

Aus dem

Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Verbesserung der mikrobiologischen Urindiagnostik durch Einsatz von  
Durchflusszytometrie und schneller Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels  
MALDI-TOF Massenspektrometrie**

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

vorgelegt von  
Felix Neuenschwander

aus  
Zürich

Jahr  
2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Sören Schubert

Zweites Gutachten: Priv. Doz. Dr. Andreas Wieser

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Michael Vogeser

Promovierter Mitbetreuer: Priv. Doz. Dr. Matthias Klein

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2024

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Harnwegsinfektionen .....	1
1.1.1 Klinische Relevanz .....	1
1.1.2 Urindiagnostik .....	2
1.2 Möglichkeiten der Urinuntersuchung .....	3
1.2.3 Konventionelle Resistenztestung .....	3
1.3 MALDI-TOF MS .....	4
1.3.1 Erregeridentifikation .....	4
1.3.2 Antibiotikaresistenzbestimmung .....	5
1.4 Antibiotika .....	7
1.4.1 Resistenzlage .....	7
1.4.2 Verwendete Antibiotika .....	7
1.4.2.1 Fosfomycin .....	7
1.4.2.2 Fluorchinolone .....	8
1.4.2.3 Nitrofurantoin .....	8
1.4.2.4 Beta-Laktam-Antibiotika .....	9
1.4.2.5 Cotrimoxazol .....	10
1.5 Ziel der Arbeit .....	10
2. Material und Methoden .....	12
2.1 Material .....	12
2.1.1 Urine .....	12
2.1.2 Nährmedien .....	12
2.1.2.1 Agarplatten .....	12
2.1.2.2 Flüssigmedien .....	12
2.1.3 Verwendete Antibiotika .....	13
2.1.4 MHK-Teststreifen .....	13
2.1.5 Urinteststreifen .....	14

2.1.6 Chemikalien .....	14
2.1.7 Technische Ausstattung .....	15
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Voruntersuchung der Urinproben .....	17
2.2.1.1 Urinstix.....	17
2.2.1.2 Durchflusszytometrie .....	17
2.2.1.3 Neubauer-Zählkammer .....	19
2.2.2 MALDI TOF MS.....	19
2.2.2.1 Erregeridentifikation .....	19
2.2.2.2 MBT-ASTRA Assay .....	21
2.2.2.1 Aufbereitung der Urine und Inkubation.....	21
2.2.2.2 Vorbereitung der Messung.....	22
2.2.2.3 Massenspektrometrische Analyse der Proben .....	22
2.2.3 Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen.....	23
2.2.4 Konventionelle Antibiotikaresistenztestung.....	23
2.2.5 Datenauswertung .....	23
2.2.5.1 Sysmex.....	23
2.2.5.2 MBT-ASTRA Assay .....	24
3. Ergebnisse .....	26
3.1 Automatische Untersuchung der Urinproben .....	26
3.1.1 Untersuchte Urinproben .....	26
3.1.2 Ergebnisse der Kulturuntersuchung .....	27
3.1.3 Untersuchungen zur Leukozyturie .....	28
3.1.3.1 Vergleich der Leukozytenzählung mittels Durchflusszytometrie mit dem Goldstandard der manuellen Mikroskopie mittels Neubauer-Zählkammer .....	28
3.1.3.2 UC 3500 vs. manuelle Urinteststreifen-Ergebnisse .....	29
3.1.3.3 UF 5000 vs. UC 3500 .....	31

3.1.4 Untersuchung zum Zusammenhang zwischen der Leukozyturie und dem Erregernachweis .....	32
3.1.5 Bakterienzahl .....	40
3.1.6 Gram-Färbung.....	41
3.1.6 Zusammenfassung.....	44
3.2 Ergebnisse der Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS .....	45
3.2.1 Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen.....	47
3.2.2 Resistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay.....	48
3.2.2.1 Übersicht .....	48
3.2.2.2 Cefuroxim .....	53
3.2.2.3 Ciprofloxacin .....	54
3.2.2.4 Cotrimoxazol.....	55
3.2.2.5 Fosfomycin .....	56
3.2.2.6 Meropenem.....	58
3.2.2.7 Nitrofurantoin .....	59
3.2.2.8 Mischkulturen.....	59
3.2.2.9 Zusammenfassung .....	60
3.3 Zusätzliche Ergebnisse .....	61
3.3.1 Hemmstoffe und Bakteriennachweis in Kultur-negativen Urinproben .....	61
3.3.2 Einsparmöglichkeiten von Antibigrammen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	62
4. Diskussion.....	64
5. Zusammenfassung.....	81
Abbildungsverzeichnis.....	83
Bildquellen .....	85
Tabellenverzeichnis.....	85
Literaturverzeichnis .....	86
Danksagungen .....	93



## **1. Einleitung**

### **1.1 Harnwegsinfektionen**

#### **1.1.1 Klinische Relevanz**

Harnwegsinfekte stellen einen der häufigsten Gründe für einen Arztbesuch dar. Besonders oft sind Frauen betroffen, was zum einen an einer im Vergleich zum Mann kürzeren Urethra liegt und zum anderen an der anatomischen Nähe zum Analbereich, der als Erregerreservoir dient. (1) Zudem wirkt beim Mann das Prostatasekret antibakteriell. Laut einer Studie, die im Zuge einer Routinedatenanalyse unter Versicherten der Barmer GEK Krankenkassen durchgeführt worden ist, wurde 2013 bei ca. 430.000 Patientinnen (ungefähr 9 % aller weiblichen Versicherten ab 12 Jahren) die Diagnose akute Zystitis oder Harnwegsinfektion gestellt. Etwa 5 % der Versicherten erhielten deswegen eine Antibiotikaverordnung. (2) Die Wahrscheinlichkeit, an einer Harnwegsinfektion zu erkranken, steigt dabei mit dem Alter an. Auch die Kosten für die Behandlung von Harnwegsinfektionen sind sehr hoch. So wurden alleine in den USA 2011 rund 400.000 Patienten wegen eines Harnwegsinfektes im Krankenhaus behandelt, was zu Kosten von rund 2,8 Milliarden US-Dollar geführt hat. (3)

Klinisch unterscheidet man zwischen einem Infekt des oberen und des unteren Harntrakts und kompliziertem und unkompliziertem Harnwegsinfekt. Zu den unteren Harnwegsinfektionen zählen die Urethritis und die Zystitis, zu den oberen die Pyelonephritis. Die Unterscheidung zwischen unkompliziertem und kompliziertem Harnwegsinfekt wird auf Grund von vorhandenen anatomischen oder funktionellen Veränderungen, wie z.B. Nierensteine oder Ureterabgangsstenosen, Niereninsuffizienz oder Störungen des Immunsystems durch HIV oder einen schlecht eingestellten Diabetes mellitus getroffen.

Zu den Symptomen, die bei einem Harnwegsinfekt auftreten, gehören Pollakisurie, Algurie, verstärkte Nykturie, imperativer Harndrang, Makrohämaturie, suprapubische Schmerzen und eine Trübung des Urins. Bei einer Zystitis hat man in der Regel kein oder nur leichtes Fieber, während ein ascendierender Infekt mit Pyelonephritis mit

Fieber über 38 °C und Flankenschmerzen einhergeht. Als Folge der Pyelonephritis kann sich eine Urosepsis entwickeln. (1)

### 1.1.2 Urindiagnostik

Harnwegsinfektionen werden vor allem durch Gram-negative Bakterien aus der Ordnung der Enterobacterales verursacht. An erster Stelle steht dabei *Escherichia coli*, gefolgt von *Proteus mirabilis* und *Klebsiella pneumoniae*. Auch Gram-positive Erreger wie *Staphylococcus saprophyticus* und Enterokokken lassen sich als Verursacher von Harnwegsinfektionen finden. Um eine genaue Bestimmung der Erregerzahl zu ermöglichen, wird in der Urindiagnostik ein definiertes Volumen (z.B. 100 µL) der eingehenden Urinproben auf Frischblutagarplatten ausplattiert. Zusätzlich streicht man den Urin auf MacConkey Agar und Columbia CNA Blutagar aus, um selektiv Gram-negative bzw. Gram-positive Bakterien zu kultivieren. Bei Bedarf wird ein Hemmstofftest auf einer mit *Bacillus subtilis* beimpften Platte durchgeführt. Danach werden alle Platten für 24 Stunden inkubiert. Ist nach dieser Zeit ein Erreger auf der Platte gewachsen, wird er mittels MALDI-TOF Analyse identifiziert. Handelt es sich um einen potenziell krankmachenden Erreger, erfolgt anschließend eine maschinelle Antibiotika-Resistenzbestimmung. Das Ergebnis des Antibiogramms liegt dann am nächsten Tag vor. Nach 48 Stunden werden die am ersten Tag angelegten Platten nochmals auf Wachstum hin geprüft und es wird ggf. eine Erregeridentifikation und eine Antibiotika-Resistenztestung durchgeführt.

Abgesehen von der Erregeridentifikation und dem Antibiogramm spielt in der mikrobiologischen Urindiagnostik die Bestimmung der Leukozyturie im Zusammenhang mit der Bakterienzahl eine immer wichtigere Rolle. Bisher war nur die Bakterienzahl und hier vor allem die als Kass'sche Zahl (4) bezeichnete Erregerkonzentration von  $10^5$  Koloniebildende Einheiten (KBE) pro Milliliter ein Maß zur Beurteilung über das Vorliegen eines Harnwegsinfekts. Sowohl Oyaert et al. in der BILULU Studie (5) als auch die neue Leitlinie zur mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätssicherung (6) enthalten Vorgehensschemata, die für die Bestimmung eines Antibiogramms auch die Beurteilung der Leukozyturie miteinbeziehen. Dafür sollte der Urin möglichst zeitnah entweder durch Teststreifen, mittels Zählkammer oder automatisch durch durchflusszytometrische oder digitalmorphologische Verfahren bestimmt werden. Das Ausmaß der Leukozyturie lässt dann auch ein



unterschiedliches Verfahren bei den gefundenen Erregern zu, in Abhängigkeit davon, wie pathogen die Erreger sind. Eine genaue Unterscheidung zwischen dem Vorliegen einer Harnwegsinfektion und einer Kontamination der vorliegenden Urinprobe ist wichtig, um keine falsche Behandlungsindikation insbesondere mit Antibiotika zu stellen. Insgesamt dauert die mikrobiologische Untersuchung von Urinen vom Eingang der Probe bis zum fertigen Antibiogramm 48 Stunden. Deswegen werden neue Verfahren erprobt, um diese Zeit zu verkürzen.

## **1.2 Möglichkeiten der Urinuntersuchung**

Eine schnelle und einfache Methode zur Untersuchung von Urinen stellen die Urinteststreifen dar. Hierbei ist eine Untersuchung von pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin und Blut im Urin möglich. Es gibt sowohl die Möglichkeit, diese Untersuchung manuell durchzuführen, als auch ein automatisiertes Verfahren zu verwenden. Hierbei erfolgt dann eine optische Auswertung des Tests, z.B. über einen CMOS-Sensor beim UC 3500 der Firma Sysmex. Aus mikrobiologischer Sicht sind von diesen Parametern vor allem, wie bereits erwähnt, die Leukozyten interessant, ebenso wie das Nitrit, da viele Erreger, die Harnwegsinfektionen verursachen, in der Lage sind, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Des Weiteren kann auch eine durchflusszytometrische Untersuchung zur Bestimmung der Leukozyten- und Bakterienzahl im Urin durchgeführt werden, um einen Rückschluss auf eine mögliche Infektion des Patienten zu ziehen. Durchflusszytometer wie der in dieser Studie eingesetzte UF 5000 der Firma Sysmex ermöglichen zusätzlich eine Beurteilung des Gram-Verhaltens der gefundenen Bakterien.

### **1.2.3 Konventionelle Resistenztestung**

Bei der konventionellen Antibiotikaresistenztestung gibt es unterschiedliche Arten der Durchführung. Neben manuellen Ansätzen auf Agarplatten stehen inzwischen auch automatisierte Systeme für die Resistenztestung zur Verfügung.

Mit Hilfe des Gradientendiffusionstests kann der MHK-Wert (minimale Hemmkonzentration) eines Erregers bestimmt werden. Dazu wird auf einer Agarplatte eine Keimsuspension in einer definierten Konzentration aufgetragen (McFarland Standard 0,5) und ein MHK-Teststreifen aufgelegt. Dieser ist mit einen

Konzentrationsgradienten des zu testenden Antibiotikums beschickt. Nach erfolgter Inkubation der Agarplatte für 12- 18 h kann an der unteren Schnittstelle des elliptischen Hemmhofs mit dem Teststreifen die MHK auf der aufgezeichneten Skala des Teststreifens abgelesen werden. Um den Keim als sensibel oder resistent zu klassifizieren, wird dieser Wert dann mit den klinischen Grenzwerten für MHK-Werte in Tabellen des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (7) verglichen (8). Das EUCAST stellt dabei den europäischen Standard für die mikrobielle Antibiotikaresistenztestung dar. Dieses Testverfahren wurde auch in der vorliegenden Studie verwendet.

Auch mit einem Agardiffusionstest kann man eine Antibiotikaresistenzbestimmung durchführen, allerdings ist eine Aussage über die MHK im Gegensatz zu MHK-Teststreifen nicht möglich. Nach dem Auftragen der Bakteriensuspension werden antibiotikahaltige Filter-Plättchen auf die Platte gelegt. Nach der Inkubation sieht man durch die Diffusion des Antibiotikums einen Hemmhof um das Plättchen, dessen Durchmesser ausgemessen werden kann. Auch dieser wird mit entsprechenden klinischen Hemmhof-Durchmesser-Grenzwerten des EUCAST verglichen und anhand dieser beurteilt.

Neben diesen manuellen Verfahren gibt es auch automatische Verfahren zur Bestimmung der Antibiotikaresistenzen. Mittels einer photometrischen Auswertung wird das Bakterienwachstum in Anwesenheit verschiedener Antibiotikakonzentrationen in einzelnen Kavitäten eines Trägers bestimmt und daraus ein MHK-Bereich festgelegt.

## **1.3 MALDI-TOF MS**

### **1.3.1 Erregeridentifikation**

Früher wurden die Erreger anhand ihrer biochemischen und enzymatischen Eigenschaften mit Hilfe einer bunten Reihe identifiziert. Dabei werden die Bakterien für bis zu 24 Stunden in Differentialmedien inkubiert. Stoffwechselprodukte der Bakterien führen dann über eine Veränderung des pH-Werts mittels eines Indikators zu einem Farbumschlag. Des Weiteren können die zugegebenen Substrate auch über eine Wirkung von bakteriellen Enzymen direkt zu einer Farbänderung führen. Anhand von

Referenztabellen kann der Erreger schließlich identifiziert werden (8). Die Einführung der MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*) hat die Identifikation von Erregern in der Mikrobiologie stark verändert. Diese ist nun über den Nachweis und die Massenbestimmung ribosomaler Proteine der Bakterien möglich innerhalb von weniger als 10 Minuten kann so nach vorhergehender kultureller Anzucht der Bakterien eine Bestimmung der Erreger durchgeführt werden. (8)

### 1.3.2 Antibiotikaresistenzbestimmung

Auf Grund der steigenden Antibiotikaresistenzen wird zunehmend nach schnelleren Methoden zur Bestimmung von Resistenzen gesucht. Da viele mikrobiologische Labore die MALDI-TOF MS zur schnellen Identifikation von Erregern verwenden, bietet es sich an, sie auch zur Resistenzbestimmung einzusetzen. Dafür haben sich in letzter Zeit vier Ansätze besonders bewährt.

Ein Ansatz, Resistenzen von Erregern mit Hilfe von MALDI-TOF MS nachzuweisen, ist es, genetische Unterschiede festzustellen und damit resistenzvermittelnde Proteine zu detektieren. So kann zum Beispiel bei *Bacteroides fragilis* zwischen zwei unterschiedlichen Genomovaren unterschieden werden, wobei einer das Gen *cfiA* trägt, welches eine Beta-Laktamase (Carbapenemase) kodiert. Es lässt sich zwar nicht zwingend aus dem Vorhandensein des Gens auf dessen Expression des Proteins schließen, aber dennoch besteht die Gefahr einer sehr schnellen Resistenzentwicklung unter Antibiotikaeinsatz (9, 10). Des Weiteren ist es mit Hilfe der MALDI-TOF MS möglich, bestimmte Vancomycin-resistente Enterokokken zu identifizieren. So gelingt es, mit Hilfe der Datenbank zur Erregeridentifikation zwischen *vanB*-positiven und -negativen Enterokokken-Stämmen zu unterscheiden (11).

Der Beta-Laktamase Assay wurde entwickelt, um schnell direkt die Anwesenheit einer Beta-Laktamase nachzuweisen. Hierfür wurde die Detektion von Abbauprodukten von Beta-Laktam-Antibiotika zu Hilfe genommen. Bei der Hydrolyse des Antibiotikums kommt es durch das Hinzufügen von Wasser zu einer Verschiebung des Masse-Signals/Masse-Spitzen-signals (mass-shift) von +18 Da. Anschließend kann das Zwischenprodukt spontan decarboxylieren, wobei es durch die Abspaltung von CO<sub>2</sub> zu einer mass shift von -44 Da kommt. Diese Verschiebungen lassen sich mittels der Massenspektrometrie leicht nachweisen. Für die Resistenztestung werden Bakterien

für bis zu 3 Stunden mit einem Beta-Laktam-Antibiotikum inkubiert und 1  $\mu\text{L}$  des Ansatzes auf ein MALDI-Target gegeben und mit Matrix überschichtet. Nach der Messung der Spektren mit MALDI-TOF MS erfolgt ein Vergleich mit bekannt sensiblen und resistenten Kontroll-Stämmen ( $\beta$ -Laktamase-Produzenten) und daraus wird dann auf die vorhandene  $\beta$ -Laktamase-Aktivität geschlossen. (12) Erste Ergebnisse können je nach Beta-Laktamase bzw. Carbapenemase auch schon nach einer Stunde Inkubation erhoben werden. Dieser Assay beschleunigt die Resistenztestung sehr, hat aber den Nachteil, dass eine Resistenz gegen Beta-Laktam-Antibiotika, die auf einem anderen Resistenzmechanismus, zum Beispiel veränderte Porine oder Efflux, beruht, nicht erkannt wird (12, 13). Auch werden Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika-Klassen nicht detektiert.

Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Assays kann man mit Hilfe der *stable isotope labeling*-Methode Bakterien auf Grund ihres Stoffwechsels phänotypisch auf Resistenzen gegen theoretisch alle Antibiotika testen. Dieser Methode liegt SILAC (*stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*) zu Grunde, wobei als Aminosäure für dieses Test Lysin ausgesucht wurde. Für die Bestimmung erfolgten in unserer Arbeitsgruppe jeweils drei Ansätze, wobei einer „normales“ Lysin enthält, der zweite z.B.  $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ -L-Lysin und der dritte  $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ -L-Lysin und zusätzlich das zu untersuchende Antibiotikum.  $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ -L-Lysin ist ein schweres, nicht radioaktives Isotop. Die Spektren der einzelnen Ansätze werden untersucht und miteinander verglichen. Wird schweres Lysin in die Proteine eingebaut, kommt es zu einem mass shift von jeweils +8 Da pro eingebautes schweres Lysin. Wird in dem mit Antibiotika versetzten Ansatz ein *mass shift* detektiert und gleicht daher das Spektrum dem Ansatz mit dem schwereren Lysin, ist eine Resistenz anzunehmen, da die Bakterien in der Lage waren, weiterhin neue Proteine aufzubauen. Gleicht das Spektrum dem Ansatz mit normalem Lysin, ist davon auszugehen, dass es sich um schon vor der Inkubation hergestellte Proteine handelt und das Antibiotikum den Aufbau neuer Proteine erfolgreich gehemmt hat. Dann ist das Bakterium sensibel gegenüber dem zugegebenen Antibiotikum. Der Ansatz mit normalem Lysin kann darüber hinaus auch zur Identifikation des Keims verwendet werden (14, 15).

Bei dem MBT-ASTRA Assay (MALDI Biotyper *antibiotic susceptibility test rapid assay*), der in dieser Arbeit verwendet wurde, handelt es sich auch um einen phänotypischen Ansatz zur Bestimmung von Antibiotikaresistenzen, der auf der Semiquantifizierung

der Proteine von Bakterien beruht, die in Gegenwart und in Abwesenheit eines Antibiotikums in einem Flüssigmedium angezüchtet werden. Hierbei können gleichzeitig eine Erregeridentifikation und eine Antibiotikaresistenztestung stattfinden. Dieser Testansatz wird im Methodenteil unter 2.2.2 genauer beschrieben.

## **1.4 Antibiotika**

### **1.4.1 Resistenzlage**

Insgesamt lässt sich eine Zunahme der Resistenzen von Erregern, die man bei Harnwegsinfektionen isoliert, feststellen. Da 15 % der in der Praxis verschriebenen Antibiotika für die Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt werden, ist dies ein wachsendes Problem (16). Bezüglich der Resistenzraten unkomplizierter Harnwegsinfektionen in 5 europäischen Ländern zeigte sich bei Kahlmeter et al. (17) in den Jahren 2007-2008 im Vergleich zum ECO.SENS Projekt (18) aus den Jahren 1999-2000 ein signifikanter Anstieg für Ciprofloxacin (von 1,1 % auf 3,9 %), Cotrimoxazol (von 12,3 % auf 16,1 %) und Trimethoprim (von 13,1 % auf 16,7 %). In einer Fortführung der Studie (19) hat sich für Deutschland in Jahre 2014 im Vergleich zur ursprünglichen Studie ein Anstieg der Resistenzraten für Ciprofloxacin (von 2,2 % auf 20,2 %), Cefadroxil (von 1,4 % auf 12,0 %) und Trimethoprim (von 22,5 % auf 36,8 %) ergeben. Allgemein bestehen starke regionale Unterschiede bezüglich der Prävalenz einzelner Antibiotikaresistenzen (18).

### **1.4.2 Verwendete Antibiotika**

Im Folgenden werden einige Antibiotika beschrieben, die in den Leitlinien zu Harnwegsinfektionen (1) für die Therapie empfohlen werden und auch in dieser Studie verwendet worden sind.

#### *1.4.2.1 Fosfomycin*

Fosfomycin ist ein bakterizid wirkendes Antibiotikum, das die Zellwandsynthese hemmt, indem es zu einer Inaktivierung des Enzyms Enol-Pyruvyl-Transferase führt. Dieses Enzym stellt einen wichtigen frühen Schritt in der Peptidoglykan-Synthese dar (20). Fosfomycin wird als ein Mittel der ersten Wahl bei einem unkomplizierten

Harnwegsinfekt empfohlen. Als orale Therapie ist bei einem unkomplizierten Harnwegsinfekt oft eine Einmalgabe von Fosfomycin, das in oraler Form in Kombination mit Trometamol versetzt wird, ausreichend. Noch finden sich bei den Erregern nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz (ca. 1,5 %) Resistenzen. Die Selektion von resistenten Bakterien wird durch die hohen Wirkkonzentrationen im Urin unterbunden. Des Weiteren wachsen resistente Stämme durch einen veränderten Glycophosphat-Transporter langsamer als empfindliche (1). Es gibt drei wichtige Resistenzmechanismen, die entweder auf einer Erniedrigung der Permeabilität in die Bakterienzelle beruhen, oder einer Veränderung der Bindestelle von MurA durch Mutation, wodurch Fosfomycin nicht mehr binden kann, oder der Bildung von Enzymen, die den Epoxid-Ring des Antibiotikums angreifen (21).

#### 1.4.2.2 Fluorchinolone

Fluorchinolone sind Gyrase-Hemmer, die eine bakterizide Wirkung gegen Bakterien aufweisen. Auf Grund ihrer Interaktion mit der DNA-Gyrase und DNA-Topoisomerase IV wird die Replikation der DNA gestört. Diese Enzyme führen zu einem negativen Supercoiling und entwinden die DNA, mit dem Ergebnis einer besseren Ablesbarkeit der DNA. Zur Behandlung von Harnwegsinfektionen kommt u.a. Ciprofloxacin zum Einsatz, das wir auch in unseren Versuchen getestet haben. Bei einer unkomplizierten Zystitis sind Fluorchinolone nicht mehr Mittel der ersten Wahl, sondern sollten als Breitband-Antibiotika speziellen Indikationen vorbehalten werden. So sind sie weiterhin Mittel der ersten Wahl zur Behandlung bei einer Pyelonephritis. Als Ersatz bei Versagen der Erstlinien-Therapie sind sie dennoch auch bei Harnwegsinfektionen in Betracht zu ziehen (1, 20). Enterobakterien weisen zudem eine zunehmende Resistenz gegen Fluorchinolone auf. Ein wichtiger Resistenzmechanismus beruht dabei auf chromosomal erworbenen Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC*, die die beiden Zielenzyme von Fluorchinolonen kodieren. Dabei sind mehrere Mutationen nötig, um eine starke Resistenz zu verursachen, während nur eine lediglich zu einem leicht erhöhten MHK-Wert für Ciprofloxacin führt (22).

#### 1.4.2.3 Nitrofurantoin

Nitrofurantoin gehört zu der Gruppe der Nitrofurane und wirkt über eine Hemmung des Kohlenhydratstoffwechsels der Zellen vorwiegend bakteriostatisch. Auf Grund sehr

niedriger Resistenzraten ist Nitrofurantoin in der Leitlinie zu der unkomplizierten Zystitis als ein Mittel der Wahl bei Frauen ohne Begleitkrankheiten aufgeführt (1, 20, 23). Durch Mutation von Nitroreduktasen, die entweder Sauerstoff-sensitiv oder -unsensitiv sind, können Resistenzen gegen Nitrofurantoin entstehen. Diese Enzyme werden auf den Genen *nfsA* und *nfsB* kodiert. Des Weiteren kann ein erhöhter Efflux des Antibiotikums zu einer Resistenz führen (24).

#### 1.4.2.4 Beta-Laktam-Antibiotika

Beta-Laktam-Antibiotika erzielen ihre auf proliferierende Zellen bakterizide Wirkung durch die Hemmung der Peptidoglykan-Synthese, die ein wichtiger Schritt im Aufbau der bakteriellen Zellwand darstellt. Diese Hemmung erfolgt durch Bindung an die Penicillin-Bindeproteine, zu denen Transpeptidasen, Carboxypeptidasen und Endopeptidasen gehören. In der Therapie der Harnwegsinfekte spielt die Gabe von Aminopenicillinen ohne Beta-Laktamase-Inhibitor keine Rolle in der empirischen Therapie, weil Resistenzen zu häufig auftreten (1). In dieser Arbeit werden deshalb Amoxicillin/Clavulansäure bzw. Ampicillin/Sulbactam verwendet. Beta-Laktamase-Inhibitoren wirken, indem sie zuerst kompetitiv an die Beta-Laktamase binden und dann gespalten werden. Die entstandenen Produkte wirken danach im Sinne einer Suizidhemmung (23). Außerdem stehen mit den Cephalosporinen (z.B. Cefuroxim) und Carbapenemen (z.B. Meropenem) weitere Beta-Laktam-Antibiotika zur Verfügung. Diese Substanzen zeichnen sich durch ihre unterschiedliche Unempfindlichkeit gegenüber Beta-Laktamasen aus. Immer häufiger lassen sich Bakterien nachweisen, die  $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Wirkspektrum (Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen, ESBL) produzieren. Diese ESBL führen bei den Bakterien zu einer Resistenz gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen der 3. und teilweise auch 4. Generation sowie gegen Monobaktame. Dabei spalten sie die Antibiotika durch Hydrolyse. Bei *E. coli*-Stämmen mit ESBL ist der CTX-M-Typ (Ambler Klasse A) dominierend, die meistens Plasmid-kodiert vorliegen. Als Therapieoption bleiben dann Carbapeneme oder andere Reserveantibiotika, wobei die Resistenz gegenüber Beta-Laktamase-Inhibitoren von der Art der ESBL abhängt. (22, 25).

Seit 2016 ist für die unkomplizierte Zystitis der Frau in Deutschland Pivmecillinam zugelassen und zeichnet sich durch sehr niedrige Resistenzraten aus (1). Pivmecillinam ist ein Prodrug und wird mit Hilfe von Esterasen durch die Hydrolyse

einer Esterbindung und über einen nicht stabilen Alkohol in Mecillinam umgewandelt. Das Antibiotikum, welches eine besonders gute Aktivität gegen *E. coli* hat, greift dabei hauptsächlich das PBP2 an. Von besonderem Vorteil ist bei Mecillinam die Wirksamkeit gegen ESBL-produzierende Erreger, vor allem vom Typ CTX (26, 27).

#### 1.4.2.5 Cotrimoxazol

Die Kombination aus Trimethoprim und dem Sulfonamid Sulfamethoxazol wirkt bakteriostatisch und auf einige Erreger auf Grund des Synergismus beider Substanzen auch bakterizid dadurch, dass die Produktion der Tetrahydrofolsäure gehemmt wird, die die Bakterien für die DNA- und RNA-Synthese brauchen. Dabei werden die Dihydrofolatreduktase von Trimethoprim und die Dihydropteroat-Synthetase von Sulfonamid gehemmt (23). Trotz gestiegener Resistenzraten kann es bei lokalen Resistenzraten unter 20 % zur empirischen Therapie bei ambulanten Patienten verwendet werden (1). Neben einer Veränderung der Enzyme und daraus resultierender geringerer Affinität des Antibiotikums zum Zielenzym gibt es Bypass-Effekte, die zu Resistenzen führen. Durch eine Mutation in der Promotorenregion der Enzyme können die Zielenzyme in größerer Menge produziert werden, wodurch die Wirkung des Antibiotikums nicht mehr ausreichend groß ist. (22)

## 1.5 Ziel der Arbeit

Harnwegsinfektionen sind sehr häufige Erkrankungen, bei denen oft Antibiotika verschrieben werden (1). Auf Grund der zunehmenden Antibiotika-Resistenz der Bakterien ist es sehr wichtig, schnell einen Erregernachweis und ein Antibiogramm zur Verfügung zu stellen. Dadurch könnte schneller von einer kalkulierten auf eine gezielte Therapie umgestellt oder die Behandlung sogar direkt mit einer gezielten Therapie gestartet werden. Außerdem sollte es ein Ziel sein, dass im Labor zeitnah und zuverlässig bei Erregernachweis im Urin eine Kolonisierung/Kontamination von einer Infektion unterschieden werden kann, um unnötige Antibiotika-Testungen und damit -Therapien zu verhindern.

Im ersten Teil der Arbeit gehen wir der Frage nach, welchen Einfluss die Verwendung von automatisierten Urinanalysegeräten auf die mikrobiologische Diagnostik von Harnwegsinfektionen hat, in dem Leukozyten-Nachweise helfen, Urine mit



Infektionserreger von solchen mit Kontaminationen und Kolonisationen zu unterscheiden. Hierzu wird das vollautomatische klinisch-chemische Urinanalysesystem UC 3500 mit dem Durchflusszytometer UF 5000 der Firma Sysmex verglichen und untersucht, ob eine Übereinstimmung der Ergebnisse der Leukozytenzahl und des Nitrit-Nachweis mit manuellen Analysemethoden besteht. Zusätzlich soll durch einen Vergleich mit dem kulturellen Ergebnis der Zusammenhang zwischen einer Leukozyturie und Nachweis von Bakterien im Urin (Bakteriurie) untersucht werden. Durch den Nachweis von Leukozyturie kann eine genauere Identifikation von Harnwegsinfekten gelingen. Dies würde es ermöglichen, unnötige Antibiotikaresistenztestungen zu vermeiden und auf aus Laborsicht notwendige Fälle zu begrenzen und so die Anzahl nicht indizierter Antibiotika-Therapien bei Verdacht auf Harnwegsinfektion zu reduzieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob mit Hilfe von MALDI-TOF MS und dem MBT-ASTRA Assay eine Resistenztestung direkt aus dem Patientenurin möglich ist und ein Antibiogramm nach einer Kurzzeit-Inkubation von nur 2,5 Stunden erstellt werden kann. Auf Grund der herausragenden Bedeutung Gram-negativer, schnellwachsender Bakterien als Ursache von Harnwegsinfektionen haben wir uns auf diese konzentriert. Es wurden nur Urine in die Studie aufgenommen, die in der Voruntersuchung entweder mit dem Combur Urinteststreifen oder dem vollautomatischen klinisch-chemischen Urinanalysesystem UC 3500 eine Leukozyturie aufwiesen und/oder Nitrit-positiv waren oder in der Durchflusszytometrie mit dem Sysmex UF 5000 eine Leukozyturie und Gram-negative Bakterien aufwiesen. Dadurch, dass die Resistenztestungen direkt aus dem Urin vorgenommen und die Ergebnisse innerhalb desselben Tages an den einsendenden Arzt übermittelt werden können, wäre es möglich, bei Harnwegsinfekten gleich eine gezielte Antibiotikatherapie einzuleiten und nicht wie bis jetzt erst mit einer empirischen Therapie zu beginnen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Urine**

Die untersuchten Urine stammen aus Restvolumina anonymisierter Urinproben der mikrobiologischen Diagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts. Nachdem die Urine die Routinediagnostik durchlaufen haben, wurden sie von mir, wie im Methodenteil unter 2.2.1 beschrieben, voruntersucht und für die Antibiotikaresistenzbestimmung vorbereitet. Das eingehende Probenmaterial wird in Urin-Monovetten (Firma Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland), die mit 15 mg Borsäure pro mL Urin (entspricht 1,5 %) präpariert sind, transportiert.

#### **2.1.2 Nährmedien**

##### *2.1.2.1 Agarplatten*

Die Resistenzbestimmung erfolgt mittels MHK-Teststreifen auf Müller-Hinton II Agarplatten (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). BD Columbia Agar mit 5 % Schafsblut (BD, Heidelberg, Deutschland) wird verwendet, um eine Kultivierung der Erreger für die konventionelle Resistenztestung und zur Archivierung zu erreichen. Einzelne Fälle erfordern zusätzlich den Einsatz von BD MacConkey II Agar (Fa. Becton Dickinson).

##### *2.1.2.2 Flüssigmedien*

Für die Inkubation der Erreger direkt aus dem Urin wird BD Phoenix AST Broth (Fa. Becton Dickinson) benutzt. Zur Archivierung der Erreger wird Einfriermedium auf Glycerin-Basis verwendet. Die Voruntersuchungen finden mit artifiziellem Urinmedium statt. (28)

### 2.1.3 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Cefuroxim	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Langenhagen, Deutschland)
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Langenhagen, Deutschland)
Cotrimoxazol	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Fosfomycin	INFECTOPHARMA Arzneimittel und Consilium GmbH (Heppenheim, Deutschland)
Meropenem	Hikma Pharma GmbH (Planegg, Deutschland)
Nitrofurantoin	SIGMA-ALDRICH Co. (St. Louis, Missouri, USA)

Tab. 1: Verwendete Antibiotika

### 2.1.4 MHK-Teststreifen

MHK-Teststreifen	Hersteller
Cefuroxim	Liofilchem S.r.l., (Roseto degli Abruzzi (TE), Italien)
Ciprofloxacin	Liofilchem S.r.l., (Roseto degli Abruzzi (TE), Italien)
Cotrimoxazol	Liofilchem S.r.l., (Roseto degli Abruzzi (TE), Italien)
Fosfomycin	Liofilchem S.r.l., (Roseto degli Abruzzi (TE), Italien)
Meropenem	Liofilchem S.r.l., (Roseto degli Abruzzi (TE), Italien)
Nitrofurantoin	Liofilchem S.r.l., (Roseto degli Abruzzi (TE), Italien)

Tab. 2: MHK-Teststreifen

### 2.1.5 Urinteststreifen

Urinteststreifen	Hersteller
Meditape™ UC-9A	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Cobas 9 Test®	F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)

Tab. 3: Urinteststreifen

### 2.1.6 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	J.T. Baker, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
Ameisensäure	SIGMA-ALDRICH Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Cellclean® U	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Interner ASTRA Standard	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Trifluoressigsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
UF-Cellpack™ CR	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
UF-Cellpack™ SF	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
UF-Cellsheath™	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
UF-Fluorocell™ CR	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)

Chemikalie	Hersteller
UF-Fluorocell™ SF	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Wasser, ROTISOLV® HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
α-Cyano-4-hydroxymzimtsäure (α-HCCA)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)

Tab. 4: Chemikalien

### 2.1.7 Technische Ausstattung

Gerät/Software	Name und Hersteller
Autoklav	Laboklav 160-MSLV; SHP Steriltechnik (Detzel, Deutschland) VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 500EC; Thermo Electron LED GmbH (Ismaning, Deutschland)
Datenverarbeitung	MS Office 10; Microsoft (Redmond, Washington, USA) flexControl Version 3.4; Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland) flexAnalysis 3.4; Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Durchflusszytometer	UF-5000; Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Gefrierschänke (- 20 °C)	Comfort; Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland) Profi Line; Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Inkubatoren	Heraeus T12; Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland)
Kühlschränke	Profi Line; Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
MALDI-TOF MS	Microflex LT Tischgerät mit Stickstofflaser; Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Mikroskop	Axiovert 25; Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

Gerät/Software	Name und Hersteller
Photometer	Ultrospect 3100 pro; Amersham Biosciences (General Electric; Fairfield, Connecticut, USA)
Photometerküvetten	SEMI-MICRO-CUVETTE; Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Schüttelinkubator	Thermomixer comfort; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Thermomixer compact; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Sartorius Certomat R; Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Vollautomatisches klinisch-chemisches Urinanalysesystem	UC-3500; Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Vortex Tischschüttler	7-2020; neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer; Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Zentrifugen	5417R; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Megafuge 1.0; R Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland)

Tab. 5: Technische Ausstattung

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Voruntersuchung der Urinproben

Der MBT-ASTRA Assay wird als MALDI-TOF-basierter Schnelltest zur Resistenzbestimmung von Erregern aus Urinen eingesetzt. Um diesen Test sinnvoll und effizient zu verwenden, wird eine Vorauswahl vorgenommen, weil viele Urine keine (pathogenen) Erreger enthalten. Diese Vorauswahl erfolgt sowohl mit manuellen wie auch automatischen Untersuchungsmethoden innerhalb von 2 Stunden nach Eingang der Urinproben. Als Auswahlkriterien dienen neben dem Nachweis von Nitrit und Leukozyten die Quantifizierung der Bakterienzahl und das Gram-Färbeverhalten der in der Urinprobe nachgewiesenen Bakterien. Ziel ist es, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die Urine von Patienten mit einem durch Gram-negative Erreger verursachten Harnwegsinfekt zu selektieren (29).

#### 2.2.1.1 *Urinstix*

Die Untersuchung des Urins mit einem Urinteststreifen ist eine schnelle Methode, um den pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin und Blut im Urin zu erfassen. Dazu wird ein Teststreifen mit Urin benetzt und anschließend die Farbreaktion auf den Testfeldern mit der Referenz verglichen und beurteilt. Es gibt sowohl die Möglichkeit, diese Untersuchung manuell durchzuführen, als auch ein automatisiertes Verfahren zu verwenden. Hierbei erfolgt eine optische Auswertung des Testresultats, z.B. über einen CMOS-Sensor beim UC 3500 der Firma Sysmex. Für die manuelle Urinstix-Untersuchung wird im klinischen Alltag häufig der Urin-Teststreifen Combur 9 (F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, Schweiz) benutzt. Dieser wird in den Urin eingetaucht und nach ca. 2 Minuten die Farbveränderung auf den Testfeldern mit der Referenz des Herstellers verglichen.

#### 2.2.1.2 *Durchflussszytometrie*

Die Durchflussszytometrie (Abb. 1) erlaubt die Untersuchung der Urine auf Leukozyten, Bakterien, Hefen, Erythrozyten, Epithelzellen und Kristalle. Es stehen zwei Messkanäle zur Verfügung. Der Kernkanal (CR) dient dazu, nukleinhaltige Partikel, wie z.B. Bakterien oder Leukozyten, zu erkennen. Hier werden die Zellwände mit

einem Verdünnungsreagenz perforiert, damit anschließend fluoreszierende Farbe in den Zellkern gelangen kann. Im Oberflächenkanal (SF) dagegen werden die Zellwände von Partikeln wie rote Blutkörperchen, die nicht nukleinhaltig sind, ohne vorherige Perforation mit Fluoreszenzfarbstoffen eingefärbt. In der Durchflusszelle erfolgt eine hydrodynamische Fokussierung der zu untersuchenden Partikel, damit eine Beurteilung einzelner Partikel möglich ist. Danach passieren die Partikel einen Laser, wobei es zu einer Streuung des Lichts kommt. Der eingesetzte UF 5000 verwendet einen blauen Laser (488 nm). Das Streulicht wird anschließend mit Detektoren erfasst. Zur Beurteilung der Größe der Partikel wird das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) eingesetzt. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) zeigt die intrazelluläre Komplexität und das Seitwärtsfluoreszenzlicht den Nukleinsäuregehalt an. Durch die Fluoreszenzmarkierung erhält man mit dem Seitwärts-Fluoreszenzlicht zusätzliche Informationen über das Zellinnere und die Zellmembran, die eine Unterscheidung zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ermöglichen. Dabei kann in Gram-positive Zellen auf Grund der Zellwandbeschaffenheit, z.B. dickere Peptidoglykan-Hülle, weniger fluoreszierende Farbe in die Bakterien eindringen. Dies führt zu einem verringerten Signal des Seitwärtsstreulichts im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien und es steht so mehr Laserenergie für die Vorwärtsstreuung zur Verfügung. Dies führt zusammen mit der Reflexion von Photonen an der dickeren Zellwand zu einem stärkeren Signal des Vorwärtsstreulichts. In Scattergrammen werden dann die einzelnen Partikel, die nach den oben genannten Parametern charakterisiert wurden, dargestellt. (30)



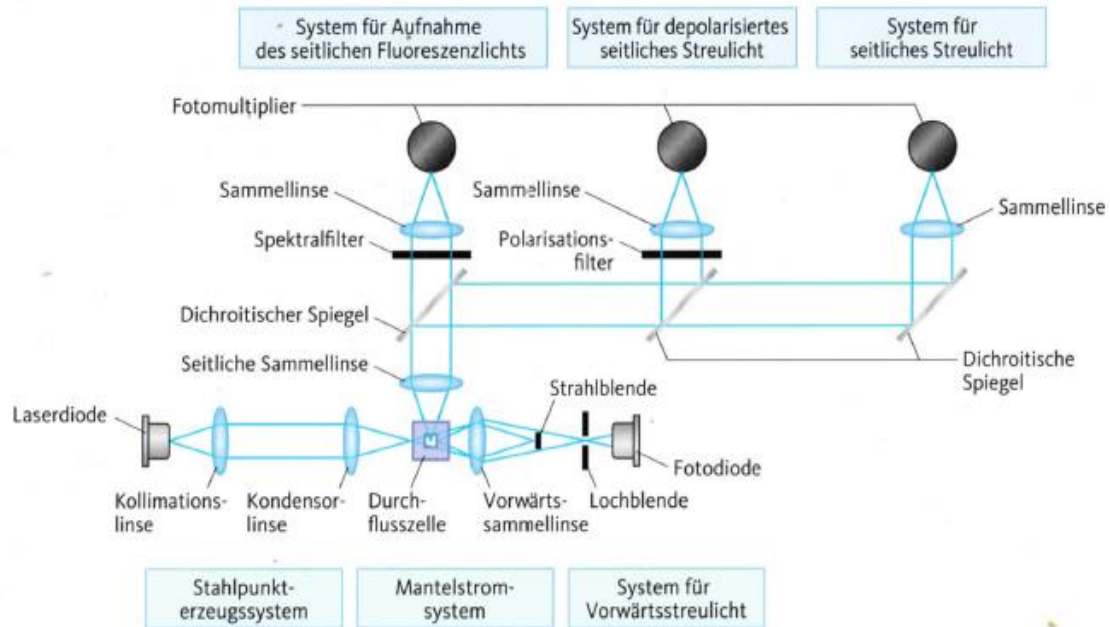


Abb. 1: Funktionsweise des UF 5000 (30)

### 2.2.1.3 Neubauer-Zählkammer

Zur Validation der Leukozytenzählung mittels Durchflusszytometrie wird diese mit dem Goldstandard verglichen, indem wir die Leukozytenzahl bei 100 Proben in der Neubauer-Zählkammer manuell mikroskopisch nachzählen. Dazu werden 15 - 20  $\mu\text{L}$  Urin in die Neubauer-Zählkammer gegeben und 4 große Eckfelder, bestehend aus 4x4 kleinen Feldern, ausgezählt. Nach Teilung der Summe der Leukozyten aller 4 Quadrate durch 4 und anschließender Multiplikation mit 10 ergibt sich daraus der Wert von Leukozyten pro  $\mu\text{L}$  in der Urinprobe.

## 2.2.2 MALDI TOF MS

### 2.2.2.1 Erregeridentifikation

Die MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*) hat die Identifikation von Erregern in der diagnostischen Mikrobiologie bedeutend verändert. Diese ist nun über den Nachweis und die Massenbestimmung ribosomaler Proteine der Bakterien und Pilzen möglich. Hierfür werden die Erreger, es reichen ca.  $10^4$  bis  $10^6$  KBE, auf eine polierte Stahlplatte, das Target, aufgetragen. Damit für die Messung die ribosomalen Proteine besser zugänglich sind, muss man

die Bakterien lysieren. Dafür wird 70%ige Ameisensäure verwendet und ebenfalls auf das Target gegeben. Nach dem Trocknen bedeckt man die Probe zusätzlich mit Matrix. In unserem Fall wurde als Matrix alpha-Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA) verwendet. Es kommt zu einer Co-Kristallisation zwischen der Matrix und der Probe. Die Matrix hat dabei den Zweck, die Energie des Lasers zu absorbieren und die einzelnen zu untersuchenden Proteine zu trennen. Nachdem die Target-Platte in das MALDI-TOF MS Gerät gestellt worden ist, muss ein für die Messung notwendiges Hochvakuum aufgebaut werden. Den Proben wird dann bei einer Frequenz von 60 Hz mit einem Laser Energie zugeführt. Dadurch kommt es zu einer Ionisation der Probe, wobei die Matrix als Protonendonator fungiert. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt (ca. 10 – 30 kV) und es wird die Zeit bestimmt, die die Ionen bis zum Auftreffen auf den Detektor brauchen (*Time of Flight*, TOF) (Abb. 2). Dabei ist die Zeit von der Ladung und dem Molekulargewicht der Ionen abhängig. Der Messbereich liegt zwischen ca. 2.000 bis 20.000 Dalton (Da). Zur Identifikation von Bakterien sind vor allem ribosomale Proteine relevant, da sie (i) unabhängig von der Stoffwechsellage in Bakterien zahlreich vorhanden sind und (ii) deren Größenverteilung im gemessenen Spektrum aussagekräftige Rückschlüsse auf die entsprechende Spezies zulässt. Aus den sich ergebenden Spektren gelingt die exakte Identifikation der Bakterien, indem man die gefundenen Spektren mit einer Referenz-Datenbank auf Ähnlichkeit vergleicht. Daraus wird ein Score-Wert berechnet, der Werte von  $\leq 3$  erreichen kann. Bei Werten  $\geq 2$  kann von einer sicheren Identifikation der Spezies ausgegangen werden. Bei Werten zwischen 2 und 1,7 ist zumindest die Identifikation der Gattung möglich (8, 31, 32). Die Messung selbst dauert dabei weniger als eine Minute und ist damit deutlich schneller als biochemische Identifikationen. Solche Verfahren, wie beispielsweise die bunte Reihe zeigen, in der Regel erst nach einer Inkubationszeit von ca. 18 - 24 Stunden ein Ergebnis (8).

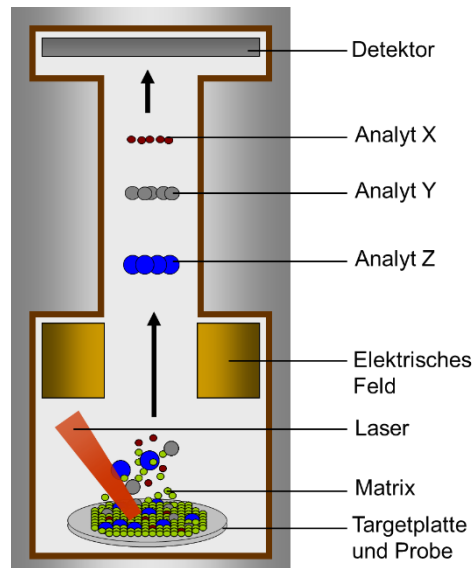


Abb. 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise der MALDI-TOF MS (8)

#### 2.2.2.2 MBT-ASTRA Assay

Der MBT-ASTRA Assay (MALDI Biotyper *antibiotic susceptibility test rapid assay*) ist ein phänotypischer Test, um mit Hilfe von MALDI-TOF MS eine schnelle Antibiotikaresistenztestung durchzuführen. Der Test beruht darauf, dass mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie semi-quantitativ ribosomale bakterielle Proteine nachgewiesen werden. Die Intensität der gefundenen Peaks lässt einen Rückschluss auf die Proteinbiosynthese während der Inkubationszeit zu. Kommt es zu einer Reduktion des Spektrums in den Proben, die mit Antibiotikum inkubiert wurden, im Vergleich zur Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum, spricht dies für eine verminderte Proteinbiosynthese. Daraus kann man ableiten, ob ein Erreger sensibel gegenüber einem Antibiotikum ist. (33)

#### 2.2.2.1 Aufbereitung der Urine und Inkubation

Nach der Auswahl geeigneter Urine wird 1 mL Urin in ein 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 4300 rpm für 5 Minuten bei 4 C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das entstandene Pellet mit 1 mL Aqua dem. resuspendiert. Dann erfolgt eine Zentrifugation der Probe für 2 Minuten bei 14.000 rpm. Dieser Waschvorgang wird nochmals wiederholt. Anschließend wird das Pellet in ca. 50 µL des Überstands resuspendiert und 5 µL in 1400 µL AST Medium eingebracht. 1000 µL davon werden

benötigt, um die  $OD_{600}$  zu bestimmen und daraus dann die Verdünnung für die gewünschte  $OD_{600}$  von 0,01 zu errechnen. Pro Ansatz gibt man das zu untersuchende Antibiotikum und 200  $\mu\text{L}$  der verdünnten Bakteriensuspension in ein 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen. Das Antibiotikum wird jeweils gemäß den Voruntersuchen (siehe 2.2.3) dazugegeben. Zusätzlich stellt man eine Wachstumskontrolle mit 200  $\mu\text{L}$  her. Dann werden die Ansätze für 2,5 Stunden bei 37 C und 970 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

#### *2.2.2.2 Vorbereitung der Messung*

Nach der Inkubationszeit wird jeweils der ganze 200  $\mu\text{L}$  Ansatz auf eine 96 well Filterplatte aufgetragen, 3 Minuten bei 4000 Umdrehungen und 20 °C zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wäscht man die Proben mit 50  $\mu\text{L}$  HPLC Wasser, zentrifugiert sie nochmals und verwirft auch hier wieder den Durchfluss. Zur Lyse der Bakterien wird in jeden Ansatz 10  $\mu\text{L}$  70%ige Ameisensäure und 10  $\mu\text{L}$  Acetonitril, in das der Interne ASTRA Standard von Bruker gelöst ist, gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei den gleichen Bedingungen wird nun der Durchfluss in einer frischen 96 well Platte aufgefangen und zur Messung am MALDI verwendet. Dafür trägt man auf eine polierte Stahl-Target-Platte jeweils 1  $\mu\text{L}$  des Durchflusses auf. Pro Ansatz haben wir 4 Spots verwendet, um mit Hilfe der Auswertungssoftware einen Mittelwert bilden zu können und Messergebnisse ohne größere Extremwerte („Ausreißer“) zu generieren. Nach dem Trocknen wird 1  $\mu\text{L}$  HCCA (alpha-Cyano-4-hydroxycimtsäure von Bruker) als Matrix hinzugegeben.

#### *2.2.2.3 Massenspektrometrische Analyse der Proben*

Nach dem Trocknen der Matrix schleust man das Target in das MALDI-TOF-Gerät ein, woraufhin nach Herstellen des Vakuums die MALDI-TOF MS Messung erfolgt und die Messspektren generiert werden. Dabei werden Massen im Bereich von 2.000 und 20.000 Da gemessen und die folgenden Einstellungen verwendet, die man auch routinemäßig zur Erregeridentifikation einsetzt: Ionenquelle eins: 20 kV; Ionenquelle zwei: 18,25 kV; Extraktions-Verzögerung: 160 ns; Linse: 7 kV; Detektorverstärkung: 7,4 V. Die Frequenz des Lasers beträgt hierfür 60 Hz.

### 2.2.3 Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen

Um herauszufinden, welche Antibiotikakonzentration im Versuchsansatz eine genaue Unterscheidung zwischen resistent und empfindlich ermöglicht, wurde mit bekannt sensiblen und resistenten Enterobakterien-Isolaten der MBT-ASTRA Assay durchgeführt. Dabei wurden Isolate der Spezies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* und *Serratia marcescens* verwendet, um die Antibiotika Cefuroxim, Ciprofloxacin, Cotrimoxazol, Fosfomycin, Meropenem und Nitrofurantoin zu testen.

### 2.2.4 Konventionelle Antibiotikaresistenztestung

Auf Muller-Hinton II Agarplatten 150 mm (Fa. Becton Dickinson) wurde eine Bakteriensuspension mit einer  $OD_{600}$  0,5 aufgetragen und die MHK-Teststreifen (Fa. Liofilchem S.r.l.) für die 6 verwendeten Antibiotika aufgelegt. Nach ca. 18 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Ablesung und die Bewertung entsprechend der klinischen Grenzwerte gemäß EUCAST (v. 10.0) (7).

### 2.2.5 Datenauswertung

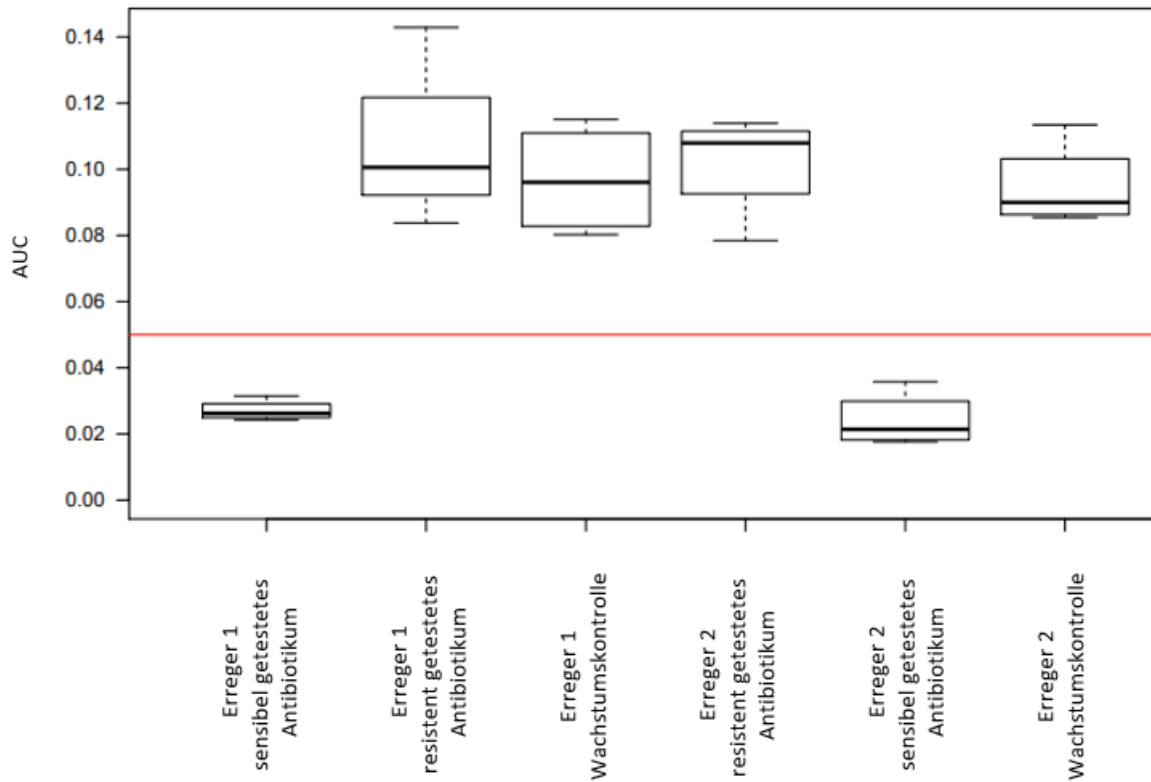
#### 2.2.5.1 Sysmex

Die durch das Gerät erhobenen Daten sind direkt am Gerät einsehbar und zur weiteren Bearbeitung mittels einer CSV-Datei in Excel übertragbar. So können Leukozyten-, Bakterien- und Hefe-Zellzahlen und das Gram-Verhalten anhand des Gram-*flags* des UF 5000 und die Leukozytenzahl und das Nitrit-Ergebnis des UC 3500 ausgewertet werden. Die Scattergramme werden als PNG-Dateien abgespeichert. Scattergramme sind Diagramme, in welchen die Untersuchungsergebnisse eines Partikels aus der Probe aus jeweils zwei Messkanälen, wie zum Beispiel Vorwärts- oder Seitwärtsstreulicht, in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen werden. Aus dem Verteilungsmuster können die Partikel einer Gruppe zugeordnet werden. Die kulturelle Anzucht lieferte Ergebnisse über gefundene Erreger, Erregerzahl und Hemmstoffe. Alle erhobenen Daten werden in einer Excel-Tabelle zusammengefügt und miteinander verglichen.

### 2.2.5.2 MBT-ASTRA Assay

Mit Hilfe der MALDI Biotyper MBT-ASTRA Prototype Software (Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Deutschland) ist es möglich, die Daten des MALDI-TOF MBT-ASTRA Assay automatisch auszuwerten. Hierbei handelt es sich um eine Prototyp-Software, die in der freien Programmiersprache „R“ geschrieben worden ist (34). Um die von der MALDI-TOF MS erzeugten Spektren zu untersuchen, werden die jeweiligen Baseline-Werte vom Messwert abgezogen und die Peaks auf den höchsten Intensitätswert normalisiert. Diese relativen Intensitäten zwischen 0 und 1 wurden in 100 gleich große Bereiche unterteilt (Abstand 0,01). Die Anzahl Peaks oberhalb jedes Grenzwertes werden zusammengezählt und gegen den jeweiligen Grenzwert aufgetragen. Anschließend berechnet die Software daraus zu jedem Spektrum eine „*area under the curve*“ (AUC) (34-36). Dieser Wert spiegelt das Wachstum der Bakterien im Ansatz wieder. Aus diesen Werten werden zu den jeweiligen vier Messungen pro Probe Box-Plots generiert. Diese sind in Abbildung 3 gezeigt. Ein Ergebnis über dem Grenzwert der AUC von 0,05 - verdeutlicht durch die rote Linie - zeigt ein Wachstum in der untersuchten Probe an. Unterhalb des Grenzwerts lassen sich nicht genügend bakterielle Proteine nachweisen. Wird der Grenzwert von 0,05 im Ansatz ohne Antibiotikum nicht überschritten, kann die Probe nicht ausgewertet werden. Wird der Grenzwert im Ansatz mit Antibiotikum nicht überschritten, wird das Bakterium als empfindlich gegen dieses Antibiotikum klassifiziert.

Da manchmal auf Grund von Hintergrundrauschen die AUC durch die Software fälschlicherweise zu hoch angegeben wurde, erfolgte jeweils manuell eine visuelle Kontrolle der Spektren und gegebenenfalls eine Korrektur.



**Abb. 3:** Ausschnitt eines mittels der MALDI Biotyper MBT-ASTRA Prototype Software erstellten Box-Plots-Diagramms

Die Ergebnisse des MBT-ASTRA Assay werden zusammen mit den Ergebnissen der Voruntersuchungen mittels UC 3500 und UF 5000 in eine Excel-Tabelle eingetragen. Dieser Tabelle werden dann die Ergebnisse der kulturellen Erregeridentifikation und Erregerzahl und der Resistenztestung mittels MHK-Untersuchung hinzugefügt.

### **3. Ergebnisse**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch den Einsatz der MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) die Urindiagnostik zu verbessern und eine schnellere Antibiotikaresistenztestung uropathogener Erreger aus Urinen zu ermöglichen. Für eine Vorselektion relevanter Urinproben für die MALDI-TOF MS Untersuchung wurden vollautomatische Durchflusszytometrie- und Urinanalysesysteme genutzt, die einen hohen Probendurchsatz im Routinelabor erlauben. Dabei wurden Urinproben (i) auf Gram-negative Erreger mit hoher Erregerzahl und (ii) auf eine Leukozyturie als Zeichen einer Infektion untersucht. Im Folgenden werden daher in einem ersten Teil zuerst die Ergebnisse der Untersuchung des vollautomatischen klinisch-chemisches Urinanalysesystem UC 3500 (Firma Sysmex) und des Durchflusszytometers UF 5000 (Fa. Sysmex) dargestellt. Im zweiten Teil dieses Kapitels wird die Auswertung der Antibiotikaresistenz-Bestimmung mittels MALDI-TOF MS-gestützter ASTRA-Methode vorgestellt.

#### **3.1 Automatische Untersuchung der Urinproben**

Das vollautomatische klinisch-chemische Urinanalysesystem UC 3500 und das Durchflusszytometer UF 5000 wurden durch einen Methodenvergleich mit konventioneller Urindiagnostik validiert. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf den Möglichkeiten, die Urindiagnostik zu verbessern und zu beschleunigen. Des Weiteren sollte ein Algorithmus gefunden werden, mit dem sich die Urine herausfiltern lassen, die für die schnelle Antibiotikatestung mittels MALDI-TOF MS geeignet sind.

##### **3.1.1 Untersuchte Urinproben**

Im Zeitraum von Mitte Juli bis Ende September 2019 wurden 3017 Rückstellproben von Patientenerinuren konsekutiv gesammelt und mit Hilfe des UC 3500 und des UF 5000 (Firma Sysmex) untersucht. Alle Proben waren anonymisiert und es wurden keine weiteren klinischen Daten erhoben.

Eine Unbedenklichkeitsbescheinigung durch die Ethikkommission des Klinikums der Universität liegt für diese Untersuchungen vor (417-16 UE/2016).

Die eingesendeten Materialien sind der untenstehenden Tabelle 6 zu entnehmen.



Material	Anzahl
Mittelstrahlurin	1463
Dauerkatheter-Urin	1376
Urin (nicht weiter spezifiziert)	98
Einmalkatheter-Urin	66
Nierenfistel-Urin	8
Punktat-Urin	4
Exprimaturin	2

Tab. 6: Übersicht über die eingesendeten Materialien

Für die Studie konnten 2976 Urinproben ausgewertet werden und 41 wurden ausgeschlossen (bei 17 war es auf Grund von zu wenig Material nicht möglich, ein Ergebnis vom UF 5000 zu erzielen, 24 Proben kamen nicht in Urin-Monovetten mit Stabilisator).

### 3.1.2 Ergebnisse der Kulturuntersuchung

In 1565 Proben ließen sich kulturell keine Erreger nachweisen. In 888 Proben wurde ausschließlich oder zusätzlich zu anderen Erregern Schleimhaut- oder Mischflora in der Kultur gefunden, dabei in 372 Fällen weniger als  $10^3$  KBE/mL. In 1597 Urinproben konnten Hemmstoffe nachgewiesen werden (52,9 %).

Erreger $\geq 10^3$	Anzahl
<i>E. coli</i>	324
<i>Candida non albicans</i>	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	97
<i>Enterococcus faecium</i>	89
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62
<i>Candida albicans</i>	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
<i>Proteus mirabilis</i>	42
<i>Enterobacter cloacae</i>	24
<i>Streptococcus agalactiae</i>	24
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
<i>Klebsiella oxytoca</i>	21
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	21

Erreger $\geq 10^3$	Anzahl
<i>Citrobacter species</i>	21
<i>Aerococcus urinae</i>	14
<i>Morganella morganii</i>	14
Gram-negative Stäbchen	12
<i>Streptococcus anginosus</i>	11
Sonstige	106

Tab. 7: Erreger der untersuchten Urinproben (nur für  $\geq 10^3$  KBE/mL)

Die Tabelle 7 zeigt eine Aufstellung der Erreger, die in den untersuchten Urinproben mit einer Erregerzahl  $\geq 10^3$  KBE/mL gefunden wurden. Dabei war der häufigste Erreger *E. coli*, der in 324 Urinproben ermittelt werden konnte. Unter den in der Tabelle 7 als „Sonstige“ aufgeführten Erregern sind 78 Gram-positiv, 27 Gram-negativ und 1 Hefe. Des Weiteren konnten 457 Erreger mit nur  $< 10^3$  KBE/mL nachgewiesen werden. Die Nennung mehrerer Erreger pro Urin ist möglich.

Bei der Urindiagnostik findet eine quantitative Bestimmung der Bakterienzahl statt, um zusammen mit dieser, der Leukozyturie und der Symptomatik des Patienten eine Harnwegsinfektion zu diagnostizieren. Entgegen früherer Annahmen der signifikanten Bakteriurie von  $10^5$  KBE/mL geht man heute auch bei niedrigeren Bakterienzahlen schon von einer Signifikanz beim Vorliegen einer klinischen Symptomatik für einen Harnwegsinfekt aus (37-39). In der aktuellen Leitlinie wird ein Grenzwert von  $\geq 10^3$  KBE/mL angegeben (1), der auch hier als Grenzwert gewählt worden ist.

### 3.1.3 Untersuchungen zur Leukozyturie

#### 3.1.3.1 Vergleich der Leukozytenzählung mittels Durchflusszytometrie mit dem Goldstandard der manuellen Mikroskopie mittels Neubauer-Zählkammer

Um zu zeigen, wie sicher eine Leukozyturie mittels Durchflusszytometrie im direkten Vergleich zur manuellen Mikroskopie mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt werden kann, wurden beide Methoden bei 100 Urinen gegenübergestellt. Dabei wurden kategorische Zuordnungen zu Fehlen oder Nachweis einer Leukozyturie unter Zugrundelegung zweier unterschiedlicher Cut-off-Werte von 10 Leukozyten (Leu)/ $\mu$ L und 25 Leukozyten/ $\mu$ L verglichen. Wie in Abbildung 4 und Abbildung 5 dargestellt, wies

die Durchflusszytometrie eine Sensitivität von 87,9 % und eine Spezifität von 92,9 % für den Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  auf. Bei einem Grenzwert von 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  zeigte sich für die Durchflusszytometrie gegenüber dem Goldstandard eine Sensitivität von 83,3 % und Spezifität von 94,8 %. Für den niedrigeren Grenzwert von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  ließ sich eine gute Übereinstimmung des Durchflusszytometers UF 5000 mit der mikroskopischen Leukozytenzählung, die als Goldstandard gilt, finden.

	Cut-off 10 Leu/ $\mu\text{l}$	Mikroskopie mittels Neubauer-Zählkammer		
		Leukozyturie	keine Leukozyturie	
Durchflusszytometrie UF 5000	Leukozyturie	51	3	54
	keine Leukozyturie	7	39	46
		58	42	100

**Abb. 4: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. manuelle Mikroskopie (Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ )** Vergleich des Nachweises der Leukozyturie mittels des Durchflusszytometers UF 5000 gegenüber dem Goldstandard der manuellen Mikroskopie mittels Neubauer-Zählkammer bei einem Cut-off der Leukozyturie von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$

	Cut-off 25 Leu/ $\mu\text{l}$	Mikroskopie mittels Neubauer-Zählkammer		
		Leukozyturie	keine Leukozyturie	
Durchflusszytometrie UF 5000	Leukozyturie	35	3	38
	keine Leukozyturie	7	55	62
		42	58	100

**Abb. 5: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. manuelle Mikroskopie (Cut-off 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ )** Vergleich des Nachweises der Leukozyturie mittels des Durchflusszytometers UF 5000 gegenüber dem Goldstandard der manuellen Mikroskopie mit Neubauer-Zählkammer bei einem Cut-off der Leukozyturie von 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$

### 3.1.3.2 UC 3500 vs. manuelle Urinteststreifen-Ergebnisse

In der klinischen Praxis vor Ort spielen Urinteststreifen u.a. zum Nachweis von Leukozyturie und Bakteriurie eine bedeutende Rolle. Daher sollte auch der manuelle Urinteststreifen mit einem automatisiert arbeitenden Gerät für Urinteststreifen

(UC3500) verglichen werden. Hierzu wurden 200 Proben zusätzlich zur Stix-Untersuchung mittels UC 3500 per Hand mit Combur 9 Teststreifen (Fa. Roche) untersucht. Der Fokus des Vergleichs lag auf den für die Harnwegsinfektionen und den gesuchten Algorithmus wichtigen Parametern Leukozytenesterase und Nitrit als Surrogatmarker für eine Leukozyturie und eine Bakteriurie. Auf Grund ihres schon langzeitigen Einsatzes in der Praxis wurden die Combur 9 Teststreifen als etablierte manuelle Methode als Vergleichsreferenz gewählt.

Im Vergleich zum Goldstandard Combur 9 Teststreifen wies der Leukozyten-Nachweis mittels UC 3500 eine Sensitivität von 95,8 % und eine Spezifität von 89,1 % auf (Abb. 6).

		Combur 9 Teststreifen		
		Leukozyturie	keine Leukozyturie	
Stixergebnis UC 3500	Leukozyturie	68	14	82
	keine Leukozyturie	3	115	118
		71	129	200

**Abb. 6: Leukozyten-Nachweis mittels UC 3500 und Combur 9 Teststreifen**

Abbildung 7 zeigt, dass sich bei der Bestimmung von Nitrit in den 200 untersuchten Proben nur ein falsch-positives und ein falsch-negatives Ergebnis im Vergleich zwischen den manuellen und den automatischen Urinteststreifen fanden. Dies entspricht einer Sensitivität und Spezifität von 96,2 % bzw. 99,4 %.

		Combur 9 Teststreifen		
		Nitrit positiv	Nitrit negativ	
Stixergebnis UC 3500	Nitrit positiv	25	1	26
	Nitrit negativ	1	173	174
		26	174	200

**Abb. 7: Nitrit-Nachweis mittels automatischem Teststreifen System UC 3500 und Combur 9 Teststreifen**

Es zeigte sich für Nitrit eine sehr gute Übereinstimmung der manuellen und der automatisierten Methode für die Untersuchung von Urinteststreifen. Für die

Leukozyturie konnte eine sehr gute Sensitivität nachgewiesen werden, allerdings fiel eine Spezifität von knapp unter 90 % auf.

### 3.1.3.3 UF 5000 vs. UC 3500

In einer weiteren Versuchsreihe sollten die beiden Urin-Analysegeräte hinsichtlich der Ergebnisse des Leukozyten-Nachweises untersucht werden. Um herauszufinden, wie geeignet die Testung der Urinproben mit Hilfe eines automatisierten Urinteststreifens im Vergleich zur Durchflusszytometrie ist, eine Leukozyturie festzustellen, erfolgte ein Vergleich der Urinteststreifen-Ergebnis des UC 3500 mit dem Ergebnis der Leukozytenzahl des Durchflusszytometers UF 5000 mit unterschiedlichen Cut-off-Werten bei 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  und 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ . Die Durchflusszytometrie wurde dabei als Referenztest verwendet. Dabei wurde der Stix als positiv gewertet, sobald vom Gerät eine Farbreaktion auf dem Feld für Leukozytenesterase detektiert werden konnte. In die Auswertung gingen 2976 Urinproben ein. Es zeigte sich, dass eine Leukozyturie bei einem Cut-off von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  vom Stix nur in 973 von 1564 Fällen richtig ermittelt werden konnte, woraus sich eine Sensitivität von 62,2 % ergab (Abb. 8). Bei einem Cut-off für Leukozyturie von 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  stieg die Sensitivität auf 78,5 % an, wie der Abbildung 9 zu entnehmen ist. Die Spezifität sank von 97 % bei einem Grenzwert von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  auf 93,4 % bei einem Grenzwert von 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ . Auch bei dieser höheren Detektionsgrenze für die Leukozyturie zeichnete sich der Urinteststreifen durch eine recht geringe Sensitivität im Vergleich zur Durchflusszytometrie aus. Daher scheint die Durchflusszytometrie besser geeignet zu sein, eine Leukozyturie zu erkennen, als Urinteststreifen.

	Cut-off 10 Leu/ $\mu\text{l}$	Durchflusszytometrie UF 5000		
		Leukozyturie	keine Leukozyturie	
Stixergebnis UC 3500	Leukozyturie	973	43	1016
	keine Leukozyturie	590	1370	1960
		1564	1412	2976

**Abb. 8: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. automatischem Teststreifen-System (Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ )** Nachweis der Leukozyturie durch das Durchflusszytometer UF 5000 gegenüber dem Teststreifen-Ergebnis des UC 3500 bei einem Cut-off für Leukozyturie von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$

	Cut-off 25 Leu/ $\mu$ l	Durchflusszytometrie UF 5000		
		Leukozyturie	keine Leukozyturie	
Stixergebnis UC 3500	Leukozyturie	888	128	1016
	keine Leukozyturie	237	1723	1960
		1131	1845	2976

**Abb. 9: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. automatischem Teststreifen-System (Cut-off 25 Leukozyten/ $\mu$ L)** Nachweis der Leukozyturie durch das Durchflusszytometer UF 5000 gegenüber dem Teststreifen-Ergebnis des UC 3500 bei einem Cut-off für Leukozyturie von 25 Leukozyten/ $\mu$ L

### 3.1.4 Untersuchung zum Zusammenhang zwischen der Leukozyturie und dem Erregernachweis

In dem neuen Qualitätsstandard zur mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MIQ) von Harnwegsinfektionen (6) spielt der Nachweis einer Leukozyturie eine wichtige Rolle, um neben der bisher als alleinigem Parameter verwendeten Erregerzahl das Vorliegen einer Harnwegsinfektion aus labortechnischer Sicht zu beurteilen (40, 41). Deshalb ist der Leukozytennachweis auch ein wichtiges Kriterium bei der Voruntersuchung für eine schnelle Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS. In der neuen MIQ Harnwegsinfektionen (6) wird bei den isolierten Erregern zwischen uropathogenen, potenziell uropathogenen Erregern und Bakterien der urogenitalen Schleimhautflora unterschieden (Abb. 10). Wie von Oyaert et al (5) vorgeschlagen, wurde in der neuen Leitlinie zum mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandard zu Harnwegsinfektionen eine neue Strukturierung der Laborkriterien für eine Harnwegsinfektion sowie eine Vereinheitlichung der mikrobiologischen Urin-Befunde angestrebt. Diese Strukturierung der Laborkriterien ist auch der in dieser Arbeit angewendeten Auswertung zugrunde gelegt (6). Auf dieser Basis wurde der

Zusammenhang zwischen der Leukozytenzahl, dem Erregernachweis und dem eingesendeten Material untersucht.

uropathogene Erreger	potenziell uropathogene Erreger	urogenitale Hautflora
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Enterobacterales</i>, u.a.:</li> <li>▪ <i>E. coli</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Klebsiella</i> sp.</li> <li>• <i>Proteus</i> sp.</li> <li>• <i>Morganella</i> sp.</li> <li>• <i>Providencia</i> sp.</li> <li>• <i>Enterobacter</i> sp.</li> <li>• <i>Citrobacter</i> sp.</li> </ul> </li> <li>▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>▪ <i>Staphylococcus saprophyticus</i></li> <li>▪ <math>\beta</math>-hämolisierende Streptokokken der Gruppe A und B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• Enterokokken</li> <li>• Hefen (<i>Candida</i> sp.)</li> <li>• <i>Aerococcus urinae</i></li> <li>• <i>Aerococcus sanguinicola</i></li> <li>• <i>Actinotignum schaalii</i></li> <li>• <i>Corynebacterium urealyticum</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Haemophilus</i> sp.</li> <li>• Vergrünende Streptokokken</li> <li>• <i>Neisseria</i> sp.</li> <li>• <i>Lactobacillus</i> sp.</li> <li>• Koag. neg. Staphylokokken (außer <i>S. saprophyticus</i>)</li> <li>▪ <i>Corynebacterium</i> sp. (außer <i>C. urealyticum</i>)</li> <li>▪ <i>Aerococcus</i> sp. (außer <i>A. urinae</i> und <i>A. sanguinicola</i>)</li> </ul>

**Abb. 10:** Häufig in Urinproben gefundene Erreger und deren Zuordnung (6)

Zuerst sollte gezeigt werden, ob unterschiedliche Leukozytenzahlen in den Urinproben nachweisbar sind in Abhängigkeit davon, ob (i) ein uropathogener oder potenziell uropathogener Erreger kulturell gefunden wurde oder (ii) ob ein Nachweis von Normalflora oder kein kulturelles Wachstum gelang. Die Abbildung 11 zeigt die entsprechenden Ergebnisse. In diese Ergebnisse gingen für Urine mit potenziell uropathogenen Erregern, Normalflora oder keinem Wachstum nur die Erreger ein, in welchen keine Hemmstoffe nachgewiesen werden konnten. Dadurch konnten Urine von Patienten, die bereits mit Antibiotika behandelt worden sind, und somit ein falsch niedriges Erregerwachstum ausgeschlossen werden. 42 % der Urine mit Normalflora oder ohne kulturelles Wachstum zeigten eine Leukozyturie, wenn man einen Grenzwert für Leukozyturie von 10 Leukozyten/ $\mu$ L festlegt. Bei uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern waren es hingegen ca. 84 % mit einer infektiologisch relevanten Leukozyturie von  $\geq 10$  Leukozyten/ $\mu$ L. Bei 56 % der Urine dieser Gruppe ließ sich sogar eine Leukozytenzahl von über 100 Leukozyten/ $\mu$ L nachweisen. Es fanden sich demnach sowohl bei Urinen mit Erregernachweis als auch bei Urinen mit Normalflora oder ohne kulturelles Wachstum eine Leukozyturie. Dies war aber bei Urinen mit Erregernachweis häufiger der Fall und die Leukozytenzahl fiel höher aus.

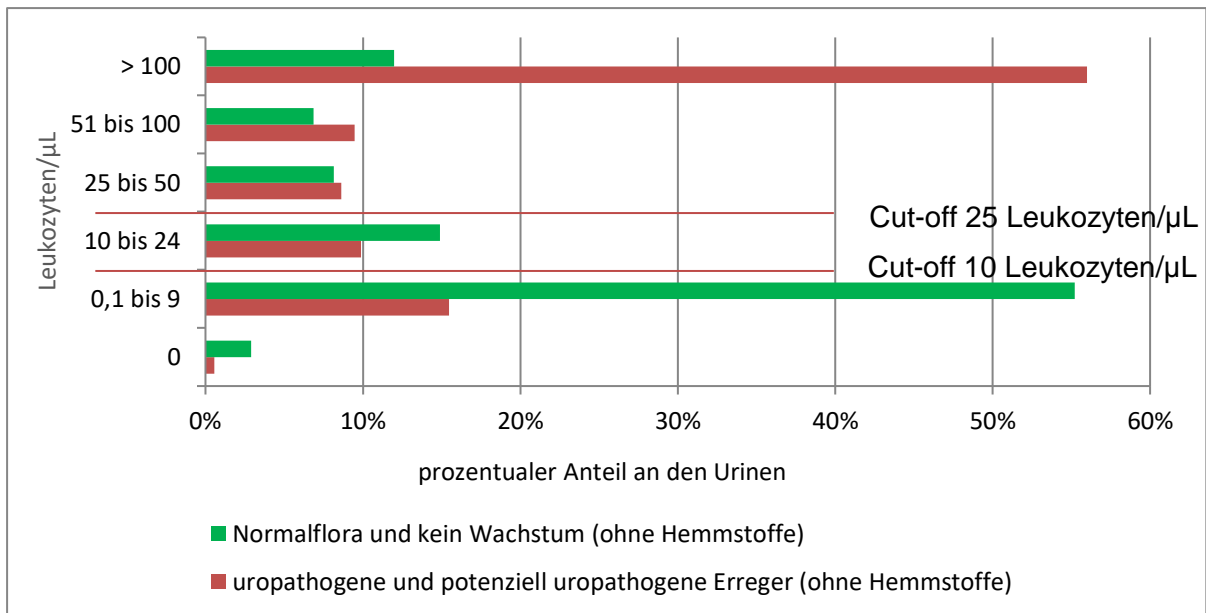


Abb. 11: Leukozytenzahl in Urinen mit uropathogenen oder potenziell uropathogenen Erregern vs. Urinen mit Normalflora oder ohne Wachstum

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob ein Unterschied in der Leukozyturie besteht, wenn entweder uropathogenen oder potenziell uropathogenen Erregern nachweisbar sind. Dabei fand sich eine deutlich höhere Leukozytenzahl bei Urinen mit uropathogenen Erregern. Diese Ergebnisse zeigt Abbildung 12. So betrug der Median der Leukozyten in Urinen mit uropathogenen Erregern 259,6 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ , aber nur 44,4 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  für Urine mit potenziell uropathogenen Erreger.

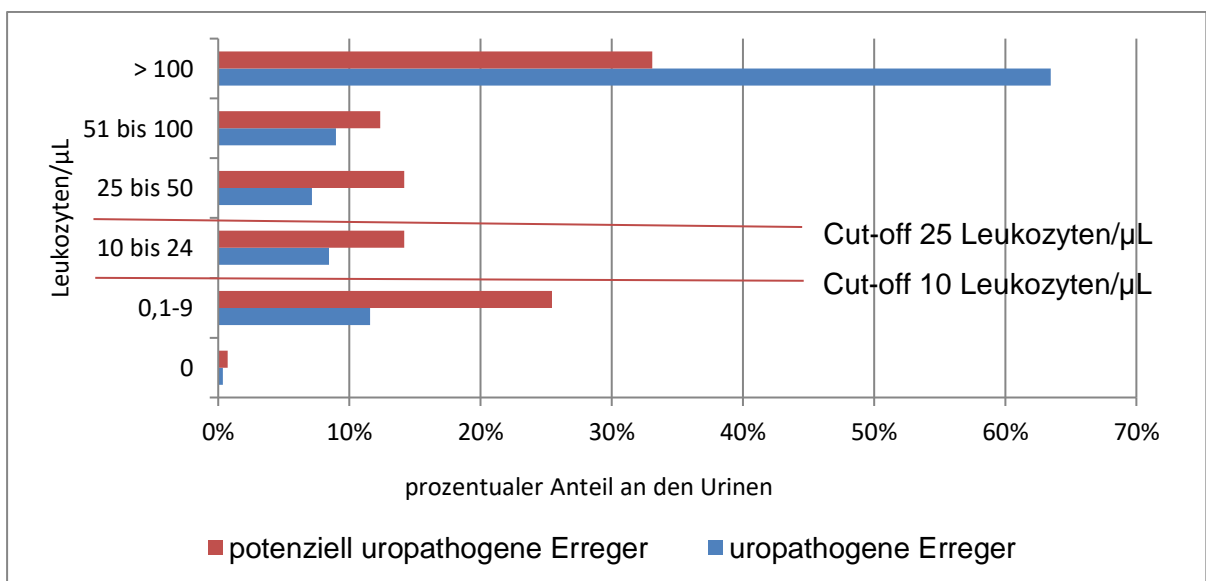
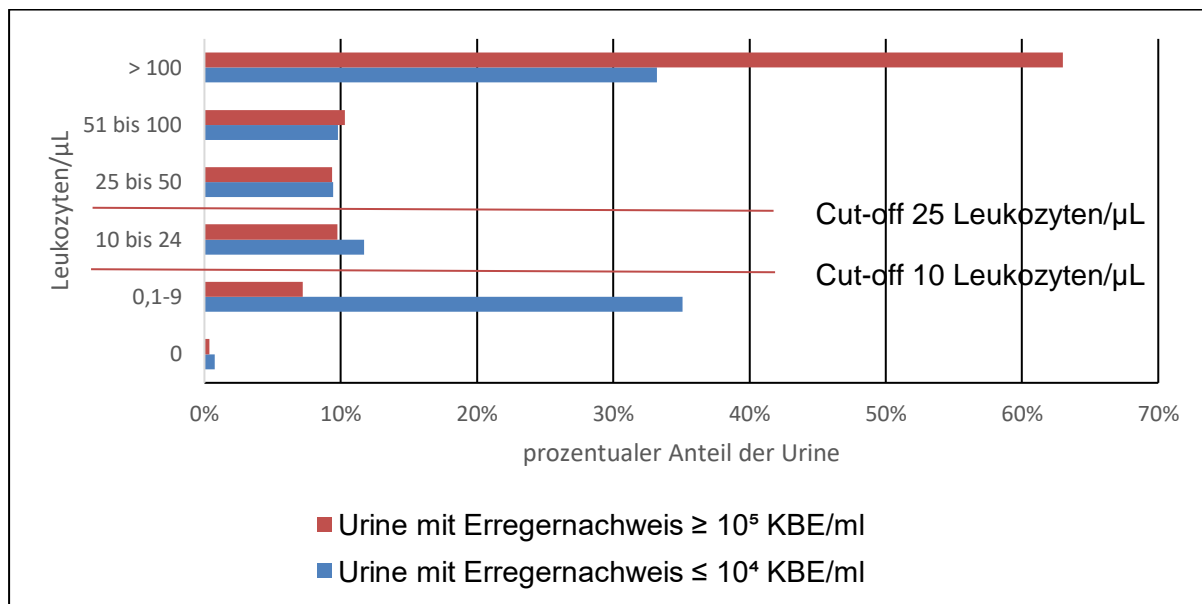


Abb. 12: Leukozytenzahl der Urine mit uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern

Ein Unterschied in der Verteilung der Leukozytenzahl ließ sich des Weiteren auch in Abhängigkeit von der Erregerzahl uropathogener oder potenziell uropathogener



Erreger nachweisen. Wie in Abbildung 13 dargestellt, fanden sich bei einem Erregernachweis von  $\leq 10^4$  KBE/mL Erregern in 64,2 % der untersuchten Urinproben eine Leukozytenzahl  $\geq 10$  Leukozyten/ $\mu$ L (klinisch relevante Nachweisgrenze). Dies war bei einem Erregernachweis  $\geq 10^5$  KBE/mL dagegen in 93 % der Fall.

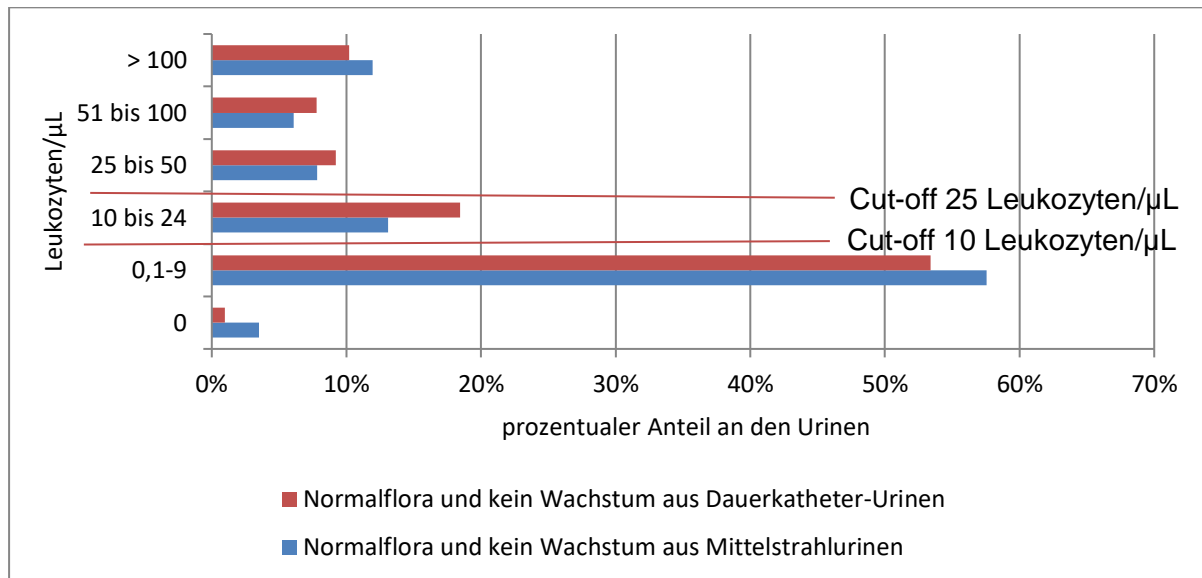


**Abb. 13: Leukozytenzahlen von Urinen mit uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern in Abhängigkeit von der Erregerzahl**

Insgesamt ließen sich bei Urinen mit Normalflora oder ohne kulturelles Wachstum niedrigere Leukozytenzahlen nachweisen als bei Urinen, aus denen ein Erregernachweis gelang. Dabei zeigte sich allerdings, dass die Leukozytenzahl auch hier abhängig davon war, welcher Erreger gefunden wurde und wie hoch die Erregerzahl war. Urine mit niedrigeren Erregerzahlen und Urine mit potenziell uropathogenen Erregern hatten im Vergleich niedrigere Leukozytenzahlen.

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sehr die Leukozytenzahl zwischen den unterschiedlichen Probenmaterialien variiert. In Abbildung 14 ist ersichtlich, wie sich die Leukozytenzahlen in Urinproben ohne Hemmstoffe verhielten, in denen sich Normalflora oder kein kulturelles Wachstum nachweisen ließen. Urine mit Hemmstoffen wurden nicht ausgewertet, um einen Effekt durch eine vorbestehende Antibiotikatherapie oder sonstige Hemmstoffe auszuschließen. Der Median lag bei 4,7 Leukozyten/ $\mu$ L in Materialien von Mittelstrahlurinen und 8,6 Leukozyten/ $\mu$ L in Urinproben aus Dauerkathetern.

Ebenso war der kumulative Anteil der Urine mit Leukozyturie bei einem Grenzwert von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  bei Urinen, die aus Mittelstrahlurinen stammten, mit 38,9 % niedriger als bei Urinproben aus Dauerkathetern mit 45,6 %.



**Abb. 14: Vergleich zwischen Urinen mit Normalflora und ohne kulturelles Wachstum in Abhängigkeit vom Probenmaterial** Es gingen nur Urine ohne Hemmstoffe in die Auswertung ein.

Abbildungen 15 und 16 zeigen die Verteilungen der Leukozytenzahlen in Urinen mit uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern. Ebenso wie oben bei Urinen mit Normalflora und ohne kulturelles Wachstum fand sich auch hier eine erhöhte Leukozytenzahl bei Urinen aus Dauerkathetern. Bei Mittelstrahlurinen betrug der Wert des Medians der Leukozytenzahl 206,2 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  bei Urinen mit uropathogenen Erregern und 20,8 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  bei Urinen mit potenziell uropathogenen Erregern. Diese Werte erhöhten sich auf 369,8 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  bei Urinen mit uropathogenen Erregern und auf 57 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  bei potenziell uropathogenen Erregern, wenn die Urine aus Dauerkathetern stammten. In den Abbildungen 15 und 16 sieht man, dass der Anteil an Urinen mit Leukozyturie mit Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  83,4 % bei Urinen mit uropathogenen Erregern aus Mittelstrahlurinen (bei potenziell uropathogenen Erregern 61,5 %) betrug und bei Urinen aus Dauerkathetern dagegen 96,8 % (bei potenziell uropathogenen Erregern 82,1 %).

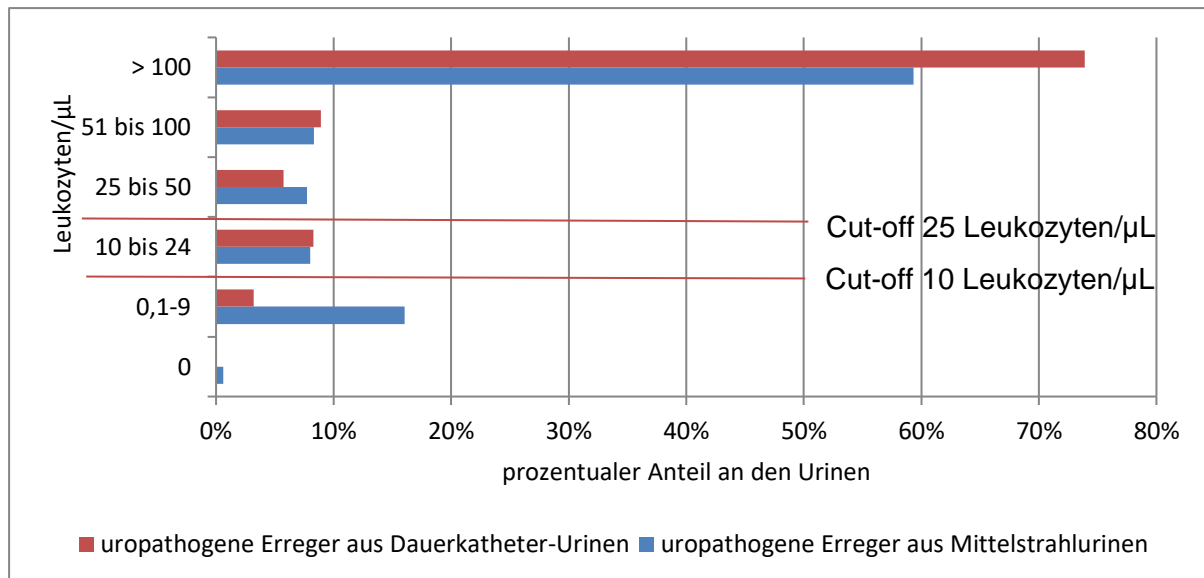


Abb. 15: Leukozytenzahl in Urinen mit uropathogenen Erregern in Abhängigkeit vom Probenmaterial

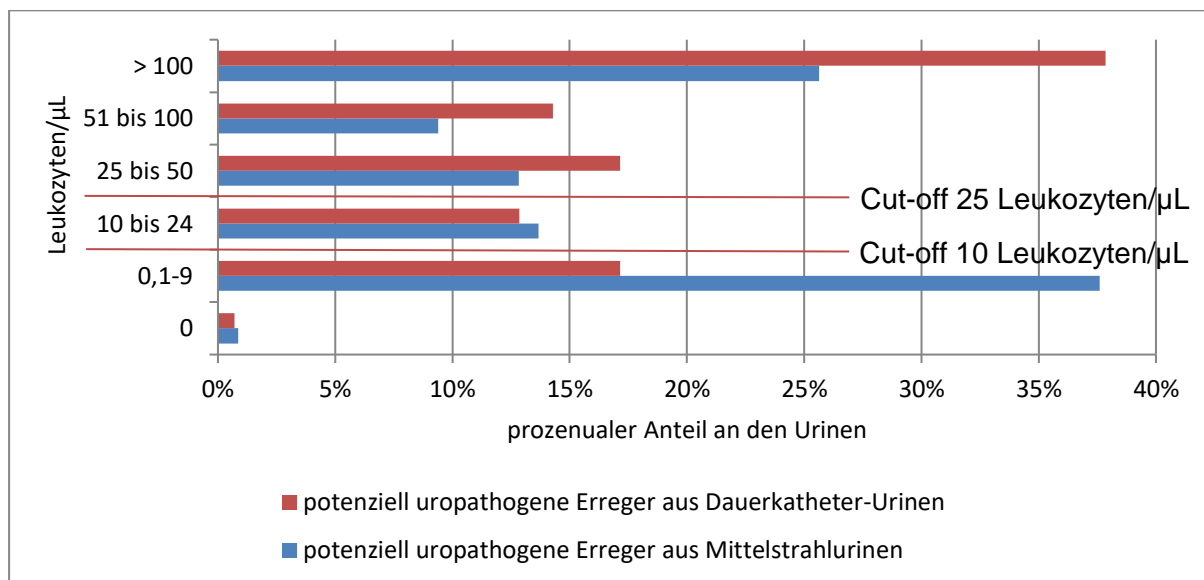


Abb. 16: Leukozytenzahl in Urinen mit potenziell uropathogenen Erregern in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Damit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Leukozytenzahl in Urinen aus Dauerkathetern höher ist als aus Mittelstrahlurinen. Dies konnte unabhängig von dem im Urin gefundenen bakteriellen oder Pilz-Wachstum bestätigt werden. Des Weiteren ließen sich auch Leukozyten in Urinen ohne kulturelles Wachstum nachweisen, wobei es sich um eine Art „Hintergrundrauschen“ handeln könnte. Eine andere Erklärung wäre eine Infektion mit Erregern, die sich mit den üblichen Routinetechniken kulturell nicht nachweisen lassen (z.B. Ureaplasmen).

Ein Nachweis einer erhöhten Leukozytenzahl ist ein Hinweis auf eine Infektion. Bei einem Harnwegsinfekt kommt es dann zu einer Leukozyturie. Bei einem kulturellen Nachweis von Mikroorganismen ohne eine Leukozyturie liegt aus labordiagnostischer Sicht eine Kontamination der Urinprobe oder eine Kolonisation der Harnwege vor. Dennoch ist eine Infektion nicht vollkommen auszuschließen; jedoch war im Rahmen dieses Labor-Methodenvergleiches die Erhebung und Auswertung klinischer Daten nicht vorgesehen. Deshalb wurde die folgende Auswertung unter labortechnischen Gesichtspunkten durchgeführt.

Insgesamt wurden in dieser Studie 2976 Urinen ausgewertet. Jeder Erregernachweis von uropathogenen oder potenziell uropathogenen Erregern wurde berücksichtigt, wenn er bei  $\geq 10^3$  KBE/mL lag. Die Auswertung wurde anhand von zwei Cut-off-Werten für die Leukozyturie (10 Leukozyten/ $\mu$ L und 25 Leukozyten/ $\mu$ L) durchgeführt.

Die Kontaminationsrate wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kontaminationsrate} = \frac{\text{Anzahl Urine mit (potenziell) uropathogenen Erregern ohne Leukozyturie}}{\text{Anzahl aller Urine mit (potenziell) uropathogenen Erregern}}$$

Die Kontaminationsrate für uropathogene Erreger betrug bei einem Cut-off von 10 Leukozyten/ $\mu$ L 12 % und 20,4 % für 25 Leukozyten/ $\mu$ L. Wenn man das Urinteststreifen-Ergebnis betrachtet, ergab sich mit 21,1 % eine ähnliche Kontaminationsrate wie bei einem Grenzwert von 25 Leukozyten/ $\mu$ L. Betrachtet man potenziell uropathogene Erreger, so lag die Kontaminationsrate bei 26,1 % für einen Grenzwert von 10 Leukozyten/ $\mu$ L und 40,2 % bei einem Grenzwert von 25 Leukozyten/ $\mu$ L. Bei einem Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu$ L waren bei 13 Urinen mit uropathogenen Erregern und bei 3 Urinen mit potenziell uropathogenen Erregern zusätzlich 2 weitere Erreger nachweisbar (bei  $\geq 25$  Leukozyten/ $\mu$ L 20 und 5 Urine), was eine Kontamination sehr wahrscheinlich macht.

Des Weiteren wurde untersucht, ob es in den Kontaminationsraten einen Unterschied zwischen den eingesandten Materialien Mittelstrahlurin und Dauerkatheter-Urin gibt, wobei 1449 Mittelstrahlurine und 1352 Dauerkatheter-Urine ausgewertet wurden. Bei Dauerkatheter-Urinen lag die Kontaminationsrate bei 3,2 % für uropathogene Erreger. Bei Mittelstrahlurinen dagegen betrug die Kontaminationsrate 16,6 % für uropathogene Erreger bei einem Cut-off von 10 Leukozyten/ $\mu$ L für eine Leukozyturie.

Bei einem Cut-off von 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  lagen die Kontaminationsraten für uropathogenen Erreger bei 12,1 % bei Urinen aus Dauerkathetern und bei 24,6 % bei Mittelstrahlurinen.

Betrachtet man potenziell uropathogene Erreger, so betragen die Kontaminationsraten bei einem Cut-off von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  17,9 % bei Urinen aus Dauerkathetern und 39 % bei Mittelstrahlurinen. Bei einem Cut-off von 25 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  ergaben sich bei Urinen aus Dauerkathetern Kontaminationsraten von 30,7 % und bei Mittelstrahlurinen von 52,1 %. Damit lagen die Kontaminationsraten, wie die Abbildung 17 im Überblick zeigt, bei Dauerkatheter-Urinen unter denen von allen Materialien und bei Mittelstrahlurinen darüber.

Cut-off Leukozyturie	Uropathogene Erreger			Potenziell uropathogene Erreger		
	Alle Materialien	Mittelstrahlurine	Dauerkatheter-Urine	Alle Materialien	Mittelstrahlurine	Dauerkatheter-Urine
$\geq 10$ Leu/ $\mu\text{l}$	12	16,6	3,2	26,1	39	17,9
$\geq 25$ Leu/ $\mu\text{l}$	20,4	24,6	12,1	40,2	52,1	30,7

Abb. 17: Kontaminationsraten (in Prozent) bei uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern in Abhängigkeit vom Probenmaterial

Abbildung 18 zeigt exemplarisch die Verteilung der Erregerzahlen in der Kultur, die bei einem Cut-off von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  keine Leukozyturie aufwiesen (n=137).

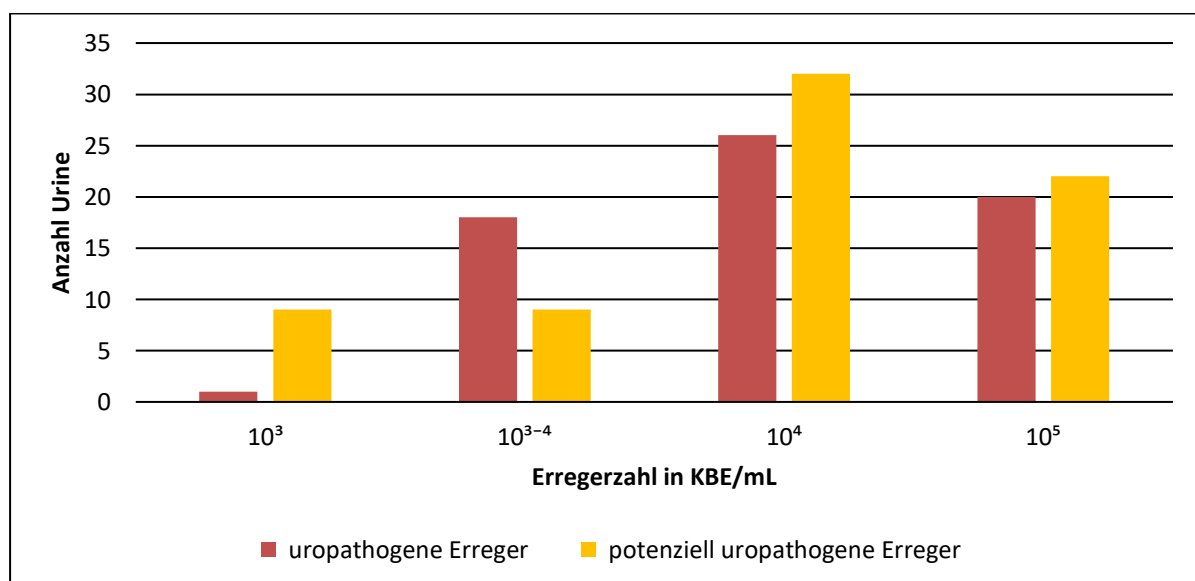


Abb. 18: Urinproben mit Erreger-Nachweis ohne Leukozyturie Darstellung der Urinproben mit Nachweis von uropathogenen oder potenziell uropathogenen Erregern ohne Nachweis einer Leukozyturie bei einem Grenzwert von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$

95,4 % der Urine ohne Leukozyturie zeigten kein Wachstum mit einem uropathogenen Erreger. Wenn man potenziell uropathogene Erreger hinzuzieht, wiesen 90,3 % der Urine ohne Leukozyturie kein kulturelles Wachstum oder Normalflora auf.

Insgesamt ließen sich für potenziell uropathogene Erreger bei beiden Cut-offs höhere Kontaminationsraten nachweisen als bei uropathogenen Erregern. Bezogen auf die Materialien zeigten sich für Dauerkatheter-Urine niedrigere Kontaminations- bzw. Kolonisationsraten.

### 3.1.5 Bakterienzahl

Bei der Vorauswahl der Urine für die Antibiotikaresistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay ist es vor allem wichtig, dass die hohen Bakterienzahlen gut erkannt werden, da diese für den Test notwendig sind. Daher diente die nächste Versuchsreihe der Klärung der Frage, wie gut die mit Hilfe des Durchflusszytometers nachgewiesene Bakterienzahl mit der kulturell nachweisbaren Bakterienzahl übereinstimmt. Im Durchflusszytometer können Erregerzahlen  $\geq 10^3$  KBE/mL erkannt werden. Es wurden die kulturell und durchflusszytometrisch ermittelten Bakterienzahlen für  $\geq 10^5$  KBE/mL gegenübergestellt.  $10^5$  KBE/mL in der Kultur entsprechen  $\geq 100$  Bakterien/ $\mu$ L in der Durchflusszytometrie. Wie Abbildung 19 zeigt, konnten in 566 der 2976 untersuchten Kulturen Erregerzahlen von  $\geq 10^5$  KBE/mL festgestellt werden. Davon wurde in 510 Fällen im Durchflusszytometer ebenfalls eine Bakterienzahl  $\geq 10^5$  KBE/mL ermittelt. Dies entsprach einer Sensitivität von 90,1 %. In 290 Urinproben hatte sich die vom UF 5000 gemessene Erregerzahl in der Kultur nicht bestätigt. Daraus ergab sich eine Spezifität von 88 %. Auf Grund der hohen Sensitivität scheint diese Untersuchung als Voruntersuchung für die schnelle Antibiotikaresistenzbestimmung geeignet zu sein.

		Koloniebildende Einheiten in der Kultur		
		$\geq 10^5$	$< 10^5$	
Bakterienzahl Durchflusszytometrie UF 5000	$\geq 10^5$	510	290	800
	$< 10^5$	56	2120	2176
		566	2410	2976

Abb. 19: Koloniebildende Einheiten in der Kultur vs. in der Durchflusszytometrie gefundene Bakterienzahl

### 3.1.6 Gram-Färbung

Das Durchflusszytometer UF 5000 ist, wie in Kapitel 2 beschrieben, in der Lage, mittels Fluoreszenzmarkierung der Bakterien eine Aussage über ihr Gram-Verhalten zu treffen. In dieser Arbeit sollten für die Antibiotikaresistenzbestimmung mittels MALDI-TOF MS nur Gram-negative Bakterien untersucht werden, daher sollte der Gram-negativ *flag* als Einschlusskriterium für die MALDI-TOF MS Studie dienen. Im Folgenden wird dargestellt, inwieweit man von dem Gram-*flag* des Gerätes auf das Gram-Verhalten der in der Kultur gewachsenen Bakterien schließen kann. Dieser Vergleich wurde gewählt, weil es für die schnelle Antibiotikaresistenztestung mittels MALDI-TOF MS wichtig ist, dass das Gram-Verhalten der Bakterien, das vom UF 5000 bestimmt wurde, mit den kulturell wachsenden Bakterien übereinstimmt und es sich nicht um tote Bakterien handelt. Ein Gram-*flag* wurde vom UF 5000 nur dann gesetzt, wenn mehr als 100 Bakterien/ $\mu\text{L}$  nachgewiesen werden konnten und somit eine Bakterienzahl von  $> 10^5$  KBE/mL vorlag. Des Weiteren fanden Kulturen keine Berücksichtigung, die kein Wachstum oder nur Schleimhautflora oder Mischflora enthielten. Insgesamt wurden 543 Urinproben untersucht.

Abbildung 20 zeigt den Unterschied in den Scattergrammen zwischen Proben mit einem Gram-negativen und einem Gram-positiven *flag*.

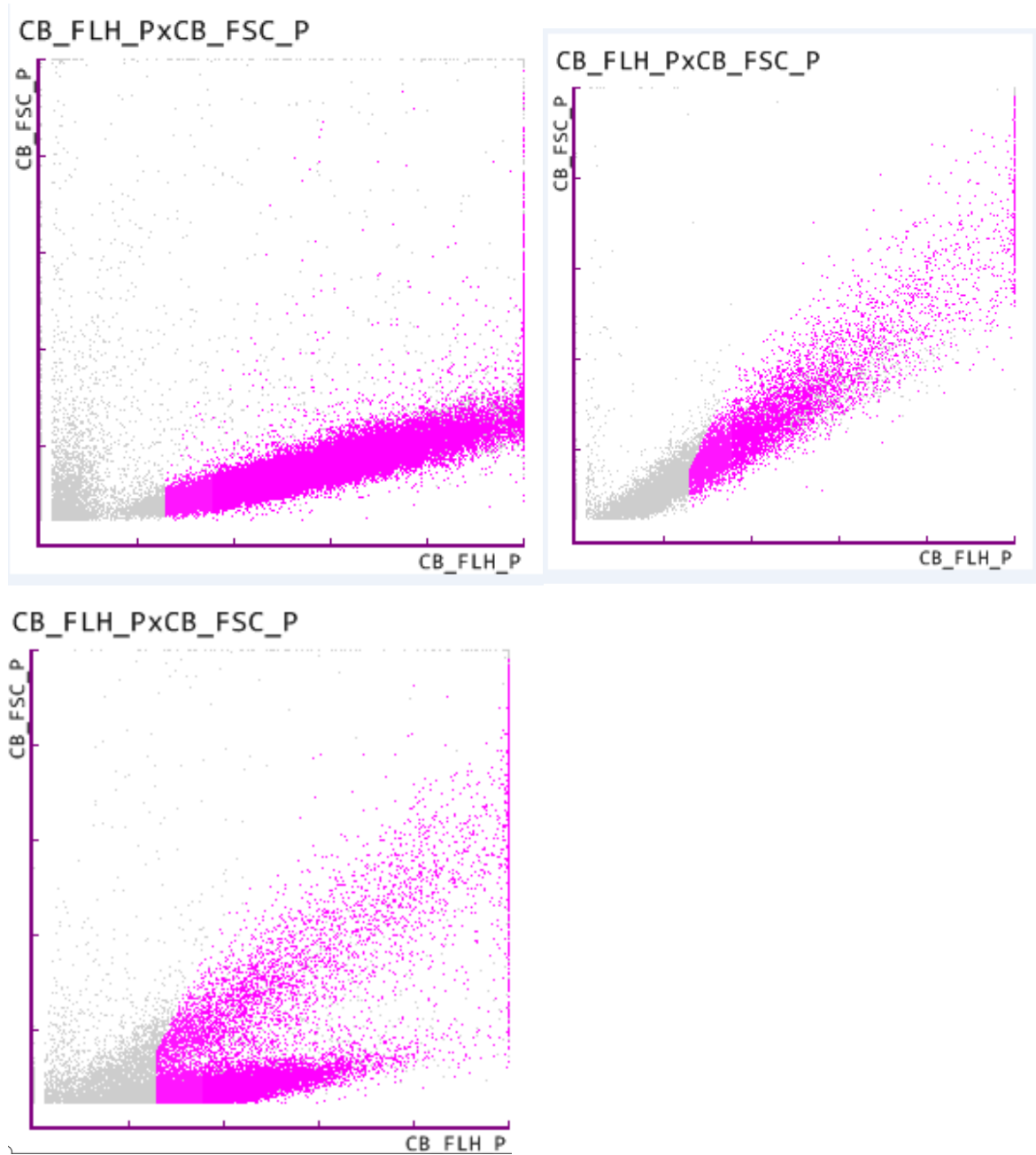


Abb. 20: Scattergramm eines Urins mit Gram-negativem *flag* (links oben), Gram-positivem *flag* (rechts oben) und Gram-positiv/Gram-negativ *flag* (links unten)



		Gram-Verhalten der in der Kultur kultivierten Erreger $\geq 10^5$		
		Gram-positiv	Gram-negativ	
Gram-flag Durchflusszytometrie UF 5000	Gram-positiv	103	21	124
	Gram-negativ	4	246	250
		107	267	

**Abb. 21: Gram-Verhalten der in der Kultur gefundenen Erregern gegenüber dem Gram-flag des UF 5000**  
Dabei wurden nur Urine mit Nachweis lediglich eines Erregers in die Auswertung eingeschlossen. Urine mit sowohl Gram-positiven als auch Gram-negativen Erregern mit  $\geq 10^5$  KBE/mL und Urine mit Gram-positiv/negativ *flag* sind in dieser Abbildung nicht enthalten.

In der Abbildung 21 sind die Ergebnisse des Vergleichs zwischen der Kultur und den Gram-flags des UF 5000 dargestellt. Hierbei wurden nur Urine verwendet, in denen entweder nur Gram-positive oder nur Gram-negative Erreger nachgewiesen werden konnten. Von den 250 Urinproben, in denen ein Gram-negativ *flag* gesetzt worden ist, konnte in 98,4 % mind. ein Gram-negativer Erreger in der Kultur gefunden werden. Beim Gram-positiv *flag* lag die Übereinstimmung bei 83,1 %. Daraus ergab sich eine Rate falsch klassifizierter Urine von 1,6 % für den Gram-negativ *flag* und 16,9 % für den Gram-positiv *flag*.

Insgesamt wurde bei den Untersuchungen - Gram-negative und Gram-positive Erregermischungen mit einbezogen - nur in 6 Fällen ein Gram-negativ *flag* beobachtet, das sich nicht in der Kultur bestätigen ließ. 35-mal wurde in der Kultur ein Gram-negativer Erreger gefunden, der Urin aber zuvor vom UF 5000 nicht mit einem Gram-negativ *flag* versehen worden war. 7 Erreger wurden als unklassifiziert herausgegeben, der Rest als Gram-positiv. 77 Gram-positive Erreger wurden vom Durchflusszytometer nicht erkannt und somit nicht mit einem Gram-positiv-*flag* versetzt, 55 davon wurden als unklassifiziert herausgegeben. Dabei hatten 8 über 100 Bakterien/ $\mu$ L. 47-mal wurde ein Gram-positiver *flag* gesetzt, der sich in der Kultur nicht bestätigen ließ.

Durch die insgesamt sehr gute Vorhersagekraft des Gram-negativ *flags* eignet sich die Durchflusszytometrie, um eine Vorauswahl der Urine für die Antibiotikaresistenzbestimmung von Gram-negativen Bakterien mittels MBT-ASTRA Assay zu treffen.

### 3.1.6 Zusammenfassung

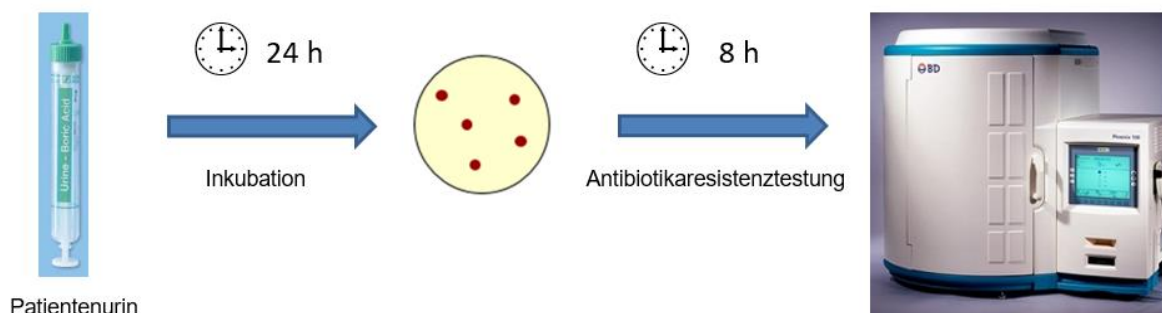
Insgesamt ließ sich eine gute Übereinstimmung der manuellen Methoden mit dem vollautomatischen klinisch-chemischen Urinanalysesystem UC 3500 und dem Durchflusszytometer UF 5000 der Firma Sysmex finden. Eine Verbesserung der Urindiagnostik unter Bezugnahme auf die Leukozyturie wäre mittels dieser Untersuchungsmethoden möglich.

Die Untersuchung einer Urinprobe auf eine Leukozyturie ließ keinen sicheren Rückschluss auf den späteren kulturellen Nachweis eines uropathogenen oder potenziell uropathogenen Erregers zu und ist somit alleine nicht als Screening-Methode für die Auswahl von Urinen für die Antibiotikaresistenzbestimmung mittels MADLI-TOF MS geeignet. Zusammen mit den Gram-*flags* und der Bakterienzahl scheint die Durchflusszytometrie eine gute Möglichkeit für eine Vorauswahl der Urine mittels automatischer Untersuchung darzustellen.

### 3.2 Ergebnisse der Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS vorgestellt, die bereits Eingang in eine Publikation gefunden haben. (29) Der momentane Standard der mikrobiologischen Untersuchung von Urinproben besteht aus einer kulturellen Anzucht der Erreger und Beurteilung der Kulturplatten nach 24 Stunden Bebrütungszeit. Nach dieser Inkubation ist eine Identifikation der Erreger möglich und eine Testung auf Antibiotikaresistenzen wird angeschlossen. Diese dauert weitere 8-24 Stunden. Bis das abschließende Ergebnis vorliegt, vergehen daher ca. 48 Stunden. Die Abbildung 22 zeigt einen Vergleich der Zeitdauer der konventionellen Urindiagnostik und der möglichen Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS (MBT-ASTRA Assay). Das Ziel der Arbeit war es, direkt aus Urinen mit einer Inkubationszeit von nur ca. 4,5 Stunden ein Antibiotogramm zu erstellen und so eine Beschleunigung der Antibiotikaresistenztestung zu erreichen.

#### Konventionelle Antibiotikaresistenzbestimmung



#### Antibiotikaresistenzbestimmung mittels MBT-ASTRA Assay



**Abb. 22: Zeitlicher Ablauf der konventionellen Urindiagnostik und des MBT-ASTRA Assay (29)**

Mit Hilfe des MBT-ASTRA Assay wird die Proteinproduktion von Bakterien semiquantitativ beurteilt. Dazu wurden Urinproben abzentrifugiert und bei 37 °C mit und ohne Antibiotikum inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden wurden

die Bakterien lysiert und auf ein MALDI-Target aufgetragen. Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden Spektren generiert und anschließend durch die MALDI Biotyper MBT-ASTRA Prototype Software der Fa. Bruker Daltonik ausgewertet. Dabei wurde bei der Auswertung ein Grenzwert der berechneten AUC (*area under the curve*) bei 0,05 zu Grunde gelegt. Es folgte eine Klassifizierung der Bakterien in sensibel und resistent. Abbildung 23 verdeutlicht den Ablauf des MBT-ASTRA Assay schematisch. In dieser Studie wurden die 6 Antibiotika Cefuroxim, Ciprofloxacin, Cotrimoxazol, Fosfomycin, Meropenem und Nitrofurantoin getestet. Die verwendeten Antibiotika werden teils zur Behandlung eines unkomplizierten Harnwegsinfekts und teils für die Therapie einer Pyelonephritis eingesetzt.

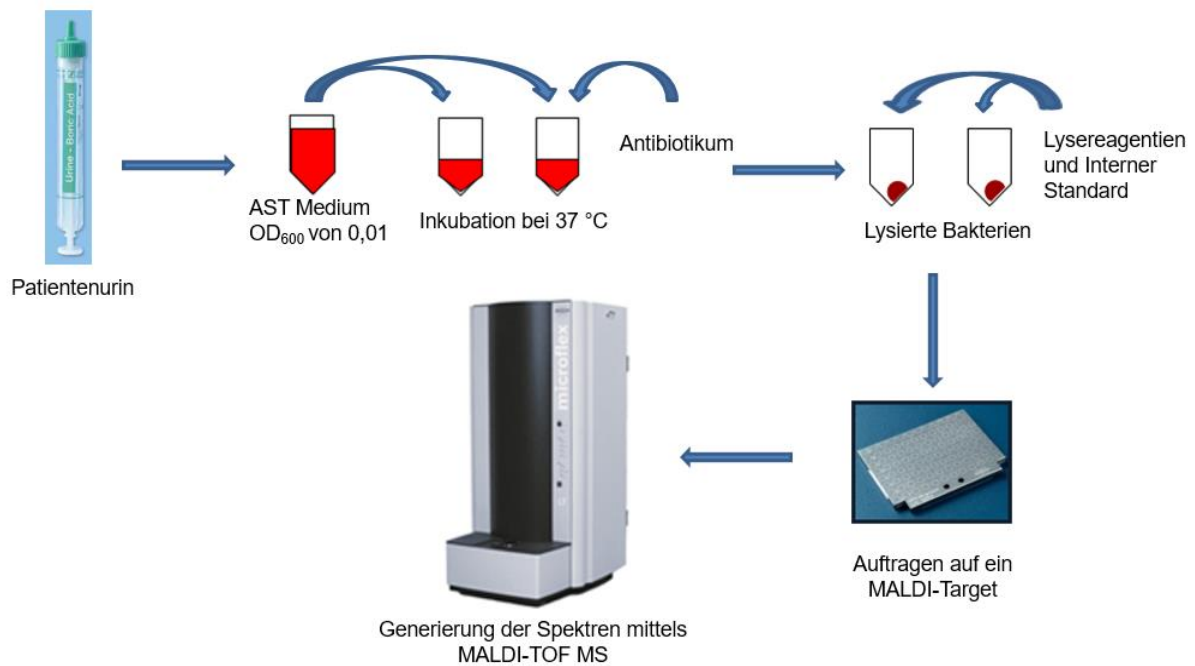


Abb. 23: Ablauf des MBT-ASTRA Assay (29)

### 3.2.1 Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Breakpoint MHK-Wert gemäß EUCAST (v. 10.0) in mg/l (7)	Konzentration im Ansatz in mg/l
<b>Cefuroxim</b>	8	32
<b>Ciprofloxacin</b>	0,5	0,5
<b>Cotrimoxazol</b>	4	8
<b>Fosfomycin</b>	32	64
<b>Meropenem</b>	8	8
<b>Nitrofurantoin</b>	64	64

Tab. 8: Verwendete Antibiotikakonzentrationen für den MBT-ASTRA Assay

In einem ersten Schritt erfolgte eine Kalibrierung des Testsystems für alle zu testenden Antibiotika mit einer Austitrierung der Konzentration des Antibiotikums im Probenansatz, bei dem eine korrekte Resistenzbestimmung gelang. Wie im Kapitel 2 beschrieben, wurden hierfür bekannt sensible und resistente Erreger aus der Routinediagnostik verwendet. Als Test-Erreger dienten *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* und *Serratia marcescens*. In ersten Experimenten zur Näherung an die effizienten Testkonzentrationen wurden die Breakpoint MHK-Konzentrationen verwendet, wie sie von dem EUCAST (v. 10.0) angegeben werden (7). Für Ciprofloxacin, Meropenem und Nitrofurantoin konnte so bereits eine richtige Unterscheidung zwischen sensiblen und resistenten Erregern getroffen werden. Für die anderen Antibiotika wurden die Konzentrationen jeweils verdoppelt, bis eine Klassifikation der Erreger in sensibel und resistent möglich war. Aus Tabelle 8 können die jeweiligen Ergebnisse und Konzentrationen für die weiteren Versuche entnommen werden. Die angegebenen Breakpoint MHK-Konzentrationen beziehen sich auf Enterobacterales. Die ebenfalls Gram-negativen Pseudomonaden sind nicht berücksichtigt, da hier die Bebrütungszeit von 2,5 Stunden nicht ausreichte, um bei der MALDI-TOF MS eine positive Wachstumskontrolle zu erhalten (42).

### 3.2.2 Resistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay

#### 3.2.2.1 Übersicht

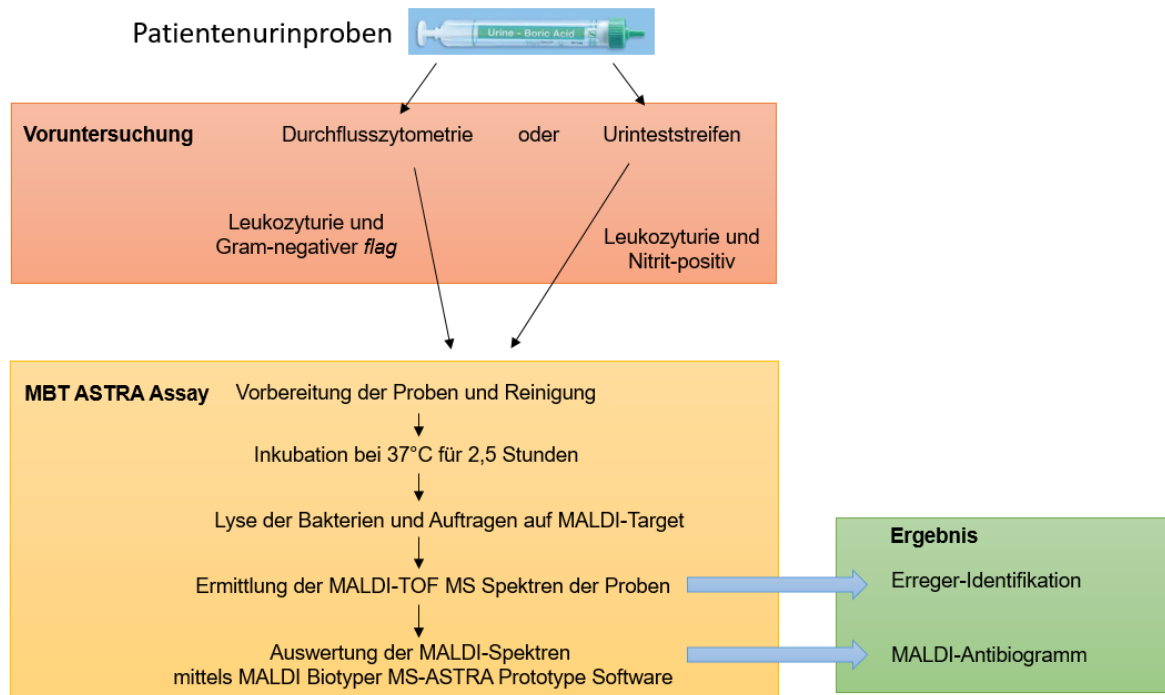
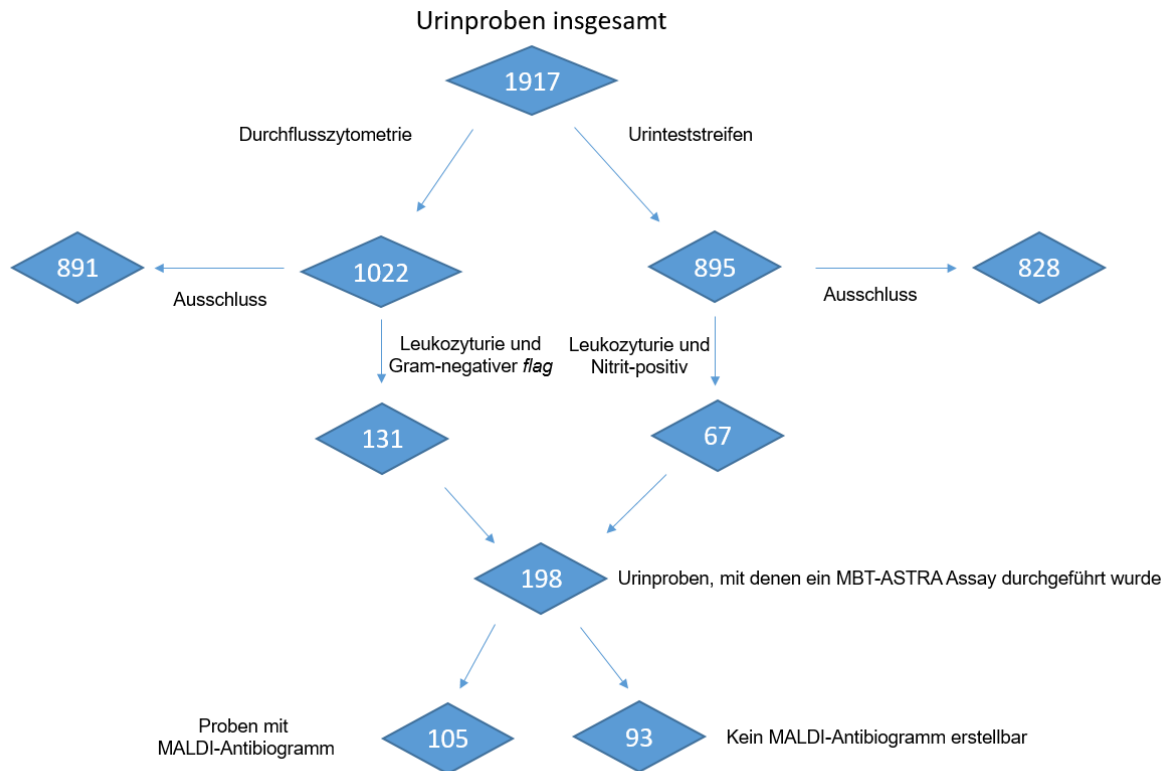


Abb. 24: Arbeitsablauf MBT-ASTRA Assay inklusive der Voruntersuchungen

In Abbildung 24 ist der gesamte Arbeitsablauf von der Patientenurinprobe bis zum schlussendlichen Ergebnis des Antibiogramms dargestellt. Auf Grund der fehlenden Automatisierung des hier verwendeten Tests war zunächst eine Voruntersuchung der Urine nötig. Hierzu erfolgte ein Screening auf Urine, die Gram-negative Erreger enthielten. Als Marker wurde der Gram-negativ *flag* des UF 5000 bzw. ein positiver Nachweis von Nitrit verwendet. Da des Weiteren nur Urine mit einer tatsächlichen Infektion untersucht werden sollten, wurden die Urinproben außerdem auf das Vorhandensein einer Leukozyturie hin untersucht. So konnten Urine mit Erregern auf Grund einer Kolonisation oder Kontamination ausgeschlossen werden. Anhand der Spektren in der Wachstumskontrolle war eine Erregeridentifikation mittels MALDI-TOF MS möglich. Das Antibiogramm wurde dann mittels Auswertung durch die MALDI Biotyper MBT-ASTRA Prototype Software erstellt (im Folgenden als MALDI-Antibiogramm bezeichnet) (34), analog wie es in vorherigen Einsatz zur direkten Resistenztestung aus positiven Blutkulturen genutzt wurde (33).

Insgesamt wurden 1917 Urine voruntersucht; 1022 mittels Durchflusszytometrie und 895 mittels Urinteststreifen. Mit Hilfe der oben beschriebenen Kriterien konnten 198 Urine gefunden werden, die mittels MBT-ASTRA Assay untersucht wurden (Abb. 25).



**Abb. 25: Flussschema der Probenauswahl mit daraus resultierenden Ergebnissen (29)**

Von den 198 mittels MBT-ASTRA Assay untersuchten Urinproben konnte in 105 Fällen ein MALDI-Antibiogramm erstellt werden. Dabei wurde in 95 Urinen jeweils ein schnellwachsender Gram-negativer Erreger gefunden. In 10 Fällen ließen sich mehrere Erreger nachweisen. Tabelle 9 zeigt die als Monokultur gefundenen Erreger.

Erreger	Anzahl Urine
<i>E. coli</i>	66
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
<i>Proteus mirabilis</i>	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Citrobacter koseri</i>	1
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	1

**Tab. 9: Erreger mit MALDI-Antibiogramm** Urine mit mehreren Gram-negativen Erregern sind nicht berücksichtigt. (29)

In 93 Fällen konnte kein MALDI-Antibiogramm erstellt werden. Die Tabellen 10 und 11 zeigen eine Übersicht der in diesen Proben kulturell nachgewiesenen Erreger.

	Erreger	Anzahl	Bemerkung
<b>Bewertung mittels MALDI in 2,5 Stunden Inkubationszeit nicht möglich</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	
	Mischflora und Schleimhautflora	12	5 davon 10 <sup>3</sup> KBE/mL
	kein Wachstum	8	
	<i>Candida albicans</i>	4	
	<i>Corynebacterium species</i>	3	
	<i>Enterococcus faecium</i>	2	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
	<i>Gram-negative Stäbchen</i>	1	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	
	<i>Lactobacillus species</i>	1	
<b>Summe</b>		<b>46</b>	

**Tab. 10: Erreger ohne MALDI-Antibiogramm** I Übersicht über die in der Kultur gefundenen Erreger aus Urinen, aus denen kein Antibiotogramm mittels MALDI-TOF MS generiert werden konnte, weil man kein Wachstum innerhalb von 2,5 Stunden erwarten würde



Dabei zeigt die Tabelle 10 diejenigen der 93 Isolate, deren Spezies aufgrund ihres bekannt langsamen Wachstums innerhalb der 2,5 Stunden Inkubationszeit keine aussagekräftigen Wachstum-Differenzen im MBT-ASTRA Assay erwarten ließen. Unter diesen 46 Fällen war *Pseudomonas aeruginosa*, der in 13 Urinproben gefunden wurde, am häufigsten. In acht Urinproben konnte trotz Bakterien- und Leukozyturie-Nachweis in der Durchflusszytometrie kein kulturelles Wachstum nachgewiesen werden.

	Erreger	Anzahl	Bemerkung
<b>Bewertung mittels MALDI in 2,5 Stunden Inkubationszeit möglich</b>	<i>E. coli</i>	34	8 davon 10 <sup>4</sup> KBE/mL 10 davon Hemmstoffe
	<i>Enterobacter cloacae</i>	4	1 davon Hemmstoffe
	<i>Proteus mirabilis</i>	4	1 davon 10 <sup>4</sup> KBE/mL 1 davon Hemmstoffe
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1 davon 10 <sup>3-4</sup> KBE/mL
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> und <i>Citrobacter freundii</i>	1	1 davon Hemmstoffe
	<i>Serratia marcescens</i>	1	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	
<b>Summe</b>		<b>47</b>	

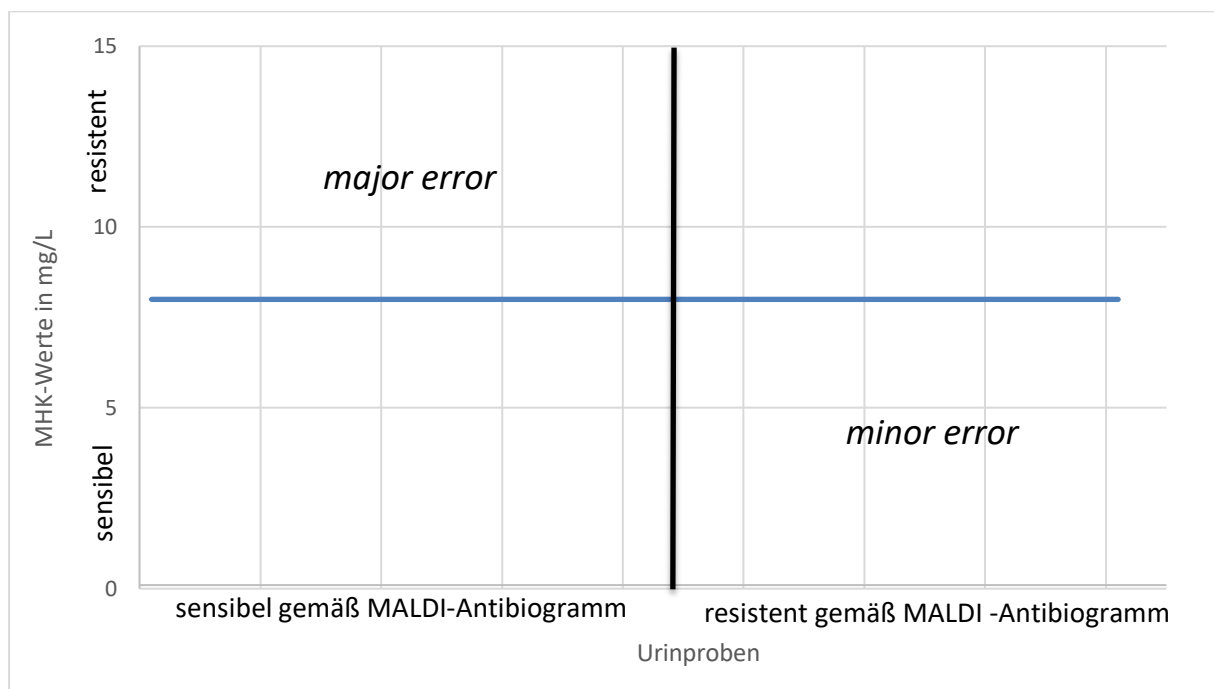
**Tab. 11: Erreger ohne MALDI-Antibiogramm II** Übersicht über die in der Kultur gefundenen Erregern aus Urinen, aus denen kein Antibiotogramm mittels MALDI-TOF MS generiert werden konnte, obwohl man ein Wachstum innerhalb von 2,5 Stunden erwarten würde

Tabelle 11 zeigt dagegen Erreger aus 47 Urinproben, bei denen man ein Antibiotogramm mittels MALDI-TOF MS in der Inkubationszeit von 2,5 Stunden erwartet hätte. In 10 Fällen lag die Erregerzahl bei < 10<sup>5</sup> KBE/mL und damit unter der für den MBT-ASTRA Assay üblich eingesetzten Erregerzahl. In 13 Fällen ließen sich zudem Hemmstoffe

nachweisen, die auf eine Behandlung des Patienten mit Antibiotika hinweisen und die Wachstumseigenschaften der Bakterien im MBT-ASTRA Assay negativ beeinflussen.

Bei den durchflusszytometrisch untersuchten Urinen ergaben sich für Urine, bei denen der MBT-ASTRA Assay funktioniert hat, eine mediane Leukozytenzahl von 450,3 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  und eine mediane Bakterienzahl von 19604,4 Bakterien/ $\mu\text{L}$ . Dahingegen lagen die Mediane bei Urinen, bei denen ein Antibiogramm mittels MBT-ASTRA Assay nicht möglich war, bei 494,4 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  und 3976,6 Bakterien/ $\mu\text{L}$ . Bei den Proben mit Erregern, bei denen ein erfolgreiches Antibiogramm zu erwarten wäre, lagen die medianen Leukozytenzahlen bei 798,3 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  und die medianen Bakterienzahlen bei 4552,2 Bakterien/ $\mu\text{L}$ .

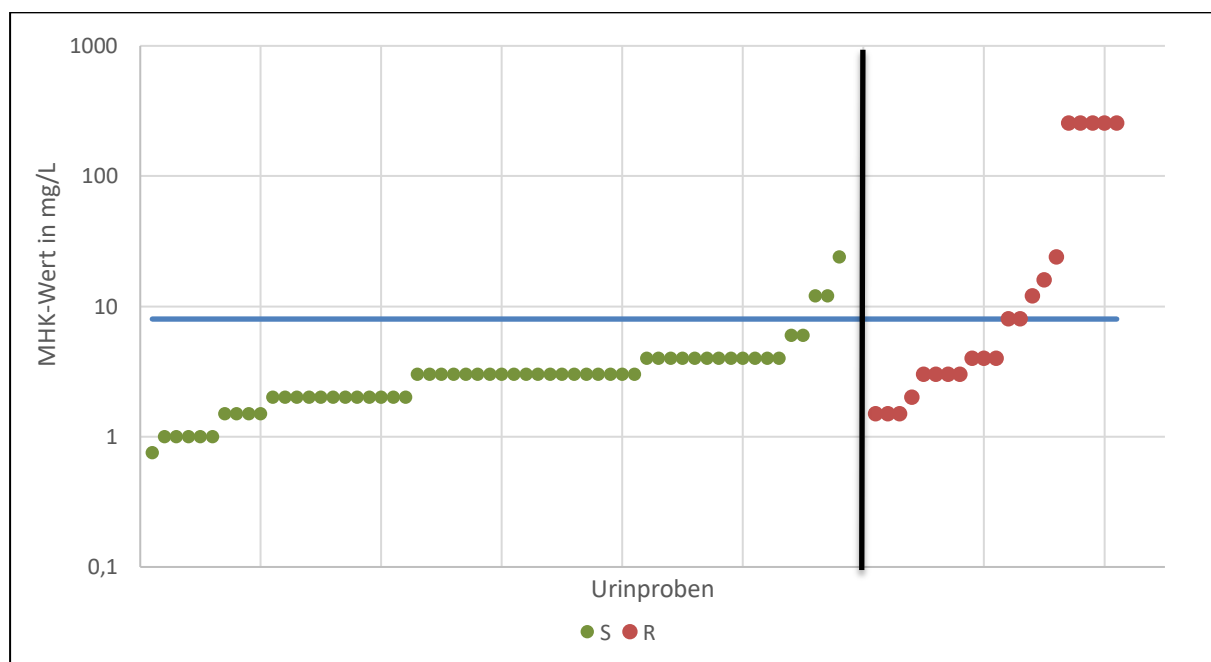
Abbildung 26 zeigt schematisch den Aufbau der nachfolgenden Diagramme.



**Abb. 26: Schematische Darstellung der nachfolgenden Diagramme** Auf der X-Achse ist das MALDI-AST Ergebnis und auf der Y-Achse der MHK-Wert des MHK-Teststreifens dargestellt. Resistente und sensible MALDI-AST Ergebnisse sind durch die schwarze Linie getrennt. Der Breakpoint des MHK-Werts wird durch die blaue Linie gekennzeichnet. Ergebnisse im linken unteren und im rechten oberen Quadranten stellen richtig klassifizierte Proben dar, während sich falsch-sensible Ergebnisse (*major errors*) im linken oberen Quadranten und falsch-resistente Ergebnisse (*minor errors*) im rechten unteren Quadranten darstellen.

## 3.2.2.2 Cefuroxim

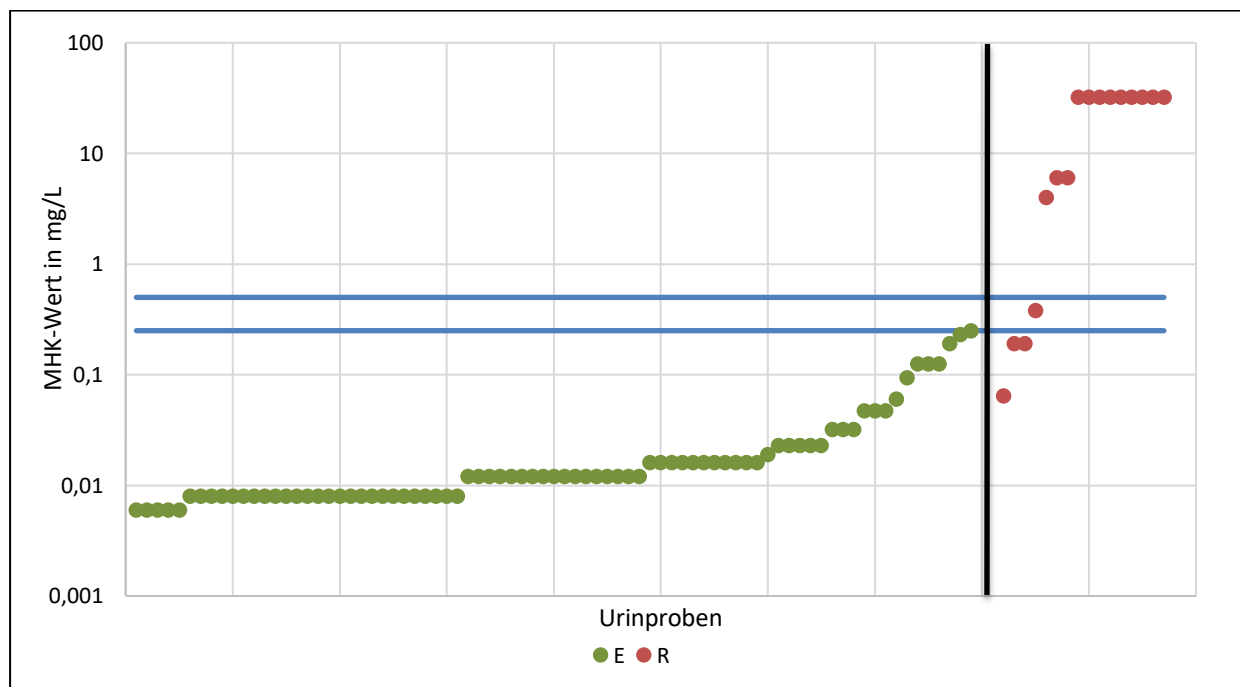
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Antibiogramme für Cefuroxim mittels MBT-ASTRA Assay dargestellt. Dabei gibt es laut EUCAST nur für *E. coli*, *Klebsiella* spp. (außer *Klebsiella aerogenes*), *Raoultella* species und *Proteus mirabilis* MHK-Breakpoints (7) und nur diese Erreger gingen in die Auswertung ein. Insgesamt wurden von 11 resistenten Erregern 8 durch den MBT-ASTRA Assay als resistent herausgegeben. Dadurch lag die Rate richtig als resistent bestimmter Isolate bei 72,7 %. Bei 3 *E. coli*-Isolaten kam ein falsch sensibles Ergebnis zustande. Bei diesen Erregern lagen die MHK-Werte einmal bei 24 und zweimal bei 12 mg/L und damit knapp über dem MHK-Breakpoint von 8 mg/L. Von 68 Erregern, die einen MHK-Wert unter dem Breakpoint aufgewiesen haben, wurden 55 auch durch den ASTRA Assay als sensibel klassifiziert, weshalb die Rate richtig-sensibel bestimmter Isolate 80,9 % betrug. In 13 Fällen war das Ergebnis falsch resistent. Dabei handelte es sich 9-mal um *E. coli*, 3-mal um *Klebsiella oxytoca* und einmal um ein *Proteus mirabilis*-Isolat. Die zwei Erreger mit einem grenzwertigen MHK-Wert bei 8 mg/L wurden nochmals mittels MHK-Teststreifen wiederholt, im Wert bestätigt und gingen als sensibel in die Bewertung ein. Abbildung 27 zeigt die MALDI-Antibiogrammergebnisse im Vergleich zu den MHK-Werten, die durch die MHK-Teststreifen ermittelt wurden.



**Abb. 27: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Cefuroxim** Jeder Urinprobe (auf der X-Achse) ist der jeweilige MHK-Wert des MHK-Teststreifens (auf der Y-Achse) zugeordnet. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Urinprobe. Grüne Punkte zeigen ein sensibles Ergebnis und rote Punkte ein resistentes Ergebnis des MBT-ASTRA Assay an (getrennt durch schwarze Linie). Der Breakpoint des MHK-Werts liegt bei 8 mg/L (blaue Linie). (29)

### 3.2.2.3 Ciprofloxacin

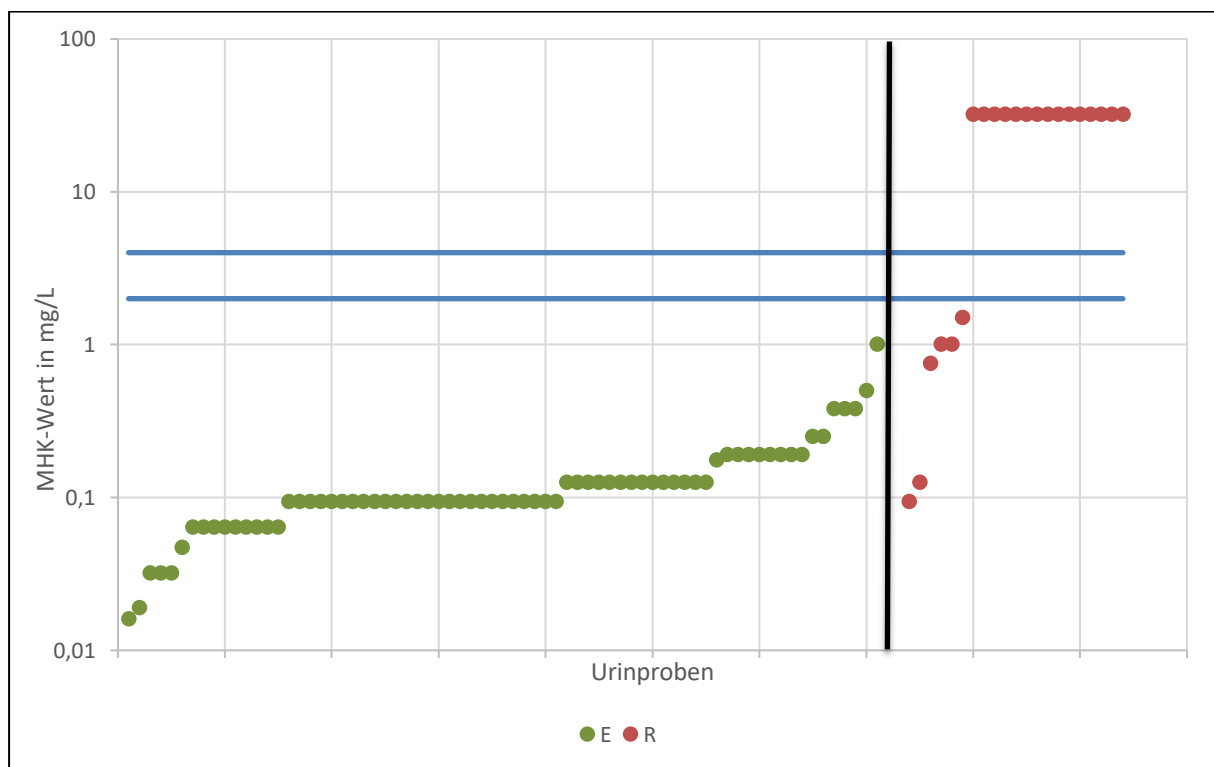
Es wurden 95 Urine mittels MBT-ASTRA Assay auf eine Resistenz der Erreger gegen Ciprofloxacin getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Dabei wurden 12 mittels konventioneller Resistenztestung resistent getestete Isolate auch durch den MBT-ASTRA Assay resistent klassifiziert. Dies entsprach einer Rate richtig-resistent klassifizierter Isolate von 100 %. Einer der Erreger, der mittels MALDI-TOF MS als resistent getestet wurde, zeigte in der MHK-Bestimmung mittels MHK-Teststreifen ein intermediäres Ergebnis. Dieses ging als sensibel in die Auswertung ein. In der MHK-Testung wurden 83 Erreger sensibel bestimmt. In der Resistenztestung mittels MALDI-TOF MS wurden davon 79 als sensibel klassifiziert. Dies ergab eine Rate richtig-sensibel bestimmter Isolate von 95,2 %. 4 wurden resistent getestet. Bei zwei Erregern zeigten sich ein MHK-Ergebnis von 0,25 mg/L, was genau dem Grenzwert entspricht. Bei einer Wiederholung des Testes konnte ein Wert bestätigt werden, der andere zeigte mit 0,38 mg/L ein intermediäres Ergebnis.



**Abb. 28: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammresultate in den Urinproben für Ciprofloxacin** Jeder Urinprobe (auf der X-Achse) ist der jeweilige MHK-Wert des MHK-Teststreifens (auf der Y-Achse) zugeordnet. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Urinprobe. Grüne Punkte zeigen ein sensibles Ergebnis und rote Punkte ein resistentes Ergebnis des MBT-ASTRA Assay an (getrennt durch schwarze Linie). Die Breakpoints der MHK-Werte liegen bei 0,25 und 0,5 mg/L (blaue Linien). (29)

### 3.2.2.4 Cotrimoxazol

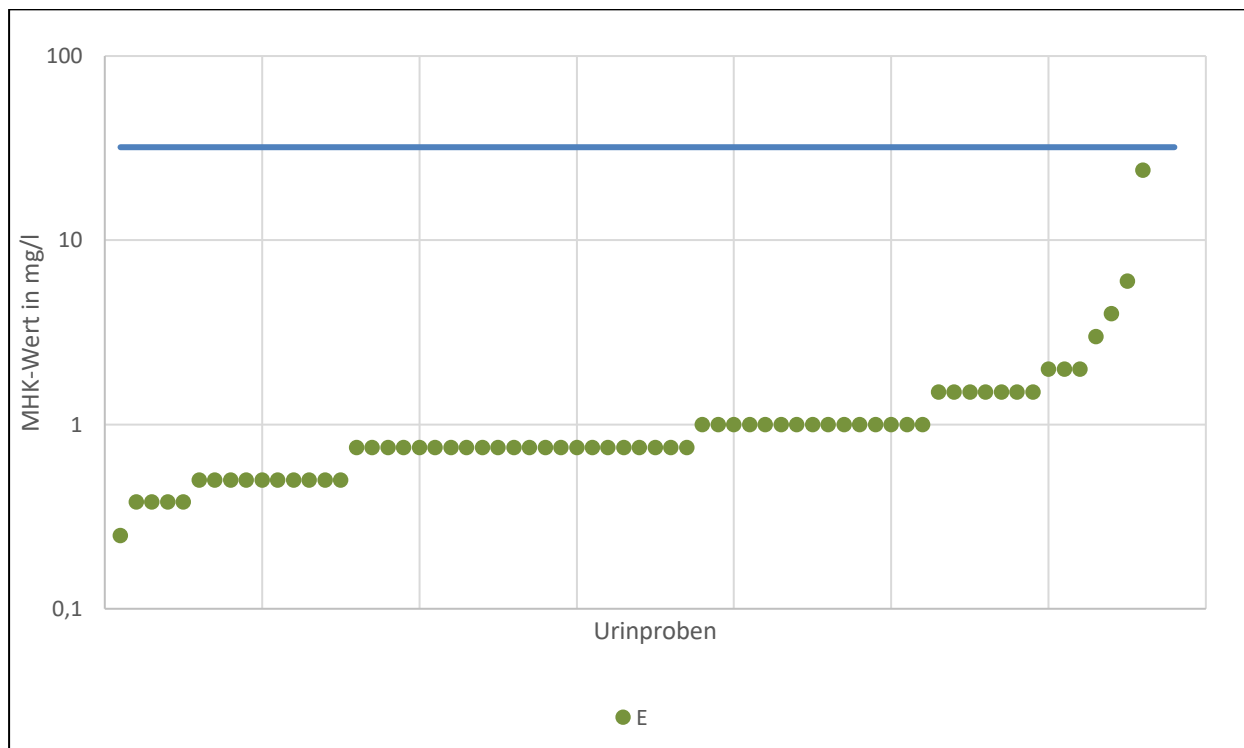
Insgesamt erfolgte eine Untersuchung von 92 Urinproben mit Hilfe des MBT-ASTRA Assay bezüglich einer Resistenz gegen Cotrimoxazol. Dabei wurden alle 15 mittels MHK-Bestimmung resistenten Erreger auch vom MBT-ASTRA Assay als resistent gewertet, was einer Rate richtig resistenter klassifizierter Isolate von 100 % führte. Insgesamt wurden, wie in Abbildung 29 dargestellt, von den 76 sensiblen Erregern 6 fälschlicherweise als resistent erkannt. Dies ergab eine Rate richtig sensibel getesteter Proben von 92,1 %. Bei den 6 falsch klassifizierten Isolaten handelte es sich 4-mal um *E. coli* und jeweils einmal um *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter cloacae*.



**Abb. 29: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammresultat in den Urinproben für Cotrimoxazol** Jeder Urinprobe (auf der X-Achse) ist der jeweilige MHK-Wert des MHK-Teststreifens (auf der Y-Achse) zugeordnet. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Urinprobe. Grüne Punkte zeigen ein sensibles Ergebnis und rote Punkte ein resistentes Ergebnis des MBT-ASTRA Assay an (getrennt durch schwarze Linie). Die Breakpoints der MHK-Werte liegen bei 2 und 4 mg/L (blaue Linien). (29)

### 3.2.2.5 Fosfomycin

Im Folgenden werden die Ergebnisse des MBT-ASTRA Assay in Bezug auf eine Resistenz der Erreger gegen Fosfomycin dargestellt. Für eine alleinige Anwendung von Fosfomycin bei Harnwegsinfektionen gibt es laut EUCAST nur einen MHK-Breakpoint für *E. coli* (7). Alle 66 mittels konventioneller MHK-Testung sensibel getesteten *E. coli*-Isolate wurden auch mittels MBT-ASTRA Assay richtig klassifiziert, was eine Rate richtig-sensibel getesteter Isolate von 100 % ergab (Abb. 30). Resistente *E. coli*-Isolate konnten in dieser Studie nicht gefunden werden.

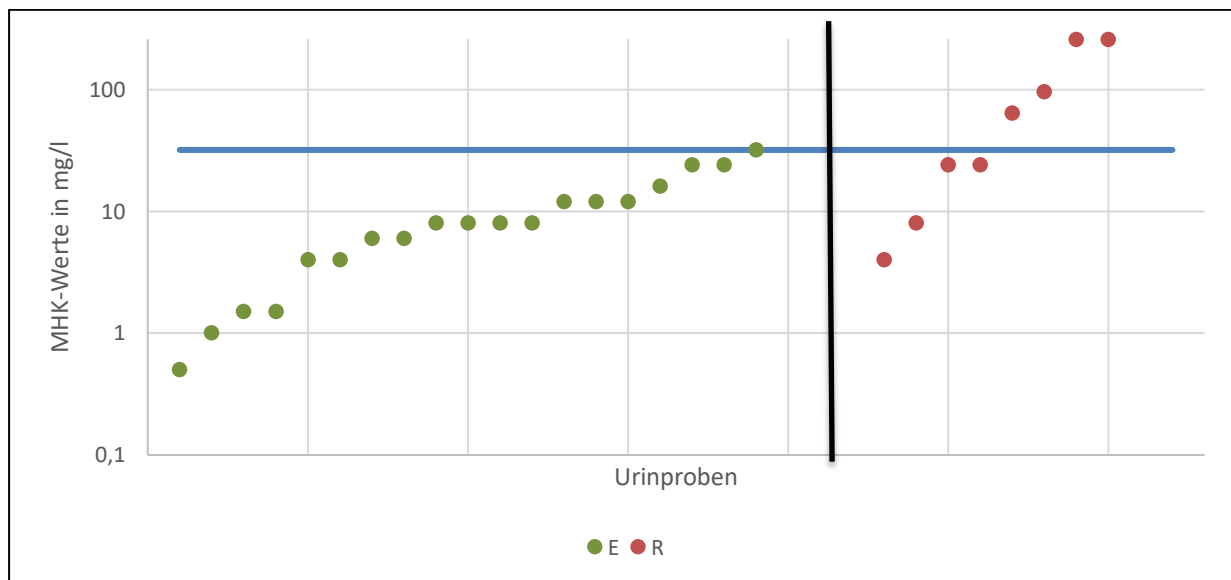


**Abb. 30: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Fosfomycin für *E. coli*** Jeder Urinprobe (auf der X-Achse) ist der jeweilige MHK-Wert des MHK-Teststreifens (auf der Y-Achse) zugeordnet. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Urinprobe. Grüne Punkte zeigen ein sensibles Ergebnis. Die Breakpoints der MHK-Werte liegen bei 32 mg/L (blaue Linie). (29)

Bei schweren Infektionen außerhalb der Harnwege kann Fosfomycin in Kombinationstherapie gegeben werden (43), wofür es MHK-Breakpoints des EUCAST gibt (v. 10.0) (7). Unter Verwendung der Grenzwerte für *E. coli* haben andere Enterobacterales folgende Ergebnisse gezeigt (Abb. 31). Von 6 Urinen, die mittels MHK-Bestimmung resistent getestet worden sind, 5 auch mittels MALDI-TOF MS als resistent klassifiziert. 1 Erreger, es handelte sich um das *Morganella morganii*-Isolat, wurde fälschlicherweise als sensibel bewertet. Von den 23 Erregern, die einen MHK-Wert unter dem Breakpoint ausgewiesen haben, wurden 19 mittels MBT-ASTRA

Assay als sensibel klassifiziert. Bei den 4 falsch-resistent klassifizierten Isolaten handelte es sich zweimal um ein *Klebsiella pneumoniae*-Isolat und jeweils einmal um ein *Enterobacter cloacae*- und ein *Klebsiella oxytoca*-Isolat. Ein Erreger wies einen MHK-Wert von 32 mg/L auf, was dem Breakpoint entspricht. Bei der Wiederholung der MHK-Bestimmung hat sich der Wert bestätigt.

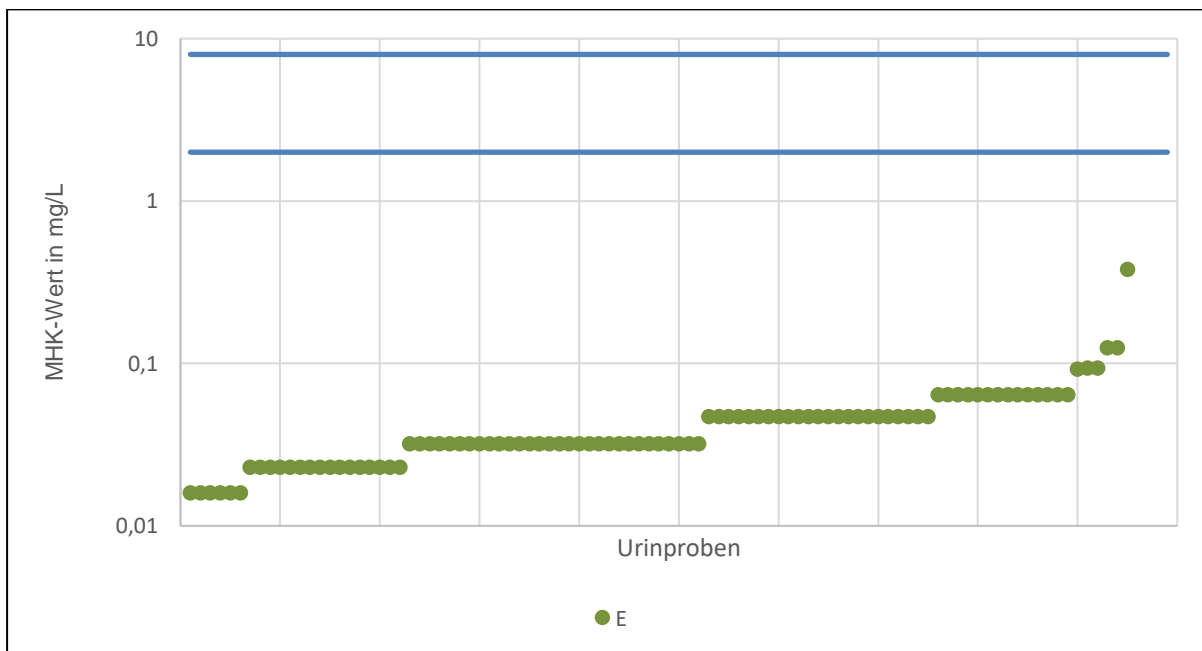
Über alle Enterobacterales hinweg ergab sich eine Rate richtig-sensibler getesteten Isolate von 83,3 % und eine Rate richtig-resistent getesteten Isolate von 95,5 %.



**Abb. 31: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammresultat in den Urinproben für Fosfomycin für Enterobacterales ohne *E. coli*.** Jeder Urinprobe (auf der X-Achse) ist der jeweilige MHK-Wert des MHK-Teststreifens (auf der Y-Achse) zugeordnet. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Urinprobe. Grüne Punkte zeigen ein sensibles Ergebnis und rote Punkte ein resistentes Ergebnis des MBT-ASTRA Assay an (getrennt durch schwarze Linie). Der Breakpoint des MHK-Werts liegt bei 32 mg/L (blaue Linie).

### 3.2.2.6 Meropenem

Insgesamt konnten 95 Urine durch den MBT-ASTRA Assay auf eine Resistenz bezüglich Meropenem untersucht werden. Dabei wurden, wie in Abbildung 32 dargestellt, alle Erreger sensibel getestet, was sich mittels MHK-Bestimmung bestätigen ließ. Dadurch ergab sich eine Rate richtig-sensibel getesteter Isolate von 100 %. In allen untersuchten Urinproben fand sich dabei kein Meropenem-resistenter Erreger, weshalb die Berechnung einer Rate richtig-resistent bestimmter Isolate nicht möglich war.

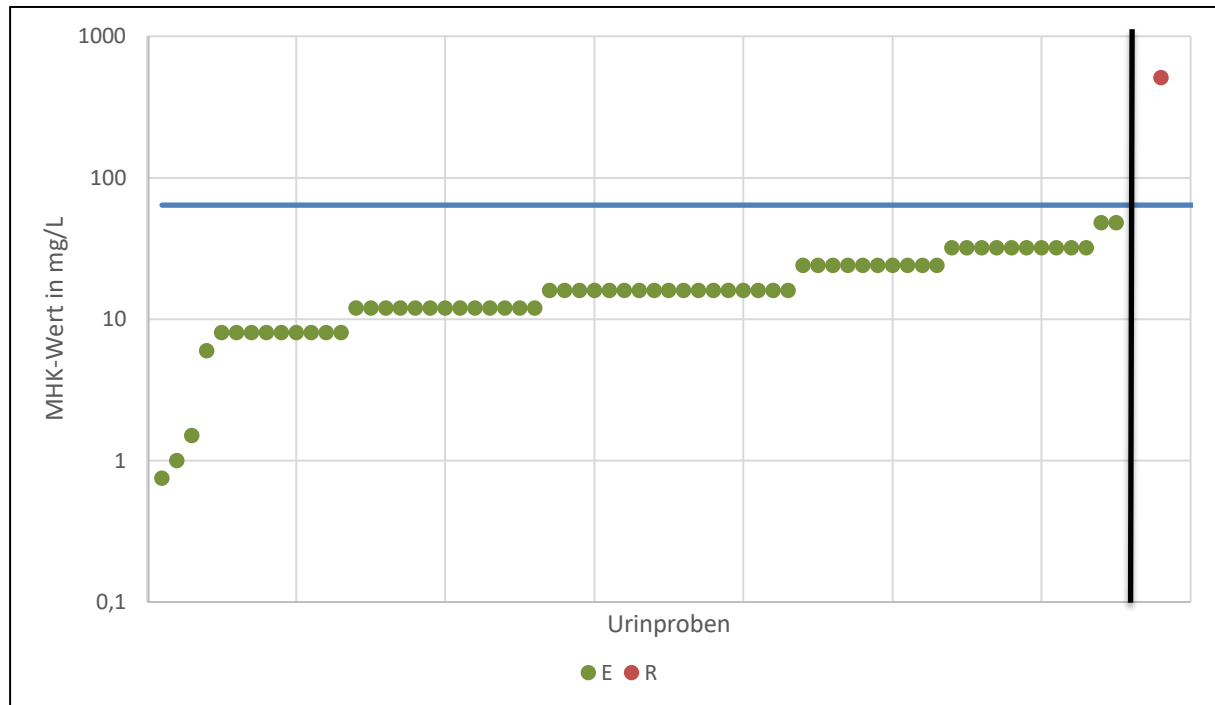


**Abb. 32: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammresultat in den Urinproben für Meropenem** Jeder Urinprobe (auf der X-Achse) ist der jeweilige MHK-Wert des MHK-Teststreifens (auf der Y-Achse) zugeordnet. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Urinprobe. Grüne Punkte zeigen ein sensibles Ergebnis des MBT-ASTRA Assay an. Die Breakpoints der MHK-Werte liegen bei 2 und 8 mg/L (blaue Linien). (29)



### 3.2.2.7 Nitrofurantoin

In den 66 Urinproben mit *E. coli* als Erreger wurde für ein Isolat mittels klassischer Resistenztestung eine Nitrofurantoin-Resistenz nachgewiesen (Abb. 33). In der Resistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay konnte dieses Isolat ebenfalls als resistent klassifiziert werden. Alle anderen 65 Isolate wurden mittels MALDI-TOF MS korrekt als sensibel gegenüber Nitrofurantoin getestet.



**Abb. 33: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Nitrofurantoin für *E. coli***  
 Jeder Urinprobe (auf der X-Achse) ist der jeweilige MHK-Wert des MHK-Teststreifens (auf der Y-Achse) zugeordnet. Dabei repräsentiert jeder Punkt eine Urinprobe. Grüne Punkte zeigen ein sensibles Ergebnis und rote Punkte ein resistentes Ergebnis des MBT-ASTRA Assay an (getrennt durch schwarze Linie). Der Breakpoint des MHK-Werts liegt bei 64 mg/L (blaue Linie). (29)

### 3.2.2.8 Mischkulturen

Bei den insgesamt 10 Urinen, in denen Mischkulturen mit mehreren schnellwachsenden Gram-negativen Erregern nachgewiesen wurden, lagen in 9 Fällen die Bakterien in gleicher Zahl mit  $10^5$  KBE/mL vor. Bei Ciprofloxacin kam es bei dem Vorliegen eines resistenten und eines sensiblen Erregers zu einer sensiblen Bestimmung mittels MBT-ASTRA Assay. Zusätzlich erfolgte in einem Fall trotz zweier sensibler Erreger eine falsch-resistente Bestimmung. Bei Cefuroxim fanden sich trotz des Vorliegens zweier sensibler Erreger 4 falsch-resistente Bestimmungen. Zweimal

ließ sich ein resistenter und ein sensibler Erreger nachweisen, wobei sich jeweils einmal ein resistentes und ein sensibles MALDI-Antibiogramm zeigte. Für Cotrimoxazol und Meropenem kam die Kombination aus einem resistenten und einem sensiblen Erreger nicht vor. Da bei Nitrofurantoin und bei Fosfomycin für Harnwegsinfekte von dem EUCAST (v. 10.0) (7) nur MHK-Werte für *E. coli* angegeben werden, konnte hier kein Vergleich mit nicht-*E. coli*-Isolaten gemacht werden. Legt man die MHK-Breakpoints für Fosfomycin bei anderen Infektionen zu Grunde, konnte in 4 Fällen ein resistenter und ein sensibler Erreger nachgewiesen werden. Hiervon wurde in 3 Fällen ein resistentes MALDI-Antibiogramm erstellt und einmal ein sensibles. Insgesamt zeigte sich damit, dass sich nicht immer der resistente Erreger durchsetzt.

#### *3.2.2.9 Zusammenfassung*

Die Studie konnte zeigen, dass es möglich ist, direkt aus Patientenuurinproben mittels MBT-ASTRA Assay ein Antibiogramm für Enterobacterales innerhalb von ca. 4,5 Stunden zu erhalten. Durch diese Methode konnte die Zeit bis zum Vorliegen eines Antibiogramms im Vergleich zu herkömmlichen Methoden von ca. 48 Stunden auf 4,5 Stunden reduziert und somit ein Antibiogramm am selben Tag erstellt werden. Dabei ließ sich, wenn auch mit Unterschieden zwischen den einzelnen Antibiotika, bei den getesteten Antibiotika eine gute Übereinstimmung zwischen dem mit MALDI-TOF MS generierten Antibiogramm und den jeweiligen MHK-Werten nachweisen.

### 3.3 Zusätzliche Ergebnisse

#### 3.3.1 Hemmstoffe und Bakteriennachweis in Kultur-negativen Urinproben

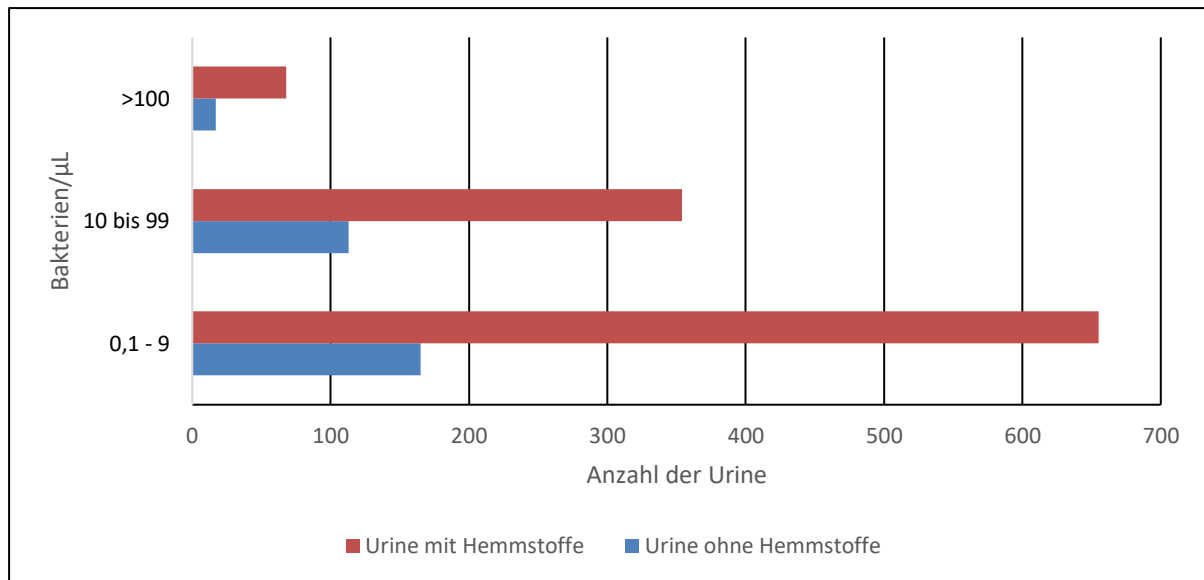
In der Studie fiel auf, dass sich oftmals Bakterien durchflusszytometrisch nachweisen ließen, die in der Kultur nicht angewachsen sind (Abb. 34).

		Durchflusszytometrie Bakterienanzahl		
		0	> 0	
Hemmstoffe bei Kulturergebnis ohne Wachstum	ja	124	1077	1201
	nein	54	295	349
		178	1372	1550

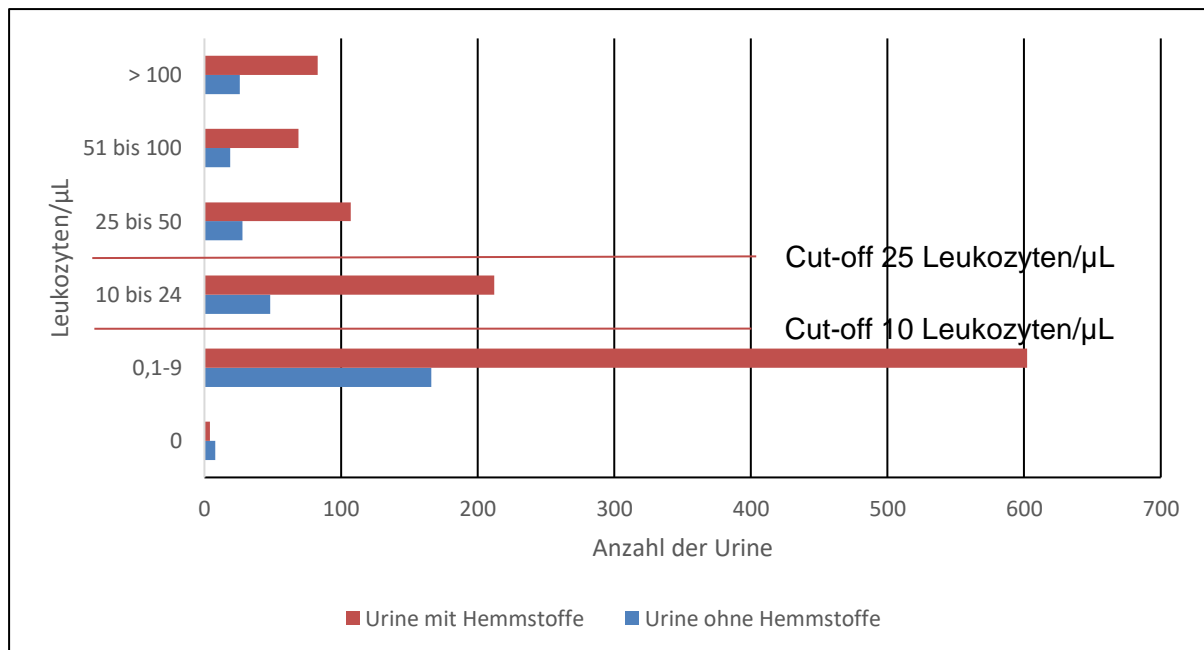
Abb. 34: Bakterienzahl in der Durchflusszytometrie bei fehlendem kulturellem Wachstum in Abhängigkeit von Hemmstoffen

Von 1550 Urinproben ohne kulturelles Wachstum konnten in 1372 Proben mittels Durchflusszytometrie Bakterien nachgewiesen werden. 1077 (78,5 %) dieser 1372 Proben mit durchflusszytometrischem Bakteriennachweis wurden positiv auf Hemmstoffe getestet, deren Gegenwart zu toten oder nicht mehr anwachsenden Bakterien führen kann. In 295 Fällen wurden allerdings keine Hemmstoffe gefunden. Bei 121 dieser Fälle konnte ein Leukozyturie mit  $\geq 10$  Leukozyten/ $\mu\text{L}$  ermittelt werden, was 41 % entsprach. 68 Urinproben wurden aus Dauerkathetern abgenommen. In einer Mittelstrahlurinprobe konnte Nitrit nachgewiesen werden.

Unter allen Urinen ohne kulturelles Wachstum ohne Hemmstoffe, aber mit Nachweis von Bakterien in der Durchflusszytometrie konnte eine mediane Bakterienzahl von 8,2 Bakterien/ $\mu\text{L}$  und eine mediane Leukozytenzahl von 6,8 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  gefunden werden. In den Urinen mit Hemmstoffen lagen die Mediane bei 7,1 Bakterien/ $\mu\text{L}$  und 8 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ . Die Abbildungen 35 und 36 zeigen dabei allerdings eine sehr ähnliche Verteilung sowohl der Bakterien als auch der Leukozyten, wenn man Urine mit und ohne Hemmstoffe vergleicht.



**Abb. 35: Bakterienzahl in der Durchflusszytometrie bei Urinen ohne kulturelles Wachstum mit vs. ohne Hemmstoffe**

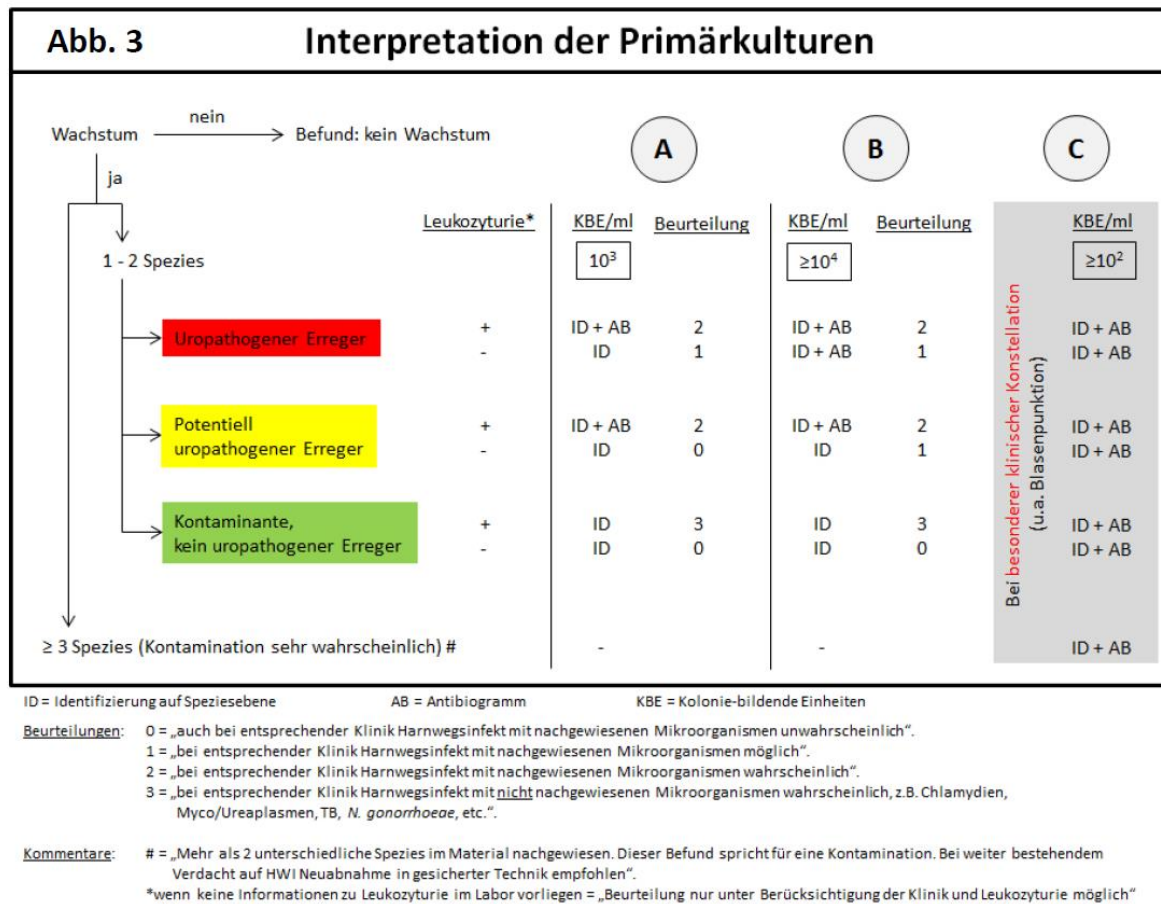


**Abb. 36: Leukozytenzahl bei Urinen mit Bakterien-Nachweis in der Durchflusszytometrie ohne kulturelles Wachstum mit vs. ohne Hemmstoffe**

### 3.3.2 Einsparmöglichkeiten von Antibiogrammen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Mittels des in Abbildung 37 angegebenen Schemas wurde untersucht, ob sich durch ein Hinzuziehen der Leukozyturie in die Entscheidung, ein Antibiogramm zu erstellen, die Anzahl an Resistenztestungen verändert. In der Routinediagnostik wurde bei 685 Urinen für mindestens einen Erreger ein Antibiogramm angefertigt. Nach dem neuen

Schema würde man nur noch bei 620 Urinen ein Antibiogramm anfertigen und damit bei 9,5 % weniger Urinen eine Behandlungsindikation aus Laborsicht stellen. Des Weiteren wären in unserer Studie nur noch 691 einzelne Antibiotikaresistenztestungen, im Gegensatz zu 821 in der Routine durchgeführten Antibiotikaresistenztestungen. Die entspricht einer Reduktion der Anzahl der Antibiotikaresistenztestungen um 15,8 %.



**Abb. 37: Befundungsschema für die Verarbeitung von Urinen nach Leukozytenzahl und Bakterienzahl (6)**

## **4. Diskussion**

Harnwegsinfektionen gehören zu den häufigsten Infektionen (1) und werden sowohl bei stationären als auch bei ambulanten Patienten oft mit Antibiotika behandelt. Dabei wird die Antibiotikatherapie häufig als kalkulierte Therapie begonnen, auf eine gezielte kann dann erst umgestellt werden, wenn das Antibiogramm vorliegt. Dies ist bei einer konventionellen mikrobiologischen Harnwegsdiagnostik nach ca. 48 Stunden der Fall. Je nach verwendetem Antibiotikum, zumindest bei ambulanten Harnwegsinfektionen, erreicht das Ergebnis den behandelnden Arzt erst am Ende der Therapie oder sogar nach der Therapie. In dieser Studie sollte gezeigt werden, dass es auch möglich ist, ein Antibiogramm mit Hilfe eines neuartigen Schnelltests direkt aus Patientenerurinen am Tag des Probeneingangs zu erstellen. Dadurch kann eine schnelle Umstellung von einer kalkulierten Antibiotikatherapie auf eine gezielte erfolgen, oder eine gezielte Antibiose direkt begonnen werden. Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass eine bessere Fokussierung der Diagnostik und damit auch der Therapie von Harnwegsinfektionen möglich ist. Dabei spielt die Leukozyturie eine wichtige Rolle, damit zukünftig nur von solchen Urinen, in denen zytologische Hinweise auf eine Infektion nachweisbar sind, Antibiogramme erstellt und Patienten nicht unnötigerweise mit Antibiotika therapiert werden.

Die Vorteile der konventionellen Resistenztestung liegen darin, dass eine große Zahl von Antibiotika parallel getestet werden kann. Da die konventionelle Antibiotikaresistenzbestimmung zudem auf phänotypischen Testansätzen beruht, ist es möglich eine Aussage über eine Antibiotikaresistenz unabhängig vom Resistenzmechanismus zu treffen (44). Durch die phänotypische Charakterisierung der Erreger kann des Weiteren eine Aussage über die minimale Hemmkonzentration (MHK-Wert) getroffen und daraus eine klinische Konsequenz hinsichtlich der Auswahl des geeignetsten der empfindlich getesteten Antibiotika gezogen werden (44). Dafür ist allerdings neben einer Inkubationszeit für die primäre Anzucht der Erreger eine weitere Inkubation für die Antibiotikaresistenztestung nötig. So dauert es in der Routinediagnostik ca. 48 Stunden bis zum Vorliegen des Ergebnisses (45). Inzwischen gibt es auch viele molekulare Ansätze, um die Antibiotika-Resistenz-Eigenschaften von Infektionserregern zu ermitteln (45). Hier können in sehr kurzer Zeit einzelne Antibiotikaresistenz-vermittelnde Gene der Bakterien nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht für alle Resistenzgene ein Test verfügbar. Außerdem schließt der

fehlende Nachweis eines Resistenzmechanismus eine Resistenz auf Grund eines anderen Mechanismus nicht aus. Dadurch kann es zu falsch-sensiblen Ergebnissen kommen. Ebenso kann der Nachweis eines Resistenzgens ohne oder nur geringer Expression mit einer fehlenden phänotypischen Ausprägung einhergehen und so zu einem falsch-resistenten Ergebnis führen. Daher dienen diese Tests momentan als Zusatzuntersuchung (z.B. bei MRSA oder VRE) und können noch kein vollständiges konventionelles Antibiotogramm ersetzen (44). Neben diesen molekularen Verfahren arbeitet man derzeit an schnellen phänotypischen Antibiotikaresistenztests (46, 47). Ein solcher wurde auch in dieser Studie angewandt.

In der Literatur finden sich vielfältige Ansätze, mittels MALDI-TOF MS Erreger auf Antibiotikaresistenzen zu untersuchen (31, 48, 49). Die MALDI-TOF MS bietet sich dabei besonders an, weil sie in der mikrobiologischen Diagnostik bereits für die Erregeridentifikation routinemäßig eingesetzt wird. Mit Hilfe von klonalen Vergleichen (50) mit hoher Assoziation zum Auftreten bestimmter Resistenzgene, wie z.B. *vanB*-Gen in Enterokokken (11) oder *cfiA*-Gen in *Bacteroides fragilis* (51), konnten mittels MALDI-TOF MS Resistenz-Genotypen nachgewiesen werden. Auch konnten bereits phänotypische Resistenzbestimmungen mittels MALDI-TOF MS etabliert werden. So gelang es durch den Nachweis von  $\beta$ -Laktamase-Aktivitäten von kultivierten Bakterien eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika verlässlich zu detektieren (12, 13, 52). Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass der isolierte Erreger nur auf eine Antibiotikaklasse ( $\beta$ -Laktam-Antibiotika) und auf einen Resistenzmechanismus hin getestet werden kann. Im weiteren Verlauf wurde ein phänotypischer Test entwickelt, mit dem Erreger auf Resistenzen gegen alle Antibiotika untersucht werden können. Durch das Hinzufügen von nicht-radioaktiv markiertem Lysin gelang eine Unterscheidung der Proteinproduktion zwischen Proben, die mit Antibiotikum, und Proben, die ohne Antibiotikum inkubiert wurden (14, 15). Hierbei erfolgte die Einteilung von Erregern in resistent und sensibel durch den Nachweis einer Verschiebung der Peaks mittels MALDI-TOF MS in Abhängigkeit vom Einbau markierten Lysins in die Proteine in Gegenwart bzw. Abwesenheit eines Antibiotikums. Lange et al. (36) konnte mit dem MBT-ASTRA Assay eine Methode entwickeln, durch die eine schnelle phänotypische Antibiotikaresistenztestung mittels MALDI-TOF MS ohne Markierung durch Isotopen möglich ist. Hier wird die Proteinbiosynthese direkt semi-quantitativ bestimmt. So ist es möglich, durch einen Vergleich der Proteinproduktion in einer Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum und einer Probe, die mit Antibiotikum inkubiert

wurde, eine Resistenzbestimmung auf das untersuchte Antibiotikum durchzuführen. In unserem Labor konnte von Jung et al. (33) gezeigt werden, dass eine Antibiotikaresistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay direkt aus Blutkulturen erfolgen kann. Wie auch bei Jung et al. (33) wurden in den Studien von Sauget et al. (53) und Axelsson et al. (54) für die Untersuchung von Blutkulturen mittels MBT-ASTRA Assay positive Blutkulturen verwendet. In positiven Blutkulturen lässt sich fast ausschließlich ein einzelner Erreger nachweisen. Dies ist für eine Resistenzbestimmung vorteilhaft, da eine Mischkultur das Ergebnis beeinflussen kann. Eine Übertragung dieses Testprinzips von Blutkulturen auf Urine ist möglich, weil sich auch in Urinproben von Patienten mit Harnwegsinfektion üblicherweise eine Monokultur oder zumindest ein dominanter Erreger nachweisen lässt.

Da für die vorliegende Studie der Urin direkt verwendet wurde, sollten die Urine zuerst hinsichtlich des Vorliegens Gram-negativer Bakterien voruntersucht werden. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass das Screening von Urinen mittels des vollautomatischen klinisch-chemischen Urinanalysesystems UC 3500 (Fa. Sysmex) (55) und mittels Durchflusszytometrie-Systemen, z.B. des UF 5000 (Fa. Sysmex) (56-58) zum Ausschluss des Vorliegens eines Harnwegsinfekts geeignet ist. Auf der Basis dieser Testsysteme wurden die Urine voruntersucht und ein Algorithmus entwickelt, um nur Urine der MALDI-TOF MS-basierten Resistenztestung mittels ASTRA Assay zuzuführen, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit von einem Patienten mit Harnwegsinfektion stammen.

Bei der im ersten Teil dieser Dissertationsschrift beschriebenen Untersuchungen mit dem vollautomatischen klinisch-chemischen Urinanalysesystems UC 3500 und dem Durchflusszytometer UF 5000 lag das Hauptaugenmerk auf der Identifikation einer Leukozyturie. Es sollte mittels dieser Methoden ermittelt werden, inwieweit eine Vorauswahl der Urinproben für die Resistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay möglich ist.

Zuerst wurde die Leukozytenzahl der Durchflusszytometrie mit der manuellen Mikroskopie unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer verglichen. Dabei konnte bei einem Cut-off von  $\geq 10$  Leukozyten/ $\mu\text{L}$  für eine Leukozyturie mit einer Sensitivität von 87,9 % und einer Spezifität von 92,9 % eine gute Übereinstimmung beider Methoden gezeigt werden. Previtali et al. (59) haben im Vergleich zwischen dem UF 5000 und der Fuchs-Rosenthal-Kammer beim gleichen Cut-off für eine Leukozyturie



eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 92 % gefunden. Hier lagen die Sensitivität und Spezifität sogar noch höher als in unserer Studie. Es konnte also mit zwei unterschiedlichen Zählkammern (Fuchs-Rosenthal-Kammer und Neubauer-Zählkammer) eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem UF 5000 und der Mikroskopie nachgewiesen werden.

Der Vergleich des Ergebnisses der Leukozytenzahl zwischen UC 3500 und dem manuellen Urinteststreifen, der hier als Goldstandard angesehen wurde, zeigte mit einer Sensitivität von 95,8 % und Spezifität von 89,1 % eine hohe Übereinstimmung. Dies galt auch für die Ergebnisse des Nitrit-Nachweises in beiden Systemen, der eine Sensitivität und Spezifität von 96,2 % bzw. 99,4 % erreichte. Vuljanić et al. (60) konnten bei einem Vergleich mehrerer manueller Urinteststreifen sehr gute Übereinstimmungen bei Nitrit feststellen, während der Leukozytennachweis nur eine moderate Übereinstimmung der verschiedenen Teststreifen zeigte.

Im weiteren Verlauf wurden die Ergebnisse des UC 3500 auch mit der Durchflusszytometrie verglichen. Beachtet man die Detektionsgrenze der Urinteststreifen, die bei ca. 25 Leukozyten/ $\mu$ L liegt, so lag die Sensitivität bei 78,5 % und die Spezifität bei 93,4 %. Bei Oyaert et al. (55) findet man bei einem Cut-off für Leukozyturie von 25 Leu/mL eine Sensitivität von 80,5 % und eine Spezifität von 91,7 % bei einem Vergleich zwischen dem UC 3500 und dem UF 5000 und damit sehr ähnliche Werte wie in dieser Studie. Für den in der MiQ (6) empfohlenen Cut-off Wert für die Leukozyturie von 10 Leukozyten/ $\mu$ L ergab sich eine Sensitivität von 62,2 % bei einer Spezifität von 97 %. Die Durchflusszytometrie scheint bei der momentan geltenden Richtlinie für die Leukozyturie auf Grund der niedrigeren Detektionsgrenze besser geeignet zu sein, eine Leukozyturie zu bestimmen, als der UC 3500 oder manuelle Urinteststreifen.

Für die mikrobiologische Diagnostik werden sehr häufig Borat-haltige Urinröhrchen verwendet. Diese verhindern das Wachstum von Bakterien während des Transports der Probe und damit eine falsch hohe Bakterienzahl. Die Verwendung von Borat-haltigen Urinröhrchen kann zu falsch negativen Ergebnissen beim Nachweis der Leukozytenesterase führen (1, 61). Dies könnte eine Erklärung für die Proben sein, die in der Durchflusszytometrie eine Leukozyturie aufwiesen, nicht aber mittels Urinteststreifen. Da nicht klar ist, welche Urinröhrchen bei Qyaert et al. (55) verwendet wurden, ist ein direkter Rückschluss auf den Borat-Einfluss durch den Vergleich der

beiden Studienergebnisse nicht möglich. Weil in der Urindiagnostik am Max von Pettenkofer-Institut keine Urinröhrchen ohne Stabilisator untersucht werden, die als Kontrollgruppe dienen können, ist der Einfluss nicht abschließend abschätzbar, sodass weitere Untersuchungen nötig sind.

Allgemein fanden sich bei Urinen mit Erreger-Nachweis höhere Leukozytenzahlen. Hierbei zeigte sich allerdings ein Unterschied zwischen uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern, deren mediane Leukozytenzahlen bei 259,6 Leukozyten/ $\mu$ L beziehungsweise bei 44,4 Leukozyten/ $\mu$ L lagen. Auch andere Studien konnten zeigen, dass für Enterokokken und Pilze eine geringere Leukozytenzahl im Urin detektiert werden kann. (58, 62, 63) Die Anzahl Urine mit Leukozyturie aber ohne kulturelles Wachstum oder nur mit Nachweis von urogenitaler Hautflora war mit 42 % erstaunlich hoch. Eine mögliche Erklärung wäre der hohe Anteil an Urinen aus Dauerkathetern, die eine höhere Leukozytenzahl zeigten. Eine weitere Erklärung wäre das Vorhandensein von Erregern, die nicht oder nur schwer auf konventionellen Medien anzüchtbar sind, wie z.B. Chlamydien oder Gonokokken. Außerdem wird eine sterile Leukozyturie z.B. auch bei Kindern mit systemischen Erkrankungen oder bestimmten Virusinfektionen (64) oder Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (65) beschrieben. Wie erwartet fand sich bei Urinen ohne Leukozyturie in einem sehr hohen Anteil (ca. 95 %) der Fälle kein Wachstum uropathogener Erreger.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass es einen Unterschied in der Ausprägung/Höhe der Leukozyturie von Urinen aus Dauerkathetern und Mittelstrahlurinen gibt. Ein Grund dafür liegt möglicherweise in der mechanischen Reizung des Dauerkatheters, die zu einer Verstärkung der Leukozyturie führt. Betrachtet man nur Urine ohne Hemmstoffe und ohne pathologisches kulturelles Wachstum, so zeigte sich für Dauerkatheter-Urine eine mediane Leukozytenzahl von 8,6 Leukozyten/ $\mu$ L und für Mittelstrahlurine lediglich eine mediane Leukozytenzahl von 4,7 Leukozyten/ $\mu$ L. Diese Leukozytenzahlen in Mittelstrahlurinen könnten ein „Hintergrundrauschen“, also die physiologische Anzahl von Leukozyten, in den Harnwegen von Patienten ohne Harnwegsinfekt darstellen. Diese Unterschiede ließen sich auch bei Urinen mit Erregernachweis zeigen. So stieg die mediane Leukozytenzahl bei Urinen mit uropathogenen Erregern von 206,2 Leu/mL bei Mittelstrahlurinen auf 369,8 Leu/mL bei Urinen aus Dauerkathetern. Die unterschiedlichen Leukozytenzahlen wirkten sich auch auf die Rate von Urinen mit

einer Kontamination, also einem Erregernachweis ohne Zeichen einer Infektion, aus. Die Beurteilung einer möglichen Kontamination wurde in dieser Studie auf Grund von fehlenden klinischen Angaben anhand von Laborparametern getroffen. Dabei gingen die Bakterienzahl und die Leukozytenzahl, deren diesbezügliche Bedeutung z.B. von Chon et al. (40) und Wilson und Gaido (41) hervorgehoben wird, sowie die Kategorie, in die der jeweilige Erreger entsprechend der MiQ (6) fällt, in das Ergebnis mit ein. So betrug die berechnete Kontaminationsrate bei Urinen mit uropathogenen Erregern 16,6 %, bei Mittelstrahlurinen und 3,2 % bei Urinen aus Dauerkathetern. Auf Grund der allgemein höheren Leukozytenzahlen bei Urinen aus Dauerkathetern könnte die Kontaminationsrate allerdings falsch-niedrig sein und eine Kontamination trotz hoher Leukozytenzahl vorliegen. In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Nutzens der Bestimmung von Leukozyten zur Detektion von Harnwegsinfektionen bei Dauerkathetern (66). So konnte von Schwartz et al. (67) keine gute Übereinstimmung zwischen der Leukozytenzahl und einer Infektion gefunden werden. Lee et al. (68) dagegen wies eine zufriedenstellende Sensitivität für den Leukozytennachweis bei Harnwegsinfektionen nach. Tambyah et al. (63) konnte zwar signifikant höhere Leukozytenzahlen bei Patienten mit einem Erregernachweis bei liegendem Dauerkatheter als bei Patienten ohne Erregernachweis zeigen; dennoch lag die Sensitivität lediglich bei 37 %. Die in dieser Studie gefundene mediane Leukozytenzahl von Urinen aus Dauerkathetern ohne kulturelles Wachstum von 8,6 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  als „Hintergrundrauschen“ legt nahe, dass der Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  für Dauerkatheter-Urine zu niedrig ist. Es benötigt aber weitere Studien, um zu klären, ob der Cut-off für eine Leukozyturie von 10 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ , wie er in der neuen MiQ (6) für Mittelstrahlurine diskutiert wird, auch auf Dauerkatheter-Urine übertragbar ist, beziehungsweise, wie hoch der Cut-off bei Dauerkatheter-Urinen sinnvollerweise sein soll. Bezüglich der Umsetzung der Cut-off Werte im Labor muss gesondert auf hämato-onkologische Patienten geachtet werden. Bei einer Neutropenie fehlt eine Leukozyturie bei einem Harnwegsinfekt sehr häufig (69).

In der vorliegenden Studie wurde die Richtigkeit der Bestimmung hoher Bakterienzahlen ( $\geq 10^5$  KBE/mL) untersucht. Diese hohen Bakterienzahlen machen Urine hochgradig verdächtig auf eine Harnwegsinfektion und sollten in dieser Studie einer Antibiotikaresistenztestung mittels MALDI-TOF MS zugeführt werden. Kulturell ist in unserer Routinediagnostik  $10^5$  KBE/mL (entspricht 100 Bakterien/ $\mu\text{L}$ ) die höchste angegebene Erregerzahl, wohingegen die Auszählung des Durchflusszytometers

Werte bis über 96.000 Bakterien/ $\mu\text{L}$  erreicht hat und 13 Mal ein Wert darüber nicht mehr quantifiziert wurde. Es zeigte sich mit einer Sensitivität von 90,1 % und einer Spezifität von 88 % eine gute Übereinstimmung zwischen der Bakterienzahl des UF 5000 und der kulturell ermittelten Bakterienzahl. Bei der durchflusszytometrischen Bakterienzählung kann die Messung toter Bakterien, z.B. nach bereits erfolgter Antibiotika-Therapie, zur Detektion höherer Bakterienzahlen führen als mit dem kulturbasierten Verfahren. Des Weiteren können Bakterien gezählt werden, die auf den in der Routinediagnostik verwendeten Medien, Frischblutagar, MacConkey Agar und Columbia CNA Blutagar, nicht oder nur schlecht anwachsen, wie etwa strikt anaerob oder sehr langsam wachsende Bakterien. Dies könnten Erklärungen für die 290 Proben sein, in denen sich das Ergebnis des UF 5000 nicht in der Kultur bestätigte. In 136 dieser Proben ließen sich Hemmstoffe nachweisen, was auf eine bereits begonnene Behandlung mit Antibiotika hinweisen kann. Außerdem unterliegt die manuelle Auszählung der KBE/mL einer subjektiven Interpretation des ablesenden Mitarbeiters, wodurch sowohl falsch-hohe als auch falsch-niedrige Ergebnisse entstehen können. Kim et al. (24) und De Rosa et al. (22) zeigten für ein kulturelles Bakterienwachstum von  $\geq 10^5$  KBE/mL eine ebenfalls sehr gute Übereinstimmung mit der Durchflusszytometrie. In beiden Studien wurde, anderes als in dieser Studie mit 100 Bakterien/ $\mu\text{L}$ , ein Cut-off Wert von 71 Bakterien/ $\mu\text{L}$  verwendet, wodurch die Sensitivität auf 95 % bzw. 98,5 % stieg. Auf Grund der hohen Übereinstimmung beider Methoden ist die Durchflusszytometrie geeignet, auch in Bezug auf die Erregerzahl als Vorauswahl für den MBT-ASTRA Assay zu dienen.

Ein weiteres Augenmerk lag auf dem Vergleich des Gram-*flags* des Durchflusszytometers UF 5000 und dem Gram-Verhalten der Kultur. Die Übereinstimmung bei dem Vergleich des Gram-negativ *flags* mit dem Gram-Verhalten der in der Kultur gefundenen Erreger war mit 98,4 % sehr hoch. Beim Gram-positiv *flag* lag sie dagegen mit 83,1 % niedriger. Damit zeigte sich vor allem für den Gram-negativ *flag* eine sehr gute Übereinstimmung zwischen UF 5000 und dem Ergebnis der Kultur. Eine mögliche Erklärung für die 6 Proben mit einem Gram-negative *flag* und den 47 Proben mit einem Gram-positiv *flag*, die sich in der Kultur nicht bestätigen ließen, wäre, wie bei der Bestimmung der Bakterienzahl bereits erwähnt, dass Bakterien klassifiziert worden sind, die in der Routinediagnostik nicht oder nur schwer zu kultivieren sind oder durch eine bereits begonnene antibiotische Therapie abgetötet wurden. Ein weiterer Grund für die Differenz zwischen kulturellem und

durchflusszytometrischem Ergebnis könnte technischer Natur sein. Das Gerät gibt bei unseren Einstellungen ein Gram-*flag* erst an, wenn mehr als 100 Bakterien/ $\mu\text{L}$  in der jeweiligen Probe detektiert wurden. Dies entspricht  $10^5$  KBE/mL bei einer kulturellen Auswertung der Bakterienzahl. Daher wurde möglicherweise mit 7 Urinen bei einem Gram-negativen Kulturergebnis und 55 Urinen bei einem Gram-positiven Kulturergebnis eine hohe Anzahl Proben vom Gerät als unklassifiziert bewertet.

Kim et al. (58) ermittelten mit einer Sensitivität von 91,7 % und einer Spezifität von 90,0 % für den Gram-negativ *flag* ähnlich wie in der vorliegenden Studie eine sehr gute Übereinstimmung. Hier zeigte sich ebenfalls für den Gram-positiv *flag* mit einer Sensitivität von 81,3 % und einer Spezifität von 80,0 % eine im Vergleich zum Gram-negativ *flag* geringere Übereinstimmung. De Rosa et al. (56) zeigten ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem Gram-negativ *flag* und dem kulturellen Ergebnis auf. Auch Ren et al. (57) konnten Übereinstimmungen zwischen den Gram-*flags* und den kulturellen Ergebnissen nachweisen.

Eine mikroskopische Auswertung der Urinproben für das Gram-Verhalten und die Bakterienzahl wäre gegenüber der durchflusszytometrischen Untersuchung des UF 5000 ein Vergleich gleichwertiger Methoden. In der mikrobiologischen Diagnostik wird jedoch die kulturell bestimmte KBE/mL verwendet, weshalb wir sie auch hier als Referenzmethode eingesetzt haben. Auch der indirekte Vergleich mit dem Gram-Verhalten der in der Kultur gefundenen Erreger ist hier als Einschränkung der Studie zu sehen. Da die Gram-Färbung allerdings nicht zur Routinediagnostik bei Urinproben gehört und ein Anwachsen der Erreger für die Antibiotikaresistenz-Bestimmung mittels MBT-ASTRA Assay wichtig war, wurde der Vergleich mit dem kulturellen Wachstum gewählt.

Auf Grund der sehr hohen Übereinstimmung zwischen dem Gram-negativ *flag* des UF 5000 und dem kulturellen Ergebnis eignet sich diese Methode gut, um eine Vorauswahl für die Testung der Urine mittels MBT-ASTRA Assay zu treffen.

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde untersucht, ob mittels Durchflusszytometrie eine Sortierung von Urinproben gelingen kann, damit Urinproben ohne Harnwegsinfekt nicht angelegt werden müssen, wobei unterschiedliche Grenzwerte für verschiedene Patientenkollektive verwendet wurden (56-58, 62, 70-81). Aber auch ohne die Urinproben direkt zu verwerfen, kann die Untersuchung der

Urinproben auf eine Leukozyturie einen Einfluss auf diagnostische Schritte nehmen. Das Vorliegen eines Antibiotogramms kann Einfluss auf die Antibiotika-Therapie haben, so wird doch das Vorliegen eines Antibiotogramms für den behandelnden Arzt oftmals ein explizites Signal aus dem Labor für das Einleiten einer Antibiotika-Therapie verstanden. Jedoch liegt aus laboranalytischer Sicht nur dann eine Infektion vor, wenn neben Erregern auch eine Leukozyturie nachweisbar ist. Bisher wurde in der mikrobiologischen Routinediagnostik die Bakterienzahl als alleiniges Kriterium zur Anfertigung eines Antibiotogramms verwendet. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei 9,5 % der Proben mit Antibiotogramm gemäß der neuen MiQ (6) unter Einbeziehung der Leukozyturie kein Antibiotogramm notwendig gewesen wäre. Damit würde in diesen Fällen die Indikation zur Behandlung eventuell wegfallen und es könnten neben Kosten vor allem Antibiotika eingespart werden. Dies unterstreicht auch die große Relevanz, die die Leukozyturie in der Vorauswahl der Urine für die schnelle Antibiotikaresistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay spielt.

Bei dem im zweiten Teil der Dissertationsschrift beschriebenen Untersuchungen des MBT-ASTRA Assays zu schnellen Antibiotikaresistenzbestimmung mittels MALDI-TOF MS sollte die Methode für die Antibiotika-Testung direkt aus Patientenerinen etabliert/validiert werden und hierzu die Übereinstimmung der Ergebnisse mit routinemäßig verwendeten Methoden zur Antibiotikaresistenzbestimmung im Fokus stehen.

Die untersuchten Urine stammten alle aus der Routinediagnostik des Max-von-Pettenkofer-Instituts der LMU München. Dass alle Urine von Patienten eines Universitätsklinikums stammten, trug zu einem Selektionsbias bei. Die typische unkomplizierte Harnwegsinfektion der jüngeren Frau wird überwiegend ambulant behandelt (1), während im Krankenhaus häufig komplizierte Harnwegsinfektionen, z.B. bei Dauerkathetern, vorliegen. Dies ist auch ein Grund dafür, dass vermehrt Urine mit mehreren Erregern gefunden werden konnten.

Von insgesamt 1917 untersuchten Urinen zeigten 198 die vorher festgelegten Kriterien (Leukozyturie mit Gram-negativ *flag* bzw. Nitrit-Nachweis), was die Notwendigkeit einer Voruntersuchung der Urinproben insbesondere bei sehr hohem Probenaufkommen unterstreicht. Nur so ist bei der momentan noch arbeitsintensiven und weitgehend manuellen Methode eine Fokussierung auf Urine von Patienten möglich, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Antibiotikum brauchen und somit von

einem schnellen Antibiogramm profitieren können. Es fanden sich in der Durchflusszytometrie Unterschiede in den Leukozytenzahlen der Urine, bei denen ein MALDI-Antibiogramm erstellt werden konnte und Urinen, aus denen trotz Nachweis schnell-wachsender Gram-negativer Erreger kein MALDI-Antibiogramm erzeugt werden konnte. So betrug der Median bezüglich der Leukozytenzahl von Urinen mit MALDI-Antibiogramm 450,3 Leukozyten/ $\mu\text{L}$ , bei Urinen ohne erfolgreiches MALDI-Antibiogramm dagegen mit 798,3 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  deutlich mehr. Die Bakterienzahl war mit 19604,4 Bakterien/ $\mu\text{L}$  bei Urinproben mit MALDI-Antibiogramm im Vergleich zu 4552,2 Bakterien/ $\mu\text{L}$  bei Urinen ohne erfolgreiches MALDI-Antibiogramm deutlich höher. Neben der absoluten Anzahl an Bakterien scheint auch der Quotient zwischen Bakterienzahl und Leukozytenzahl eine Rolle zu spielen, damit man eine ausreichend große Anzahl an Bakterien im ausgewaschenen Pellet hat. So lag, wenn man einen Quotienten aus Bakterienzahl und Leukozytenzahl bildet, der Median bei Urinen, aus denen ein Antibogramm mittels MALDI-TOF MS angefertigt werden konnte bei 39,3. Bei Urinen ohne erfolgreiches MALDI-Antibiogramm lag der Median nur bei 2,8. Hier stellt sich die Frage, ob es möglich wäre, durch ein Herausfiltern der Leukozyten aus den Urinproben oder ein verändertes Waschprotokoll (82) auch in diesen Fällen ein Antibogramm zu erstellen.

Von 93 Urinproben konnte kein MALDI-Antibiogramm erzeugt werden. In 46 Proben ließ sich kein kulturelles Wachstum nachweisen oder es wurden Erreger gefunden, die innerhalb der 2,5 Stunden Inkubationszeit kein Wachstum im MBT-ASTRA Assay erwarten lassen würden. Dabei war *Pseudomonas aeruginosa* der häufigste. *Pseudomonas aeruginosa* war in der vorliegenden Studie der einzige relevante Gram-negative Harnwegsinfektionserreger, der innerhalb der 2,5 Stunden Inkubationszeit kein Wachstum zeigt. Hier wird in der Literatur eine im Vergleich zu *E. coli* langsamere Verdopplungszeit angegeben (42). Eine Verlängerung der Inkubationszeit, um auch Ergebnisse für *Pseudomonas aeruginosa* zu erhalten, ginge zulasten der sehr schnellen Resultate und Ergebnisse am selben Tag. 8 Urine zeigten ein Wachstum mit nur Gram-positiven Bakterien und 4 mit Pilzen, die ebenfalls für die Schnelltestung mittels MALDI-TOF MS in der derzeitigen Form aufgrund ihres langsamen Wachstums nicht geeignet sind. Ebenso wie bei den Urinen ohne kulturelles Wachstum ist hier eine Verbesserung des Voruntersuchungsalgorithmus zur Identifikation von nicht MALDI-TOF MS-testfähigen Erregern nötig. So könnten diese Urine zum Beispiel durch eine direkte Erregeridentifikation mittels MALDI-TOF MS (83, 84) herausgefiltert werden.

Dies geht allerdings derzeit noch mit einem erhöhten manuellen Arbeitsaufwand einher. Bei Urinen mit Mischflora oder Schleimhautflora ist ein Antibiogramm meist nicht nötig und mittels MADLI-TOF MS auf Grund der kleinen Erregerzahl der einzelnen Erreger auch nicht möglich. In 47 Urinproben ließen sich Erreger nachweisen, bei denen sich ein Antibiogramm mittels MALDI-TOF MS bei einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden erstellen lassen müsste. Bei all diesen Erregern ist aus anderen Urinen die Erstellung eines Antibiogramms geglückt. Hierbei ist, entsprechend der Häufigkeit der Erreger als Verursacher von Harnwegsinfektionen, *E. coli* mit 34 Fällen dominierend. Insgesamt ließen sich von den 47 Urinproben bei 10 Urinen Erregerzahlen von  $< 10^5$  KBE/mL nachweisen. Da in diesen Fällen nicht die von Jung et al. (33) besprochene Bakterienzahl von ca.  $10^6$  KBE/mL erreicht wurde, könnte die zu geringe Bakterienzahl für das Nichtfunktionieren verantwortlich sein. In weiteren 13 Urinproben konnten Hemmstoffe nachgewiesen werden. Dies kann auf eine bereits begonnene Behandlung mit Antibiotika hinweisen, wodurch die Erreger nicht in der Lage sind, sich in den vorgegebenen 2,5 Stunden Inkubationszeit zu erholen und Proteine zu synthetisieren. Somit konnte bei 69 von 93 Urinproben eine Erklärung für das Ausbleiben des MALDI-Antibiogramms gefunden werden. Hierbei handelte es sich um Proben, in denen entweder keine schnell-wachsenden Gram-negativen Bakterien nachgewiesen wurden oder Hemmstoffe gefunden wurden oder die Bakterienzahl gering war. Bei den restlichen Urinproben könnte der oben beschriebene Unterschied im Quotienten aus Bakterienzahl und Leukozytenzahl eine mögliche Erklärung darstellen.

Im Folgenden sollen, wie bereits teilweise publiziert (29), die Ergebnisse der schnellen Antibiotikaresistenztestung mittels MBT-ASTRA Assay besprochen werden. Ein *major error* des MS-ASTRA Testergebnisses lag vor, wenn ein Erreger im kultur-mikrobiologischen Testverfahren (Goldstandard) einen MHK-Wert oberhalb des klinischen Grenzwertes aufwies - also phänotypisch als resistent klassifiziert wurde -, aber mit Hilfe der MALDI-TOF MS als sensibel getestet wurde. Hier wird der Patient auf Grund des Ergebnisses eventuell mit einem Antibiotikum behandelt, das keinen Nutzen zeigen wird. Ein *minor error* dagegen lag vor, wenn ein Erreger mit einem MHK-Wert im konventionellen Verfahren unter dem Breakpoint (sensibler Test) mittels MALDI-TOF als resistent getestet wurde. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist allgemein zu betrachten, dass eine Veränderung von plus/minus einer Verdünnungsstufe bei MHK-Testen nicht signifikant ist.



Sowohl bei der Testung auf eine Resistenz gegen Ciprofloxacin als auch gegen Cotrimoxazol wurden keine Ergebnisse mit *major error* verzeichnet. Gleichzeitig ergaben sich für Ciprofloxacin 4 beziehungsweise für Cotrimoxazol 6 *minor errors*. Dabei fiel auf, dass die MHK-Werte der im MALDI-TOF-Verfahren falsch-resistent getesteten Erreger vergleichsweise hoch lagen. So wurden bei Ciprofloxacin MHK-Werte zwischen 0,064 und 0,19 mg/L und damit nahe am Breakpoint von 0,25 mg/L gemessen. Auch bei Cotrimoxazol waren 4 Erreger mit MHK-Werten zwischen 0,75 und 1,5 mg/L nahe am Breakpoint von 2 mg/L. Nur ein sensibel getesteter Erreger wies mit 1 mg/L einen ähnlich hohen MHK-Wert auf. Dagegen wiesen die anderen beiden falsch-resistent getesteten Erreger mit 0,094 und 0,125 mg/L MHK-Werte in einem Bereich auf, in dem die meisten sensibel getesteten Erreger lagen. Eine der 4 für Ciprofloxacin falsch-resistent gemessenen Erreger lag im intermediären Bereich, der zwischen 0,25 und 0,5 mg/L liegt. Dieser hätte nach neuer Deutung sensibel (bei erhöhter Dosierung/Exposition) getestet werden müssen, wurde aber mittels MALDI-TOF MS resistent bewertet

Bei der Testung von Meropenem konnten alle Erreger richtig klassifiziert werden. Allerdings war unter den 95 getesteten Urinen mit Reinkulturen kein resistenter Erreger. Da sich diese Studie auf die Testung von Patientenerinen beschränkte, wurde auf ein *Spiken* von Urinproben mit Meropenem-resistenten Isolaten verzichtet. Daher werden weitere Untersuchungen benötigt, um abschließend beurteilen zu können, ob das System auch resistente Erreger direkt aus Patientenerin korrekt bewerten kann.

Bei der Untersuchung auf eine Resistenz gegen Nitrofurantoin lagen nur für *E. coli* Breakpoint-Werte des EUCAST (v. 10.0) (7) vor. Hierbei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse des MBT-ASTRA Assays mit der konventionellen Resistenztestung ohne falsche Klassifikation.

Bei der Testung von Fosfomycin konnten alle *E. coli*-Isolate richtig klassifiziert werden. Nach EUCAST soll Fosfomycin oral nur noch bei der Behandlung von unkomplizierten Harnwegsinfektionen mit *E. coli* angewendet werden. Bei anderen schweren Infektionen kann Fosfomycin als Kombinationspartner eingesetzt werden (43). Hierfür gibt es auch MHK-Breakpoints nach EUCAST (v. 10.0) (7). Bei den anderen getesteten Erregern zeigten sich sowohl falsch-sensible als auch falsch-resistente Ergebnisse. Hierbei handelte es sich um *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* sowie um ein *Enterobacter cloacae*-Isolat. Auf Grund der EUCAST-

Richtlinie spielen die Ergebnisse für die Bewertung dieses Tests für eine schnelle Antibiotikaresistenztestung direkt aus Urinen allerdings eine untergeordnete Rolle. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte der Einfluss von Glucose-6-Phosphat auf die Bestimmung einer Fosfomycin-Resistenz sein und die unterschiedliche Ausstattung der Erreger mit Transportsystemen, über welche Fosfomycin in die Zelle gelangt. Glucose-6-Phosphat verstärkt die *in vitro*-Wirksamkeit von Fosfomycin (20) und ist in konventionellen Tests im Gegensatz zu unserem Ansatz zusätzlich hinzugefügt. Dass z.B. *E. coli* neben den durch Glucose-6-Phosphat induzierten Hexose-Monophosphat-Transportern (*uhpT*) auch über konstitutiv gebildete Glycerol-3-Phosphat-Transporter (*glpT*) verfügt (85-87), könnte für die besseren Ergebnisse bezüglich *E. coli* bei der Untersuchung auf Fosfomycin-Resistenz in unserem Test verantwortlich sein. In den neuen Richtlinien des EUCAST (v. 13.0) wurde der MHK-Breakpoint für Fosfomycin bei der Behandlung von Harnwegsinfektionen von 32 mg/l auf 8 mg/l reduziert (88). Hier wäre eine Reduktion der Antibiotikakonzentration im Assay-Ansatz nötig, um dieser Änderung gerecht zu werden.

Cefuroxim wies von allen untersuchten Antibiotika die höchste Rate falsch-resistent und falsch-sensibel getesteter Isolate auf. Hier kam es zu 3 *major errors*, also einem MHK-Wert über dem Breakpoint und einer Klassifikation mittels MALDI-TOF MS als sensibel. Die MHK-Werte lagen zwischen 12 und 24 mg/L und damit eine bis drei Stufen über dem Breakpoint-Wert von 8 mg/L. Gleichzeitig traten aber auch 13 *minor errors* auf. Hier lagen die MHK-Werte zwischen 1,5 und 4 mg/L und damit im Bereich der meisten sensibel getesteten Erreger. Zwei lagen zudem bei einem MHK-Wert von 8 mg/L und damit auf der Breakpoint-Konzentration. Eine wünschenswerte Erniedrigung des *major errors* würde zulasten einer Erhöhung der Rate falsch-resistenter Bestimmungen gehen, die 19,1 % betrug. Ein möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse könnte der in der Literatur beschriebene Inokulum-Effekt bei Beta-Lactam-Antibiotika sein. Hierbei kommt es zu veränderten MHK-Werten in Abhängigkeit der eingesetzten Menge Bakterien (89-91). Auf Grund von Einflussfaktoren, wie beispielsweise Leukozyten im Pellet, auf die Bakterieneinsaat im MBT-ASTRA Assay könnte der Inokulum-Effekt eine Erklärung für abweichende MALDI-Antibiogramme sein. Außerdem wirken nicht alle beta-Lactam-Antibiotika schnell bakterizid, sondern führen zuerst zu einer Elongation/Verformung der Zellen mit Erhöhung der optischen Dichte (92). Dies könnte wegen der anfänglichen

Produktion von Biomasse das Ergebnis des MALDI-Antibiogramms beeinflussen und zu falsch resistenten Ergebnissen führen. *E. coli* war mit 9-mal der häufigste falsch resistent und der einzige falsch sensibel klassifizierte Erreger. Dennoch ist auf Grund der anderen falsch resistent klassifizierten Erreger nicht von einem isolierten Problem für *E. coli* auszugehen.

Die Idee für die Beurteilung von Mischkulturen war, dass sich der jeweils resistente Erreger beim Test mit dem jeweiligen Antibiotikum durchsetzt und detektierbar ist. In 9 Fällen ließen sich bei Mischkulturen von zwei schnellwachsenden Gram-negativen Erregern beide Erreger in gleich großer Zahl nachweisen. Hier zeigte sich jeweils ein kulturelles Wachstum von  $10^5$  KBE/mL. Auch wenn sich zwei Erreger mit  $10^5$  KBE/mL in der Kultur nachweisen lassen, können sich die tatsächlichen Bakterienzahlen, wie sich in der Untersuchung der Bakterienzahl mittels Durchflusszytometrie zeigte, in ihrer Höhe deutlich unterscheiden. Dies wäre ein möglicher Grund, warum sich beim Vorliegen eines resistenten und eines sensiblen Erregers teils resistente und teils sensible MALDI-Antibiogramme fanden. Zu beachten ist daher, dass grundsätzlich ein gleichzeitiges Testen auf Antibiotikaresistenzen mehrerer Erreger nicht empfohlen wird. Da der vorliegende Test eine schnelle Antibiotikaresistenztestung ist und in Urinen auch mehrere Enterobacterales vorliegen können, sollte sich immer auch eine konventionelle Antibiotikaresistenztestung anschließen.

Bei der Untersuchung von Blutkulturen mittels MBT-ASTRA Assay konnte Jung et al. (33) für Ciprofloxacin eine sehr gute Übereinstimmung des Antibiogrammergebnisses des MBT-ASTRA Assay und der konventionellen Resistenztestung ermitteln. Es wurde nur ein intermediäres Isolat falsch bestimmt. Als Cephalosporin verwendete man in der Arbeit Cefotaxim. Hier wurden alle Erreger richtig klassifiziert. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung der Erreger auf eine Resistenz gegen Piperacillin-Tazobactam, wobei es sowohl zu falsch-sensiblen als auch falsch-resistenten Ergebnissen kam. Bei allen Versuchen wurde eine Inkubationszeit zwischen 2,5 und 3 Stunden verwendet. Im Vergleich dazu konnte Axelsson et al. (54) bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten aus Blutkulturen auch gute Ergebnisse mittels MBT-ASTRA Assay erzielen. Dabei wurden *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* auf Resistenzen gegen Ciprofloxacin, Cefotaxim und Meropenem untersucht. Es zeigte sich über alle Antibiotika hinweg eine Präzision von 97 %. Für Cefotaxim und Meropenem fanden sich keine falschen Klassifikationen, während sich für Ciprofloxacin sowohl falsch-resistente als auch

falsch-sensible Bestimmungen ergaben. Sauget et al. (53) untersuchte den MBT-ASTRA Assay für die Antibiotika Amoxicillin und Cefotaxim. Je nach Antibiotikum wurden die Proben nach einer Vorinkubation von 1 Stunde für 2 bzw. 2,5 Stunden mit und ohne Antibiotikum inkubiert. Hierbei wurden sensible Isolate mit einer Sensitivität von 98 % für Amoxicillin und 71 % für Cefotaxim erkannt. Dabei kam es bei beiden Antibiotika zu falsch-resistenten und falsch-sensiblen Klassifikationen, die im Falle von Cefotaxim mit 16 % bzw. 29 % sehr hoch lagen. In zwei der Studien (33, 54) konnte eine deutlich bessere Übereinstimmung für Cefotaxim erreicht werden als in unseren Versuchen mittels Cefuroxim. Dieser Unterschied könnte sowohl an den unterschiedlichen Cephalosporinen (3. Generations- vs. 2. Generations-Cephalosporin) liegen als auch an den unterschiedlichen Probenarten. Die dritte Studie (53) konnte diese guten Werte für Cephalosporine nicht zeigen. Eine Einschränkung des Vergleichs der Ergebnisse von Blutkulturen und Urinproben liegt im eingesetzten Probenmaterial. So wurden in den Versuchen mit Blutkulturen Bakterien aus positiven Blutkulturen verwendet. Hier liegen die Bakterien in besten Wachstumseigenschaften vor. Dagegen sind für die Bakterien direkt aus Patientenurinproben die Wachstumsbedingungen vergleichsweise ungünstig.

Neben einer schnellen Antibiotikaresistenztestung mittels MADLI-TOF MS und dem MBT-ASTRA Assay gibt es weitere Ansätze in der Literatur, um die Zeit bis zum Vorliegen des Ergebnisses der Antibiotikaresistenztestung zu verkürzen, die ebenso einen phänotypischen Ansatz haben und direkt aus Patientenerinuren durchgeführt werden können. So wurde die Durchflusszytometrie als Methode zur schnellen Antibiotikaresistenztestung in mehreren Studien untersucht (93-95). Die Inkubationszeit wurde hierbei zwischen 2 und 4 Stunden angegeben. Toosky et al. (93) konnten zeigen, dass diese Methode geeignet ist, sowohl Enterobacterales als auch mit Einschränkung Gram-positive Bakterien auf verschiedene Antibiotikaresistenzen zu testen. Eine Einschränkung dieser Methode besteht allerdings bei Antibiotika, die teilweise das Licht des Lasers absorbieren und so das Wachstum niedriger erscheinen lassen. Jindal et al. (94) fand dieses Problem bei Nitrofurantoin. Eine Identifikation der Erreger ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie nicht möglich. Dies ist allerdings notwendig, um die Ergebnisse mit den Empfehlungen des EUCAST vergleichen zu können.

Mach et al. und Altobelli et al. (96, 97) dagegen erreichten eine Antibiotikaresistenz-Bestimmung aus Urinen durch Messung bakterieller 16S-rRNA mittels eines *electrochemical biosensor array* als Zeichen des bakteriellen Wachstums. Es konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zur Antibiotikaresistenzbestimmung gleichzeitig eine Identifikation durch das Hinzufügen komplementärer DNA-Sonden möglich ist. Des Weiteren konnten MHK-Werte angegeben werden. Diese verhältnismäßig aufwendige Methode bedarf mehrerer zusätzlicher Geräte, die nicht in jedem Routinelabor bereits vorhanden sind. Hier wurde die Inkubationszeit mit 2,5 Stunden angegeben.

Ein weiterer methodischer Ansatz wurde von Avesar et al. durch Einsatz eines *nanoliter droplet array* gewählt (98). Bei dieser Methode wird das bakterielle Wachstum durch den Farbstoff Resazurin sichtbar gemacht, wobei die Färbung proportional zum aeroben Stoffwechsel der Bakterien ist. Für den Test ist nur eine sehr geringe Probenmenge nötig; es kann allerdings auch keine Erregeridentifikation erfolgen. Hier wurde eine Inkubationszeit von 4-5 Stunden angegeben. Insgesamt ist bei allen Methoden eine Voruntersuchung der Proben auf Grund der Vielzahl Kultur-negativen Urinproben nötig.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass eine Resistenztestung direkt aus Urinen mit einer Inkubationszeit von nur 2,5 Stunden gelingt. Auch wenn die Inkubationszeit sehr kurz ist, ist die Zeitdauer bis zum Vorliegen der Resultate bzw. die Durchführung des Assay auf Grund der vielen manuellen Arbeitsschritte länger. Die Zeit nach der Auswahl der Urine bis zum fertigen Target beträgt daher ungefähr 4,5 Stunden. Dementsprechend ist für die Vorbereitung der Urine, die Extraktion und das Auftragen auf das Target ca. 1,5 Stunden Zeit erforderlich. Die Messung mittels MALDI-TOF MS dauert je nach Anzahl an Proben und nach Gerät ca. eine halbe Stunde. Daher wäre zukünftig eine Automatisierung der Vorgänge sehr hilfreich, um mit weniger Personal- und Zeitaufwand eine schnelle Resistenztestung von rasch wachsenden Gram-negativen Bakterien direkt aus dem Urin zu erreichen. Eine Vereinfachung der Arbeitsabläufe könnte dabei der *direct-on-target microdroplet assay* direkt auf dem Target, wie er bei Idelevich et al. (99, 100) beschrieben wird, darstellen. Hier findet die Inkubation der Proben bereits direkt auf dem Target statt, wodurch einige momentan manuellen Arbeitsschritte wegfallen würden.

Eine weitere Verbesserung des Arbeitsablaufs betrifft die Auswertung des MBT-ASTRA Assays. Auf Grund von teilweise vorhandenem Hintergrundrauschen bzw.

unzureichender Unterdrückung des Hintergrundrauschens in der Auswertungssoftware musste eine visuelle Kontrolle der Spektren durchgeführt werden. Da dieses Problem in Veröffentlichungen zum MBT-ASTRA Assay bei Blutkulturen (33, 54) nicht erwähnt wird, könnten Störfaktoren im Urin ursächlich sein. Durch Optimierung und Automation des Auswertungsprozesses kann hier noch Zeit und Personaleinsatz eingespart werden.

## **5. Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war es zu zeigen, dass mittels MALDI-TOF MS ein Antibiogramm direkt aus Urinen bereits am Tag des Probeneingangs erzeugt werden kann. Dadurch ist eine gezielte Antibiotikatherapie direkt zu Beginn der Therapie oder eine schnelle Umstellung von einer kalkulierten Antibiotikatherapie möglich. Wir haben mit dem MBT-ASTRA Assay einen phänotypischen Test verwendet. Die häufigsten Erreger bei Harnwegsinfektionen sind Gram-negative Bakterien, weshalb sich diese Studie auf diese Erregergruppe konzentrierte. Auf Grund der Vielzahl an eingesendeten Urinproben, die sehr häufig kein kulturelles Wachstum zeigen, war eine Vorauswahl der Urine nötig, die mittels MBT-ASTRA Assay untersucht werden sollten. Hierfür wurden ein automatisches Urinanalysesystem (UC 3500) und ein Durchflusszytometer (UF 5000) verwendet.

Für den UF 5000 zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung in der Erkennung einer Leukozyturie mit konventionellen Methoden. Der Gram-negativ *flag* stellte eine gute Methode dar, um das Wachstum Gram-negativer Erreger in der Kultur vorherzusagen. Mit diesen beiden Parametern konnte ein Algorithmus zur Vorauswahl der Urine erstellt werden.

Für diese Studie konnten 105 Antibiogramme mittels MBT-ASTRA Assay erzeugt und mit konventioneller Antibiotikaresistenztestung mittels MHK-Teststreifen verglichen werden. Es gelang, auf Antibiotika-Resistenz bzw. -Empfindlichkeit der Erreger gegenüber Ciprofloxacin, Cefuroxim, Cotrimoxazol, Fosfomycin, Meropenem und Nitrofurantoin mittels MALDI-TOF zu testen. Dabei handelt es sich um Antibiotika, die teils gegen untere Harnwegsinfektionen eingesetzt werden und teils gegen Pyelonephritiden. Für Ciprofloxacin, Cotrimoxazol, Fosfomycin, Meropenem und Nitrofurantoin konnten sehr gute Übereinstimmungen erzielt werden. Die MALDI-TOF-Testung von Cefuroxim wies dagegen eine im Vergleich zu den anderen Antibiotika eine nicht ganz so gute Übereinstimmung mit konventionellen Verfahren auf mit einer relativ hohen Anzahl von sowohl *major* als auch *minor errors* bei den Ergebnissen

Mit Hilfe des MBT-ASTRA Assay kann innerhalb von ca. 4,5 Stunden ein Antibiogramm erstellt werden. Im Vergleich zur konventionellen Resistenztestung, die ca. 48 Stunden dauert, wird die Zeit bis zum Vorliegen des Antibiogramms so deutlich verkürzt. Dabei ist auch eine Erregeridentifikation gleichzeitig mit der

Antibiotikaresistenztestung möglich. Eine Automatisierung und weitere Optimierung des Tests stellt für die Verwendung der MALDI-TOF MS in diesem Bereich eine interessante Perspektive für mikrobiologische Labore dar.



**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Funktionsweise des UF 5000 .....	19
Abb. 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise der MALDI-TOF MS .....	21
Abb. 3: Ausschnitt eines mittels der MALDI Biotyper MBT-ASTRA Prototype Software erstellten Box-Plots-Diagramms .....	25
Abb. 4: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. manuelle Mikroskopie (Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu$ L) .....	29
Abb. 5: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. manuelle Mikroskopie (Cut-off 25 Leukozyten/ $\mu$ L) .....	29
Abb. 6: Leukozyten-Nachweis mittels UC 3500 und Combur 9 Teststreifen .....	30
Abb. 7: Nitrit-Nachweis mittels automatischem Teststreifen System UC 3500 und Combur 9 Teststreifen.....	30
Abb. 8: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. automatischem Teststreifen-System (Cut-off 10 Leukozyten/ $\mu$ L) .....	31
Abb. 9: Leukozyten-Nachweis mittels Durchflusszytometrie vs. automatischem Teststreifen-System (Cut-off 25 Leukozyten/ $\mu$ L) .....	32
Abb. 10: Häufig in Urinproben gefundene Erreger und deren Zuordnung.....	33
Abb. 11: Leukozytenzahl in Urinen mit uropathogenen oder potenziell uropathogenen Erregern vs. Urinen mit Normalflora oder ohne Wachstum.....	34
Abb. 12: Leukozytenzahl der Urine mit uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern.....	34
Abb. 13: Leukozytenzahlen von Urinen mit uropathogenen und potenziell uropathogenen Erregern in Abhängigkeit von der Erregerzahl .....	35
Abb. 14: Vergleich zwischen Urinen mit Normalflora und ohne kulturelles Wachstum in Abhängigkeit vom Probenmaterial.....	36
Abb. 15: Leukozytenzahl in Urinen mit uropathogenen Erregern in Abhängigkeit vom Probenmaterial.....	37
Abb. 16: Leukozytenzahl in Urinen mit potenziell uropathogenen Erregern in Abhängigkeit vom Probenmaterial.....	37
Abb. 17: Kontaminationsraten .....	39
Abb. 18: Urinproben mit Erreger-Nachweis ohne Leukozyturie .....	39
Abb. 19: Koloniebildende Einheiten in der Kultur vs. in der Durchflusszytometrie gefundene Bakterienzahl.....	40

Abb. 20: Scattergramm eines Urins mit Gram-negativem <i>flag</i> (links oben), Gram-positivem <i>flag</i> (rechts oben) und Gram-positiv/Gram-negativ <i>flag</i> (links unten) .....	42
Abb. 21: Gram-Verhalten der in der Kultur gefundenen Erregern gegenüber dem Gram- <i>flag</i> des UF 5000.....	43
Abb. 22: Zeitlicher Ablauf der konventionellen Urindiagnostik und des MBT-ASTRA Assay .....	45
Abb. 23: Ablauf des MBT-ASTRA Assay .....	46
Abb. 24: Arbeitsablauf MBT-ASTRA Assay inklusive der Voruntersuchungen.....	48
Abb. 25: Flussschema der Probenauswahl mit daraus resultierenden Ergebnissen .	49
Abb. 26: Schematische Darstellung der nachfolgenden Diagramme .....	52
Abb. 27: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Cefuroxim.....	53
Abb. 28: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Ciprofloxacin .....	54
Abb. 29: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Cotrimoxazol .....	55
Abb. 30: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Fosfomycin für <i>E. coli</i> .....	56
Abb. 31: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Fosfomycin für Enterobacterales ohne <i>E. coli</i> .....	57
Abb. 32: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Meropenem.....	58
Abb. 33: MHK-Werte und MALDI-Antibiogrammergebnis in den Urinproben für Nitrofurantoin für <i>E. coli</i> .....	59
Abb. 34: Bakterienzahl in der Durchflusszytometrie bei fehlendem kulturellem Wachstum in Abhängigkeit von Hemmstoffen .....	61
Abb. 35: Bakterienzahl in der Durchflusszytometrie bei Urinen ohne kulturelles Wachstum mit vs. ohne Hemmstoffe .....	62
Abb. 36: Leukozytenzahl bei Urinen mit Bakterien-Nachweis in der Durchflusszytometrie ohne kulturelles Wachstum mit vs. ohne Hemmstoffe .....	62
Abb. 37: Befundungsschema für die Verarbeitung von Urinen nach Leukozytenzahl und Bakterienzahl .....	63

## **Bildquellen**

Abb. 22: <https://de.bimedis.com/bd-phoenix-100-m27896> (Zugriff am: 27.08.2023),  
<https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/urin/urinmonovette/produkt/10.253/>  
 (Zugriff am: 24.04.2023), [https://drug.ku.dk/core-facilities/analytical-core-facility/malдитof/maldi\\_tof\\_guidelines.pdf](https://drug.ku.dk/core-facilities/analytical-core-facility/malдитof/maldi_tof_guidelines.pdf) (Zugriff am: 27.08.2023)

Abb. 23: <https://www.medicalexpo.de/prod/bruker-daltonics-inc/product-75820-543771.html> (Zugriff am: 27.08.2023),  
<https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/urin/urinmonovette/produkt/10.253/>  
 (Zugriff am: 24.04.2023), [https://drug.ku.dk/core-facilities/analytical-core-facility/malдитof/maldi\\_tof\\_guidelines.pdf](https://drug.ku.dk/core-facilities/analytical-core-facility/malдитof/maldi_tof_guidelines.pdf) (Zugriff am: 27.08.2023)

Abb. 24:  
<https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/urin/urinmonovette/produkt/10.253/>  
 (Zugriff am: 24.04.2023)

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Verwendete Antibiotika.....	13
Tab. 2: MHK-Teststreifen .....	13
Tab. 3: Urinteststreifen .....	14
Tab. 4: Chemikalien .....	15
Tab. 5: Technische Ausstattung .....	16
Tab. 6: Übersicht über die eingesendeten Materialien.....	27
Tab. 7: Erreger der untersuchten Urinproben (nur für $\geq 10^3$ KBE/mL) .....	28
Tab. 8: Verwendete Antibiotikakonzentrationen für den MBT-ASTRA Assay.....	47
Tab. 9: Erreger mit MALDI-Antibiogramm.....	50
Tab. 10: Erreger ohne MALDI-Antibiogramm I.....	50
Tab. 11: Erreger ohne MALDI-Antibiogramm II.....	51

## Literaturverzeichnis

1. Leitlinienprogramm DGU: Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Langversion 1.1-2, 2017  
AWMF Registernummer: 043/044, [https://register.awmf.org/assets/guidelines/043-044l\\_S3\\_Harnwegsinfektionen\\_2017-05.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/043-044l_S3_Harnwegsinfektionen_2017-05.pdf) (Zugriff am: 27.08.2023).
2. Dicheva S. Harnwegsinfekte bei Frauen. In: Glaeske G, Schick Tanz C. Barmer GEK Arzneimittelreport. 2015;107-37. <https://www.barmer.de/blob/37954/60143006d7108440f02512a6a80fcaea/data/pdf-arzneimittelreport-2015.pdf> (Zugriff am: 24.04.2023).
3. Simmering JE, Tang F, Cavanaugh JE, Polgreen LA, Polgreen PM. The Increase in Hospitalizations for Urinary Tract Infections and the Associated Costs in the United States, 1998-2011. *Open forum infectious diseases*. 2017;4(1):ofw281.
4. Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1956;69:56-64.
5. Oyaert M, Van Meensel B, Cartuyvels R, Frans J, Laffut W, Vandecandelaere P, et al. Laboratory diagnosis of urinary tract infections: Towards a BILULU consensus guideline. *Journal of microbiological methods*. 2018;146:92-9.
6. Schubert S. PR, Gatermann S., Fünfstück R., Naber K.G., Schimanski S., Wagenlehner F. . MiQ 02 - Harnwegsinfektionen. 3. Auflage ed. München: Elsevier GmbH; 2020.
7. EUCAST clinical breakpoints - bacteria (v. 10.0) 2020 [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_10.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf) (Zugriff am: 24.04.2023).
8. Neumeister B. BR, Geiss, H., Kimming P. *Mikrobiologische Diagnostik - Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*: Thieme Verlag KG; 2009.
9. Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M. 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. *Journal of medical microbiology*. 2011;60(Pt 11):1584-90.
10. Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clinical applications*. 2013;7(11-12):767-78.
11. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(9):2918-31.
12. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(3):927-37.
13. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(9):3321-4.
14. Jung JS, Eberl T, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S, et al. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes.

European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2014;33(6):949-55.

15. Sparbier K, Lange C, Jung J, Wieser A, Schubert S, Kostrzewa M. MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(11):3741-8.

16. Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 2017;29(sup1):2-9.

17. Kahlmeter G, Poulsen HO. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO.SENS study revisited. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(1):45-51.

18. Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;51(1):69-76.

19. Kahlmeter G, Ahman J, Matuschek E. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Causing Uncomplicated Urinary Tract Infections: A European Update for 2014 and Comparison with 2000 and 2008. *Infectious diseases and therapy*. 2015;4(4):417-23.

20. Hans-Reinhard B. *Antibiotika-Therapie - Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung*. 12. Auflage ed. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2013.

21. Castaneda-Garcia A, Blazquez J, Rodriguez-Rojas A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2013;2(2):217-36.

22. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*. 2016;4(2).

23. Grit A. *Antibiotika und Antimykotika*. 3. Auflage ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2009.

24. Zhang X, Zhang Y, Wang F, Wang C, Chen L, Liu H, et al. Unravelling mechanisms of nitrofurantoin resistance and epidemiological characteristics among *Escherichia coli* clinical isolates. *International journal of antimicrobial agents*. 2018;52(2):226-32.

25. Valenza G. [Multidrug-resistant gram-negative rods in the intensive care unit : Epidemiology, prevention and treatment options]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2019.

26. Dewar S, Reed LC, Koerner RJ. Emerging clinical role of pivmecillinam in the treatment of urinary tract infection in the context of multidrug-resistant bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(2):303-8.

27. Fuchs F, Hamprecht A. Results from a Prospective In Vitro Study on the Mecillinam (Amdinocillin) Susceptibility of Enterobacterales. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(4).

28. Brooks T, Keevil CW. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Letters in applied microbiology*. 1997;24(3):203-6.

29. Neuenschwander FR, Groß B, Schubert S. Rapid Antibiotic Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Directly from Urine Samples of UTI Patients Using MALDI-TOF MS. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2023;12(6).

30. Yuno T. UF-5000/4000 - Klinische Fallbeispiele: Sysmex Deutschland GmbH; 2020.

31. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;93(3):965-74.

32. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical biochemistry*. 2011;44(1):104-9.
33. Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, et al. Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(11):2820-4.
34. Gibb S, Strimmer K. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2012;28(17):2270-1.
35. Sparbier K, Schubert S, Kostrzewa M. MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods (San Diego, Calif)*. 2016;104:48-54.
36. Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(12):4155-62.
37. Giesen LG, Cousins G, Dimitrov BD, van de Laar FA, Fahey T. Predicting acute uncomplicated urinary tract infection in women: a systematic review of the diagnostic accuracy of symptoms and signs. *BMC family practice*. 2010;11:78.
38. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *The New England journal of medicine*. 1982;307(8):463-8.
39. Hooton TM, Roberts PL, Cox ME, Stapleton AE. Voided midstream urine culture and acute cystitis in premenopausal women. *The New England journal of medicine*. 2013;369(20):1883-91.
40. Chon CH, Lai FC, Shortliffe LM. Pediatric urinary tract infections. *Pediatric clinics of North America*. 2001;48(6):1441-59.
41. Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(8):1150-8.
42. Gibson B, Wilson DJ, Feil E, Eyre-Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings Biological sciences*. 2018;285(1880).
43. Sebastian Suerbaum G-DB, Stefan H.E. Kaufmann, Thomas F. Schulz (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer-Verlag GmbH Deutschland; 2020.
44. Idelevich EA, Becker K. How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2019;25(11):1347-55.
45. van Belkum A, Burnham CD, Rossen JWA, Mallard F, Rochas O, Dunne WM, Jr. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nature reviews Microbiology*. 2020;18(5):299-311.
46. Behera B, Anil Vishnu GK, Chatterjee S, Sitaramgupta VV, Sreekumar N, Nagabhushan A, et al. Emerging technologies for antibiotic susceptibility testing. *Biosensors & bioelectronics*. 2019;142:111552.
47. Smith KP, Kirby JE. Rapid Susceptibility Testing Methods. *Clinics in laboratory medicine*. 2019;39(3):333-44.
48. Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(1):103-14.
49. Oviaño M, Bou G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(1).

50. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of medical microbiology*. 2000;49(3):295-300.
51. Wybo I, De Bel A, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Van Cauwenbergh M, et al. Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(5):1961-4.
52. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(9):3222-7.
53. Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. Rapid antibiotic susceptibility testing on blood cultures using MALDI-TOF MS. *PloS one*. 2018;13(10):e0205603.
54. Axelsson C, Rehnstam-Holm AS, Nilson B. Rapid detection of antibiotic resistance in positive blood cultures by MALDI-TOF MS and an automated and optimized MBT-ASTRA protocol for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infectious diseases (London, England)*. 2020;52(1):45-53.
55. Oyaert M, Delanghe JR. Semiquantitative, fully automated urine test strip analysis. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2019;33(5):e22870.
56. De Rosa R, Grosso S, Lorenzi G, Bruschetta G, Camporese A. Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2018;484:171-8.
57. Ren C, Wu J, Jin M, Wang X, Cao H. Rapidly discriminating culture-negative urine specimens from patients with suspected urinary tract infections by UF-5000. *Bioanalysis*. 2018.
58. Kim SY, Park Y, Kim H, Kim J, Koo SH, Kwon GC. Rapid Screening of Urinary Tract Infection and Discrimination of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by Automated Flow Cytometric Analysis Using Sysmex UF-5000. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(8).
59. Previtali G, Ravasio R, Seghezzi M, Buoro S, Alessio MG. Performance evaluation of the new fully automated urine particle analyser UF-5000 compared to the reference method of the Fuchs-Rosenthal chamber. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2017;472:123-30.
60. Vuljanić D, Dojder A, Špoljarić V, Saračević A, Dukić L, Leniček-Krleža J, et al. Analytical verification of 12 most commonly used urine dipsticks in Croatia: comparability, repeatability and accuracy. *Biochemia medica*. 2019;29(1):010708.
61. LaRocco MT, Franek J, Leibach EK, Weissfeld AS, Kraft CS, Sautter RL, et al. Effectiveness of Preanalytic Practices on Contamination and Diagnostic Accuracy of Urine Cultures: a Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical microbiology reviews*. 2016;29(1):105-47.
62. Garcia-Coca M, Gadea I, Esteban J. Relationship between conventional culture and flow cytometry for the diagnosis of urinary tract infection. *Journal of microbiological methods*. 2017;137:14-8.
63. Tambyah PA, Maki DG. The relationship between pyuria and infection in patients with indwelling urinary catheters: a prospective study of 761 patients. *Archives of internal medicine*. 2000;160(5):673-7.
64. Bendig DW. The Differential Diagnosis of Sterile Pyuria in Pediatric Patients: A Review. *Global pediatric health*. 2021;8:2333794x21993712.

65. Kwon YE, Oh DJ, Kim MJ, Choi HM. Prevalence and Clinical Characteristics of Asymptomatic Pyuria in Chronic Kidney Disease. *Annals of laboratory medicine*. 2020;40(3):238-44.
66. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(5):625-63.
67. Schwartz DS, Barone JE. Correlation of urinalysis and dipstick results with catheter-associated urinary tract infections in surgical ICU patients. *Intensive care medicine*. 2006;32(11):1797-801.
68. Lee SP, Vasilopoulos T, Gallagher TJ. Sensitivity and specificity of urinalysis samples in critically ill patients. *Anaesthesiology intensive therapy*. 2017;49(3):204-9.
69. Klaassen IL, de Haas V, van Wijk JA, Kaspers GJ, Bijlsma M, Bökenkamp A. Pyuria is absent during urinary tract infections in neutropenic patients. *Pediatric blood & cancer*. 2011;56(5):868-70.
70. De Rosa R, Grosso S, Bruschetta G, Avolio M, Stano P, Modolo ML, et al. Evaluation of the Sysmex UF1000i flow cytometer for ruling out bacterial urinary tract infection. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(15-16):1137-42.
71. Ilki A, Ayas R, Ozsoy S, Soyletir G. Cost-effectiveness of a new system in ruling out negative urine cultures on the day of administration. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2017;36(7):1119-23.
72. Monsen T, Ryden P. A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2017;36(9):1691-703.
73. Stefanovic A, Roscoe D, Ranasinghe R, Wong T, Bryce E, Porter C, et al. Performance assessment of urine flow cytometry (UFC) to screen urines to reflex to culture in immunocompetent and immunosuppressed hosts. *Journal of medical microbiology*. 2017;66(9):1308-15.
74. Herraes O, Asencio MA, Carranza R, Jarabo MM, Huertas M, Redondo O, et al. Sysmex UF-1000i flow cytometer to screen urinary tract infections: the URISCAM multicentre study. *Letters in applied microbiology*. 2018;66(3):175-81.
75. Erdman P, Anderson B, Zacko JC, Taylor K, Donaldson K. The Accuracy of the Sysmex UF-1000i in Urine Bacterial Detection Compared With the Standard Urine Analysis and Culture. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2017;141(11):1540-3.
76. Millan-Lou MI, Garcia-Lechuz JM, Ruiz-Andres MA, Lopez C, Aldea MJ, Egido P, et al. Comparing Two Automated Techniques for the Primary Screening-Out of Urine Culture. *Frontiers in medicine*. 2018;5:353.
77. Millan-Lou MI, Garcia-Lechuz JM, Ruiz-Andres MA, Lopez C, Aldea MJ, Revillo MJ, et al. Validation and Search of the Ideal Cut-Off of the Sysmex UF-1000i((R)) Flow Cytometer for the Diagnosis of Urinary Tract Infection in a Tertiary Hospital in Spain. *Frontiers in medicine*. 2018;5:92.
78. Giesen CD, Greeno AM, Thompson KA, Patel R, Jenkins SM, Lieske JC. Performance of flow cytometry to screen urine for bacteria and white blood cells prior to urine culture. *Clinical biochemistry*. 2013;46(9):810-3.



79. Conkar S, Mir S. Urine Flow Cytometry in the Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Indian journal of pediatrics*. 2018;85(11):995-9.
80. van der Zwet WC, Hessels J, Canbolat F, Deckers MM. Evaluation of the Sysmex UF-1000i(R) urine flow cytometer in the diagnostic work-up of suspected urinary tract infection in a Dutch general hospital. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2010;48(12):1765-71.
81. Broeren M, Nowacki R, Halbertsma F, Arents N, Zegers S. Urine flow cytometry is an adequate screening tool for urinary tract infections in children. *European journal of pediatrics*. 2019;178(3):363-8.
82. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22(6):561.e1-6.
83. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(7):1007-12.
84. Tang M, Yang J, Li Y, Zhang L, Peng Y, Chen W, et al. Diagnostic Accuracy of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Direct Identification of Clinical Pathogens from Urine. *Open medicine (Warsaw, Poland)*. 2020;15:266-73.
85. Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomycin: an old, new friend? *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2010;29(2):127-42.
86. Lin EC. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annual review of microbiology*. 1976;30:535-78.
87. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1974;235(0):364-86.
88. EUCAST clinical breakpoints - bacteria (v 13.0) 2023 [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_13.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf) (Zugriff am: 24.04.2023).
89. Brook I. Inoculum effect. *Reviews of infectious diseases*. 1989;11(3):361-8.
90. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2019;74(10):2825-43.
91. Davey PG, Barza M. The inoculum effect with gram-negative bacteria in vitro and in vivo. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1987;20(5):639-44.
92. Eng RH, Cherubin C, Smith SM, Buccini F. Inoculum effect of beta-lactam antibiotics on Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985;28(5):601-6.
93. Toosky MN, Grunwald JT, Pala D, Shen B, Zhao W, D'Agostini C, et al. A rapid, point-of-care antibiotic susceptibility test for urinary tract infections. *Journal of medical microbiology*. 2020;69(1):52-62.
94. Jindal S, Thampy H, Day PJR, Kell DB. Very rapid flow cytometric assessment of antimicrobial susceptibility during the apparent lag phase of microbial (re)growth. *Microbiology (Reading, England)*. 2019;165(4):439-54.
95. Velican AM, Măruțescu L, Kamerzan C, Cristea VC, Banu O, Borcan E, et al. Rapid Detection and Antibiotic Susceptibility of Uropathogenic Escherichia coli by Flow Cytometry. *Microorganisms*. 2020;8(8).

96. Altobelli E, Mohan R, Mach KE, Sin MLY, Anikst V, Buscarini M, et al. Integrated Biosensor Assay for Rapid Uropathogen Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing. *European urology focus*. 2017;3(2-3):293-9.
97. Mach KE, Mohan R, Baron EJ, Shih MC, Gau V, Wong PK, et al. A biosensor platform for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from clinical samples. *The Journal of urology*. 2011;185(1):148-53.
98. Avesar J, Rosenfeld D, Truman-Rosentsvit M, Ben-Arye T, Geffen Y, Bercovici M, et al. Rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing using nanoliter arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(29):E5787-e95.
99. Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(7):738-43.
100. Idelevich EA, Nix ID, Busch JA, Sparbier K, Drews O, Kostrzewa M, et al. Rapid Simultaneous Testing of Multiple Antibiotics by the MALDI-TOF MS Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2021;11(10).

## **Danksagungen**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir beim Gelingen dieser Doktorarbeit geholfen und mich unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Sören Schubert für das Überlassen eines sehr interessanten Promotionsthemas und die Unterstützung, die er mir während der gesamten Zeit gegeben hat. Zudem bin ich sehr dankbar, dass er in mir eine dauerhafte Faszination für die Mikrobiologie geweckt hat.

Außerdem gilt mein herzlichster Dank Birgit Groß für die exzellente Einarbeitung in die mikrobiologischen Grundlagen und dafür, dass sie bei all meinen Fragen jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Daneben danke ich auch dem gesamten wissenschaftlichen Team des Max von Pettenkofer-Instituts und der klinischen Mikrobiologie für die fachliche Hilfe und moralische Unterstützung.

Weiterhin gilt mein größter Dank natürlich meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung während meiner Doktorarbeit und besonders meiner Mutter für ihren Einsatz bei den Korrekturen der Arbeit.

## **Publikationen/Vorträge**

Teile der Doktorarbeit wurden bereits veröffentlicht:

Neuenschwander FR, Groß B, Schubert S. Rapid Antibiotic Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Directly from Urine Samples of UTI Patients Using MALDI-TOF MS. *Antibiotics* (Basel, Switzerland). 2023;12(6).

„Rapid antibiotic susceptibility testing of Gram-negative bacteria directly from urine samples of UTI patients using MALDI-TOF MS“, 75. DGHM-Jahrestagung, Lübeck, 18.09.2023, Vortrag Felix Neuenschwander



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Neuenschwander, Felix

---

Name, Vorname

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

**Verbesserung der mikrobiologischen Urindiagnostik durch Einsatz von Durchflusszytometrie und schneller Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie**

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 15.06.2024

---

Ort, Datum

Felix Neuenschwander

---

Unterschrift Felix Neuenschwander