

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Entwicklung MALDI-TOF-basierter  
diagnostischer Methoden zur  
Identifikation periprothetischer bzw.  
gelenkassoziierter Infektionen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Azadda Nasruddin-Yekta (geb. Nasruddin)  
aus Bochum

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. Uwe Groß

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. Henning Urlaub

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. Uwe Groß

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Henning Urlaub

Drittreferent/in: Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 03.08.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Entwicklung MALDI-TOF-basierter diagnostischer Methoden zur Identifikation periprothetischer bzw. gelenkassoziierter Infektionen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 06.11.2021 .....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Noll C, Nasruddin-Yekta A, Sternisek P, Weig M, Groß U, Schilling AF, Beil FT, Bader O (2020): Rapid direct detection of pathogens for diagnosis of joint infections by MALDI-TOF MS after liquid enrichment in the BacT/Alert blood culture system. PLoS One. 2020 Dec 11;15(12)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Periprothetische und gelenkassoziierte Infektionen .....	1
1.2 Das $\alpha$ -Defensin.....	3
1.2.1 Die Rolle des $\alpha$ -Defensins in der Diagnostik von periprothetischen Gelenkinfektionen .....	4
1.3 MALDI- TOF Massenspektrometrie in der mikrobiologischen Labordiagnostik.....	5
1.3.1 MALDI-TOF MS aus mit Synovia-befüllten Blutkultur-Flaschen .....	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	7
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1 Materialien.....	9
2.1.1 Bakterienstämme.....	12
2.1.2 Biologisches Material.....	12
2.2 Methoden .....	14
2.2.1 MALDI- TOF Massenspektrometrie .....	14
2.2.2 Bakterienidentifizierung aus Blutkulturflaschen mit dem MALDI Sepsityper® .....	16
2.2.3 Nachweis von $\alpha$ -Defensin aus Gelenkpunktaten.....	17
2.2.4 Nachweis von $\alpha$ -Defensin mittels ELISA .....	21
2.2.5 Künstliche neuronale Netze.....	23
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1 MALDI-TOF MS.....	27
3.1.1 Bakterienidentifizierung aus Blutkulturflaschen mit dem MALDI Sepsityper .....	27
3.1.2 Nachweis von mit $\alpha$ -Defensin versetzten Rindergelenkpunktaten .....	33
3.1.3 Bearbeitung mit dem DTT-Protokoll.....	34
3.1.4 Bearbeitung mit dem Liquillizer-Protokoll.....	36
3.2 Auswertung durch das künstliche neuronale Netz.....	36
3.3 Ergebnisse des $\alpha$ -Defensin ELISA .....	37
3.3.1 Klassifizierung der ROC-Kurven nach mikrobiologischen und klinischen Kriterien .....	37
3.3.2 Korrelation der ELISA-Ergebnisse in Anhängigkeit der mikroskopischen Leukozytenanzahl .....	41
3.3.3 Klassifizierung der ROC-Kurven nach Leukozyten .....	43
3.3.4 Interpretation der Cut-off-Werte .....	46
3.3.5 Gegenüberstellung $\alpha$ -Defensin-ELISA und visuelle MALDI-TOF MS-Auswertung ...	48

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktueller Arbeitsprozess.....	15
Abbildung 2: Spektren: DTT, $\alpha$ -Defensin und Rindersynovia.....	19
Abbildung 3: $\alpha$ -Defensin-ELISA .....	22
Abbildung 4: Aufbau eines KNN .....	23
Abbildung 5: Convolutional neuronal network Aufbau (ConvNet).....	25
Abbildung 6: Workflow mit dem MALDI-Sepsityper-Kit .....	27
Abbildung 7: Ergebnisse MALDI Sepsityper aus Synovia-befüllten BK-Flaschen .....	28
Abbildung 8: Erregerverteilung .....	31
Abbildung 9: Verteilung der MALDI Sepsityper Score-Ergebnisse .....	32
Abbildung 10: Verdünnungsreihe: Mit Defensin versetzte Rindersynovia.....	33
Abbildung 11: $\alpha$ -Defensin MALDI Signal bei einem repräsentativen Punktat .....	34
Abbildung 12: Ergebnisverteilung des DTT-Versuchs .....	35
Abbildung 13: Übereinstimmung MALDI-positiver und MALDI-negativer Messungen mit dem DTT-Protokoll .....	35
Abbildung 14: Ergebnisvergleich Liquillizer und MALDI. MALDI-positive (links) und MALDI-negative (rechts) Messungen .....	36
Abbildung 15: Trainingsphase Epochen des ConvNet .....	37
Abbildung 16: ROC-Kurven nach definierten Kriterien und mit Berücksichtigung aller Punktate .....	40
Abbildung 17: Boxplot Einfluss der Leukozyten auf den Cut-off .....	41
Abbildung 18: ROC-Kurven nach Klassifizierung der mikroskopischen Leukozyten .....	45
Abbildung 19: Darstellung der interpretierten Cut-off-Kriterien ROC-Abb. 18 a-e .....	46
Abbildung 20: Darstellung der interpretierten Cut-offs Kriterien ROC-Abb. 20 a-e .....	47
Abbildung 21: Ergebnisverteilung nach Cut-off-Werten.....	48
Abbildung 22: Vergleich der Methoden $\alpha$ -Defensin-ELISA, $\alpha$ -Defensin-MALDI, und Kultur .....	50
Abbildung 23: Übereinstimmung von $\alpha$ -Defensin-MALDI-positiven und $\alpha$ -Defensin-ELISA-positiven Punktaten .....	51
Abbildung 24: MALDI-negative und ELISA-positive .....	52
Abbildung 25: MALDI-, Kultur-, und ELISA-positive Punktate nach verschiedenen Cut-offs.....	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien .....	9
Tabelle 2: Reagenzien und Lösungen.....	10
Tabelle 3: Geräte.....	10
Tabelle 4: Nährmedien.....	11
Tabelle 5: Bakterienstämme .....	12
Tabelle 6: Kits .....	13
Tabelle 7: Software .....	14
Tabelle 8: Vergleich Identifizierung MALDI Sepsityper mit kultureller Routinediagnostik..	29
Tabelle 9: Cut-off-Ermittlung nach mikrobiologischer Kultur .....	39
Tabelle 10: Kulturergebnis der Punktate zur Ermittlung der ROC-Kurven .....	39
Tabelle 11: Punktate in den Leukozyten-Gruppen .....	42
Tabelle 12: Boxplot $\alpha$ -Defensin-ELISA-Konzentration in Abhängigkeit von Leukozyten .....	42
Tabelle 13: Cut-off-Ermittlung nach mikroskopischem Leukozytennachweis .....	44
Tabelle 14: Leukozyteneigenschaften der Punktate zur Ermittlung der ROC-Kurven .....	44
Tabelle 15: Interpretation der ermittelten Cut-offs .....	46
Tabelle 16: Interpretierte Cut-offs bezogen auf Abbildung 19 a-e .....	47
Tabelle 17: Ergebnisverteilung Kultur und MALDI .....	49
Tabelle 18: ELISA Ergebnis-Verteilung und Übereinstimmung .....	51
Tabelle 19: MALDI-negative und ELISA-positive Punktate.....	52



## Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
AUC	<i>area under the curve</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BK	Blutkultur
CRP	C-reaktives Protein
ConvNet	Convolutional neuronal network
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
EBJIS	European Bone and Joint Infection Society
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HCCA	$\alpha$ -cyano-4-Hydroxymethylsäure
HNP	Humanes neutrophiles Peptid
ICM	International Consensus Meeting
IL-6	Interleukin 6
IT	Informationstechnologie
IQR	Interquartile range/ Interquartilsbereich
kDa	Kilodalton
KI	Künstliche Intelligenz
KNN	Künstliches neuronales Netz
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MS	Massenspektrometrie
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
NPW	Negativ prädiktiver Wert
NaCl	Natriumchlorid
PJI	<i>periprosthetic joint infection/</i> Periprothetische Gelenkinfektion
PPW	Positiv prädiktiver Wert
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
ReLU	<i>rectified linear unit</i>
WAIOT	World Association against Infection in Orthopaedics and Trauma
WBC	<i>white blood cells</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Periprothetische und gelenkassoziierte Infektionen

Die Diagnose periprothetischer und gelenkassoziiierter Infektionen stellt seit Jahren eine große Herausforderung im klinischen Alltag dar. So können je nach Ätiologie einer Gelenkinfektion mikrobiologische, histologische, radiologische sowie nicht zuletzt klinische Befunde eine mehr oder weniger wichtige Rolle spielen (Springer 2015). Bei der Entwicklung periprothetischer Infektionen sind weiterhin Faktoren wie die Beanspruchung und Weichteildeckung des Gelenks, der Infektionsweg und Vorerkrankungen des Patienten von besonderer Relevanz (Ochsner et al. 2019). Geringste Keimmengen können ausreichen, um eine Gelenkinfektion auszulösen. Ursächlich sind vor allem Staphylokokken, die Bestandteil der physiologischen Hautflora darstellen. Diese sogenannten Koagulase-negativen Staphylokokken sind in bis zu 43% der Fälle als Erreger ausfindig zu machen. Der Koagulase-positive Erreger *Staphylococcus aureus* bedingt immerhin noch 12-23% der Gelenkinfektionen. Aber auch Streptokokken, Enterobakterien, andere gramnegative Stäbchenbakterien, Anaerobier oder Mischkulturen können der Grund für eine Gelenkinfektion sein (Zimmerli et al. 2004; Ochsner et al. 2019). Für die Diagnostik und therapeutische Konsequenz gilt es zusätzlich zu unterscheiden, ob es sich um eine akute oder chronische Infektion handelt. Die bisher etablierten Untersuchungen sind vergleichsweise langwierig und gehen nicht zuletzt mit hohen Kosten einher. Andererseits existieren Probleme, die die Diagnostik gelenkassoziiierter Infektionen erschweren (Deirmengian et al. 2014; Drago et al. 2019). Gelenkassoziierte Infektionen werden mit Erregern in Verbindung gebracht, die zum einen langsam wachsen, zum anderen einen Biofilm bilden können (Costerton 1999). Die geringe Keimanzahl bei periprothetischen Gelenkinfektionen kann ebenfalls eine Herausforderung in der mikrobiologischen Diagnostik darstellen. Auch eine Kontamination durch Bakterien der Standortflora des Patienten ist bei der Diagnostik und Befunderhebung zu beachten (Drago et al. 2019). Eine zuverlässige und sichere Diagnose der periprothetischen und gelenkassoziierten Infektionen ist daher erstrebenswert. Andernfalls kann es zu Komplikationen wie Prothesenlockerungen, Osteomyelitis oder Pseudarthrosen kommen (Ochsner et al. 2019). Des

Weiteren kann ein langwieriger Krankheitsverlauf mit einer erhöhten Mortalität verbunden sein (Zmistowski et al. 2013). Sollte der Krankheitsverlauf eine ungünstige Prognose haben, ist die Behandlung des Patienten mit höheren Kosten für das Gesundheitssystem verbunden (Haddad et al. 2017).

Am Anfang einer angemessenen Behandlung steht die richtige Diagnose durch den behandelnden Arzt. Hohe Priorität hat mitunter eine zügige Diagnosestellung. Ein positives Patienten-Outcome ist nicht zuletzt von einer schnellen und möglichst genauen Sicherstellung der Diagnose abhängig. Die Definition, aber auch das diagnostische Vorgehen bei Verdacht einer Gelenkinfektion unterliegt einem ständigen Diskurs. Bisher existieren lediglich Versuche eine einheitliche und vor allem zuverlässige Diagnostik auf diesem Gebiet zu schaffen. Somit stellen bereits die Anamnese, der Verdacht und die klinische Untersuchung wichtige Faktoren dar (Springer 2015). Die Musculoskeletal Infection Society (MSIS) hat bereits 2011 eine Definition veröffentlicht, mit der Absicht einen Goldstandard der Definitionskriterien für periprothetische Infektionen zu etablieren. Danach wurden zwei Major- und sechs Minor-Kriterien aufgestellt. Bei Erfüllung eines Major-Kriteriums, eine mit der Prothese kommunizierende Fistel oder ein kultureller Erregernachweis aus zwei separaten Gewebe- oder Synovialproben, oder Vorliegen von vier von sechs Minor-Kriterien ist von einer PJI Infektion auszugehen (Parvizi et al. 2011). Im großen interdisziplinären Austausch mit zahlreichen Experten aus den Gebieten der Unfallchirurgie, Orthopädie sowie Mikrobiologie, Infektiologie und weiteren Fachdisziplinen wurde 2013 nach zehnmonatiger Zusammenarbeit eine einheitliche Definition, basierend auf der 2011 veröffentlichten Version, erarbeitet (Cats-Baril et al. 2013). In den vergangenen Jahren wurde diese Strategie durch die Arbeit der großen Orthopädischen Fachgesellschaften wie der Musculoskeletal Infection Society (MSIS), European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) und dem International Consensus Meeting (ICM) erweitert (Drago et al. 2019). Die modifizierte Definition des International Consensus Meeting aus dem Jahr 2018 hat zuletzt weltweit großen Zuspruch unter Fachleuten gefunden. Danach muss entweder ein Major-Kriterium erfüllt sein, oder sechs von sieben Minor-Kriterien. Sollten drei bis fünf Minor-Kriterien erfüllt werden, ist eine Infektion potenziell möglich. Die Musculoskeletal Infection Society prüfte 2018 die Evidenz ihrer 2011 aufgestellten Kriterien in einer Studie und überarbeitete diese nach sieben Jahren erneut (Parvizi et al. 2018). Zusätzlich haben Parvizi et al. ein auf diesen Kriterien

basierendes Scoring-System entwickelt, das die Sensitivität der Diagnostik bei Hüft- und Kniegelenkinfektionen erhöhen soll. Dieses Scoring-System wurde hinsichtlich der aktuellsten Kriterien auf seine Evidenz und Validität hin überprüft. Dabei konnte in der multizentrischen Studie eine Steigerung der Sensitivität auf 97,7% erreicht werden. Im Vergleich mit den MSIS-Kriterien und den ICM-Kriterien, bei denen eine Sensitivität von 79,3% bzw. 86,6% erzielt wurden, konnte somit insgesamt ein Anstieg hinsichtlich der Sensitivität erreicht werden.

Bereits bei den ersten Definitionsversuchen gehörten Laborparameter wie ein Anstieg des C-reaktiven Proteins (CRP) im Serum, eine beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), erhöhte Leukozytenzahlen bzw. ein prozentualer Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Gelenkflüssigkeit zu den diagnostischen Minor-Kriterien. Weitere prädiktive Biomarker wurden in jüngster Vergangenheit als diagnostische Parameter evaluiert. Ihre Validität ist Gegenstand aktueller Forschung (Deirmengian et al. 2014). So haben Deirmengian et al. 2014 in einer Studie fünf Biomarker ausfindig machen können, die gemessen an den Kriterien der Musculoskeletal Infection Society (MSIS), eine Periprothetische Gelenkinfektion mit einer Spezifität und Sensitivität von bis zu 100% nachweisen konnten. Zu diesen Antimikrobiellen Peptiden gehören beispielsweise das Lactoferrin, die Neutrophile Elastase 2, das Bacterial/Permeability increasing protein, das Neutrophilen-Gelantinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) und das  $\alpha$ -Defensin. Das  $\alpha$ -Defensin spielt unter anderem eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der korrekten Voraussage einer PJI, angelehnt an den MSIS Kriterien, und das Vorkommen von  $\alpha$ -Defensin in der Synovialflüssigkeit von Patienten aufgezeigt werden (Deirmengian et al. 2015; Bonanzinga et al. 2017). Auch weitere Studien konnten sowohl eine hohe Spezifität als auch Sensitivität des  $\alpha$ -Defensins in Bezug auf PJI bestätigen (Bonanzinga et al. 2017; Miyamae et al. 2019). Zurzeit werden wenige kommerziell erhältliche Tests zum Nachweis des  $\alpha$ -Defensins aus der Synovialflüssigkeit angeboten, die nicht zuletzt sehr kostenintensiv sind.

## 1.2 Das $\alpha$ -Defensin

Das  $\alpha$ -Defensin ist ein antimikrobielles Peptid. Antimikrobielle Peptide werden der unspezifischen Immunabwehr des angeborenen Immunsystems zugeordnet (Diamond et

al. 2009). Defensine sind in der Regel zwischen 2-5 kDa große, positiv geladene Peptide (Kagan et al. 1994; Lehrer und Lu 2012). Generell gibt es drei Defensin-Untergruppen, die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine. Ihre Unterteilung in die Subgruppen ist auf die Anordnung der intramolekularen Disulfidbrücken zurückzuführen. Humane  $\alpha$ -Defensine zeigen eine spezifische  $\beta$ -Faltblattstruktur, deren Stabilität durch drei Disulfidbrücken gesichert wird. Diese Disulfidbrücken entstehen durch sechs konservierte Cysteinreste (Lai und Gallo 2009). Die Anzahl der enthaltenen Aminosäuren beläuft sich bei den humanen  $\alpha$ -Defensinen auf 29-34. Die dazu gehörenden humanen neutrophilen Peptide 1-3 (HNP 1-3) besitzen 29-30 Aminosäuren (Selsted et al. 1985; Ganz et al. 2009). Insgesamt existieren sechs verschiedene humane  $\alpha$ -Defensine, die unterschiedliche und vielseitige immunmodulatorische Aufgaben übernehmen (Lai und Gallo 2009; Lehrer und Lu 2012). Eine Fähigkeit ist beispielsweise die Eigenschaft Chemotaxis zu vermitteln. Die humanen neutrophilen Peptide (HNP) bilden die Gruppe der HNP 1-4, von denen die HNP 1-3 vor allem in der unspezifischen Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten sind (Sakamoto et al. 2018). Die azurophile Granula der Granulozyten, deren Aufgabe unter anderem die unspezifische Immunabwehr darstellt, macht einen Anteil von 5-7% des enthaltenen Gesamtproteins aus. Dabei machen das HNP 1-3 wiederum etwa 30-50% der Azurgranula aus (Ganz et al. 2009). Die humanen  $\alpha$ -Defensine 5 und 6 sind intestinalen Ursprungs und werden in den Paneth-Zellen des Dünndarms synthetisiert (Jones und Bevins 1993; Schroeder et al. 2015). Die physikalischen und biochemischen Eigenschaften der Defensine sind für die Ausübung ihrer physiologischen Aufgaben von Relevanz (Pazgier et al. 2012). So wirken  $\alpha$ -Defensine bakterizid, fungizid und antiviral (Spitznagel 1990). Weiterhin wird dem Peptid eine Inhibierung von zytotoxischen Eigenschaften zugesprochen (Kim et al. 2005).

### **1.2.1 Die Rolle des $\alpha$ -Defensins in der Diagnostik von periprothetischen Gelenkinfektionen**

Die optimale Behandlung einer Gelenkinfektion setzt eine genaue Diagnostik und sichere Diagnosestellung voraus. Nicht zuletzt hängt die therapeutische Konsequenz davon ab. Je nach Erregerspektrum und Resistenzprofil muss eine Antibiotikabehandlung individuell angepasst werden. Nach Zusammenschau aller Befunde stellt sich die Frage

nach einer geeigneten Therapiestrategie. Möglich sind auch ein chirurgisches Debridement oder eine komplette Prothesenentfernung. Zur Unterscheidung einer septischen von einer aseptischen Gelenkinfektion wäre ein einfach zu bestimmender Biomarker hilfreich. So konnte angelehnt an den MSIS-Kriterien für das  $\alpha$ -Defensin eine Spezifität und Sensitivität von 100% erreicht werden, wohingegen der Leukozytenesterase-Test lediglich eine Sensitivität von 69% bei einer Spezifität von 100% erzielen konnte (Deirmengian et al. 2015). Bei einem entzündlichen Vorgang werden neutrophile Granulozyten früh an den Ort des Geschehens rekrutiert. Dies ist ihre Aufgabe als Teil des angeborenen Immunsystems. Da  $\alpha$ -Defensin, vor allem jedoch HNP 1-3, in der azurophilen Granula enthalten ist, konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg oder Nachweis von  $\alpha$ -Defensin und dem Vorliegen einer periprothetischen oder gelenkassoziierten Infektionen vermutet werden. Verglichen mit bisher etablierten Entzündungsparametern, die im Serum oder in der Synovialflüssigkeit gemessen wurden, konnte das  $\alpha$ -Defensin als zuverlässiger Biomarker für eine Diagnosestellung gewertet werden (Bingham et al. 2014; Frangiamore et al. 2016; Kasperek et al. 2016). Es konnte beobachtet werden, dass die Messung des  $\alpha$ -Defensins in der Synovialflüssigkeit unabhängig von anderen Einflussfaktoren einen Anstieg aufwies, wenn eine PJI vorlag (Bonanzinga et al. 2017). Ein Vorteil in diesem Zusammenhang wäre die breite Etablierung eines  $\alpha$ -Defensin-Tests als routinemäßiger Biomarker. Dabei sollte dieser labortechnisch praktikabel und idealerweise schnell durchführbar sein.

### **1.3 MALDI- TOF Massenspektrometrie in der mikrobiologischen Labordiagnostik**

Der Begriff MALDI-TOF MS steht für *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Diese Methode zur Identifizierung von mikrobiellen Erregern wie Bakterien und Pilzen hat in den letzten Jahren die konventionellen diagnostischen Methoden zur Differenzierung von Erregern in den mikrobiologischen Laboren abgelöst (Claydon et al. 1996). Sie bietet einen erheblichen zeitlichen Vorteil bei einfacher Handhabung (Krishnamurthy und Ross 1996; Christner et al. 2010; Patel 2015). Das Verfahren der Massenspektrometrie hat ihren Ursprung zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Die Anfänge der MALDI-TOF MS liegen im Jahre 1985, als das Prinzip der *matrix assisted laser*

*desorption/ionization time-of-flight* durch die Forschung der Wissenschaftler Karas, Bachmann und Hillenkamp maßgeblich mitentwickelt wurde (Karas et al. 1985). Das MALDI-TOF Massenspektrometer-Gerät besteht aus einer Ionenquelle, einem Flugrohr und einem Detektor. Zur Messung von Proben wird Material von einer Bakterienkolonie oder einer vorher aufbereiteten Probe auf ein Target, den Probenträger, gegeben. Danach wird die Matrix auf die Probe pipettiert. Die Matrix enthält  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxymizinsäure oder kurz HCCA, welche für eine Kristallisierung der Probe sorgt. Zum Messen der Probe wird das Target in das Massenspektrometer gelegt, in dem dann ein Vakuum aufgebaut wird. Unter diesen Bedingungen wird das Target anschließend mit einem Laser beschossen, was zur Verdampfung der mit Matrix kristallisierten Probe führt. Durch die Verdampfung lösen sich Moleküle aus dem Matrix-Proben-Gemisch und werden dabei ionisiert. Bei diesen Molekülen handelt es sich meist um ribosomale Proteine der Erreger (Lay 2001; Teramoto et al. 2007; Suarez et al. 2013). Die ionisierten Teilchen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und fliegen im Flugrohr des Massenspektrometers in Abhängigkeit ihrer Masse und Ladung. Im Vakuum des Flugrohres kann die Flugzeit (*time-of-flight*) bis zum Erreichen des Detektors am Ende der Flugstrecke genau gemessen werden. Je größer ein Teilchen oder je mehr Ladungen es besitzt, desto länger stellt sich die Flugzeit dar (Schubert und Wieser 2010). Das letztendlich resultierende Spektrum dieser mehrheitlich ribosomalen Proteine ergibt einen „Fingerabdruck“, der für den jeweiligen Erreger spezifisch ist. Das ermittelte Spektrum wird mit einer Datenbank abgeglichen, in der Spektren klinisch relevanter Bakterien und Pilze gespeichert sind. So kann man eine Keimidentifizierung der Gattung oder sogar der Spezies erhalten.

### **1.3.1 MALDI-TOF MS aus mit Synovia-befüllten Blutkultur-Flaschen**

Die bisherige mikrobiologische Diagnostik fußt auf dem kulturellen Ansatz von Bakterienkolonien aus dem eingesendeten Probenmaterial. Mit der Identifizierung der Erreger anhand der gewachsenen Bakterienkolonie ist in der Vergangenheit schon ein großer Fortschritt in der Diagnostik erzielt worden (Claydon et al. 1996; Patel 2015). Der direkte Keimnachweis aus positiven BK-Flaschen, die mit Materialien wie dem peripheren Blut befüllt sind, ist bereits eine etablierte Methode. Die Firma Bruker Daltonik (Bremen,

Germany) hat für diesen Zweck ein Kit entwickelt, das den direkten Erregernachweis aus Blut-befüllten BK-Flaschen ermöglicht (Buchan et al. 2012; Di Gaudio et al. 2018; Scohy et al. 2018). In jüngster Vergangenheit konnte ebenfalls zahlreich gezeigt werden, dass der direkte Bakterien-, aber auch Pilznachweis aus verschiedenen Material-befüllten BK-Flaschen mittels MALDI-TOF MS erzielt werden konnte (Christner et al. 2010; Bader 2013; Tadros et al. 2013; Scohy et al. 2018). Die Intention ist eine schnellere Keimidentifizierung, die primär nicht vom Wachstum der Bakterien- oder Pilzkolonien auf einem Nährmedium abhängt.

Einige Kliniken haben die direkte Abnahme von Gelenkflüssigkeit in BK-Flaschen bereits in den präanalytischen Prozessablauf beim Management von periprothetischen und gelenkassoziierten Gelenkinfektionen aufgenommen. So wird bei der Gelenkspiration die BK-Flasche in der Regel zeitgleich mit befüllt. Je nach Möglichkeit des Einsenders vor Ort können die BK-Flaschen im hauseigenen Labor vorab inkubiert werden und bei positivem Wachstumssignal in das mikrobiologische Untersuchungslabor eingeschendet werden. Dieses Vorgehen bietet sich vor allem bei langen Transportwegen in ein mikrobiologisches Labor an.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Diese Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, inwiefern der Einsatz MALDI-TOF MS-basierter Methoden in der Labordiagnostik der Gelenkinfektionen erweitert und der Prozessablauf gezielt verbessert werden kann.

Im Konkreten werden folgende Fragen behandelt:

1. Ist der direkte Erregernachweis aus mit Synovia-befüllten BK-Flaschen möglich?
2. Ist die Detektion von  $\alpha$ -Defensin aus der Synovialflüssigkeit mithilfe von MALDI-TOF MS realisierbar?
3. Wie lassen sich die Messergebnisse am effizientesten auswerten?
4. Welche Schlussfolgerungen und Vor- sowie Nachteile ergeben sich aus den gewonnenen Erkenntnissen?



Dazu soll im ersten Teil geklärt werden, ob vom Probeneingang bis zum ersten Zwischenbefund durch direkte Messung aus Synovia-befüllten BK-Flaschen eine zeitliche Verkürzung erreicht werden kann. Der direkte Erregernachweis wird mit dem Einsatz des MALDI Sepsityper<sup>®</sup> Kits von Bruker (Bruker Daltonik, Bremen) geprüft.

Weiterhin wird im experimentellen Teil eine Methode entwickelt, um den bekannten Biomarker  $\alpha$ -Defensin mittels MALDI-TOF MS zu detektieren. Da derzeit nur wenige zum Teil kostenintensive Immunoassays zur Bestimmung des  $\alpha$ -Defensins angeboten werden, wäre die massenspektrometrische Detektion eine innovative Alternative zu gängigen Methoden in der Labordiagnostik der Gelenkinfektionen. Vor allem wäre sie eine zeitsparende sowie finanziell günstige Möglichkeit die MALDI-TOF MS erweitert zu nutzen.

Der Methodenvergleich wird mit dem immunologischen Verfahren des *enzyme-linked immuno sorbent assay* des HNP 1-3 ELISA von Hycult<sup>®</sup>Biotech (Hycult<sup>®</sup> Biotech, Uden, NL) durchgeführt. Die Gegenüberstellung soll die Faktoren Genauigkeit, Handhabung sowie die Vor- und Nachteile beider Methoden aufzeigen.

Bei der Auswertung des MALDI-Defensin-Versuchs wird außerdem ein neuer Ansatz zur Auswertung von größeren Datenmengen unternommen. Im Zeitalter von künstlicher Intelligenz und maschinellem Lernen wird ein künstliches Neuronales Netz (KNN) entwickelt. Dieses KNN soll im Stande sein den Untersucher bei der Auswertung der Messreihen zu unterstützen. Letztendlich soll die Auswertung durch das KNN dahingehend vereinfacht werden, dass für jede Probe ein qualitatives Ergebnis von „positiv“ oder „negativ“ erzielt werden kann.

Im Optimalfall schicken Einsender ein Gelenkpunktat oder eine Synovia-befüllte BK-Flasche, die durch MALDI-TOF-basierte Untersuchungen, z.B. durch Aufarbeitung mit dem Sepsityper<sup>®</sup> und die Bestimmung des  $\alpha$ -Defensin, eine zuverlässige Aussage bezüglich einer Gelenkinfektionen erlaubt. Dabei soll die Genauigkeit des  $\alpha$ -Defensin-Nachweises im besten Fall durch den Einsatz von Künstlicher Intelligenz, hier durch spezielle bilderkennende Neuronale Netze, verbessert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Safe-Lock Tubes® (2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Glaspipetten 5 mL, 10mL	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Glaspasteurpipetten	Brand GmbH Co KG, Wertheim
Anaerocult Inkubationstopf	Merck KGaA, Darmstadt
CryoPure 1,8 mL Gefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Quality pipette tips Pipettenspitzen 0,1-20 µL, 2-200 µL, 10-1000 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Filter tips Biosphere® Pipettenspitzen 0,1-20 µL, 2-200 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
50 mL Falcon	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Impfchlingen 1 µL, 10 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Wiegeschalen 5 ml 35 x 35 mm, PVC	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Generatoren GENbox CO <sub>2</sub> für mikroaerophile Stämme	Biomérieux, Nürtingen
Generatoren GENbox anaer für anaerobe Keime	Biomérieux, Nürtingen
Einmalkanülen Sterican® 20 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze BD Plastipak™ 1 mL	BD GmbH, Heidelberg
Spritze Ecoject® 2 mL	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Punktionsbesteck (Kanüle und Spritze)	BD GmbH, Heidelberg

**Tabelle 2: Reagenzien und Lösungen**

70%ige Ameisensäure	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Acetonitril	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
Aqua dest. und Aqua bidest.	Eigenherstellung des Instituts
Ethanol Rotipuran® ≥ 99,8% p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid Suprapur®	Merck KGaA, Darmstadt
80%ige Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MALDI Matrix HCCA	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Defensin HNP-1 human	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Peptide calibration standard Part No. 8206195	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Protein calibration standard I Part No. 8206355	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Liquillizer®	MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlußheim

**Tabelle 3: Geräte**

Zentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Sepatech Labofuge M	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Densitometer DEN-1	Biotechnology Lab4you GmbH, Berlin
Reagenzschüttler Vortex genius 3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau
MALDI autoflex III	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MALDI microflex	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MALDI MSP 96 Target und 256 Target	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Wärmeblock – Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg

SpeedVac Concentrator Savant DNA 120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Eppendorf Research® plus Pipette 0,1-2,5 µL, 0,5 µL, 10-100 µL, 20-200 µL und 100-1000 µL -	Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage Entris®	Sartorius AG, Göttingen
Manueller Koloniezähler	Waldemar Link GmbH & Co. KG, Hamburg
Ultraschallbad Bacto Sonic 14.2	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Brutschrank Heraeus Function Line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laborgasbrenner gasprofi 1 SCS micro	WLD Tec., Göttingen
Pipettierhelfer Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Sicherheitswerkbank BDK®- S 1800	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Kühlschrank Liebherr premium	Liebherr- International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank Liebherr comfort	Liebherr- International AG, Bulle, Schweiz
BACT/ALERT® 3D	Biomérieux, Nürtingen
Plattenreader Tecan Sunrise™	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz

**Tabelle 4: Nährmedien**

Columbia-Agar mit 5% Schafsblut (COS-Agar)	Biomérieux, Nürtingen
Kochblut-Agar PolyViteX (PVX- Agar)	Biomérieux, Nürtingen
Thioglycollat Medium U.S.P.	Oxoid Limited, Basingstoke Hants, UK
BHI- Bouillon Brain Heart Infusion Broth	Oxoid Limited, Basingstoke Hants, UK

### 2.1.1 Bakterienstämme

Die für den ersten Versuchsteil zur Bestimmung der Detektionsgrenzen verwendeten Bakterienstämme stammen zum Teil von der ATCC (*American type culture collection*). Außerdem sind einige der laborinternen Stammsammlung bzw. aus der laufenden Diagnostik entnommen. Alle Bakterienstämme wurden vor ihrem Gebrauch kultiviert und passagiert. Am Ende des Versuchs wurden alle zwölf Bakterienstämme mittels Kryokonservierung in 1,8 mL CryoPure Gefäßen von Sarstedt bei -18°C eingefroren und asserviert.

**Tabelle 5: Bakterienstämme**

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12208
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Stammsammlung Nr. 208
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Enterococcus faecalis</i>	Stammsammlung Nr. 71
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Isolat Pat.Nr. 163145
<i>Staphylococcus capitis</i>	Isolat Pat.Nr. 163328
<i>Streptococcus oralis</i>	Isolat Pat.Nr. 163277.3
<i>Corynebacterium striatum</i>	Isolat aus laufender Diagnostik
<i>Cutibacterium acnes</i>	Isolat aus laufender Diagnostik
<i>Bacillus subtilis</i>	Stammsammlung Nr.101

### 2.1.2 Biologisches Material

#### 2.1.2.1 Humane Gelenkpunktate

Die bewachsenen und unbewachsenen Gelenkpunktate stammten aus der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und wurden im Zeitraum vom 01.08.2017 – 01.07.2019 gesammelt. Hierfür verweisen wir auf die Ethikanträge 26/2/18

und 29/11/17. Bis zu ihrer Bearbeitung für die Versuche wurden sie bei -18 °C eingefroren.

#### 2.1.2.2 Blutkulturflaschen

Die mit Gelenkpunktaten befüllten Blutkulturmedien, hier Bact/ALERT® der Firma Biomérieux, und BACTEC™ der Firma Becton Dickinson wurden ebenfalls aus der täglichen Routine bezogen und bei positiver Meldung durch den Vollautomaten BACT/ALERT® 3D direkt mit dem MALDI Sepsityper® weiterverarbeitet. Das Sammeln der positiv gemeldeten Flaschen schloss den Zeitraum vom 01.12.2017 bis zum 24.06.2019 ein.

#### 2.1.2.3 Rindergelenkspunktate

Für die Verwendung der Punktate und Durchführung der Versuche wird auf die Anträge, 26/2/18, 29/11/17 sowie DE 03 152 0005 21 (Veterinärmedizinische Registriernummer für die Erlaubnis zur Verwendung tierischer Nebenprodukte) verwiesen.

Der Gewinn der Gelenkspunktate von Rindern wurde im Schlachthof Kassel GmbH & Co. Verwaltungs-KG fachgerecht durch eine Fachärztin für Orthopädie und Unfallchirurgie und einem erfahrenen Biochemiker und Molekularbiologen unter Aufsicht des örtlichen Schlachthofpersonals durchgeführt. Für die Materialgewinnung wurden die Metacarpalgelenke von sechs verschiedenen, bereits getöteten Rindern punktiert. Die Punktion erfolgte von lateral zwischen dem Mittelfußknochen und den Seitensträngen des M. interosseus.

**Tabelle 6: Kits**

MALDI Sepsityper® Kit	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Human HNP 1-3 HK317 ELISA Kit	Hycult® Biotech, Uden, NL

**Tabelle 7: Software**

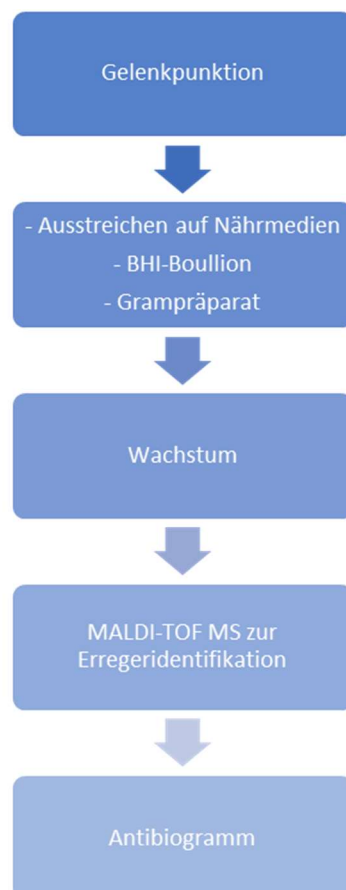
MALDI Software Compass MBT 3.0	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MALDI Software flexAnalysis 3.0	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Tecan Magellan™ Software	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2013	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft PowerPoint 2013	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Jupyter Notebook	Project Jupyter © <a href="https://jupyter.org/">https://jupyter.org/</a> ; Zugriff am 20.08.2019
Anaconda - Data Science Toolkit	<a href="https://www.anaconda.com/">https://www.anaconda.com/</a> ; Zugriff am 20.08.2019
EasyROC Version 1.3	<a href="http://www.biosoft.hacet-tepe.edu.tr/easyROC/">http://www.biosoft.hacet-tepe.edu.tr/easyROC/</a> ; Zugriff am 22.10.2019
Box Plot Template	<a href="https://www.vertex42.com/Excel-Templates/box-whisker-plot.html">https://www.vertex42.com/Excel-Templates/box-whisker-plot.html</a> ; Zugriff am 29.10.2019

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 MALDI- TOF Massenspektrometrie

Der hier beschriebene Prozess bezieht sich auf das diagnostische Vorgehen in der Zeit während des Promotionsvorhabens im Institut für medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen. Eingesendete Gelenkpunktate werden auf konventionelle Nährmedien aufgetragen und ausgestrichen. Man unterscheidet hierbei feste von flüssigen Nährmedien. Zu den festen Medien gehören der Blut-, MacConkey- und Kochblutagar. Bei der Durchführung der Versuche wurden Nährmedien der Firma Biomérieux (Nürtingen, Germany) verwendet. Zusätzlich wurde die Gelenkflüssigkeit in eine Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI-Bouillon) gegeben. Die BHI stellt ein Flüssigmedium zur Anreicherung von Erregern dar. Die BHI-Bouillon stammte vom Hersteller Oxoid Limited

(Basingstoke Hants, UK). Weiterhin wird am Einsendetag ein mikroskopisches Grampräparat des Gelenkpunktats angefertigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwölf Stunden werden die Nährmedien auf ein mögliches Wachstum hin beurteilt. Bei positivem Wachstum wird die Identifizierung des Erregers durch die MALDI-TOF MS eingeleitet. Nach erfolgreicher Identifizierung wird eine erregerangepasste Resistenzbestimmung durchgeführt. Falls es zur Trübung der BHI-Bouillon kommt, wird diese auf Nährmedien ausgestrichen und bis zum nächsten Tag inkubiert. Bei Wachstum aus der BHI-Anreicherung entspricht das weitere Prozedere dem beim Wachstum auf festen Nährmedien.



**Abbildung 1: Aktueller Arbeitsprozess**



### 2.2.2 Bakterienidentifizierung aus Blutkulturflaschen mit dem MALDI Sepsityper®

Für den Nachweis von Bakterienwachstum in Synovialflüssigkeit wurden mit Synovia-befüllte BK-Flaschen aus der laufenden Diagnostik neben ihrer routinemäßigen Bearbeitung parallel nach dem Protokoll des Sepsityper® Kits (Bruker Daltonik, Bremen) bearbeitet. Dieses kommerziell erhältliche Kit ist bereits für Blutkulturen erfolgreich getestet worden und zugelassen. Jede, im Bearbeitungszeitraum aus dem Laborbetrieb durch das BacT/ALERT® 3D (Biomérieux, Nürtingen) positiv gemeldete BK-Flasche wurde nach dem Protokoll des Sepsityper® Kits bearbeitet. Zur Kontrolle des Protokolls wurde aus der positiv gemeldeten Flasche ein kultureller Ansatz auf konventionellen Nährmedien durchgeführt.

Die Kulturmedien umfassten aerobe und anaerobe Medien der Hersteller Biomérieux und Becton Dickinson.

Für die Aufarbeitung wurde das Protokoll aus dem MALDI- Sepsityper® Kit (Bruker Daltonik, Bremen, Instructions for Use, Page 6 of 7, Revision 2) befolgt.

Zuerst wurde das Septum der zu bearbeitenden BK-Flasche mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden 1 mL Blutkulturflüssigkeit mithilfe einer Kanüle und einer Spritze aus der Flasche entnommen und in ein Eppendorf-Tube überführt. Zu diesem Inhalt wurden 200 µL Lysis Puffer hinzu pipettiert und mithilfe eines Vortexschüttlers durchgemischt. Von diesem Gemisch wurden 800 µL entnommen und in eine Filtersäule, SigmaPrep™ (SC1000-1KT) der Firma Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA), gegeben und zwei Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Filter entfernt und das Gemisch noch mal zwei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde sorgfältig abgehoben und verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Sediment (Pellet) in 1 mL Waschpuffer resuspendiert. Danach wurde das Gemisch eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Schließlich wurde das Pellet in 300 µL Aqua dest und 900 µL Ethanol erneut in Lösung gebracht. Als nächstes wurde der Ansatz erneut bei 13000 rpm zwei Minuten lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend ein weiteres Mal bei 13000 rpm zentrifugiert und der restliche Überstand abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurde das Tube bei Raumtemperatur und geöffnetem Deckel einige Minuten zum Trocknen gebracht. Danach wurden in Abhängigkeit der Größe des Pellets 2–50 µL

70%ige Ameisensäure hinzu gegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert. Eine zur Ameisensäure äquivalente Menge 100%iges Acetonitril wurde zu diesem Gemisch hinzugefügt und der gesamte Inhalt sorgfältig gemischt. Im weiteren Verlauf wurde das Gemisch zwei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und 1  $\mu$ L Überstand abgehoben und auf ein MALDI Target pipettiert. Nach Trocknung der Probe bei Raumtemperatur wurden 1  $\mu$ L MALDI Matrix (HCCA) auf den Mikroliter angetrockneter Probe pipettiert und die erneute Trocknung abgewartet. Danach konnte die Probe im MALDI-TOF Massenspektrometer gemessen werden.

### 2.2.3 Nachweis von $\alpha$ -Defensin aus Gelenkpunktaten

#### 2.2.3.1 Kalibration und Kontrolle

Um den Messbereich des  $\alpha$ -Defensins zu kalibrieren wurde ein selbst hergestellter Kalibrator eingesetzt. Dies gelang durch das Mischen von zwei geeigneten Standards. Zum einen wurde der Peptide calibration standard (Part No. 8206195, Bruker Daltonik, Bremen) und zum anderen der Protein calibration standard I (Part No. 8206355, Bruker Daltonik, Bremen) verwendet. Vorab musste zur Herstellung des Kalibrators der gesamte Inhalt des Peptid- sowie des Protein Standards in je 125  $\mu$ L 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA) gelöst werden. Der Peptid- und Protein Standard konnten nun im Verhältnis von 1:1 gemischt werden. Weiterhin wurde dem Kalibrator eine verdünnte Menge an Defensin-Lösung hinzupipettiert. 80  $\mu$ L eines hergestellten Standardmixes zur Kalibration enthielten letztendlich 38  $\mu$ L Peptid Standard, 38  $\mu$ L Protein Standard und 4  $\mu$ L 1:20 verdünntes  $\alpha$ -Defensin. Von diesem Standardmix konnte 1  $\mu$ L auf das MALDI Target aufgetragen werden. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurden 1  $\mu$ L MALDI Matrix HCCA hinzupipettiert. Nach erneuter Trocknung des Ansatzes erfolgte die Kalibration.

Als reines Reagenz wurde das Defensin HNP-1 human von Sigma Aldrich verwendet. Dieses Reagenz enthielt 25  $\mu$ g/mL Lösung. Dazu musste die Substanz in einem geeigneten Lösungsmittels gelöst werden. Das Lösungsmittel wurde selbst hergestellt und bestand bei 30 mL Gesamtvolumen aus 50% Acetonitril, 30% Aqua bidest und 20% Ameisensäure. Der Inhalt von 25  $\mu$ g  $\alpha$ -Defensin wurde in 250  $\mu$ L des selbsthergestellten Lösungsmittels gelöst. Von diesem Ansatz konnte 1  $\mu$ L zur Messung auf das Target pipettiert werden. Dies diente als Kontrolle bei den Versuchsreihen.

Weiterhin wurde das angelöste Defensin zur Herstellung eines Standards verwendet. Dafür wurden 4  $\mu\text{L}$  der hergestellten Defensin-Lösung vorher im Verhältnis von 1:20 verdünnt und zum selbstgemischtem Standard pipettiert. Nicht verwendetes  $\alpha$ -Defensin Reagenz wurde aliquotiert und bei  $-18^\circ\text{C}$  für eine spätere Verwendung eingefroren.

#### 2.2.3.2 Nachweis von $\alpha$ -Defensin aus mit Defensin versetzten Rindergelenkspunktaten

Um die Möglichkeit des  $\alpha$ -Defensin-Nachweises vorher zu testen wurde auf Rindergelenkspunktate zurückgegriffen.

Vor der Verwendung der Punktate wurden diese auf eine mögliche Kontamination hin mittels kultureller Probenanlage überprüft. Der Ausschluss von mikrobiellem Wachstum geschah auf einem COS-Nährmedium unter aeroben und anaeroben sowie auf einer Kochblutplatte unter mikroaerophilen Wachstumsbedingungen.

Die Rindergelenkspunktate wurden mit einer definierten Menge humanem  $\alpha$ -Defensin versetzt und anschließend weiter verdünnt. Vorher mussten sie mit Dithiothreitol, kurz DTT, zur Verringerung der Viskosität bearbeitet werden. Die Endkonzentration des DTT betrug nun 0,1%. Danach wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentrationen in den jeweiligen Tubes verringerte sich dementsprechend von 9,09  $\text{ng}/\mu\text{L}$  im ersten Tubes auf 4,55  $\text{pg}/\mu\text{L}$  im zweiten, 2,27  $\text{fg}/\mu\text{L}$  im dritten, 1,14  $\text{ag}/\mu\text{L}$  im vierten und 0,57  $\text{zg}/\mu\text{L}$  im fünften und letzten Tube. Nachdem jede Probe etwa 10 Sekunden lang mit dem Vortexschüttler gemischt wurde, wurde sie für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Mit dem Überstand erfolgte nun die Weiterverarbeitung. Dazu wurden 1  $\mu\text{L}$  des Überstandes aller bearbeiteten Punktateverdünnungen auf ein Target und nach Trocknung des Überstandes die gleiche Menge MALDI Matrix HCCA über die Proben pipettiert. Nachdem alle Proben vollständig auf dem Target getrocknet waren, wurde das Target zu Messung ins das MALDI-TOF Spektrometer gelegt. Die Datenbank musste vor der Messung auf LP\_Pepmix.par eingestellt werden. In dieser Datenbank sind Spektren zu Peptiden hinterlegt.

### 2.2.3.3 Herstellung der DTT-Lösung

Zu Beginn der Bearbeitung der Punktate musste eine 0,2%ige DTT-Lösung mit Acetonitril hergestellt werden. Dafür wurden 200 mg 1,4-Dithiothreitol auf einer Präzisionswaage abgewogen und in ein 50 mL Falcon gegeben. Nun wurde das kristalline Pulver unter einer Werkbank mit Luftabzug mit 10 mL Acetonitril aufgefüllt und darin gelöst. Im Anschluss erhielt man eine 0,2%ige DTT-Lösung, die für die weiteren Versuchsansätze benutzt werden konnte.

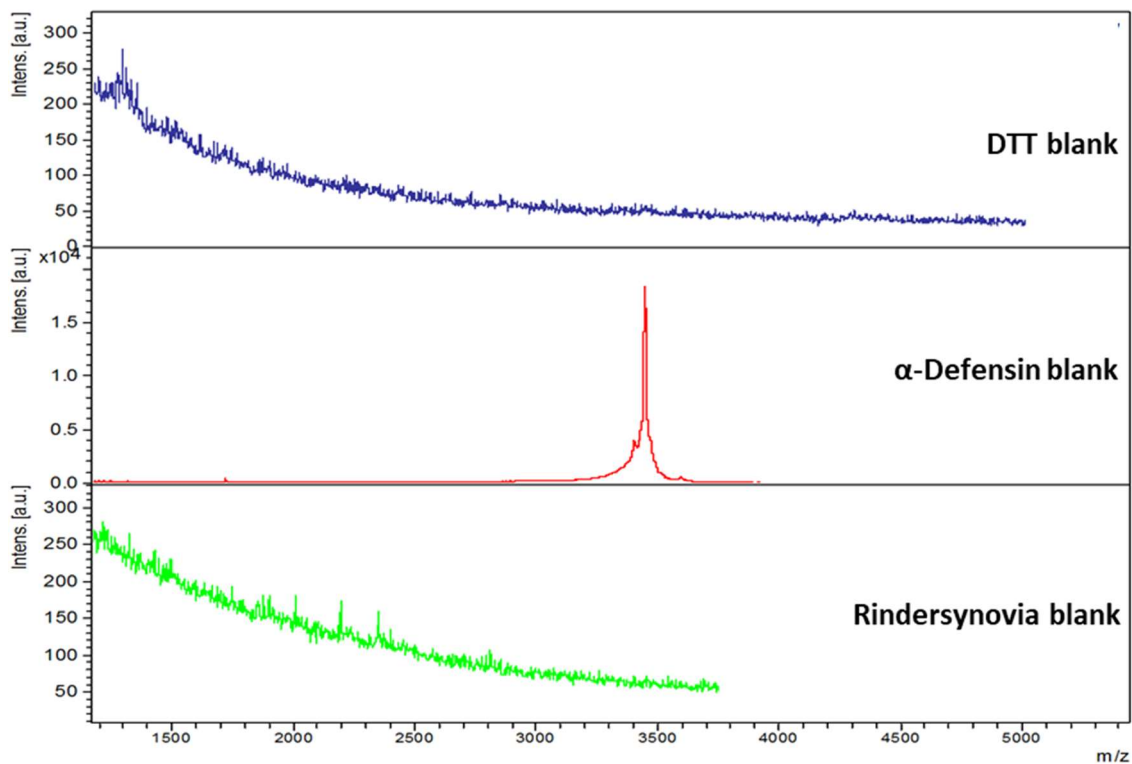


Abbildung 2: Spektren: DTT,  $\alpha$ -Defensin und Rindersynovia

### 2.2.3.4 Nachweis von $\alpha$ -Defensin aus Patientensynovia

Die Gelenkpunktate für diesen Versuch entstammten aus der Routinediagnostik und wurden nach ihrer konventionellen kulturellen Bearbeitung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Insgesamt wurden die Gelenkpunktate in einem Zeitraum vom 01.08.2017 - 01.07.2019 gesammelt. Die Bearbeitung der Gelenkpunktate begann nachdem diese Raumtempe-

ratur erreichten. Um ein geeignetes Protokoll zur Detektion von  $\alpha$ -Defensin aus Synovialflüssigkeit zu finden, wurden zwei Protokolle entwickelt. Zum Vergleich startete die Durchführung der beiden Protokolle an Kultur-positiven sowie Kultur-negativen Gelenkpunktaten aus der laufenden Routinediagnostik. Die visuelle Auswertung geschah mithilfe der Software Flexanalysis 3.0 von Bruker.

#### 2.2.3.5 Aufarbeitung mit DTT

Zum Nachweis von  $\alpha$ -Defensin aus der Synovialflüssigkeit mikrobiologisch kulturell positiver Gelenkpunktate wurde ein Protokoll zur Vorbehandlung der Punktate entwickelt. Diese Vorbehandlung erhielten alle Gelenkpunktate vor der massenspektrometrischen Messung. Die Durchführung entspricht im Wesentlichen der der Vorbereitung der Rindergelenkpunktate. Der entscheidende Unterschied ist, dass bei den humanen Gelenkpunktaten kein Defensin hinzugegeben wurde und auch keine Verdünnungsreihe erstellt wurde. In die vorbereiteten Eppendorf-Tubes pipettierte man 25  $\mu$ L des Gelenkpunktates und die gleiche Menge der 0,2%igen DTT-Lösung. Danach wurde der Ansatz kurz gevortexet. Im Anschluss wurde das Eppendorf-Tube zwei Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Menge von 1  $\mu$ L Überstand konnte auf ein MALDI Target pipettiert werden. Im Anschluss konnte 1  $\mu$ L HCCA (Matrix) pipettiert werden. Die MALDI-TOF MS Messung erfolgte wieder bei der Datenbank LP\_Pepmix.par.

#### 2.2.3.6 Aufarbeitung mit dem Liquillizer<sup>®</sup>-Reagenz

Das Liquillizer<sup>®</sup>-Reagenz ist eine gebrauchsfertige wässrige Lösung, die aus verschiedenen Reagenzien besteht. Die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller Meta Systems (Altussheim, Deutschland) nicht genauer erläutert. Der Bedienungsanleitung ist jedoch zu entnehmen, dass es sich um ein DTT- freies Reagenz handelt (Liquillizer- Bedienungsanleitung, MetaSystems Hard & Software GmbH, PDI-LIQIFUDE-2017-12-01-P). Eigentlich findet das Liquillizer<sup>®</sup>-Reagenz Verwendung in der Diagnostik von respiratorischem Untersuchungsmaterial. Es sorgt für eine Verflüssigung der Proben durch Herabsetzung der Viskosität.

Bei der Aufbereitung wurden 10  $\mu$ L eines Gelenkpunktates in ein Eppendorf-Tube pipettiert und mit 10  $\mu$ L der Liquillizer<sup>®</sup>-Lösung gemischt. Danach wurde eine äquivalente Menge, hier also 20  $\mu$ L Acetonitril hinzugegeben und sorgfältig gemischt. Im Anschluss

wurde der Ansatz zwei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. 1  $\mu$ L des Überstandes wurde auf ein MALDI Target aufgetragen und nach vollständiger Trocknung bei Raumtemperatur mit einem 1  $\mu$ L Matrix bedeckt. Nachdem dieser auch getrocknet war, konnte die Probe mittels MALDI-TOF gemessen werden. Hier musste die Datenbankumstellung auf LP\_Pepmix.par umgestellt werden.

#### 2.2.4 Nachweis von $\alpha$ -Defensin mittels ELISA

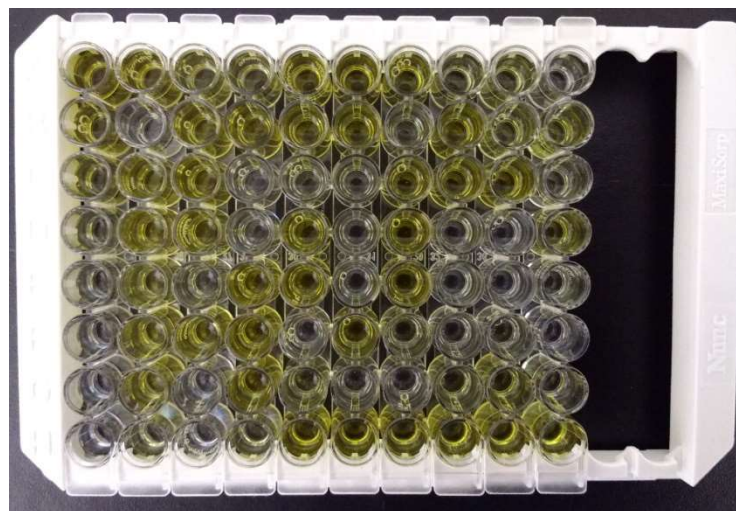
Zum Vergleich der Methode des MALDI-TOF MS wurden die gesammelten Gelenkpunktate mit dem kommerziell zu Forschungszwecken erhältlichen *enzyme linked immuno sorbent assay* (HNP 1-3 ELISA) von Hicult®Biotech gemessen. Dieser  $\alpha$ -Defensin-ELISA ermöglicht den Nachweis der humanen neutrophilen Peptide 1-3. Makroskopisch blutige Punktate wurden von der Durchführung ausgeschlossen, da sie die photometrische Messung am Ende des Immuno-Assays stören und dadurch die Messergebnisse verfälschen würden. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Laut Hersteller eignet sich das Kit für Bronchoalveoläre Lavagen, Sputum, Serum, Speichel, Plasma, Stuhl, Vaginalsekret sowie Überständen aus Zellkulturen (vgl. Manual HK317, Edition 08-16, S. 2). Für die Durchführung des  $\alpha$ -Defensin-ELISA wurden die gesammelten Gelenkpunktate verwendet. Die quantitative Bestimmung wurde bei 66 Gelenkpunktaten durchgeführt, in denen die kulturelle Diagnostik bereits bakterielles Wachstum aufwies. Zum Vergleich wurden 125 Kultur-negative Gelenkpunktate in den Test mit eingeschlossen.

Das Kit enthält gegen  $\alpha$ -Defensin gerichtete Antikörper. Die im Kit enthaltenen Mikrotiter-Streifen sind mit diesen Antikörpern beschichtet. Die zu testenden Punktate wurden in die Wellenstreifen pipettiert und inkubiert. Sollte in den Punktaten  $\alpha$ -Defensin vorhanden sein, würde dieses am Boden der antikörperbeschichteten Mikrotiter-Streifen haften. Nach viermaligem Waschen wurden biotinylierte Antikörper, die gegen  $\alpha$ -Defensin gerichtet sind, hinzugegeben. Nach einem erneuertem Inkubations- und Waschschrift wurde das Streptavidin-Perosidase-Konjugat hinzupipettiert. Die Zielstruktur des Konjugats ist das Biotin des biotinmarktierten Antikörpers. Nach einer weiteren Inkubations- und Waschphase wurde Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Tetramethylbenzidin sorgte für eine Enzymreaktion mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Die

Enzymreaktion wurde nach 30 Minuten durch die Zugabe von Oxalsäure gestoppt. Nach fachgerechter Durchführung der einzelnen Reaktionsschritte erfolgte die photometrische Messung im Plattenreader Tecan Sunrise™ der Firma Tecan. Eine mögliche Absorption konnte bei 450 nm gemessen werden.

Vor der Interpretation der  $\alpha$ -Defensin-Messungen mit dem  $\alpha$ -Defensin-ELISA musste diese Methode validiert werden. Um den diagnostischen Cut-off-Wert ermitteln zu können, wurde eine ROC-Kurve erstellt und der Cut-off-Wert mithilfe der AUC (area under the curve) bestimmt. Die Punkte wurden im Vorhinein anhand bestimmter Kriterien charakterisiert und die erzeugten ROC-Kurven miteinander verglichen. Der optimale Cut-off-Wert wurde mithilfe des Youden-Index bestimmt. Nach Ermittlung des Cut-off-Wertes wurden die Ergebnisse der ELISA-Messreihen dem jeweiligen Cut-off-Wert gegenübergestellt und interpretiert. Die gemessenen Proben wurden dann wiederum als ELISA-positiv oder ELISA-negativ eingestuft. Die Erstellung der ROC-Kurven wurde mithilfe der Web-Applikation easyROC Version 1.3 realisiert (<http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC>; 2019-10-22).



**Abbildung 3:  $\alpha$ -Defensin-ELISA**

### 2.2.5 Künstliche neuronale Netze

Die Auswertung des MALDI-Defensin-Versuchs wurde zusätzlich mit einem künstlichen neuronalen Netz (KNN) durchgeführt. Künstliche neuronale Netze gehören zum Gebiet der künstlichen Intelligenz (KI) in der Informationstechnologie (IT). Im Sinne des maschinellen Lernens soll das KNN biologische Neurone und ihre komplexe Informationsverarbeitung nachahmen. Ziel des für diesen Versuch entwickelten KNN ist es, nach Einspeisung der Messdaten ein einfaches qualitatives Ergebnis von „positiv“ oder „negativ“ zu erreichen.

#### 2.2.5.1 Architektur

Jedes KNN besteht aus einer Eingabe- (*input layer*) und einer Ausgabeschicht (*output layer*). Zwischen diesen Schichten befinden sich beliebig viele versteckte Schichten, die sogenannten *hidden layer* (Abbildung 4). Dabei kann es je nach Architektur des KNN unterschiedlich viele *hidden layer* geben.

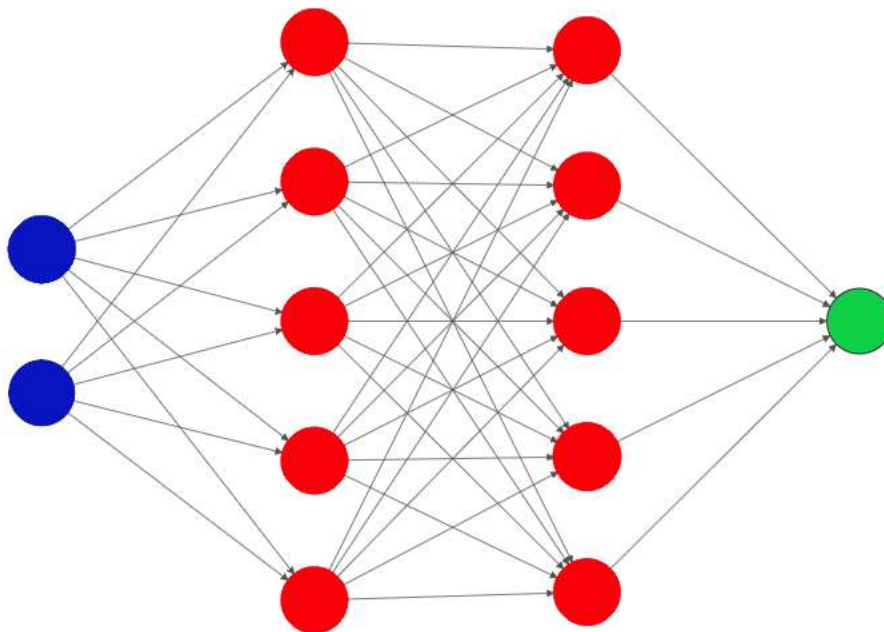


Abbildung 4: Aufbau eines KNN. *input layer* (blau), *hidden layer* (rot) und *output layer* (grün) (erstellt mit <http://alexlenail.me/NN-SVG/index.html>; 22.12.2019)

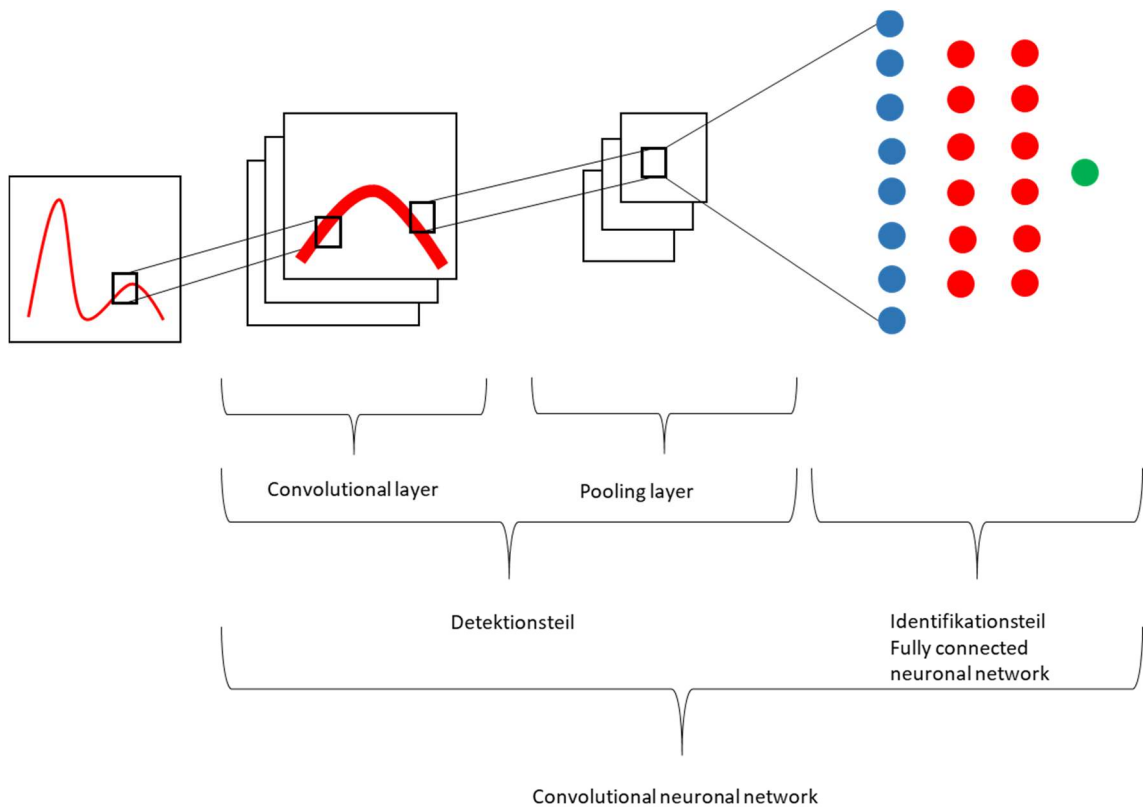
Am Anfang der Entwicklung eines KNN gilt es außerdem zu bestimmen, wie viele Neurone das KNN haben soll. Neurone werden in diesem Zusammenhang auch als Knoten



bezeichnet. Alle Neurone im *hidden layer* sind jeweils mit den Neuronen der vor- und nachgestellten Schicht verbunden. Die Ausgangsschicht stellt die letzte Schicht des KNN dar. Diese Schicht, auch *output layer* genannt, entscheidet über das letztendlich erzielte Ergebnis (Rashid 2017).

#### 2.2.5.2 Convolutional Neuronal Networks

Das Convolutional Neuronal Network, kurz ConvNet, ist ein spezielles KNN, das bei der Erkennung von Bildern eingesetzt wird. Ein ConvNet besteht aus einem Detektions- und einem Identifikationsteil (Abbildung 5). Das Detektionsteil gliedert sich wiederum in einen *Convolutional layer* und einen *Pooling layer*. Der *Convolutional layer* besteht aus Neuronen, die die Aufgabe haben im eingespeisten Bild Muster zu erkennen. Diese Muster können beispielsweise Kanten, Punkte oder Linien sein (Schwaiger 2019). Dabei reagiert ein Neuron immer auf das gleiche Merkmal und die vielen verschiedenen Neurone dabei auf zahlreiche andere Muster. Jedes Neuron stellt prinzipiell eine Funktion dar und führt dementsprechend mit jeder ankommenden Information die gleiche Berechnung durch. Danach wird das Ergebnis eine Schicht weitergetragen und mit allen Neuronen der nächsten Schicht verknüpft. Innerhalb der Schichten kann man den einzelnen Neuronen Gewichtungen zuweisen, je nachdem ob Berechnungen mehr oder weniger vom erwarteten Ergebnis abweichen. Vorteil gegenüber einem herkömmlichen KNN ist, dass nicht einzelne Datenpunkte betrachtet werden, sondern in erster Instanz Ausschnitte, die dann in den einzelnen Schichten des *Convolutional layer* immer feiner betrachtet und berechnet werden können. Dabei wird in jeder weiteren Schicht ein Merkmal tiefer fokussiert und darin abermals Muster gesucht. Im *Pooling layer* werden die Informationen gefiltert. Die Vorgänge in dieser Schicht sind mit der neurophysiologischen lateralen Hemmung zu vergleichen. So werden beispielsweise innerhalb einer Filterschicht die berechneten Werte der Matrix verglichen und nur der Maximalwert an die nächste Schicht weitergegeben. Beim *Pooling* existiert dabei keine Überlappung der Werte, was schließlich zum Filtern der Informationen führt. Das Identifikationsteil besteht letztendlich aus einem wie im Kapitel Architektur beschriebenen neuronalen Netz, das an das Detektionsteil angeschlossen ist und die gefilterten Informationen klassifiziert. Diese angeschlossene Einheit wird auch als *Fully Connected Network* bezeichnet (Schwaiger 2019).



**Abbildung 5: Convolutional neuronal network Aufbau (ConvNet)**

### 2.2.5.3 Die Entwicklung des künstlichen neuronalen Netzes

Als Entwicklungsumgebung wurde Jupyter Notebook des *Non-Profit* Projekts *Project Jupyter* genutzt. Jupyter Notebook ist eine *Open Source* Applikation, die die Bearbeitung webbasiert und in Echtzeit erlaubt. Dabei können durch frei verfügbare Datenbanken und Bibliotheken Daten bereinigt, analysiert und visualisiert werden (<https://jupyter.org>). Weiterhin erlaubt das Tool die Entwicklung von Machine-Learning-Modellen, zu denen auch künstliche neuronale Netze gehören.

Für die Entwicklung des KNN mussten im ersten Schritt Messdaten zum Trainieren des KNN ausgewählt und bereinigt werden. Als Daten dienen in diesem Fall die bei den Messungen erstellten Bilder bzw. Grafiken der Massenspektren, die durch die Auswertungssoftware des MALDI-TOF Massenspektrometers erzeugt wurden. Insgesamt wurden 398 Grafiken zum Trainieren des ConvNet verwendet. Die Massenspektren wurden einer *baseline subtraction* unterzogen. Außerdem wurden alle Grafiken in eine einheitliche Bildgröße von 800 Pixel Breite und 400 Pixel Höhe gebracht. Danach wurden alle Bild-Dateien visuell nach Anwesenheit des  $\alpha$ -Defensin-Peaks hin geprüft. Davon wurden 207

als  $\alpha$ -Defensin-negativ und 191 als  $\alpha$ -Defensin-positiv eingestuft. Die Bilder wurden dementsprechend sortiert. Ziel ist die Schaffung von optimalen Trainingsdaten für das KNN. Die bereinigten Messdaten wurden zum Trainieren des KNN verwendet werden. Das für diese Arbeit zur Auswertung entwickelte Convolutional Neuronal Network besitzt insgesamt vier Schichten. Die bereinigten Daten wurden über Jupyter Notebook in das KNN eingepflegt. In den Neuronen finden Berechnungen statt, deren Ergebnisse zu Neuronen der nächsten Schichten getragen werden. Der *Pooling layer* in diesem Modell filtert die Informationen in einer Matrix mit der Größe von drei zu drei. Gewichtungen können in der Trainingsphase noch modifiziert werden und tragen dabei stets zur Verbesserung der Genauigkeit des KNN bei. Bei einem ConvNet haben Gewichtungen innerhalb einer Ebene des *Convolutional layers* die gleiche Gewichtung. Bei diesem entwickelten ConvNet wurden zum Trainieren 100 Epochen für die Lernphase festgesetzt.

Da jedes Neuron zum Start der Berechnungen eine Funktion benötigt, wurde beim ConvNet *rectified linear unit* (ReLU) als Aktivierungsfunktion gewählt. Diese Funktion gewährleistet eine schnelle Berechnung besonders großer Datenmengen. In diesem ConvNet wurde darüber hinaus ein *Dropout* von 25% eingefügt. Dies bedeutet, dass 25% der Gewichtungen auf null gesetzt wurden um Überlappungen zu vermeiden. Im *output layer* wird letztendlich das Ergebnis herausgegeben. In unserem Modell wird die Berechnung am *output layer* durch eine Sigmoidfunktion realisiert.

Nach der Trainingsphase folgt das Einspeisen der Grafiken unserer Messdaten, die ausgewertet werden sollen (Chollet 2018).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 MALDI-TOF MS

##### 3.1.1 Bakterienidentifizierung aus Blutkulturflaschen mit dem MALDI Sepsityper

Im Zeitraum vom 01.12.2017 bis zum 24.06.2019 wurden Synovia-befüllte BK-Flaschen, aus der laufenden Routinediagnostik neben dem routinemäßigen kulturellen Ansatz auf konventionellen Nährmedien zusätzlich nach dem Protokoll des MALDI Sepsityper Kit bearbeitet. Es wurden BK-Flaschen eingeschlossen, die während der Inkubation im automatisierten Nachweissystem für mikrobielles Wachstum BACT/ALERT als positiv detektiert wurden (Abbildung 6).

Dies waren im Beobachtungszeitraum 99 Proben, welche von unterschiedlichen Patienten stammten. BK-Flaschen, bei denen außerhalb der wochentäglichen Arbeitszeiten der mikrobiologischen Diagnostik Wachstum detektiert wurde, wurden nicht berücksichtigt.

Letztendlich konnten 42 der insgesamt 99 positiv detektierten BK-Flaschen bearbeitet werden. Diese 42 BK-Flaschen (26 aerobe und 16 anaerobe) wurde direkt im Anschluss an das positive Wachstumssignal dem Protokoll des MALDI Sepsityper Kits unterzogen. Bei BK-Flaschen, die bereits als positiv markiert im Labor eingetroffen waren, erfolgte die Bearbeitung unmittelbar mit der täglichen Routinediagnostik.

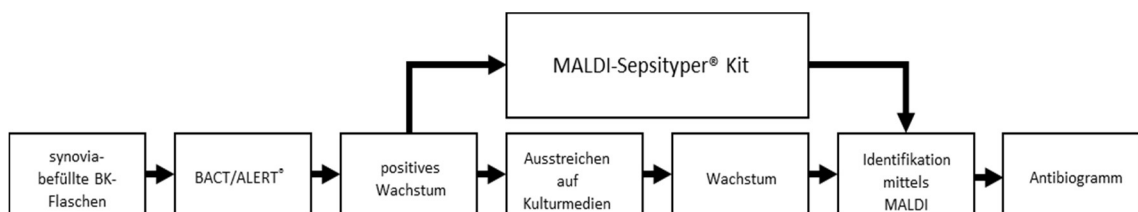


Abbildung 6: Workflow mit dem MALDI-Sepsityper-Kit

Die erreichten Score-Werte lagen bei 29 Proben bei  $\geq 2,0$ . Sieben Proben lieferten einen Score zwischen 1,7 und 2,0. In einem Fall wurde ein Score-Wert von  $< 1,7$  gemessen. Score-Werte  $\geq 2,0$  erlauben eine Identifizierung bis auf Spezies-Ebene, Scores von 1,7-2,0 erlauben noch einen sicheren Rückschluss auf die Gattung zu. Insgesamt konnten somit 37 Erreger ermittelt werden, davon in sieben Fällen allerdings nur bis zur Gattungsebene. Von den bearbeiteten Gelenkpunktaten erhielten 29 ein Ergebnis bezüglich der Erregerspezies durch die MALDI-TOF MS noch am selben Tag. Bei fünf der untersuchten Gelenkpunktate konnte kein Ergebnis erzielt werden (Abbildung 7). Bei vier dieser Erreger, den Proben 37, 38, 39, 42 waren durch die MALDI-TOF MS keine Signale gefunden worden. Lediglich bei der BK-Flasche mit der Probennummer 40 konnte keine eindeutige Identifikation vorgenommen werden, da den Massenspektren kein Erreger zugeordnet werden konnte. Von allen bearbeiteten wies lediglich die Probe 3 eine Diskrepanz mit den Ergebnissen der kulturellen Diagnostik auf. Hier wurde in der Routinediagnostik der Erreger *Streptococcus oralis* ermittelt, während der MALDI Sepsityper *Streptococcus pneumoniae* als Ergebnis lieferte.

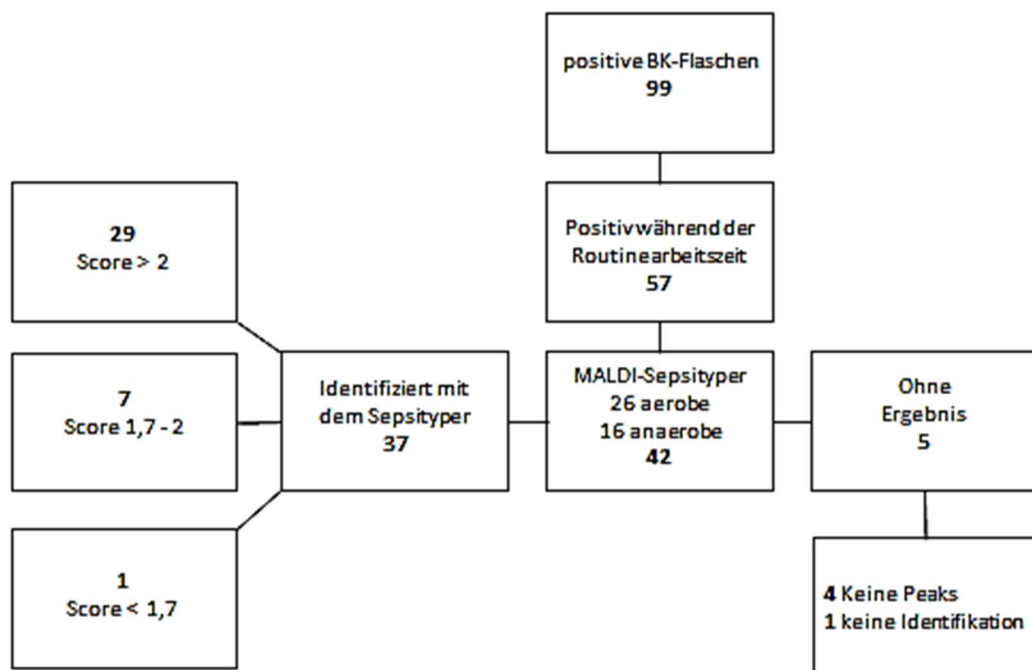


Abbildung 7: Ergebnisse MALDI Sepsityper aus Synovia-befüllten BK-Flaschen

Tabelle 8: Vergleich Identifizierung MALDI Sepsityper mit kultureller Routinediagnostik

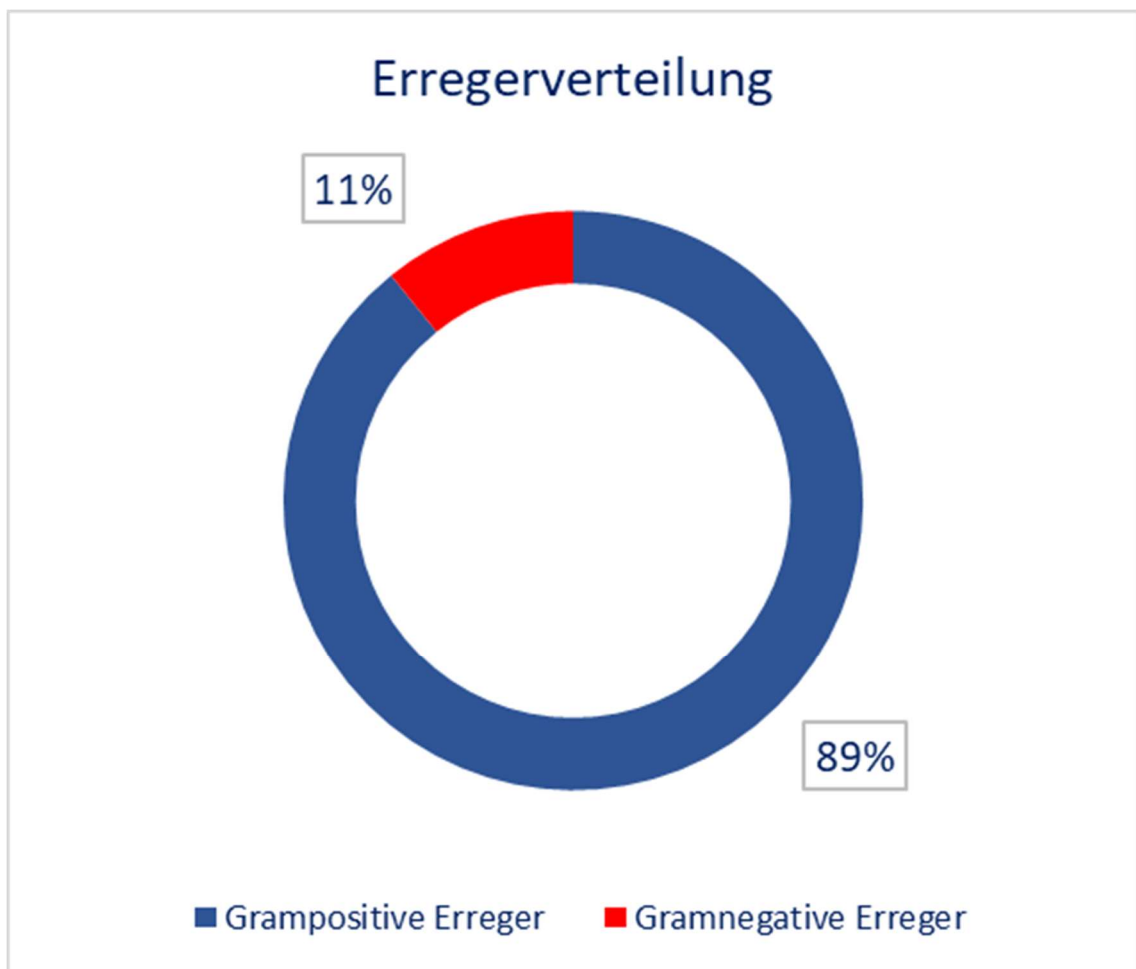
Probe	Kultur Ergebnis	Sepsityper Ergebnis	Score
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.00
2	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.01
3	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> **	2.08
4	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	2.31
5	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.10
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.11
7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.65
8	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>	2.11
9	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	2.13
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Enterococcus faecium</i> *	<i>Enterococcus faecium</i>	2.41
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Enterococcus faecium</i> *	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.23
12	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2.29
13	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2.18
14	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	2.19
15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.24
16	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	2.25
17	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.28
18	<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Enterbacter cloacae</i> -Komplex*	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.29
19	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.29
20	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.35
21	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	2.37
22	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.37
23	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	2.41
24	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	2.41
25	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.42

	<i>Komplex</i>	<i>Komplex</i>	
<b>26</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.44
<b>27</b>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.51
<b>28</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	2.56
<b>29</b>	<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	<i>Enterococcus faecium</i>	2.40
<b>30</b>	<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	<i>Enterococcus faecium</i>	2.17
<b>31</b>	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	1.70
<b>32</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.71
<b>33</b>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.75
<b>34</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.85
<b>35</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.94
<b>36</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.96
<b>37</b>	<i>Campylobacter coli</i>	Kein Signal	
<b>38</b>	<i>Cutibacterium acnes</i>	Kein Signal	
<b>39</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	kein Signal	
<b>40</b>	<i>Streptococcus oralis</i>	Keine Identifizierung möglich	1.67
<b>41</b>	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	1.72
<b>42</b>		Kein Signal	

\* Mischkultur; \*\* keine Konkordanz

In fünf Proben war darüber hinaus in der mikrobiologischen Diagnostik auf kulturellen Nährböden ein Keimgemisch gewachsen. Dabei handelte es sich zunächst um zwei Blutkulturpärchen (aerob/anaerob) des gleichen Patienten (Proben 10 und 11, sowie 29 und 30) sowie eine einzelne Probe (Probe 18). In der aeroben Kultur beider Pärchen waren in der mikrobiologischen Routinediagnostik auf den Nährmedien nachweislich die Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* gewachsen und mittels

MALDI-TOF MS ermittelt worden. Gleiches ließ sich in der anaeroben Kultur beider eingesendeten Pärchen finden. Mit dem MALDI Sepsityper wurde in der aeroben BK-Flasche des ersten Pärchens lediglich *Pseudomonas aeruginosa* als Erst- und Zweitvorschlag gefunden, in der anaeroben Flasche wurde *Enterococcus faecium* nachgewiesen. Beim zweiten Pärchen wurde in beiden BK-Flaschen der Keim *Enterococcus faecium* (Scorewerte von 2.40 und 2.17) ermittelt. Die aerobe Kultur zeigte darüber hinaus als Zweitvorschlag das Ergebnis des *Pseudomonas aeruginosa* mit einem Score von 2.03.



**Abbildung 8: Erregerverteilung**

In einem weiteren Fall wurde seitens der herkömmlichen Diagnostik eine Mischkultur in einer Einzelflasche gefunden. Hier wies die aerobe BK-Flasche das Wachstum der Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Enterobacter cloacae*-Komplex auf. Die anaerobe Kultur zeigte nur ein Wachstum des *Staphylococcus aureus*. Mittels MALDI Sepsityper wurde die aerobe Kultur bearbeitet, die einen Nachweis von *Staphylococcus aureus* lieferte.



Von den insgesamt 37 identifizierten Bakterienspezies stellten 33 grampositive Keime dar, vier waren den gramnegativen Erregern zuzuordnen (Abbildung 8). Weiterhin wurde in vier Flaschen das anaerobe Bakterium *Cutibacterium acnes* korrekt identifiziert. Die MALDI Sepsityper Methode lieferte in 97,3% der Fälle ein konkordantes Ergebnis im Vergleich zur Identifizierung in der Routinediagnostik (Abbildung 9).

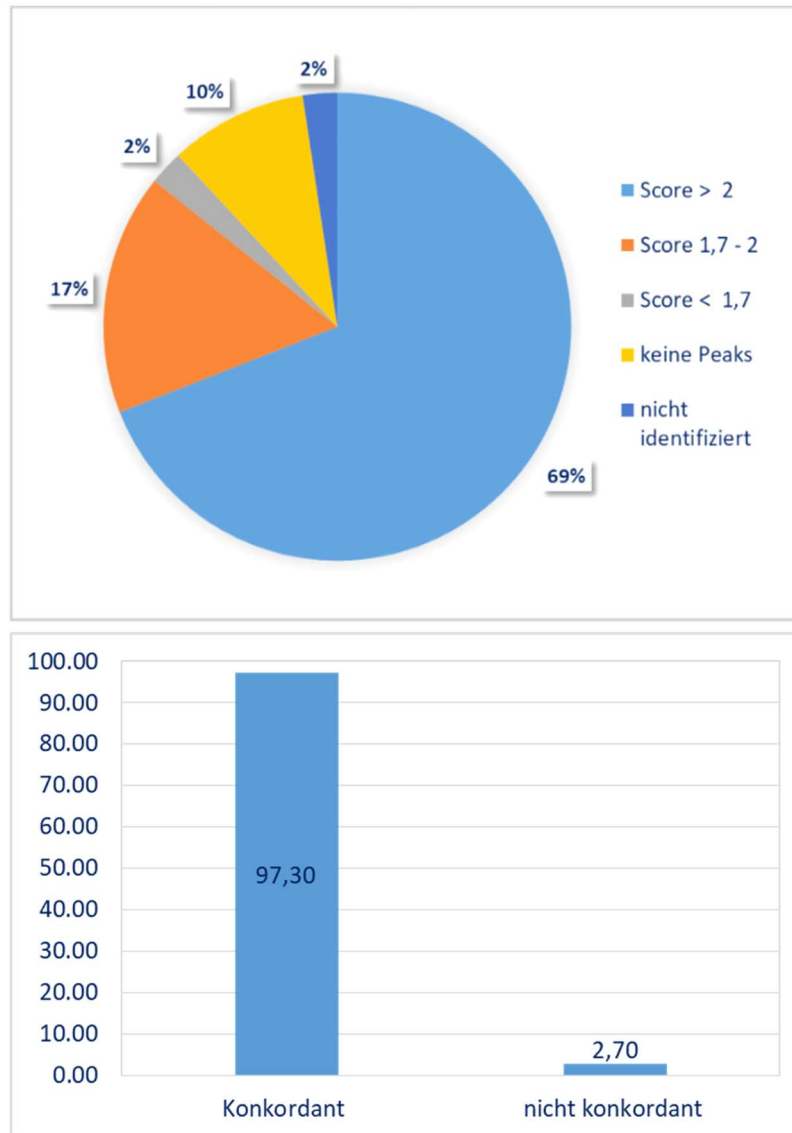
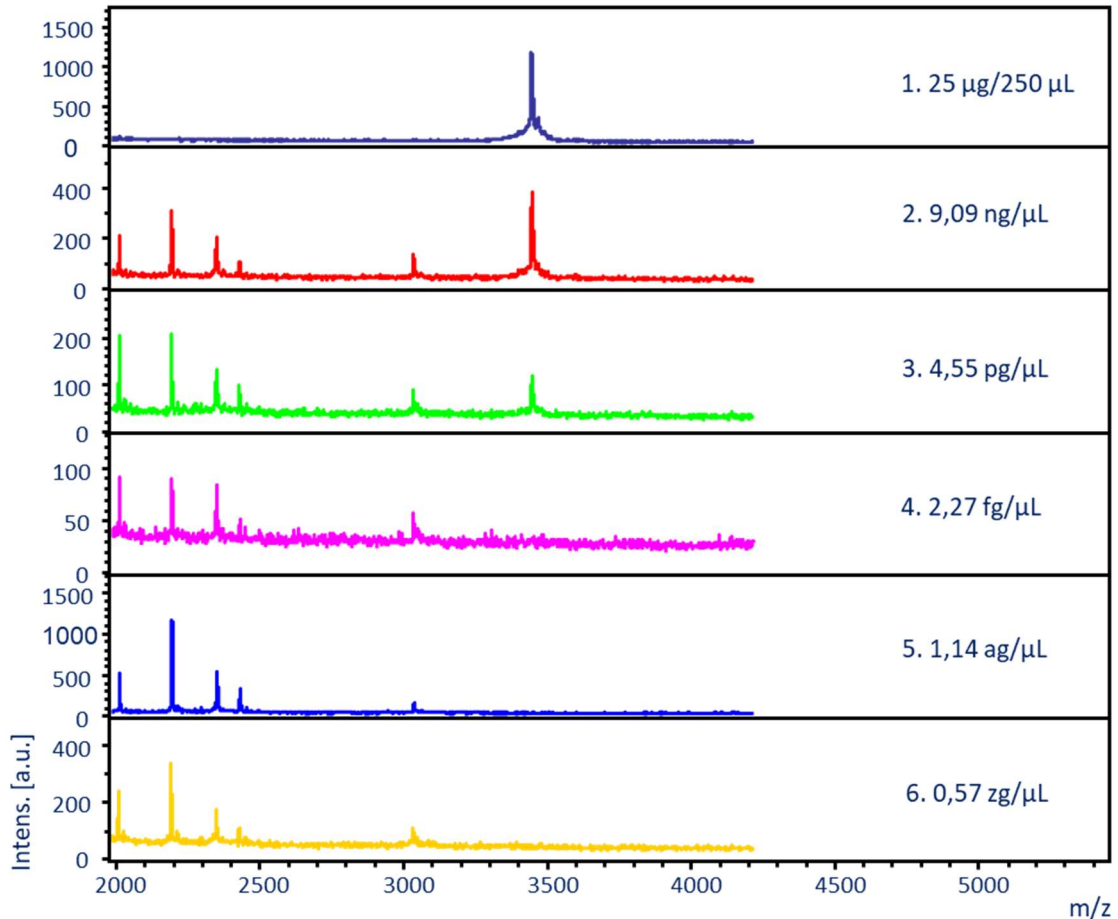


Abbildung 9: Verteilung der MALDI Sepsityper Score-Ergebnisse (oben) und Konkordanz (unten)

### 3.1.2 Nachweis von mit $\alpha$ -Defensin versetzten Rindergelenkspunktaten

In der Abbildung 10 sind die Spektren der Versuchsreihe abgebildet. Das erste Spektrum stellt die Masse des  $\alpha$ -Defensins in Form des unverdünnten  $\alpha$ -Defensins in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dar.



**Abbildung 10: Verdünnungsreihe: Mit Defensin versetzte Rindersynovia**

Das zweite Spektrum bildet das Rindergelenkspunktat mit einer Defensin-Konzentration von 9,09  $\text{ng}/\mu\text{L}$  ab. Die Defensin-Konzentration im Rindergelenkspunktat beträgt bei der dritten Messung 4,55  $\text{pg}/\mu\text{L}$ . Die Konzentrationen liegen beim vierten Spektrum bei 2,27  $\text{fg}/\mu\text{L}$ , beim fünften bei 1,14  $\text{ag}/\mu\text{L}$  und bei dem sechsten Spektrum bei 0,57  $\text{zg}/\mu\text{L}$ . In unseren Versuchen konnte der Nachweis von  $\alpha$ -Defensin massenspektrometrisch aus Rindersynovia noch bis in den Pikogramm-Bereich geführt werden.

### 3.1.3 Bearbeitung mit dem DTT-Protokoll

Für den Nachweis des  $\alpha$ -Defensins mit der MALDI-TOF MS wurden insgesamt 76 menschliche Gelenkpunktate nach dem DTT-Protokoll bearbeitet (siehe 2.2.3.5). Die Probenverteilung bestand aus 38 mikrobiologisch Kultur-positiven und 38 Kultur-negativen Gelenkpunktaten. Mittels der DTT-Methode konnte in 25 der Kultur-positiven Punktate ein Signal im Bereich von  $3449 \text{ Da} \pm 2 \text{ Da}$  nachgewiesen werden. In den restlichen 13 der Kultur-positiven Proben zeigte sich kein Signal in diesem Bereich. Zwei Kultur-negative Punktate wiesen ein Signal um  $3449 \text{ Da}$  auf. Bei 36 Proben gab es keinen Nachweis in diesem Messbereich (Abbildung 11).

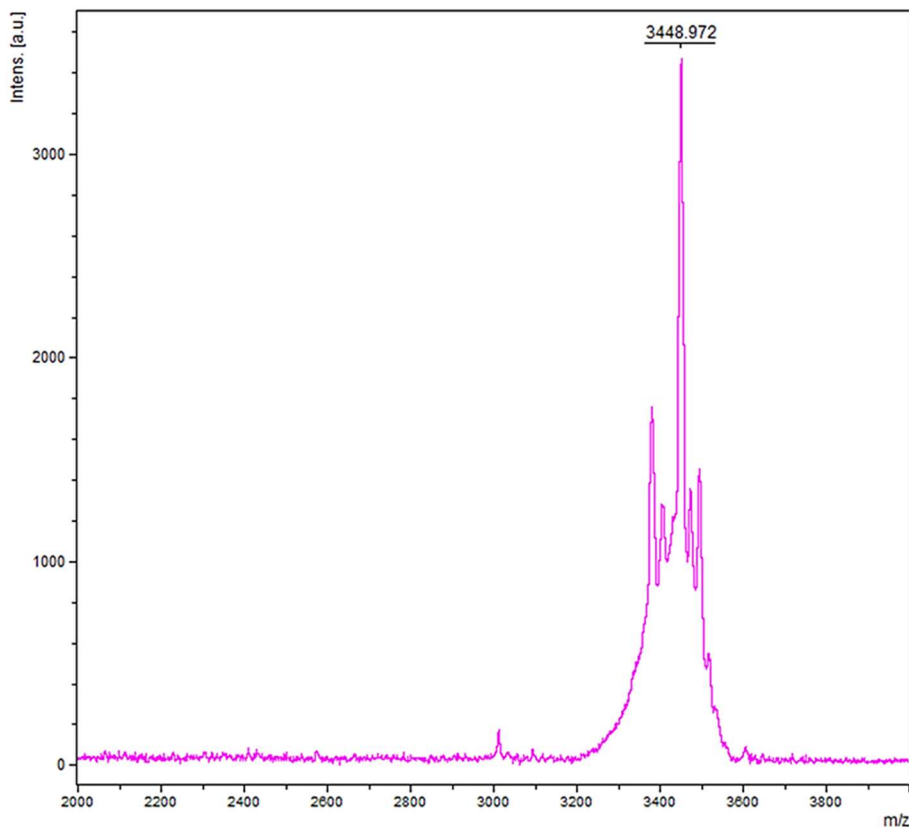
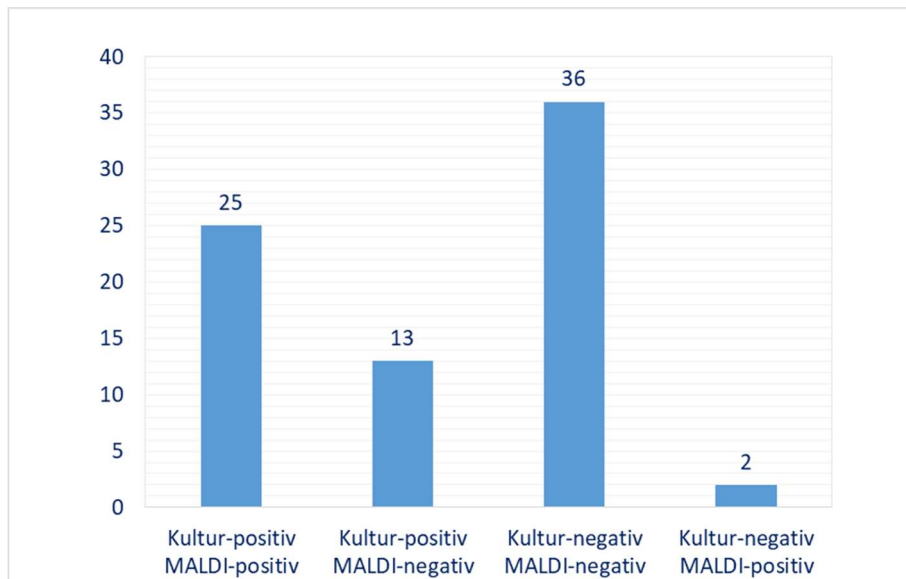
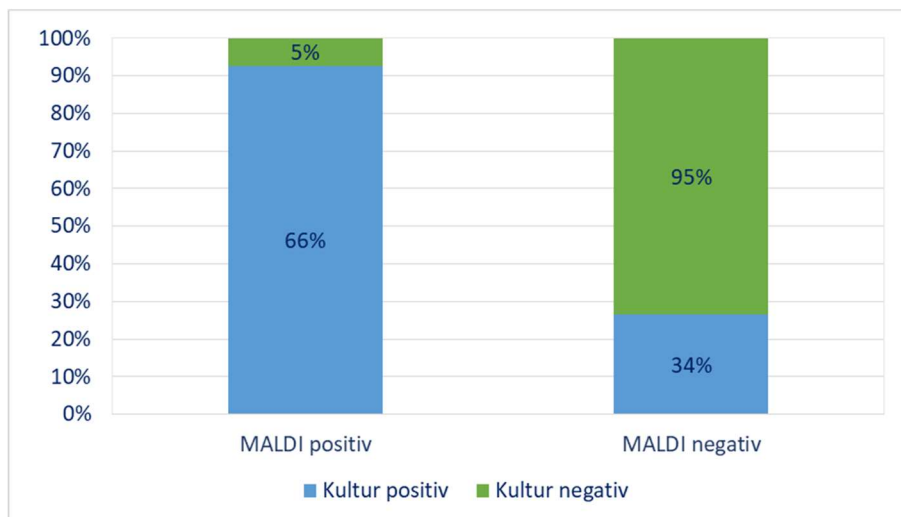


Abbildung 11:  $\alpha$ -Defensin MALDI Signal bei einem repräsentativen Punktat



**Abbildung 12: Ergebnisverteilung des DTT-Versuchs**

Bei den Kultur-negativen Punktaten gab es eine Konkordanz von 95% zwischen den Kultur- und MALDI-Ergebnissen. Ein positives MALDI-Ergebnis lieferten 5% der Kultur-negativen Punktate. Unter den Kultur-positiven entsprach die visuelle Auswertung einer Übereinstimmung von 66%. Bei 34% der Kultur-positiven Punktate fiel das MALDI-Ergebnis negativ aus (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Übereinstimmung MALDI-positiver (links) und MALDI-negativer (rechts) Messungen mit dem DTT-Protokoll**

### 3.1.4 Bearbeitung mit dem Liquillizer-Protokoll

Insgesamt wurden 158 Punktate bearbeitet, von denen 49 mikrobiologisch Kultur-positive und 109 Kultur-negative Gelenkpunktate darstellen.

Von 49 Kultur-positiven Gelenkpunktaten konnte bei 34 ein Signal im Bereich von 3449 Da  $\pm$  2 Da ermittelt werden. Bei 15 der Kultur-positiven Proben wurde kein Signal in diesem Bereich gefunden. Unter 109 Kultur-negativen Punktaten konnte in 29 Fällen ein Signal um 3449 Da gesichert werden. Bei 80 Gelenkpunktaten gab es keinen massenspektrometrischen Nachweis in diesem Messbereich.

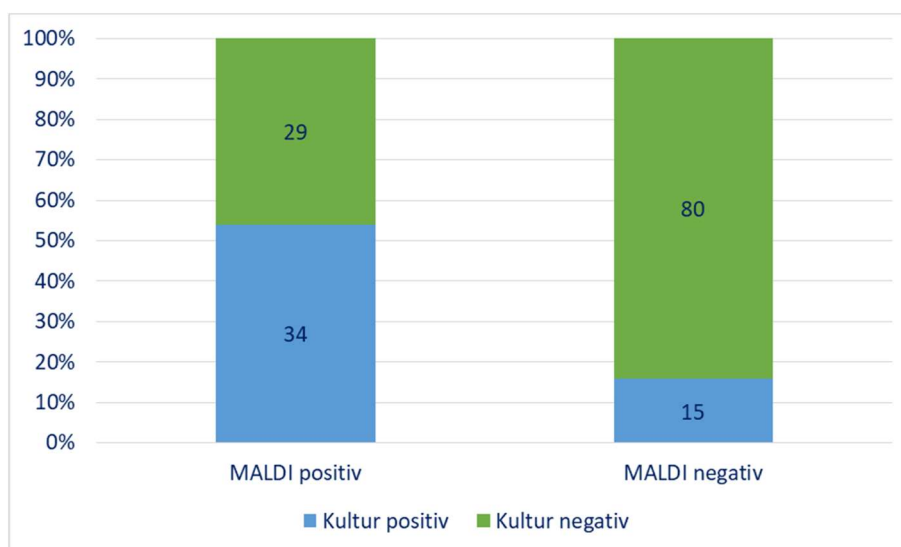


Abbildung 14: Ergebnisvergleich Liquillizer und MALDI. MALDI-positive (links) und MALDI-negative (rechts) Messungen

## 3.2 Auswertung durch das künstliche neuronale Netz

Das entworfene ConvNet wurde mit 398 Grafiken wie unter 2.2.5.3 beschrieben trainiert. Vorab wurden die Massenspektren visuell klassifiziert. Dabei ergab sich eine Verteilung von 207  $\alpha$ -Defensin-negativen und 191  $\alpha$ -Defensin-positiven Spektren. Die ausgewählten Bilder wurden dem ConvNet eingespeist und in 100 Epochen einer Trainingsphase unterzogen.

```
Epoch 58/100
99/99 [=====] - 33s 333ms/step - loss: 0.0565 - accuracy: 0.9823 - val_loss: 1.6472 - val_accuracy:
0.5958
Epoch 59/100
99/99 [=====] - 32s 325ms/step - loss: 0.0441 - accuracy: 0.9873 - val_loss: 1.5704 - val_accuracy:
0.6333
Epoch 60/100
99/99 [=====] - 33s 329ms/step - loss: 0.0400 - accuracy: 0.9949 - val_loss: 1.6827 - val_accuracy:
0.6000

Epoch 98/100
99/99 [=====] - 32s 328ms/step - loss: 0.0204 - accuracy: 0.9898 - val_loss: 2.5222 - val_accuracy:
0.6042
Epoch 99/100
99/99 [=====] - 33s 329ms/step - loss: 0.0200 - accuracy: 0.9924 - val_loss: 2.5941 - val_accuracy:
0.6042
Epoch 100/100
99/99 [=====] - 32s 327ms/step - loss: 0.0127 - accuracy: 0.9975 - val_loss: 2.1529 - val_accuracy:
0.6542
```

**Abbildung 15: Trainingsphase Epochen 58-60 und 98-100 des ConvNet**

Im Anschluss wurden 243 Massenspektren in dieses ConvNet eingepflegt und ausgewertet. Von diesen 243 eingegebenen Testdaten wurden im Vorhinein 157 visuell als  $\alpha$ -Defensin-positiv und 86 als  $\alpha$ -Defensin-negativ klassifiziert. Diese Testdaten durchliefen das gleiche vorher trainierte ConvNet. Das maschinelle Lernverfahren und die zu testenden Bilddateien wurden dabei mit einer Genauigkeit von 99,75% vorhergesagt. Bereits ab der 60. Epoche stellte sich eine Genauigkeit von 99% für die Vorhersagen ein.

### 3.3 Ergebnisse des $\alpha$ -Defensin ELISA

#### 3.3.1 Klassifizierung der ROC-Kurven nach mikrobiologischen und klinischen Kriterien

Um die gemessenen Werte interpretieren zu können muss ein Cut-Off-Wert für den ELISA bestimmt und die Methode validiert werden. Dies wird mithilfe von ROC-Kurven und der AUC (area under the curve) umgesetzt. Der optimale Cut-off-Wert wurde mithilfe des Youden-Index bestimmt. Nach Bestimmung des optimalen Cut-off-Wertes werden diese den ELISA-Messergebnissen gegenübergestellt und interpretiert. Bei der Erstellung der ROC-Kurven in der Abbildung 16 wurden klinische und diagnostische Kriterien variiert. Die  $\alpha$ -Defensin-Messergebnisse der ROC-Kurven 16a bis e wurden anhand der mikrobiologischen Kultur klassifiziert. Für die Abbildung 16a wurden die ELISA-Messergebnisse aller 152 zur Verfügung stehenden Gelenkpunktate verwendet (Abbildung 16). Es erfolgte kein Ausschluss von Punktaten, die von Patienten mit rele-

vanten Grunderkrankungen stammten. Patienten mit Rheumatoider Arthritis, bakterieller Sepsis, Pneumonien, Knochentumoren, reaktiven Arthritiden und Gicht wurden für die Erstellung der ROC-Kurven 16a mit eingeschlossen. Von 152 Punktaten waren 102 Kultur-negativ und 50 Kultur-positiv (Tabelle 10). Hier wird der Cut-off bei 858,98 pg/mL und eine AUC von 0,59 ermittelt. Die Sensitivität liegt bei 86,0% und die Spezifität bei 36,30%. Der positiv prädiktive Wert (PPW) erreicht 0,40 bei einem negativ prädiktiven Wert (NPW) von 0,84 (Tabelle 9). Für die ROC-Kurve in Abbildung 16b wurden aus der Gruppe der Kultur-negativen Punktate alle Leukozyten-positiven Punktate gefiltert und gingen nicht in die Bewertung mit ein. So ergab sich für die Erstellung der ROC-Kurve 16b eine Anzahl von insgesamt 104 Punktaten bei 50 Kultur-positiven und 54 Kultur-negativen Punktaten (Tabelle 10). Der Cut-off-Wert ist bei 1871,65 pg/mL definiert bei einer Sensitivität von 72,0% und einer Spezifität von 74,10%, sowie einer AUC von 0,74. Der PPW liegt bei 0,72 und der NPW bei 0,74 (Tabelle 9). Für die ROC-Kurven 16c bis 16e wurden die Kriterien bezüglich der klinischen Diagnosen geändert. So wurden Gelenkpunktate von Patienten mit beeinflussenden Nebendiagnosen aus dem Untersuchungskollektiv entfernt. ELISA-Messergebnisse von Punktaten, bei denen Diagnosen wie Rheumatoide Arthritis, bakterielle Sepsis, Pneumonien, Knochentumoren, Reaktive Arthritis oder Gicht ermittelt werden konnten, wurden zur Erstellung dieser Kurven dementsprechend nicht berücksichtigt. Patienten ohne Angabe jeglicher Diagnosen wurden bei der Erstellung der ROC-Kurve in Abbildung 16c weiterhin berücksichtigt. Bei der Kurve in Abbildung 16d wurden diese jedoch zusätzlich exkludiert. Für die Ermittlung der ROC-Kurve in Abbildung 16c sind 135 Punktate in die Bewertung eingegangen. Davon erwiesen sich 45 als Kultur-positiv und 90 als Kultur-negativ (Tabelle 10). Unter diesen Voraussetzungen errechnet sich ein Cut-off Wert von 858,98 pg/mL mit einer Sensitivität von 88,20% und einer Spezifität von 48,10% bei einer AUC von 0,62. Der PPW beträgt 0,35 und der NPW erreicht 0,93. Die Kriterien der ROC-Kurve in der Abbildung 16d entsprechen denen der Kurve c bezüglich der Exklusion der beeinflussenden Diagnosen. Zusätzlich wurden bei d Punktate entfernt, die Kultur-negativ, jedoch Leukozyten-positiv waren. Demnach ergeben sich für die Kurve d insgesamt 96 Gelenkpunktate, von denen 45 Kultur-positiv und 51 Kultur-negativ sind (Tabelle 10). Der Cut-off liegt bei diesen Kriterien bei 1681,39 pg/mL bei einer AUC von 0,73. Die Sensitivität stellt sich bei 73,3% ein und die Spezifität beträgt 72,5%. Es ergibt sich ein PPW von 0,70 und ein NPW

von 0,76 (Tabelle 9). Für die ROC-Kurve in der Abbildung 16e wurden ausschließlich  $\alpha$ -Defensin-Messergebnisse von Gelenkpunktaten verwendet, bei denen der Verdacht oder eine gesicherte Gelenkinfektion bestand. Punktate von Patienten mit beeinflussenden Nebenerkrankungen wurden hier ebenfalls exkludiert. So ergab sich für die Klassifizierung anhand der mikrobiologischen Kultur die Beurteilung von insgesamt 71 Gelenkpunktaten, von den 17 Kultur-positiv waren und 54 Kultur-negativ (Tabelle 10). Für diese Kriterien lässt sich mithilfe der ROC-Kurve in der Abbildung 16e ein Cut-off von 858,98 pg/mL berechnen. Die AUC liegt bei 0,62 bei einer Sensitivität von 88,20% und einer Spezifität von 48,10%. Der Positive prädiktive Wert ist 0,35 und der NPW erreicht 0,93 (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Cut-off-Ermittlung nach mikrobiologischer Kultur**

Abbildung	optimaler Cut-off pg/mL	AUC	Youden-Index	Sensitivität %	Spezifität %	PPW	NPW
16a	858,98	0,59	0,22	86,00	36,30	0,40	0,84
16b	1871,65	0,74	0,46	72,00	74,10	0,72	0,74
16c	858,98	0,62	0,36	88,20	48,10	0,35	0,93
16d	1681,39	0,73	0,46	73,30	72,50	0,70	0,76
16e	858,98	0,62	0,36	88,20	48,10	0,35	0,93

**Tabelle 10: Kulturergebnis der Punktate zur Ermittlung der ROC-Kurven**

ROC-Kurve	optimaler Cut-off pg/mL	Punktate insgesamt	Kultur positiv	Kultur negativ
16a	858,98	152	50	102
16b	1871,65	104	50	54
16c	858,98	135	45	90
16d	1681,39	96	45	51
16e	858,98	71	17	54



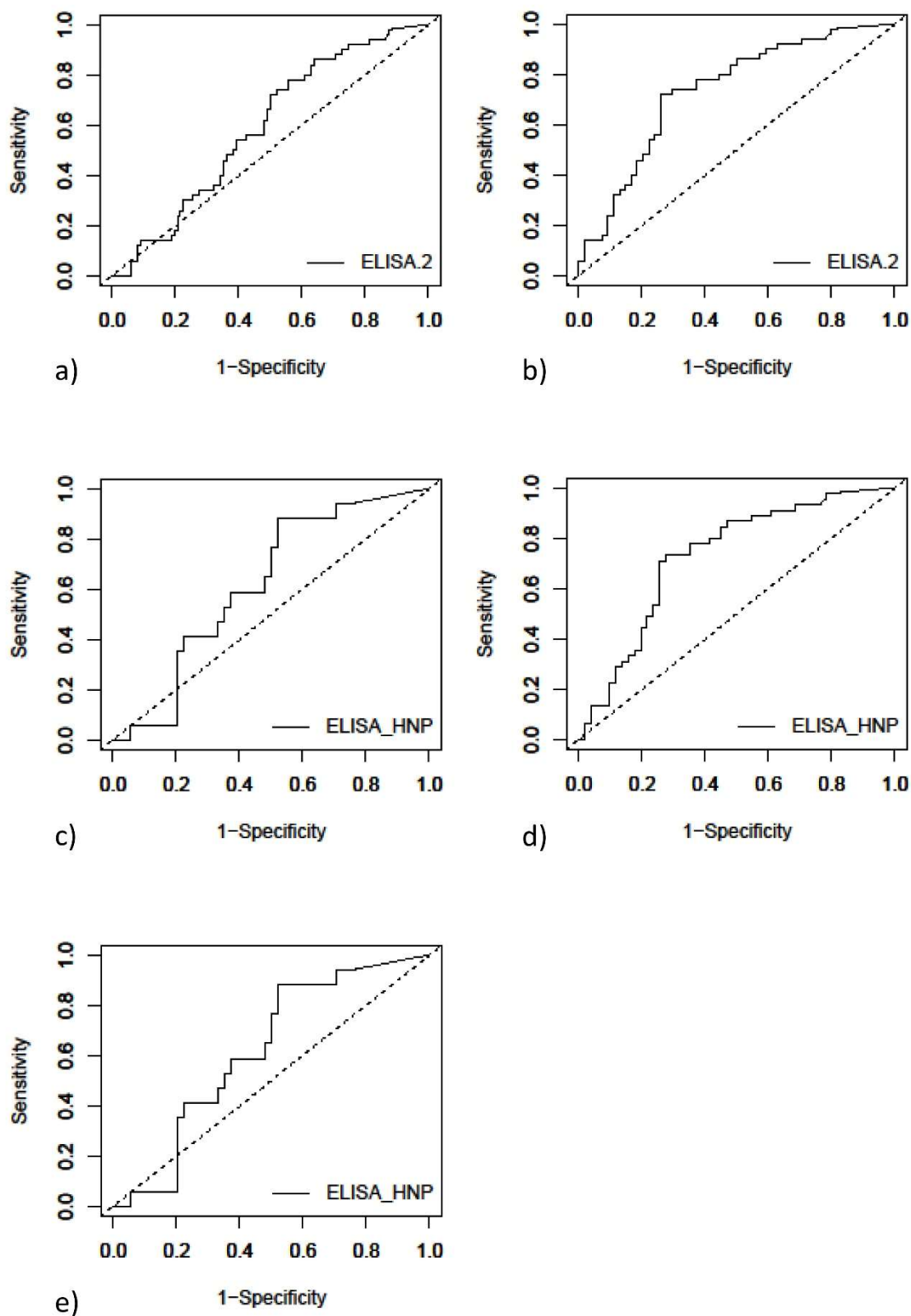


Abbildung 16: ROC-Kurven nach definierten Kriterien und mit Berücksichtigung aller Punkte

### 3.3.2 Korrelation der ELISA-Ergebnisse in Anhängigkeit der mikroskopischen Leukozytenanzahl

Der Boxplot in Abbildung 17 zeigt die Streuung der ELISA-Messwerte in Abhängigkeit vom Leukozytenwert in den einzelnen Gelenkpunktaten. Jedes Punktate wurde einer mikroskopischen Beurteilung bezüglich der Leukozyten unterzogen. Dabei steht „0“ für die Abwesenheit von Leukozyten und die in der Darstellung abgebildeten Stufen Leukozyten 1-3 entsprechen der semiquantitativen Angabe von „+“, vereinzelt Leukozyten, „++“, mäßig viele und „+++“ massenhaft Leukozyten.

Insgesamt wurden bei 152 Gelenkpunktaten die Leukozyten bestimmt. 70 Punktate wurden mit Leukozyten 0 und 38 mit Leukozyten 1 beurteilt. Der Gruppe Leukozyten 2 wurden 35 Gelenkpunktate zugeordnet und 9 Punktate erhielten die Beurteilung Leukozyten 3 (Tabelle 11).

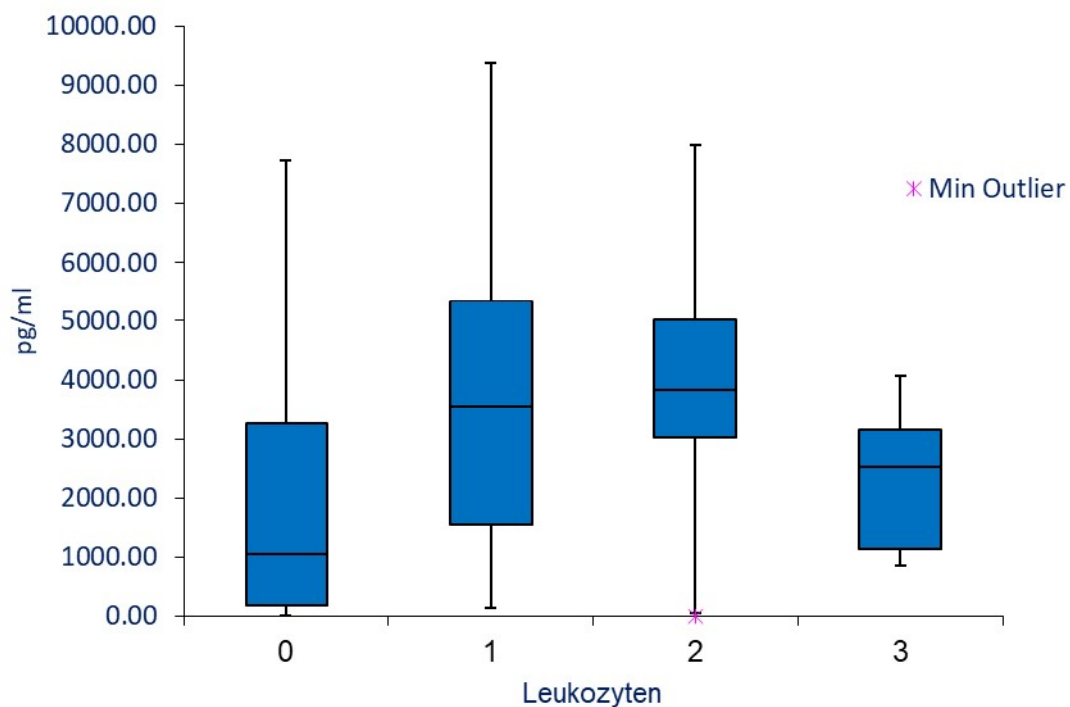


Abbildung 17: Boxplot Einfluss der Leukozyten auf den Cut-off

**Tabelle 11: Punktate in den Leukozyten-Gruppen**

Leukozyten	Punktate
0	70
1	38
2	35
3	9

Die Tabelle 12 fasst die Daten des Boxplots zusammen. In den Gruppen mit Leukozyten 0 und 2 liegen die  $\alpha$ -Defensin-Minima bei einer Konzentration von 0,0 pg/mL (Min Outlier) und die Maxima bei 7722,22 pg/mL und 9109,67 pg/mL. Bei der Gruppe Leukozyten 1 kann das Minimum bei 142,51 pg/mL und das Maximum bei 9370,23 pg/mL abgelesen werden. Diese Gruppe bringt das höchste Maximum und auch die ausgedehnteste Streubreite mit einer Interquartilsbreite von 3796,88 pg/mL hervor. Das höchste Minimum ist in der Gruppe Leukozyten 3 zu finden. Hier wurde ein Wert von 858,98 pg/mL gemessen. Das Maximum stellt sich bei 4062,75 pg/mL ein und präsentiert verglichen mit den anderen Gruppen das geringste Maximum. Der Median liegt in der Gruppe der Punktate ohne Leukozyten bei 1015,82 pg/mL, bei denen in Gruppe 1 bei 3535,84 pg/mL, in Gruppe 2 bei 3820,88 pg/mL und in der Gruppe 3 bei 2523,72 pg/mL. Somit erreicht der Median der Gruppe Leukozyten 2 mit 3820,88 pg/mL den Höchstwert (Abbildung 17). Der Interquartilsbereiche (IQR) für die Gruppe der Punktate ohne Leukozyten liegt bei 3089,84 pg/mL, die für die Gruppe Leukozyten 1, wie bereits erwähnt, bei 3796,88 pg/mL. Bei Gelenkpunktaten der Gruppe Leukozyten 2 findet sich ein IQR von 1984,30 pg/mL und bildet damit den engsten Interquartilsbereich aller Gruppen. Für die Gruppe Leukozyten 3 errechnet sich ein Interquartilsbereich von 2021,84 pg/mL (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Boxplot  $\alpha$ -Defensin-ELISA-Konzentration in Abhängigkeit von Leukozyten**

Leukozyten	0	1	2	3
Min	0,0	142,51	0,0	858,98
Q <sub>1</sub>	176,24	1554,39	3028,23	1132,74
Median	1015,82	3535,84	3820,88	2523,72
Q <sub>3</sub>	3266,08	5351,27	5012,53	3154,58
Max	7722,22	9370,23	9109,67	4062,75
IQR	3089,84	3796,88	1984,30	2021,84

### 3.3.3 Klassifizierung der ROC-Kurven nach Leukozyten

Den verschiedenen Kriterien wurde für jede in Abbildung 16 beschriebene Konstellation auch der Einfluss der Leukozyten überprüft und gegenübergestellt. Bei den ROC-Kurven in Abbildung 18a bis e wurde die Unterteilung mithilfe der mikroskopischen Leukozytenbeurteilung vorgenommen. Bei der ROC-Kurve unter Abbildung 18a gingen 104 Punkttate in die Bewertung mit ein. Einziges Ausschlusskriterium war die Nicht-Beurteilung von Leukozyten im mikroskopischen Präparat, da dieses Charakteristikum die Unterteilung bedingte. Von diesen 104 Gelenkpunktaten waren 35 Leukozyten-positiv und 69 Leukozyten-negativ (Tabelle 19). Bei den Kriterien unter Abbildung 18a wird der Cut-off bei 1871,65 pg/mL festgelegt. Die Sensitivität erreicht 82,90% und die Spezifität 69,60% bei einer AUC von 0,76. Der PPW liegt bei 0,58 und der NPW bei 0,89 (Tabelle 13). Die Abbildung 18b zeigt die ROC-Kurve, die die Kriterien der ROC-Kurve von 16b aufgreift, lediglich die Klassifikation geschieht hier nach Leukozyten. Von 105 einbezogenen Messergebnissen stammten 35 von Leukozyten-positiven und 70 von Leukozyten-negativen Punkttaten (Tabelle 19). Auch hier wurde der Cut-off bei 1871,65 pg/mL ermittelt. Die AUC wurde mit 0,75 definiert bei einer Sensitivität von 82,90% und Spezifität von 68,60%. Die PPW erreicht 0,57 und die NPW 0,89 (Tabelle 13).

Bei der Klassifizierung der  $\alpha$ -Defensin-Ergebnisse der Abbildung 18c wurden ebenfalls 135 Gelenkpunktate in die Auswertung eingeschlossen. Davon stellten sich 70 als Leukozyten-positiv und 65 als Leukozyten negativ dar. Wie aus der Tabelle 13 zu entnehmen ist, liegt der Cut-off hier bei 813,71 pg/mL. Die Sensitivität erreicht 82,90% und die Spezifität 66,70% bei einer AUC von 0,77. Der PPW liegt bei 0,77 und der NPW bei 0,74.

Somit entsprechen die Kriterien der ROC-Kurve in der Abbildung 16d denen der Kurve 18d bezüglich der Exklusion der beeinflussenden Diagnosen. In die Auswertung wurden nicht Punkttate einbezogen, die Kultur-negativ, jedoch Leukozyten-positiv waren.

Bei einer Klassifikation nach Anwesenheit von Leukozyten im mikroskopischen Präparat, wie sie unter 18d durchgeführt wurde, konnten ebenfalls insgesamt 96 Punkttate zur Beurteilung herangezogen werden. Dabei stellten sich 31 Gelenkpunktate als Leukozyten-positiv und 65 als Leukozyten-negativ dar (Tabelle 19). Nach diesem Kriterium wurde ein Cut-off-Wert von 1871,65 pg/mL ermittelt. Die Sensitivität ist der ROC-Kurve bei 80,60%

zu entnehmen und die Spezifität stellt sich bei 69,20% ein. Die AUC beträgt 0,74. Der PPW erreicht einen Wert von 0,56 und der NPW 0,88 (Tabelle 13).

Für die ROC-Kurve in der Abbildung 18e erfolgte die Ermittlung ausschließlich mit  $\alpha$ -Defensin-Messergebnisse von Patienten, bei denen ein Verdacht oder eine gesicherte Gelenkinfektion bestand. Patienten mit relevanten beeinflussenden Nebenerkrankungen wurden ausgeschlossen. Die ROC-Kurve 18e fasst die Daten aus 71 Gelenkpunktaten zusammen, 41 Punktate waren Leukozyten-positiv und 30 Leukozyten-negativ (Tabelle 19). Die ROC-Kurve ermittelte einen geeigneten Cut-off bei 813,71 pg/mL bei einer AUC von 0,77. Für die Sensitivität errechnet sich bei Anwendung dieser Kriterien ein Wert von 82,90% bei einer Spezifität von 66,70%. Der PPW erreicht 0,77 bei einem NPW von 0,74 (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Cut-off-Ermittlung nach mikroskopischem Leukozytennachweis**

Abbildung	optimaler Cut-off pg/mL	AUC	Youden-Index	Sensitivität %	Spezifität %	PPW	NPW
18a	1871,65	0,76	0,52	82,90	69,60	0,58	0,89
18b	1871,65	0,75	0,51	82,90	68,60	0,57	0,89
18c	813,71	0,77	0,50	82,90	66,70	0,77	0,74
18d	1871,65	0,74	0,50	80,60	69,20	0,56	0,88
18e	813,71	0,77	0,50	82,90	66,70	0,77	0,74

**Tabelle 14: Leukozyteneigenschaften der Punktate zur Ermittlung der ROC-Kurven**

ROC-Kurve	optimaler Cut-off pg/mL	Punktate insgesamt	Leukozyten positiv	Leukozyten negativ
18a	1871,65	104	35	69
18b	1871,65	105	35	70
18c	813,71	135	70	65
18d	1871,65	96	31	65
18e	813,71	71	41	30

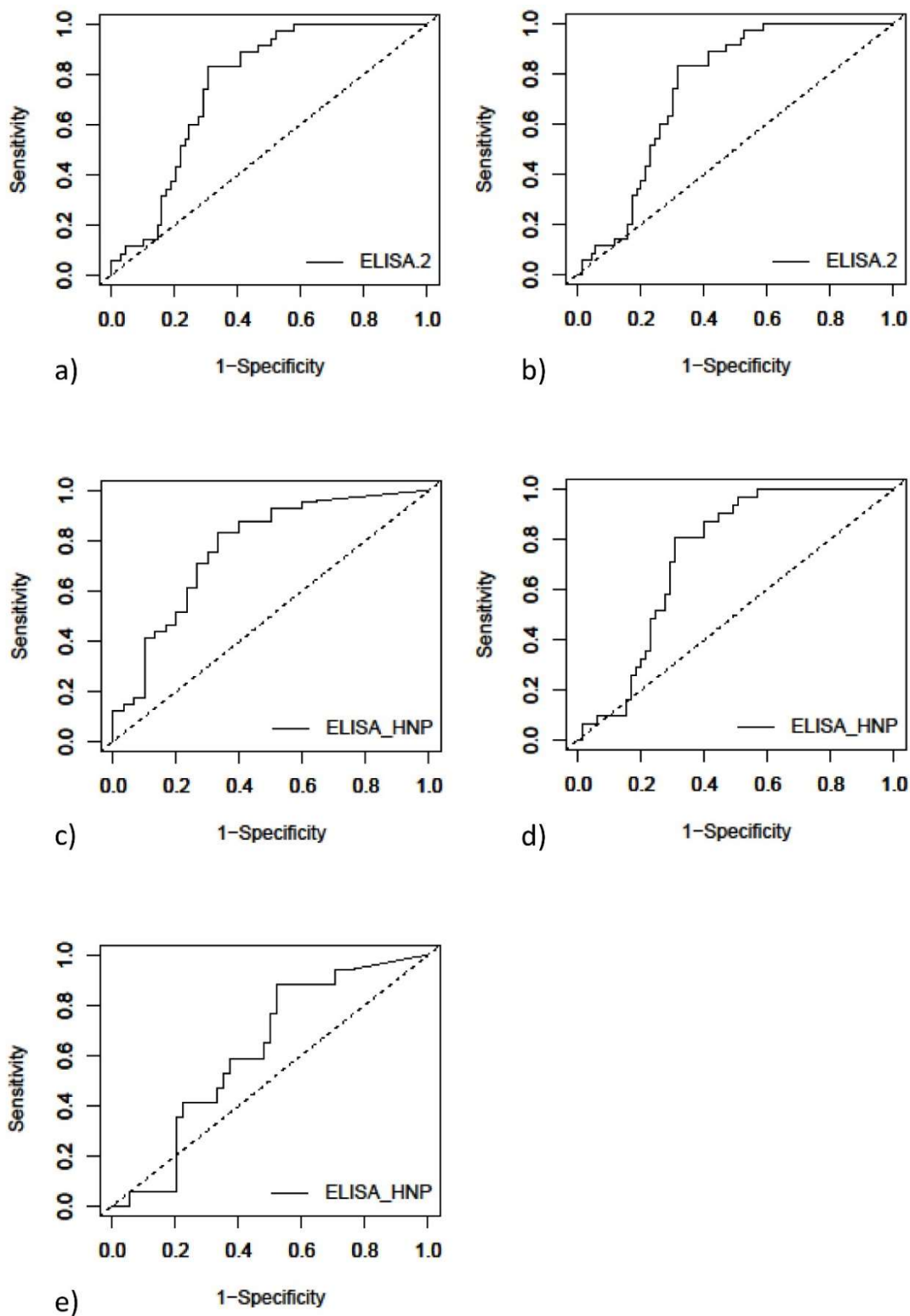


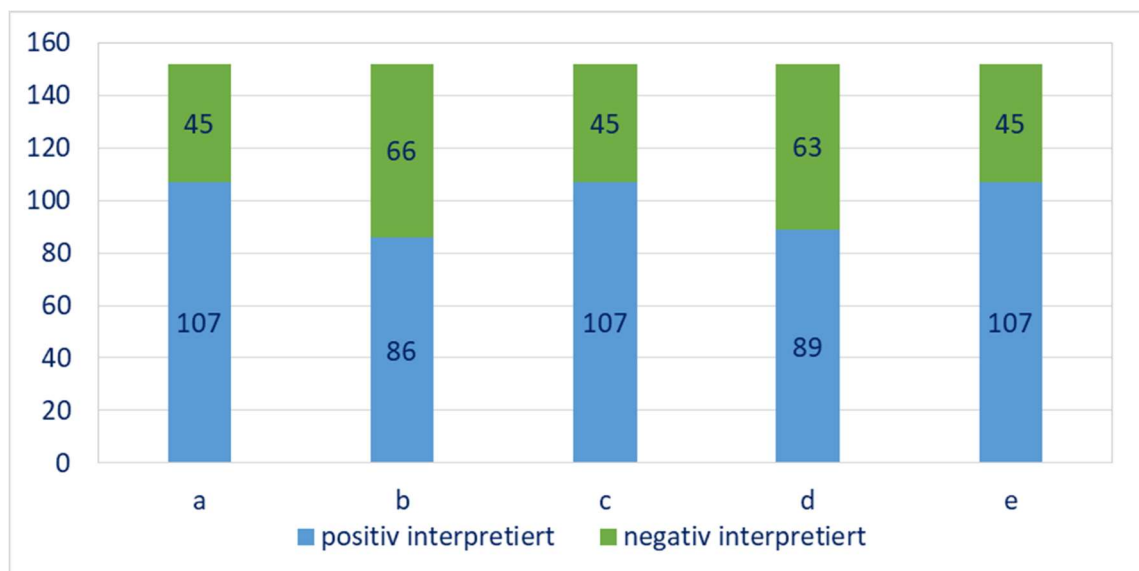
Abbildung 18: ROC-Kurven nach Klassifizierung der mikroskopischen Leukozyten

### 3.3.4 Interpretation der Cut-off-Werte

Basierend auf der Grundlage der erstellten ROC-Kurven in der Abbildung 16 und Abbildung 18 konnten die Cut-off-Werte ermittelt werden. Anhand dieser Cut-off-Werte erfolgt die Interpretation der  $\alpha$ -Defensin-Messergebnisse. Die  $\alpha$ -Defensin-Messungen wurden an 152 Gelenkpunktaten durchgeführt. Wurde der Cut-off-Wert überschritten ist das Ergebnis als ELISA-positiv einzustufen, wird der Wert unterschritten, so ist das Ergebnis als ELISA-negativ anzusehen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9 und 10 zusammengefasst.

**Tabelle 15: Interpretation der ermittelten Cut-offs bezogen auf Abbildung 16 a-e**

ROC-Kurve	Optimaler Cut-off pg/mL	Punkte insgesamt	Positiv Interpretiert	Negativ Interpretiert
16a	858,98	152	107	45
16b	1871,65	152	108	44
16c	858,98	152	107	45
16d	1681,39	152	89	63
16e	858,98	152	107	45



**Abbildung 19: Darstellung der interpretierten Cut-off-Kriterien ROC-Abb. 16 a-e**

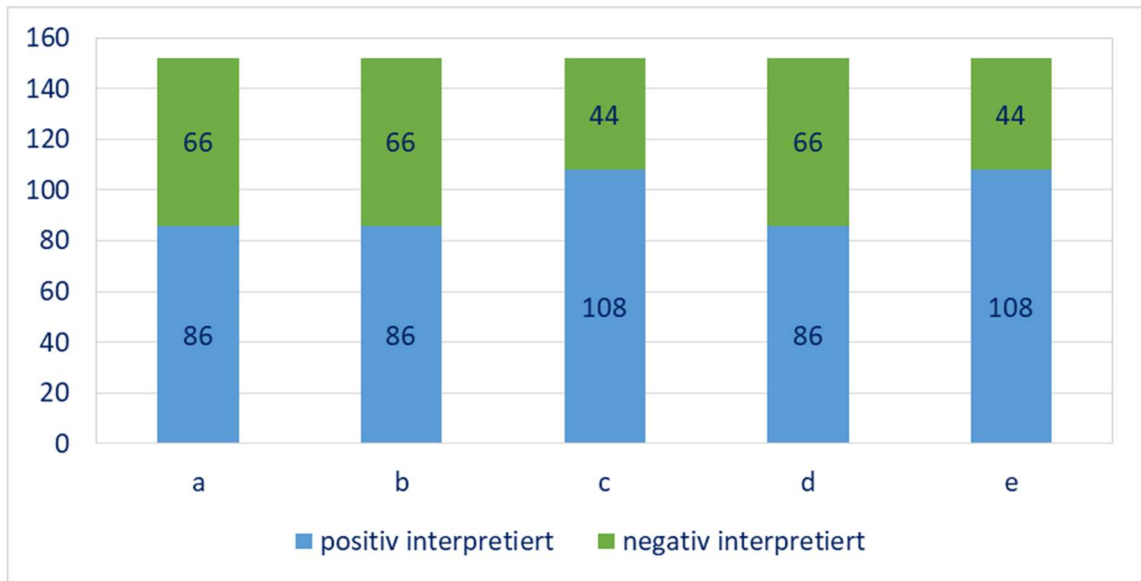


Abbildung 20: Darstellung der interpretierten Cut-offs Kriterien ROC-Abb. 18 a-e nach Leukozyten

Tabelle 16: Interpretierte Cut-offs bezogen auf Abbildung 18a-e

ROC-Kurve	Optimaler Cut-off pg/mL	Punktate insgesamt	Positiv Interpretiert	Negativ Interpretiert
18a	1871,65	152	86	66
18b	1871,65	152	89	63
18c	813,71	152	108	44
18d	1871,65	152	86	66
18e	813,71	152	108	44

Wurde ein Cut-off bei 858,98 pg/mL gewählt, konnten insgesamt 107 von 152 Punktaten als  $\alpha$ -Defensin-ELISA-positiv interpretiert werden und 45  $\alpha$ -Defensin-Messungen sind als ELISA-negativ zu werten. Bei einem Cut-off von 1871,65 pg/mL sind 86  $\alpha$ -Defensin-Messergebnisse als ELISA-positiv zu interpretieren und 66 als ELISA-negativ (Tabelle 16).

Die ROC-Kurven unter 18c und 18e ergaben einen Cut-off-Wert bei 813,71 pg/mL, so dass 108 Messergebnisse als ELISA-positiv und 44 als ELISA-negativ zu deuten sind (Abbildung 20). Unter der ROC-Kurve in 16d ließ sich ein Cut-off von 1681,39 pg/ $\mu$ L ermitteln. Demnach ist zu schlussfolgern, dass 89 der  $\alpha$ -Defensin-Messergebnisse ELISA-positiv und 63 ELISA-negativ sind (Tabelle 16).



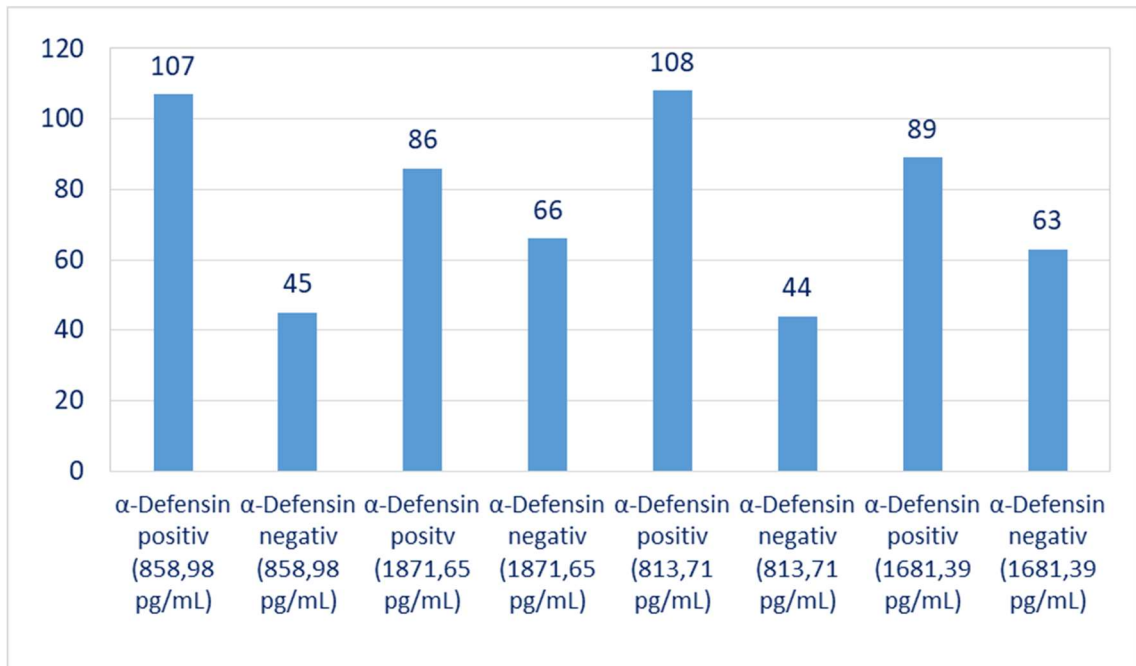


Abbildung 21: Ergebnisverteilung nach Cut-off-Werten

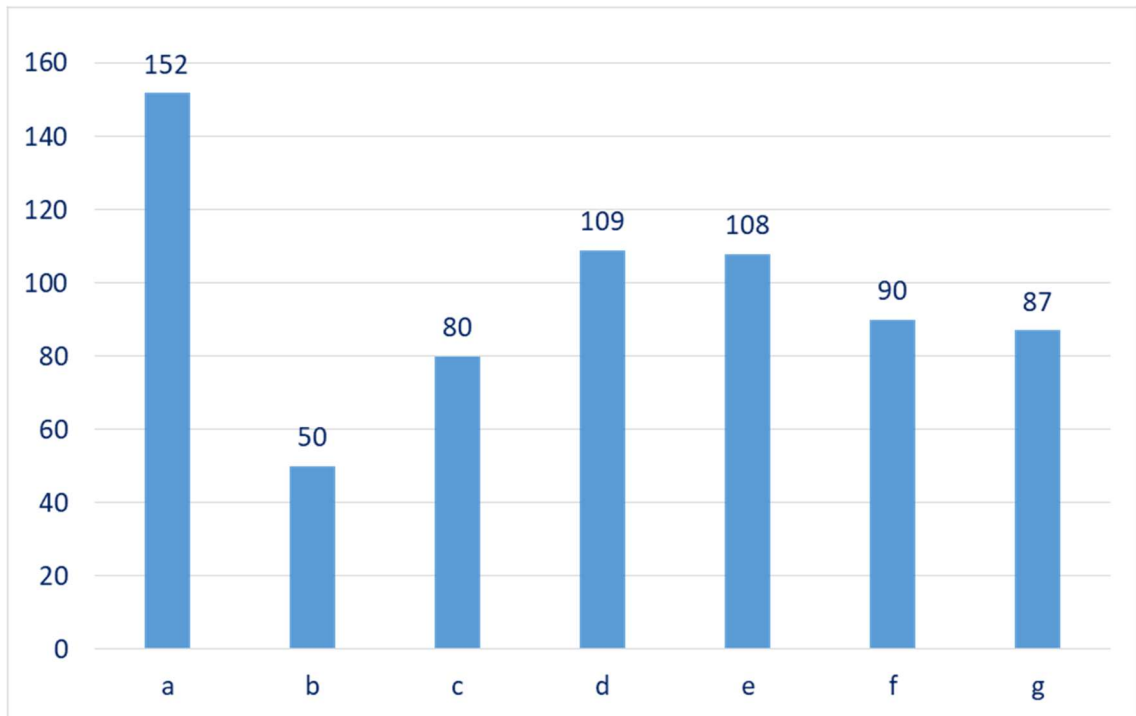
### 3.3.5 Gegenüberstellung $\alpha$ -Defensin-ELISA und visuelle MALDI-TOF MS-Auswertung

Nach der Validierung und Interpretation des ELISA-Verfahrens wurde diese Methode der MALDI-TOF MS-Methode gegenübergestellt. Die erste Auswertung der MALDI-TOF MS-Ergebnisse erfolgte visuell mithilfe der Flexanalysis Software der Firma Bruker. Hier wurde jedes erzeugte Massenspektrum nach Vorhandensein des  $\alpha$ -Defensin-Peaks bei  $3449 \pm 2$  Da durchgemustert. Insgesamt wurden 152 Gelenkpunkte für diese Messung nach dem Liquillizer-Protokoll aufbereitet und gemessen. Fünfzig dieser 152 Punkte waren bezüglich der mikrobiologischen Diagnostik Kultur-positiv und 102 Kultur-negativ (Tabelle 17). Unter den 152 Gelenkpunkten wurde in 80 ein Peak im Massebereich des  $\alpha$ -Defensins festgestellt. Von diesen 80 MALDI-positiven Punkten konnte in 42 ein Wachstum in der kulturellen Diagnostik nachgewiesen werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass 60 von diesem MALDI-positiv gemessenen Punkten einen positiven Leukozytennachweis im mikroskopischen Präparat vorzuweisen hatten.

**Tabelle 17: Ergebnisverteilung Kultur und MALDI**

Punktate insgesamt	152
Kultur-positiv	50
Kultur-negativ	102
MALDI-positiv für $\alpha$ -Defensin	80
MALDI-positiv für $\alpha$ -Defensin und Kultur-positiv	42
MALDI-positiv für $\alpha$ -Defensin und Leukozyten-positiv	60

Hinsichtlich der unterschiedlich festgelegten Cut-off-Werte erfolgte die Gegenüberstellung für jeden Cut-off separat. So ist der Tabelle 18 zu entnehmen, dass für den Cut-off 813,71 pg/mL 109 von 152 Gelenkpunktaten als ELISA-positiv interpretiert werden konnten. Für den Cut-off bei 858,98 pg/mL lieferten 108, für den Cut-off 1681,39 pg/mL 90 und für 1871,65 pg/mL 87 Gelenkpunktate ein positives Ergebnis. Wie oben bereits beschreiben, ergab die visuelle Auswertung der Summenspektren ein positiv zu interpretierendes MALDI-TOF MS-Ergebnis in 80 von 152 Gelenkpunktaten (Tabelle 17).

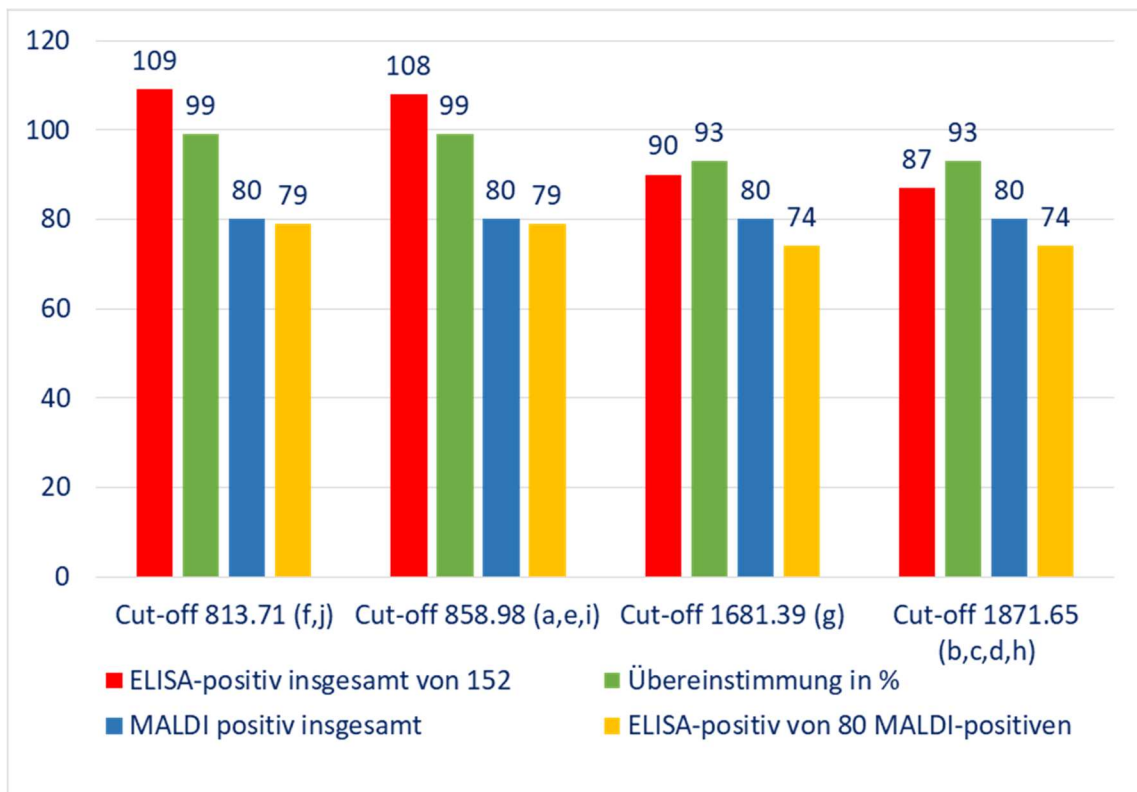


**Abbildung 22: Vergleich der Methoden  $\alpha$ -Defensin-ELISA,  $\alpha$ -Defensin-MALDI, und Kultur. a. Punkte insgesamt, b. Kultur positiv, c.  $\alpha$ -Defensin-MALDI-positiv, d.  $\alpha$ -Defensin-ELISA-positiv 813,71 pg/mL.  $\alpha$ -Defensin-ELISA-positiv 858,98 pg/mL, f.  $\alpha$ -Defensin-ELISA-positiv 1681,39 pg/mL, g.  $\alpha$ -Defensin-ELISA-positiv 1881,95 pg/mL**

Nach Gegenüberstellung dieser positiv zu interpretierenden Ergebnisse ergibt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse von  $\alpha$ -Defensin-MALDI positiven ( $n = 80$ ) und  $\alpha$ -Defensin-ELISA in 79 von 80 Fällen für den Cut-off von 813,71 pg/mL. Ebenfalls 79 von 80 Übereinstimmungen wurden durch den Vergleich mit dem Cut-off bei 858,98 pg/mL generiert. Dies entspricht für beide Fälle einer Übereinstimmung von 99%. Beim den Cut-off-Werten von 1681,39 pg/mL und 1871,65 pg/mL kam es mit 74 von 80 Übereinstimmungen zur gleichen Anzahl von gleichzeitig positiven MALDI- und ELISA-Ergebnis in den Gelenkpunktaten (Abbildung 22). Damit erreichen diese beiden Cut-offs nach der Gegenüberstellung eine Übereinstimmung von 93% (Tabelle 18).

**Tabelle 18: ELISA Ergebnis-Verteilung und Übereinstimmung**

Cut-off	1.Cut-off 813,71 pg/mL	2.Cut-off 858,98 pg/mL	3.Cut-off 1681,39 pg/mL	4.Cut-off 1871,65 pg/mL
ELISA-positiv von 152	109	108	90	87
ELISA-positiv von 80 MALDI positiven	79	79	74	74
Übereinstimmung in %	99	99	93	93

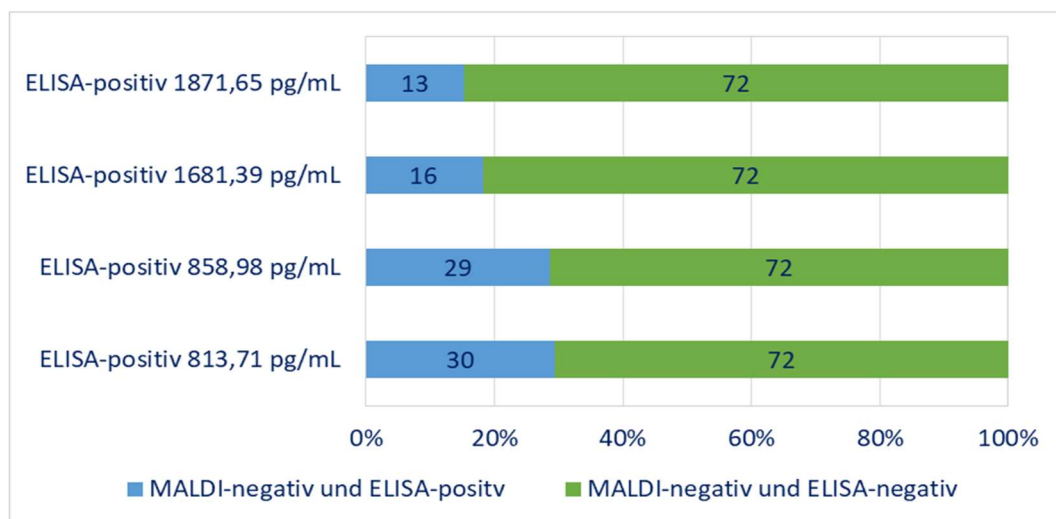
**Abbildung 23: Übereinstimmung von  $\alpha$ -Defensin-MALDI-positiven und  $\alpha$ -Defensin-ELISA-positiven Punktaten**

In den insgesamt 152 gemessenen Punktaten konnte in 72 massenspektrometrisch kein  $\alpha$ -Defensin detektiert werden. In diesen 72, in denen kein  $\alpha$ -Defensin nachzuweisen war, konnten jedoch in Abhängigkeit der gewählten Cut-off-Werte ein positiv zu interpretierendes ELISA-Ergebnis erzielt werden (Abbildung 23).

**Tabelle 19: MALDI-negative und ELISA-positive Punktate**

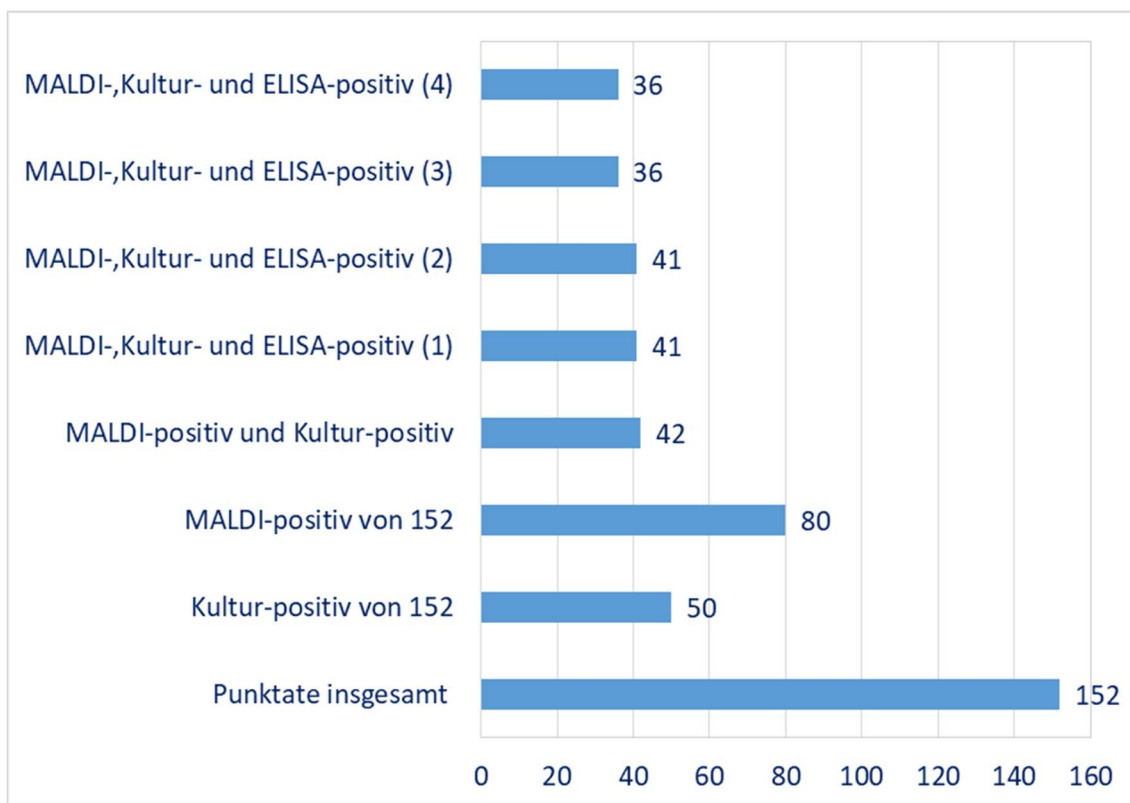
MALDI-Defensin-negativ	72
MALDI-Defensin-negativ und ELISA-positiv 813,71 pg/ml	30
MALDI-Defensin-negativ und ELISA-positiv 858,98 pg/ml	29
MALDI-Defensin-negativ und ELISA-positiv 1681,39 pg/ml	16
MALDI-Defensin-negativ und ELISA-positiv 1871,65 pg/ml	13

So konnte bei einem gewählten Cut-off von 813,71 pg/mL in 30 Punktaten ein Messergebnis über dem Cut-off erzielt werden. Beim Cut-off von 858,98 pg/mL waren es 29 Punktate mit einem positiven ELISA-Ergebnis. Für den unter 18 d bei 1681,39 pg/mL gewählten Cut-off konnte bei 16 Punktaten ein Ergebnis über dem Cut-off gemessen werden. Bei Betrachtung des gewählten Cut-offs bei 1871,65 pg/mL fallen 13 Punktate in die Kategorie eines positiven  $\alpha$ -Defensin-ELISA-Ergebnisses bei negativer  $\alpha$ -Defensin-Detektion durch die MALDI-TOF MS (Abbildung 24).

**Abbildung 24: MALDI-negative und ELISA-positive**

In 42 Gelenkpunktaten konnte ein positives Ergebnis mit der MALDI-TOF MS und gleichzeitig in der Kultur gefunden werden. Eine Übereinstimmung in allen drei Methoden konnte abhängig vom Cut-off ebenfalls nachgewiesen werden. So wurde bei den Cut-off-Werten von 813,71 pg/mL und 858,98 pg/mL eine Übereinstimmung in 41 Punktaten gefunden. Hier waren die mikrobiologische Kultur und die MALDI-Detektion sowie die  $\alpha$ -Defensin-Messung im ELISA als positiv zu beurteilen. Bei den Cut-off-Werten von

1681,39 pg/mL und 1871,65 pg/mL gab es jeweils in 36 Punktate die in allen drei Verfahren ein positiv zu interpretierendes Ergebnis lieferten (Abbildung 25).



**Abbildung 25: MALDI-, Kultur-, und ELISA-positive Punktate nach verschiedenen Cut-offs.**  
(1) Cut-off 813,71 pg/mL, (2) Cut-off 858,98 pg/mL, (3) Cut-off 1681,39 pg/mL, (4) Cut-off 1871,65 pg/mL

## 4 Diskussion

Die MALDI-TOF MS stellt eine Methode dar, die in den letzten Jahren zu einem erheblichen Fortschritt in der mikrobiologischen Diagnostik beigetragen hat (Patel 2015). Lallemand et al. haben 2016 eine Studie zum Erregernachweis mittels MALDI-TOF MS aus BK-Flaschen durchgeführt, die mit Synovia- und osteoartikulärem Material befüllt waren (Lallemand et al. 2017). Dabei konnten in bis zu 92% der untersuchten Proben die Erreger bis auf die Speziesebene identifiziert werden. Beim Vorliegen von Mischkulturen konnten in 92,8% der Fälle beide Keime zumindest bis auf die Gattungsebene erkannt werden. Weiterhin haben sie festgestellt, dass die Detektion von *Staphylococcus species* besser gelang als die von *Streptococcus species*. Im ersten Versuchsteil dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der direkte Erregernachweis aus mit Synovia-befüllten BK-Flaschen möglich ist. Nach Anreicherung in den BK-Flaschen und positivem Wachstumssignal wird keine Anzucht auf Nährmedien abgewartet, sondern die direkte Keimidentifikation mit dem MALDI-Sepsityper Kit angestrebt. In unserem Fall konnten aus 42 positiv gemeldeten BK-Flaschen 37 Erreger unmittelbar identifiziert werden. Davon sogar 29 Erreger bis auf ihre Speziesebene. Damit lieferte die Sepsityper Methode ein zu 97,3% übereinstimmendes Ergebnis mit der kulturellen Routinediagnostik. Die Kosten zur Anschaffung des Sepsityper Kit gilt es dabei abzuwägen. Azrad et al. haben 2019 jedoch gezeigt, dass mit einer laborinternen Aufreinigungsmethode vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können (Azrad et al. 2019). Frédéric et al. haben 2015 mit ihrer Arbeit den MALDI Sepsityper Kit und eine laborinterne Aufreinigungsmethode miteinander verglichen und gezeigt, dass diese durchaus bessere Ergebnisse liefern kann und zudem noch kostengünstiger abschnitt. Im besten Fall konnte ein Befund durch diese Methode 24 Stunden früher mitgeteilt werden (Frédéric et al. 2015). Insgesamt erweist sich die Keimidentifikation nach Inkubation der Synovia in BK-Flaschen als eine zeitsparende und mit der kulturellen Anzucht übereinstimmende Methode (Lallemand et al. 2017). Die generelle Zeitersparnis durch die Nutzung der MALDI-TOF MS eröffnet langfristig weitere Vorteile. Diese sind vor allem die günstige Auswirkung auf den anfallenden Kostenfaktor. Das Labor kann Material- und Personalkosten einsparen (Tran et al. 2015). Weiterhin kann sich dies vorteilhaft auf die Ausgaben im Gesundheitssystem auswirken. Eine schnellere Diagnostik kann eine zeitnahe und gezieltere Diagnose und

Therapie bedeuten. Dies wiederum kann eine schnellere Genesung und kürze Krankenhausliegezeit bedeuten. Diesen Umstand gilt es zukünftig intensiver zu untersuchen. Schwächen zeigt MALDI-TOF MS Methode bei der Differenzierung von Keimgemischen. Scohy et al. konnten 2018 in ihren Versuchen bei zwei Erregern pro BK-Flasche 34,3% ihrer Keimgemische vollständig identifizieren (Scohy et al. 2018). Hinzuzufügen ist jedoch auch, dass es sich dabei nicht um Gelenkpunktate handelte. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung konnte massenspektrometrisch lediglich ein Keim als Ergebnis geliefert werden, wohingegen in der bakteriologischen Kultur beide Bakterienspezies gewachsen sind. Dennoch besticht die Anwendung der MALDI-TOF-basierten Methode durch ihre unkomplizierte Handhabung, simple Anwendung und vor allem durch den Faktor Zeit (Frédéric et al. 2015). MALDI-TOF MS wird bereits seit Jahren in der Routinediagnostik eingesetzt. Hier wird jedoch vor allem die Identifizierung von bereits gewachsenen Bakterienkulturen durchgeführt. Der entscheidende Vorteil liegt in der Ausbaufähigkeit der Diagnostik im Bereich von Gelenkinfektionen. Hier bietet die MALDI-TOF MS zum einen den Vorteil, dass mögliche Pathogene bis auf die Ebene ihrer Spezies identifiziert werden können. Teilweise wurde dieser tiefergehenden Diagnostik aus Kostengründen in der Vergangenheit nicht nachgegangen (Peel et al. 2015). Das MALDI Sepsityper Kit setzt auch auf eine massenspektrometrische Analyse der vorbehandelten Gelenkflüssigkeit. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei Zwischenschritte übersprungen werden konnten, die in ihrem Aufwand nicht ganz unerheblich sind (Abbildung 6). Die sich Wachstum-positiv gemeldete BK-Flasche musste auf Nährmedien ausgestrichen werden und 12-24 h inkubiert werden. Der eventuell anwachsende Erreger kann dann in der Regel am darauffolgenden Arbeitstag für die MALDI-TOF MS vorbereitet werden. Im Idealfall konnte bei positivem Wachstumssignal durch Anwendung des Sepsityper Kits innerhalb einer Stunde ein Erregernachweis bis auf die Speziesebene erzielt werden.

Bei all den erwähnten Vorteilen sollte jedoch beachtet werden, dass die MALDI-TOF MS in der Mikrobiologischen Diagnostik die kulturelle Erregeranzucht derzeit nicht ersetzen kann. Die Konsequenz einer Keimidentifizierung aus einer Patientenprobe ist eine optimale antibiotische Behandlung, die aus der jeweiligen Resistenzbestimmung resultiert. Die MALDI-TOF Methode mit dem Sepsityper erlaubt dabei eine erste Eingrenzung der



möglichen wirksamen Antibiotikaklassen durch die Keimidentifikation auf Gattungs- oder sogar Speziesebene. Die erste Eingrenzung der Antibiotika ist dem klinisch tätigen Personal eine sehr wichtige Hilfestellung. Es kann zeitnah eine Antibiotikatherapie eingeleitet werden, bis ein Antibiogramm erstellt ist. Diese sogenannte kalkulierte ist wichtig um spätere Komplikationen durch Nichtbehandeln bei bakteriellem Infekt zu vermeiden. Je mehr über den Erreger bekannt ist, desto treffender kann die Antibiotikatherapie erfolgen. Eine möglichst gezielte Behandlung ist wünschenswert, um Resistenzbildungen zu vermeiden. Ist die Gattung oder gar Spezies also so früh wie möglich bekannt, kann eine kalkulierte Antibiotikatherapie, die vom Wirkspektrum breiter gehalten wird, deeskaliert und somit gezielter angesetzt werden. Für die bisher etablierten und standardisierten Resistenzbestimmungen werden zurzeit jedoch noch Bakterienkulturen benötigt. Dennoch besitzt die MALDI-TOF MS ein hohes Potenzial zukünftig auch diese Lücke zu schließen (Idelevich et al. 2018). So konnten bereits Resistenzen gegen Antibiotika MALDI-TOF-basiert in Versuchen nachgewiesen werden (Yoon et al. 2020). Letztendlich könnte die Weiterentwicklung MALDI-TOF MS-basierter Techniken den Nachweis von Antibiotikasensibilität oder Resistenzen ergänzen und sogar erweitern. Die sichere Diagnose der periprothetischen und gelenkassoziierten Infektionen bleibt nach wie vor eine Herausforderung im klinischen Alltag und in der Diagnostik. Serumparameter, wie das C-reaktive Protein (CRP) oder das Interleukin 6 (IL-6) weisen Schwächen auf, da sie unter Umständen bei Begleiterkrankungen oder systemischen Inflammationen ebenfalls erhöht messbar sind (Du Clos und Mold 2004; Chen et al. 2014). Beim Anstieg dieser Parameter im Gelenkpunktat kann es sich nämlich auch um Erkrankungen wie beispielsweise einen Gichtanfall handeln (Archibeck et al. 2001). In vielen Studien wurde die Aussagekraft von Parametern wie der Leukozytenanzahl (WBC), dem C-reaktiven Protein (CRP), der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder der Leukozytenesterase aus der Synovialflüssigkeit für die Diagnose der PJI untersucht (Chen et al. 2014; Deirmengian et al. 2014; Bonanzinga et al. 2017; De Vecchi et al. 2018). Frangiamore et al. haben 2016 in einer Studie gezeigt, dass die Genauigkeit der Vorhersage einer PJI durch die Bestimmung des  $\alpha$ -Defensins aus der Synovialflüssigkeit eine höhere Spezifität und Sensitivität besitzt, als die Messung der BSG und CRP im Serum (Frangiamore et al. 2016). In einer 2014 publizierten Studie zeigten Deirmengian et al., dass

sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität der  $\alpha$ -Defensin-Messung in einem Immunoassay im direkten Vergleich mit einem kolorimetrischen Leukozytenesterase-Teststreifentest höher lagen. So haben unter anderem Miyamae et al. 2018 eine Studie zur Genauigkeit der Vorhersage einer periprothetischen Gelenkinfektion durch die Messung von  $\alpha$ -Defensin bei Patienten mit gleichzeitiger systemischen Inflammation bei Hüft- und Knieprothesenrevisionen durchgeführt. Sie konnten dabei eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 93%, bei einer Genauigkeit von 97% aufzeigen. Ins Patientenkollektiv wurden Patienten unter laufender medikamentösen Therapie durch Immunsuppressiva und Antibiotika mit eingeschlossen (Miyamae et al. 2019). Auch wurden erhöhte  $\alpha$ -Defensin-Spiegel bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis festgestellt (Bokarewa et al. 2019).

In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass weitere gelenkassoziierte Parameter, wie beispielsweise das  $\alpha$ -Defensin, nachgewiesen werden können. Zukünftig könnte dies für Einsender und Labore von Interesse sein. Wenn der gleiche Arbeitsplatz mehrere Untersuchungen in einem Schritt umsetzt, könnten logistische Zwischenschritte vermieden werden. Nicht zuletzt könnte der Umgang mit zu Verfügung stehenden Ressourcen gezielter geplant werden. Labormitarbeiter und Materialien, aber auch die Patientenprobe selbst müsste nicht aufwändig geteilt, mehrmals erfasst und weitergeleitet werden. Zu erwähnen ist, dass gerade Synovia durch ihre zähe Beschaffenheit schwierig zu aliquotieren ist. Mehrmaliges unnötiges Öffnen und Teilen der Probe sollte gerade zum Zweck der mikrobiologischen Diagnostik aufgrund der Kontaminationsgefahr vermieden werden.

Der bisherige Nachweis des  $\alpha$ -Defensins bestand in immunologischen Methoden. Nachteil dieser immunologisch-serologischen Verfahren sind Arbeitsprotokolle, die in der Regel langwierig sind und mehrere aufwändige Schritte beinhalten. Diese lassen sich nicht in jedem Fall in den täglichen diagnostischen Arbeitsprozess beim heutzutage anfallenden Probenaufkommen integrieren. Mittlerweile existieren auch einige kommerziell erhältliche Tests, die eine einfache Durchführung besitzen, jedoch zu immens hohen Kosten (Marson et al. 2018).

Gravius et al. haben in Versuchen bereits neutrophile Peptide in periprothetischem Gewebe mittels MALDI-TOF MS nachweisen können (Gravius et al. 2015).

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis eines Biomarkers in der Synovialflüssigkeit. Es konnte der MALDI-TOF-basierte Nachweis des humanen neutrophilen Peptids  $\alpha$ -Defensin realisiert werden. Vorab wurde die Nachweisbarkeitsgrenze in Gelenkpunktaten von Rindern getestet. Hier wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Defensin bis in den Pikogramm-Bereich nachweisbar ist.

Nach einer Vorbehandlung humaner Gelenkpunktate nach selbstentwickelten Protokollen konnte  $\alpha$ -Defensin massenspektrometrisch detektiert werden. Dabei wurde die Vorbehandlung mit DTT und der Liquillizer<sup>®</sup>-Lösung verglichen (2.2.3.5, 2.2.3.6). DTT stellt eine chemische Verbindung dar, die bei Anwendung die Konservierung intrazellulärer Proteine und Peptide bewirkt. Dies wird dadurch erreicht, dass DTT die Sulfhydryl-Gruppen vor der Oxidation durch Sauerstoff schützt. Im Gegensatz dazu ist das Liquillizer<sup>®</sup>-Reagenz eine gebrauchsfertige wässrige Lösung frei von DTT. Sie verringert die Viskosität von Materialien. Die visuelle Auswertung der Massenspektren erzielte je nach Protokoll ähnliche Ergebnisse. So konnte bei der Behandlung mit DTT bei 25 von 38 Kultur-positiven Punktaten  $\alpha$ -Defensin massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Bei der Vorabbehandlung mit dem Liquillizer konnte bei 34 von 49 Kultur-positiven Punktaten  $\alpha$ -Defensin detektiert werden. Dies entspricht einer Konkordanz von jeweils 66% und 69%. Bei den Kultur-negativen Punktaten wurden höhere Übereinstimmungen erzielt. Beim DTT-Protokoll konnte in ca. 95% der Kultur-negativen Proben kein  $\alpha$ -Defensin nachgewiesen werden und beim Liquillizer 73%. Bei einer höheren Probenanzahl würde vermutlich somit eine höhere Spezifität erreicht werden.

Der immunologische Nachweis des  $\alpha$ -Defensins mithilfe des ELISA erfolgte im Gegensatz zur MALDI-TOF-basierten Methode quantitativ. Um einen geeigneten Vergleich durchführen zu können musste der optimale Cut-off-Wert für den ELISA ermittelt werden. Dafür wurden verschiedene Kriterien variiert und der Cut-off gewählt, der die höchste Sensitivität bei möglichst hoher Spezifität aufwies. Die Ermittlung erfolgt mithilfe des Youden-Index (Tabelle 13). Daran angelehnt wurde der optimale Cut-off bei 1871,65 pg/mL für die unter der Abbildung 18a dargestellte ROC-Kurve ausgewählt (Tabelle 16). Die AUC wurde mit 0,76 definiert bei einer Sensitivität von 82,90% und Spezifität von 69,60%. Die PPW erreicht 0,58 und die NPW 0,89. Bezüglich der Kriterien ist zu erwähnen, dass hier kein Ausschluss von Gelenkpunktaten von Patientin mit Vorerkrankungen

stattgefunden hat. Die Klassifizierung erfolgte bei der ROC-Kurve 20a anhand der Anwesenheit von Leukozyten im mikroskopischen Präparat. Diesen Kriterien zufolge gingen von insgesamt 152 Gelenkpunktaten 104 in die Auswertung ein, von denen 35 Patientenproben Leukozyten-positiv und 69 Leukozyten-negativ waren. Bei diesen Punktaten wurden bei Anwendung des o.a. Cut-off-Wertes 86 Gelenkpunktate als  $\alpha$ -Defensin-positiv interpretiert und 66 als  $\alpha$ -Defensin-negativ. So würde sich diese Methode dafür eignen, einen klinischen Verdacht durch ein positives Ergebnis zu untermauern. Letztendlich spielt die Anwesenheit der Leukozyten für den Nachweis keine Rolle, wohingegen die Abwesenheit der Leukozyten sehr wohl mit einer negativen Detektion korreliert.

Dieselben 152 Patientenproben wurden unter 3.1.4 der MALDI-TOF MS Messung nach Behandlung mit dem Liquillizer-Reagenz unterzogen. Fünfzig dieser 152 Punktate waren bezüglich der mikrobiologischen Diagnostik Kultur-positiv und 102 Kultur-negativ. Unter den 152 Gelenkpunktaten wurde in 80 ein Peak im Massebereich des  $\alpha$ -Defensins festgestellt. Von diesen 80 MALDI-positiven Punktaten konnte in 42 ein Wachstum in der kulturellen Diagnostik nachgewiesen werden. Nach Interpretation für den Cut-off bei 1871,65 pg/mL konnte bei 87 von 152 Gelenkpunktaten ein positives ELISA-Ergebnis erzielt werden.

Bei der direkten Gegenüberstellung der positiv zu interpretierenden Ergebnisse nach dem ausgewählten optimalen Cut-off-Wert von 1871,65 pg/mL ergibt sich bei 74 von 80 ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen der MALDI- und ELISA-Messung in den Gelenkpunktaten. Dies entspricht einer Übereinstimmung von 93%. In den insgesamt 152 gemessenen Punktaten konnte in 72 massenspektrometrisch kein  $\alpha$ -Defensin-Peak detektiert werden. Bei Betrachtung des gewählten Cut-offs bei 1871,65 pg/mL fallen 13 Punktate in die Kategorie eines positiven  $\alpha$ -Defensin-ELISA-Ergebnisses bei negativer  $\alpha$ -Defensin-Detektion durch die MALDI-TOF MS. In 42 Gelenkpunktaten konnte ein positives Ergebnis mit der MALDI-TOF MS und gleichzeitig in der Kultur gefunden werden. Eine Übereinstimmung in allen drei Methoden konnte abhängig vom Cut-off ebenfalls nachgewiesen werden. Beim Cut-off-Wert von 1871,65 pg/mL gab es jeweils in 36 Punktaten in allen drei Verfahren ein positiv zu interpretierendes Ergebnis.

Die Gegenüberstellung mit der ELISA- Methode gelingt dabei mit Einschränkungen. Während diese quantitativ die Konzentration des  $\alpha$ -Defensins misst, wird bei der MALDI-

TOF MS ein qualitativer Nachweis erbracht. Andere Studien erreichen eine Spezifität bis zu 98% und eine Sensitivität von 100% (Frangiamore et al. 2016). Hier werden jedoch Kriterien der MSIS zur Einteilung von Gelenkinfektionen herangezogen. In unserem Versuch gilt es den qualitativen Nachweis in einer gerechten Form mit der quantitativen zu vergleichen. Außerdem geschah der immunologische Nachweis des  $\alpha$ -Defensins nicht mit dem gleichen Test, der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Dennoch ist zu erwähnen, dass die Nachweisbarkeit des ELISA laut Herstellerangaben bei einer Minimalkonzentration von 156 pg/mL liegt. In den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit gelang die Detektion ebenfalls bis in den Pikogramm-Bereich. Weiterhin ist der direkte Vergleich beider Methoden mit der mikrobiologischen Kultur bedingt möglich. In der mikrobiologischen Kultur wird ein Keim nachgewiesen, wohingegen der ELISA und die MALDI-TOF MS die Konzentration oder Anwesenheit eines Peptids messen, welches als Reaktion auf Pathogene aus der Granula der neutrophilen Granulozyten sezerniert wird. Nichtsdestotrotz ist der Vorteil eines Biomarkers, der von der mikrobiologischen Kultur weitestgehend unabhängig ist, nicht zu unterschätzen (Bonanzinga et al. 2017). Die besonderen Gegebenheiten bei periprothetischen und gelenkassoziierten Infektionen machen einen Kultur-unabhängigen Parameter wünschenswert. So sind gerade Gelenkinfektionen nicht selten mit niedrigen Keimzahlen verbunden. Einige Patienten sind eventuell bereits antibiotisch vorbehandelt. In solchen Fällen kann bei bestehender Gelenkinfektion kein Keim nachgewiesen werden. Dabei können sich die Infektionen über einen langen Zeitraum von mehreren Monaten entwickeln ohne einen akuten Verlauf aufzuzeigen. Weiterhin stellt das Keimspektrum eine Herausforderung dar, da sich darunter auch Keime der örtlichen Standortflora befinden (Rosteijs et al. 2018). Die Differenzierung zwischen Kontamination und kausal bedingter Infektionserreger ist gegenwärtig Gegenstand der Forschung. So versucht die World Association against Infection in Orthopaedics and Trauma (WAIOT) beispielweise Kriterien zu definieren, die Infektionen in High- und Low-grade Infektionen, Biofilm-assoziierte Implantat Funktionsstörungen, keine Infektion und Kontamination einteilen. Sie haben einen Score entwickelt, der auf eine wahrscheinliche Kontamination hinweist (Drago et al. 2019). Das humane  $\alpha$ -Defensin hat sich in den letzten Jahren als zuverlässiger Biomarker in der Diagnostik der Gelenkinfektionen herausgestellt (Deirmengian et al. 2014; Frangiamore et al. 2016; Miyamae et al. 2019). Labormedizinisch zeigte sich ein weiterentwickelter  $\alpha$ -Defensin-

Test außerdem nicht nur als zuverlässiger Parameter, sondern auch weniger störanfällig als die Untersuchung der Leukozyten-Esterase. Bei variabler Probenbeschaffenheit war der Leukozyten-Esterase-Nachweis bei blutigen Punktaten und Proben, die Detritus enthielten, nicht auswertbar (Deirmengian et al. 2015).

Diese Arbeit zeigt, dass es durchaus möglich ist die MALDI-TOF MS Methode, die seit einigen Jahren bereits für die Keimdiagnostik in der Mikrobiologie etabliert wurde, für die erweiterte Diagnostik neuer Parameter einzusetzen. Zukünftig würde es den Vorteil bieten, Untersuchungen in der Synovialflüssigkeit zu kombinieren. Beispielsweise könnten die Keimidentifikation und der  $\alpha$ -Defensin-Nachweis im gleichen Messvorgang durchgeführt werden. Bei gleichzeitigen klinischen Befunden und fundiertem Verdacht könnte eine schnellere Diagnose der Gelenkinfektion gesichert werden. Dabei könnte ein positiver Nachweis des  $\alpha$ -Defensins unter Zusammenschau weiterer Befunde die Verdachtsdiagnose erhärten. Weiterhin spielt auch hier der Faktor Zeit eine erhebliche Rolle. Die Messung mittels MALDI-TOF MS gestaltet sich im Gegensatz zum ELISA simpel, schneller und bei unter Umständen sicherlich kostengünstiger.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde getestet, ob die Möglichkeit besteht die Auswertung der erzeugten Massenspektren zu vereinfachen und zu automatisieren. In diesem Teil sollte mithilfe von Maschinellen Lernverfahren eine möglichst präzise und schnelle Interpretation erreicht werden. In Zeiten künstlicher Intelligenz können Neuronale Netze die Auswertung von Daten unterstützen. In diesem Zusammenhang spielen Data Science und Machine Learning eine immer größer werdende Rolle in der Medizin. In einigen Bereichen wurde der Einsatz künstlicher Intelligenz bereits erprobt (Harada et al. 2019; Zahia et al. 2020). Dabei sind vor allem Convolutional Neuronal Networks bei der Erkennung von Bildern von besonderer Relevanz. Beispielsweise wurden ConvNet in der radiologischen Diagnostik zur Detektion von Meniskusverletzungen eingesetzt. In diesem Zusammenhang trugen sie zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität bei und wurden als zukunftsfähige Technologie angesehen, die zu einem effizienteren Arbeitsablauf verhelfen kann (Roblot et al. 2019). In der Ophthalmologie wurden ConvNet zur Erkennung pathologischer Veränderungen aus OCT-Untersuchungen (optische Kohärenztomographie) erprobt und auch im Bereich der Radiologie, nämlich bei der Auswertung von Röntgenbildern des Thorax, kam diese Art von Maschinellen Lernen bereits zum Einsatz (Kermary et al. 2018).

In diesem Versuch wurden die erzeugten Massenspektren mithilfe eines ConvNet ausgewertet. Von insgesamt 243 eingegebenen Spektren wurden vorab 157 als  $\alpha$ -Defensin-positiv und 86 als  $\alpha$ -Defensin-negativ klassifiziert. Dabei wurden die Bilder mit einer Genauigkeit von 99,75% vorhergesagt. Das ConvNet wurde vorher mit 389 Bildern trainiert. Zur Steigerung der Genauigkeit der Neuronalen Netze wären möglichst viele Daten vorteilhaft, aus denen das KNN lernen kann. Auch ist die Verteilung der klassifizierten Daten mit einer Verteilung von 157:86 von  $\alpha$ -Defensin-positiven zu  $\alpha$ -Defensin-negativen un- ausgeglichen und könnte das Training des ConvNet beeinflussen. Hier liegt eine Schwäche des entwickelten ConvNet. Von Vorteil wäre eine höhere und ausgeglichene Anzahl von Bildern zum Trainieren. Enormer Wichtigkeit für die Trainingsphase haben weiterhin möglichst präzise Daten. In den vergangenen Jahren hat die Arbeitsverdichtung auch in den Alltag der Labordiagnostik Einzug genommen. Diese Informationen müssen zeitgerecht verarbeitet und interpretiert werden. Schon heute trägt künstliche Intelligenz in Form von Neuronalen Netzen dazu bei, dass Arbeitsabläufe optimiert werden können. Durch Maschinelle Lernverfahren können auffällige Befunde schneller erkannt und im besten Fall behandelt werden. Der Einsatz künstlicher Intelligenz in der medizinischen Diagnostik wird sich stetig weiterentwickeln und die Effizienz, aber auch die Qualität der Diagnostik enorm steigern. Sie wird zukünftig eine große unterstützende Rolle im Alltag der medizinischen Diagnostik spielen.

## 5 Zusammenfassung

Die bereits seit Jahren etablierte Methode der MALDI-TOF Spektrometrie kann dynamisch weiterentwickelt und ihre Nutzbarkeit vielseitig erweitert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen die Möglichkeiten der MALDI-TOF MS-basierten Methode im Bereich der mikrobiologischen aber auch der erweiterten Diagnostik von periprothetischen und gelenkassoziierten Infektionen auf. Eingangs wurde die Frage gestellt, ob der direkte Erregernachweis aus mit Synovialbefüllten BK-Flaschen möglich ist? Im ersten Versuchsteil konnte gezeigt werden, dass der direkte Nachweis von Erregern aus Synovialbefüllten BK-Flaschen zuverlässig möglich ist. Vorteile dieser Methode bestehen nicht nur in der Präanalytik, sondern auch im analytisch diagnostischen Bereich. Die Anwendung des MALDI Sepsityper ist einfach durchführbar und nimmt verhältnismäßig wenig Zeit in Anspruch. Weiterhin könnten insgesamt wertvolle Ressourcen in Form von Materialien, Arbeitskraft und logistische Schritte eingespart und optimiert werden. Auch besticht dieser Test durch den Faktor Zeit. Der Zeitraum bis zum ersten Zwischenbefund konnte im Vergleich zur konventionellen Kultur verkürzt und eine kalkulierte Therapie früher deeskaliert werden. Eine zeitnahe gezielte Therapie minimiert das Risiko für die Ausbildung unnötiger Resistenzen durch eine Fehltherapie. Eine mindestens 12 stündige Inkubation der auf konventionelle Medien ausgestrichenen Gelenkpunkttate und eine Analyse mittels MALDI-TOF der darauf wachsenden Kolonien müsste nicht mehr abgewartet werden. Im Idealfall erzielt man einen Zwischenbefund bis zu einem Arbeitstag früher.

Ein weiterer großer Nutzen der MALDI-TOF MS konnte im zweiten Teil der Arbeit bewiesen werden. Hier wurde anfangs die Frage gestellt, ob die Detektion von  $\alpha$ -Defensin aus der Synovialflüssigkeit mithilfe von MALDI-TOF MS realisierbar ist. Die Validität von  $\alpha$ -Defensin als Biomarker für die Diagnostik von periprothetischen Infektionen und Gelenkinfektionen ist in zahlreichen Studien in den letzten Jahren bestätigt worden. Der Nachweis des bislang immunologisch nachgewiesenen Parameters konnte in dieser Arbeit nach zwei selbst entwickelten Protokollen massenspektrometrisch realisiert werden. Neben der Betrachtung der klinischen Symptomatik und Befunde besitzt das  $\alpha$ -Defensin eine Relevanz, da die An- oder Abwesenheit des Parameters einen wichtigen Anteil zur richtigen Diagnosefindung beisteuert.



Mit Hinblick auf die zukünftige Entwicklung im Bereich Künstliche Intelligenz wurde ein ConvNet entworfen. Die im  $\alpha$ -Defensin- Versuch erzeugten Massenspektren wurden mithilfe dieses ConvNet automatisiert ausgewertet. Mit einer Genauigkeit von 99,75% konnte das Maschinelle Lernverfahren die Massenspektren richtig vorhersagen. Die Prüfung der Durchführbarkeit von Maschinellen Lernverfahren ist von enormer Wichtigkeit. In Absehbarer Zukunft wird Künstliche Intelligenz zur selbstverständlichen Hilfestellung in der Diagnostik von Bildern und Daten in der Medizin.

Diese Arbeit greift die Möglichkeiten der MALDI-TOF-basierten Analytik auf und zeigt ihren flexiblen Einsatz. Einzelne Laborbereiche können zukünftig thematisch sinnvoller gebündelt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in der Zielsetzung formulierten Fragen durchaus umsetzbar sind. So ist es möglicherweise zukünftig nicht mehr nötig Gelenkpunktate zwischen mehreren Laborbereichen aufzuteilen. Idealerweise wird ein Punktat in einem Arbeitsschritt für mehrere Analysen an einem Arbeitsplatz verarbeitet. Im Optimalfall wird ein zeitnahe Zwischenbefund oder Endbefund erstellt. Dieser kann dem Kliniker in Zusammenschau seiner restlichen Befunde behilflich sein zuverlässig zwischen Gelenkinfektion, Kontamination oder keiner Gelenkinfektion zu unterscheiden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Archibeck MJ, Rosenberg AG, Sheinkop MB, Berger RA, Jacobs JJ (2001): Gout-Induced Arthropathy After Total Knee Arthroplasty: A Report of Two Cases. *Clin Orthop Relat Res* 392, 377–382
- Azrad M, Keness Y, Nitzan O, Pastukh N, Tkhawkho L, Freidus V, Peretz A (2019): Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect Dis* 19,72
- Bader O (2013): MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 13, 788–799
- Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME (1989): Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* 84, 553–561
- Bedienungsanleitung Liqullizer (2017): Liqullizer MetaSystems Hard & Software GmbH, PDI-LIQIFUDE-2017-12-01-P
- Bingham J, Clarke H, Spangehl M, Schwartz A, Beauchamp C, Goldberg B (2014): The Alpha Defensin-1 Biomarker Assay can be Used to Evaluate the Potentially Infected Total Joint Arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 472, 4006–4009
- Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A (2003) Intraarticular release and accumulation of defensins and bactericidal/permeability-increasing protein in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30, 1719–1724
- Bonanzinga T, Zahar A, Dütsch M, Lausmann C, Kendoff D, Gehrke T (2017b): How Reliable Is the Alpha-defensin Immunoassay Test for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection? A Prospective Study. *Clin Orthop Relat Res* 475, 408–415
- Buchan BW, Riebe KM, Ledebner NA (2012): Comparison of the MALDI Biotyper System Using Sepsityper Specimen Processing to Routine Microbiological Methods for Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol* 50, 346–352
- Cats-Baril W, Gehrke T, Huff K, Kendoff D, Maltenfort M, Parvizi J (2013): International Consensus on Periprosthetic Joint Infection: Description of the Consensus Process. *Clin Orthop Relat Res* 471, 4065–4075
- Chen A, Fei J, Deirmegian C (2014): Diagnosis of Periprosthetic Infection: Novel Developments. *J Knee Surg* 27, 259–266
- Chollet F, Lorenzen K (Hrsg): *Deep Learning mit Python und Keras*. 1. Auflage; mitp Verlag; Frechen 2018
- Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M (2010): Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting. *J Clin Microbiol* 48, 1584–1591
- Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB (1996): The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14, 1584–1586
- Costerton JW (1999): Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284, 1318–1322
- De Vecchi E, Romanò CL, De Grandi R, Cappelletti L, Villa F, Drago L (2018): Alpha defensin, leukocyte esterase, C-reactive protein, and leukocyte count in synovial fluid for pre-operative diagnosis of periprosthetic infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* 32, 205873841880607
- Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J (2014): Diagnosing Periprosthetic Joint Infection: Has the Era of the Biomarker Arrived? *Clin Orthop Relat Res* 472, 3254–3262

- Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Booth RE, Parvizi J (2015): The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infection Outperforms the Leukocyte Esterase Test Strip. *Clin Orthop Relat Res* 473, 198–203
- Di Gaudio F, Indelicato Serena, Indelicato Sergio, Tricoli MR, Stampone G, Bongiorno D (2018): Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with Sepsityper kit. *J Microbiol Methods* 155, 1–7
- Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich K (2009): The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr Pharm Des* 15, 2377–2392
- Drago L, Clerici P, Morelli I, Ashok J, Benzakour T, Bozhkova S, Alizadeh C, del Sel H, Sharma HK, Peel T, et al. (2019): The World Association against Infection in Orthopaedics and Trauma (WAIOT) procedures for Microbiological Sampling and Processing for Periprosthetic Joint Infections (PJIs) and other Implant-Related Infections. *J Clin Med* 8, 933
- Du Clos TW, Mold C (2004): C-Reactive Protein: An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity. *Immunol Res* 30, 261–278
- Frangiamore SJ, Gajewski ND, Saleh A, Farias-Kovac M, Barsoum WK, Higuera CA (2016b):  $\alpha$ -Defensin Accuracy to Diagnose Periprosthetic Joint Infection—Best Available Test? *The J Arthroplasty* 31, 456–460
- Frédéric S, Antoine M, Bodson A, Lissoir B (2015): Bacterial rapid identification with matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: development of an 'in-house method' and comparison with Bruker Sepsityper<sup>®</sup> kit. *Acta Clin Belg* 70, 325–330
- Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI (2009): Defensins. *Eur J Haematol* 44, 1–8
- Gravius S, Randau TM, Casadonte R, Kriegsmann M, Friedrich MJ, Kriegsmann J (2015): Investigation of neutrophilic peptides in periprosthetic tissue by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight imaging mass spectrometry. *Int Orthop* 39, 559–567
- Haddad FS, Ngu A, Negus JJ, Drago L (Hrsg.): *A Modern Approach to Biofilm-Related Orthopaedic Implant Infections: Prosthetic Joint Infections and Cost Analysis?* Band 971; Springer International Publishing, Cham 2017, 93–100
- Harada D, Bise R, Tokunaga H, Ohyama W, Oka S, Fujimori T, Uchida S: Scribbles for Metric Learning in Histological Image Segmentation. In: 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC 2019. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., Berlin 2019, 1026–1030
- Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K (2018): Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clin Microbiol Inf* 24, 738–743
- Jones DE, Bevins CL (1993): Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Letters* 315, 187–192
- Jones DE, Bevins CL (1992): Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 267, 23216
- Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI (1994): Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* 87, 131–149
- Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F (1985): Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem* 57, 2935–2939
- Kasperek MF, Kasperek M, Boettner F, Faschingbauer M, Hahne J, Dominkus M (2016): Intraoperative Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection Using a Novel Alpha-Defensin Lateral Flow Assay. *J Arthroplasty* 31, 2871–2874
- Kermany DS, Goldbaum M, Cai W, Valentim CCS, Liang H, Baxter SL, McKeown A, Yang G, Wu X, Yan F, et al. (2018): Identifying Medical Diagnoses and Treatable Diseases by Image-Based Deep Learning. *Cell* 172, 1122–1131.e9

- Kim C, Gajendran N, Mittrucker H-W, Weiwad M, Song Y-H, Hurwitz R, Wilmanns M, Fischer G, Kaufmann SHE (2005): Human  $\alpha$ -defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 4830–4835
- Krishnamurthy T, Ross PL (1996): Rapid Identification of Bacteria by Direct Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Whole Cells. *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**, 1992–1996
- Lai Y, Gallo RL (2009): AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* **30**, 131–141
- Lallemand E, Arvieux C, Coiffier G, Polard J-L, Albert J-D, Guggenbuhl P, Jolivet-Gougeon A (2017): Use of MALDI-TOF mass spectrometry after liquid enrichment (BD Bactec™) for rapid diagnosis of bone and joint infections. *Res Microbiol* **168**, 122–129
- Lalli M: Herausforderungen in der Herstellung, Reinigung und Charakterisierung der humanen  $\alpha$ -Defensine 5 und 6. Chem. Diss. Stuttgart 2015
- Lay JO (2001): MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* **20**, 172–194
- Lehrer RI, Lu W (2012):  $\alpha$ -Defensins in human innate immunity:  $\alpha$ -Defensins. *Immunol Rev* **245**, 84–112
- Marson BA, Deshmukh SR, Grindlay DJC, Scammell BE (2018): Alpha-defensin and the Synovasure lateral flow device for the diagnosis of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J* **100-B**, 703–711
- Miyamae Y, George J, Klika AK, Barsoum WK, Higuera CA (2019): Diagnostic Accuracy of the Alpha-Defensin Test for Periprosthetic Joint Infection in Patients With Inflammatory Diseases. *J Arthroplasty* **34**, 1767–1771
- Ochsner PE, Borens O, Bodler PM, Broger I, Eich G, Hefti F, Maurer T, Nötzli H, Seiler S, Suvà D, Trampuz A, Uçkay I, Vogt M, Zimmerli W (Hrsg.): Infektionen des Bewegungsapparates. 2. Auflage; Eigenverlag swiss orthopaedics, Grandvaux 2016, 19-102
- Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, Garvin KL, Mont MA, Wongworawat MD, Zalavras CG (2011): New Definition for Periprosthetic Joint Infection: From the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res* **469**, 2992–2994
- Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, Shohat N (2018a): The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty* **33**, 1309-1314.e2
- Patel R (2015): MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem* **61**, 100–111
- Pazgier M, Wei G, Ericksen B, Jung G, Wu Z, de Leeuw E, Yuan W, Szmackinski H, Lu W-Y, Lubkowski J, et al. (2012): Sometimes It Takes Two to Tango: Sometimes it takes two to tango: contributions of dimerization to functions of human  $\alpha$ -defensin HNP1 peptide. *J Biol Chem* **287**, 8944–8953
- Peel TN, Cole NC, Dylla BL, Patel R (2015): Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry and diagnostic testing for prosthetic joint infection in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* **81**, 163–168
- Rashid T: Neuronale Netze selbst programmieren: Ein verständlicher Einstieg mit Python. 1. Auflage; O'Reilly, Heidelberg 2017
- Roblot V, Giret Y, Bou Antoun M, Morillot C, Chassin X, Cotten A, Zerbib J, Fournier L (2019): Artificial intelligence to diagnose meniscus tears on MRI. *Diagn Interv Imaging* **100**, 243–249
- Rosteius T, Jansen O, Fehmer T, Baecker H, Citak M, Schildhauer TA, Geßmann J (2018): Evaluating the microbial pattern of periprosthetic joint infections of the hip and knee. *J Med Microbiol* **67**, 1608–1613

- Sakamoto N, Ishimoto H, Kakugawa T, Satoh M, Hasegawa T, Tanaka S, Hara A, Nakashima S, Yura H, Miyamura T, et al. (2018): Elevated  $\alpha$ -defensin levels in plasma and bronchoalveolar lavage fluid from patients with myositis-associated interstitial lung disease. *BMC Pulm Med* 18, 44
- Schroeder BO, Ehmann D, Precht JC, Castillo PA, K uchler R, Berger J, Schaller M, Stange EF, Wehkamp J (2015): Paneth cell  $\alpha$ -defensin 6 (HD-6) is an antimicrobial peptide. *Mucosal Immunol* 8, 661–671
- Schubert S, Wieser A, Bonkat G (2017): Neue mikrobiologische Techniken. *Urologe* 56, 711–719
- Schwaiger R, Steinwender J (Hrsg.): Neuronale Netze programmieren mit Python. 1.Auflage; Rheinwerk Verlag, Bonn 2019
- Scohy A, No el A, Boeras A, Brassinne L, Laurent T, Rodriguez-Villalobos H, Verroken A (2018a): Evaluation of the Bruker® MBT Sepsityper IVD module for the identification of polymicrobial blood cultures with MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37, 2145–2152
- Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI (1985): Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 76, 1436–1439
- Spitznagel JK (1990): Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest* 86, 1381–1386
- Springer BD (2015): The Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty* 30, 908–911
- Suarez S, Ferroni A, Lotz A, Jolley KA, Guérin P, Leto J, Dauphin B, Jamet A, Maiden MCJ, Nassif X, Armengaud J (2013): Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J Microbiol Methods* 94, 390–396
- Tadros M, Petrich A (2013): Evaluation of MALDI-TOF Mass Spectrometry and Sepsityper Kit™ for the Direct Identification of Organisms from Sterile Body Fluids in a Canadian Pediatric Hospital. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 24, 191–194
- Teramoto K, Sato H, Sun L, Torimura M, Tao H (2007): A Simple Intact Protein Analysis by MALDI-MS for Characterization of Ribosomal Proteins of Two Genome-Sequenced Lactic Acid Bacteria and Verification of Their Amino Acid Sequences. *J Proteome Res* 6, 3899–3907
- Tran A, Alby K, Kerr A, Jones M, Gilligan PH (2015): Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 53, 2473–2479
- Yoon EJ, Lee EH, Hwang DH, Lee H, Baek JH, Jeong SH (2020): Direct detection of intact *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases produced by Enterobacterales using MALDI-TOF MS. *J Antimicrob Chemother* 75, 1174–1181
- Zahia S, Garcia Zapirain MB, Sevillano X, González A, Kim PJ, Elmaghraby A (2020): Pressure injury image analysis with machine learning techniques: A systematic review on previous and possible future methods. *Artif Intell Med* 102, 101742
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE (2004): Prosthetic-Joint Infections. *N Engl J Med* 351, 1645–1654
- Zmistowski B, Karam JA, Durinka JB, Casper DS, Parvizi J (2013): Periprosthetic Joint Infection Increases the Risk of One-Year Mortality. *J Bone Joint Surg Am* 95, 2177–2184

**Internetquellen**

Anaconda. <https://www.anaconda.com/>; abgerufen am 20.08.2019

Biosoft Project. <http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC>; abgerufen am 22.10.2019

Excel Templates. <https://www.vertex42.com/ExcelTemplates/box-whisker-plot.html>; abgerufen am 29. 10.2019

Project Jupyter. <https://www.jupyter.org>; abgerufen am 20.08.2019

**Literaturverwaltungsprogramme**

Zotero Version 5.0.98

---

## Lebenslauf

---

## Danksagung

Abschließend möchte ich einige dankende Worte an alle Menschen widmen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeiten beigetragen haben.

Großen Dank richte ich hiermit an meine Betreuer Herrn Dr. Oliver Bader und Frau Dr. Christine Noll, sowie Prof. Dr. Uwe Groß, die mir stets mit all ihrer langjährigen Expertise zur Seite gestanden haben. Ich bedanke mich für all die Freiheiten, die mir im Rahmen dieser Arbeit gegeben wurden. Jederzeit konnte ich mich mit eigenen Ideen einbringen, Vieles ausprobieren und umsetzen. Ich möchte mich für die Geduld und die Erfahrung bedanken, die in das Projekt eingeflossen sind.

Auch möchte ich mich bei einigen Mitarbeitern bedanken, die durch fachlichen Austausch und anderweitige Hilfe diese Arbeit unterstützt haben. Vor allem bedanke ich mich bei Pia Sternisek für ihre geduldige Einarbeitung und großartige Hilfe. Vielen Dank für die zahlreichen Tipps während dieser Zeit. Mein Dank richtet sich weiterhin an Sabine Ceramella für ihre großartige Unterstützung bei der Durchführung des Projekts.

Weiterhin möchte ich großen Dank aussprechen an: Yvonne Laukat, Agnieska Goretzki, Angela Aurin-Gerke, Ruth Rosenhagen, Maik Tomm.