

Aus der Klinik für Anästhesiologie
(Prof. Dr. med. M. Quintel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Detektion von humanpathogenen Bakterien mittels
Ionenmobilitätsspektrometrie im Headspace von
Bakterienkolonien**

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

vorgelegt von

Lena Kristina Hofmann

aus

Gießen

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Priv. Doz. Dr. med. T. Perl

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. M. Weig

Datum der mündlichen Prüfung: 25.09.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Detektion von humanpathogenen Bakterien mittels Ionenmobilitätsspektrometrie im Headspace von Bakterienkolonien“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Köln, den

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

1	Einleitung	1
1.1	<i>Allgemeine Problematik</i>	1
1.2	<i>Fragestellung.....</i>	4
1.3	<i>Theoretischer Hintergrund.....</i>	4
1.3.1	Allgemeiner Hintergrund	4
1.3.2	Erregerdiagnostik	7
1.3.3	Methoden zur Analyse von volatilen Metaboliten.....	15
1.3.3.1	Elektronische Nase (<i>e-nose</i>).....	15
1.3.3.2	Gaschromatographie-Massenspektrometer (GC-MS).....	18
1.3.3.3	Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS).....	18
1.3.3.4	Ionenmobilitätsspektrometrie	19
1.3.4	Volatile Metabolite von drei auserwählten humanpathogenen Mikroorganismen	19
1.3.4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
1.3.4.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
1.3.4.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
1.4	<i>Grundlagen der Ionenmobilitätsspektrometrie</i>	26
1.5	<i>Ionisationsmethoden.....</i>	27
1.6	<i>Ionenmobilität in Gasen</i>	29
1.7	<i>Kopplung der Ionenmobilitätsspektrometrie mit gaschromatographischen Techniken.....</i>	31
2	Material und Methoden	33
2.1	<i>Mikroorganismen und Materialien</i>	33
2.1.1	Mikroorganismen.....	33

2.1.2	Materialien	33
2.2	<i>Probenvorbereitung und Rehydrierung der gefriergetrockneten Kultur und Kultivierung des Blutagars</i>	34
2.3	<i>Verwendetes Ionenmobilitätsspektrometer und Headspace</i>	34
2.4	<i>Experimenteller Versuchsablauf</i>	37
2.4.1	MCC-IMS.....	37
2.4.2	Thermodesorption Gaschromatograph-Massenspektrometer (TD-GC-MS)	39
2.5	<i>Datenerfassung und Verarbeitung</i>	40
2.5.1	Visualisierung	40
2.5.2	Normierungsprozesse.....	41
2.5.3	MCC-IMS-Datenanalyse	42
2.5.4	TD-GC-MS-Datenanalyse.....	42
3	Ergebnisse	43
3.1	<i>Bestimmung der volatilen Metabolite von S. aureus, S. pneumoniae und P. aeruginosa mittels MCC-IMS</i>	43
3.2	<i>Vergleich der volatilen Ergebnisse der MCC-IMS-Analysen von P. aeruginosa, S. aureus, S. pneumoniae und des Columbia-Schafblutagar</i>	48
3.3	<i>Vorkommen von unspezifischen Volatilen im MCC-IMS</i>	48
3.4	<i>TD-GC-MS-Analyse der VOCs von P. aeruginosa, S. aureus und S. pneumoniae</i>	48
4	Diskussion	51
4.1	<i>Differenzierung und Identifizierung der Mikroorganismen anhand ihrer volatilen Metabolite mittels MCC-IMS</i>	52
4.1.1	Unspezifische Volatile der Keime	52
4.1.2	Keimidentifizierung anhand der emittierten VOCs	53
4.2	<i>Die Bedeutung von Driftzeit und Retentionszeit</i>	53
4.3	<i>Vorkommen von Dimeren</i>	54

4.4	<i>Das MCC-Ionenmobilitätsspektrometer und das Gaschromatograph-Massenspektrometer im Vergleich</i>	54
4.4.1	Technische Unterschiede zwischen MCC-IMS und TD-GC-MS	54
4.4.2	Analyse mittels GC-MS	56
4.5	<i>Limitationen</i>	56
4.5.1	Technische Limitationen	56
4.5.1.1	Konstante Volumina der Bakterienprobe und des Gasflusses	57
4.5.1.2	Einfluss der Temperatur	57
4.5.2	Nährmedium	57
4.5.3	Der Einfluss von Wachstumsphasen auf die Synthese von volatilen Substanzen	58
4.5.4	Herkunft der Bakterienproben	59
4.5.5	Antibiotikaresistenzen und bestehende Antibiotikatherapie	60
4.6	<i>Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien</i>	61
4.7	<i>Ausblick</i>	61
5	Zusammenfassung	62
6	Abbildungsverzeichnis	64
7	Tabellenverzeichnis	65
8	Literaturverzeichnis	66

Abkürzungsverzeichnis

2-AA	Aminoacetophenon
2-PF	2-Pentylfuran
³ H	Tritium
⁶³ Ni	Nickel-Isotop
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADT	<i>air dissolving tube</i>
AH+	Analytion
AHC-GC	automatisierte Headspace-Konzentration Gaschromatographie
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
CPIS	<i>clinical pulmonary infection score</i>
DMDS	Dimethyldisulfid
DMS	Dimethylsulfid
DMTS	Dimethyltrisulfid
DSM	Leibniz-Institut DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E _d	Driftstrecke
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>

e-nose	elektronische Nase
E-Test	Epsilontest
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
eV	Elektronenvolt
FPEC-GLC	<i>frequency-pulse-modulated</i> <i>electron capture gas liquid chromatography</i>
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometer
GLC	Gasflüssigkeitschromatographie
H ⁺	Wasserstoff
H. influenzae	Haemophilus influenzae
H ₂ O	Wasser
HCN	Blausäure
hPa	Hektopascal
ICU	<i>intensive care unit</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMS	Ionenmobilitätsspektrometer
K	Proportionalitätskoeffizient
kDa	Kilodalton
K ₀	reduzierte Ionenmobilität

keV	Kiloelektronenvolt
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MBq	Megabecquerel
MCC	<i>multi-capillary-column</i> ; Multikapillarsäule
MS	Massenspektrometer
N ₂	Stickstoff
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid- Phosphat
NH ₄ ⁺	Ammonium
NO ⁺	Stickstoffmonoxid
NIST	National Institute of Standards and Technology
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PCR	Polymerasenkettenreaktion
ppb	<i>parts per billion</i> ; 1 Milliardstel
ppt	<i>parts per trillion</i> ; 1 Billionstel
RIP	Reaktionsionenpeak
RNA	Ribonukleinsäure

S	Svedberg-Einheit
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
SIFT- MS	<i>selected ion flow tube mass spectrometry</i>
SPME	<i>solid phase microextraction</i>
TD-GC-MS	Thermodesorption-Gaschromatograph- Massenspektrometer
TOF	<i>time of flight</i>
VAP	Ventilator-assoziierte Pneumonie
v_d	Driftgeschwindigkeit
VOC	<i>volatile organic compound</i>

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Problematik

Jedes Lebewesen hat das Bestreben nach Fortpflanzung und Wachstum. Dabei steht es mit seiner Umwelt ständig im Austausch von Energie und Stoffen. Um Substanzen aufnehmen, verarbeiten und ausscheiden zu können, benötigen alle Lebewesen vom einfachen, einzelligen Bakterium bis zum mehrzelligen Menschen Energiesubstrate in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Dieses ist notwendig, um Körperfunktionen aufrechtzuerhalten, wie z. B. Muskelarbeit oder die Synthese bzw. der Abbau von Proteinen.

Zahlreiche Stoffwechselwege befinden sich in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Der Metabolismus ist ein offenes System, das sich in einem ständigen Gleichgewicht von Aufbau (Anabolismus) und Abbau (Katabolismus) von Substanzen befindet, um das Überleben und die Weiterentwicklung des Lebewesens zu sichern.

Zwischen den verschiedenen Spezies existieren einige gemeinsame Stoffwechselwege, z. B. die Glykolyse, die in jedem lebenden Organismus, wenn auch etwas abgewandelt, aufzufinden sind. Auf der anderen Seite gibt es bestimmte Metabolismen, beispielsweise die Ethanolgärung, die nur bei einigen Spezies zu finden sind. Aus diesem Grund produzieren die verschiedenen Mikroorganismen unterschiedliche Endprodukte. Der aerobe Stoffwechsel zeigt häufig ähnliche oder identische Wege, so dass bei den aeroben Lebewesen eine Differenzierung anhand der gebildeten Metabolite erschwert sein könnte. Im Gegensatz dazu gibt es bei der anoxischen Energiegewinnung eine größere Vielfalt an Metabolismen, die zu einem größeren Spektrum an Metaboliten führt.

Endprodukte des Stoffwechsels können als *volatile (volatile organic compound; VOC)* und als nichtvolatile Metabolite freigesetzt werden.

Volatile Metabolite sind flüchtig und können daher, im Gegensatz zu nichtvolatilen Metaboliten, in der Umgebungsluft (im Headspace) nachgewiesen werden.

Diese Eigenschaft der Organismen habe ich in meiner Arbeit genutzt, um humanpathogene Keime anhand ihrer volatilen Metabolite zu identifizieren und zu differenzieren.

In den 80er Jahren haben Zechman und Labows pathogene Bakterien aus klinischen Proben anhand ihrer Volatile detektiert und klassifiziert.

Studien zeigen, dass volatile Metabolite ebenfalls zur Detektion von Schimmel in Gebäuden (Miller et al. 1988) und in gelagerten Getreide (Börjesson et al. 1992) geeignet sind.

Die Keimidentifikation mit Hilfe der individuellen VOCs wäre schneller möglich als der Nachweis der Mikroorganismen durch Anzucht auf selektiven Nährböden.

Durch die Wartezeit auf den mikrobiellen Befund mit dem entsprechenden Antibiogramm verzögert sich eine adäquate und gezielte antibiotische Behandlung um 3-4 Tage. Diese Verzögerung kann für den häufig schwerkranken Patienten fatal sein. Eine klinische Verschlechterung ist in vielen Fällen möglich.

Dickinson und Kollef 2011 konnten belegen, dass eine verzögerte antibiotische Therapie von 6 Stunden die Mortalität dramatisch steigen lässt. Der Einsatz nichtwirksamer Antibiotika bei nosokomialen Pneumonien führt zum Therapieversagen und zum Anstieg des Mortalitätsrisikos um den Faktor 6 (Torres et al. 1990). Studien zeigen, dass sich bei Patienten im septischen Schock, durch eine initial ungeeignete antimikrobielle Therapie, die Überlebensrate um das 5-Fache reduziert werden kann (52% zu 10,3%) (Kumar et al. 2009).

Alvarez-Lerma (1996) sah, dass im Verlauf bei 43% der ICU-Patienten die initiale Antibiotikatherapie umgestellt wurde. In 62% der Fälle wurde die antimikrobielle Therapie nach Erhalt des Antibiotogramms angepasst. In einer anderen Studie waren es 38% der Fälle (Rello et al. 1997). Es ergab sich eine Assoziation mit dem signifikanten Anstieg der Mortalität im Vergleich zu einer von Beginn an adäquaten Antibiotikatherapie (37% zu 15,4%). Durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* bedingte Bakteriämien zeigten eine steigende 30-Tage-Mortalität, wenn mehr als zwei Tage zwischen der Abnahme der Blutkultur und der Gabe eines adäquaten Antibiotikums vergangen waren (Lodise et al. 2003 und Lodise et al. 2007). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit einer primär sensitiven antibiotischen Therapie.

Leider wird die Resistenzrate der Mikroorganismen durch häufiges Einsetzen von empirischen Breitspektrumantibiotika und Kreuzübertragungen von resistenten Keimen von Patient zu Patient erhöht (Chastre 2008). Die Folge ist die Limitierung der verfügbaren effizienten Antibiotika. Zusätzlich sind vorausgegangene Antibiotikatherapien, verlängerte Krankenhausaufenthalte, lange invasive Beatmungsdauer und invasives Monitoring/ Verweilkatheter mit einer höheren Resistenzrate assoziiert (Kollef 2000). Das Hinzuziehen von Infektiologen, die Anwendung von Kombinationspräparaten bei empirischer, antimikrobieller Therapie und das schnellstmögliche Umsetzen auf ein Schmalspektrumantibiotikum nach Mitteilung des Antibiogramms sind einige Möglichkeiten zur Minimierung der Resistenzentwicklung (Kollef 2000). Ein wichtiger Schritt ist die Entwicklung schnellerer Diagnosetechniken der Keimidentifizierung, um eine Reduktion der Resistenzentwicklung und der Mortalität zu erreichen (Kollef 2000). Ebenfalls könnte die Hospitalisierungsdauer verkürzt werden, wodurch die Krankenhauskosten gesenkt werden würden.

Viele Studienergebnisse sowie die klinische Erfahrung zeigen, dass eine schnelle und zuverlässige Identifizierung des verursachenden Keims sowohl für den Genesungsprozess als auch für das Überleben der Patienten bedeutsam ist.

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts fanden die ersten Untersuchungen im Bereich der Ionenmobilitätsspektrometrie statt. Es folgten stetig weitere Forschungen u. a. durch Thompsen und Rutherford. Langevin bewies Anfang des 20. Jahrhunderts, dass ionisierte Luft aus einem Gemisch von multiplen chemischen Stoffen besteht.

Die Ionenmobilitätsspektrometrie stellt ein hochempfindliches Nachweissystem volatiler Substanzen dar, die eine Detektion im ppm/ppt-Bereich ermöglicht.

Ionen, welche unter Normaldruck erzeugt werden, bewegen sich in einem elektrischen Feld in Richtung eines entgegenkommenden Gasstroms fort. Die Ionen werden nach Masse, Größe und Ladung getrennt und treffen mit unterschiedlicher Driftzeit auf der Detektionsplatte ein.

Die Ionenmobilitätsspektrometrie wird in vielen Bereichen verwendet. Neben der Gasanalytik erlangte das Verfahren insbesondere im militärischen Gebiet seinen Einsatz zur Erkennung von Sprengstoffen, chemischen Kampfstoffen und Drogen (Eiceman und Karpas 2005, Baumbach und Eimann 1999). Die Lebensmittelindustrie

nutzt das Verfahren experimentell, um mit Bakterien und Schimmelpilzen kontaminierte Lebensmittel zu erkennen. Aufgrund dessen kann die Qualität der Lebensmittel gesichert werden (Raatikainen et al. 2005; Vautz et al. 2006a). Die Ionenmobilitätsspektrometrie wird ebenfalls in der Herstellung von Bier genutzt (Vautz et al. 2006b).

Weitere Einsatzgebiete sind in der Humanmedizin beschrieben. Die Identifizierung einer bakteriellen Vaginose haben Chaim et al. (2003) untersucht. Durch die Analyse von Atemluft kann eine gestörte Organfunktion erkannt werden. Beispielsweise können bei einer Funktionseinschränkung der Leber vermehrt schwefelhaltige Verbindungen beobachtet werden (Buszewski et al. 2007). Ebenfalls ist das Erkennen von Lungenkrebs möglich (Sponring et al. 2009). Zum Drug-Monitoring wurde u. a. Propofol unter total-intravenöser Anästhesie in der Expirationsluft untersucht (Carsten 2010).

1.2 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung der Möglichkeit einer Identifizierung und Differenzierung von humanpathogenen Bakterien unter Laborbedingungen mittels Multikapillarsäulen-Ionenmobilitätsspektrometrie im Headspace von Bakterienkulturen anhand ihres volatilen Metabolitenmusters.

Die MCC-IMS-Analytik wird durch eine GC-MS-Analytik mit Thermodesorptions-Röhrchen erweitert, um weitere Produkte des bakteriellen Stoffwechsels zu identifizieren und ggf. unbekannte Signale aus der MCC-IMS-Analytik mittels GC-MS-Identifikation zu benennen.

1.3 Theoretischer Hintergrund

1.3.1 Allgemeiner Hintergrund

Bei der Betrachtung der menschlichen und mikrobiellen Stoffwechselwege wird die gemeinsame Phylogenese deutlich. Mit dem Begriff Stoffwechsel sind ablaufende chemische Prozesse wie Katabolismus, Anabolismus sowie Erhalt der Struktur in einem Organismus gemeint (Petrides 1998; Campbell et al. 2009). Die zentralen Stoffwechselwege laufen zum Teil identisch ab, wohingegen in der Stoffwechselregulation ein starker Unterschied besteht (Fuchs 2007). Dies lässt sich

u. a. aus der Tatsache erklären, dass der Mensch im Vergleich zu den einzelligen Bakterien aus Billionen Zellen besteht.

Humanmedizinisch bedeutende Bakterien betreiben einen chemotrophen Stoffwechsel, das heißt, die freigesetzte Energie aus den chemischen Reaktionen wird ausschließlich aus organischen (z. B. Zucker, Aminosäuren, Fette) oder zusätzlich aus anorganischen Substanzen gewonnen (Fuchs 2007). Ebenfalls existieren Bakterien, die nur aus anorganischen Quellen (z. B. NH_3 , H_2) ihre Nährstoffe beziehen (Fuchs 2007).

Im Intermediärstoffwechsel werden die Nährstoffe (Lipide, Proteine und Kohlenhydrate) verarbeitet (Katabolismus), dabei wird Energie in Form von ATP frei, und aus den entstandenen Verbindungen können neue Zellbestandteile (Anabolismus) synthetisiert werden (Löffler 1998; Fuchs 2007). In diesem Prozess fallen unterschiedliche Intermediate (Zwischenprodukte) bzw. Metabolite an. Metabolite sind durch Enzymreaktionen veränderte oder entstandene Verbindungen im Stoffwechsel (Pschyrembel 2001).

Die notwendige Energie kann über die Zellatmung oder über die Gärung gewonnen werden. Die Zellatmung lässt sich in eine anaerobe und eine aerobe Atmung einteilen. Steht Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung, wird von aerober Atmung gesprochen. Dabei werden Substrate mit Hilfe von Sauerstoff verbrannt bzw. oxidiert. Dienen andere Substanzen (u. a. Nitrat und Sulfat) als terminale Elektronenakzeptoren, spricht man von anaerober Atmung (Fuchs 2007). Bei der Zellatmung entstehen Elektronen, die in darauffolgenden Redoxreaktionen auf ein anderes Molekül übertragen werden und so die nötige Energie in Form von ATP liefern (Löffler 1998; Rassow et al. 2006).

Stehen den Mikroorganismen weder Sauerstoff noch andere Elektronenakzeptoren für die aerobe bzw. anaerobe Atmung zur Verfügung, können einige Keime die sogenannte Gärung als Energiegewinnung nutzen (Heider 2007). Dabei werden die Substrate zu Gärprodukten (u. a. Milchsäure, Ethanol, n-Butanol) reduziert und ausgeschieden (Heider 2007). Es gibt verschiedene Formen der Gärung wie z. B. die Milchsäuregärung oder die ethanolische Gärung (Heider 2007). Im Vergleich zur

Zellatmung, findet man bei der Gärung keine Elektronentransportkette (Campbell et al. 2009).

Sowohl Prokaryonten, zelluläre Lebewesen ohne Zellkern, als auch Eukaryonten, zelluläre Lebewesen mit Zellkern, sind je nach Verfügbarkeit von Sauerstoff befähigt, sowohl Gärung als auch Zellatmung zu betreiben (Campbell et al. 2009). Die Übergänge gehen fließend ineinander über (Heider 2007).

Bei Prokaryonten erfolgt eine weitere Einteilung in fakultativ aerob bzw. anaerob und obligat aerob bzw. anaerob (Campbell et al. 2009).

Ist ein Bakterium ausschließlich unter anoxischen Bedingungen lebensfähig, spricht man von obligaten Anaerobiern. Sie gewinnen ihre Energie entweder über eine Form der Gärung oder über anaerobe Atmung (Fuchs 2007). Fakultativ anaerobe Mikroorganismen sind sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen überlebensfähig.

Aerotolerante Keime können in Gegenwart von Sauerstoff überleben, können ihn allerdings nicht verwerten.

Der eingeschlagene Stoffwechselweg ist von den verfügbaren Elektronenakzeptoren und somit von der vorherrschenden Umweltsituation und der genetischen Enzymausstattung der Organismen abhängig (Campbell et al. 2009, Fuchs 2007). Aufgrund der effizienteren Energieausbeute ist der aerobe Stoffwechselweg der präferierte Weg (Fuchs 2007). Liegt eine anoxische Situation vor, wird der anaerobe Stoffwechselweg der Gärung vorgezogen (Heider 2007).

Die meisten Stoffwechselreaktionen in den Organismen laufen langsam ab. Daher besitzt das Erbgut aller Lebewesen Enzyme. Das sind Proteine, die chemische Reaktionen katalysieren, indem sie die Aktivierungsenergie herabsetzen, ohne die Gleichgewichtslage zu verändern (Fuchs 2007). Dadurch wird die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 10^8 - 10^{20} (Löffler 1998) gesteigert. Die verschiedenen Spezies haben eine unterschiedliche Enzymausstattung, die evolutionär an die umliegende Situation angepasst ist.

Enzyme haben die Eigenschaft, dass sie nur ganz bestimmte Substrate umsetzen (Substratspezifität) und nur eine oder wenige Reaktionen katalysieren können

(Reaktionsspezifität). Diese Eigenschaften sind Voraussetzungen für die Regulation des Zellstoffwechsels (Fuchs 2007).

Die Enzymsynthese ist zum einen selbst von der Genausstattung, zum anderen vom vorherrschenden Enzymbedarf abhängig (Petrides 1998). Ebenfalls tragen Inhibitoren und Aktivatoren zur Regulation der Enzyme bei (Campbell et al. 2009).

Bei der Umsetzung von Substanzen entsteht ein Fließgleichgewicht. Die neu entstandenen Reaktionsprodukte können in einer nachfolgenden Reaktion weiter verstoffwechselt werden. Die Richtung und die Geschwindigkeit der verschiedenen Stoffwechselwege passen sich an die vorherrschenden Umweltbedingungen an (Campbell et al. 2009).

Die Bildung von bestimmten Metaboliten ist zum einen vom Vorhandensein des spezifischen Enzyms und zum anderen von der Enzymaktivität abhängig. Die entstandenen Endprodukte werden in die Umgebung ausgeschieden

1.3.2 Erregerdiagnostik

Die Erregerdiagnostik kann auf verschiedene Weise erfolgen. In der Abbildung 1 ist ein Überblick über verschiedene Methoden der Erregerdiagnostik aufgeführt. Eine gängige Methode ist die kulturelle Anzuchtung des Keims auf einen Nährboden. Als Material dienen u. a. Blut, Sputum, Urin, Wundsekret, Stuhl oder Liquor. Die Nährmedien müssen Grundstoffe und andere Bestandteile enthalten, um das Wachstum der Erreger zu gewährleisten. Aus diesem Grund gibt es Universalmedien, die ein Wachstum der meisten humanpathogenen Erreger ermöglichen. Bestimmte Keime können lediglich auf Spezialnährböden optimal kultiviert werden, z. B. *Haemophilus influenzae* auf einem Kochblutagar. Selektivnährböden können das Wachstum bestimmter Keime fördern bzw. hemmen.

Nach Inkubation der beimpften Agarplatten, erfolgt eine makroskopische Begutachtung und bestenfalls Identifizierung der wachsenden Keime. Je nach Befund erfolgt eine sich anschließende biochemische Bestätigung, beispielsweise ein Oxidase-Test (Madigan et al. 2013) oder die Keimidentifizierung mit Hilfe eines Maldi-TOF.

Das Maldi-TOF ermöglicht eine schnelle Identifizierung. Allerdings kann es möglich sein, dass z. B. aufgrund von Spezies mit massenspektrometrischen Ähnlichkeiten,

keine Identifizierung möglich ist. In diesen Fällen könnte die PCR zur weiteren Diagnostik herangezogen werden.

In den letzten Jahren hat sich die molekulare Diagnostik um die MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*; Matrix unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) etabliert. Vorteile bei dieser Methode sind eine schnelle Analysezeit, eine Automatisierung mit einfacher Bedienung sowie eine hohe Empfindlich- und Genauigkeit (Schubert und Wieser 2010). Die Analyten werden zusammen mit einer Matrix-Lösung, meist ein Benzooesäurederivat, auf eine Targetplatte aufgebracht. Im Hochvakuum des MALDI-TOF-Massenspektrometers wird die Matrix mit der Probe durch einen Laserstrahl verdampft. Dabei werden die Proteine der Erregerproben ionisiert. Im Anschluss daran werden die Analytmoleküle in einem elektrischen Feld beschleunigt. Diese Flugzeit kann im Vakuum unter dem Einfluss von Masse und Ionisierungsgrad der Proteine ermittelt werden. Die meisten Analyte sind ribosomale Eiweiße. Bakterien- und Pilzspezies haben ein charakteristisches Spektrum an Proteinen, welches man als „molekularen Fingerabdruck“ bezeichnen kann (Schubert und Wieser 2010). Anhand der individuellen „Abdrücke“, können mit der im System integrierten Referenzdatenbank die Erreger benannt werden. Ein erzeugter Zahlenwert (*Score*) gibt Auskunft über die Validität der Ergebnisse. Insbesondere Proteine zwischen 2-12 kDa zeigen ein sehr stabiles und aussagekräftiges Spektrum (Schubert und Wieser 2010). Vom Auftragen der Keime auf die Targetplatte bis zur Differenzierung vergehen weniger als fünf Minuten (Schubert und Wieser 2010). Ein weiterer Vorteil ist neben dem Faktor Zeit, dass lediglich ein Gerät für die Bestimmung notwendig ist. Im besten Fall kann 12-24 Stunden nach Materialeingang im Labor den Klinikern ein Vorbefund vorliegen.

Ein Nachteil des MALDI-TOF-MS ist, dass eine direkte Bestimmung aus dem Patientenmaterial häufig unmöglich ist, denn beim Vorliegen von mehreren Erregern kann es zu Überlagerungen von Spektren kommen. Ebenfalls können körpereigene Proteine weitere Spektren erzeugen (Schubert und Wieser 2010). Auch die Erstellung eines Antibiogramms ist mit der MALDI-TOF-MS bisher nicht möglich.

Im Vergleich zu biochemischen Testverfahren ist die Massenspektrometrie weniger empfindlich gegenüber Verlusten oder Zugewinnen von Stoffwechseleigenschaften der Mikroorganismen (Schubert und Wieser 2010).

Christner et al. (2010) analysierten aus positiven Blutkulturen direkt den Erreger mittels MALDI-TOF-MS. In 277 Proben wuchsen Bakterienisolate. In 95% der Fälle wurden die Spezies, Anaerobier und Aerobier, identifiziert. Als Referenz wurden die Ergebnisse von herkömmlichen, mikrobiellen Methoden genutzt. Ein Vergleich mit den bereits analysierten „Fingerabdrücken“, erbrachte eine Identifizierungsrate von 87%. Diskrepanzen traten u. a. durch ungenügende Bakterienzahlen auf. Ebenfalls kam es verstärkt bei grampositiven Keimen zu Abweichungen. Bei positiver Blutkultur war eine Identifizierung des Erregers nach ca. 100 Minuten möglich. Die zügige Keimbestimmung ist ein großer Vorteil in der Therapie von septischen Patienten.

Barbuddhe et al. (2008) untersuchten 146 Stämme von verschiedenen Listerien-Spezies, Listerien-Serotypen und Listerien aus klinischen Isolaten. Die MALDI-TOF-Methodik wurde mit den Ergebnissen der Puls-Feld-Gelelektrophorese verglichen. Die Profilspektren beinhalteten eine Reihe von Signalintensitäten, hauptsächlich durch ribosomale Proteine erzeugt, die einem charakteristischen Fingerabdruck glichen. Es wurde gezeigt, dass eine schnelle Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-TOF möglich ist. Die Massenspektren der Listerien-Isolate zeigten charakteristische Peaks. Somit konnten die Isolate von *Listeria monocytogenes* bis zur Ebene der klonalen Abstammung abgegrenzt werden. Verschiedene Labore und MALDI-TOF-Systeme zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Qualität der Spektren und auf die Identifizierung der Erreger (Barbuddhe et al. 2008).

Ebenfalls wurden klinisch isolierte Hefen und Hefe ähnliche Pilze mittels MALDI-TOF-MS und mit herkömmlichen Phänotypisierungen und biochemischen Methoden untersucht und identifiziert. Die beiden Methoden wurden auf Schnelligkeit und Reliabilität verglichen (Marklein et al. 2009). Alle 267 Isolate konnten, teils nach Komplementierung der Referenzdatenbank, benannt werden. Es bestätigte sich, dass die MALDI-TOF-MS schnell, zuverlässig und mit einem geringen Arbeitsaufwand zu erledigen ist. Auch hier erwies sich die Interpretation der Ergebnisse als einfach. Die Investition ist durch geringe Kosten für Erhaltung und Nutzung lohnenswert (Marklein et al. 2009).

Das MALDI-TOF-MS ist in den herkömmlichen Laboren routinemäßig in der Erregerdiagnostik etabliert.

Zur Anfertigung eines Antibiogramms gilt das Vitek®2 (Fa. bioMérieux) als automatischer Goldstandard. In spezielle Karten sind Antibiotika eingeführt. Je nach Vorliegen von Resistenzen können über resultierende Wachstumskurven die Antibiotika-Empfindlichkeiten durch das Gerät bestimmt werden. Das Vitek®2 ist auch befähigt, Keime zu identifizieren, ähnlich dem Prinzip der „Bunten Reihe“. Allerdings benötigt das Vitek®2 zur Identifizierung deutlich länger (ca. 5-8 Stunden), und es können zeitgleich weniger Proben analysiert werden als beim Mald-TOF-Verfahren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die o. g. automatisierten Verfahren eine Identifizierung und Resistenzbestimmung im besten Fall nach 48 Stunden vorliegen. Die durchschnittliche Befundlaufzeit beträgt jedoch um die 72 Stunden.

Eine andere Methodik der Resistenzbestimmung gelangt durch manuelle Tests. Beim Agardiffusionstest z. B. werden mit einem Bakterienstamm kultivierten Nährboden Filterpapierblättchen aufgelegt. Diese sind mit einer bestimmten Menge eines Antibiotikums durchtränkt. Entstehen um die Blättchen sogenannte Hemmhöfe, wird ab einem bestimmten Hemmhof-Durchmesser von einer Antibiotikasensibilität ausgegangen (Groß 2013). Eine Variante des Agardiffusionstests ist der sogenannte Epsilometer Test (E-Test; AB BIODISK, Solna, Schweden). Bei diesem beinhaltet ein Plastikstreifen das entsprechende Antibiotikum mit dem standardisierten Konzentrationsgradienten. Dieser wird für eine bestimmte Zeit auf eine beimpfte Agarplatte aufgebracht. Im Anschluss kann entlang des Streifens eine elliptische Hemmzone abgelesen werden (Madigan et al. 2013).

Mit dem Agardiffusionstest und dem E-Test kann die minimale Hemmkonzentration abgelesen werden. Diese gibt die niedrigste antibiotische Konzentration an, unter der kein sichtbares Bakterienwachstum auftritt (Groß 2013). Der Vorteil der manuellen Resistenzbestimmung sind die geringen Kosten sowie ein schnelles Ergebnis bei erhöhtem Arbeitsaufwand insbesondere bei einer großen Probenanzahl.

Die ermittelten Werte der Resistenzbestimmung werden in Deutschland nach EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), dem europäischen Standard, interpretiert (Groß 2013).

Zu falsch-positiven Befunden kann es u. a. durch Kontamination während der Probenentnahme oder während der Kulturbeimpfung im Labor kommen. Die Befundung von pathogenen Erregern aus unsterilen Proben z. B. Spontanurin, Sputum oder Rachenabstrich muss im gesamten klinischen Kontext betrachtet werden. Sowohl das klinische Patientenbild als auch die Infektparameter sollten zur Therapieentscheidung mit einbezogen werden.

Die Bakterienkultur liefert frühestens nach 18 Stunden ein Ergebnis (Mims et al. 2006). Bei sehr langsam wachsenden Mykobakterien kann es Wochen dauern, bis ein endgültiger Befund vorliegt (Mims et al. 2006).

Eine Alternative kann die Lichtmikroskopie darstellen, die eine Diagnose bzw. Differentialdiagnose in Minuten bis Stunden erbringen kann, z. B. die Ziehl-Neelsen-Färbung. Die Präparate können angefärbt oder nativ betrachtet werden. Ebenfalls können die Beweglichkeit und die Morphologie der Erreger zur Differenzierung herangezogen werden. Ein Antibiogramm kann durch die Mikroskopie nicht erstellt werden.

Die Elektronenmikroskopie wird in einigen Speziallabors zur Detektion von submikroskopisch kleinen Viren eingesetzt.

Ebenfalls kann der Erregernachweis indirekt serologisch erfolgen z. B. falls die Kultivierung auf einem Nährboden nicht gelang, das Ergebnis schnell vorliegen sollte, die Infektion bereits durchgemacht wurde oder eine direkte Probe aus einem infizierten Gewebe nicht möglich gewesen ist (Hof 2014).

Ein Nachteil ist, dass häufig in der Akutphase keine Antikörper nachweisbar sind, da Antikörper (IgM) erst nach einer Latenz von etwa einer Woche messbar sind (Hof 2014). Die Positivität von IgG bestätigt einen stattgehabten Kontakt mit dem Erreger, gibt aber keine valide Information über die Aktivität der Infektion. Erst der weitere Titerverlauf lässt eine genauere Aussage über einer aktiven oder chronischen Infektion zu (Hof 2014). Die Bestimmung der genauen Antikörperzahl aus der Probe (u. a. Serum, Liquor) ist technisch schwierig. Die Antikörperbestimmung hat einen hohen Stellenwert bei der Diagnostik von Virusinfektionen. Impfungen, immunsuppressive Therapien oder die Gabe von Immunglobulinpräparaten kann die Erregerdiagnostik erschweren.

Zum Nachweis des Antigens bzw. Antikörpers kann die Präzipitationsreaktion, der Neutralisationstest, die Agglutinationsreaktion oder die Enzymimmunoassay eingesetzt werden (Hof 2014).

Zur Erkennung von unbekanntem Antikörpern oder Antigenen sind Präzipitationsreaktionen einsetzbar. Antikörpermoleküle besitzen mindestens 2 Antigenbindungsstellen, so dass makroskopisch sichtbare Vernetzungen, sogenannte Präzipitate, entstehen können. Die Methode des Antigen- bzw. Antikörpernachweises ist kostspielig, erbringt jedoch ein schnelleres Ergebnis als die Keimkultivierung auf einem Nährboden.

Bei der Agglutinationsreaktion entstehen Agglutinate zwischen Antikörpern und Epitopen, welche sich an ganze Partikeln, u. a. Erythrozyten oder Bakterien befinden. Treponemen-Antigen beladene Schafserythrozyten können beispielsweise mit im Patientenserum befindlichen Antikörpern agglutinieren und so nachgewiesen werden (Hof 2014). Erreger einer bakteriellen Meningitis können im Patientenliquor durch die sogenannte Latexagglutination in wenigen Minuten nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist unwesentlich sensitiver als die Anfärbung nach Gram. Es kann durch Kreuzreaktionen zu falsch-positiven Ergebnissen kommen (Mims et al. 2006).

Mit der Enzymimmunoassay, auch ELISA (*enzym-linked immunosorbent assay*), können Antikörper, welche sich in einem Antigen-Antikörper-Komplex befinden, mit markierten Antihumanglobulinen identifiziert werden. Die Markierung erfolgt durch ein Enzym und die Menge der gebundenen Antikörper kann mittels einer anschließenden Enzymreaktion quantitativ bestimmt werden (Hof 2014).

Der Neutralisationstest ist häufig eine Referenzmethode und zeitlich sehr aufwendig. Bei diesem Test können immunitätsvermittelnde Antikörper nachgewiesen werden.

Die Komplementbindungsreaktion ist heute von geringer Bedeutung. Der Nachweis von Antikörpern wird hauptsächlich in der Virusdiagnostik angewendet. Immunologische Verfahren sind relativ schnell durchführbar, haben allerdings nicht die Sensitivität von Kulturen oder der PCR (Hof 2014).

Ein indirekter Keimnachweis kann teilweise durch den Nachweis von Endo- und Exotoxinen erfolgen.

Eine sensitivere Methode ist die molekulare Diagnostik mit dem Nachweis des Genoms oder der RNA-Transkripte der Erreger. Dabei sind zwei Techniken von Bedeutung, zum einen die Polymerasenkettenreaktion (PCR) und zum anderen die Nukleinsäurehybridisierung.

Die PCR, die selektive DNA-Abschnitte *in vitro* vervielfältigt, ist die sensitivere von beiden, da schon kleine Mengen des Genoms (Nachweisgrenze bei ca. 50-200 Genomkopien/ml) zur Amplifikation und damit zur Diagnostik ausreichen (Hof 2014). Es kann sowohl DNA (Desoxyribonukleinsäure) als auch RNA (Ribonukleinsäure), die mit Hilfe der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben wird, verwendet werden. Nach der Amplifikation (ca. 20-40 Zyklen) kann der entsprechende Genabschnitt nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren ist die PCR weiter in den Vordergrund gerückt, u. a. in Bezug auf die Bestimmung der Erregerlast beispielsweise bei einer Hepatitis (Hof 2014). Das Ergebnis liegt in wenigen Stunden vor. Ein spezielles Verfahren der PCR ist die Real-Time-PCR-Methode. Hierbei ist die Diagnostik schon während des Verfahrens möglich. Als Nachteil ist zu erwähnen, dass die Identifizierung des verursachenden Keims aus dem direkten Probenmaterial schwierig ist. Falsch-positive Ergebnisse können durch residente Keime entstehen (Kunze et al. 2015). Die Proben aus Kulturen liefern bislang die validiertesten PCR-Ergebnisse. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR muss eine Verunreinigung der Probe umso mehr verhindert werden.

Kunze et al. (2015) untersuchten in einer Pilotstudie die Effektivität einer patientennahen Multiplex-PCR zur schnellen mikrobiellen Identifizierung von Patienten mit nosokomialer Pneumonie auf der Intensivstation. Es konnte gezeigt werden, dass die PCR im Durchschnitt innerhalb von 6,5 Stunden ein Ergebnis vorweisen kann. Dadurch ist ein frühzeitiger Antibiotikabeginn möglich. Insbesondere wenn der *clinical pulmonary infection score* (CPIS) über 5 Punkte lag, bewies die Methodik eine höhere Übereinstimmung als mit den Ergebnissen aus der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik.

Lehmann et al. (2010) konnten in einer prospektiven Beobachtungsstudie zeigen, dass die Anwendung der PCR zu einer effektiven Kostensenkung aufgrund einer

gezielten antimikrobiellen Therapie und damit zu einem verbesserten Outcome von postoperativen ICU-Sepsispatienten führt.

Bei der Nukleinsäurehybridisierung, die an dieser Stelle der Vollständigkeit halber erwähnt wird, kann sowohl DNA als auch RNA identifiziert werden. Schon in den 70er Jahren nutzte man diese Methode, um Virus-DNA nachzuweisen. Die Sensitivität ist von der Anzahl der vorkommenden Genkopien abhängig (Hof 2014). Die Hybridisierung erfolgt u. a. in Kombination mit anderen Techniken (Northern Blot, Southern Blot).

Es kann weder mit der Real-Time-PCR noch mit der Nukleinsäurehybridisierung die Antibiotikaempfindlichkeit überprüft werden.

Eine weitere Technik zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Kombination der PCR ist die Anwendung von Gensonden. Das sind DNA- oder RNA-Fragmente, die nach Klonierung oder Amplifikation mittels PCR, zur Diagnostik nichtradioaktiv oder radioaktiv markiert werden (Mims et al. 2006). Es sind bisher nur wenige Sonden zum Nachweis von pathogenen Erregern erhältlich. Ein Ergebnis kann nach 2-4 Stunden vorliegen. Bei geringer Keimzahl besteht die Möglichkeit, dass die Gensonden lediglich eine geringe Sensitivität haben. In diesem Fall kann die Amplifikation mittels PCR weiterhelfen. Mims et al. (2006) konnten mit spezifischen DNA-Sonden einzelne Resistenzgene nachweisen.

Schon seit 30 Jahren ist die Sequenzanalyse der Goldstandard unter den Identifikationsmethoden (Keller et al. 2010). Bei Prokaryonten existieren verschiedene RNA-Moleküle: 5S, 16S und 23S. Bei Eukaryonten liegt die 18S-RNA vor. Die konventionelle, biochemische Methode beruht auf einer Genamplifikation von meist 16S-rRNA bei Bakterien und 18S-rDNA und 28S-rDNA bei Pilzen (Keller et al. 2010). Die Technik wird bei ungewöhnlichen Phänotypen, seltenen Bakterien, Kultur-negativen Infektionen oder langsam und anspruchsvoll wachsenden Bakterien, z. B. *Brucella* und *Chlamydia*, in Betracht gezogen (Woo et al. 2008). Das Fragment des Zielgens, mit ca. 1.500 Basenpaaren, wird zu Beginn vervielfacht. Ein Ergebnis kann nach etwa 48 Stunden vorliegen (Woo et al. 2008).

Die Sequenzanalyse lässt Rückschlüsse auf eine adäquate Antibiotikatherapie zu, kann die erforderliche Therapiedauer bestimmen und kann die Therapieeffektivität

anzeigen (Woo et al. 2008). Bei eng verwandten Keimen, wie z. B. *Streptococcus pneumoniae* und β -hämolyisierenden Streptokokken ist die Methodik nicht zu empfehlen (Bosshard 2004). Die Identifizierung der Bakteriengattung und der Bakterienspezies ist möglich. Es besteht ein großes Angebot an Testsystemen mit entsprechender Analysesoftware (Frontzek 2015). Die 16S-rRNA ist hoch konserviert und kann eine moderate Kopieanzahl vorweisen (Miller und Moore 2004). Die MALDI-TOF und die 16S-rDNA-Sequenzanalyse gleichen sich durch die Verwendung von ribosomaler DNA und haben beide Schwierigkeiten bei der Differenzierung eng verwandter Erreger (Schubert und Wieser 2010).

In der Studie von Bahrani-Mougeot et al. (2008) wurden Blutkulturen von Patienten nach Zahnextraktion auf oral vorkommende Bakterien mit Hilfe der Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens und mit einer computerbasierenden (*Remel Rapid System*) biochemischen Analyse untersucht und verglichen. Mit der 16S-rRNA-Methode konnten mehr Bakterienspezies identifiziert werden als mit der konventionellen Methode. Durch die Sequenzanalyse wurden auch nicht lebensfähige Mikroorganismen nachgewiesen, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Damit besteht die Gefahr einer unnötigen Antibiotikatherapie. Eine Aussage über die antibiotische Sensitivität kann nicht getroffen werden. Bahrani-Mougeot und Kollegen kamen zu der Folgerung, dass die 16s-rRNA-Technik eine Alternative bei Versagen von phänotypischen Methoden darstellt. Eine Differenzierung zwischen den eng verwandten *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, mit deutlich unterschiedlicher Pathogenität, war nicht möglich. Der Nachteil der auf Nukleinsäure-basierenden Techniken ist kostspielig und mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden (Schubert und Wieser 2010).

1.3.3 Methoden zur Analyse von volatilen Metaboliten

Mit der Identifizierung von Bakterien und Pilze anhand ihrer volatilen Metabolite haben sich bis heute mehrere Arbeitsgruppen unter Anwendung verschiedener Techniken beschäftigt.

1.3.3.1 Elektronische Nase (*e-nose*)

Die sogenannte elektronische Nase (*e-nose*) imitiert das olfaktorische System von Säugetieren. In den 90er Jahren hatte die Technik in der Lebensmittel- und

Duftindustrie einen hohen Stellenwert (Arnold und Senter 1998). Die *e-nose* kann über 32 verschiedene Sensoren nutzen. Diese produzieren ein Signalmuster. Es stehen piezoelektrische, elektrochemische, kalorimetrisch-thermische und optische Sensoren zur Verfügung (Chambers et al. 2011). Die Signale entstehen durch Adsorption und Desorption der Volatile an der Sensoroberfläche. Dadurch entstehen Veränderungen des elektrischen Widerstandes, die durch eine Computersoftware aufgezeichnet werden (Arnold und Senter 1998).

Die Nachweisgrenze der *e-nose* liegt im Bereich parts per Billion, so dass möglicherweise wesentliche Moleküle, die der Differenzierung dienen, nicht nachgewiesen werden. Die Sensoren sind nicht befähigt die detektierten Moleküle zu benennen, auch sind die Geräte untereinander nicht vergleichbar. Man benötigt eine große Messreihe, um reproduzierbare Ergebnisse erhalten zu können. Das jeweilige Profilmuster ist abhängig von der Antwortempfindlichkeit des verwendeten Sensors (Chambers et al. 2011). Mit Hilfe der *e-nose* können verschiedene Organismen anhand ihrer generierten Signalmuster unterschieden werden. Die *e-nose* besitzt derzeit nicht die Sensitivität von biologischen Verfahren (Berna et al. 2009; Chambers et al. 2011).

Anhand eines großen Probanden-Patientenkollektivs mit der gleichen Erkrankung wird ein krankheitsspezifisches Signalmuster erstellt. Dieses kann später mit dem volatilen Spektrum des erkrankten Patienten verglichen werden. Im besten Fall ist eine exakte Diagnosestellung möglich (Chambers et al. 2011). Keime unterhalb der Nachweisgrenze sind folglich nicht detektierbar. Diese müssten zuvor kultiviert werden, wodurch es zu einer Verzögerung des mikrobiellen Befundes kommen würde.

<u>Infektionsdiagnostik</u>	
Klinische Diagnostik	Mikrobiologische Diagnostik
<p>Anamnese</p> <p>Körperliche Untersuchung</p> <p>Klinische Parameter (z. B. Blutbild, CRP, PCT)</p> <p>Bildgebung (z. B. Röntgen-Thorax)</p> <p>ggf. Entnahme von Blutkulturen, Fremdkörper</p>	<p><u>Direkter Nachweis</u></p> <p>Mikroskopie:</p> <p>Lichtmikroskopie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nativ • Dunkelfeldmikroskopie • Phasenkontrastmikroskopie • Kalilaugenpräparat • Färbung (z. B. Gram-, Ziehl-Neelsen-Färbung) <p>Elektronenmikroskopie</p> <p>Kultivierung</p> <p>Molekularbiologische Diagnostik:</p> <ul style="list-style-type: none"> • PCR <ul style="list-style-type: none"> - DNA-Sonden • Hybridisierungsverfahren • 16S-rRNA-Sequenzanalyse • MALDI-TOF <p><u>Indirekter Nachweis</u></p> <p>Antikörper-Nachweis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Biochip-Technologie <p>Nachweis von Endo- und Exotoxinen</p> <p>Serologie:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antigen- bzw. Antikörper-Nachweis: <ul style="list-style-type: none"> - Präzipitationsreaktion - Agglutinationsreaktion - Komplementbindungsreaktion - Enzymimmunoassay (ELISA) - Neutralisationstest

Abbildung 1 Übersicht über die Möglichkeiten zur Infektionsdiagnostik.

2002 wurden erfolgreich anaerobe Spezies (*Clostridium spezies pluralis* und *Bacteroides fragilis*) in vitro mit der Nutzung der *e-nose* durch Pavlou et al. (2002) identifiziert.

Moens et al. (2006) konnte die zehn wichtigsten Erreger einer Ventilator-assoziierten Pneumonie (VAP) mit Hilfe der *e-nose* in weniger als 17 Stunden benennen. Unter den Erregern waren auch eng verwandte Spezies (u. a. verschiedene Streptokokken und Enterobacteriaceae).

1.3.3.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) stellt in der Gasanalyse den Goldstandard dar (Chambers et al. 2011). Seit den 70er Jahren wird diese Methode zur Identifizierung von kultivierten Bakterien anhand der volatilen Komponenten eingesetzt (Carroll et al. 2005). Es ermöglicht eine Identifizierung von Einzelverbindungen in komplexen Gasgemischen. Zuerst wird das zu untersuchende Stoffgemisch gaschromatographisch aufgetrennt und anschließend erfolgt die massenspektrometrische Identifizierung der einzelnen Komponenten. Die Sensitivität liegt im ppt-Bereich. Der Vorteil ist die hohe Reproduzierbarkeit und die gut ausgelegte Referenzdatenbank zur Substanzbestimmung (*National Institute of Standards and Technology*; NIST) (Chambers et al. 2011). Die Gaschromatographie ist schnell und besonders vorteilhaft bei langsam wachsenden Keimen und bei schwieriger Isolation (Zechman et al. 1986).

Leider ist das GC-MS sehr sperrig, unbeweglich und in der Nutzung zeitaufwendig im Vergleich zur *e-nose*, zum IMS oder zum SIFT-MS (Chambers et al. 2011). Hinzu kommt der Mangel an Sensitivität bei der Detektion von niedermolekularen Volatilen (Carroll et al. 2005).

1.3.3.3 Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS)

Die *selected ion flow tube mass spectrometry* (SIFT-MS) ist eine weitere Technik zur Analyse volatiler Substanzen. Sie ermöglicht eine zeitnahe Quantifizierung von Gasgemischen aus Luft und Atemproben. Es werden verschiedene Reaktionsionen, sogenannte Vorläuferionen (H_3O^+ , O_2^+ , NO^+), zur chemischen Ionisierung der Volatile genutzt (Chambers et al. 2011). Dabei entstehen Produktionen, welche durch ein Quadrupol-Massenspektrometer und Teilchenmultiplikator analysiert werden. Es

resultiert ein Spektrum, welches die Identifikation und Quantifizierung von bekannten Metaboliten ohne Hilfe von chromatographischer Trennung ermöglicht. Die Sensitivität liegt für die meisten Analyte im Messbereich von ppb. Für bestimmte Analyte kann die Sensitivität bis in den ppt-Bereich reichen (Chambers et al. 2011). Die resultierende Echtzeit (*real-time*) der analytischen Ergebnisse und die Bestimmung der Masse der Substanzen durch ein Flugzeitmassenspektrometer (*time of flight*, TOF) ist von Vorteil (Chambers et al. 2011). Die Detektion von kleinen Molekülen ist somit gut möglich, allerdings ist die Bestimmung für größere Moleküle in komplexen Verbindungen weniger spezifisch (Chambers et al. 2011; Scotter et al. 2005).

1.3.3.4 Ionenmobilitätsspektrometrie

Ein weiteres Verfahren ist die Ionenmobilitätsspektrometrie. Mit dieser Methode werden Analytmoleküle ionisiert. Anschließend durchlaufen die im Idealfall aufgetrennten Moleküle nach Masse, Struktur und Ladung ein bestimmtes elektrisches Feld. Am Ende der zurückgelegten Strecke treffen die Moleküle auf einen Detektor und erzeugen ein elektrisches Signal. Anhand dieses Signals erfolgt die Identifizierung. Das Verfahren wird in Kapitel 1.4 näher erörtert.

1.3.4 Volatile Metabolite von drei auserwählten humanpathogenen Mikroorganismen

1.3.4.1 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) gehört in die Klasse der γ -Proteobakterien und wird zur Gattung der Pseudomonaden gezählt. Es ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium. Dieser Keim ist obligat aerob und benötigt daher als terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff (Hof 2014). *P. aeruginosa* kann Glucose oxidativ und nicht fermentativ verwerten (Hof 2014). Indol stimuliert die Biofilm-Bildung in *P. aeruginosa*. Selber produziert dieses Bakterium kein Indol (Ren et al. 2004).

Das von Pseudomonaden gebildete Endotoxin, ein Lipopolysaccharid, hat einige strukturelle Unterschiede zu dem Endotoxin der anderen gramnegativen Stäbchen. Es ist weniger toxisch und weniger entzündungsfördernd (Hof 2014). *P. aeruginosa* ist als transienter Hautkeim bekannt.

Eine artspezifische Eigenschaft ist sein süßlich-aromatischer Geruch, der von vielen als lindenblütenartig (Habs (1954)) oder *grape like* (Mann (1966)) beschrieben wird. Mit diesem charakteristischen Geruch lässt sich häufig schon eine Infektion mit *P. aeruginosa* vermuten.

1966 identifizierte Mann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie diese Substanz als Aminoacetophenon (2-AA). 2-AA ist ein Zwischenprodukt des Stoffwechsels.

Cox und Parker (1979) konnten *P. aeruginosa* nach 20 bis 24 Stunden anhand von Aminoacetophenon (2-AA) identifizieren. Die Etherextrakte aus *P. aeruginosa*-Kulturen wurden mit der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (GLC), der kalorimetrischen und der fluorimetrischen Dünnschichtchromatographie untersucht. Bei allen Stämmen von *Pseudomonas* konnte 2-AA nachgewiesen werden. Ebenfalls wurden geringe Mengen an 4-Methylquinazoline und 2,4-Dimethylquinazoline beobachtet.

Anfang der achtziger Jahre (Thadepalli et al. 1982) untersuchte man Meningitis-Erreger aus flüssigen Medien mittels GLC. In den Flüssigkulturen von *P. aeruginosa* konnte in sehr geringen Mengen Milchsäure und Bernsteinsäure nachgewiesen werden. Thadepalli et al. (1982) vermuteten, dass Bernsteinsäure ein bakterielles Nebenprodukt der Fermentation sei.

Um eine schnellere und sensitivere Identifizierung von mit *P. aeruginosa* infizierten Körperflüssigkeiten zu ermöglichen, untersuchte man das Headspace von elf *P. aeruginosa*-Stämmen und fünf verwandten *Pseudomonaden* mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Labows et al. 1980). Alle *P. aeruginosa*-Stämme produzierten charakteristische ungerade Kohlenstoff-Methyl-Ketone, besonders 2-Nonanone, 2-Undecanone und 2-AA. 2-AA wurde ausschließlich bei *P. aeruginosa* beobachtet. Zwei schwefelhaltige Substanzen, Dimethyldisulfid (DMDS) und Dimethyltrisulfid (DMTS), wurden bei allen *Pseudomonaden* in unterschiedlichen Mengen detektiert. Butanol, 1-Undecene, Isopentanol, 2-Butanon und Toluol sind weitere Substanzen, die bei den *Pseudomonaden* beobachtet worden sind. *P. aeruginosa* zeigte auch nach längerer Inkubationszeit (7 Tage) und längerer Probenentnahme (17 Stunden) das gleiche Metabolitenprofil mit erhöhter Peak-Intensität für 2-AA und das Vorkommen von 4-Methylquinazolin, bei dem es sich um ein Reaktionsprodukt von 2-AA handelt.

Zechman et al. (1986) untersuchten volatile Substanzen von pathogenen Bakterien (*P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*) mittels automatisierter Headspace Konzentration-Gaschromatographie (AHC-GC) und der Massenspektrometrie. Es zeigten sich individuelle Headspace-Profile, die eine Differenzierung zwischen den Bakterien ermöglichten. Die Ergebnisse waren reproduzierbar in Bezug auf die Zeitdauer des Auftretens der Volatile und den Retentionszeiten. Über *P. aeruginosa* sind besonders Isobutanol (2-Methyl-1-Propanol), 1-Undecen, Butanol und Isopentanol (3-Methyl-butan-1-ol) beobachtet worden.

Es bestätigte sich auch später, dass *P. aeruginosa* Schwefelgemische (Dimethyldisulfid) produziert (Schöller et al. 1997). Es wurden Proben von Pseudomonaden und Enterobacteriaceae mit Hilfe von ADT (*air dissolving tube*) gefüllte Tenax entnommen. Neben Dimethyldisulfid, welches den größten Anteil der Metabolite ausmachte, wurden Isopren und 1-Undecan bei *P. aeruginosa* nachgewiesen. Oxygenierte VOCs wurden nicht nachgewiesen (Schöller et al. 1997).

Arnold und Senter (1998) analysierten VOCs von verarbeiteten Geflügel mit der Technik der *e-nose*, der Festphasenmikroextraktion (*solid phase microextraction*, SPME) und der GC-MS. Die *e-nose* konnte zwischen den Spezies unterscheiden und zeigte sich als ausreichend sensitiv. Die Ergebnisse waren reproduzierbar. Während bei vielen Spezies in erster Linie Alkohole, insbesondere Ethanol, nachgewiesen werden konnten, stellte *P. aeruginosa* eine Ausnahme dar. *P. aeruginosa* zeigte Signale für 3-Methyl-1-Butanol und Phenethylalkohol.

Carrol et al. (2005) konnten ein spezifisches Muster für *P. aeruginosa* mittels SIFT-MS bestimmen. Als Proben dienten Pseudomonaden aus Sputum bzw. Auswurf von an zystischer Fibrose erkrankten Patienten. Eine signifikante Menge an VOCs waren in der Wachstumsphase von *P. aeruginosa* zu erkennen. Blausäure (HCN) zeigte das höchste Vorkommen. Eine HCN-Konzentration von über 100 ppb hatte eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 100%. Carrol et al. (2005) sahen Blausäure als Biomarker für *P. aeruginosa* an. Ammoniak und DMDS kamen in zu geringen Mengen vor und konnten nicht als spezifisch für *P. aeruginosa* angesehen werden.

Volatile Substanzen im Headspace aus Blutkulturen von Patienten mit Bakteriämien (*P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Neisseria meningitidis*) wurden mit der SIFT-MS im Headspace analysiert (Allardyce et al. 2006). Für die Substanzbestimmung wurde das MS genutzt. Durch das SIFT-MS konnte eine schnelle Erregerdiagnostik ermöglicht werden. Das SIFT konnte die absolute Konzentration des entsprechenden Metabolits bestimmen. *P. aeruginosa* zeigte charakteristische Werte für Essigsäure und Aceton. In geringer Menge wurden Ethanol, Acetaldehyd, Ammoniak, Dimethylsulfid (DMS), DMDS und Schwefelwasserstoff nachgewiesen. Die ermittelten Metabolitenmuster erwiesen sich über 24 Stunden als konstant, allerdings konnte man eine proportionale Zunahme der einzelnen Metabolite beobachten. Nach einer Inkubation von sechs Stunden konnten die *P. aeruginosa*-spezifischen Metabolite nachgewiesen werden (Allardyce et al. 2006).

Kunze et al. (2013) beobachteten das Metabolitenprofil von Referenzstämmen und von klinischen Isolaten von *E. coli* und *P. aeruginosa* in unterschiedlichen Wachstumsphasen mit Hilfe des MCC-IMS. Über *P. aeruginosa* konnten sieben Signalpeaks (2-Propan, Azane, Dodecan, 2-Ethylhexan-1-ol, p_603_25, p_648_36_, p_778_4) detektiert werden, die eine Differenzierung zwischen den beiden Keimen ermöglichten. Die drei nicht identifizierten Substanzen wurden nach ihrer Lage im 2D-topographischen Plot benannt. Bis auf 2-Propan zeigten die Metabolite eine steigende Intensität in der späten exponentiellen bzw. in der stationären Phase.

1.3.4.2 Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*), auch als Pneumococcus bezeichnet, ist ein grampositives, bekapseltes Bakterium. Es kann sowohl aerob als auch anaerob existieren und ist damit fakultativ anaerob. Als Kommensale gehört der Keim- wie einige andere Milchsäurebakterien- ebenfalls zur normalen Flora von Schleimhäuten oder der Haut (Heider 2007). Die Bildung von Milchsäure verhindert gleichzeitig die Besiedlung von pathogenen Erregern. Bei circa 40-70% der Menschen lösen Pneumokokken keine Symptome aus (Hof 2014). *S. pneumoniae* ist ein typischer Erreger der Lobärpneumonie. Bei älteren Patienten ist das Bakterium auch bei Lungenabszessen und Bronchopneumonien zu finden. Eine sekundär

erworbene Pneumokokken-Meningitis ist lebensgefährlich, und der Patient kann neurologische Residuen beibehalten.

Mit der *frequency-pulse-modulated electron capture gasliquid chromatography* (FPEC-GLC) wurden Meningitis-Erreger auf die Produktion von Aminen untersucht. Eine Differenzierung zwischen den Erregern (*S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae* und einige Typen von *Escherichia coli*) war möglich (Brooks et al. 1980b). *S. pneumoniae* emittierte als einziger Keim kein Amin und konnte dadurch von den anderen Bakterien unterschieden werden. *S. pneumoniae* wies ein schlechtes Wachstum auf den verwendeten Nährböden auf (Brooks et al. 1980b).

Nach dem gleichen Versuchsaufbau wurde nach dem Vorkommen von Säuren geschaut (Brooks et al. 1980a). *S. pneumoniae* konnte wegen seiner Produktion von Benzoesäure und einem nicht identifizierten Metaboliten (iC5) einfach von den anderen Keimen unterschieden werden. *S. pneumoniae* emittierte kaum Volatile, welche die anderen Keime produzierten. Zum Beispiel konnte der Keim durch das Fehlen von Indol von *Haemophilus influenzae* und *Escherichia coli* abgegrenzt werden. Ein Vorteil der FPEC-GLC ist zum einen die Selektivität und die gute Sensitivität und zum anderen ist keine vorherige Kultivierung der Bakterien notwendig. Circa 7 Stunden nach Beimpfung der Nährmedien war eine Keimidentifizierung möglich (Brooks et al. 1980a).

Im Weiteren wurden die Substanzen Ethanol, Acetaldehyd, Aminoacetophenon, Formaldehyd, Hexanal, Indol, Trimethylamin und DMS per SIFT-MS bei *S. pneumoniae* nachgewiesen (Allardyce et al. 2006).

1.3.4.3 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein grampositiver, aerober und opportunistischer Keim. Dieser ist Koagulase-positiv und dadurch von den anderen Staphylokokken (Koagulase-negativ) zu unterscheiden. Es ist ein gefürchteter Keim bei nosokomialen Infektionen und oft in Eiterwunden nachzuweisen.

Zechman et al. (1986) bestimmten in der bereits oben erwähnten Studie die volatilen Metabolite von Bakterien mittels AHC-GC. In Stämmen von *S. aureus* waren am stärksten Isobutanol, Isopentanol und Acetoin (auch 3-Hydroxy-2-butanon) vertreten. Ebenfalls wurden Spuren von Pyridin, Indol, Isovaleriansäure (3-Methylbuttersäure)

und Isobuttersäure als nicht charakteristische Substanzen beobachtet. Unterschiedliche Mengen an Dimethyldisulfid, Dimethyltrisulfid und Methylketone mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffen (C₃-C₁₅) wurden bei allen Keimen nachgewiesen.

Substanz	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Acetaldehyd	+ ^a	+ ^a	+ ^(a)
Acetoin		+ ^b	
Aceton (2-Propanon)			+ ^{a,o}
Aminoacetophenon	+ ^a	+ ^a	+ ^{b, c, d, f}
Ammoniak			+ ^{k, a}
Azane			+ ^o
Benzoessäure	+ ⁿ		
Benzylmethylsulfid			+ ^b
Bernsteinsäure			+ ^(e)
Butanol			+ ^{b, f}
Butanon		+ ^b	+ ^b
Dimethyldisulfid (DMDS)		+ ^{b, m}	+ ^{a, b, f, h, k}
Dimethyltrisulfid (DMTS)		+ ^(b)	+ ^{f, h}
Dimethylsulfid (DMS)	+ ^a	+ ^b	+ ^{(a), b}
Dodecan			+ ^o
Essigsäure			+ ^a
Ethanol	+ ^a	+ ^a	+ ^(a)
Ethylmethylsulfid			+ ^b
Formaldehyd	+ ^a		
Hexanal	+ ^a	+ ^(a)	
Hydrogensulfid		+ ^a	+ ^a
Indol	+ ^(a)	+ ^{a,(b)}	
Isobutanol		+ ^b	+ ^b
Isobuttersäure		+ ^(b)	
Isopentanol		+ ^{b, f}	+ ^b
Isopentylacetat			+ ^b
Isopren			+ ^{b, h}
Isovaleriansäure	+ ⁿ	+ ^(b)	
Keton		+ ^m	

Methanethiol		+ ^a	+ ^(a)
Methylbutanal		+ ^b	+ ^b
Methylbutenol		+ ^b	+ ^d
Methylketone		+ ^(b)	
Milchsäure			+ ^e
Pentanone/ Toluol		+ ^a	+ ^{d, f}
Phenetylalkohol			+ ⁱ
Pyridin		+ ^(b)	
Trimethylamin	+ ^a	+ ^(a)	
Schwefelsäure			+ ^k
Schwefelwasserstoff		+ ^a	+ ^a
Undecan			+ ^b
Undecen			+ ^b
1-Decanol		+ ^m	
1-Undecen			+ ^{f, h}
2-Butanol		+ ^e	+ ^a
2-Butanon			+ ^f
2-Ethylhexan-1-ol			+ ^o
2-Heptanon		+ ^a	+ ^a
2-Nonanon		+ ^e	+ ^{c, f}
2-Undecanon			+ ^{a, f}
2-Tridecenone		+ ^m	
2,4-Dimethylquinazolin			+ ^(d)
3-Methyl-1-butanol			+ ⁱ
4-Methylquinazolin		+ ^{(d), f}	

Tabelle 1 Zusammenfassung der detektierten VOCs im Headspace der Bakterien.

a) Allardyce et al. (2006) b) Zechman et al. (1986), c) Mann (1966), d) Cox and Parker (1979), e) Thadepalli (1982), f) Labows et al. (1980), h) Schöller et al. (1997), i) Arnold und Senter (1998), k) Carrol et al. (2005), m) Elgaali et al. (2002) n) Brooks et al. (1980a), o) Kunze et al. (2013). Der Buchstabe in Klammern gibt an, dass die jeweilige Substanz in geringen Mengen gesehen wurde.

Elgaali et al. (2002) verglichen langkettige Alkohole und andere volatile Metabolite von mit Bakterien infizierten Lebensmitteln und von verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterien mittels SPME und Massenspektrometrie. Insgesamt zeigte sich bei den grampositiven Bakterien eine geringere Anzahl an Volatilen als bei den gramnegativen Bakterien. 1-Decanol war der einzige Alkohol, der bei den

grampositiven Keimen nachgewiesen werden konnte. Häufig wurden geringe Mengen an Ketonen beobachtet. Die von *S. aureus* produzierten Substanzen Dimethyldisulfid und 2-Tridecenone konnten nicht zur Differenzierung beitragen, denn weitere grampositive Bakterien, z. B. *Streptococcus agalacticae*, produzierten diese Volatile ebenfalls.

Die SIFT-MS Analysen von mit *S. aureus* kontaminierten Blutkulturen ergaben als Metabolitenmuster in absteigender Reihenfolge: Acetaldehyd, Methanthiol (Methylmercaptan/ Mercaptomethan), Ethanol, Schwefelwasserstoff (H_2S / Hydrogensulfid), Aminoacetophenon, Hexanal, Indol und Trimethylamin (Allardyce et al. 2006).

Eine Übersicht der produzierten Volatile von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* geben Tabelle 1 und 2.

Substanz	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
p_603_25			+ ^a
p_648_36			+ ^a
p_778_4			+ ^a

Tabelle 2 Zusammenfassung der detektierten, aber unbekanntenen VOCs im Headspace der Bakterien nach der Lage im 2D-topographischen Plot. (p_1000xinverse Ionenmobilität_Retentionszeit). a) Kunze et al. (2013).

1.4 Grundlagen der Ionenmobilitätsspektrometrie

Im Folgenden wird sich dieses Kapitel an die Monographie „Ion Mobility Spectrometry“ von Eiceman und Karpas (2005) orientieren.

Die Ionenmobilitätsspektrometrie dient der chemischen Analyse flüchtiger, organischer Verbindungen. Ein solches Ionenmobilitätsspektrometer besteht aus den folgenden Hauptkomponenten: Ionisationsraum, Driftraum und Detektor (i. Allg. Faraday-Platte). Zunächst erfolgt die Ionisation der Analytmoleküle mittels einer geeigneten Ionisationsquelle. Danach werden die gebildeten Ionen über ein Trägergas in den Driftraum geleitet. Bei der Nutzung eines β -Strahlers als Ionisationsquelle entstehen die Reaktionsionen (protonierte Wassercluster) über eine Reaktionskette.

Zwischen Ionisationsraum und Driftraum befindet sich ein sich periodisch öffnendes Einlassgitter. Dieses verhindert, dass große Mengen der ionisierten Analyte in den Driftraum gelangen. Sobald die Ionenschwärme in den Driftraum gelangt sind, bewegen sich diese aufgrund eines homogenen elektrischen Feldes entlang einer Feldlinie in Richtung Faraday-Platte. Hierbei strömt den Ionen ein Driftgas entgegen. Das Driftgas verhindert die Bildung von sogenannten Clustern, eine Zusammenlagerung von Molekülen/ Atomen, zwischen den Ionen und den in den Driftraum gelangten neutralen Molekülen. Abhängig von Masse, Ladung, Struktur und Kollision mit den Driftgasmolekülen, bildet das jeweilige geladene Molekül eine bestimmte Geschwindigkeit und wird im Idealfall aufgetrennt.

Von Bedeutung ist die Driftzeit (Millisekunden). Sie bezeichnet die Dauer, welche die Ionen für die Wegstrecke von dem Einlassgitter bis zum Detektor, der sogenannten Faraday-Platte, benötigen. Sie ist letztendlich das Maß für die Ionenmobilität in dem verwendeten Gas.

Um eine verbesserte Vergleichbarkeit erzielen zu können, wurde durch Normierung von Druck, Temperatur, Driftstreckenlänge und elektrischem Feld, die reduzierte Ionenmobilität (K_0) eingeführt. Diese ist unter gleichen Versuchsbedingungen eine stoffspezifische Größe.

Ein der Faraday-Platte vorgeschaltetes Aperturgitter dient der kapazitiven Entkopplung der Ionen am Detektor und der Driftstrecke. Die im Anschluss daran auf die Faraday-Platte auftreffenden Ionen erzeugen ein elektrisches Signal, welches durch einen Strom-/Spannungswandler verstärkt wird. Das Messsignal wird computergestützt dargestellt und zeigt ein Driftzeitspektrum. Dieses gibt die Signalintensität in Abhängigkeit von der Driftzeit wieder.

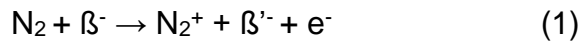
1.5 Ionisationsmethoden

Die meisten Ionenmobilitätsspektrometer (IMS) verwenden als Ionisationsquelle eine radioaktive Strahlungsquelle (u. a. ^3H , ^{63}Ni). Diese erzeugt sowohl positive als auch negative Ionen. Als alternative Ionisationsmethoden stehen UV-Strahlungsquellen, Laser, Elektrospray und die Ionisation über Teilentladungen zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde eine radioaktive ^{63}Ni - Strahlungsquelle (550 MBq) verwendet, die β -Teilchen mit einer maximalen Energie von 67 Kiloelektronenvolt (keV) emittiert.

Die Moleküle aus dem Gasgemisch kollidieren mit den β -Teilchen und werden auf diese Art ionisiert.

In dieser Arbeit wurde synthetische Luft (N_2 und O_2) als Trägergas verwendet. Die β -Teilchen ionisieren den molekularen Stickstoff (N_2) wie folgt:



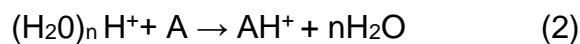
β'^- entspricht einem β^- -Teilchen mit reduzierter Energie (Sielemann 1999).

Der ionisierte Stickstoff reagiert mit den in der synthetischen Luft enthaltenen Kontaminanten (u. a. Spuren von Wassermolekülen, Stickstoffmonoxid oder Ammoniak). Als Ionen entstehen hierbei vor allem $(H_2O)_nNO^+$, $(H_2O)_nNH_4^+$ und $(H_2O)_nH^+$ -Ionen.

Die o. g. Ionen dienen als Reaktionspartner für die Analytmoleküle, sobald das Probengasgemisch in den Ionisationsraum gelangt. Die Analytionen können entsprechend der Reaktionsionen negativ oder positiv geladen sein.

Die Reaktionsionen sind in einem IMS-Spektrum als Reaktionsionenpeak (RIP) sichtbar. Links vom RIP sind $(H_2O)_nNH_4^+$ als kleiner Peak erkennbar (siehe Abbildung 2). Die $(H_2O)_nNO^+$ sind aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht erkennbar.

Die Analytionen (AH^+) werden durch einen Protonentransfer gebildet. Die Analytmoleküle (A) weisen, verglichen mit denen der Reaktionsionen, eine erhöhte Protonenaffinität auf:



Die so gebildeten Analytionen sind in der Regel physikalisch und chemisch stabil, so dass eine Dissoziation oder Fragmentierung selten zu beobachten ist. Zudem kann es auch zur Bildung von Dimeren kommen, welche von der Konzentration der Substanz und von der Protonenaffinität abhängig ist:



Auch die Bildung höherwertiger Polymere ist möglich.

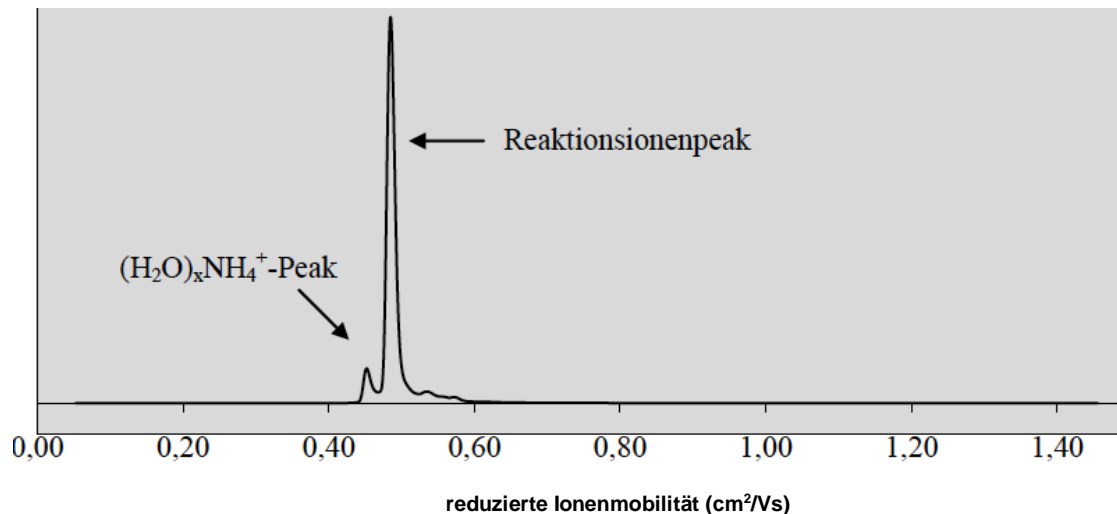


Abbildung 2 Schema eines Ionenmobilitätsspektrometers des verwendeten Nickel-IMS.
 Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung durch Eike Carstens (vgl. Carstens 2010, S. 19).

1.6 Ionenmobilität in Gasen

Durch die Beschleunigung im elektrischen Feld und das Abbremsen der ionisierten Moleküle durch Kollision mit den Driftgasmolekülen, ergibt sich die mittlere Geschwindigkeit innerhalb der Driftstrecke. Jedes Molekül besitzt seine spezifische Driftgeschwindigkeit v_d [cm/s] abhängig von seiner Ladung, Masse und Form.

Bei Vorliegen eines homogenen Feldes innerhalb der Driftstrecke E_d [V/cm], besteht eine direkte Proportionalität zwischen v_d und E_d .

$$v_d = K \times E_d \quad (4)$$

Die Mobilität der Ionen wird durch den Proportionalitätskoeffizient K [cm^2/Vs] definiert. Aus der Länge der Driftstrecke l_d [cm] und der gemessenen Driftzeit t_d [s] bis zur Detektion wird die Geschwindigkeit [v_d] errechnet.

$$v_d = \frac{l_d}{t_d} \quad (5)$$

Die Ionenmobilität K aus der ermittelten Driftzeit lässt sich direkt bestimmen durch Umformung der Gleichung (4) unter Hinzunahme von Gleichung (5).

$$K = \frac{l_d}{t_d \times E_d} \quad (6)$$

Eine Veränderung des Druckes p beziehungsweise der Temperatur T führt nach dem idealen Gasgesetz zu einer Änderung der Moleküldichte eines Gases.

Die dadurch möglicherweise entstehenden Veränderungen der Ionenmobilität K sind zu berücksichtigen. Die reduzierte Ionenmobilität K_0 [cm^2/Vs] korrigiert die Einflüsse der Temperatur T und des Druckes p (Standardbedingungen $T_0 = 273,2$ K und $p_0 = 1013,2$ hPa), so dass eine verbesserte Vergleichbarkeit der Messergebnisse sichergestellt werden kann.

$$K_0 = K \left(\frac{p}{p_0} \right) \left(\frac{T_0}{T} \right) \quad (7)$$

Die Mobilität der Ionen kann nach der von Revercomb und Mason aufgestellten Gleichung von 1975 unter Berücksichtigung der gaskinetischen Gesetze wie folgt berechnet werden:

$$K = \frac{3}{16} \frac{q}{N} \left(\frac{m + M_m}{mM_m} \right)^{1/2} \left(\frac{2\pi}{k_B T_{eff}} \right)^{1/2} \frac{(1 + \gamma)}{\Omega_d(T_{eff})} \quad (8)$$

Dabei kennzeichnet q die Ladung des Ions, N die Molekülzahl des Driftgases, m die Ionenmasse, M_m die Masse der neutralen Driftgasmoleküle, k_B die Boltzmann-Konstante, T_{eff} die Temperatur des Driftgases, γ einen Korrekturfaktor, welcher für $m > M_m$ kleiner 0,02 ist, und $\Omega_d(T_{eff})$ den temperaturabhängigen Stoßquerschnitt zwischen den Ionen und Gasmolekülen.

Nach Gleichung (8) ist die Ionenmobilität abhängig von der Masse und umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Für atomare Ionen gilt hingegen eine konstante Größe, so dass deren Mobilität durch deren Masse bestimmt wird. Eine geringere Mobilität weisen Molekülionen auf, da diese einen größeren Stoßquerschnitt besitzen. Ebenfalls wird die Ionen-spezifische Driftzeit durch Diffusion beeinflusst. Gelangt ein Ionenschwarm durch das Einlassgitter in den Driftraum, resultiert aufgrund von Diffusion eine gaußförmige Verteilung. Das zu verzeichnende Peakmaximum stellt die durchschnittliche Mobilität identischer Ionen dar (Sielemann 1999).

1.7 Kopplung der Ionenmobilitätsspektrometrie mit gaschromatographischen Techniken

Um Bestandteile komplexer Gasgemische, wie z. B. Bakterienmetabolite, mit Hilfe eines IMS zu analysieren, ist eine Vortrennung der Probe unabdingbar. Durch den Verzicht einer Vortrennung, würden sich Peaks verschiedener Analyte überlappen und eine Identifizierung wäre nicht möglich (Baumbach et al. 2000).

Durch den Schritt der gaschromatographischen Vortrennung resultiert die sogenannte Retentionszeit, welche ergänzend zur Driftzeit, die Identifizierung der unterschiedlichen Substanzen ermöglicht.

Kurz nachdem die Ionenmobilitätsspektrometrie in den 70er Jahren den Weg in die analytische Praxis gefunden hatte, stellten Karasek und Keller (1972) eine Kopplung eines Ionenmobilitätsspektrometers (IMS) an einen Gaschromatographen vor. Trotz ständiger Modifizierung war die Chromatographie sehr zeitintensiv und sperrig. Eine Verbesserung wurde durch die Entwicklung einer Multikapillarsäule (*multi-capillary-column*; MCC) erzielt (Baumbach et al. 1997). Diese Entwicklung führte zu einer Verkürzung der Analysezeiten von Sekunden bis auf wenige Minuten (Baumbach et al. 2000).

Eine MCC besteht aus 900-1200 gebündelten Kapillaren mit einem jeweiligen Innendurchmesser von 43 μm und einer Filmdicke von 0,2 μm . Die stationäre Phase besteht bei den konventionellen MCC aus gebundenen Siloxanen wie z. B. 5%- oder 10%-Phenylmethylsiloxan.

In dieser Studie wurde eine 20 cm lange stabförmige Säule mit einem Durchmesser von 3 mm verwendet. Die apolare stationäre Phase setzte sich aus 95% Dimethylsiloxan und 5% Phenylsiloxan zusammen. Der Einsatz dieser MCC ist besonders für mobile IMS geeignet, denn auftretende Flussschwankungen des Trägergases haben auf diesem Weg lediglich einen minimalen Einfluss auf die Retentionszeit. Ein weiterer Vorteil ist die optimale Flussrate der MCC von 15-300 ml/min, die dem normalerweise verwendeten Trägerfluss in der Ionenmobilitätsspektrometrie entspricht und ein Zusammenfügen erleichtert. Die konventionellen Gaschromatographen besitzen Flussraten von 0,4-1,5 ml/min.

Ebenfalls von Vorteil ist die mögliche Verwendung bei Raumtemperatur bis zu Temperaturen von 250 °C. Auf Temperaturprogramme kann so verzichtet werden. Die Probenauftrennung erfolgt bei konstanter Temperatur.

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen und Materialien

2.1.1 Mikroorganismen

Die Erstellung der Metabolitenprofile von *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* und *S. aureus* erfolgte mit klassifizierten Stämmen der Leibniz-Institut DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) und der *American Type Culture Collection* (ATCC). Die verwendeten Stämme werden in Tabelle 3 dargestellt.

Keim	DSM-Stamm	ATCC-Stamm	Keimkürzel
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM46358	ATCC25668	P aeru
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM11967	ATCC49619	S pneu
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM13661	ATCC43300	S aure

Tabelle 3 Klassifizierte Stämme der verwendeten Bakterien.

Die Stämme wurden als Vakuum-getrocknete Kulturen von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)“ Braunschweig bezogen und vor der jeweiligen Versuchsreihe rehydriert.

2.1.2 Materialien

Als Nährmedium wurde ein universeller Columbia-Agar (Fertigplatten mit 5% Schafblut, Ref.: 43049, Fa. BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) gewählt. Dieser ermöglicht das Wachstum aller drei Mikroorganismen.

Die verwendeten Impfschlingen wurden von der Fa. Sarstedt (Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Ref.: 861562010, 10 µl) verwendet.

Zur Analyse der Bakterienvolatile im GC-MS mit *polytetrafluoroethylene tubing* (PTFE; Bohlender GmbH, Grünsfeld, Germany) wurden mit TenaxTMGR (GERSTEL GmbH & Co. KG, Mühlheim, Germany) bestückte *thermal desorption tubes* verwendet.

2.2 Probenvorbereitung und Rehydrierung der gefriergetrockneten Kultur und Kultivierung des Blutagars

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Bakterienkultur nach den Herstellerempfehlungen rehydriert. Die Proben wurden bei -80 °C in einem komplexen Nährmedium (*Lysogeny Broth*, LB-Medium) und Glycerol (25% v/v) gelagert.

Die Beimpfung des Columbia-Blutagars (COS-Agar) erfolgte mit einem auf dem Agar ausgestrichenen Tropfen der Bakteriensuspension. Im Anschluss daran wurde der beimpfte Agar für 24 Stunden in einem Brutschrank (37 °C) inkubiert.

Am Folgetag wurde die bewachsene Agarplatte als Probenmaterial genutzt.

Nach Durchführung der vollständigen Messreihen wurden die Keime entweder nach Autoklavierung entsorgt oder unter Verschluss mit Parafilm im Kühlschrank gelagert.

Die Agarplatten wurden alle sieben Tage überimpft.

2.3 Verwendetes Ionenmobilitätsspektrometer und Headspace

Das in dieser Arbeit verwendete IMS ist ein im *Institute for Analytical Sciences* (ISAS) in Dortmund entwickelter Prototyp zur Atemgasanalytik. Die im Kapitel 1.4 beschriebenen Grundlagen eines Multikapillarsäulen-Ionenmobilitätsspektrometers (MCC-IMS) entsprechen im Allgemeinen dem vorliegenden Versuchsaufbau, werden aber im Folgenden ergänzt.

Das IMS, ausgestattet mit der o. g. Strahlungsquelle, besitzt einen aus 12 cm langem Teflon angefertigten Driftraum mit der enthaltenen Driftstrecke. An der Driftstrecke sind an der Außenseite der Driftröhre in gleichen Abständen Metallringe angeordnet, die das homogene elektrische Feld (Driftspannung) erzeugen.

Die Einstellungen der Periodik sowie die Öffnungszeit des Schaltgitters, die Driftspannung und die Polarität erfolgen mittels einer ebenfalls im ISAS entwickelten Versorgungseinheit.

Ein konstanter Gasfluss (Trägergas) gelangt über den Probeneinlass in die oben beschriebene Multikapillarsäule (MCC-OV-5, Sibertech Ltd., Novosibirsk, Russland) und anschließend in den bereits beschriebenen Ionisationsraum des IMS. Über eine externe digitale Säulenheizung erfolgt die Temperaturregulierung der MCC. In der Tabelle 4 sind die Versuchsparametereinstellungen dargestellt.

Eine kontinuierliche und konstante Gasversorgung des MCC-IMS mit synthetischer Luft der Firma *AirLiquid* (Düsseldorf, Deutschland) wird über einen externen *Mass-Flow-Controller* gewährleistet. Dieser ist mittels eines Teflonschlauches (Innendurchmesser 1,6 mm; Fa. Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland) von 220 cm mit den Anschlüssen des „Driftgases“ (Flow von 100 ml/min) und des „Trägergases“ (Flow von 150 ml/min) verbunden. Bei den Anschlussstücken handelt es sich sowohl an dem *Mass-Flow-Controller* als auch an der IMS-Einheit um Swagelok®-Fittings (Swagelok, Solon, Ohio, USA). Teflon besitzt eine geringe Oberflächenspannung, was ein Anhaften von Substanzen verhindert.

Für die Bestimmung der volatilen Bakterienmetabolite wurde eine im ISAS entwickelte Messkammer (Headspace) verwendet (Abbildung 3).

Diese aus rostfreiem Stahl bestehende Kammer ist wärmerreguliert und beinhaltet einen Zu- und einen Abfluss. Über den Gaszufluss gelangt das Spülgas in das Headspace. Die zu untersuchende Probe gelangt ausgehend von der Messkammer über eine Probenschleife (Volumen von 8 ml/min) in die Multikapillarsäule.

Das MCC-IMS besitzt eine 6-Wege-Ventilschaltung, mit der Möglichkeit von zwei unterschiedlichen Gasflüssen in der Probenschleife (Ventileinstellung A und B).

Als Grundeinstellung dient die Ventileinstellung A, in der lediglich das Drift- und das Trägergas in das MCC-IMS gelangen.

In dieser Einstellung wird eine dauerhafte Spülung (Gasfluss von 100 ml/min) der Probenschleife mit synthetischer Luft gewährleistet, um eine potentielle Verschmutzung zu vermeiden. Dabei entweicht die Spülluft über einen bestimmten Ausgang, ohne dabei direkten Kontakt zum Ionenmobilitätsspektrometer zu haben.

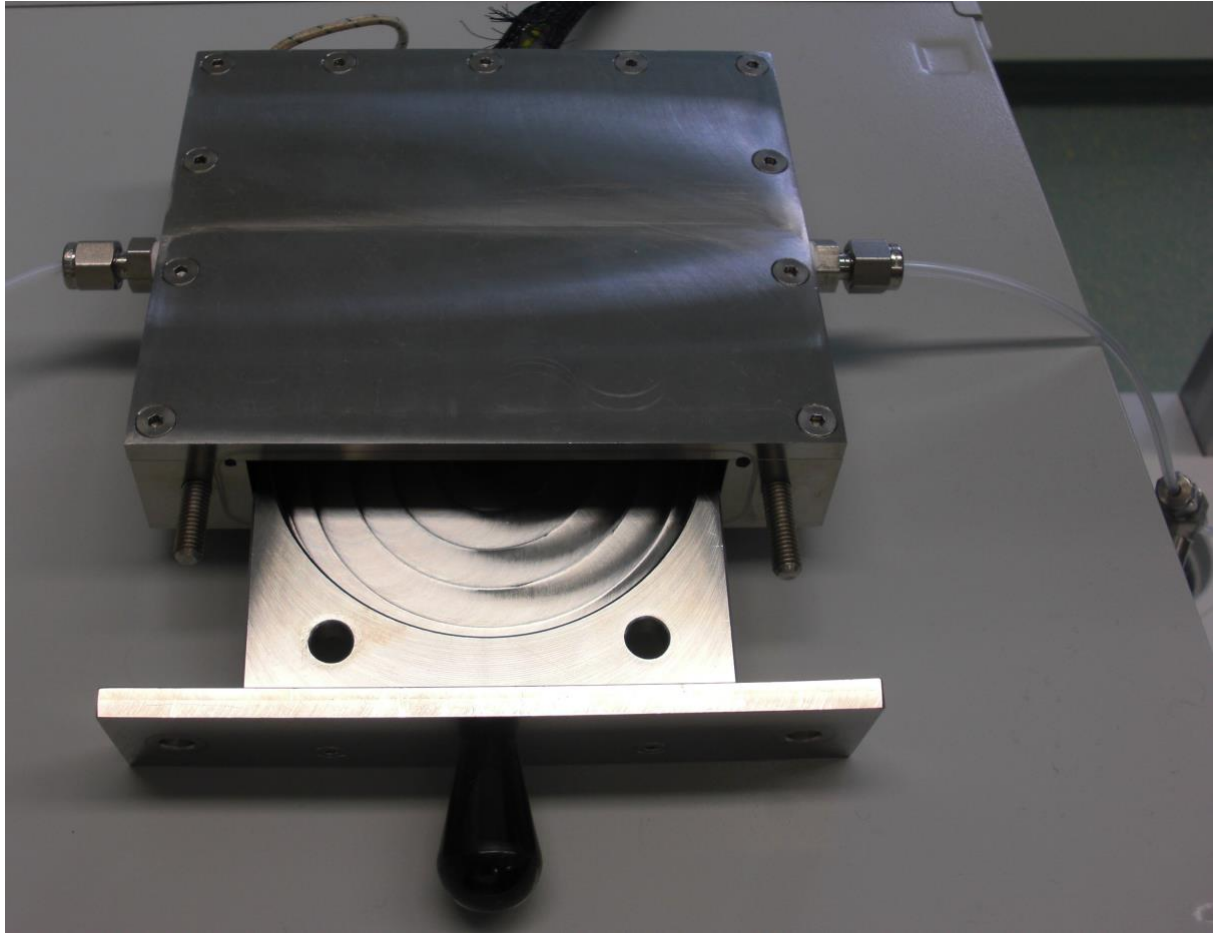


Abbildung 3 Verwendetes Headspace ohne Agarplatte.

Ebenfalls wird in der Ventileinstellung A die Probenschleife mit der zu analysierenden Probe gespült. Dies kann entweder über das Einleiten der Probe über die Probenschleife erfolgen oder über das Ansaugen einer Pumpe am Anschluss „Abgas“.

Die Ventileinstellung B dient der Probenanalyse. Das in der Probenschleife befindliche Probenvolumen wird durch das gleichzeitige Einströmen von Trägergas in die MCC gespült. Im Anschluss daran gelangt die Probe in das IMS, und das Spülgas entweicht als Abgas. Es erfolgt die Auswertung. Die Abbildung 4 stellt das verwendete MCC-IMS schematisch dar.

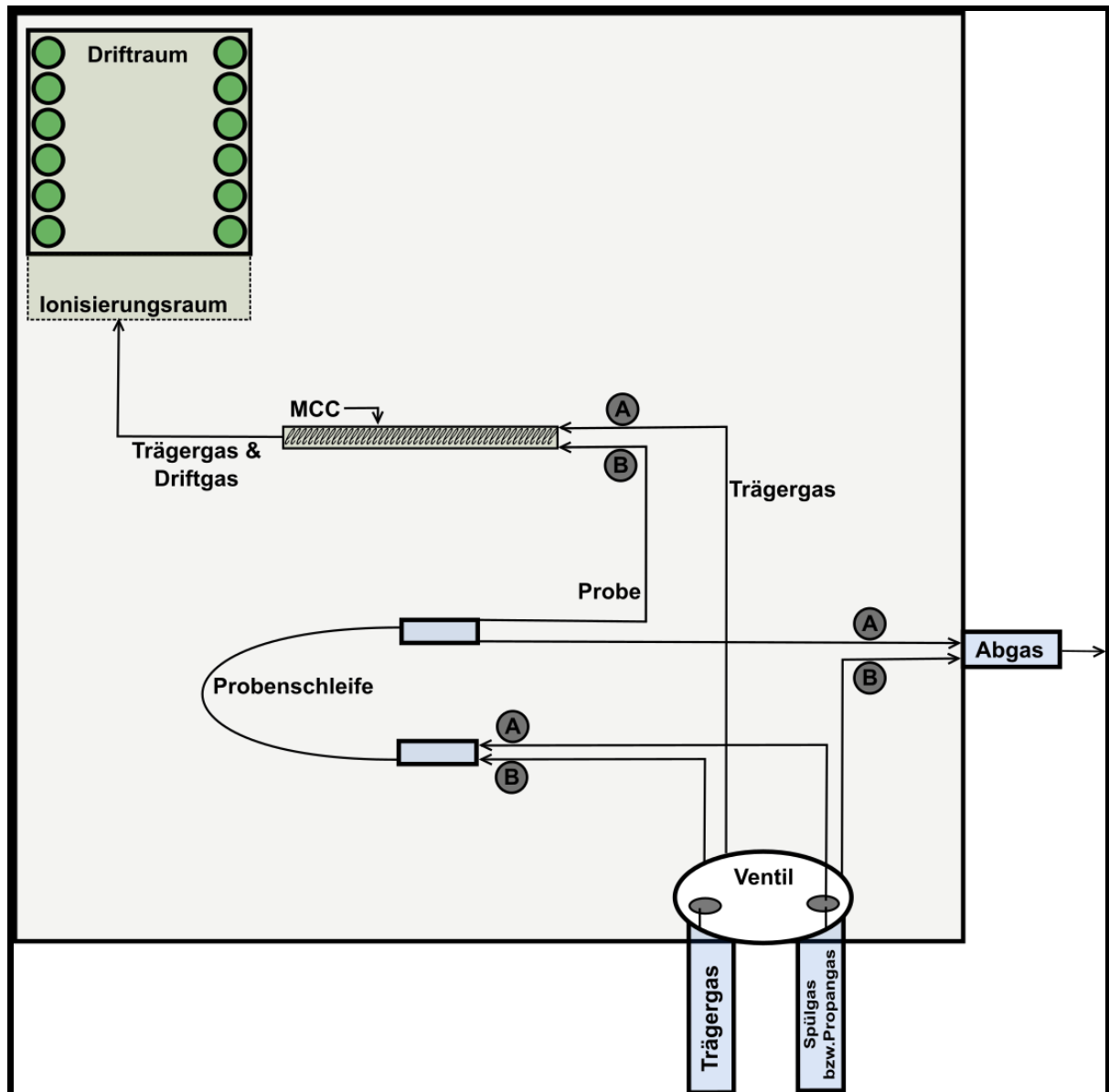


Abbildung 4 Schematische Darstellung des verwendeten MCC-IMS.

2.4 Experimenteller Versuchsablauf

2.4.1 MCC-IMS

Zu Beginn einer Messreihe wurden die Gasflüsse aller Anschlussleitungen mit Hilfe eines Gasflussmessers überprüft und gegebenenfalls nach Tabelle 4 korrigiert.

Als Spülgas wurde synthetische Luft für eine aerobe Messung bzw. Stickstoff für eine anaerobe Messung verwendet. Die Messungen waren stets von 10-minütiger Dauer.

Eine Versuchsreihe begann bei positiver Polarität mit einer Geräteleerlaufmessung (FN+) mit dem gewählten Probengas (synthetische Luft bzw. Stickstoff) ohne An-

schluss an die Messkammer. Dieser Schritt dient zur Reinigung vor einer möglichen Kontamination und zur Auswertung einer sogenannten Null-Referenz.

Drift- und Trägergas	Synthetische Luft
Driftgasfluss	100 ml/min
Driftspannung	4,0 kV
Driftstreckenlänge	12 cm
Driftzeit, maximal	50 ms
Druck	Umgebungsdruck
Elektrische Feldstärke	330 V/cm
Gitterimpuls	100 ms
Gitteröffnungszeit	300 μ s
Ionisationsquelle	⁶³ Nickel β -Strahler, 550 MBq
MCC-Säulentemperatur	40 °C
Polarität	positiv bzw. negativ
Temperatur	Umgebungstemperatur
Trägergasfluss	150 ml/min
Vortrennung	Multikapillarsäule OV-5,

Tabelle 4 Am MCC-IMS verwendete Einstellung der Versorgungseinheit und der Säulenheizung.

Im Weiteren wurde eine Messung der unbestückten Messkammer durchgeführt. Im Anschluss wurde eine unbeimpfte COS-Agar-Platte für fünf Minuten in die Messkammer inkubiert und es erfolgte eine Messung sowohl bei positiver als auch bei negativer Polarität (COS+, COS-). Dieser Vorgang diente der Erfassung der im Agar enthaltenen Volatile. Die Probenluft wurde mit Hilfe einer integrierten Pumpe für drei Sekunden in das IMS gezogen.

Die auf dem Blutagar zuvor bei 37 °C für 24 Stunden inkubierte Bakterienkultur, wurde in die vorgewärmte (37 °C) Messkammer eingebracht. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Messung zweimal bei positiver (t5+, t7+) Polarität durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde für jeden Keim drei Mal wiederholt und im Anschluss erfolgte die Messung bei negativer Polarität (Abb. 5).

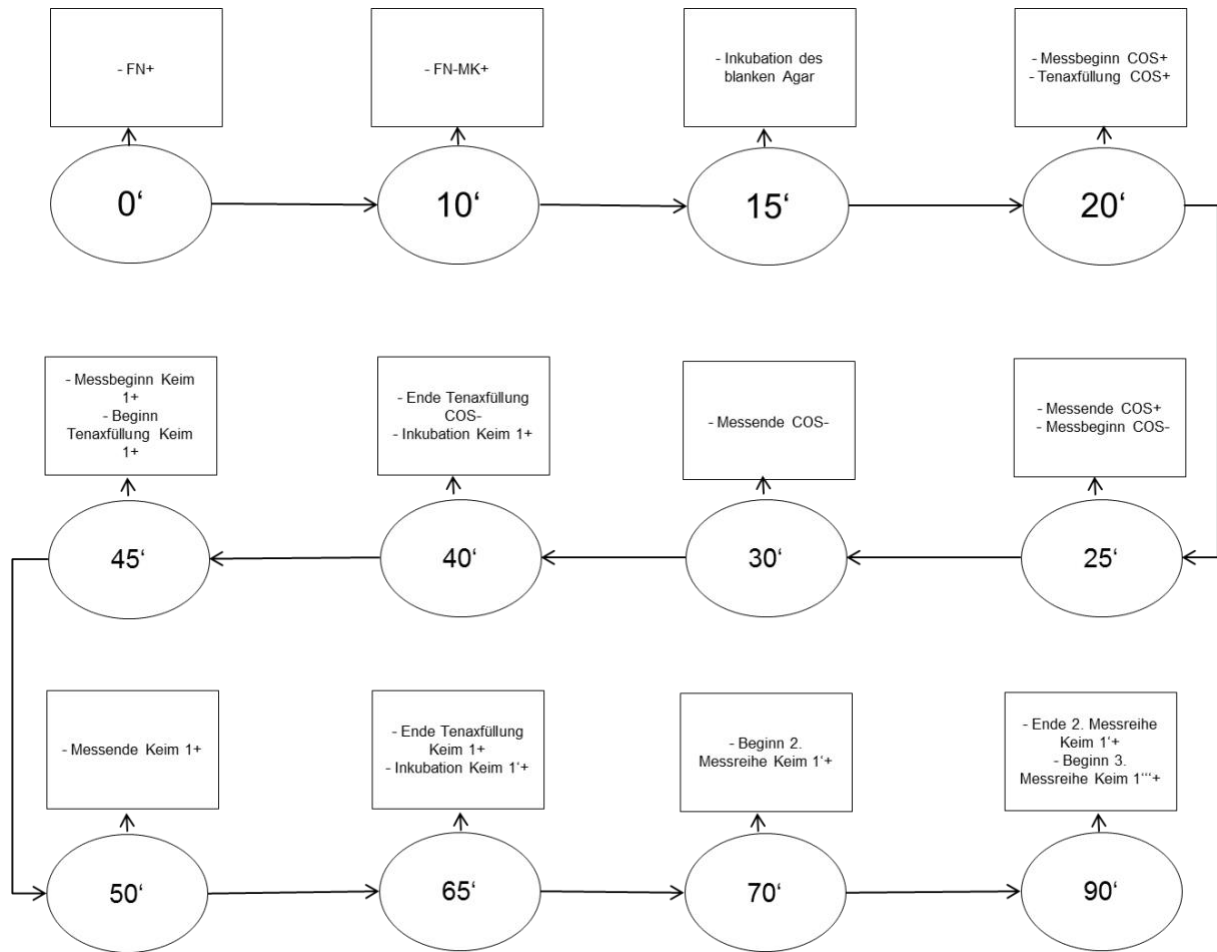


Abbildung 5 Flowchart. Zeitliches Schema des Versuchablaufs. Zunächst erfolgte die Leerlaufmessung, dann erfolgte die Bestimmung der Volatile im blanken Blutagar. Nach drei Messreihen wurde der Versuch bei negativer Polarität durchgeführt.

Sowohl nach der COS+ als auch nach der t5+ Messung, wurden die oben beschriebenen Tenaxröhrchen für 20 Minuten mit einem Durchfluss von 2 Litern (100 ml/min) hinter die Messkammer zwischengeschaltet.

2.4.2 Thermodesorption Gaschromatograph-Massenspektrometer (TD-GC-MS)

Die volatilen Substanzen wurden thermisch aus dem Tenaxmaterial (Tenax™) mit dem folgenden Temperaturprogramm desorbiert. Die initiale Temperatur von 25 °C wurde sekundlich um 30 °C bis zu einem Maximum von 250 °C erhöht und dann für 2,5 Minuten gehalten.

Die Probe wurde im Anschluss mit Helium als Trägergas und einem Fluss von 60 ml/min für zwei Minuten in den Gaschromatographen eingelassen.

Die volatilen Analyte wurden dann bei 300 °C in einem integrierten Cool-Injektorsystem (CIS; GERSTEL & Co. KG, Mühlheim, Deutschland) transferiert und bei –120 °C fixiert. Das CIS wurde pro Minute um 12 °C bis zum Erreichen von 250 °C aufgeheizt und die Temperatur für 10 Minuten konstant gehalten. Zur Analyse erfolgte die Weiterleitung der Bestandteile in eine HP-5MS-Kapillarsäule (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm Schichtdicke; *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). Die Analyse im GC-MS erfolgte nach dem folgenden Temperaturschema. Die initiale Temperatur des Gaschromatographen von 35 °C wurde für zwei Minuten gehalten und im Weiteren um 7°C die Minute bis zur Temperatur von 250 °C erhöht und dann für sieben Minuten gehalten. Die Trennung der Analyte erfolgte bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min mit Helium als Trägergas. Die Elektronenionisation wurde bei 70 eV durchgeführt und es wurden Molekülmassen zwischen 33-450 m/z erfasst.

2.5 Datenerfassung und Verarbeitung

Die Steuerung der Probenentnahme sowie die Erfassung der Daten wurden über ein Notebook (IBM, Lenovo R60) mit einer im ISAS entwickelten Bedienungssoftware (qIMS v0.29) gesteuert.

Die erzeugten Signale der Faraday-Platte lagen lediglich im Nanoampere-Bereich, so dass zur Signalverstärkung ein im ISAS entwickelter 1010-Volt/Ampere-Strom-Spannungswandler eingesetzt wurde. Die Digitalisierung der Signale erfolgte durch eine Analog-Digital-Wandlerkarte (usbADC3, Entwicklung ISAS) und wurden im Anschluss über einen *Universal Serial Bus* (USB) übermittelt. Die Auswertung der erfassten Ergebnisse als *comma separated values-files* gelang mit Hilfe einer Auswertungs- und Visualisierungssoftware (BB_IMSAnalyse v1.0, Entwicklung ISAS).

2.5.1 Visualisierung

Die erhaltenen Datensätze geben Informationen über die Signalintensität, die Ionenmobilität und die Retentionszeit.

Die Ionenmobilität wird durch die Visualisierungssoftware als inverse reduzierte Ionenmobilität $1/K0$ [vs/cm^2] dargestellt, wobei $1/K0$ proportional zur tatsächlich erfassten Driftzeit ist. Die Signalintensität wird in Volt [V] sowie die Retentionszeit in Sekunden [s] angezeigt. Die Daten werden zweidimensional dargestellt (Bödeker et

al. 2008a), wobei die x-Achse die reduzierte Ionenmobilität $1/K_0$ und die y-Achse die Retentionszeit anzeigt.

2.5.2 Normierungsprozesse

Die Spektren unterlaufen verschiedene Normierungsprozesse, um eine hohe Validität und Reliabilität sicherzustellen.

Schon während der Datenerfassung findet die Normierung der reduzierten Ionenmobilität durch die Bedienungssoftware qIMS statt. Aus diesem Grund wird die reduzierte Ionenmobilität K_0 der Reaktionsionen als konstant angesehen. Der Reaktionsionenpeak wird bei jeder Messung mit Hilfe der verwendeten Software auf eine identische K_0 normiert. Damit konnte für zahlreiche Substanzen eine genauere Identifikation der substanzspezifischen reduzierten Ionenmobilität erreicht und die Standardabweichung der zu analysierenden Substanzen minimiert werden (Vautz et al. 2009).

Durch die oben erwähnte Auswertungs- und Visualisierungssoftware BB_IMSAnalyse werden Signalintensität und Retentionszeit normiert. Als Referenz und Normierung wurde das Signal von Benzothiazol verwendet, da es in der verwendeten synthetischen Luft als Kontaminant enthalten war. Benzothiazol hat eine mittlere Retentionszeit bei o. g. Geräteeinstellung bei 118,3 Sekunden. In verschiedenen Analysen konnte in dem Retentionszeitbereich von Benzothiazol keine andere Substanz beobachtet werden.

Die Software berechnet das Signalmaximum im Bereich von Benzothiazol und unifiziert dieses mit der mittleren Retentionszeit von Benzothiazol (Perl et al. 2010).

Die Signalintensität eines kompletten Spektrums wird auf die Intensität des Reaktionsionenpeaks von 1,0 Volt normiert.

Die jeweiligen Normierungsprozesse von Signalintensität, Retentionszeit und reduzierter Ionenmobilität werden als *Alignment* zusammengefasst (Perl et al. 2010).

Zur besseren Präzision der erhaltenen Peaks durchlaufen die ermittelten Datensätze maschinell weitere Normierungsprozesse.

Des Weiteren sind mathematische Algorithmen (Bader et al. 2008) eingesetzt worden, um Substanzen von geringer Menge und folglich nur geringer Signalintensität zu detektieren.

2.5.3 MCC-IMS-Datenanalyse

Das schon oben erwähnte Programm BB_IMSAnalyse ermöglicht den direkten Vergleich mehrerer Spektren. Dazu wird ein als IMS-Set bezeichneter Datensatz aus den ermittelten Spektren gebildet. Die zuvor vom Anwender manuell markierten Regionen in den Spektren werden in wenigen Sekunden mit den Spektren des gesamten Datensatzes durch die Software verglichen. Innerhalb der zuvor markierten Region wird die maximale Signalintensität mit der dazugehörigen Retentionszeit und der reduzierten Ionenmobilität ermittelt. Die Abbildungen 6, 7 und 8 zeigen eine Visualisierung der Ergebnisse der drei Bakterien. Das Ziel der Analyse ist zu prüfen, ob identische Substanzen in den jeweiligen Proben vorhanden sind bzw. welche Intensitäten sie zeigen (Bödeker et al. 2008b).

2.5.4 TD-GC-MS Datenanalyse

Ausgeführt wurde die TD-GC-MS-Analyse mit einer *Agilent Technologie 7890A GC-System* verbundenen mit einer *Agilent Technologie 5975C inerten XL Mass selective detector* (MSD; *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). Die Ergebnisse der Gaschromatographie wurden mittels *AMDIS/NIST (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System; version 2.62, 2005; NIST version 2.0, 2005)* verglichen und konnten im besten Fall die Volatile der Bakterien identifizieren.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden volatile Metabolite von drei Bakterienarten (*S. aureus*, *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae*) unter Anwendung eines MCC-IMS analysiert. Im Weiteren wurde untersucht, ob anhand dieser Volatile ein bakterienspezifischer „Fingerabdruck“ erstellt werden kann, womit die o. g. Keime differenziert und identifiziert werden können.

Zusätzlich sind die genannten Keime im GC-MS analysiert worden, um Signale (Peaks), die mittels MCC-IMS nicht bestimmt werden konnten, zu identifizieren, zu bestätigen bzw. weitere Substanzen zu ermitteln. Denn durch die erhaltenen Retentionszeiten beider gaschromatographischer Methoden lässt sich durch mathematische Formeln die Retentionszeit einer Substanz des einen Verfahrens auf das andere gaschromatographische Verfahren umrechnen (Jünger et al. 2010). Das erleichtert die Identifizierung der volatilen Substanzen. Die GC-MS-Untersuchungen sind als sekundäres Ziel anzusehen.

3.1 Bestimmung der volatilen Metabolite von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* mittels MCC-IMS

Nach 24-stündiger Inkubation zeigten alle drei Bakteriengattungen in der MCC-IMS sowohl in negativer als auch in positiver Polarität messbare volatile Metabolite (Tabelle 5). Die durch die MCC-IMS erhaltenen charakteristischen Volatile sind fortlaufend nummeriert und im Folgenden durch den Substanznamen und durch die Zahlen 1 bis 4 entsprechend Tabelle 5 benannt worden. Drei der vier spezifischen Substanzen, die als charakteristisch anzusehen sind, konnten chemisch bisher nicht identifiziert werden. Daher werden diese Volatile nach ihrer Lage im 2D-topographischen Plot als $p_{(1000 \times \text{inverse Ionenmobilität})_Retentionszeit}$ (z. B. p_{599_10}) bezeichnet.

Die erhaltenen MCC-IMS-Retentionszeiten wurden zum besseren Datenvergleich an die Retentionszeit von Benzothiazol (118,3 Sekunden) normalisiert.

Das Ergebnis erbrachte insgesamt vier signifikante Volatile sowohl im negativen als auch im positiven Modus des MCC-IMS. Diese vier Substanzen konnten bei den Kontroll-Messungen des reinen Blutagars nicht beobachtet werden.

Nummer	Substanz	P. aeruginosa	S. aureus	S. pneumoniae	Polarität
Nr. 1	Ethanol	x	xx		positiv
Nr. 2	p_711_3	x			
Nr. 3	p_572_8		x	x	negativ
Nr. 4	p_599_10		x		
Anzahl		2	3	1	

Tabelle 5 Detektierte Bakterienmetabolite mittels MCC-IMS mit negativer und positiver Polarität [je 3 Messungen]. Die VOCs wurden aus dem Headspace-Volumen des entsprechenden Keims analysiert. Das Vorkommen einer Substanz wurde mit einem „x“ bzw. bei stärkerem Vorkommen mit einem „xx“ markiert.

S. aureus emittierte drei (Ethanol, p_572_8, p_599_10) und P. aeruginosa zwei (Ethanol, p_711_3) individuelle Substanzen. Eine charakteristische Substanz konnte bei S. pneumoniae (p_572_8) analysiert werden (Tabelle 5).

Ethanol wurde im positiven Modus bei P. aeruginosa und in höherer Konzentration bei S. aureus beobachtet. Aus diesem Grund kann Ethanol nicht zur Differenzierung zwischen den beiden Keimen herangezogen werden.

3 Ergebnisse

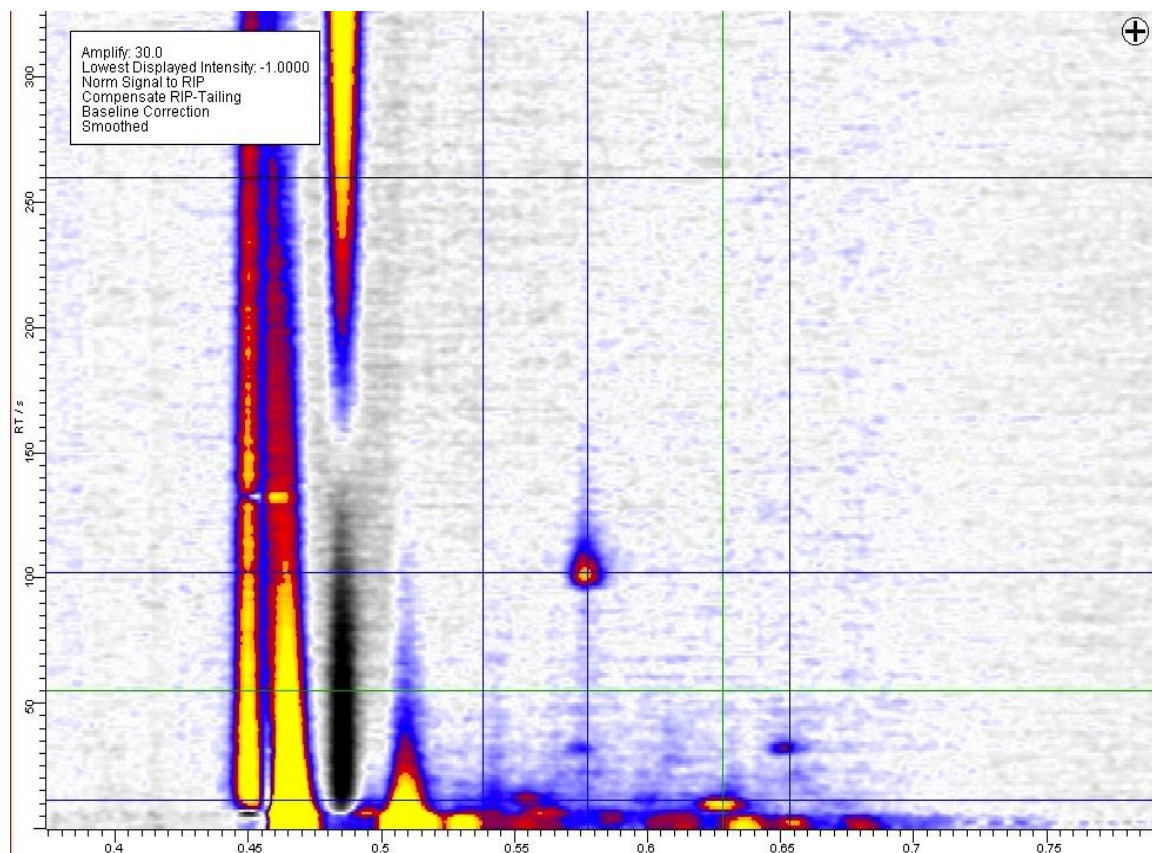


Abbildung 6 Zweidimensionale Darstellung der Messergebnisse von *P. aeruginosa* bei positiver Polarität des BB_IMSAnalyse-Programms. Die x-Achse stellt die reduzierte Ionenmobilität ($1/K_0$ Vs/cm²), die y-Achse die Retentionszeit in Sekunden dar (RT/s).

Als spezifisches Volatil emittiert *P. aeruginosa* Substanz p_711_3 im positiven Modus. Im negativen Modus konnten keine charakteristischen Metabolite beobachtet werden. Abbildung 6 zeigt die zweidimensionale Darstellung von *P. aeruginosa*.

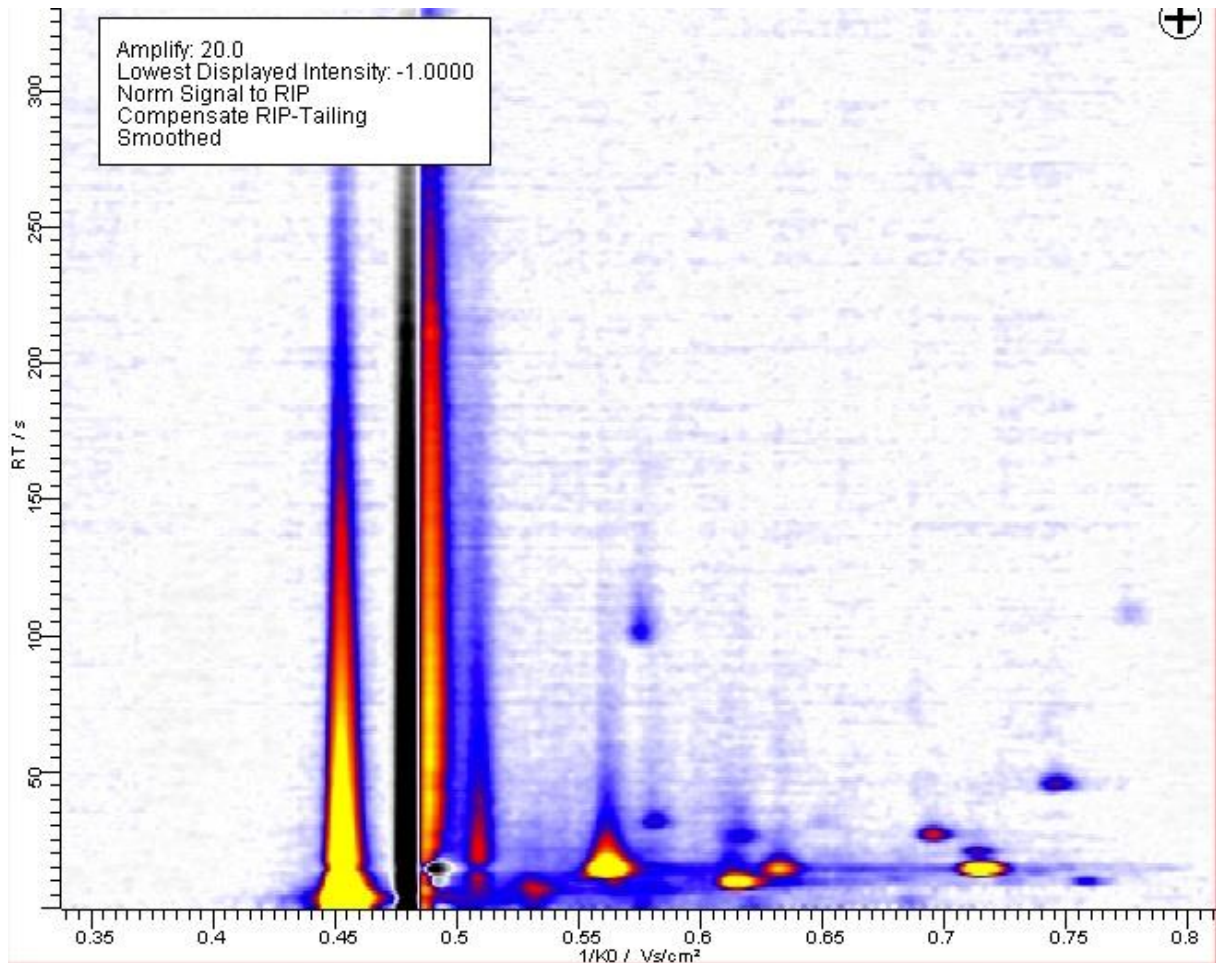


Abbildung 7 Zweidimensionale Darstellung der Messergebnisse von *S. pneumoniae* bei positiver Polarität des BB_IMS-Analyse-Programms. Die x-Achse stellt die reduzierte Ionenmobilität ($1/K_0$ [Vs/cm^2]), die y-Achse die Retentionszeit in Sekunden dar (RT/s).

S. pneumoniae zeigt ebenfalls nur ein individuelles Merkmal- p_572_8. Dieses konnte im Vergleich zu *P. aeruginosa* im negativen Modus detektiert werden. Die Abwesenheit von p_599_10 ermöglicht die Differenzierung zu *S. aureus*. Bei positiver Polarität konnten keine Substanzen festgestellt werden. Abbildung 7 zeigt die zweidimensionale Darstellung von *P. pneumoniae*.

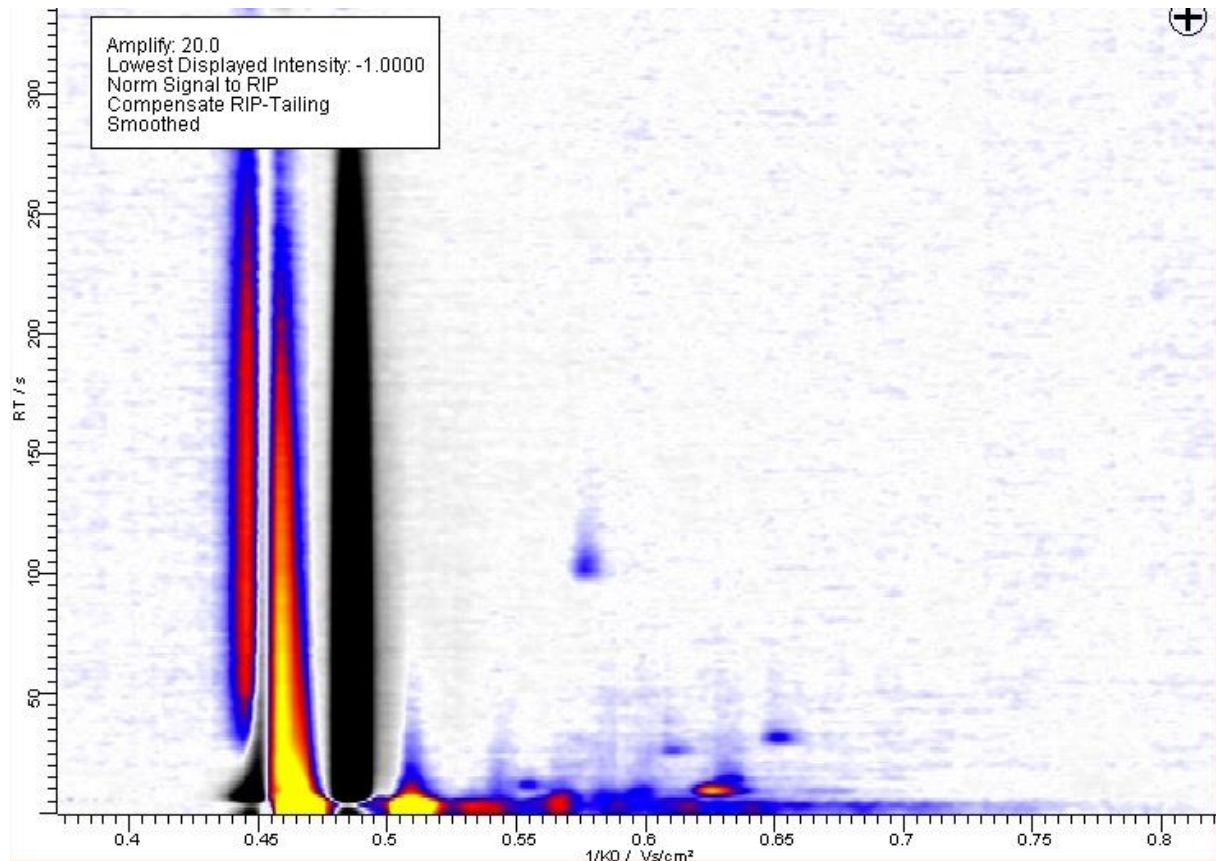


Abbildung 8 Zweidimensionale Darstellung der Messergebnisse von *S. aureus* bei positiver Polarität des BB_IMS-Analyse-Programms. Die x-Achse stellt die reduzierte Ionenmobilität ($1/K_o$ [Vs/cm^2]), die y-Achse die Retentionszeit in Sekunden dar (RT/s).

Bei *S. aureus* wurde neben Ethanol im positiven Modus p_572_8 und p_599_10 als charakteristische Volatile in negativer Polarität gemessen. Abbildung 8 zeigt die zweidimensionale Darstellung von *S. aureus*.

Die Untersuchung der humanpathogenen Erreger *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* zeigt, dass alle drei Keime individuelle volatile Metabolite produzieren. Anhand dieser drei individuellen Fingerabdrücke ist eine Differenzierung der Pathogene mit Hilfe der MCC-IMS möglich.

Prinzipiell handelt es sich bei dieser Methode um eine phänotypische Bakterienbestimmung.

3.2 Vergleich der volatilen Ergebnisse der MCC-IMS-Analysen von *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* und des Columbia-Schafblutagar

Die MCC-IMS-Analysen des blanken Schafblutagars zeigen ebenfalls messbare volatile Substanzen.

Ein Vergleich der Volatile der Bakterien und der des Blutagars ergab zum Teil identische Metabolite. Aus diesem Grund konnten Substanzen, die im Blutagar beobachtet worden sind, nicht in der Auswertung berücksichtigt werden und dienen weder der Differenzierung noch der Identifizierung der Keime.

3.3 Vorkommen von unspezifischen Volatilen im MCC-IMS

Neben den bisher genannten Substanzen wurden weitere VOCs gemessen, die nicht zur Unterscheidung der Bakterien herangezogen werden konnten.

Ein Grund war eine zu geringe Substanzkonzentration in der Headspace-Probe. Zum anderen wurde in einigen Fällen eine hohe Hintergrundsignalintensität durch den verwendeten Schafblutagar hervorgerufen, so dass eine Differenzierung der Komponenten nicht möglich war.

Ein Beispiel ist Ammoniak. Es wurde im positiven Modus des MCC-IMS bei allen drei Bakterienstämmen in hohen Intensitäten beobachtet. Allerdings lag das Signal in einem Bereich mit hoher Hintergrundsignalintensität und ist somit nicht zur quantitativen Auswertung geeignet.

3.4 TD-GC-MS-Analyse der VOCs von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. pneumoniae*

Die Analysen durch die TD-GC-MS validierten, dass eine Identifizierung und Differenzierung von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. pneumoniae* anhand ihres volatilen Profils möglich ist.

Ethanol konnte erst durch die ergänzende TD-GC-MS identifiziert werden. Anschließende Kontrollmessungen mit reinem Ethanol im MCC-IMS konnten das Ergebnis der TD-GC-MS bestätigen.

Nicht alle Substanzen, die in der MCC-IMS detektiert wurden, konnten in der GC-MS benannt bzw. bestätigt werden und umgekehrt.

Mit Hilfe der GC-MS wurden insgesamt neun charakteristische Metabolite bestimmt, die eine sichere Identifizierung der drei Keime ermöglichen. Im Folgenden werden die wichtigsten Metabolite hervorgehoben (Tabelle 6).

Nummer	Rt GC (min)	Substanz	P. aeruginosa	S. aureus	S. pneumoniae
Nr. 5	7.01	3-Methylbutanal	X	X	X
Nr. 6	8.48	Isoamylalkohol (3-Methyl-1-butanol)	X	X	X
Nr. 7	8.77	Dimethyldisulfid	X		
Nr. 8	12.8	2,5-Dimethylpyrazin		X	
Nr. 9	14.74	Benzonitril	X		X
Nr. 10	17.08	1-Undecene	X		
Nr. 11	17.10	2-Nonanone	X		
Nr. 12	18.32	Benzylnitril			X
Nr. 13	21.94	2-(3-Methylbutyl)-3,5-dimethylpyrazin	X		
		Anzahl der VOCs	7	3	4

Tabelle 6 Mittels GC-MS detektierte Metabolite der Bakterienproben. Die Substanzen wurden aus einem Headspace-Volumen von 2 Litern analysiert. Das Vorkommen einer Substanz wurde mit einem „X“ markiert.

Es konnten einige VOCs von den pathogenen Keimen analysiert werden, die über den reinen Columbia-Blutagar nicht beobachtet worden sind. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Volatile aus der endogenen Produktion der Bakterien stammen.

Ebenfalls wurde der reine Columbia-Blutagar durch die GC-MS analysiert (Tabelle 7). Das Vorkommen dieser Volatile im Metabolitenprofil der Bakterien ist für die Identifizierung und Differenzierung irrelevant und muss als Kontamination durch den Blutagar gewertet werden.

Die Analysen der GC-MS waren nicht primäres Ziel dieser Arbeit. Daher wird auf die Ergebnisse hinsichtlich der Unterschiede zwischen den einzelnen Keimen nicht weiter eingegangen.

Substanz	Retentionszeit (Rt) in Minuten
Cyclohexanol	12,17
Styrol	12,35
Cyclohexanon	12,45
Benzaldehyd	14,14
2-Ethyl-1-Hexanol	15,61
Azetophenon	16,68

Tabelle 7 Detektierte Volatile des Columbia-Blutagars durch das GC-MS.

4 Diskussion

Die Diagnostik von humanpathogenen Keimen bei infektionsverdächtigen Patienten dauert in der Regel zwei bis vier Tage. In den meisten Fällen, gerade im Hinblick auf kritisch kranke Intensivpatienten mit dem klinischen Bild einer Sepsis, wird ohne Abwarten des mikrobiologischen Befundes eine breite, kalkulierte Antibiotikatherapie begonnen. Im schlechtesten Fall ist die Antibiotikawahl inadäquat und die Wahrscheinlichkeit zu überleben sinkt für den septischen Patienten um das 5-Fache (Kumar et al. 2009).

Nach Erhalt des Antibiogramms wird ggf. auf ein dem Keim entsprechendes Antibiotikum eskaliert bzw. auf ein Antibiotikum mit schmalereem Wirkspektrum deeskaliert, um einer möglichen Resistenzentwicklung entgegenzuwirken.

Die weltweite Resistenzentwicklung von pathogenen Keimen nimmt im Verhältnis zu neu entwickelten Antibiotika weiter zu.

Die Sepsis zählt zu den ältesten beschriebenen Krankheitsbildern. Der griechische Arzt Hippokrates beschrieb die Sepsis vor mehr als 2000 Jahren als: „Fieber, das verursacht wird durch eine Materie, die fault.“ Die Letalität und Morbidität der Sepsis ist weiter hoch. Sie wird ca. 62.000-90.000 Mal pro Jahr in Deutschland diagnostiziert, mit einer Letalität von 48-55% (Engel et al. 2007).

Das verdeutlicht, dass eine schnelle und effiziente Erregerbestimmung für das Outcome der Patienten wichtig ist.

Die Anwendung des MCC-IMS ermöglicht eine schnelle Differenzierung von Pathogenen anhand ihrer Stoffwechselprodukte. Es ergänzt und verbessert konventionelle Techniken, wie z. B. das Anlegen von Bakterienkulturen oder die Gramfärbung.

In der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob eine Bestimmung der volatilen Metabolite von *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* und *S. aureus* mit der Methode der MCC-IMS möglich ist und ob mittels eines spezifischen „Fingerabdrucks“ diese drei Bakterien voneinander differenzier- und identifizierbar sind.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Unterscheidung der auf Columbia-Blutagar wachsenden pathogenen Keime möglich ist. Nach 24-stündiger Inkubation der Bakterien konnte sowohl mit der MCC-IMS als auch mit der TD-GC-MS anhand des metabolischen Profils eine Differenzierung der Bakterien vorgenommen werden.

Die Trennung der Volatile im elektrischen Feld des IMS sollte mit beiden Polaritäten durchgeführt werden. Diese ist für eine sensitivere Keimdifferenzierung entscheidend. Messungen mit lediglich einer Polarität zeigen eine geringere Aussagekraft (Kunze et al. 2013). Eine höhere Reliabilität ist im positiven Modus zu erreichen und daher im Fokus der aktuellen Forschungen.

4.1 Differenzierung und Identifizierung der Mikroorganismen anhand ihrer volatilen Metabolite mittels MCC-IMS

Für alle drei untersuchten Mikroorganismen zeigte sich ein individuelles Profilmuster, durch das eine Keimdifferenzierung erfolgen konnte. Es handelt sich bei dieser Methode um eine phänotypische Bestimmung.

Die Bestimmung der spezifischen Retentions- und Driftzeiten der MCC-IMS ist essenziell, um eine eindeutige Identifizierung der Substanzen vornehmen zu können. Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten können nur erschwert oder gar nicht bestimmt werden, da es zu einer Überlagerung der Signalpeaks kommen kann.

4.1.1 Unspezifische Volatile der Keime

Ammoniak ist eine Stickstoffverbindung und wurde über allen drei Bakterienstämmen beobachtet. Es zählt zu einem Abbauprodukt von Tryptophan, einer essenziellen Aminosäure. Die größte Menge bildete *S. aureus*. *S. pneumoniae* zeigte geringe Mengen an Ammoniak. Durch das ubiquitäre Vorkommen kann die Stickstoffverbindung nicht zur Unterscheidung herangezogen werden.

Ammoniak ist wegen seiner hohen Flüchtigkeit und einem niedrigen Molekulargewicht prinzipiell schwer zu erfassen (Schulz und Dickschat 2007).

Benzothiazol konnte bei allen drei untersuchten Pathogenen hervorragend von anderen auftretenden VOCs unterschieden werden. Das sowohl stickstoff- als auch schwefelhaltige Benzothiazol stellte sich als Verunreinigung des verwendeten synthetischen Gases heraus. Folglich konnte es nicht in die Auswertung mit

einbezogen werden. Einige Autoren (Dunkel et al. 2009, Schulz und Dickschat 2007) ordneten Benzothiazol als Bakterienmetabolit zu.

Um die Retentionszeiten der MCC zu vereinheitlichen und einen besseren Vergleich der Daten zu ermöglichen, wurde Benzothiazol- bereits von Perl et al. (2010) beschrieben- zur Normalisierung der Retentionszeiten genutzt.

Über *P. aeruginosa* wurde eine weitere schwefelhaltige Substanz detektiert: Dimethylsulfid. Das entsprechende Signal lag eng am Spektrum des von Ethanol, so dass es partiell zur Überlagerung dieser beiden Substanzen gekommen ist. Folglich war die Detektion von Dimethylsulfid erschwert. Bei *P. aeruginosa* konnte die Substanz nur in geringen Mengen gemessen werden.

4.1.2 Keimidentifizierung anhand der emittierten VOCs

Ethanol, als bekanntes Fermentationsprodukt von Bakterien, ist lediglich mit der Technik der GC-MS detektiert worden. Die Kontrolle der Ethanol-Referenzsubstanz im MCC-MS bestätigt das Ergebnis der GC-MS. Ethanol konnte sowohl bei *S. aureus* als auch bei *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.

Durch das Fehlen von Ethanol bei *S. pneumoniae* war eine Abgrenzung zu *S. aureus* möglich. Beide Keime produzieren bei negativer Polarität eine bislang unbekannte Substanz: p_572_8. Somit ist Ethanol eine Differenzierungshilfe zwischen diesen beiden grampositiven Kokken.

Die bisher ebenfalls noch unbekannte Substanz p_599_10 wurde ausschließlich von *S. aureus* in negativer Polarität gemessen. Diese kam in geringerer Konzentration als Ethanol vor.

P. aeruginosa produzierte als einziges Bakterium p_711_3 in positiver Polarität, so dass eine einfache Abgrenzung zu *S. aureus* und *S. pneumoniae* möglich ist.

Insgesamt konnten vier spezifische Volatile bestimmt werden, die der Identifizierung und Differenzierung der Keime dienen.

4.2 Die Bedeutung von Driftzeit und Retentionszeit

Die auftretenden MCC-IMS-Signale werden nach ihren Drift- und Retentionszeiten bezeichnet. Bereits namentlich identifizierte Substanzen können auf diese Weise zugeordnet werden. Die MCC-IMS-Ergebnisse wurden mit einer Datenbank des

ISAS (*Leibniz-Institute for Analytical Sciences-ISAS-e.V.*, Dortmund, Deutschland) verglichen. Diese enthält Referenzwerte von bereits ermittelten Substanzen. Ethanol konnte auf diese Weise bestätigt werden.

Andere, noch nicht identifizierte Metabolite, wurden nach ihrer Lage im 2D-topographischen-Plot nach der inversen Ionenmobilität und Retentionszeit bestimmt (siehe oben). Bisher war es nicht möglich, den Signalen p_572_8, p_599_10 und p_711_3 die entsprechende Substanz zuzuweisen zu können.

Die exakte Bestimmung der spezifischen Retentions- und Driftzeiten ist essenziell, um die Signalpeaks einem Stoff eindeutig zuzuweisen.

Die Vergrößerung und die Entwicklung der MCC-IMS-Datenbank des ISAS ist wichtig, um bisher nicht namentlich identifizierte Substanzen benennen zu können. Die Bakterienidentifizierung und -differenzierung könnte dadurch effizienter und valider werden.

4.3 Vorkommen von Dimeren

Eine interessante Beobachtung war das Vorkommen von Dimeren. Die Ionisierung mit ^{63}Ni führt zu Protonen-gebundenen Monomeren. Unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei Vorliegen von VOCs in hohen Konzentrationen, kann es zur Bildung von Protonen-gebundenen Dimeren bzw. Trimeren kommen (Borsdorf and Eiceman 2006). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Substanz p_599_10 das jeweilige negative Dimer von p_572_8 ist. Interessanterweise wurde p_599_10 ausschließlich von *S. aureus* emittiert, obwohl p_572_8 ebenfalls von *S. pneumoniae* produziert wurde.

4.4 Das MCC-Ionenmobilitätsspektrometer und das Gaschromatograph-Massenspektrometer im Vergleich

4.4.1 Technische Unterschiede zwischen MCC-IMS und TD-GC-MS

Beide Verfahren sowohl die MCC-IMS als auch die GC-MS sind in der Analyse von Volatilen gut etabliert. Beide Techniken ergänzen sich hervorragend in Bezug auf mikrobielle volatile Metabolite.

Die Tabelle 8 stellt die bedeutendsten Eigenschaften der MCC-IMS und der GC-MS gegenüber.

Eigenschaften	MCC-IMS	TD-GC-MS
Dauer der Probenanalyse	10 Minuten	60 Minuten
Dauer der Probenentnahme	5 Minuten	20 Minuten
Datenanalyse (Referenzdatenbank)	ca. 120 Substanzen (Datenbank ISAS)	> 190.000 Substanzen (NIST Standard-Referenzdatenbank)
Molekulargewicht, messbar	ca. 17-180 g/mol	ca. 85-200 g/mol
Probenvolumen	10 ml	2 Liter
Probenvorbereitung	nicht notwendig	notwendig, z. B. Tenax
Temperatur	isotherm bei 40 °C	35 °C bis 250 °C
Vakuum	nicht notwendig	notwendig

Tabelle 8 Die wichtigsten Unterschiede zwischen der MCC-IMS und der TC-GC-MS (Jünger et al. 2012).

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Techniken wurden einige Substanzen durch das MCC-IMS, andere ausschließlich mit der thermischen Desorptions-GC-MS gemessen. Als Beispiel sei das bereits erwähnte Ethanol mit einer Masse von 46,07 g/mol zu nennen, welches erst in der GC-MS identifiziert werden konnte. Eine Kontrolle mit einer Referenzsubstanz von Ethanol durch die MCC-IMS bestätigte das Ergebnis.

Ein markanter Unterschied der Geräte ist der Faktor Zeit. Das MCC-IMS benötigt für eine Probenanalyse ca. 15 Minuten, während die Analyse mittels GC-MS ca. 100 Minuten dauert.

Ein großer Vorteil der MCC-IMS ist die Mobilität und der geringe Platzbedarf. Diese Vorteile würden ein Bedside-Verfahren zur schnelleren Erregerdiagnostik begünstigen.

Bisher sind ca. 190.000 Substanzen in der NIST zur Interpretation der GC-MS Ergebnisse hinterlegt. Die Referenzdatenbank ist damit deutlich größer als die der MCC-IMS-Datenbank des ISAS (ca. 120 Substanzen). Aus diesem Grund ist die zeitaufwendigere GC-MS aktuell nicht aus der Forschung wegzudenken.

Die MCC-IMS bietet eine leistungsstarke Trennung von kleineren Molekülen aus komplexen Gasgemischen mit einem Molekulargewicht ab ca. 17 g/mol. Dies ist von

Vorteil, da Substanzen mit einer Retentionszeit von unter 3 Minuten häufig ein geringeres Molekulargewicht besitzen.

Die starke Trennfähigkeit basiert auf der doppelten Separation im MCC-IMS. Zuerst erfolgt die chromatographische Trennung in der Multikapillarsäule und im Anschluss erfolgte eine erneute Trennung im Driftraum. Allerdings können ausschließlich ionisierbare, volatile Substanzen im IMS-Driftraum beschleunigt und letztendlich auch durch die Software dargestellt werden.

Die GC-MS besitzt die Fähigkeit, Substanzen ab ca. einer Größe von ca. 85 g/mol zu bestimmen. Stoffe, mit geringerer Masse, werden in der TD-GC-MS häufig nicht berücksichtigt. Auf diesem Weg können Störfaktoren wie z. B. Sauerstoff und Wasser vermieden werden. Eine strikte Aussage über den Bereich, in dem Volatile in der TD-GC-MS nachgewiesen werden können, ist allerdings nicht möglich. Als Beispiel ist Ethanol mit einem Molekulargewicht von 46,07 g/mol zu nennen, welches zunächst durch die GC-MS identifiziert werden konnte.

Der Einsatz der GC-MS empfiehlt sich zur wichtigen Ergänzung in der Bestimmung von Stoffen, welche möglicherweise durch das MCC-IMS nicht detektiert oder nicht benannt werden konnten.

4.4.2 Analyse mittels GC-MS

Die Identifizierung von unbekanntem Substanzen unter Anwendung der GC-MS wurde als sekundäres Ziel meiner Arbeit angesehen. Mit Hilfe der GC-MS konnte eine Differenzierung der Keime erfolgen.

Dimethyldisulfid, mit einer molaren Masse von 94,20 g/mol, konnte durch die GC-MS bestimmt werden. In der MCC-IMS zeigte es lediglich eine geringe Konzentration, so dass es nicht zur Differenzierung herangezogen werden konnte.

4.5 Limitationen

4.5.1 Technische Limitationen

Die durchgeführten Versuchsreihen wurden stets unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

4.5.1.1 Konstante Volumina der Bakterienprobe und des Gasflusses

Die Volumina waren stets gleich ohne Veränderungen der Messeinstellungen, z. B. das Probenvolumen von 10 ml oder der Probengasfluss von 100 ml/min. Bekannt ist, dass durch die Reduzierung des Gasflusses eine Konzentrationserhöhung der Volatile erzielt werden kann. Folglich würde man bei geringer Bakterienzahl und reduziertem Gasfluss ein valideres Ergebnis erhalten können.

In weiteren Untersuchungen müssen die MCC-IMS-Einstellungen optimiert werden, um bestmögliche Ergebnisse zu erhalten.

4.5.1.2 Einfluss der Temperatur

In der vorliegenden Arbeit wurden die Pathogene bei einem Temperaturoptimum von 37 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur kann von einer optimalen Enzymaktivität ausgegangen werden. Das Wachstumsverhalten ist bei einer alternativen Inkubationstemperatur unterschiedlich, so dass im Vergleich zur optimalen Inkubationstemperatur andere Metabolite detektiert werden könnten.

4.5.2 Nährmedium

In der vorliegenden Arbeit wurde in allen Messreihen ein Columbia-Schafblutagar (Ref.: 43049, Fa. BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) als Medium verwendet. Der Columbia-Schafblutagar ist ein Nährboden, der routinemäßig in klinischen Labors eingesetzt wird. Bekannt ist, dass dieser Agar die Wachstumsbedingungen und die Bildung von flüchtigen Substanzen stark beeinflusst (Wagner et al. 2003; Schulz und Dickschat 2007). Mit dem verwendeten Columbia-Schafblutagar konnte eine hohe Reliabilität der Ergebnisse erreicht werden.

Es lässt die Frage aufkommen, ob durch die Verwendung anderer Nährmedien ein verändertes Metabolitenprofil, z. B. durch veränderte Wachstumsbedingungen, entsteht.

Die Arbeit von Scotter et al. (2005) zeigt, dass von unterschiedlichen humanpathogenen Pilzen die Art und die Intensitäten der VOCs von dem verwendeten Kulturmedium abhängig war.

O'Hara und Mayhew (2009) beimpften *S. aureus* auf drei verschiedenen Nährböden. Es wurden keine Veränderungen der emittierten VOCs beobachtet. Allerdings waren

das zeitliche Auftreten und die Intensitäten der Volatile von den Nährmedien abhängig.

Aminoacetophenon (AA) wurde in früheren Studien (Allardyce et al. 2006; Zechman et al. 1986; Mann 1966; Cox und Parker 1979; Labows et al. 1980) bei *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. pneumoniae* als Metabolit identifiziert. AA ist für den charakteristischen Geruch von *P. aeruginosa* verantwortlich. Nach 20- bis 24-stündiger Inkubation kann ein Maximum dieser Substanz beobachtet werden (Cox und Parker 1979). Cox und Parker (1979) untersuchten das Vorkommen von AA mit der Verwendung von verschiedenen Nährböden. Bei der Untersuchung auf Blutagar erhielten sie im Vergleich zu den anderen Nährböden lediglich geringe Mengen von AA. Ein anderer Grund könnte die hohe Flüchtigkeit dieser Substanz sein (Zechman und Labows 1985). Zechman und Labows (1985) konnten AA in der AHC-GC nicht nachweisen.

Maddula et al. (2009) untersuchten die Ausscheidung der Volatile von *E. coli*. Es wurde ein optimal an *E. coli* angepasstes Minimalmedium verwendet, um unnötige Hintergrundsignale durch ein komplexes Nährmedium auszuschließen. Aus diesem Grund ergab sich ein verändertes Volatilenprofil im Vergleich zu anderen Studien (Kunze et al. 2013). Die Etablierung von speziellen Minimalnährmedien in die klinische Diagnostik ist unpraktisch und unrealistisch.

Der Einfluss von Nährböden auf die Produktion von Volatilen wurde in meiner Arbeit nicht untersucht. Es müssen weitere Untersuchungen mit verschiedenen Nährböden erfolgen, um das bestmögliche Nährmedium für die Bakterien zu finden und ein reproduzierbares, spezifisches Metabolitenprofil zu erhalten. Zur klinischen Etablierung muss ein universales Nährmedium eingesetzt werden. Individuelle bakterienspezifische Nährböden sind für eine adäquate Diagnostik nicht hilfreich und können falsch-negative Ergebnisse liefern.

4.5.3 Der Einfluss von Wachstumsphasen auf die Synthese von volatilen Substanzen

Bakterien besitzen unterschiedliche Wachstumsphasen, bestehend aus der Anlaufphase, der exponentiellen Phase, der stationären Phase und der Absterbephase. Jede Phase ist charakterisiert durch verschiedene Enzymaktivierungen und Enzymdeaktivierungen. Daher stellt sich die Frage, ob einige Substanzen ausschließlich in

bestimmten Wachstumsphasen emittiert werden und damit nur zu bestimmten Zeitpunkten gemessen werden können. In dieser Arbeit haben sich die Keime zum Zeitpunkt der Versuche in der Wachstumsphase befunden.

Kunze et al. (2013) untersuchten *E. coli* und *P. aeruginosa* zu vier verschiedenen Zeitpunkten mittels MCC-IMS, um Veränderungen der VOC-Intensität oder Veränderungen im Auftreten von VOCs während den verschiedenen Wachstumsphasen zu untersuchen. Sie beobachteten, dass *P. aeruginosa* sieben Substanzen mit zeitlichem Unterschied in Bezug auf Vorkommen und Signalintensität emittierte. Die meisten Veränderungen traten in der späten exponentiellen oder in der stationären Wachstumsphase auf. Zwischen den verschiedenen Stämmen einer Spezies wurden keine zeitlichen Veränderungen in Bezug auf das Vorkommen oder der Signalintensität der VOCs festgestellt. Es wurden Referenzstämme von *E. coli* und *P. aeruginosa* sowie infizierte klinische Proben mit diesen Keimen verwendet. Die Differenzierung von humanpathogenen Bakterien durch das MCC-IMS war in der späten Wachstumsphase am erfolgversprechendsten. *P. aeruginosa* erreichte die stationäre Phase nach ca. 11,6-stündiger Inokulation.

Es ist von Bedeutung, den bestmöglichen und individuellen Wachstumszeitpunkt der Keime zu kennen, um eine effiziente MCC-IMS-Analyse zu erhalten. Dadurch kann die Identifizierung der Pathogene an Sensitivität gewinnen.

4.5.4 Herkunft der Bakterienproben

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Reinkulturen der Bakterien verwendet. Damit die Technik der MCC-IMS an Sensitivität gewinnt, müssen weitere Untersuchungen mit klinischen Proben erfolgen. Im Idealfall muss Expirationsluft von Patienten mit einem unteren Atemwegsinfekt gewonnen werden, um z. B. eine Pneumonie mit dem ursächlichen Keim identifizieren zu können. Nur durch weitere In vivo-Untersuchungen kann die MCC-IMS Einzug in den klinischen Alltag finden. Bei den eingangs erwähnten Metaboliten (Tabelle 1) handelte es sich meist um klinische Proben (Schöller et al. 1997, Thadepalli et al 1982, Carrol et al. 2005), wodurch möglicherweise unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden konnten.

Kunze et al. (2013) hat in der schon erwähnten Arbeit neben den Reinkulturen von *P. aeruginosa* und *E. coli* klinische Bakterienproben (Urin, Blut, Trachealsekret, Wund-

abstrich, Abstrich von Ohr/Abdomen/Abszess/Leiste) verwendet. Das Metabolitenprofil der Keime war identisch.

Maddula et al. (2009) konnten bei der Untersuchung von nichtpathogenen Rekombinanten von *E. coli* kein Indol nachweisen. Indol reguliert jedoch die Biofilm-Bildung und zählt als pathogene Eigenschaft von *E. coli* (Martino et al. 2003).

Das Vorkommen verschiedener Bakterien (pathogen oder apathogen) in klinischen Proben könnte das Wachstum durch inhibitorische oder exzitatorische Proteine bzw. durch Kommensalismus beeinflussen.

4.5.5 Antibiotikaresistenzen und bestehende Antibiotikatherapie

Eine Bestimmung von Antibiotikaresistenzen ist mit dem Verfahren der MCC-IMS bisher nicht möglich. Um die MCC-IMS zur Keimidentifizierung und Keimdifferenzierung als Bedside-Verfahren etablieren zu können, wäre ein Hinweis auf das Resistenzmuster eine wertvolle Eigenschaft. Insbesondere hospitalisierte Patienten mit nosokomialen Infekten zeigen häufig Infektionen mit hohen Erregerresistenzen. Ebenso kann die schnelle Erregeridentifizierung bei bekannter Resistenzstatistik einen wichtigen Hinweis auf die Auswahl der Antibiotika geben.

Zhu et al. (2007) konnten die Antibiotikaresistenzen von klinisch isolierten Staphylokokken-Proben mit Hilfe eines PCR-basierten DNA-Microarrays bestimmen. Ein großer Vorteil ist der schnelle Erhalt des Antibiogramms. Allerdings ist das Verfahren teuer und aufgrund dessen nicht in den klinischen Alltag etablierbar.

Offen ist die Frage, wie sich das Metabolitenprofil unter schon laufender Antibiotikatherapie verhält. Möglicherweise verändert sich unter dem Einfluss von Antibiotika das Metabolitspektrum, so dass eine Erregeridentifizierung nicht mehr möglich wäre. Die herkömmlichen Verfahren versagen meist und können unter laufender Antibiotikatherapie häufig keinen Erreger nachweisen.

Thadepalli et al. (1982) konnten durch den Einsatz der Gas-Flüssigkeits-Chromatographie zeigen, dass die Konzentration an Bernsteinsäure im Liquor von mit *H. influenzae* infizierten Meningitis-Patientin für mindestens drei Tage unter antibiotischer Therapie abnahm. Bei einem Patienten wurde durch eine Reinfektion ein erneuter Anstieg von Bernsteinsäure gesehen.

4.6 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien

In vielen Arbeiten wurden unterschiedliche Verfahren verwendet. Schöller et al. (1997) verwendeten ebenfalls das GC-MS, welches Substanzen mit größerem Molekulargewicht identifiziert.

Ebenfalls profitiert die Lebensmittelindustrie von der Bestimmung von VOCs z. B. von Bakterien-infizierten tierischem Fleisch. Arnold und Senter (1998) konnten mittels *e-nose* Bakterien von verarbeitendem Geflügel unterscheiden. In weiteren Analysen durch die SPME/GC-MS, wurden als VOCs überwiegend Alkohole beobachtet, insbesondere Ethanol, 3-Methyl-1-butanol, welches in der vorliegenden Arbeit mit der GC-MS detektiert worden ist, und Phenethylalkohol waren die einzigen Metabolite, die über *P. aeruginosa* gemessen werden konnten. Phenethylalkohol ist ein nach Rosen riechender Alkohol, der in Rosenöl und Rosenwasser vorkommt (Schröter et al. 1995). In der Arbeit von Elgaali et al. (2002), in der VOCs und langkettige Alkohole von Bakterien-infizierten Lebensmitteln mittels SPME verglichen wurden, produzierten grampositive Bakterien weniger Volatile. Ebenfalls wurde deutlich, dass langkettige Alkohole vermehrt bei gramnegativen Keimen zu beobachten sind. Die Untersuchung von zwei Isolaten der gleichen Bakterienspezies ergab ein unterschiedliches VOC-Muster (Elgaali et al. 2002). Die SPME/GC-MS nutzt zur Desorption der Analyten Temperaturen zwischen 100-300 °C.

In den Arbeiten von Brooks et al. (1980a; 1980b) wurden VOCs von bakteriellen Meningitiserregern auf den Gehalt von Aminen und Säuren mittels FPEC-GLC hin untersucht. *S. pneumoniae* zeigte keine Produktion von Aminen. An Säuren wurde Benzoesäure und eine weitere unbekannte Säure gemessen.

4.7 Ausblick

Aktuell sind einige Methoden zur schnellen Erregerdiagnostik verfügbar. Leider sind diese häufig teuer, nicht mobil und nicht ubiquitär verfügbar. Viele weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Methode der MCC-IMS in den klinischen Alltag etablieren zu können. Die MCC-IMS wäre als Bedside-Verfahren einsatzfähig und zeigt in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit der schnellen und validen Erregeridentifizierung und -differenzierung.

5 Zusammenfassung

Auf Intensivstationen wird eine hohe Mortalität aufgrund von Infektionen, wie z. B. einer Ventilator-assoziierten Pneumonie, beobachtet. Das Vorliegen eines mikrobiologischen Befundes dauert mit den herkömmlichen Laborstandards zwischen zwei und vier Tagen. Dadurch verzögert sich eine adäquate Antibiotikatherapie, und es kann zu einer klinischen Verschlechterung der Patienten kommen. Eine erhöhte Mortalitätsrate, eine zunehmende Krankenhausverweildauer und erhöhte Krankenhauskosten können die Folgen sein.

Die vorliegende Dissertation untersucht die Möglichkeit *S. aureus*, *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* mittels des spezifischen volatilen Headspace-Profiles unter Anwendung der MCC-IMS-Technik zu identifizieren und zu differenzieren. Zur Ergänzung wurde die GC-MS eingesetzt, um weitere Volatile zu detektieren, die Ergebnisse der MCC-IMS zu bestätigen bzw. unbekannte Substanzen aus der MCC-IMS über ein *Alignment* zu benennen.

In der analytischen Chemie ist die Verwendung der Ionenmobilitätsspektrometrie ein etabliertes, weitverbreitetes Verfahren, z. B. zur Kampfmitteldetektion oder zur Detektion von Bakterien und Schimmelpilzen in der Lebensmittelindustrie.

Die Massenspektrometrie stellt eine alternative Technik zum metabolomischen Nachweis und Identifikation pathogener Keime dar. In verschiedenen Studien wurden unter der Anwendung unterschiedlicher massenspektrometrischer Verfahrensweisen die Differenzierung und Identifizierung von Pilzen und Bakterien untersucht. Es konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden, ohne dass sich eine bestimmte Technik durchsetzen konnte. Nachteil der Massenspektrometrie ist der damit verbundene große technische Aufwand.

In dieser Arbeit wurde ein mit einer Multikapillarsäule gekoppeltes Ionenmobilitätsspektrometer verwendet, dass der gaschromatographischen Auftrennung des komplexen Gasgemisches dient. Zunächst wurde das zu untersuchende Probengasgemisch in einer vorgeschalteten Multikapillarsäule (MCC) vorgetrennt. Für die

Analyten resultierte eine spezifische Retentionszeit. Im Weiteren wurde die Probe im IMS ionisiert und es erfolgte eine zweite Auftrennung in einem elektrischen Feld nach der Mobilität der Moleküle unter Verwendung eines Driftgases. Die hierbei erzeugte Retentionszeit und reduzierte Ionenmobilität des MCC-IMS sind für die Bestimmung der Volatile essenziell. Je nach Menge einer Substanz resultiert eine starke bzw. schwache Signalintensität.

Nach 24-stündiger Inkubation der jeweiligen Keime erfolgte die Messung der im Headspace produzierten Volatile durch das MCC-IMS. Die Messreihen erfolgten sowohl in positiver als auch in negativer Polarität. Die Substanzen wurden nach ihrer Retentions- und Driftzeit identifiziert bzw. nach diesen benannt.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist eine Differenzierung und eine Identifizierung durch die spezifischen volatilen Profile von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. pneumoniae* möglich. In der MCC-IMS zeigten sich Ethanol und eine unbekannte Substanz (p_711_3) spezifisch für *P. aeruginosa*. Für *S. aureus* waren Ethanol und zwei weitere unbekannte Substanzen (p_572_8; p_599_10), für *S. pneumoniae* ausschließlich die Substanz p_572_8 charakteristisch.

Die ergänzend durchgeführte TD-GC-MS konnte die drei charakteristischen, aber unbekannt Substanzen aus der MCC-IMS nicht identifizieren. Ethanol konnte erst durch die sich anschließende TD-GC-MS identifiziert werden. Die TD-GC-MS detektierte weitere Volatile. Für *P. aeruginosa* waren es weitere sieben, für *S. aureus* drei und für *S. pneumoniae* vier Substanzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die MCC-IMS ein anwendbares System in der Metabolomanalyse ist. Das Multikapillarsäulen-Ionenmobilitätsspektrometer stellt eine gute Alternative in der Diagnostik von komplexen Gasgemischen gegenüber herkömmlichen Verfahren dar. Sie ist eine Methode, die eine schnelle und zuverlässige Identifizierung und Differenzierung von pathogenen Keimen ermöglicht.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über die Möglichkeiten zur Infektionsdiagnostik.	17
Abbildung 2 Schema eines Ionenmobilitätsspektrometers des verwendeten Nickel-IMS.	29
Abbildung 3 Verwendetes Headspace ohne Agarplatte.	36
Abbildung 4 Schematische Darstellung des verwendeten MCC-IMS.	37
Abbildung 5 Flowchart. Zeitliches Schema des Versuchablaufes.	39
Abbildung 6 Zweidimensionale Darstellung der Messergebnisse von <i>P. aeruginosa</i> bei positiver Polarität des BB_IMSAnalyses-Programms.	45
Abbildung 7 Zweidimensionale Darstellung der Messergebnisse von <i>S. pneumoniae</i> bei positiver Polarität des BB_IMSAnalyses-Programms.	46
Abbildung 8 Zweidimensionale Darstellung der Messergebnisse von <i>S. aureus</i> bei positiver Polarität des BB_IMSAnalyses-Programms.	47

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zusammenfassung der detektierten VOCs im Headspace der Bakterien.	24
Tabelle 2	Zusammenfassung der detektierten, aber unbekanntem VOCs im Headspace der Bakterien nach der Lage im 2D-topographischen Plot.	26
Tabelle 3	Klassifizierte Stämme der verwendeten Bakterien.	33
Tabelle 4	Am MCC-IMS verwendete Einstellung der Versorgungseinheit und der Säulenheizung.....	38
Tabelle 5	Detektierte Bakterienmetabolite mittels MCC-IMS mit negativer und positiver Polarität.	44
Tabelle 6	Mittels GC-MS detektierte Metabolite der Bakterienproben.	49
Tabelle 7	Detektierte Volatile des Columbia-Blutagars durch das GC-MS.....	50
Tabelle 8	Die wichtigsten Unterschiede zwischen der MCC-IMS und der TC-GC-MS.	55

8 Literaturverzeichnis

Allardyce RA, Langford VS, Hill AL, Murdoch DR (2006): Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *J Microbiol Methods* 65, 361-365

Alvarez-Lerma F (1996): Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 22, 387-394

Arnold JW, Senter SD (1998): Use of digital aroma technology and SPME GC-MS to compare volatile compounds produced by bacteria isolated from processed poultry. *J Sci Food Agric* 78, 343-348

Bader S, Urfer W, Baumbach JI (2008): Preprocessing of ion mobility spectra by lognormal detailing and wavelet transform. *Int J Ion Mobil Spec* 11, 43-49

Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Knost S, Sautter RL, Lockhart PB (2008): Identification of oral bacteria in blood cultures by conventional versus molecular methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105, 720-724

Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T (2008): Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74, 5402-5407

Baumbach JI, Eiceman GA (1999): Ion mobility spectrometry: Arriving on site and moving beyond a low profile. *Appl Spectrosc* 53, 338A-355A

Baumbach JI, Sielemann S, Pilzecker P (2000): Coupling of multi-capillary columns with two different types of ion mobility spectrometer. *Int J Ion Mobil Spec* 3, 28-37

Baumbach JI, Eiceman GA, Klockow D, Sielemann S, Irmer AV (1997): Exploration of a multicapillary column for use in elevated speed gas chromatographie. *Int J Env Anal Chem* 66 (4), 225 – 239 1029-1039

- Berna AZ, Anderson AR, Trowell SC (2009): Bio-benchmarking of electronic nose sensors. *PloS One* 4, e6406
- Bödeker B, Vautz W, Baumbach IJ (2008a): Visualisation of MCC/IMS-data. *Int J Ion Mobil Spec* 11, 77-81
- Bödeker B, Vautz W, Baumbach IJ (2008b): Peak comparison in MCC/IMS-data-searching for potential biomarkers in human breath data. *Int J Ion Mobil Spec* 11, 89-93
- Börjesson T, Stöllman U and Schnürer J (1992) Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl Environ Microbiol* 58, 2599-2605
- Bosshard PP, Abels S, Altwegg M, Böttger EC, Zbinden R (2004): Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 42, 2065–2073
- Brooks JB, Kellogg DS Jr., Shepherd ME, Alley CC (1980a): Rapid differentiation of the major causative agents of bacterial meningitis by use of frequency-pulsed electron capture gas-liquid chromatography: Analysis of Acids. *J Clin Microbiol* 11, 45-51
- Brooks JB, Kellogg DS, Jr., Shepherd ME, Alley CC (1980b): Rapid differentiation of the major causative agents of bacterial meningitis by use of frequency-pulsed electron capture gas-liquid chromatography: Analysis of Amines. *J Clin Microbiol* 11, 52-58
- Buszewski B, Kesy M, Ligor T, Amann A (2007): Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 6, 553-566
- Campbell NA, Reece JB: *Biologie*. 8. Auflage; Pearson Studium, München 2009
- Carroll W, Lenney W, Wang T, Španěl P, Alcock A, Smith D (2005): Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry. *Pediatr Pulmonol* 39, 452-456
- Carstens ETH: Quantifizierung von Propofol in der Atemluft mittels endtidaler Ionenmobilitätsspektrometrie. Med. Diss. Göttingen 2010
- Chaim W, Karpas Z, Lorber A (2003): New technology for diagnosis of bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 111, 83-87

Chambers ST, Bhandari S, Scott-Thomas A, Syhre M (2011): Noveldiagnostic: progress toward a breath test for invasive *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 49, 54-61

Chastre J (2008): Evolving problems with resistant pathogens. *Clin Microbiol Infect* 14, 3-14

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

Cox CD, Parker J (1979): Use of 2-Aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 9, 479-484

Dickinson JD, Kollef MH (2011): Early and adequate antibiotic therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Curr Infect Dis Rep* 13 (5), 399-405

Dunkel M, Schmidt J, Struck S, Berger L, Gruening B, Hossbach J, Jaeger IS, Effmert U, Piechulla B, Eriksson R et al. (2009): SuperScent—a database of flavors and scents. *Nucleic Acids Res* 37, D291-D294

Eiceman GA, Karpas Z: Ion mobility spectrometry. 2. Auflage; CRC Press, London 2005

Elgaali H, Hamilton-Kemp TR, Newman MC, Collins RW, Yu K, Archbold DD (2002): Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related gram positive and gram negative bacteria. *J Basic Microbiol* 42, 373-380

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33, 606–618

Frontzek A: DNA Sequenzierung. In: Thiemann F, Cullen PM, Klein H-G (Hrsg): *Molekulare Diagnostik*. 2. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2015, 173-192

Fuchs G: Zentrale Stoffwechselwege. In: Fuchs G (Hrsg.): *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007, 195-228

Groß U: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 3. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2013

Habs H: *Bakteriologisches Taschenbuch*. 36. Auflage; Barth, Leipzig 1954

Heider J: Mikrobielle Gärungen. In: Fuchs G (Hrsg.): Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007, 349-378

Heider J: Anaerobe Atmung. In: Fuchs G (Hrsg.): Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007, 381-404

Hof H: Grundlagen; Bakteriologie. In: Hof H, Dörries R (Hrsg): Medizinische Mikrobiologie. 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2014 13-58 277-459

Jünger M, Bödeker B, Baumbach JI (2010): Peak assignment in multi-capillary column-ion mobility spectrometry using comparative studies with gas chromatography-mass spectrometry for VOC analysis. *Anal Bioanal Chem* 396, 471-482

Jünger M, Vautz Wolfgang, Kuhns M, Hofmann L, Ulbricht S, Baumbach JI, Quintel M, Perl T (2012): Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 2603-2614

Karasek FW, Keller RA (1972): Gas chromatograph/plasma chromatograph interface and its performance in the detection of musk ambrette. *J Chromatogr Sci* 10, 626-628

Keller PM, Hombach M, von Bloemberg G (2010): 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektion. *Biospektrum* 16, 755-757

Kollef MH (2000): Inadequate antimicrobial treatment: An important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 31, 131-138

Kumar An, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar As, Simon D (2009): Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 136, 1237-1248

Kunze N, Göpel J, Kuhns M, Jünger M, Quintel M, Perl T (2013): Detection and validation of volatile metabolic patterns over different strains of two human pathogenic bacteria during their growth in a complex medium using multi-capillary column-ion mobility spectrometry (MCC-IMS). *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3665-3676

Kunze N, Moerer O, Steinmetz N, Schulze MH, Quintel M, Perl M (2015): Point-of-care multiplex PCR promises short turnaround times for microbial testing in hospital-acquired

pneumonia-an observational pilot study in critical ill patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14, 33

Labows JN, McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ (1980): Headspace analysis volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 12, 521-526

Lehmann LE, Herpichboehm B, Kost GJ, Kollef MH, Stüber F (2010): Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit Care* 14, R186

Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ (2003): Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus*. *Bacteremia Clin Infect Dis* 36, 1418-1423

Lodise TP, Patel Jr. N, Kwa A, Graves J, Furuno JP, Graffunder E, Lomaestro B, McGregor JC (2007): Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: Impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3510-3515

Löffler G: Bioenergetik und Enzymologie. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg): *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage; Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1998, 83-105

Maddula S, Blank LM, Schmid A, Baumbach JI (2009): Detection of volatile metabolites of *Escherichia coli* by multi capillary column coupled ion mobility spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394, 791–800

Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP: *Brock Mikrobiologie*. 13., aktualisierte Auflage; Pearson, Higher Education, München 2013

Mann S (1966): Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa* *Archiv für Mikrobiologie*. *Arch Mikrobiol* 54, 184-190

Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum M, Hoerauf A (2009): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47, 2912-2917

Martino PD, Fursy R, Bret L, Sundararaju B, Phillips RS (2003): Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J Microbiol* 49, 443–449

Miller BC, Moore JE (2004): Current trends in the molecular diagnosis of infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23, 353-365

Miller JD, Laflamme AM, Sobol Y, Lafontaine P, Greenhalgh R (1988): Fungi and fungal products in some canadian houses. *Int Biodeterior* 24, 103-120

Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M: *Medizinische Mikrobiologie Infektiologie*. 2. Auflage; Urban & Fischer in Elsevier, München 2006 486, 491-492, 494

Moens M, Smet A, Naudts B, Verhoeven J, Ieven M, Jorens P, Geise HJ, Blockhuys F (2006); Fast identification of ten clinically important micro-organisms using an electronic nose. *Lett Appl Microbiol* 42, 121-126

O'Hara M, Mayhew CA (2009): A preliminary comparison of volatile organic compounds in the headspace of cultures of *Staphylococcus aureus* grown in nutrient, dextrose and brain heart bovine broths measured using a proton transfer reaction mass spectrometer. *J Breath Res* 3, 27001-27008

Pavlou A, Turner APF, Magan N (2002): Recognition of anaerobic bacterial isolates in vitro using electronic nose technology. *Lett Appl Microbiol* 35, 366-369

Perl T, Bödecker B, Jüngling M, Nolte J, Vautz W (2010): Alignment of retention time obtained from multicapillary column gas chromatographie used for VOC analysis with ion mobility spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 397, 2385–2394

Petrides PE: *Grundlagen des Intermediärstoffwechsels*. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg): *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage; Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1998, 359-374

Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage; de Gruyter, Berlin 2001

Raatikainen O, Reinikainen V, Minkkinen P, Ritvanen T, Muje P, Pursiainen J, Hiltunen T, Hyvoenen P, von Wright A, Reinikainen S-P (2005): Multivariate modelling of fish freshness index based on ion mobility spectrometry measurements. *Anal Chim Acta* 544, 128-134

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Duale Reihe Biochemie.1. Auflage; Thieme Verlag; Stuttgart 2006 178

Rello J, Gallego M, Mariscal D, Soñora R, Valles J (1997): The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 196-200

Ren D, Bedzyk LA, Ye RW, Thomas SM, Wood TK (2004): Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70, 2038–2043

Schöller C, Molin S, Wilkins K (1997): Volatile metabolites from some gram-negative bacteria. *Chemosphere* 35, 1487-1495

Schröter W, Lautenschläger K-H, Bibrack H: Taschenbuch der Chemie. 17. Auflage; Harri Deutsch Verlag, Thun und Frankfurt am Main 1995

Schubert S, Wieser A (2010): MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *Biospektrum* 7, 760-762

Schulz S, Dickschat JS (2007): Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24, 814–842

Scotter JM, Langford VS, Wilson PF, McEwan MJ, Chambers ST (2005): Real-time detection of common microbial volatile compounds from medically important fungi. *J Microbiol Methods* 63, 127-134

Sielemann S: Detektion flüchtiger organischer Verbindungen mittels Ionenmobilitätsspektrometrie und deren Kopplung mit Multi-Kapillar-Gas-Chromatographie. Chem. Diss. Dortmund 1999

Sponring A, Filipiak W, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A, Troppmair J (2009): Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. *Anticancer Res* 29, 419-426

Thadepalli H, Gangopadhyay PK, Ansari A, Overturf GD, Dhawan VK, Mandal AK (1982): Rapid differentiation of bacterial meningitides by direct gas-liquid chromatography. *J Clin Invest* 69, 979-984

Torres A, Aznar R, Gatell JM, Jimenez P, Gonzales J, Ferrer A, Celis R and Rodriguez-Roisin R (1990): Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 142, 523-528

Vautz W, Zimmermann D, Hartmann M, Baumbach JI, Nolte J, Jung J (2006a): Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food Addit Contam* 23, 1064-1073

Vautz W, Baumbach JI, Jung J (2006b): Beer fermentation control using ion mobility spectrometry — Results of a Pilot Study. *J Inst Brewing* 112, 157-164

Vautz W, Schmäh M (2009): HovaCal®- a generator for multi-component humid calibration gases. *Int J Ion Mobil Spec* 12, 139-147

Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH (2003): Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185, 2080–2095

Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY (2008): Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14, 908-934

Zechman JM, Labows JN Jr (1985): Volatiles of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by automated headspace concentration-gas chromatography. *Can J Microbiol* 31, 232-237

Zechman JM, Aldinger S, Labows JN Jr (1986): Characterization of pathogenic bacteria by automated headspace concentration-gas chromatography. *J Chromatogr* 377, 49-57

Zhu L-X, Zhang Z-W, Wang, Yang H-W, Jiang D, Zhang Q, Mitchelson K, Cheng J (2007): Use of a DNA Microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among *Staphylococcal* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 45, 3514–3521

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Thorsten Perl für die Ermöglichung meiner Dissertation danken. Im Weiteren für die große Geduld, die er mir entgegenbrachte.

Großer Dank gilt insbesondere Dr. rer. nat. Wolfgang Vautz und Dr. Melanie Jünger. Beide standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Ebenfalls geht mein Dank an die Unterstützer aus dem Institute for Analytical Sciences in Dortmund.

Ich bedanke mich bei Andrea Kernchen, die als Study Nurse immer mit Rat, Tat und Motivation zur Seite stand sowie bei meinen Mitdoktoranden Tobias Gehrig, Eike Carstens und insbesondere bei Siobhán Ulbricht.