäuren und muss über die Nahrung zugeführt werden, von den meisten Bakterien und Pflanzen kann es jedoch über verschieden Schritte und aus unterschiedlichen Vorläufermolekülen selbst hergestellt werden [37]. Für unsere Untersuchungen ergab sich aus dieser Tatsache jedoch kein erkennbarer Nachteil, da die Aminosäure-*de-novo*-Synthese der Bakterienzellen offenbar vernachlässigbar gering ist, wenn diese im Kulturmedium in ausreichender Menge vorliegen. Sparbier et al. testeten die Verwendung anderer markierter Aminosäuren. Diese Untersuchungen lieferten vergleichbare Ergebnisse, jedoch mit abweichenden Peak-Shifts [6].

In einem anderen Versuchsansatz verwendeten Demirev et al. zur Erzeugung der Massen-Shifts einen Aminosäure-Mix in dem sämtliche C-Atome der Aminosäuren durch schwere ^{13}C -Isotope des Kohlenstoffs ^{12}C ersetzt wurden [39]. Die Interpretation der Ergebnisse stellte sich jedoch als kompliziert heraus, da dabei vielfache Peak-Shifts mit unterschiedlichen Massendifferenzen entstehen, je nachdem wie viele C-Atome in den Biomarker eingebaut werden. Verwendet man Aminosäuren lassen sich die veränderten Spektren besser vorhersagen. Des Weiteren ist die Verwendung von ^{13}C vergleichsweise teuer [6].

Bei unseren Untersuchungen fiel auf, dass der SILAC-Test bei Untersuchungen mit Meropenem im Vergleich zu den anderen beiden Antibiotika mehr Zeit benötigt um Ergebnisse zu erzielen. Diese Beobachtung mag durch die Tatsache begründet sein, dass Meropenem wie in 1.2.1. besprochen die Bildung der Zellwand stört und nicht direkt in die Proteinbiosynthese eingreift. Wirksame β -Laktam-Antibiotika beeinträchtigen den Protein-Stoffwechsel des Bakteriums anfänglich nicht. Vielmehr ließ sich aktive Proteinbiosynthese auch bei empfindlichen Isolaten noch bis zu einer Inkubationszeit von 90 Minuten nachweisen. Dieselben Beobachtungen beschrieben Sparbier et al. bereits für die beiden β -Laktam-Antibiotika Oxacillin und Cefoxitin [6]. So stellten sie gleichfalls vor dem endgültigen Stoffwechselarrest sensibler *S. aureus*-Isolate noch reduzierte Aktivität fest.

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse in Bezug auf falsch-resistente Ergebnisse durch dieses Phänomen zu verhindern, führten wir für Meropenem eine 30-minütige Vorinkubationszeit ohne Lysin durch und gewährten dem Antibiotikum die nötige Zeit seine Wirksamkeit im Sinne eines eingeschränkten Stoffwechsels zu entfalten. Demgegenüber wählten wir diese Vorinkubationszeit möglichst kurz, damit resistente Bakterien nicht aufgrund des Lysinmangels im Medium beginnen neues Lysin zu synthetisieren.

Die Auswertung der Ergebnisse kann auf verschiedene Arten erfolgen, drei Beispiele sollen im Folgenden beschrieben werden.

Als visuelle Auswertung mit flexAnalysis 3.4, wie in 3.1.1. beschrieben oder alternativ anhand einer anderen Darstellungsform, bei der die Peak-Intensitäten miteinander verglichen werden, indem die Spektren von der Software auf die totale Ionenzahl normalisiert und die Peaks als Banden je nach Intensität in verschiedenen Grauabstufungen, ähnlich einer Elektrophorese, dargestellt werden (Gel-view-Modus).

Über die MALDI Biotyper 3.1. Software ist weiterhin eine automatisierte Auswertung und Darstellung der gewonnenen Daten in Form einer Korrelationskalkulations-Matrix CCI (*calculation of the correlation index*), nach Arnold und Reilly möglich [40]. Es wird der Korrelationsindex zwischen den normalen Spektren und denen aus dem Medium mit schwerem Lysin und Antibiotikum berechnet und in Werten zwischen 0 (keine Korrelation) und 1 (totale Übereinstimmung) angegeben. Ein verändertes Peak-Muster durch Massen-Shifts führt zur Abnahme des Index; Isolate mit

CCI-Werten kleiner gleich 0,6 werden als resistent, mit größeren als sensibel gewertet.

Zuletzt die ebenfalls von uns angewandte und in 2.3.5.2. beschriebene Datenverarbeitung, bei der die Intensitäten ausgewählter Peaks normaler Spektren summiert werden, um sie mit denen aus Spektren mit schwerem Lysin und Antibiotikum ins Verhältnis zu setzen.

Alle Analysemöglichkeiten lieferten vergleichbar zuverlässige Ergebnisse; für diese Arbeit wurden jeweils ein visuelles und ein automatisiertes Verfahren gewählt.

Wie in Abbildung 5 gezeigt, beobachteten wir des Öfteren die Entstehung von mehrgipfligen Peaks durch Einbau von nativem und Isotop-markiertem Lysin (vgl. 3.1.1.). Bei der von uns gewählten Auswertung werden diese bisher nicht berücksichtigt. Ein verbessertes Auswertungs-Programm, das dieses Phänomen ausreichend berücksichtigt, könnte beispielsweise auf der Messung der Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) in einem definierten Bereich um den Haupt-Peak beruhen. Aus bioinformatischer Sicht ist dies jedoch eine anspruchsvolle Aufgabe, da zuerst eine Nulllinie, für den Beginn der Messung definiert werden müsste.

4.2. MHK-Bestimmung

Die therapeutische Wirksamkeit einer antimikrobiellen Substanz genau vorherzusagen ist unmöglich; eine Abschätzung gelingt über verschiedene Faktoren, unter denen pharmakokinetische Eigenschaften und die MHK von großer Bedeutung sind.

Wie bereits in Ergebnisse erwähnt kann mit unserem Protokoll zwar eine zutreffende Einteilung der Isolate in empfindlich und resistent vorgenommen werden, jedoch korreliert die Höhe der Absolutwerte nicht mit den Werten der MHK. Aktuell in der Routine eingesetzte Methoden zur genauen MHK-Bestimmung wie Etest, Bouillon-Verdünnungstest oder auch Agardilutionstest beanspruchen viel Zeit, Schnelltests mit kurzen Untersuchungszeiten (Beispiel PCR) oder experimentelle Verfahren wie Echtzeit-Mikroskopie [41], bei der die bakterielle Zellteilung von einer Kamera mit Zeitraffer detektiert wird, zeigen ebenfalls keine Korrelation zur MHK [42].

Die oben erwähnten Methoden zur konventionellen MHK-Bestimmung bedienen sich der Untersuchung verschiedener Verdünnungsstufen. Eine Übertragung dieser Vor-

gehensweise auf unsere MS-basierte Methode ist theoretisch möglich und wurde in ähnlicher Form beschrieben.

In einem Paper von de Carolis et al. konnte anhand von *Candida sp.* und *Aspergillus sp.* gezeigt werden, dass es mittels MALDI-TOF MS möglich ist, Resistenzbestimmungen mit Korrelation zur MHK vorzunehmen [43]. Nach Marinach et al., die 3 Jahre zuvor als *proof of principle* ein Protokoll für die Durchführung erstellten [44], gelang es der Gruppe die MPCC (*minimal profile change concentration*) festzustellen, die eine hohe Übereinstimmung mit der MHK für alle getesteten 44 Isolate aufwies. Zur Auswertung wurde der CCI zwischen Spektren aus verschiedenen Verdünnungsstufen mit der Minimal- und Maximalkonzentration ermittelt. Die MPCC stellt die geringste Konzentration dar, an der ein Spektrum dem aus der Maximum-Konzentration ähnlicher ist als dem aus der Minimum-Konzentration.

Die Arbeit mit Verdünnungsstufen wurde von uns bewusst vernachlässigt, da unsere Vorgehensweise auf eine rasche und einfach durchzuführende Testung ausgelegt und für eine Schnelltestung der MHK-Wert nicht von vorrangiger Bedeutung ist.

Eine Alternative stellen quantitative Messungen zur Bestimmung der MHK dar, bei denen die Menge der neusynthetisierten Proteine mit schwerem Lysin bestimmt werden müssten. Die Anwendungsbegrenzung von MALDI-TOF MS durch ihre eingeschränkte Möglichkeit solche Messungen vorzunehmen, ist jedoch ein häufig diskutiertes Problem. In Bezug auf quantitative Messungen ist die Elektronenstoßionisation der MALDI überlegen, eignet sich jedoch nicht zur Untersuchung von großen thermisch labilen Molekülen, wie die hier untersuchten ribosomalen Proteine [10]. Seit Jahren wird an der Überwindung der unzureichenden quantitativen Messergebnisse von MALDI-TOF MS gearbeitet und es sind verschiedenste mehr oder weniger hilfreiche Lösungen beschrieben. Bislang jedoch zeigten diese keine für den diagnostischen Einsatz zufriedenstellenden Ergebnisse. Meist wird die schlechte Reproduzierbarkeit als zugrundeliegendes Hauptproblem angegeben. Die Ergebnisse variieren zwischen einzelnen Proben und sogar verschiedenen Laserpulsen. Neben Schwankungen der Laserstärke soll besonders ungleichmäßige Verteilung der Probe und das Vorkommen sogenannter „*hot spots*“ mit erhöhten Intensitätswerten die Ursache sein. Dies scheint von nicht standardisierter Probenverarbeitung und -aufbringung, Matrixmenge und -kristallisationsverhalten und dem Targetmaterial abhängig zu sein. Die

Optimierung dieser Einflussfaktoren, wie zum Beispiel durch Verwendung von α -Cyano-4-hydroxymizinsäure als Matrix, die bekanntlich eine sehr homogene Verteilung erreicht, den Einsatz von internen Standards als Referenz, bevorzugt durch Isotop-markierte Analoga der zu messenden Substanz, oder überarbeitete Algorithmen zur Spektrenaufnahme verbesserten die Ergebnisse in manchen Fällen, lieferten jedoch nie den einschlägigen Erfolg quantitativer Messungen. Hinzu kommt, dass auch in manchen homogenen Proben starke Nichtlinearität zwischen Intensität und Konzentration festgestellt werden konnte. Dies scheint besonders in komplexen Proben der Fall zu sein. Als Ursache wird etwa auf den Suppressionseffekt, zu dem es möglicherweise durch Unterschiede im Ionisationsgrad durch geladene Reste oder Ladungswettbewerb zwischen sauren und basischen Aminosäuren kommt, die Übersättigung des Massenspektrometer-Detektors oder Überlagerung von Molekülen ähnlicher Masse verwiesen [45-47].

Albalat et al. konzentrierten sich auf die Komplexität der Proben als Auslöser der mangelnden Quantifizierbarkeit [46]. Sie beobachteten lineares Verhalten der Intensitäten einzelner Proteine, jedoch nicht bei Untermischung in proteinreiche Proben, sowie Veränderung der erzeugten Spektren durch Verdünnung komplexer Proben, durch die manche Proteine überhaupt erst detektierbar wurden. In ihrer Arbeit liefern sie einen Lösungsansatz, der auf der Annahme basiert, dass die meisten Peptide einen individuellen Bereich der Probenverdünnung besitzen, an dem sich die Peak-Intensität zur Peptid-Konzentration linear verhält. Sie entwickelten einen Algorithmus, mit dessen Hilfe sich der Verdünnungsbereich ermitteln lässt, der zur Quantifizierung genutzt werden kann, und mit dem die erhaltenen Intensitäten normalisiert werden können.

Folgt man diesem Ansatz wäre es wichtig, die mit der SILAC-Methode untersuchten Proben so einfach wie möglich zu halten, und darauf zu achten, die Analyten in ihrem dynamischen Bereich zu messen, beziehungsweise die Biomarker nach diesen Kriterien auszuwählen.

4.3. Vorteile der SILAC-Methode

In vielerlei Hinsicht stellt das SILAC-Verfahren für MALDI-TOF MS eine Verbesserung der bisher bekannten Resistenztestungsmethoden dar.

Der Nachweis der Stoffwechselaktivität in Anwesenheit von antibiotisch wirksamen Substanzen erlaubt im Gegensatz zur Prüfung auf Auswirkungen einzelner Mechanismen, wie beispielsweise Bestätigung des Vorhandenseins von β -Laktam-Spaltprodukten, oder gar reine Überprüfung auf das Vorhandensein von Resistenzgenen mittels PCR, eine Aussage über das tatsächliche Resistenzverhalten. Die SILAC-Methode stellt demnach einen phänotypischen Resistenztest dar und beurteilt gewissermaßen als Summation das Zusammenspiel aller Mechanismen, die die Resistenzeigenschaften eines Erregers begründen. Sie ermöglicht dies erstmalig im Sinne eines Schnelltests mit MALDI-TOF MS.

Besonders bei Bakterien, deren Resistenzverhalten häufig vom Zusammenspiel mehrerer Mechanismen abhängig ist, wie etwa bei *P. aeruginosa*, ist diese Art der Testung aussagekräftiger. Durch einen Vergleich mit dem Assay zum Nachweis von β -Laktamase-Aktivität konnten wir dies verdeutlichen.

Zahlreiche falsch-negative Ergebnisse im β -Laktamase-Assay bei Verwendung von Meropenem führten zur Entscheidung Ertapenem als Carbapenemase-Indikator für diese Arbeit zu verwenden. Wie oben erwähnt besitzt *P. aeruginosa* im allgemeinen Ertapenem-Resistenz und scheint daher möglicherweise zur Resistenztestung ungeeignet. Hier soll jedoch lediglich eine Carbapenemase-Aktivität bei resistenten Isolaten nachgewiesen werden, weshalb eine Verwendung des Wirkstoffes in diesem Zusammenhang und aufgrund der eindeutigeren Ergebnisse gerechtfertigt ist.

Während mit der SILAC-Methode alle Isolate richtig als resistent identifiziert werden konnten, wurden bei alleiniger Untersuchung mit dem β -Laktamase-Assay oder der PCR, Carbapenem-resistente aber Carbapenemase-negative *P. aeruginosa* Isolate fälschlicherweise als sensibel eingestuft. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass durch den β -Laktamase-Assay bei Carbapenemase-positiven Stämmen keine β -Laktamase-Aktivität detektiert wird (vgl. Isolat Nr. 3 in Tabelle 3).

Im Februar 2015, nach Abschluss unserer Laborphase, veröffentlichten Papagiannitis et al. eine Arbeit in der die niedrige Sensitivität des β -Laktamase-Assays für Meropenem beschrieben wird [48]. Dies konnten sie durch Zugabe von NH_4HCO_3 zum Ansatz auf 98% erhöhen. Unter Verwendung des ursprünglichen Ansatzes konnten vor allem Carbapenemasen vom VIM-Typ schlecht nachgewiesen

werden, was sich auch in unseren Ergebnissen zeigte. Dies wird mit der Entstehung mehrerer, das Ergebnis beeinflussender, Peaks signifikanter Intensität erklärt.

Es bleibt zu überprüfen, ob die Detektion der Ertapenem-Spaltung durch die VIM-Carbapenemase aus unserem Test mit Hilfe der veränderte Pufferzusammensetzung gelingt, oder ob es einen anderen Grund dafür gibt, wie beispielsweise das zusätzliche Vorhandensein anderer Resistenzmechanismen, die nicht auf der Spaltung des Antibiotikums beruhen.

Nichtsdestotrotz konnten wir für Carbapenemase-negative Isolate die Vorteile der SILAC-Methode mit Resistenzmechanismus-unabhängigem Ergebnis nachweisen. In Tabelle 3 zeigt sich deutlich, dass alle getesteten Isolate durch die SILAC-Methode richtig als Meropenem-resistent identifiziert wurden. Wohingegen die Carbapenemase-PCR und der β -Laktamase-Assay lediglich Carbapenemasen bzw. Carbapenem-Spaltprodukte nachweisen und somit keine Aussage über resistent/empfindlich zulassen.

Die erfolgreiche Resistenzbestimmung direkt aus bebrüteten Blutkulturflaschen zeigt ein weiteres Mal die Vorteile der SILAC-Methode gegenüber bisherigen Routineverfahren auf. Wie schon in der Einleitung besprochen ist die Sepsis ein Krankheitsbild mit hoher Dringlichkeit der Erreger-Identifikation und Resistenzbestimmung. Bisher war es zwar möglich Bakterien direkt aus Blutkulturflaschen mittels MALDI-TOF MS zu identifizieren, Resistenzbestimmungen hingegen erforderten weiterhin Übernachtskulturen. Die SILAC-Methode ermöglicht nun auch eine beschleunigte Resistenzbestimmung und erlaubt die frühe Einleitung einer gezielten antibiotischen Therapie.

4.4. Ausblick

Die Vorteile des SILAC-Assays sind beachtlich und die Fragen nach Einbindung in die Routinediagnostik oder Erweiterung des Anwendungsgebiets berechtigt.

Besonders für Laboratorien die bereits mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer ausgestattet sind, ist unsere Vorgehensweise der Resistenzbestimmung attraktiv, da sie Speziesidentifizierung und Resistenzbestimmung mit ein und demselben Gerät unter unveränderten Einstellungen des zu untersuchenden Massenbereichs und ohne weitere Kalibrierung ermöglicht.

Für den endgültigen Einzug des Tests in die Routinelabors bedarf es dennoch weiterer Untersuchungen und Modifikationen. Die bisherigen Protokolle und Daten für *S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa* reichen noch nicht aus, um die Vorgehensweise zu verallgemeinern.

Im Hinblick auf die Datenverarbeitung scheint es noch Optimierungspotential zu geben. Bei dem von uns gewählten Auswerteverfahren müsste eine Datenbank mit den zu untersuchenden leichten und schweren Peaks für jeden zu testenden Erreger angelegt werden, was einen großen Arbeits- und Zeitaufwand darstellt. Wie in Material und Methoden beschrieben müssten zuerst ausreichend viele Stämme eines Bakteriums mit und ohne schwerem Lysin getestet, und die erzeugten Spektren visuell ausgewertet werden, um die Massenwerte geeigneter Peaks zu bestimmen. Verwendet man allerdings Spektren-vergleichende Datenverarbeitung, wie die oben beschriebene Bestimmung des CCI, könnten diese arbeitsintensiven Schritte vermieden werden.

Bezüglich der Durchführung bleiben Inkubationszeiten und Antibiotika-Konzentrationen anderer Erreger-Substanz-Kombinationen zu überprüfen. Die Notwendigkeit einer Vorinkubation ohne Lysin für alle β -Laktam-Antibiotika bleibt durch weitere Tests zu bestätigen.

Eine Verwendung des Tests mit Beschränkung auf die häufigsten Erreger und Antibiotika von klinischer Relevanz in Kombination mit der Auswertung über die Spektrenkorrelationsuntersuchung als Ergänzung bisheriger Methoden wäre jedoch schon jetzt insbesondere bei Sepsis-Patienten denkbar.

Eine Übertragung unserer Vorgehensweise ist grundsätzlich auf alle Mikroorganismen, die *in vitro* angezüchtet werden können (andere Bakterienspezies oder Pilze) und auf eine Vielzahl antimikrobieller Substanzen oder Substanzkombinationen möglich. Selbst noch nicht identifizierte Isolate könnten bei Verwendung der oben erwähnten CCI-Matrix oder durch Kombination mit der Identifizierung mittels MALDI-TOF MS getestet werden [6, 39].

Besonders vielversprechend scheint der SILAC-Test für anspruchsvolle und langsam wachsende Mikroorganismen, unter denen Mykobakterien aufgrund ihrer hohen klinischen Relevanz besonders hervorzuheben sind.

Tuberkulose (TB) ist eine weltweit bedeutende Infektionskrankheit, die besonders in Kombination mit HIV oft tödlich verläuft. Die Entwicklung von MDR- und XDR-TB durch ungenügende Einhaltung der Therapieempfehlung zur Verwendung einer

Kombination aus vier Antituberkulotika über sechs Monate erschwert die effektive Kontrolle dieser Erkrankung enorm. Die WHO schätzte die Inzidenz von MDR-TB im Jahr 2008 auf 3,6% der weltweit aufgetretenen TB-Fälle, mit besonders hohen Zahlen für China und Indien [49]. Die Resistenzbildung von Mykobakterien ist auf verschiedene chromosomale Mutationen in verschiedenen Genen wie u.a. *katG*, *inhA*, *mshA* zurückzuführen [50].

Mykobakterien sind sehr anspruchsvolle Erreger, die nur auf besonderen Nährboden vermehrt werden können und ein sehr träges Wachstumsverhalten mit einer Verdopplungszeit von 15-20 Stunden zeigen. Die Resistenzbestimmung mittels Agar-Methode, bei der Kolonie bildende Einheiten gezählt werden müssen, ist ein arbeitsintensives Vorgehen, dessen Ergebnisse erst nach ca. 21 Tagen erwartet werden können. Der derzeit übliche Einsatz von Flüssigkulturen mit bzw. ohne Antimykotika-Zusatz im MGIT-Kulturautomaten konnte die Bestimmungszeit nur um eine Woche verkürzen [51, 52].

In den letzten Jahren wurde intensiv Forschung betrieben, um die Diagnostik für Mykobakterien zu beschleunigen und so eine frühe gezielte Antibiotikatherapie zu ermöglichen. Molekulare Tests zum direkten Nachweis obenerwählter Resistenzgene scheinen sich bisher am besten hierfür zu eignen [53]. Seit 2008 wurden von der WHO zwei Line Probe Assays zum Screening auf *M. tuberculosis*-Komplex und gleichzeitigen Nachweis von Resistenz gegen die wichtigsten First-Line-Antituberkulotika (Rifampicin und Isoniazid) genehmigt [54]. Diese Line Probe Assays bedienen sich einer Kombination aus PCR und Hybridisierungstechnik, mit der sich die häufigsten resistenzassoziierten Einzelnukleotid-Polymorphismen nachweisen lassen [53]. Für die Testung von Second-Line-Antituberkulotika existiert derzeit jedoch noch kein von der WHO akzeptiertes kommerziell erwerbliches Molekulardiagnostik-Tool [55]. Die SILAC-Methode bietet hier einen vergleichsweise stabilen Ansatz, da sie nicht an stetig neu auftretende Genmutationen, die mit neuen Antituberkulotika-Resistenzen und Resistenzmechanismen assoziiert sind, angepasst werden muss.

Für den Einsatz der SILAC-Methode an sporenbildende Bakterien oder Viren sind weitere Fortschritte hinsichtlich der Identifizierung mittels MS abzuwarten.

Abweichende Spektren, die auf unterschiedliche Proteinexpression der Sporen und ihrer vitalen Lebensform zurück zu führen sind, und die Ähnlichkeit der Spektren von Sporen verschiedener Spezies stellen Hindernisse bei der Identifizierung von

Sporenbildnern dar. Aktuelle Arbeiten zur Sporen-Identifizierung von *Bacillus*-Spezies wirken vielversprechend und werden aufgrund der Relevanz der Erreger als Biowaffen, besonders *Bacillus anthracis*, mit Sicherheit noch intensiviert [56, 57].

Auch die Identifizierung von Viren mittels MALDI-TOF MS ist Gegenstand aktueller Forschung. 2014 gelang es erstmals auch *Influenza A*, nach vorheriger Anzucht in Zellkulturen, mit MS zu identifizieren und aus einem Gemisch mit andern Viren nachzuweisen. Fraglich bleibt hier wie sich die Verwendung Isotop-markierter Aminosäuren in Zellkulturen umsetzen lässt [58].

5. Zusammenfassung

Antibiotika sind bedeutende Therapeutika der heutigen Medizin, ihr Einsatz erfolgt häufig kalkuliert oder empirisch und ist daher nicht selten unwirksam – eine Folge davon, aber auch Grund dafür sind steigende Resistenzen. Bisherige Methoden zur Resistenztestung sind zeit- und/oder kostenintensiv. Hingegen ist beispielsweise zur Einleitung von Hygienemaßnahmen bei MDR-Erregern oder zur optimalen Behandlung lebensbedrohender Infektionskrankheiten der Bedarf an schneller Antibiotikaresistenz-Bestimmung sehr hoch.

MALDI-TOF MS ist ein präzises, einfaches, schnelles und kosteneffizientes Verfahren, das bereits seit mehreren Jahren erfolgreich zur Identifizierung von Mikroorganismen eingesetzt wird und, wie in unseren Untersuchungen gezeigt, in Kombination mit SILAC auch eine zuverlässige Resistenztestung erlaubt.

Bei der SILAC-Methode werden Bakterien-Isolate zusammen mit antibiotisch wirksamen Stoffen inkubiert und der weiterhin bestehende Stoffwechsel resistenter Isolate nachgewiesen, indem mittels MALDI-TOF MS der Einbau Isotop-markierter Aminosäuren in die neu synthetisierten Proteine dargestellt wird.

Diese Arbeit beschreibt den erstmaligen und erfolgreichen Einsatz dieser SILAC-Methode zur Resistenztestung von *P. aeruginosa* mit klinisch relevanten Antibiotika aus drei verschiedenen Klassen Meropenem/ β -Laktamase-Antibiotikum, Ciprofloxacin/ Gyrasehemmer und Tobramycin/Aminoglycosid und von *E. coli* mit Ciprofloxacin. Im beispielhaften Vergleich mit einem Hydrolyse-Assay am MALDI-TOF MS für β -Laktamase-Antibiotika und Carbapenemase-Nachweis mittels PCR gelang die Veranschaulichung der Vorteile dieser Methode. Der Nachweis des Stoffwechsels von Mikroorganismen erlaubt eine vom Resistenzmechanismus unabhängige Testung, was einen universellen Einsatz des von uns beschriebenen Verfahrens für sämtliche *in vitro* anzüchtbaren Erreger denkbar macht.

Wir entwickelten einen Algorithmus für Durchführung und halbautomatisierte Auswertung dieses Verfahrens, der nach 2,5 bis 3 Stunden reproduzierbare Ergebnisse liefert, die mit der konventionellen Testung übereinstimmen. Dies konnte an 30 *P. aeruginosa*-Isolaten je Antibiotikum und 12 *E. coli*-Isolaten mit Ciprofloxacin gezeigt werden. Erstmals gelang es, das Verfahren direkt aus bewachsenen Blutkulturflaschen anzuwenden, was an 9 Blutkulturen mit *E. coli* und Ciprofloxacin dokumentiert wurde. Ist die genaue Bestimmung der MHK gewünscht, sind

quantitative Messungen notwendig oder die Testung verschiedener Verdünnungsstufen erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Fleming, A., *On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae*. British journal of experimental pathology, 1929. **10**(3): p. 226-236.
2. Vincent, J.L., et al., *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 344-53.
3. *Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2012. **55**(10): p. 1311-1354.
4. Magiorakos, A.P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(3): p. 268-81.
5. Beekmann, S.E., et al., *Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3119-25.
6. Sparbier, K., et al., *MALDI Biotyper based rapid resistance detection by stable isotope labeling*. J Clin Microbiol, 2013.
7. Leone, M. and C. Martin, *How to break the vicious circle of antibiotic resistances?* Curr Opin Crit Care, 2008. **14**(5): p. 587-92.
8. Wolters, M., et al., *MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant Staphylococcus aureus lineages*. Int J Med Microbiol, 2011. **301**(1): p. 64-8.
9. Wieser, A., et al., *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review)*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **93**(3): p. 965-74.
10. Trimpin, S., *Methodische Entwicklung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie für Grenzbereiche der Makromolekülanalytik*. 2002, Universitätsbibliothek Mainz.
11. Rehm, H. and T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 2010: Springer DE.

12. Edwards-Jones, V., et al., *Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry*. J Med Microbiol, 2000. **49**(3): p. 295-300.
13. Jackson, K.A., et al., *Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods, 2005. **62**(3): p. 273-84.
14. Majcherczyk, P.A., et al., *The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **255**(2): p. 233-9.
15. Szabados, F., et al., *Identical MALDI TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic SCCmec-harboring and SCCmec-lacking strains of Staphylococcus aureus*. J Infect, 2012. **65**(5): p. 400-5.
16. Nagy, E., et al., *Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) Bacteroides fragilis strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 11): p. 1584-90.
17. Trevino, M., et al., *Susceptibility trends of Bacteroides fragilis group and characterisation of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF*. Anaerobe, 2012. **18**(1): p. 37-43.
18. Wybo, I., et al., *Differentiation of cfiA-negative and cfiA-positive Bacteroides fragilis isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(5): p. 1961-4.
19. Papagiannitsis, C.C., et al., *Identification of CMY-2-type cephalosporinases in clinical isolates of Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(5): p. 2952-7.
20. Sparbier, K., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(3): p. 927-37.
21. Hrabak, J., et al., *Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(7): p. 2441-3.

22. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
23. Lößner, C., *Etablierung und Validierung quantitativer Proteomik-Techniken zur Identifizierung von mikroRNA-Zielproteinen im Mantelzelllymphom*. 2009.
24. Zhanel, G.G., et al., *Ertapenem: review of a new carbapenem*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2005. **3**(1): p. 23-39.
25. Neu, H.C., *Penicillin-binding proteins and role of amdinocillin in causing bacterial cell death*. Am J Med, 1983. **75**(2A): p. 9-20.
26. Courvalin, P., R. Leclercq, and L.B. Rice, *Antibiogram*. 2010: ESKA Pub.
27. Hof, H. and R. Dörries, *Medizinische Mikrobiologie*. 2004: Georg Thieme Verlag.
28. Neu, H.C., *The emergence of bacterial resistance and its influence on empiric therapy*. Rev Infect Dis, 1983. **5 Suppl 1**: p. S9-20.
29. Heym, B., et al., *Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Molecular microbiology, 1995. **15**(2): p. 235-245.
30. Bugg, T.D.H., et al., *Molecular basis for vancomycin resistance in Enterococcus faecium BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA*. Biochemistry, 1991. **30**(43): p. 10408-10415.
31. Hinrichs, W., et al., *Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance*. Science, 1994. **264**(5157): p. 418-20.
32. Schneider, E., *ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen*. Chemie in unserer Zeit, 2000. **34**(2): p. 90-98.
33. Burkhardt, F., et al., *Mikrobiologische diagnostik: Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie*. 2009: Thieme.
34. ECDC. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe*. 2012; Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>.
35. EUCAST. *Disk Diffusion Test Methodology*. 2014; Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_4/Manual_v_4.0_EUCAST_Disk_Test.pdf.

36. EUCAST. *Clinical breakpoints - bacteria*. 2014; Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf.
37. Fazius, F., C. Zaehle, and M. Brock, *Lysine biosynthesis in microbes: relevance as drug target and prospects for beta-lactam antibiotics production*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013. **97**(9): p. 3763-72.
38. Pineda, F.J., et al., *Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers*. Anal Chem, 2003. **75**(15): p. 3817-22.
39. Demirev, P.A., et al., *Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2013. **24**(8): p. 1194-201.
40. Arnold, R.J. and J.P. Reilly, *Fingerprint matching of E. coli strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1998. **12**(10): p. 630-6.
41. Fredborg, M., et al., *Real-time optical antimicrobial susceptibility testing*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(7): p. 2047-53.
42. van Belkum, A. and W.M. Dunne, Jr., *Next-generation antimicrobial susceptibility testing*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(7): p. 2018-24.
43. De Carolis, E., et al., *Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of Candida and Aspergillus species*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(7): p. 2479-83.
44. Marinach, C., et al., *MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of Candida albicans and fluconazole*. Proteomics, 2009. **9**(20): p. 4627-31.
45. Szajli, E., T. Feher, and K.F. Medzihradszky, *Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(12): p. 2410-8.
46. Albalat, A., et al., *Improving peptide relative quantification in MALDI-TOF MS for biomarker assessment*. Proteomics, 2013. **13**(20): p. 2967-75.
47. Schlosser, G., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry of a combinatorial peptide library: effect of matrix composition on signal suppression*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(12): p. 1590-4.
48. Papagiannitsis, C.C., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a*

- reliable tool for direct detection of carbapenemase activity.* J Clin Microbiol, 2015. **53**(5): p. 1731-5.
49. Organization, W.H., *Multidrug and extensively drug-resistant TB.* 2010.
50. Zhang, Y. and W.W. Yew, *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis.* Int J Tuberc Lung Dis, 2009. **13**(11): p. 1320-30.
51. Hall, L., et al., *Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtiter plate format.* J Vis Exp, 2011(52).
52. Tortoli, E., et al., *Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion.* J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 607-10.
53. Ling, D.I., A.A. Zwerling, and M. Pai, *Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy.* Expert Rev Respir Med, 2008. **2**(5): p. 583-8.
54. Barnard, M., et al., *The diagnostic performance of the GenoType MTBDRplus version 2 line probe assay is equivalent to that of the Xpert MTB/RIF assay.* J Clin Microbiol, 2012. **50**(11): p. 3712-6.
55. Colman, R.E., et al., *Rapid Drug Susceptibility Testing of Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis Directly from Clinical Samples using Amplicon Sequencing: A Proof of Concept Study.* J Clin Microbiol, 2016.
56. Demirev, P.A., A.B. Feldman, and J.S. Lin, *Bioinformatics-based strategies for rapid microorganism identification by mass spectrometry.* Johns Hopkins Apl Tech Dig, 2004. **25**: p. 27-37.
57. Wynne, C., et al., *Top-down identification of protein biomarkers in bacteria with unsequenced genomes.* Anal Chem, 2009. **81**(23): p. 9633-42.
58. Majchrzykiewicz-Koehorst, J.A., et al., *Rapid and generic identification of influenza A and other respiratory viruses with mass spectrometry.* J Virol Methods, 2015. **213**: p. 75-83.

Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht

Jung, J. S., **Eberl, T.**, Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S., Wieser, A. (2014). *Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 2014, 33(6), 949-955.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Binding-Casette
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curv
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
CCI	Calculation of the correlation index
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DMEM	Dulbeco's modified Eagle medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EAEC	<i>Enteroaggregativer E. coli</i>
EHEC	<i>Enterohämorrhagischer E. coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasiver E. coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogener E. coli</i>
ETEC	<i>Enterotoxischer E. coli</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G	Gramm
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
4-HCCA	α-Cyano-4-hydroxymzimtsäure
HCl	Salzsäure

Hz	Herz
K	Kilo
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
l	Liter
μ	Mikro
M	Milli
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation
MDR	Multi-drug-resistant
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
min	Minute
MPCC	Minimal profile change concentration
3MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen drei der vier Antibiotikaklassen
4MRGN	Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen vier der vier Antibiotikaklassen
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
NAOH	Natronlauge
Ns	Nanosekunden
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Penicillinbindeprotein
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDR	Pan-drug-resistant
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	Stabel isotop labeling amino acid
TFA	Metalltrifluoracetat
TOF	Time of flight
V	Volt
XDR	Extended-drug-resistent

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau und Prinzip von MALDI-TOF MS (verändert nach [9]).....	3
Abbildung 2	Massenspektrum von <i>E. coli</i> mit Markierung ribosomaler Proteine.	5
Abbildung 3	Veränderung des Peak-Musters von Ampicillin (1) durch Hydrolyse (2) und anschließende Decarboxylierung (3).....	7
Abbildung 4	Spektren aus Medium N und H, native Peaks in grün und geshiftete in rot markiert.....	27
Abbildung 5	Mehrgipfliger Peak in Medium H.	28
Abbildung 6	Boxplot-Darstellung eines empfindlichen und resistenten Isolats.	29
Abbildung 7	Säulendiagramm eines empfindlichen und resistenten Isolats.	30
Abbildung 8	Repräsentativer Peak aus Medium H nach 0, 45, 90 und 240 min und aus Medium N zum Vergleich.	31
Abbildung 9	Resistente (1 und 2) und empfindliche (3 und 4) <i>P. aeruginosa</i> bei Ciprofloxacin-Konzentrationen von 30, 40 und 60 mg/l und einer Inkubationszeit von 3 h.	33
Abbildung 10	Repräsentative Spektren resistenter und empfindlicher <i>P. aeruginosa</i> -Isolate in Medium H und AB nach 90, 150 und 180 min.....	34
Abbildung 11	Meropenem-empfindlicher <i>P. aeruginosa</i> aus Medium AB, oben mit und unten ohne Vorinkubation ohne Lysin. Repräsentativer Peak in grün (nativ) bzw. rot (mit schwerem Lysin) markiert.	35
Abbildung 12	Empfindliche (1 und 2) und resistenter (3) <i>P. aeruginosa</i> ohne und mit Vorinkubation mit Meropenem, aber ohne Lysin.	35
Abbildung 13	Tag 1: SILAC-Assay von zwei empfindlichen und zwei resistenten <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten, jeweils von Blut- und MacConkey-Agar.....	36
Abbildung 14	Tag 2: Biologische Replikate der Isolate von Tag 1 (vgl. Abbildung 13).	36
Abbildung 15	Evaluierung der Protokolle mit den drei Antibiotika an je 15 sensiblen und 15 resistenten <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten, Ergebnisse aufgetragen gegen die jeweiligen MHK-Werte.....	38
Abbildung 16	SILAC-Assay aus Blutkulturflaschen, 5 empfindliche und 3 resistente <i>E. coli</i> , empfindlicher ATCC-Stamm als Referenz.....	39
Tabelle 1	Massenspektren der zur automatisierten Auswertung gewählten Peaks.	29
Tabelle 2	Zusammenstellung der durchgeführten Testparameterkombinationen.....	32
Tabelle 3	Vergleich verschiedener Testsysteme zum Nachweis von Resistenzen gegenüber β -Laktam-Antibiotika/Carbapenemen (Etest, PCR, β -Laktamase- und SILAC-Assay).	40

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Sören Schubert, für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und die fachliche sowie freundschaftliche Unterstützung.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. med. Jette Jung für ihre exzellente und professionelle Betreuung und die wertvollen Ratschläge, mit denen sie mir während der experimentellen Phase sowie beim Verfassen dieser Arbeit gleichsam intensiv zur Seite stand.

Spezieller Dank gilt allen Mitgliedern der Forschungsgruppe AG-Schubert und dem gesamten Team der klinischen Mikrobiologie des Max von Pettenkofer-Instituts für ihre Unterstützung, die vielen anregenden Diskussionen und unterhaltsamen gemeinsamen Stunden.

Meinen Dank möchte ich auch Frau Dr. rer. nat. Katrin Sparbier und Herrn Dr. rer. nat. Markus Kostrzewa für ihre bereitwillige Kooperation und Hilfestellung aussprechen.

Ich danke meinen Freunden für die Ermutigung zur Durchführung dieser Dissertation, für ihre hilfreichen Ratschläge und Anregungen, ebenso wie für die erholsamen Stunden zwischendurch.

Meiner Familie gebührt ganz besonderer Dank dafür, dass Sie mir meinen bisherigen Weg so selbstverständlich ermöglicht haben und mich dabei liebevoll begleiten.

Meine Schwester, Johanna Eberl, stand mir überdies beim Schreiben dieser Arbeit unermüdlich mit wertvollen Ratschlägen und Korrekturvorschlägen zur Seite, dafür bedanke ich mich sehr.

Ich danke meinen Eltern, dass sie nur das Beste für meine Schwestern und mich wünschen und immer bereit sind sich dafür einzusetzen.

Eidesstattliche Versicherung

Theresa Anna Eberl

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Schnelle Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels Massenspektrometrie und Isotop-Markierung am Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 26.07.2016