

Aus der Klinik für Anästhesiologie
(Prof. Dr. med. K. Meissner)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Differenzierung bakterieller
Krankheitserreger einer ventilator-
assoziierten Pneumonie mittels
Ionenmobilitätsspektrometrie am
Kleintiermodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jakob Luther

aus
Salzgitter

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. W. Brück
Referent/in:	PD Dr. T. Perl
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. M. Weig
Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 24.11.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Differenzierung bakterieller Krankheitserreger einer ventilator-assoziierten Pneumonie mittels Ionenmobilitätsspektrometrie am Kleintiermodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Theoretischer Hintergrund.....	4
1.1.1 Ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP).....	4
1.1.1.1 Diagnostik der VAP.....	5
1.1.1.2 Das Erregerspektrum der VAP	7
1.1.1.3 Therapie der VAP	8
1.1.2 Merkmale der Erreger <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	10
1.1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.1.3 Verfahren zur Erregeridentifizierung.....	13
1.1.3.1 Genomische Verfahren – Polymerase Kettenreaktion (PCR)	14
1.1.3.2 Proteomische Verfahren – Matrix-assistierte-Laser-Desorption-Ionisation – Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-ToF-MS).....	15
1.1.3.3 Metabolomische Verfahren.....	16
1.1.4 Technische Anforderungen an die Analytik	17
1.1.5 Funktionsweise der Ionenmobilitätsspektrometrie	18
1.1.6 Ionisationsvorgänge im Ionenmobilitätsspektrometer	23
1.1.6.1 Bildung positiver Reaktionsionen	23
1.1.6.2 Bildung negativer Reaktionsionen	24
1.1.6.3 Bildung der Analytionen.....	24
1.1.7 Vortrennung mittels Multikapillarsäule.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Versuchsablauf und Pneumoniemodell.....	27
2.2 Tierversuchsantrag und Versuchstierkollektiv	31
2.3 Nährmedium, verwendete Bakterien und Keimanzucht	31
2.4 Narkoseprotokoll	32
2.5 Atemluftprobennahme	34
2.6 Verwendetes Ionenmobilitätsspektrometer.....	35
2.6.1 Datenerfassung und -verarbeitung.....	37
2.6.2 Visualisierung	37
2.6.3 Normierungsprozesse	38
2.6.4 Auswertung der MCC-IMS-Datensätze	38
2.7 Auswertung der computertomographischen Lungenaufnahmen.....	39
2.8 Histopathologische Untersuchung des Lungenparenchyms	41

2.9 Statistische Auswertung.....	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Pneumonieschwere	43
3.1.1 Oxygenierung	46
3.1.2 Verlauf der Leukozytenzahlen	48
3.1.3 Ergebnisse der computertomographischen Lungenaufnahmen.....	49
3.2 Atemgasanalysen.....	50
4 Diskussion.....	62
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis.....	76

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.....	Schematische Darstellung eines Ionenmobilitätsspektrometers und eines Driftzeitspektrums. (Sielemann 1999).	S. 19
Abbildung 2.....	Schema eines IMS-Spektrums des verwendeten Nickel-IMS, positiver Messbereich (Carstens 2010).	S. 24
Abbildung 3.....	Querschnitt durch eine Multikapillarsäule. MCC-OV-5, Firma Sibertech Ltd., Novosibirsk, Russland (Baumbach 2009).	S. 26
Abbildung 4.....	Schema des Versuchsablaufs mit Bezeichnung der Zeitpunkte T1-T4.	S. 28
Abbildung 5.....	Aufbau des Versuchswagens.	S. 29
Abbildung 6.....	Lagerung des Versuchstieres im Kleintier-CT unter pulsoxymetrischer Überwachung.	S. 30
Abbildung 7.....	Aufbau des Probengewinnungs- und Beatmungssystems.	S. 34
Abbildung 8.....	Schematischer Aufbau des flussgesteuerten Probengewinnungssystems.	S. 35
Abbildung 9.....	Zweidimensionale Darstellung eines MCC-IMS-Chromatogramms mittels der Software <i>BB_IMSAnalyse</i> (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS e.V., Dortmund, Deutschland).	S. 38
Abbildung 10.....	Beispielhafte Darstellung der VOI-Positionierung im 3D-Lungen-CT mittels der Software Scry v5.	S. 40
Abbildung 11.....	Pneumonie-Score aller Versuchsgruppen in den jeweiligen Lungenabschnitten.	S. 43
Abbildung 12.....	Lungenparenchym der Kontrollgruppe, HE-Färbung, 100fache Vergrößerung.	S. 44
Abbildung 13.....	Lungenparenchym der <i>E.coli</i> -Pneumoniegruppe, HE-Färbung, 100fache Vergrößerung.	S. 44
Abbildung 14.....	Lungenparenchym der <i>P. aeruginosa</i> -Pneumoniegruppe, HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung.	S. 45
Abbildung 15.....	Oxygenierungsindex der Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten.	S. 47
Abbildung 16.....	Verlauf der Leukozytenzahl der Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten.	S. 48
Abbildung 17.....	Belüftetes Lungenvolumen aller Regionen zu den Zeitpunkten T1 und T4.	S. 49
Abbildung 18.....	MCC-IMS-Topogramm mit Position aller untersuchten 67 Signale.	S. 51

Abbildung 19.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_714_278 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 54
Abbildung 20.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_727_557 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 54
Abbildung 21.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_648_36 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 55
Abbildung 22.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_700_549 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 55
Abbildung 23.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz Indol in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 56
Abbildung 24.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_630_11 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 56
Abbildung 25.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_633_5.5 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 57
Abbildung 26.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_653_36 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 57
Abbildung 27.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_665_7 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 58
Abbildung 28.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_710_7 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 58
Abbildung 29.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_713_11 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 59
Abbildung 30.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz P_756_11 in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 59
Abbildung 31.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz 5-Methylheptan-3-on in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 60
Abbildung 32.....	Zeitlicher Verlauf der Substanz Propofol in den jeweiligen Versuchsgruppen.	S. 61

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.....	CPIS (<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>).	S. 6
Tabelle 2.....	Therapieempfehlungen für eine kalkulierte antibiotische Therapie bei nosokomialer Pneumonie bei Patienten mit und ohne erhöhtem Risiko für MRE (Dalhoff et al. 2018).	S. 9
Tabelle 3.....	Ziel-Beatmungs- und Vitalparameter während der Versuche.	S. 33
Tabelle 4.....	Einstellungsbereiche der verwendeten MCC-IMS Geräte.	S. 36
Tabelle 5.....	Spezifikationen der verwendeten MCC-IMS Geräte.	S. 36
Tabelle 6.....	Pneumonie-Score für die histopathologischen Untersuchungen des Lungenparenchyms nach Sommer et al. (2009).	S. 41
Tabelle 7.....	Liste aller in dieser Arbeit untersuchten IMS-Signale.	S. 52

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1/K0	Inverse Reduzierte Ionenmobilität [Vs/cm ²]
A.	Arteria
ABP	arterieller Blutdruck
AF	Atemfrequenz
A-MCC-IMS	Atemgasanalyse-MCC-IMS
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
BLI	Betalaktamaseinhibitor
CPIS	<i>Clinical Pulmonary Infection Score</i>
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
csv	<i>comma separated values</i>
CT	Computertomographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
\vec{E}_d	elektrische Feldstärke [V/cm]
EC	<i>Escherichia coli</i>
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HAP	Hospital-acquired pneumonia
HUS	Hämolytisch-urämisches-Syndrom
IMS	Ionenmobilitätsspektrometer
ITS	Intensivstation
K	Ionenmobilität [cm ² /Vs]
K ₀	Reduzierte Ionenmobilität
K _p	Anzahl der ausgezählten Kolonien
KBE	Koloniebildende Einheit
KG	Körpergewicht
KISS	Krankenhaus Infektions Surveillance System
KT	Körpertemperatur

l_d	Driftlänge/-strecke [cm]
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF-MS	Matrix-assistierte-Laser-Desorption-Ionisation-time-of-flight-Massenspektrometrie
MBq	Megabecquerel
MCC	Multikapillarsäule
MCC-IMS	Multikapillarsäulen-Ionenmobilitätsspektrometer
MFC	Mass-Flow-Controller
MRE	Multiresistente Erreger
OD	Optische Dichte
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
ppb	parts per billion
ppt	parts per trillion
PSB	protected specimen brush
P	Pulsfrequenz
PEEP	Positiver Endexpiratorischer Druck
P_{\max}	Beatmungsdruck
q	Ladung
RIP	Reaktionsionen-Peak
RT	Retentionszeit
SPF	Spezifisch-Pathogen-Frei
SPME	Festphasenmikroextraktion
S_pO_2	periphere Sauerstoffsättigung
t_d	Driftzeit [ms]
TBAS	Tracheobronchiale Aspiration
TierSchG	Tierschutzgesetz
TOF	time of flight
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
upm	Umdrehungen pro Minute
VAP	Ventilator-assoziierte-Pneumonie
v_d	Driftgeschwindigkeit [cm/ms]

VOC	Volatile organische Verbindung
VOI	<i>Volume of interest</i>
Vt	Tidalvolumen
V. a.	Verdacht auf
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP) stellt für beatmete Patienten in der Intensivmedizin eine schwerwiegende Komplikation dar. Auf Basis der Daten des deutschen Krankenhaus Infektions Surveillance Systems (KISS) konnte für den Zeitraum 2005-2007 auf Intensivstationen eine VAP-Inzidenzrate von 5,4 pro 1.000 invasive Beatmungstage festgestellt werden (Kohlenberg et al. 2010). Ausgehend von jährlich etwa 2,8 Mio. Beatmungstagen in Deutschland ergibt dies ca. 15.500 VAP-Fälle pro Jahr (Kohlenberg et al. 2010; Dalhoff et al. 2018; Rosseau et al. 2013). Damit gehört die VAP zu den häufigsten nosokomialen Infektionen im intensivmedizinischen Bereich (Safdar et al. 2005, Gastmeier und Geffers 2008).

Die Letalität einer VAP wird in einer aktuellen Metaanalyse mit 16 % angegeben (Muscedere et al. 2010). Auf Basis der KISS-Daten wird die Mortalität in Deutschland mit etwa 20 % angegeben (Kohlenberg et al. 2010).

Beatmungsdauer sowie Verweildauer sind bei den betroffenen Patienten auf Intensivstationen und im Krankenhaus erhöht. Die Behandlungskosten steigen entsprechend signifikant an (Rello et al. 2002; Safdar et al. 2005, Restrepo et al. 2010). Die Prognose einer VAP scheint dabei maßgeblich vom frühzeitigen Beginn einer adäquaten Antibiotikatherapie abzuhängen (Kollef et al. 1999, Iregui et al. 2002, Kumar et al. 2009).

Um die Wahrscheinlichkeit einer adäquaten und damit effektiven Antibiotikatherapie bis zum Vorliegen mikrobiologischer Ergebnisse zu erhöhen, muss zunächst mit einer breit wirksamen Antibiotikatherapie begonnen werden (sog. kalkulierte Antibiotikatherapie). Hierbei besteht die Gefahr einer inadäquaten antibiotischen Therapie aufgrund fehlender Kenntnis des Erregers. Des Weiteren birgt eine breit wirksame antibiotische Therapie durch Erhöhung des Selektionsdruckes das Risiko Resistenzen zu induzieren (Rosseau et al. 2013). Im Vordergrund therapeutischer Bemühungen sollte also die frühzeitige Anpassung einer kalkulierten und der rasche Beginn einer gezielten Antibiotikatherapie stehen. Voraussetzung hierfür ist allerdings die Identifikation des jeweiligen Erregers. Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik ermöglicht die Identifizierung der Erreger inklusive Antibiotikaresistenztestung innerhalb eines Zeitraums von 48 bis 96 Stunden (Kunze et al. 2015a).

Die Häufigkeit einer inadäquaten Antibiotikatherapie lag in einer retrospektiven Studie an über 5.000 Patienten bei einem gesamten Anteil von etwa 20 % und bezogen auf die kalkulierte antibiotische Therapie einer Pneumonie bei etwa 25 %. Hiermit einhergehend zeigte sich in der Konsequenz eine Verdoppelung bis Vervierfachung der Mortalität intensivmedizinisch betreuter Patienten (Kumar et al. 2009). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit schneller diagnostischer Verfahren für eine zeitnahe Erregeridentifizierung. Eine Verkürzung der Befundumlaufzeit ermöglicht die frühzeitige gezielte Anpassung der Antibiotikatherapie und könnte sich positiv auf den Krankheits-

verlauf, das Gesamtüberleben von Intensivpatienten sowie auf die Behandlungskosten auswirken (Iregui et al. 2002). Der schnellen Erregeridentifizierung kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu.

Verschiedene innovative Ansätze konnten bisher die Zeitspanne bis zur Erregeridentifizierung verkürzen. So nutzen zum Beispiel genomische Verfahren die DNA des Bakteriums für dessen Identifizierung, während proteomische Verfahren Bakterien anhand ihrer spezifischen Eiweißmatrix identifizieren können (vgl. Kapitel 1.1.3).

Einen weiteren, vergleichsweise neuen, Ansatz für eine schnelle Erregerdiagnostik stellt die Messung flüchtiger Metabolite dar. Diese metabolomischen Verfahren nutzen den Umstand, dass Bakterien und Pilze während ihres Wachstums spezifische flüchtige Stoffwechselprodukte an ihre Umwelt emittieren (Schulz und Dickschat 2007). Sogenannte volatile organische Verbindungen (engl.: *volatile organic compounds*, VOC) können mithilfe gasanalytischer Verfahren detektiert und für die Erregeridentifizierung herangezogen werden. Die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) ist ein geeignetes analytisches Verfahren zur Detektion, Quantifizierung und Identifizierung von VOCs in sehr geringen Konzentrationen. Die Nachweisgrenzen liegen hierbei in Abhängigkeit der chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz im Bereich von parts per billion (ppb) bis parts per trillion (ppt). Die Kopplung eines IMS mit einer Multikapillarsäule (MCC) ermöglicht zudem die Analyse komplexer und feuchter Gasproben, wie sie beispielweise bei Atemluftmessungen vorkommen (Baumbach 2009) (vgl. hierzu 1.1.7).

Durch bisherige Forschungen im humanmedizinischen Bereich konnte der Nutzen der multikapillarsäulengekoppelten Ionemobilitätsspektrometrie (MCC-IMS) gezeigt werden. So wurde beispielsweise die Anwendbarkeit der MCC-IMS zur Erkennung von Tumorerkrankungen (Darwiche et al. 2011), zum Narkosemonitoring (Perl et al. 2009; Carstens 2010), bei Organversagen (Hüppe et al. 2016) oder zur Quantifizierung von Arbeitsplatzbelastungen durch Narkosegase untersucht (Kunze et al. 2015b).

Desweiteren konnten verschiedene *in-vitro* Untersuchungen die grundsätzliche Eignung der MCC-IMS Analytik für die Differenzierung humanpathogener Erreger anhand ihres spezifischen Metabolitmusters nachweisen (Perl et al. 2011; Jünger et al. 2012; Kunze et al. 2013).

Die Messung von Veränderungen des VOC-Spektrums in der Expirationsluft beatmeter Patienten mittels MCC-IMS könnte ein schnelles, kostengünstiges und technisch wenig aufwändiges Erkennen einer VAP, sowie eine schnelle Identifikation der Erreger ermöglichen. Somit stellt diese Technik eine innovative Methode dar, die die Zeitspanne bis zum Beginn einer adäquaten antibiotischen Therapie bei einer VAP relevant verkürzen könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die bisher aus *in-vitro* Versuchen gewonnenen Erkenntnisse auf ein Säugetiermodell zur VAP zu übertragen und die Eignung der MCC-IMS-Technologie auch im Rahmen eines *in-vivo* Versuchs zu untersuchen.

Hierfür erfolgten Untersuchungen an einem Kaninchenmodell. Nach Einteilung in eine Kontroll- sowie zwei Pneumoniegruppen erfolgten Narkoseeinleitung und kontrollierte Beatmung für zehn Stunden. Bei den Tieren der Pneumoniegruppen wurde eine Pneumonie mit *Pseudomonas aeruginosa* (PA) oder *Escherichia coli* (EC) induziert. Der Kontrollgruppe wurde steriles LB-Flüssigmedium endotracheal appliziert. Im Versuchsverlauf wurde die Atemluft der Tiere mittels MCC-IMS zu definierten Zeitpunkten untersucht. Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs erfolgten unter anderem auch computertomographische Untersuchungen der Lungen.

Folgende Fragen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Ermöglicht die Detektion bakterieller VOCs mittels MCC-IMS eine Differenzierung zwischen Kontrollgruppe und Pneumoniegruppen?
2. Ermöglicht die Detektion bakterieller VOCs mittels MCC-IMS eine Differenzierung von *E. coli* und *P. aeruginosa* in den Pneumoniegruppen?
3. Ab welchem Zeitpunkt nach Induktion einer VAP ermöglicht die Detektion bakterieller VOCs eine Differenzierung zwischen Kontroll- und Pneumoniegruppen bzw. zwischen den ausgewählten Erregern?

1.1 THEORETISCHER HINTERGRUND

In den folgenden Kapiteln wird auf Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie der VAP eingegangen. Zudem soll das Erregerspektrum und dessen Charakteristika vorgestellt werden. Schließlich wird das Funktionsprinzip der Atemluftanalytik mittels MCC-IMS, sowie ihr Einsatz in der mikrobiologischen Erregerdiagnostik beschrieben.

1.1.1 Ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP)

Eine Pneumonie ist die Entzündung des Lungenparenchyms, die durch Bakterien, Viren oder Pilze bzw. deren Toxine ausgelöst werden kann. Das Eindringen der Erreger in die Lungen kann über die Atemwege, z. B. durch Aspiration von Sekreten oder die Inhalation erregerrhaltiger Aerosole erfolgen. Besteht andernorts im Körper ein Infektfokus, so kann eine Pneumonie auch durch hämatogene Streuung der Erreger ausgelöst werden.

Der menschliche Respirationstrakt verfügt über verschiedene Abwehrmechanismen bzw. Barrieren, die ein Eindringen von Erregern verhindern. Hierzu zählen anatomische Barrieren wie Larynx und Glottis, der Hustenreflex, die tracheobronchiale sekretorische Funktion, mukoziliäre Clearance, zelluläre und humorale Abwehrmechanismen sowie ein phagozytäres System aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Chastre und Fagon 2002).

Eine herabgesetzte Immunkompetenz von Patienten, strukturelle Atemwegserkrankungen, aber auch Fremdkörper, können diese Abwehrmechanismen stören und so die Entstehung einer Pneumonie begünstigen.

Eine nosokomiale Pneumonie (Hospital acquired pneumonia, HAP) ist definiert als Pneumonie, die frühestens 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme auftritt und sich bei Aufnahme nicht bereits in Inkubation befand. Eine VAP ist definiert als eine nicht weniger als 48 Stunden nach endotrachealer Intubation auftretende Pneumonie (Kalil et al. 2016). Eine VAP kann daher immer als eine nosokomiale Pneumonie betrachtet werden.

Der Umstand, dass eine VAP nur selten mit einer Bakteriämie einhergeht, lässt die Vermutung zu, dass bei beatmeten Patienten die Besiedlung des unteren Respirationstraktes weit überwiegend über dem Oropharynx erfolgt (Chastre und Fagon 2002).

Bei der endotrachealen Intubation überwindet der Endotrachealtubus die genannten anatomischen Barrieren des Larynx und der Glottis und schafft eine dauerhafte Verbindung zwischen Pharynx und Larynx. Das permanent geöffnete Lumen des Tubus, aber auch die für die Intubation notwendige Sedierung bzw. Narkose verhindern einen effizienten Hustenstoß und somit die Expektoration von Erregern und Sekreten. Außerdem fördert der Endotrachealtubus die Aspiration von erregerr-

haltigem Sekret aus dem Oro- und Hypopharynx und stellt seinerseits ein Habitat für biofilmbildende Bakterien dar. Auch ein korrekt geblockter Cuff schützt hierbei nicht zuverlässig vor Mikroaspiration. Ferner könnte die Rückenlage der Patienten sowie ein erhöhter pH-Wert des Magens im Rahmen einer Stressulcus-Prophylaxe die Entstehung einer VAP begünstigen (Chastre und Fagon 2002; Kohlenberg et al. 2010).

Weitere bedeutende Risikofaktoren für die Entstehung einer VAP sind die Kolonisation des Oropharynx mit Gram-negativen Erregern des Gastrointestinaltrakts, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Langzeitintubation und -beatmung, kontinuierliche Sedierung, Muskelrelaxierung, eingeschränkte Immunkompetenz und das Alter (< 1 Jahr, >65 Jahre) (KRINKO 2013; Chastre und Fagon 2002).

1.1.1.1 Diagnostik der VAP

Die korrekte Diagnose einer Pneumonie gestaltet sich aufgrund der Vielzahl möglicher Symptome und interindividueller Unterschiede ihrer Manifestation schwierig. Basierend auf den von Johanson et al. 1972 formulierten Diagnose-Kriterien (Johanson et al. 1972) empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie zur nosokomialen Pneumonie und VAP folgende Kriterien für die klinische Diagnose einer Pneumonie zu verwenden (Dalhoff et al. 2018):

- neu aufgetretenes oder progredientes Lungeninfiltrat im Röntgen (Standardtechnik in zwei Ebenen)

Außerdem müssen mindestens zwei der drei folgenden Kriterien erfüllt sein:

- purulentes Sekret
- Leukozyten > 10.000/ μ l oder < 4.000/ μ l
- Fieber $\geq 38,3^{\circ}\text{C}$

Sensitivität und Spezifität dieser klinischen Kriterien liegen bei ca. 70% (Fabregas et al. 1999). Bei einem Teil der Patienten wird also eine Pneumonie nicht erkannt bzw. liegt eine andere Erkrankung vor.

Bei beatmeten Patienten sind Qualität und Beurteilbarkeit thorakaler Röntgenaufnahmen erschwert. Die liegende Position der Patienten sowie mögliche pulmonale Stauungszeichen, Atelektasen, Pleuraergüsse und die mangelnde Mitarbeit der Patienten in Hinblick auf eine tiefe Inspiration zum Aufnahmezeitpunkt tragen dazu wesentlich bei (Rosseau et al. 2013). Durch die genannten Einschränkungen sinken Sensitivität und Spezifität thorakaler Röntgenaufnahmen in Hinblick auf die Diagnose pneumonieverdächtiger Infiltrate. Folglich steigt der Anteil falsch-negativer Ergebnisse, wodurch die Genauigkeit und der diagnostische Nutzen der Röntgenuntersuchung abnehmen (Winer-Muram et al. 1993).

Einer der bekanntesten semi-objektiven Scores zur VAP-Diagnostik ist der Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS). Dieser bezieht verschiedene klinische und laborchemische bzw. mikrobiologische Faktoren ein und gibt über ein Punktesystem die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer VAP wieder. Eine höhere Punktzahl korreliert mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer VAP. Es können maximal zwölf Punkte erreicht werden. Tabelle 1 gibt die Berechnung des CPIS wieder (Pugin et al. 1991).

Tabelle 1: CPIS (Clinical Pulmonary Infection Score).

Kriterium	Bedingung	Punktzahl
<u>Körpertemperatur</u>	$\geq 36,5$ bzw. $\leq 38,4^\circ\text{C}$	0
	$\geq 38,5$ bzw. $\leq 38,9^\circ\text{C}$	1
	$\geq 39,0$ bzw. $\leq 36,0^\circ\text{C}$	2
<u>Röntgen-Thoraxaufnahme</u>	Kein Infiltrat	0
	Diffuse oder fleckige Infiltrate	1
	Lokalisiertes Infiltrat	2
<u>Leukozytenzahl</u>	≥ 4.000 bzw. $\leq 11.000/\mu\text{l}$	0
	≤ 4.000 bzw. $\geq 11.000/\mu\text{l}$	1
	≤ 4.000 bzw. $\geq 11.000/\mu\text{l}$ plus Stabkernige $\geq 50\%$	2
<u>Tracheobronchialsekret (TBS)</u>	Kein Tracheobronchialsekret	0
	Nichteitriges Tracheobronchialsekret	1
	Eitriges Tracheobronchialsekret	2
<u>Oxygenierung (PaO₂/F_iO₂-Ratio)</u>	> 240 oder ARDS	0
	< 240 und kein ARDS	2
<u>TBS Kultur</u>	Pathogene Bakterien, geringe Keimzahl	0
	Pathogene Bakterien, mittlere bis hohe Keimzahl	1
	Pathogene Bakterien, mittlere bis hohe Keimzahl plus Nachweis in der Gram-färbung	2

PaO₂ /FiO₂: Quotient aus Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion (Horowitz-Index); ARDS: *Acute respiratory distress syndrom*.

Allerdings ist der CPIS stark untersucherabhängig und seine Sensitivität von 65% sowie Spezifität von 64% gering. Neben der Kalkulation nach Pugin gibt es weitere Modifikationen dieses Scores, deren Aussagekraft sich jedoch der Erhebung klinischer Parameter nicht überlegen zeigen konnte. Zur Entscheidung über die Einleitung einer antibiotischen Therapie bei Verdacht auf VAP wird daher in jüngeren Untersuchungen nach wie vor die Verwendung ausschließlich klinischer Parameter (z. B. Fieber, purulentes Sekret, Leukozytose oder -penie, Lungeninfiltrat im Röntgen, Tachypnoe etc.) empfohlen (Zilberberg und Shorr 2010; Kalil et al. 2016; Dalhoff et al. 2018).

Die Diagnose einer VAP ist die Grundlage der Indikation für eine empirische Antibiotikatherapie.

Hierbei muss die Gefahr der Resistenzinduktion durch unnötigen Einsatz von Antibiotika gegen das Risiko eines verspäteten Therapiebeginns abgewogen werden.

Obwohl die konventionelle mikrobiologische Diagnostik viel Zeit in Anspruch nimmt, ist sie aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität und Spezifität sowie einer zuverlässigen Resistenzbestimmung nach wie vor der diagnostische Goldstandard bei Infektionen und in vielen Fällen für eine adäquate Therapie alternativlos (Dalhoff et al. 2018).

Die Diagnostik basiert auf der Anzucht von Erregern auf Nährmedien und ihrer Identifizierung anhand verschiedener Faktoren wie ihres Wachstumsverhaltens oder ihrer optischen Eigenschaften nach Anfärbung (z. B. Gram-Färbung). So wachsen z. B. bestimmte Bakterienkulturen nur auf speziellen Nährböden, nur in Anwesenheit oder Abwesenheit bestimmter Stoffe (z. B. Sauerstoff) oder nur unter bestimmten Umweltbedingungen (z. B. pH-Wert, Temperatur). Die Betrachtung dieser Faktoren und der Morphologie der Bakterien- bzw. Pilzkolonien ermöglicht eine Identifizierung. Durch Anfertigung von Antibiogrammen können etwaige Resistenzen bestimmt und somit gezielte antibiotische Therapien eingeleitet werden.

Eine Probengewinnung für einen Erregernachweis bei klinischem Verdacht auf eine VAP findet aktuell in der Regel durch tracheobronchiale Aspiration (TBAS), bronchoalveoläre Lavage oder einen bronchoskopischen Bürstenabstrich (protected specimen brush, PSB) statt (Dalhoff et al. 2018). Des Weiteren sollte die Entnahme von Blutkulturen zum Nachweis einer etwaigen Bakteriämie erfolgen. Um die Erregeranzucht nicht einzuschränken, sollte die Probenentnahme vor Beginn einer Antibiotikatherapie geschehen. Der empirische Therapiebeginn darf dabei jedoch nicht relevant verzögert werden, da hierdurch eine erhöhte Letalität resultieren kann (Iregui et al. 2002).

1.1.1.2 Das Erregerspektrum der VAP

Bakterien sind die häufigsten Erreger einer VAP, während Viren und Pilze bei immunkompetenten Patienten ein nachrangiges Problem darstellen (Jones 2010).

Die häufigsten Erreger einer VAP werden neben den grampositiven Erregern *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* den gramnegativen Stäbchenbakterien zugeordnet. Im Vordergrund stehen hier die *Enterobacteriaceae* (v. a. *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* und *Acinetobacter spp.* (Jones 2010). Es treten dabei sowohl multiresistente grampositive Bakterienstämme (methicillin-resistenter *S. aureus*, MRSA) als auch mehrfach multiresistente gramnegative Stämme (3- und 4-MRGN-Stämme von *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* etc.) auf. Intrinsische Resistenzen wie z. B. gegen Ampicillin bei *P. aeruginosa* oder gegen Cephalosporine bei Enterokokken und erworbene Resistenzmechanismen können die antibiotischen Therapieoptionen einschränken.

Zu den Risikofaktoren für das Vorliegen eines multiresistenten Erregerstammes zählen unter anderem invasive Beatmung > 4-6 Tage, vorangegangene antibiotische Therapie, Hospitalisierung > 4 Tage, Aufenthalt auf einer Intensivstation, strukturelle Lungenerkrankung, Malnutrition, bekannte Kolonisation durch MRE, Aufnahme aus Langzeitpflegebereichen, chronische Dialyse, Tracheostomaträger und offene Hautwunden (Dalhoff et al. 2018).

Kohlenberg et al. 2010 geben auf Grundlage des KISS die prozentuale Häufigkeit der Erreger bei über 6.800 Patienten mit Pneumonie an. Die häufigsten hier nachgewiesenen Erreger waren *S. aureus* und gramnegative Bakterien (18 % bzw. 59,1 % der Erreger). Von allen nachgewiesenen Erregern hatte *E. coli* einen Anteil von 9,8 % und *P. aeruginosa* von 15,7 %.

Der Nachweis von *Candida spp.* ist in vielen Fällen von VAP möglich, nicht zuletzt da eine Selektion durch eine Antibiose stattfindet. Tatsächliche Candida-Pneumonien sind dagegen extrem selten, weshalb ein positiver Candida-Nachweis keine antimykotische Therapie nach sich ziehen sollte. Eine prospektive Autopsiestudie von Meersseman et al. 2009 bei 135 Patienten mit nosokomialer Pneumonie ergab im Therapieverlauf einen positiven *Candida spp.* Nachweis in der BAL/TBAS bei über 50 % der Untersuchten. Trotzdem konnte in dieser Studie autopsisch post mortem kein einziger Fall einer invasiven Candidose der Lunge aufgezeigt werden (Meersseman et al. 2009).

Dies gilt nicht für eine Aspergillus Pneumonie, die auch beim Immunkompetenten auftritt. Wegen ihrer hohen Letalität von 70-80 % sollte diese bei Vorliegen von Risikofaktoren (z. B. strukturelle Lungenerkrankungen) in die diagnostischen und therapeutischen Überlegungen einbezogen werden (Dahlhoff et al. 2018).

1.1.1.3 Therapie der VAP

Bei unkompliziertem Verlauf und adäquater Therapie ist eine Erkrankungsdauer von 10 bis 14 Tagen zu erwarten. Tritt 48 bis 72 Stunden nach Beginn einer empirischen Antibiotikatherapie keine Besserung der klinischen Symptomatik ein, sollte ein Therapieversagen angenommen werden und die gewählte Therapie aber auch die Diagnose hinterfragt werden. Bei Fortbestehen der Klinik oder entsprechender Risikokonstellation sollten anschließend auch atypische Erreger sowie Pilze in Erwägung gezogen werden (Schulte am Esch et al. 2011). Die Wahl der initialen, empirischen Antibiotikatherapie ist neben patientenspezifischen Parametern abhängig vom lokalen Erreger- und Resistenzspektrum der jeweiligen Klinik, weshalb universelle Therapieempfehlungen schwierig sind und internationale Leitlinien deutliche Unterschiede aufweisen (Wilke und Grube 2013).

Tabelle 2 gibt die Therapieempfehlungen der aktuellen S3-Leitlinie zur nosokomialen Pneumonie Erwachsener für eine kalkulierte antibiotische Therapie bei Patienten mit und ohne Risikofaktoren für MRE wieder.

Tabelle 2: Therapieempfehlungen für eine kalkulierte antibiotische Therapie bei nosokomialer Pneumonie bei Patienten mit und ohne erhöhtem Risiko für MRE (Dalhoff et al. 2018).

Ohne Risikofaktoren für MRE	Mit Risikofaktoren für MRE
<u>Aminopenicillin/BLI*</u>	<u>Pseudomonaswirksames Betalaktam</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Ampicillin/Sulbactam • Amoxicillin/Clavulansäure 	<ul style="list-style-type: none"> • Piperacillin/Tazobactam
oder	oder
<u>Cephalosporin Gr. 3a</u>	<u>Cephalosporin</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Ceftriaxon • Cefotaxim 	<ul style="list-style-type: none"> • Cefepim • Ceftazidim**
oder	oder
<u>Carbapenem</u>	<u>Carbapenem</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Ertapenem 	<ul style="list-style-type: none"> • Imipenem/Cilastatin • Meropenem
oder	plus
<u>Fluorchinolon</u>	<u>Fluorchinolon</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Moxifloxacin • Levofloxacin 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciprofloxacin • Levofloxacin
	oder
	<u>Aminoglykosid</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Gentamicin • Tobramycin • Amikacin
	<u>bei MRSA-Verdacht zusätzlich</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Glykopeptid oder Oxazolidinon • Vancomycin • Linezolid

*BLI=Betalaktamaseinhibitor. **nur in Kombination mit einer gegen Gram-positive Erreger wirksamen Substanz.

1.1.2 Merkmale der Erreger *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*

In vorliegender Arbeit wurde das volatile Metabolom der Erreger *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) untersucht. Beide gehören zu den häufigsten Erregern der VAP und sind hinsichtlich ihrer Eigenschaften gut untersucht. *In-vitro* Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe befassten sich mit der Differenzierung dieser Erreger anhand ihres VOC-Profiles. Hierfür erfolgten MCC-IMS Messungen der Gasphase über wachsenden Kulturen dieser Erreger (Kunze et al. 2013). Die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen sollten als Referenz dienen, weshalb auch in vorliegender Arbeit die Erreger *P. aeruginosa* und *E. coli* verwendet wurden. Im Folgenden werden die wichtigsten Eigenschaften dieser Erreger einzeln aufgeführt.

1.1.2.1 *Escherichia coli*

E. coli ist ein gramnegatives Bakterium und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Das Bakterium wächst aerob bzw. fakultativ-anaerob. Es existieren apathogene, fakultativ pathogene und obligat humanpathogene Stämme. *E. coli* ist Teil der residenten humanen Darmflora, kann aber auch intra- und extraintestinal vielfältige Infektionen hervorrufen. Fakultativ pathogene *E. coli* Stämme sind beim Gesunden Teil der intestinalen Flora. Sie können extraintestinal als Erreger verschiedener Erkrankungen wie Wundinfektionen, Harnwegsinfektionen, Gallenblasenentzündungen oder Pneumonien in Erscheinung treten. Obligat pathogene Stämme sind z. B. Auslöser des hämolytisch urämisches Syndroms (HUS). Viele *E. coli* Stämme besitzen intrinsische und erworbene Resistenzmerkmale gegen Antibiotika. Die konstitutionelle Bildung von β -Laktamasen führt beispielsweise zur Resistenzbildung gegenüber β -Laktam-Antibiotika. Weitere intrinsische Resistenzen bestehen gegen Makrolide und Glykopeptide. Mehrere parallel auftretende Resistenzmechanismen können unter Umständen zu einer multiplen und klinisch sehr problematischen Antibiotikaresistenz führen (Hahn et al. 2009; Kayser et al. 2014).

E. coli zeigt eine fermentative Kohlenhydratverwertung und reduziert Nitrat zu Nitrit. Beim Lactoseabbau entsteht Acetaldehyd, das zum Erregernachweis verwendet werden kann (Kayser et al. 2014). Weiterhin ist *E. coli* Katalase positiv sowie Oxidase negativ. Der Indol-Test zum indirekten Erregernachweis zeigt sich bei *E. coli* positiv (Hahn et al. 2009).

Das Enzym Tryptophanase ermöglicht in *E. coli* und anderen Bakterien den Abbau der Aminosäure Tryptophan zu Indol, Ammoniak (Azan) und Pyruvat (Botsford und Demoss 1972). Das aromatische Amin Indol spielt in *E. coli* unter anderem eine Rolle als chemischer Abwehrstoff, für die Biofilmbildung oder die Steuerung der Populationsdichte in *E. coli*-Kulturen. Eine erhöhte Produktion von Indol zeigt sich während der stationären Wachstumsphase von *E. coli* Kulturen und ist über diesen mittels MCC-IMS detektierbar (Mueller et al. 2009; Kunze et al. 2013). Indol besitzt keine Spezifität für *E. coli*. So konnten Jünger et al. 2012 mittels MCC-IMS Indol ebenfalls über wachsenden *K. oxytoca* Kulturen nachweisen.

Bei geringem Sauerstoffangebot bzw. unter anaeroben Bedingungen entsteht im Energiestoffwechsel von *E. coli* Ethanol. Eine Lyase überführt Pyruvat in Acetyl-Coenzym A, welches von *E. coli* über Acetaldehyd schließlich durch eine Alkohol-Dehydrogenase zu Ethanol verstoffwechselt werden kann (Kalscheuer et al. 2006). Ethanol ist als Teil des volatilen Metaboloms mittels MCC-IMS Analysen über *E. coli* Kulturen nachweisbar (Maddula et al. 2009)

Weitere Produkte des Pyruvatstoffwechsels in *E. coli* sind Laktat, Succinat und Acetat (Okuda et al. 2007). Aufgrund seiner Fähigkeit unter anaeroben Bedingungen aus Zuckern wie Xylose und Glucose oder Zuckeralkoholen wie Glycerol Ethanol zu produzieren ist *E. coli* Gegenstand aktuel-

ler Forschungen. So könnte das Bakterium als mikrobielle Plattform beispielsweise eine Rolle in der Bioethanolproduktion aus Glycerol spielen. Glycerol entsteht in großen Mengen als Nebenprodukt der Biodieselproduktion (Dharmadi et al. 2006).

Weiterhin entstehen beim Wachstum von *E. coli* Kulturen längerkettige aliphatische Alkohole und Fettsäuren. Diese Substanzen sind als Teil des volatilen Metaboloms von *E. coli* mittels massenspektrometrischen Verfahren oder MCC-IMS detektierbar (Jünger et al. 2012). In der Gasphase über wachsenden *E. coli* Kulturen sind vor allem während der exponentiellen Wachstumsphase die Alkohole Octanol, Decanol und Dodecanol nachweisbar, wobei Decanol quantitativ dominiert. Diese Alkohole könnten in *E. coli* als antimikrobielle Hemmstoffe fungieren (Hamilton-Kemp et al. 2005).

Neben *E. coli* produzieren verschiedene gram-negative Darmbakterien wie Salmonellen, Klebsiellen und Enterobacter diese langkettigen Alkohole. Andere nicht enterische gram-negative Bakteriengattungen wie *Pseudomonas* und *Acinetobacter*, als auch gram-positive wie Enterokokken, Staphylokokken und Streptokokken produzieren diese Alkohole nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen. Dieser Umstand könnte eine Differenzierung von Erregern ermöglichen (Elgaali et al. 2002).

1.1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium und gehört zur Familie der *Pseudomonadaceae*. Das Bakterium wächst aerob bzw. fakultativ-anaerob. Es handelt sich um einen der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen. Hierzu zählen Harnwegsinfektionen (v. a. bei bestehender Katheterisierung), kutane Infektionen (v. a. bei Verbrennungen), Otitis externa und media, neonatologische Infektionen (Meningitis, Omphalitis, Neonaten Sepsis, Pneumonie), ophtalmologische Infektionen, Endokarditiden und Pneumonien (v. a. bei Mukoviszidose). Aufgrund seiner niedrigen Ansprüche in trockener, wie auch feuchter Umgebung und hoher Überlebensfähigkeit ist das Bakterium in der Umwelt weit verbreitet und kann als sog. „Nasskeim“ auch Medizinprodukte (z. B. Respiratoren) kontaminieren. *P. aeruginosa* besitzt die Fähigkeit der Biofilmbildung, wodurch es sich vor allem an Grenzflächen (Übergang Wasser- zur Luftphase, Kunststoffoberflächen wie z. B. intravasalen Katheter) ansiedelt und hier z. T. für eine antibiotische Therapie nicht erreichbar ist.

Aufgrund der konstitutionellen Bildung von β -Laktamasen bestehen intrinsische Resistenzen unter anderem gegen β -Laktam-Antibiotika wie Penicilline und Cephalosporine der ersten und zweiten Generation. Weitere Resistenzen bestehen gegen Makrolide und Glykopeptide (Hahn et al. 2009; Kayser et al. 2014).

P. aeruginosa ist Oxidase positiv und kann Kohlenhydrate wie Glucose nicht fermentativ abbauen. Es wird daher als Non-fermenter bezeichnet. Unter anaeroben Bedingungen kann *P. aeruginosa* unter Anwesenheit von Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor wachsen (Hahn et al. 2009) und kann Energie aus der Fermentation von Pyruvat oder Arginin gewinnen. Als Produkte dieses Stoffwechsels entstehen Lactat und Acetat (Eschbach et al. 2004).

Als Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels entsteht in *P. aeruginosa* die volatile aromatische Verbindung Aminoacetophenon, die über wachsenden Kulturen per Geruchstest als süßlicher Geruch wahrnehmbar ist (Cox und Parker 1979). Weiterhin ist Aminoacetophenon sowohl in der Gasphase über wachsenden *P. aeruginosa* Kulturen, als auch in der Atemluft von Menschen mittels massenspektrometrischen Verfahren detektierbar. Als ein Hauptmetabolit von *P. aeruginosa* ist diese Verbindung als potentieller Biomarker Gegenstand aktueller Forschungen. So konnten Scott-Thomas et al. 2010 Aminoacetophenon in der Atemluft von Mukoviszidosepatienten detektieren, die eine pulmonale Besiedlung mit *P. aeruginosa* aufwiesen. Über anderen klinisch relevanten Vertretern der Gattung *Pseudomonas* ist Aminoacetophenon als VOC nicht nachweisbar (Labows et al. 1980).

Durch die β -Oxidation und Decarboxylierung geradzahliger Fettsäuren entstehen in *P. aeruginosa* neben Aceton Methyl-Ketone. Als Vertreter dieser Verbindungen sind Pentanon, Heptanon, Nonanon, Undecanon und Dodecanon, als VOC über *P. aeruginosa*-Kulturen massenspektrometrisch nachweisbar und könnten als potentielle Biomarker fungieren (Bos et al. 2013). Die äußere Membran von Pseudomonaden wie auch anderen gram-negativen Bakterien enthält Lipopolysaccharide (LPS). Diese könnten das Vorhandensein von Nonanon als einem Metabolit der hierin enthaltenen Fettsäuren erklären (Labows et al. 1980). Aceton wird von vielen Bakterien produziert und findet sich ebenfalls in der Atemluft von Säugetieren, weshalb sein nutzen als Biomarker eingeschränkt ist (Bos et al. 2013).

Ein Review von Bos et al. 2013 zeigte als weitere potentielle Biomarker für *P. aeruginosa* die Substanzen Undecen, Dimethyl-heptan, Butanon, Methyl-quinazolin, Methycyanide (Acetonitril) und Methythiocyanat auf.

1.1.3 Verfahren zur Erregeridentifizierung

Konventionelle mikrobiologische Verfahren sind nach wie vor der Goldstandard für die Identifizierung von Pathogenen und der Bestimmung ihrer Antibiotikaresistenzen. Diese basieren auf der Anzucht der Erreger auf geeigneten Nährmedien. Durch die kulturelle Anzucht können Aussagen zu Anforderungen der Erreger an die Kulturbedingungen (z. B. aerob, anaerob, mikroaerophil, Temperatur) und über Stoffwechseleigenschaften getroffen werden. Durch die Mikroskopie können Aussagen über die Morphologie (Kokken, Stäbchen, Schrauben), Anordnung (Ketten, Haufen, zu zweit, einzeln) und das Färbeverhalten von Bakterien getroffen werden (Gram-positiv/-negativ, Ziehl-Neelsen).

Auf Grundlage der Mikrodilutionsmethode mit Mikrotiterplatten kann die Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen erfolgen, welche vom Gerät fotometrisch von den Mikrotiterplatten abgelesen werden. Hierdurch ist weiterhin eine automatisierte Resistenztestung und damit die Erstellung eines Antibigrams möglich. Von der Probennahme bis zum Vorliegen endgültiger Befunde, inklusive Antibigramm, vergehen häufig 48 bis 96 Stunden (Kunze et al 2015a).

In der klinischen Routine erfolgt die mikrobiologische Diagnostik heutzutage zu großen Teilen automatisiert. Laborautomaten wie VITEK-2 (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) ermöglichen nach Herstellung eines standardisierten Inokulums die automatisierte Inkubation der Erreger. Anschließend ist neben der Resistenztestung nach o. g. Methode eine Identifikation von Bakterien und Pilzen anhand ihres biochemischen Profils möglich (Neumeister et al. 2009).

Innovative Diagnostikverfahren könnten eine frühere gezielte Anpassung der Antibiotikatherapie ermöglichen. Dies könnte einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf, das Gesamtüberleben von Intensivpatienten sowie auf die Behandlungskosten haben (Iregui et al. 2002).

Neuere Ansätze zur schnellen Erregeridentifizierung nutzen den Nachweis des mikrobiellen Genoms (genomische Verfahren), ihrer spezifischen Protein- bzw. Enzymmuster (proteomische Verfahren) oder analysieren erregerspezifische Metabolitmuster (metabolomische Verfahren). Im Folgenden werden einige dieser alternativen diagnostischen Verfahren vorgestellt.

1.1.3.1 Genomische Verfahren – Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Polymerase Kettenreaktion, engl.: *polymerase chain reaction*) ist ein genomisches Verfahren zum Nachweis bestimmter DNS (Desoxyribonukleinsäure)-Abschnitte bzw. Nukleinsäure-Sequenzen. Hierbei wird in verschiedenen Arbeitsschritten die doppelsträngige DNS durch Erhitzen in ihre Einzelstränge gespalten (Denaturierung), anschließend wird eine vorher definierte Nukleotidsequenz (Primer) hinzugegeben. Diese bindet an die komplementären Basen des zu untersuchenden bzw. gesuchten DNS-Abschnitts, sofern dieser in der Probe vorhanden ist. Im letzten Arbeitsschritt findet ausgehend vom an die DNS gebundenen Primer die Verlängerung eines bestimmten DNS-Abschnitts statt. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Abläufe kann so eine gesuchte DNS-Sequenz vermehrt und anschließend bei ausreichender Menge z. B. mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Anhand spezifischer DNS-Abschnitte können hiermit Erreger identifiziert aber auch Genabschnitte nachgewiesen werden, die für Antibiotika-Resistenzen codieren. Neuere genomische Verfahren sind in der Lage mehrere gesuchte DNS-Abschnitte gleichzeitig zu amplifizieren und zu detektieren (Zhu et al. 2007). Diese als Multiplex-PCR (mPCR) bzw. Real-time-PCR bezeichneten Verfahren stehen mittlerweile auch als Point-of-care Technologien für den klinischen Alltag zur Verfügung. Hierdurch kann die Befundumlaufzeit mikrobiologischer Proben relevant verkürzt werden (Kunze et al. 2015a). Allerdings zeigten aktuelle Studien auch Limitationen dieser Verfahren für den Einsatz im klinischen Alltag auf:

In einer Untersuchung an Patienten mit klinischem Verdacht auf eine nosokomiale Pneumonie verglichen Kunze et al. 2015 (a) den diagnostischen Wert des Unyvero multiplex PCR Systems (Curetis AG, Holzgerlingen, Germany) mit konventionellen mikrobiologischen Verfahren (Erreger-Anzucht und Resistenzbestimmung). Durch die Nutzung der mPCR-Technik konnte die Befundumlaufzeit für die Untersuchung von Trachealsekretproben von im Mittel 71 Stunden bei Nutzung der konventionellen Mikrobiologie auf im Mittel 6,5 Stunden reduziert werden. Allerdings erwiesen sich hierbei nur 60 % der Ergebnisse der mPCR-Technik als deckungsgleich mit der konventionellen Mikrobiologie, so dass der Nutzen dieser Technik als alleiniges mikrobiologisches Diagnostikum zweifelhaft erscheint (Kunze et al. 2015a).

Warhurst et al. 2015 untersuchten eine weitere mPCR-Technik (SeptiFast, Roche, Grenzach-Wyhlen) bei Verdacht auf Sepsis. 12,5 % der in der Blutkultur nachweisbaren Pathogene konnten mit dieser Technik nicht nachgewiesen werden, da sie aufgrund technischer Limitationen nicht detektierbar waren. Darüber hinaus konnten bei einer Sensitivität von ca. 50 % nur 40 % der Ergebnisse der positiven Blutkulturen auch mittels mPCR reproduziert werden.

Dies zeigt, dass die mPCR-Technik zwar eine Ergänzung zur konventionellen mikrobiologischen Diagnostik v. a. hinsichtlich einer zeitnahen adäquaten Therapie sein kann, diese jedoch aufgrund ihrer Limitationen noch nicht ablösen kann.

1.1.3.2 Proteomische Verfahren – Matrix-assistierte-Laser-Desorption-Ionisation – Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-ToF-MS)

Die Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisation - time of flight - Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) ist ein kombiniertes, massenspektrometrisches Verfahren zur Detektion und Identifizierung komplexer Moleküle mit großen Massen und Biopolymeren wie Proteinen. Auf Grundlage erregerspezifischer Muster ribosomaler Proteine und anderer Zellbestandteile ist eine Identifizierung von Bakterien und Pilzen mit diesem Verfahren möglich (van Veen et al. 2010).

Hierbei wird der Analyt in eine Matrixsubstanz mit definierten Eigenschaften (i.d.R. kleine organische Moleküle) eingebettet, wobei es zur Kristallisation der Matrix unter Einschluss des Analyten kommt. Durch Beschuss des kristallisierten Matrix-Analyt-Gemisches mit einem hochenergetischen Laser, dessen Wellenlänge in etwa dem Absorptionsmaximum der Matrixmoleküle entspricht, kommt es durch wiederholte Anregung und Relaxation der Matrixmoleküle zur Sublimation von Teilen des Matrix-Analyt-Gemisches (Desorption) in das Vakuum der Ionisationskammer. Hier kommt es zum Verdampfen der Matrixbestandteile und v. a. durch Protonenaufnahme zur Ionisation der nun freigesetzten Analytmoleküle (Ionisation). Diese werden durch ein konstantes magnetisches Feld beschleunigt. Die Beschleunigung der Ionen im Vakuum hängt von ihrer Masse und Ladung ab, da die zugeführte kinetische Energie für jedes Molekül gleich ist. Ausgehend von ihrer initialen Geschwindigkeit nach Sublimation werden die Ionen in der Ionisationskammer auf ihre Driftgeschwindigkeit (v_d) beschleunigt, mit der sie den nachgeschalteten Analysator durchfliegen. Die Flugzeit (time of flight = TOF) ist hierbei proportional zur Masse und umgekehrt proportional zur Ladung der Analytionen bzw. zu ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Dieser Zusammenhang gilt invers für die Driftgeschwindigkeit der Analytionen. Die Ladung der Analytionen ist nach Protonierung in der Regel +1, daher kann aus dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis auf die molare Masse des untersuchten Moleküls rückgeschlossen werden.

Ein Detektor am Ende des Analysators misst die Zeit bis zum Eintreffen der Ionen (TOF). Durch Bestimmung ihres Masse-Ladungsverhältnisses und ihrer TOF ist durch Abgleich mit einer Referenzdatenbank anschließend die Identifizierung des Analyten möglich.

MALDI-TOF-MS gilt in der Humanmedizin als ein zuverlässiges Verfahren zur Identifizierung von Bakterien und Pilzen, das sich in mehreren Studien hinsichtlich der korrekten Erregeridentifizierung mit Ausnahme weniger Keime der herkömmlichen mikrobiologischen Diagnostik als ebenbürtig, wenn nicht sogar überlegen, erwies (Seng et al. 2009; van Veen et al. 2010). Es kommt mittlerweile in vielen medizinisch mikrobiologischen Laboren zum Einsatz. Allerdings hängt die Zuverlässigkeit der Ergebnisse von der Qualität der Referenzstämme in den verwendeten Datenbanken ab. In der Routine ist eine vorherige Anzucht der Erreger nötig, so dass nicht-kultivierbare Bakterien sowie Proben mit verschiedenen Erregerstämmen eine Herausforderung darstellen. Die

Untersuchung von Direktmaterial mittels MALDI-TOF ist bislang experimentell (Stevenson et al. 2010; Vlek et al. 2012). Dies kann auch zu verzögerten Befundumlaufzeiten führen. Eine weitere Einschränkung hinsichtlich der Verwendung der MALDI-TOF-MS Technik ist, neben der Größe des Messapparats, die Komplexität ihrer Anwendung, weshalb sie von speziell geschultem Personal in Laboren großer medizinischer Zentren zur Anwendung kommt. Eine Verwendung im Sinne eines Point-of-Care-Verfahrens, z. B. auf einer Intensivstation, ist daher nicht möglich.

1.1.3.3 Metabolomische Verfahren

Metabolomische Verfahren machen sich erregerspezifische Stoffwechselprodukte bzw. die Kombination dieser Produkte zur Identifizierung der Organismen zu Nutze. Diese individuellen Stoffwechseleigenschaften lassen sich aufgrund der verwerteten Substrate und der hierbei produzierten Metabolitmuster feststellen und ermöglichen die Erregeridentifizierung.

Ein etabliertes labortechnisches Verfahren zur metabolomischen Erregerbestimmung ist die sogenannte „Bunte Reihe“, bei der nach Beimpfung von verschiedenen Substraten mit Bakterien suspension biochemische Reaktionen anhand von Farbumschlägen abgelesen werden können. Anhand dieses Reaktionsmusters kann eine Identifizierung von Erregern stattfinden (Süßmuth et al. 1987). Doch nicht nur in festen oder flüssigen Phasen können Stoffwechselprodukte bzw. -edukte zur Erregerbestimmung genutzt werden. Auch das volatile Metabolom von Mikroorganismen kann zu deren Identifizierung verwendet werden.

Während ihres Wachstums hinterlassen Bakterien und Pilze nicht nur im Substrat metabolische Spuren, sondern geben ebenfalls volatile organische Verbindungen (VOC) an ihre Umgebung ab (Zoller und Clark 1921; Schulz und Dickschat 2007). Über deren gasanalytische Detektion ist eine Erregeridentifizierung möglich, was in mehreren *in-vitro* Studien gezeigt werden konnte (Perl et al. 2011; Jünger et al. 2012; Kunze et al. 2013). Die hierbei als analytisches Verfahren verwendete Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) ermöglicht die Detektion und Quantifizierung von VOC in sehr geringen Konzentrationsbereichen von parts per billion- (ppb) bis parts per trillion- (ppt).

Da der mikrobielle Stoffwechsel jedoch auch vom Substrat abhängig ist, ist auch das volatile Metabolom als Ausdruck dieses Stoffwechsels substratabhängig (O’Hara und Mayhew 2009; Kunze et al. 2013). Dieser Umstand erschwert die Übertragbarkeit von *in-vitro* Ergebnissen auf andere *in-vitro* Versuche. Mehr noch gilt dies für *in-vivo* Versuche, da ein vitales Habitat wie z. B. eine Säugtierlunge ein sehr komplexes und dynamisches Medium darstellt. Die Atemgasanalyse zur Erregeridentifizierung stellt hierbei besondere technische Anforderungen, die im Kapitel 1.1.4 näher beschrieben werden.

Die Funktionsweise der in dieser Arbeit verwendeten MCC-IMS Technik wird in Kapitel 1.1.5 weitergehend erläutert.

1.1.4 Technische Anforderungen an die Analytik

Die Atemluft des Menschen enthält neben Gasen wie Stickstoff, Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Edelgasen viel Wasserdampf sowie hunderte volatile organische Verbindungen (VOC) (Carstens 2010). Diese entstehen an verschiedenen Orten des Körpers und werden als Produkte verschiedener Stoffwechselwege über das Blut zu den Lungen transportiert und dort eliminiert. Der Nachweis und die Quantifizierung dieser VOC stellen ein potentiell diagnostisches Verfahren dar. Auch Medikamente oder Substanzen wie Ethanol werden zum Teil über die Lunge eliminiert und können z.T. nachgewiesen werden. Verschiedene Forschungsprojekte beschäftigten sich in den letzten Jahren mit dem Nachweis von Erkrankungen aber auch Substanzen wie z. B. dem Narkotikum Propofol durch Detektion von VOC in der Atemluft von Patienten (Perl et al. 2009; Carstens 2010; Chouinard et al. 2016).

Ob und in welcher Menge ein volatiler Stoff bzw. Gas im Blut gelöst transportiert und pulmonal eliminiert werden kann, hängt von seinem Löslichkeitsverhalten ab. Das Henry-Gesetz beschreibt dieses durch folgende Formel:

$$P_{part} = K_h * c_l \quad \text{bzw.} \quad c_l = \frac{P_{part}}{K_h} \quad [1]$$

Demnach ist die Stoffmengenkonzentration (c_l) eines im Blut gelösten Stoffes direkt proportional zu seinem Partialdruck (P_{part}) in der angrenzenden Gasphase und indirekt proportional zu seiner substanzspezifischen Henry-Flüchtigkeitskonstante (K_h). Je flüchtiger also ein Stoff (höhere Henry-Flüchtigkeitskonstante), desto geringer ist die in Lösung befindlich Stoffmengenkonzentration (c_l). Des Weiteren haben strukturelle und funktionelle Lungenerkrankungen (u. a. durch verlängerte Diffusionsstrecke, Atelektasen, verringerte Austauschfläche) sowie die pulmonalen und systemischen Perfusionsverhältnisse (Transport von VOC zur Lunge) hierbei einen potentiellen Einfluss auf die in der Atemluft auftretenden VOC und sollten demnach Berücksichtigung finden (Schubert et al. 2004).

Da Atemgas ein komplexes Gemisch mit volatilen Verbindungen und Aerosolen darstellt, bestehen gewisse technische Herausforderungen an eine zuverlässige Atemgasanalytik. Diese sollte die qualitative und quantitative Detektion von VOC ermöglichen, um Rückschlüsse auf dynamische physiologische und pathologische Prozesse im Körper zu erlauben. Substanzen in Atemgasproben können durch Totraumventilation auf zirka ein Drittel der vorhandenen Alveolarkonzentration verdünnt werden. Daher sollte sichergestellt sein, dass möglichst ausschließlich alveolares Atemgas analysiert wird. Dies kann beispielsweise mittels Kapnometrie- oder Flow-kontrollierter Proben-

nahme gewährleistet werden (Schubert et al. 2004; Vautz et al. 2010). Der hohen Wasserdampfsättigung des Exspiriums muss ebenfalls technisch Rechnung getragen werden. Die Kopplung eines IMS-Gerätes mit einer Multikapillarsäule (MCC) ermöglicht unter anderem die Analyse feuchter Atemluftproben (Baumbach 2009; vgl. Kapitel 1.1.7).

Um eine Verunreinigung der Probe z. B. durch Einflüsse aus der Umgebungsluft zu vermeiden, sollte ein geschlossenes System zur Probennahme verwendet werden. Zudem sollte der volatile Hintergrund des analysierten Systems (z. B. Beatmungssystem) mit Nullmessungen erfasst werden. Weiterhin kann es zum Verlust von Analyten durch Interaktion mit den verwendeten Materialien und Probenbehältern kommen (Lorenz et al. 2017). Bei ventilierten Patienten haben darüber hinaus die Einstellungen des Respirators Einfluss auf die Messergebnisse (Schubert et al. 2004).

Kapitel 1.1.5 erläutert die Funktionsweise der Ionenmobilitätsspektrometrie im Allgemeinen, sowie der hier verwendeten MCC-IMS Technik im Speziellen.

1.1.5 Funktionsweise der Ionenmobilitätsspektrometrie

Die Ionenmobilitätsspektrometrie ist ein Analyseverfahren, das die Identifikation gasförmiger Analyte bei Umgebungsluftdruck und -temperatur in niedrigen Konzentrationsbereichen (ppb bis ppt) ermöglicht. Das ursprünglich unter dem Namen Plasma-Chromatographie von Cohen und Karasek 1970 eingeführte Verfahren wurde in vielen technischen Bereichen erprobt und weiterentwickelt. Es etablierte sich u. a. bei der Detektion chemischer Kampfstoffe, von Sprengstoffen, Drogen, in der industriellen Prozesskontrolle und der umwelttechnischen Luftgütekontrolle (Tiebe 2010). Aufgrund der kurzen Analysezeit, geringen Nachweisgrenzen und der relativ geringen technischen Anforderungen war die Ionenmobilitätsspektrometrie in den letzten Jahren auch Gegenstand verschiedener Untersuchungen im humanmedizinischen Bereich (Chouinard et al. 2016).

Zentrale Bestandteile eines Ionenmobilitätsspektrometers sind der Ionisationsraum, der Driftraum und der Detektor (vgl. Abb. 1). Das grundlegende Prinzip basiert auf der Ionisation gasförmiger Moleküle, deren Bewegung (Drift) in einem elektromagnetischen Feld sowie deren Detektion an einem Detektor (Faraday-Platte).

Für die Ionisation von Gasen in der Ionenmobilitätsspektrometrie stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum Einsatz kommen u. a. UV-Strahlung, Radioaktivität, Laser oder Elektrospray. In vorliegender Arbeit fand das Nickel-63-Isotop (^{63}Ni) als radioaktive β -Strahlungsquelle Anwendung. β -Strahlung ist eine Teilchenstrahlung, bei der eine Energieemission in Form beschleunigter Elektronen (e^-) stattfindet. ^{63}Ni zerfällt vollständig als β -Strahler, emittiert β -Teilchen (Elektronen) mit einer maximalen Energie von ca. 67 Kiloelektronenvolt bei einer Halbwertszeit von etwa 100 Jahren. Treffen die emittierten Elektronen auf Gasmoleküle kommt es zur Ionisation dieser.

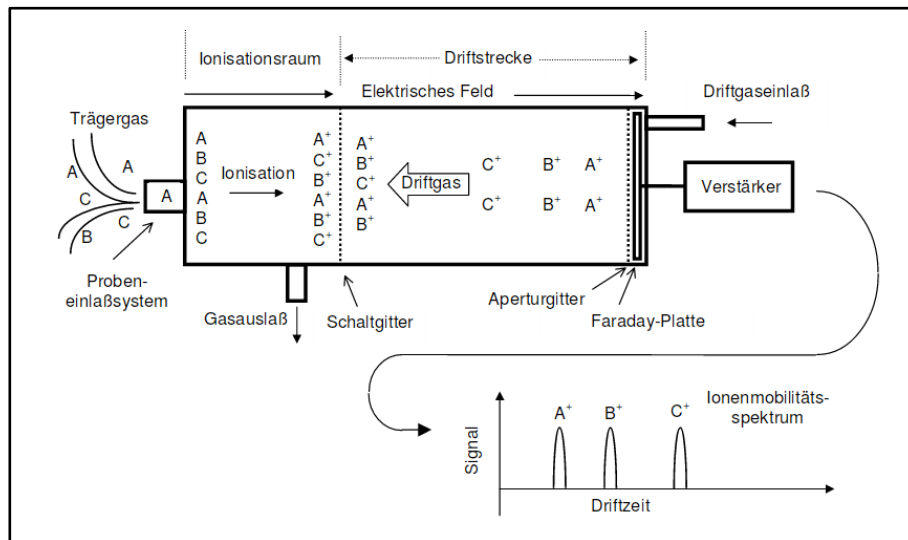


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Ionenmobilitätsspektrometers und eines Driftzeitspektrums. (Sielemann 1999; S.6). A, B, C = Analytmoleküle; A⁺, B⁺, C⁺ = Analytionen. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. S. Sielemann.

Durch den Drift- und Ionisationsraum strömt bei atmosphärischen Druckverhältnissen in entgegengesetzter Richtung zur Bewegung des Probengases ein Driftgas mit einer definierten Flussrate. Hierfür können verschiedene Gase und Gasgemische verwendet werden. Im Ionisationsraum erfolgt die Ionisation der Driftgasmoleküle. Es entstehen in einer Reaktionskette die sogenannten Reaktantionen, wobei protonierte Wassercluster die häufigsten Reaktantionen darstellen. Bei Einlass des Analyten in den Ionisationsraum kommt es durch Wechselwirkungen der Reaktantionen mit den Analytmolekülen v. a. im Rahmen von Protonentransfer-Reaktionen zur Bildung von Analytionen. Kapitel 1.1.6 beschreibt diese Vorgänge im Detail.

Durch ein elektrisches Schaltgitter, welches den Ionisations- vom Driftraum trennt, erfolgt der Einlass der Analytionen in den Driftraum. Dieses öffnet periodisch für einen definierten Zeitraum und lässt einen Ionenschwarm in den Driftraum eintreten. Durch ein hier anliegendes homogenes elektromagnetisches Feld bewegen sich die Analytionen entlang der parallel zu ihrer Bewegungsrichtung verlaufenden Feldlinien in Richtung des Detektors (Faraday-Platte). Das äußere magnetische Feld wird durch Metallringe und entsprechende Isolationsmaterialien wie Keramik erzeugt, wobei dessen weitgehende Homogenität vom Radius und Abstand der verwendeten Metallringe abhängig ist (Sielemann 1999).

Die Bewegung der Analytionen im Driftraum (Drift) wird bestimmt durch Ihre Ladung (Kationen oder Anionen) und durch die Polarität des anliegenden Magnetfeldes. Durch Wahl der Polarität des Magnetfeldes können sowohl positive als auch negative Analytionen erfasst werden (positiver bzw. negativer Ionenmodus).

Während dieses Drifts durch den Driftraum mit definierter Driftstrecke l_d [cm] kollidieren die Probenionen mit den ihnen entgegenkommenden Driftgasmolekülen, wodurch sie an kinetischer Energie verlieren. Abhängig von Größe, Struktur und Masse der Analytioneen kommt es hierdurch zur Auftrennung des Ionenschwarms. Es stellt sich durch diese wiederholten Kollisionen mit Driftgasmolekülen bei konstanter Zufuhr kinetischer Energie durch das Magnetfeld nach kurzer Zeit eine ionenspezifische konstante Driftgeschwindigkeit v_d [cm/ms] ein (Baumbach 2009). Diese bestimmt die am Detektor gemessene und für den Analyten charakteristische Driftzeit t_d [ms]. Für die Driftgeschwindigkeit der Analytioneen gilt:

$$v_d = \frac{l_d}{t_d} \quad [2]$$

v_d =Driftgeschwindigkeit; l_d =Driftstrecke; t_d =Driftzeit

Bei Auftreffen der Analytioneen auf dem Detektor (Faraday-Platte) entsteht ein elektrischer Strom. Voraussetzung hierfür ist das dem Detektor vorgeschaltete Aperturgitter, das eine kapazitive Entkopplung der driftenden Ionen und der Faraday-Platte und somit eine störungsfreie Messung ermöglicht. Mittels Verstärkung durch einen Strom-Spannungswandler entsteht ein Signal, das in Abhängigkeit zur Driftzeit grafisch in einem digitalen Driftzeitspektrum dargestellt werden kann. Die Ionenmobilität K , also die Beweglichkeit der Analytioneen bei ihrer Bewegung durch den Driftraum ist proportional zur jeweiligen Driftgeschwindigkeit, umgekehrt proportional zur Driftzeit und somit abhängig von Größe und Masse der ionisierten Analytmoleküle. Nach Einbeziehung weiterer Einflussfaktoren wie Temperatur, Druck oder Moleküldichte des Driftgases erhält man die reduzierte Ionenmobilität K_0 (vgl. Gleichung [6] unten).

Angetrieben durch das homogene elektrische Feld (in vorliegender Untersuchung: $\vec{E}_d = 330 \text{ V/cm}$) bewegen sich die Ionen durch den Driftraum, wobei es zu Kollisionen mit den in entgegengesetzter Richtung strömenden Driftgasmolekülen kommt. Eine höhere Anzahl an Kollisionen und hiermit ein Verlust kinetischer Energie resultiert in einer niedrigeren Driftgeschwindigkeit v_d [cm/ms] und somit einer niedrigeren Ionenmobilität K [cm²/Vs]. Außerdem ist die Driftgeschwindigkeit proportional zur anliegenden Feldstärke des homogenen elektrischen Feldes innerhalb des Driftraums \vec{E}_d [V/cm]. Unter Einbeziehung von Gleichung [2] gilt für die Driftgeschwindigkeit:

$$v_d = \frac{l_d}{t_d} = K * \vec{E}_d \quad [3]$$

v_d =Driftgeschwindigkeit; l_d =Driftstrecke; t_d =Driftzeit; K =Ionenmobilität;
 \vec{E}_d =elektrische Feldstärke

Eine Umformung der Gleichung [3] ermöglicht nun die Bestimmung der Ionenmobilität bzw. des Proportionalitätskoeffizienten K [cm²/Vs] aus der jeweiligen Driftzeit bei konstanter Driftstrecke:

$$K = \frac{l_d}{t_d \cdot \vec{E}_d} \quad [4]$$

K =Ionenmobilität; l_d =Driftstrecke; t_d =Driftzeit; \vec{E}_d =elektrische Feldstärke

Weiteren Einfluss auf die Ionenmobilität haben äußere Faktoren wie Luft- bzw. Gasdruck p , Dichte N der Driftgasmoleküle und Temperatur T . Die allgemeine Gasgleichung für ideale Gase beschreibt die Zusammenhänge der Zustandsgrößen eines Gases. N_A ist hierbei die Avogadro-Konstante mit $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{Teilchen} \cdot \text{mol}^{-1}$, R_S ist die spezifische Gaskonstante.

Nach der Dichte der Gasmoleküle umgestellt ergibt sich folgende Gleichung (vgl. Tiebe 2010):

$$N = \frac{p \cdot V \cdot N_A}{R_S \cdot T} \quad [5]$$

N =Dichte; p =Druck; V =Volumen; N_A =Avogadro-Konstante;

R_S =spezifische Gaskonstante

Steigt z. B. bei konstantem Druck p die Temperatur T des Driftgases, resultiert eine niedrigere Dichte N des Driftgases. Hierdurch treten weniger Kollisionen der Analytionen mit den Driftgasmolekülen auf, wodurch die Ionenmobilität und Driftgeschwindigkeit steigt. Folglich ist die Ionenmobilität proportional zur Temperatur und invers proportional zur Dichte des Driftgases. Um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse unter variablen Umweltbedingungen sicher zu stellen, erfolgt daher die Normierung der Ionenmobilität K durch Reduktion auf Standardbedingungen ($p_0 = 1013 \text{hPa}$; $T_0 = 273,15 \text{K}$).

Folgende Gleichung beschreibt diese sogenannte reduzierte Ionenmobilität K_0 (vgl. Tiebe 2010):

$$K_0 = K \cdot \left(\frac{p}{1013 \text{hPa}} \right) \cdot \left(\frac{273,15 \text{K}}{T} \right) \quad [6]$$

K_0 =reduzierte Ionenmobilität; K =Ionenmobilität; p =Druck; T =Temperatur

Unter Einbeziehung weiterer Faktoren entwickelten Revercomb und Mason 1975 auf Basis gaskinetischer Gesetze die Gleichung [7], welche die Bestimmung der Ionenmobilität unter Berücksichtigung intermolekularer Stoßprozesse ermöglicht. Hierbei bezeichnet N die Molekülzahl des Driftgases, m die Ionenmasse, q die Ladung, M_m die Masse der Driftgasmoleküle, T_{eff} die Driftgastemperatur, k_b die Boltzmann-Konstante, $\Omega_d(T_{eff})$ den von T_{eff} abhängigen Stoßquerschnitt und γ einen Korrekturfaktor $< 0,02$ bei $m > M_m$. Diese verdeutlicht die Abhängigkeit der Ionenmobilität von ihrer Masse, Ladung und ihrer inversen Proportionalität zur Größe der Probenionen.

Die Größe atomarer Ionen ist konstant und ihre Ionenmobilität daher von ihrer Masse abhängig. Ionisierte Moleküle (ionisierter Verbund mehrerer Atome) weisen einen größeren Stoßquerschnitt auf, weshalb es zu vermehrten Kollisionen mit Driftgasmolekülen und zum Verlust kinetischer Energie kommt. Ihre Mobilität ist somit geringer:

$$K = \frac{\frac{3q}{16N} * \left(\frac{m+M_m}{mM_m}\right)^{0,5} * \left(\frac{2\pi}{k_b T_{eff}}\right)^{0,5} * (1+\gamma)}{\Omega_d(T_{eff})} \quad [7]$$

K =Ionenmobilität; q =Ladung; N =Molekülnzahl; m =Ionenmasse; M_m = Masse der Driftgasmoleküle; k_b =Boltzmann-Konstante; T_{eff} =Driftgastemperatur; $\Omega_d(T_{eff})$ =Stoßquerschnitt; γ =Korrekturfaktor

Weiteren Einfluss auf die spezifische Driftzeit von Analytionen hat die Diffusion von Ionen. Geht ein Probenionenschwarm in den Driftraum, kommt es hier nicht nur zur Bewegung der Ionen entlang der magnetischen Feldlinien, sondern auch zu einer Bewegung aufgrund von Diffusion. Hierdurch entsteht eine gaußförmige Verteilung der Ionendichte im Ionenschwarm, die in einer leicht erhöhten Driftzeitverteilung für gleichartige Ionen resultiert und sich in der Breite des jeweiligen Ionen-Peaks im Driftzeitspektrum manifestiert. Die Nernst-Einstein-Beziehung beschreibt diesen Einfluss der Diffusion auf die Ionenmobilität für Systeme mit niedrigem Gradienten für das elektrische Feld und der Ionenkonzentration anhand des Diffusionskoeffizienten D (vgl. Sielemann 1999):

$$K = \frac{q * D}{k_b * T} \quad [8]$$

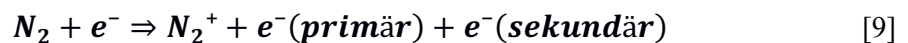
K =Ionenmobilität; q =Ladung; D =Diffusionskoeffizient; k_b =Boltzmann-Konstante; T =absolute Temperatur

1.1.6 Ionisationsvorgänge im Ionenmobilitätsspektrometer

Wie bereits unter 1.1.5 beschrieben, kommt es im Ionisationsraum des IMS in einem ersten Schritt zur Bildung von Reaktionsionen und anschließend durch diese zur Bildung der Analytione. Treffen initial die Elektronen der Strahlungsquelle auf die Gasmoleküle der Luft, kommt es zu Stoßionisationen, in Folge derer positive und negative Reaktionsionen entstehen. Durch diese kommt es anschließend zur Bildung negativ und positiv geladener Analytione. Im Folgenden werden diese Schritte näher erläutert.

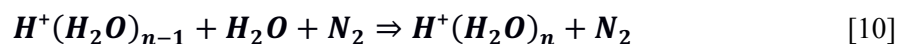
1.1.6.1 Bildung positiver Reaktionsionen

Ein primäres Elektron ionisiert den in der Luft enthaltenen Stickstoff N_2 entsprechend folgender Gleichung:



Hierbei entsteht neben dem positiv geladenen Stickstoff-Ion N_2^+ ein primäres sowie ein sekundäres Elektron e^- . Die Elektronen kollidieren mit weiteren Gasmolekülen, bis deren Energie unter die notwendige Ionisierungsenergie gefallen ist. Durch Kollision des Stickstoff-Ions mit weiteren Stickstoffmolekülen und seiner anschließenden Reaktion mit den in der Luft enthaltenen Wassermolekülen H_2O entstehen in einer Reaktionskaskade letztendlich in weit überwiegender Zahl die positiven Reaktionsionen $H^+(H_2O)_n$. Neben diesen entstehen aufgrund minimaler Verunreinigungen der verwendeten Luft durch Stickstoffmonoxid und Ammoniak die Ionen $NO^+(H_2O)_n$ und $NH_4^+(H_2O)_n$.

Gleichung [9] beschreibt hierbei den ersten, Gleichung [10] den letzten Reaktionsschritt dieser Kaskade:



Der Index n beschreibt hierbei die Anzahl von Ionen in den auftretenden Ionenclustern und ist abhängig von der Temperatur im Ionisationsraum (Tiebe 2010). In einem IMS-Spektrum des positiven Messbereiches sind die Reaktionsionen $H^+(H_2O)_n$ und $NH_4^+(H_2O)_n$ als sogenannter Reaktionsionen-Peak (RIP) sichtbar. Aufgrund der zu geringen Konzentration ist $NO^+(H_2O)_n$ nicht im Spektrum erkennbar.

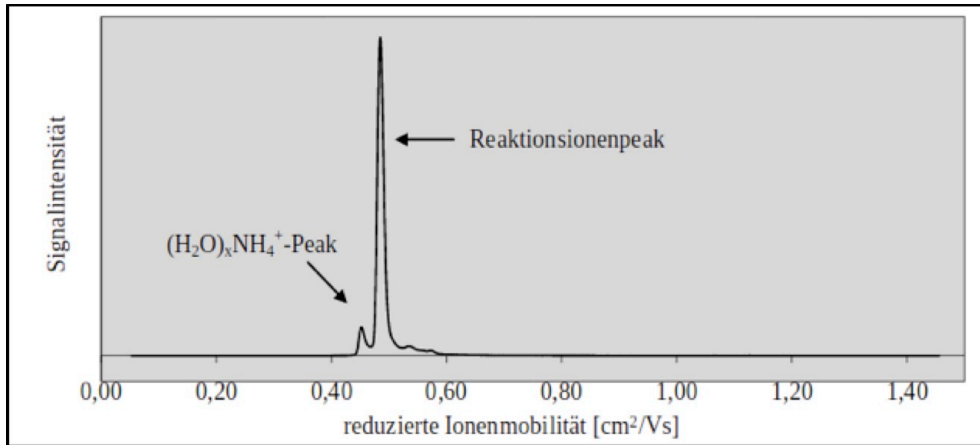


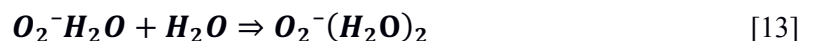
Abbildung 2: Schema eines IMS-Spektrums des verwendeten Nickel-IMS, positiver Messbereich. Reaktionsionenpeak= RIP für $H^+(H_2O)_n$ (Carstens 2010; S.20). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Dr. E. Carstens.

1.1.6.2 Bildung negativer Reaktionsionen

Durch Elektronenanlagerung an molekularen Sauerstoff O_2 entstehen unter Normaldruck im Ionisationsraum negativ geladene Reaktionsionen gemäß folgender Reaktion:



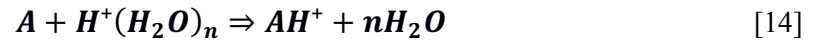
Das entstandene Sauerstoff-Ion O_2^- reagiert anschließend mit den in der Luft enthaltenen Wassermolekülen gemäß folgenden Schritten:



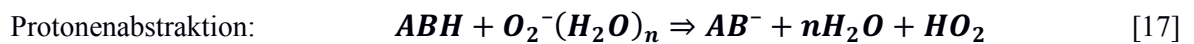
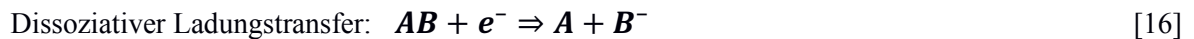
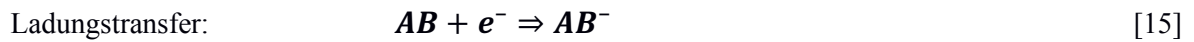
1.1.6.3 Bildung der Analytionen

Bei Einleitung des Analyten in den Ionisationsraum kommt es durch Wechselwirkungen der Analytmoleküle mit den Reaktionsionen zur Bildung positiv und negativ geladener Analytionen. Als häufigste Ionen-Molekül-Reaktionen stehen hinsichtlich der Bildung positiver Analytionen der Protonentransfer und für negative Analytionen der Ladungstransfer und die Protonenabstraktion im Vordergrund (Sielemann 1999; Baumbach 2009). Die Art der Ionen-Molekül-Reaktionen bzw. der entstehenden Analytionen ist abhängig von den Eigenschaften der Analytmoleküle wie Polarisierbarkeit, Protonen- und Elektronenaffinität oder Dipolmomente.

Die häufigste Ionen-Molekül-Reaktion in der Ionenmobilitätsspektrometrie ist der Protonentransfer. Folgende Reaktion beschreibt die Bildung positiver Analytionen A^+ aus dem Analyten A (hohe Protonenaffinität) unter Zuhilfenahme eines Wasserstoffprotons:



Die Bildung negativer Analytionen (A^- , B^- bzw. AB^-) erfolgt durch Ladungstransfer bzw. dissoziativen Ladungstransfer durch thermische Elektronen e^- , $O_2^-(H_2O)_n$ -Ionen (vgl. Gleichungen [15] und [16]) oder durch Protonenabstraktion aufgrund hoher Elektronenaffinität des Analyten (Gleichung [17]) (Sielemann 1999):



Abhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie der Protonenaffinität und der Konzentration des Analyten im Ionenmobilitätsspektrometer, steigt die Wahrscheinlichkeit für Wechselwirkungen noch vorhandener Analytmoleküle mit bereits ionisierten Analytionen, wodurch es zur Bildung von Dimeren und höherwertigen Polymeren kommen kann:



Aufgrund der Abhängigkeit der Ionen-Molekül-Reaktionen von Umgebungsdruck, Temperatur, Wassergehalt des Driftgases und Konzentration der Analytmoleküle, kann es ferner zur Clusterbildung mit Driftgasmolekülen kommen. Bei komplexen, feuchten Gasproben (wie z. B. Atemluft) können Wechselwirkungen verschiedener Analyten auftreten, so dass eine vorgeschaltete gaschromatographische Auftrennung notwendig ist (Baumbach 2009). Hierfür erfolgt die Kopplung des IMS mit einer Multikapillarsäule.

1.1.7 Vortrennung mittels Multikapillarsäule

Die Analyse feuchter und komplexer Gasproben, wie z. B. Atemluft, setzt eine gaschromatographische Vortrennung der Gasproben voraus.

Cohen und Karasek verwendeten bereits 1970 eine Kopplung aus Gaschromatographie (GC) und IMS, um eine Vortrennung der Analyten zu erreichen. Allerdings ist die herkömmliche GC zeitin-

tensiv, aufgrund der technischen Anforderungen nur bedingt miniaturisierbar und damit nur sehr begrenzt mobil nutzbar. Baumbach et al. beschrieben 1997 mit einer sogenannten Multikapillarsäule (engl.: multi-capillary column, MCC) eine Alternative zur Vortrennung von Proben. Eine MCC besteht aus ca. 1000 parallel geschalteten Kapillaren mit einem Innendurchmesser von jeweils 43 μm und einer Filmdicke der stationären Phase von 0,2 μm . Die Kapillaren werden in einer stabförmigen Säule zusammengefasst. Abbildung 3 veranschaulicht diesen Aufbau.

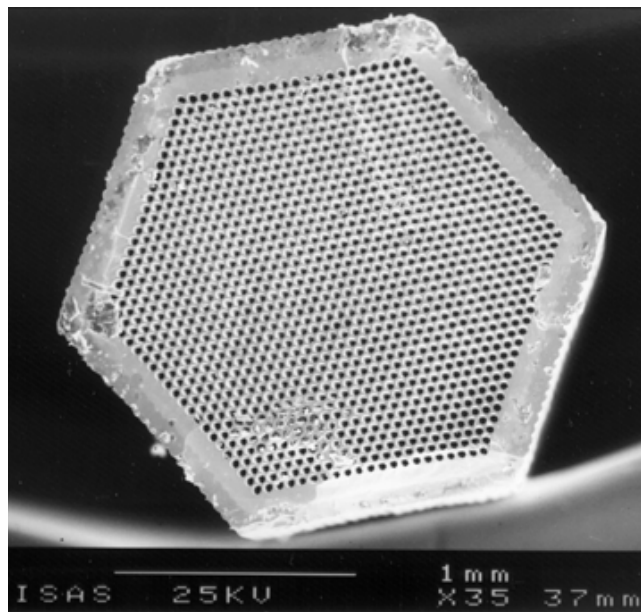


Abbildung 3: Querschnitt durch eine Multikapillarsäule. MCC-OV-5, Firma Sibertech Ltd., Novosibirsk, Russland (Baumbach 2009, S.3). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von IOP Publishing Ltd.

Die Länge der in vorliegender Untersuchung verwendeten Säule betrug 20 cm bei einem Durchmesser von 3 mm und erlaubt somit den Einsatz in miniaturisierten transportablen IMS-Systemen. Eine MCC ermöglicht die Auftrennung komplexer Proben innerhalb von Sekunden bis Minuten (Baumbach et al. 2000), wobei ein Betrieb bei Raumtemperaturen bis ca. 250 °C möglich ist. Die optimalen Trägergasflüsse einer MCC liegen im Bereich von 5-300 ml/min und damit im Bereich der in der Ionenmobilitätsspektrometrie verwendeten Flüsse. Daher ist die Kopplung einer MCC an ein IMS unkompliziert möglich (Sielemann 1999). Durch die Verwendung einer MCC zur Vortrennung komplexer Gasproben erhält man zusätzlich zu der im IMS gemessenen Driftzeit und Signalintensität den Parameter Retentionszeit (engl.: retention time, RT). Besitzen verschiedene Substanzen ähnliche Driftzeiten, kann zu deren Differenzierung und Identifizierung die RT herangezogen werden. Einfluss auf die RT und damit auf die gesamte Analysezeit der MCC-IMS besitzen die Säulentemperatur der MCC, die Geschwindigkeit des Trägergases in der MCC und der hier

anliegende Druck. Einer logarithmischen Funktion folgend nimmt die Retentionszeit mit steigender Säulentemperatur ab (Perl et al. 2010). Eine Temperaturerhöhung, Erhöhung des Trägergasflusses oder Verringerung der Säulenlänge der MCC könnte somit die Retentionszeit verkürzen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Ziel der vorliegenden Studie war die Detektion von VOC bakteriellen Ursprungs in der Atemluft beatmeter Kaninchen mit Pneumonie sowie der Vergleich dieser Proben mit der Atemluft von Tieren ohne Pneumonie. Hierfür wurden 33 Kaninchen in drei Gruppen aufgeteilt. Alle Tiere befanden sich für die gesamte Versuchsdauer in Vollnarkose und wurden zu Beginn endotracheal intubiert, sodass eine kontrollierte Beatmung ermöglicht wurde. Elf Tiere wurden der Kontrollgruppe, in der keine Pneumonie erzeugt wurde, zugeteilt. Bei den übrigen 22 Tieren wurde nach einer Beatmungsdauer von einer Stunde mittels endobronchialer Instillation einer definierten Keimlösung eine Pneumonie erzeugt (Pneumoniegruppe). Bei elf Tieren der Pneumoniegruppe wurde die Pneumonie mit *E. coli* und bei elf Tieren mit *P. aeruginosa* induziert. Kapitel 2.1 beschreibt das Pneumoniemodell weitergehend. Kapitel .4 beschreibt das Narkoseprotokoll.

2.1 Versuchsablauf und Pneumoniemodell

Insgesamt wurden die Versuchstiere 10 Stunden kontrolliert beatmet. Nach endotrachealer Intubation und Narkoseeinleitung folgte nach einer Stunde der erste Messblock im Sinne einer Baseline-Messung zum Zeitpunkt T1 (vgl. T1 in Abb. 4). Danach erfolgten drei weitere Messblöcke im Abstand von jeweils drei Stunden (vgl. T2-T4 in Abb. 4).

Zu Beginn jedes Messblocks erfolgten arterielle Blutentnahmen für eine Blutgasanalyse (BGA, GEM Premier 3000, Modell 5700, Instrumentation Laboratory, Bedford, USA) und die Bestimmung der Leukozytenzahl. Hierauf wurde die MCC-IMS Messung der Expirationsluft für den positiven und negativen Messbereich durchgeführt. Zudem erfolgte eine Darstellung der Lungen mittels Computertomographie (CT) in einem Kleintier-CT im Institut für Diagnostische Radiologie der UMG. Ziel dieser Untersuchung war die radiologische Korrelation der induzierten pneumonischen Entzündungsreaktion mit den Messergebnissen der Blutentnahmen und MCC-IMS-Messungen. Der Transport zum CT erfolgte auf einem Versuchswagen, wodurch Narkoseapplikation, Beatmung (mit Ausnahme der CT-Erstellung) und Kreislaufüberwachung kontinuierlich fortgeführt werden konnten. Zur Verbesserung der Bildqualität und Vergleichbarkeit fanden die CT-Untersuchungen in Apnoe statt. Hierfür wurden die Tiere zunächst präoxygeniert. Während der CT-Untersuchung wurde ein konstant positiver Atemwegsdruck von 8 cmH₂O aufrechterhalten, um

Atemmittellage zu simulieren. Abbildung 4 zeigt schematisch den Ablauf eines Versuches. Die Abbildungen 5 und 6 zeigen den Aufbau des Versuchswagens sowie die Lagerung des Versuchstiers im CT.

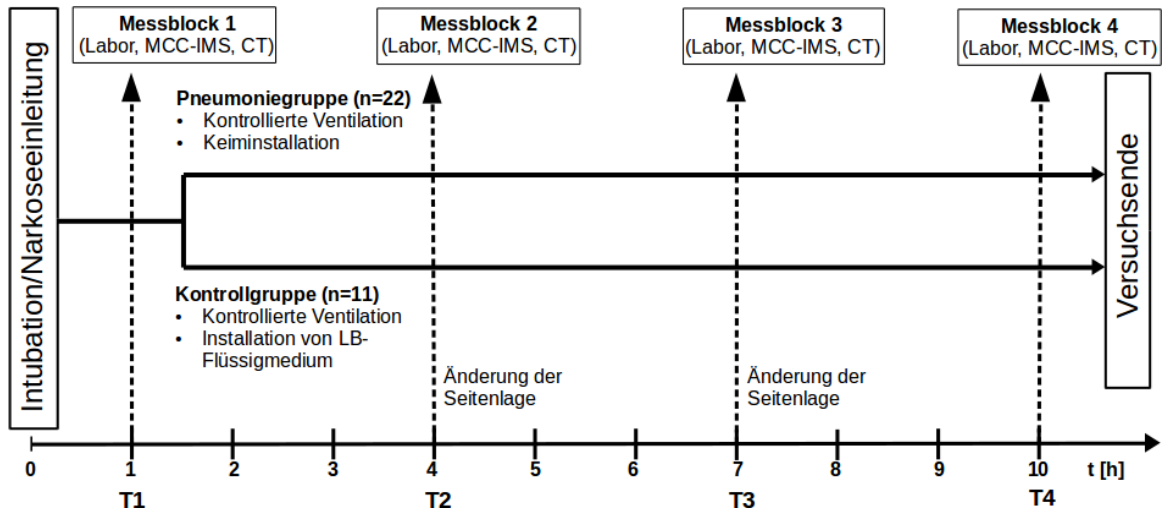


Abbildung 4: Schema des Versuchsablaufs mit Bezeichnung der Zeitpunkte T1-T4.



Abbildung 5: Aufbau des Versuchswagens.

1 = Monitor

2 = Spritzenpumpen

3 = Beatmungsgerät

4 = Konvektiver Luftwärmer mit Wärmendecke

5 = Versuchstier

6 = Unterbrechungsfreie Stomversorgung

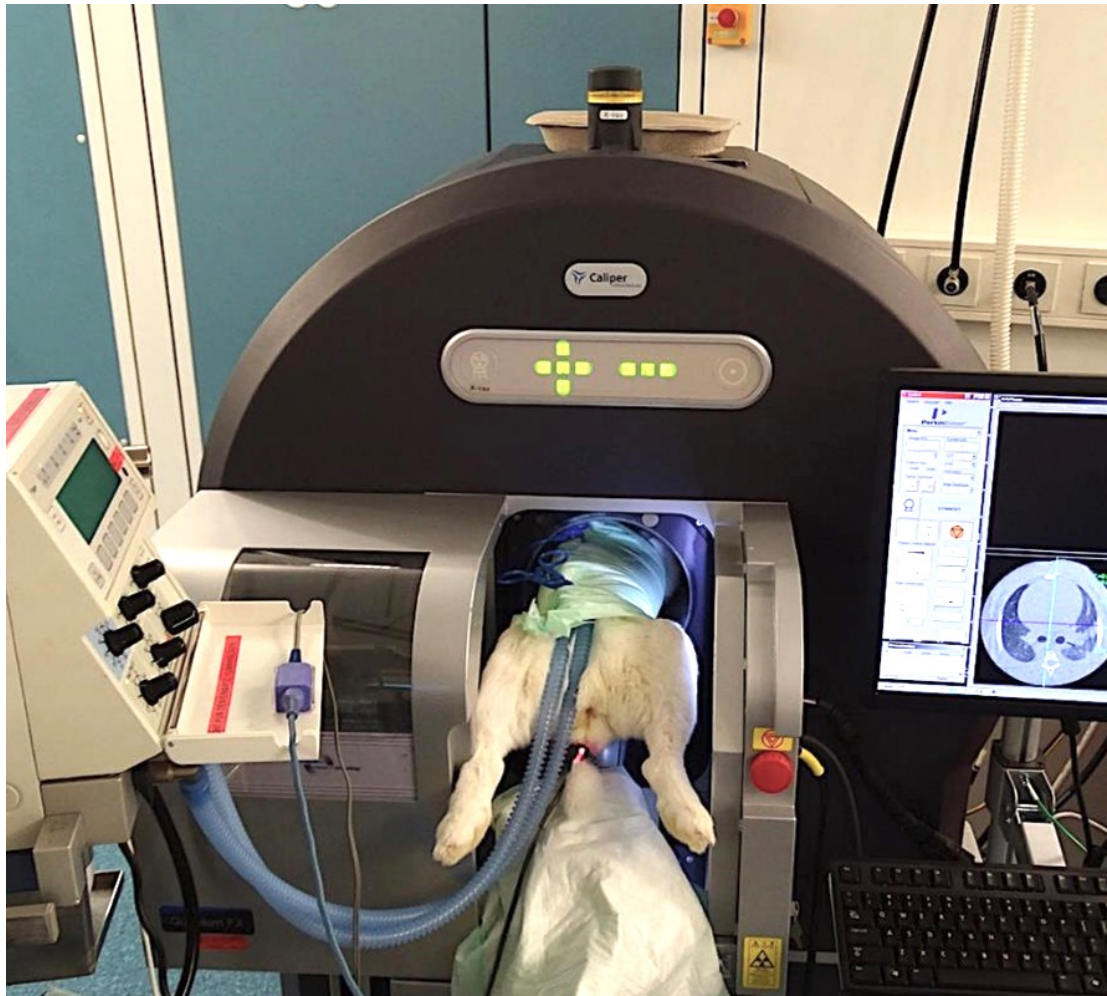


Abbildung 6: Lagerung des Versuchstieres im Kleintier-CT unter pulsoxymetrischer Überwachung

Nach dem ersten Messblock erfolgte die Induktion der Pneumonie. In den Pneumoniegruppen wurde hierfür zweimal im Abstand von zehn Minuten jeweils 1 ml einer definierten Keimlösung endotracheal appliziert. Um die Keimlösung kontaminationsfrei tieftracheal verabreichen zu können, wurde die Keimlösung mithilfe eines zentralen Venenkatheter-Sets (Cavafix[®] Certo[®] 455, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verabreicht, der eine Passage des dünnen Endotrachealtubus ermöglichte. Der Katheter wurde für die Applikation 15 cm tief in den auf 14 cm gekürzten Endotrachealtubus vorgeschoben, sodass eine Lage außerhalb des Tubus sichergestellt war. Da sich die Tiere aufgrund ihrer Anatomie in Seitenlage befanden, erfolgte zehn Minuten nach der ersten Applikation die erneute Gabe von 1 ml Keimlösung in entgegengesetzter Seitenlage. Ein Wechsel der Seitenlage fand zudem im Anschluss an die CT-Untersuchungen statt, um der Bildung lagebedingter Atelektasen vorzubeugen und ein in beiden Lungen über die Gesamtdauer der Versuche vergleichbares Ventilations-Perfusions-Verhältnis herzustellen (Charles et al. 2002). Bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe erfolgte in gleicher Weise die Installation von insgesamt 2 ml sterilen LB-Flüssignährmediums.

Nach Abschluss des letzten Messblockes wurden die Versuchstiere mittels Überdosierung von Propofol und Sufentanil getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme des oberen und unteren Respirationstraktes in toto (Oro-/Hypopharynx, Larynx, Trachea/Bronchien, beide Lungen). Die entnommenen Organe wurden in Formalinlösung (4,5%) fixiert und im Verlauf histopathologisch untersucht.

2.2 Tierversuchsantrag und Versuchstierkollektiv

Die vorliegende Studie wurde durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (Aktenzeichen 13/1251).

Die Versuche erfolgten an 33 weiblichen New-Zealand-White-Kaninchen (New Zealand White, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, USA) im Alter von 19 bis 23 Wochen und einem Gewicht von 3,0 bis 4,0 kg. Die Unterbringung erfolgte in Gruppenkäfigen mit Stroh als Bodenbelag und bei einem Licht-Dunkelheit-Zyklus von zwölf Stunden. Die Fütterung erfolgte mit Kaninchen-Trockenfutter (ssniff, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Germany), Zugang zu Heu und Wasser bestand *ad libitum*. Die Raumtemperatur wurde konstant bei 18 bis 20 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 40-60 % gehalten. Die Haltung erfolgte unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen. Nach Anlieferung der Tiere folgte eine Eingewöhnungsphase von zwei Wochen.

Die Tötung der Versuchstiere nach Versuchsende erfolgte unter tierärztlicher Aufsicht durch intravenöse Applikation hoher Dosen Sufentanil (Sufenta[®] 50 µg/ml, 5ml, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und Propofol (Propofol Lipuro 20 mg/ml, 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) bis zur Feststellung des Kreislaufstillstandes mittels Auskultation, Palpation und Pulsoxymetrie.

2.3 Nährmedium, verwendete Bakterien und Keimanzucht

Die für die vorliegende Studie verwendeten humanpathogenen Erreger wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Für die Pneumoniegruppen wurde jeweils ein Stamm *Escherichia coli* (DSM 25944) und ein Stamm *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1117) verwendet. Kapitel 1.1.2 beschreibt die Eigenschaften dieser Erreger.

Die Bakterienkulturen wurden bei -80 °C als Flüssigmedium-Glyzerin-Bakteriengemisch (LB w/v 55% Glyzerin) gelagert. 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn erfolgte die Einimpfung der gekühlten Keime in 100 ml steriles LB-Flüssigmedium (Lysogeny Broth, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit einem pH-Wert von 7,2. Anschließend wurden diese sog. Übernachtskulturen bei 37 °C unter konstanter Agitation im Schüttelinkubator mit 120 Upm (Umdrehungen

pro Minute) bei Umgebungsluftdruck und -feuchtigkeit für 24 Stunden inkubiert. Am Versuchstag wurde vor der endotrachealen Keiminstallation die optische Dichte (OD) der inkubierten Keimlösungen photometrisch bestimmt. Außerdem wurde zum Vergleich die OD von sterilem LB-Flüssigmedium bestimmt. Diese diente bei der Bestimmung der Keimdichte in der verwendeten Lösung vor Installation in das Versuchstier als Referenzwert.

Die Übernachtskulturen wurden dann um den Faktor 1×10^{-7} verdünnt. Hierfür wurden in jedem Verdünnungsschritt 0,5 ml Keimlösung in 4,5 ml LB-Flüssigmedium verdünnt. Jeweils 0,5 ml verdünnten Keimlösung wurden auf drei Platten mit Schafsblut-Agar (REF 43041, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) ausgestrichen und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Die nach Inkubation auf den drei Platten gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Durch die Anzahl der Kolonien nach Inkubation der verdünnten Lösung konnten Rückschlüsse auf die in 1 ml der verwendeten Lösung vorhandene Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) gezogen werden. Folgende Formel kam hierbei zur Anwendung:

$$\text{KBE} * \text{ml}^{-1} = \frac{([K_{p1} + K_{p2} + K_{p3}] \div 3) * 2}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

KBE = Koloniebildende Einheiten

K_{p1}, K_{p2}, K_{p3} = Anzahl der Kolonien auf den Platten 1 – 3

2.4 Narkoseprotokoll

Vor Versuchsbeginn erfolgte eine medikamentöse Prämedikation mittels intramuskulärer Applikation von 1 mg/kg KG Midazolam (Midazolam-ratiopharm® 5 mg/ml, 3ml, ratiopharm GmbH, Ulm) und 12,5 mg/kg KG Ketamin (Ketamin Inresa 50mg/ml, 10ml, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg) in die Muskulatur der Hinterläufe der Kaninchen. Nach Wirkeintritt und Platzierung der Tiere auf dem Versuchswagen erfolgte die Anlage eines intravenösen Zugangs (22G, Vasofix® Safety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in eine Ohrvene sowie eines arteriellen Katheters (24G VasoVet®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in die Zentralarterie eines Ohres. Die endotracheale Intubation erfolgte in Analgosedierung bei erhaltener Spontanatmung. Sie erfolgte ohne Laryngoskop, sondern mittels akustischer Kontrolle des Atemstroms im Endotrachealtubus (3,0 MICROCUFF®, Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien), der vorher auf eine Länge von 14 cm gekürzt worden war. Zur Verifizierung der korrekten Tubuslage wurde ein Nebenstrom-Kapnograph (Capnodig, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck) verwendet. Nach erfolgreicher Intubation erfolgte die Vertiefung der Narkose durch intravenöse Applikation von 4 mg/kg KG Propofol (PropofolLipuro 20 mg/ml, 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) sowie 0,25

µg/kg KG Sufentanil (Sufenta[®] 50 µg/ml, 5ml, Janssen-Cilag GmbH, Neuss).

Für die gesamte restliche Versuchsdauer erfolgte zur Aufrechterhaltung der Narkose die kontinuierliche Applikation von 20-50 mg/kg KG/h Propofol sowie 0,75 - 2,5 µg/kg KG/h Sufentanil mittels Spritzenpumpen (Perfusor[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Neben den Narkosemedikamenten erfolgte über den venösen Katheter kontinuierlich die Infusion einer Vollelektrolytlösung mit einer Flussrate von 50 ml/h. Die Kontrolle der Narkosetiefe erfolgte durch Prüfung von Reflexen (Zwischenzehenreflex, Cornealreflex, Lidschlussreflex), auf den Einsatz von Muskelrelaxantien wurde verzichtet. Das verwendete Narkoseprotokoll wurde vor Studienbeginn im Rahmen von Vorversuchen an fünf Tieren evaluiert (Reupke et al. 2017). Für die Beatmung kam ein pädiatrisches Beatmungsgerät (Babylog 8000 plus, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck) zum Einsatz.

Tabelle 3: Ziel-Beatmungs- und Vitalparameter während der Versuche

<i>Parameter</i>	<i>Zielbereich</i>
<i>Atemfrequenz</i>	<i>45 / min.</i>
<i>Tidalvolumen</i>	<i>20 ml</i>
<i>Beatmungsdruck</i>	<i>10-20 mbar</i>
<i>Inspiratorische O₂Fraktion</i>	<i>0,3 (30 %)</i>
<i>Sauerstoffsättigung</i>	<i>95-100 %</i>
<i>Pulsfrequenz</i>	<i>130-160 / min.</i>
<i>Arterieller Blutdruck</i>	<i>45/20 - 65/35 mmHg</i>
<i>Körpertemperatur</i>	<i>38,5 °C</i>
<i>Narkosetiefe</i>	<i>Allgemeinanästhesie</i>

Die Überwachung der Vitalparameter erfolgte mittels Pulsoxymetrie und invasiver Blutdruckmessung. Außerdem wurde die Körperkerntemperatur mittels Rektalsonde überwacht. Der für die Überwachung verwendete Monitor (Dash 3000, GE Medical Systems, Milwaukee, USA), die Spritzenpumpen sowie ein Wärmegebläse mit Wärmedecke (mistrall-air[®] plus, The Surgical Company GmbH, Kleve) zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurden am Versuchswagen befestigt. Tabelle 3 zeigt die angestrebten Beatmungs- und Vitalparameter.

2.5 Atemluftprobennahme

Für die Entnahme der Atemluftproben wurde ein Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm verwendet. Dieser wurde an den Luer-Lock-Anschluss eines dem Endotrachealtubus nachgeschalteten Winkelstücks mit Gasentnahmeport angeschlossen. Den Aufbau des Probengewinnungs- und Beatmungssystems zeigt Abbildung 7.

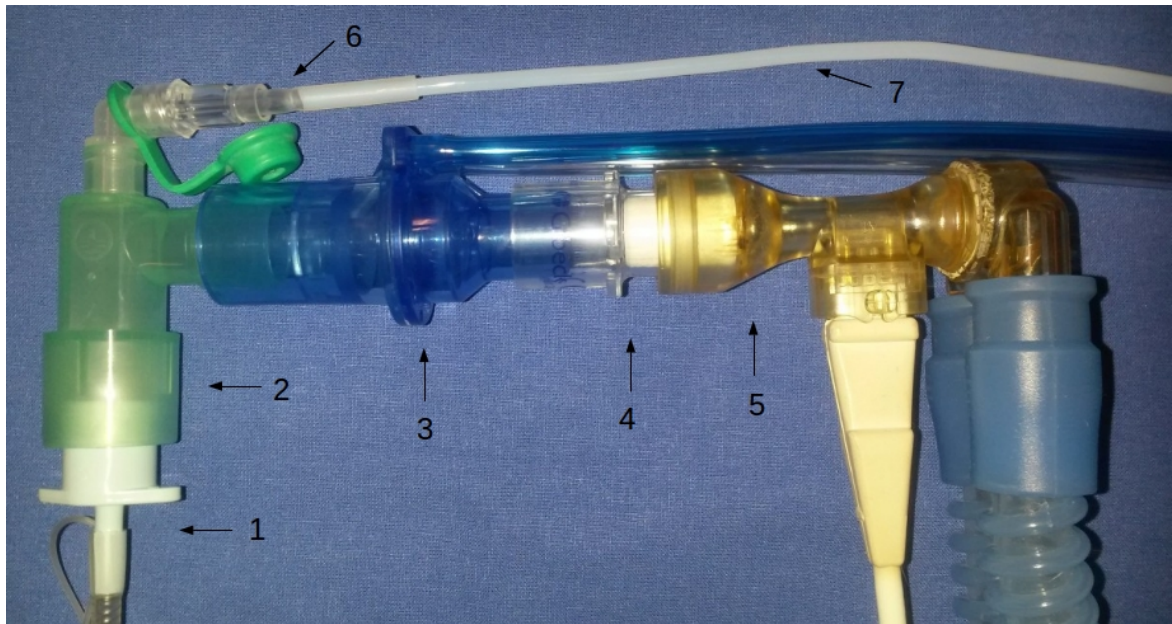


Abbildung 7: Aufbau des Probengewinnungs- und Beatmungssystems:

- 1) Endotrachealtubus
- 2) Winkelstück (Elbow 22M/15F-15M, Gas sampling port, Intersurgical, Sangt Augustin, Deutschland)
- 3) Fluss-Sensor (adult/pediatric flow sensor, REF 282049/03, Hamilton Medical AG, Bonaduz, Schweiz)
- 4) Beatmungsfiler (Teleflex Medical, Humid-Vent® Mini, REF 10011)
- 5) Beatmungsschlauch mit integriertem Flussmesser des Respirators
- 6) Gekürztes Infusionssystem als Luer-Lock-Anschluss (Sendal, PERFUSEND® PG, REF PG340, Sendal SL, Martorell, Spanien)
- 7) Teflon-Probenschlauch (Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland)

Die Luftproben wurden mithilfe der in den MCC-IMS-Geräten integrierten Vakuumpumpen gewonnen. Um die in den Lungen der Versuchstiere vorhandenen bakteriellen VOC erfassen zu können, wurden die Atemluftproben ausschließlich während der Expiration gesammelt. Zu diesem Zweck verfügten die MCC-IMS-Geräte über integrierte Fluss-Messgeräte, die eine Differenzierung zwischen Inspiration und Expiration erlauben (Vautz et al. 2010). Eine Softwarekomponente der MCC-IMS-Betriebssoftware erlaubt durch Kontrolle eines Zwei-Wege-Ventils die Steuerung des Probegasstroms anhand der Phasen des Atemzyklus. Mithilfe dieser Steuerung erfolgte die Einleitung der expiratorischen Gasprobe in die Probenschleife des MCC-IMS-Gerätes. Während der Inspiration angesaugte Luft wurde wieder an die Umwelt abgegeben. Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau des flussgesteuerten Probengewinnungssystems.

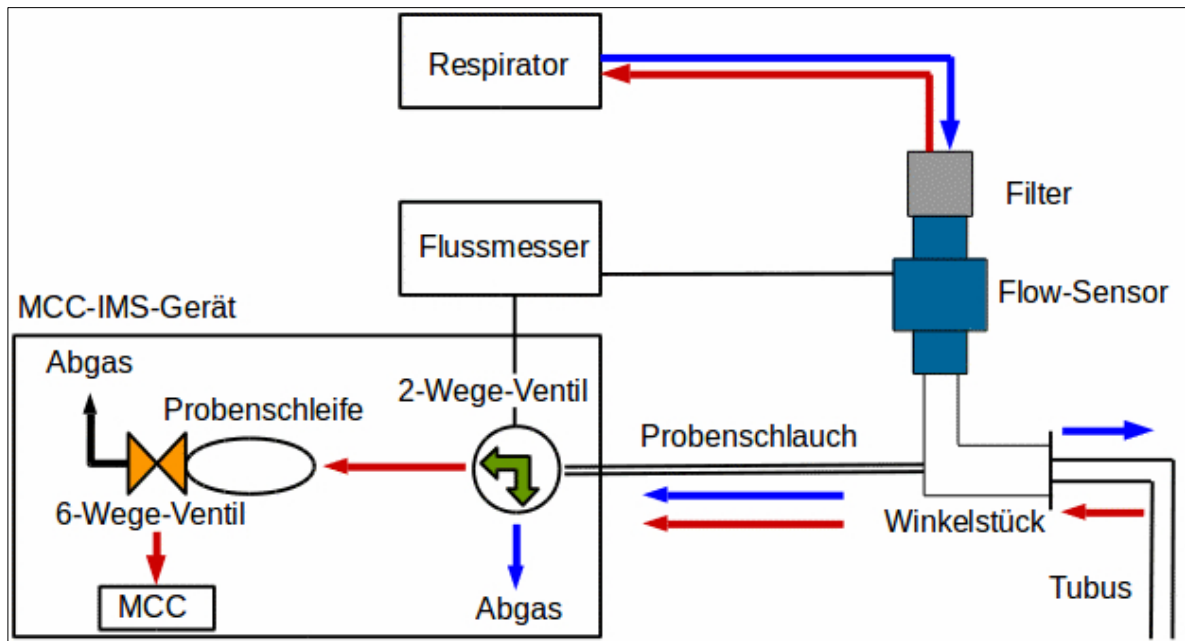


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des flussgesteuerten Probengewinnungssystems. Blau: Gasfluss während der Inspiration; Rot: Gasfluss während der Expiration.

2.6 Verwendetes Ionenmobilitätsspektrometer

In der vorliegenden Studie wurden zwei vom Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften in Dortmund als Prototypen für Atemgasanalysen entwickelte MCC-IMS-Geräte verwendet. Durch Verwendung von zwei Geräten war die parallele Analyse der Atemluftproben im positiven und negativen Ionenmodus möglich. Abgesehen von der gewählten Polarität der Driftstrecke unterschieden sich die Spezifikationen der beiden Geräte nicht. Grundlegender Aufbau und Funktion eines MCC-IMS sind in Kapitel 1.1.5 beschrieben. Die Tabellen 4 und 5 fassen die Einstellungsmöglichkeiten und Spezifikationen der verwendeten MCC-IMS-Geräte zusammen.

Die verwendeten MCC-IMS-Geräte verfügten über eine Multikapillarsäule (MCC-OV-5, Multichrom Ltd., Novosibirsk, Russland), die dem Ionisationsraum vorgeschaltet war. Die für die Vortrennung des Analyten notwendige stationäre Phase der Multikapillarsäule (MCC) bestand aus 95 % Dimethylsiloxan sowie 5 % Phenylsiloxan. Eine externe, digitale Steuereinheit ermöglichte die Temperatursteuerung der MCC zwischen 20 °C und 70 °C.

Die Ionisation der Analyten im Ionisationsraum des IMS erfolgte durch eine Nickel-63-Strahlungsquelle. Der Driftraum bestand aus Teflon, die Driftstrecke betrug 12 cm. Die kontinuierliche Gasversorgung des MCC-IMS erfolgte über Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm (PTFE, Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland), die über Swagelok®-Fittings

(Swagelok, Solon, Ohio, USA) angeschlossen waren. Der Gasfluss wurde über einen Massendurchflussregler reguliert. Als Drift- und Trägergas kam synthetische Luft in wissenschaftlicher Qualität zum Einsatz (Aer medicalis, AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf).

Tabelle 4: Einstellungsbereiche der verwendeten MCC-IMS Geräte.

	Einstellungsbereich <i>Minimum – Zwischenschritte – Maximum</i>	Verwendete Einstellungen
<i>Temperatur MCC</i>	<i>stufenlos: 20 °C – 70 °C</i>	<i>40°C</i>
<i>Gitter</i>	<i>Aus – Puls – Ein</i>	<i>Puls</i>
<i>Gitteröffnungszeit</i>	<i>aus, 30 µs, 100 µs, 300 µs, 1000 µs, an</i>	<i>300 µs</i>
<i>Gitterimpulsrate</i>	<i>25 ms, 50 ms, 100 ms</i>	<i>100 ms</i>
<i>Driftspannung</i>	<i>stufenlos: 0 – 5,0 kV</i>	<i>4,38 kV</i>
<i>Polarität Driftstrecke</i>	<i>Negativ (-) Positiv (+) -</i>	<i>+, -</i>

Tabelle 5: Spezifikationen der verwendeten MCC-IMS-Geräte

	Spezifikationen der MCC-IMS Geräte
<i>Multikapillarsäule</i>	<i>MCC-OV-5, Multichrom Ltd., Novosibirsk, Russland</i>
<i>Ionisationsquelle</i>	<i>β-Strahler, ⁶³Nickel, 550 MBq</i>
<i>Driftstrecke</i>	<i>12 cm</i>
<i>Probenschleife</i>	<i>10 ml, rostfreier Stahl</i>
<i>Elektrische</i> <i>Feldstärke</i>	<i>330 V/cm</i>
<i>Driftspannung</i>	<i>4,38 kV</i>
<i>Temperatur</i>	<i>Umgebungstemperatur</i>
<i>Druck</i>	<i>Umgebungsluftdruck</i>
<i>Driftgasflow</i>	<i>100 ml/min</i>
<i>Trägergasflow</i>	<i>150 ml/min</i>
<i>Träger-/Driftgas</i>	<i>Synthetische Luft, AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland</i>
<i>Schlauchsystem</i>	<i>PTFE, Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland</i>

2.6.1 Datenerfassung und -verarbeitung

Die Steuerung der Probennahme sowie der MCC-IMS-Geräte erfolgte mit der Bedienungssoftware qIMS v1.2 (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS e.V., Dortmund, Deutschland). Zu diesem Zweck waren beide MCC-IMS-Geräte mit Notebooks mit Windows-Benutzeroberfläche ausgestattet (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

Visualisierung

Die Visualisierung der Messwerte erfolgte über die spezielle Visualisierungs- und Auswertungssoftware *BB_IMSAnalyse* (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS e.V., Dortmund, Deutschland). Diese stellt den Datensatz aus Retentionszeit, Ionenmobilität und Signalintensität als zwei- bzw. dreidimensionales IMS-Chromatogramm sowie einzelne Spektren der jeweiligen Retentionszeit bzw. Ionenmobilität dar. Die technischen Parameter und Bedingungen einer durchgeführten Messung können ebenfalls dem Darstellungsfenster entnommen werden. Bei der in vorliegender Studie verwendeten zweidimensionalen Darstellung erfolgt die Auftragung der Retentionszeit (ergibt sich aus Vortrennung in der MCC) in Sekunden auf der y-Achse. Die x-Achse gibt die inverse Reduzierte Ionenmobilität $1/K_0$ [Vs/cm²] wieder, die proportional zur gemessenen Driftzeit ist. Die Signalintensität [Volt] wird im Bezug zur x-, als auch zur y-Achse dargestellt. Der Farbton der Signale im 2D-Plot zeigt die Signalintensität an, wobei gelb die höchste und weiß keine Spannung anzeigt. Abbildung 9 gibt beispielhaft die zweidimensionale Darstellung eines IMS-Chromatogramms mittels der verwendeten Auswertungssoftware wieder.

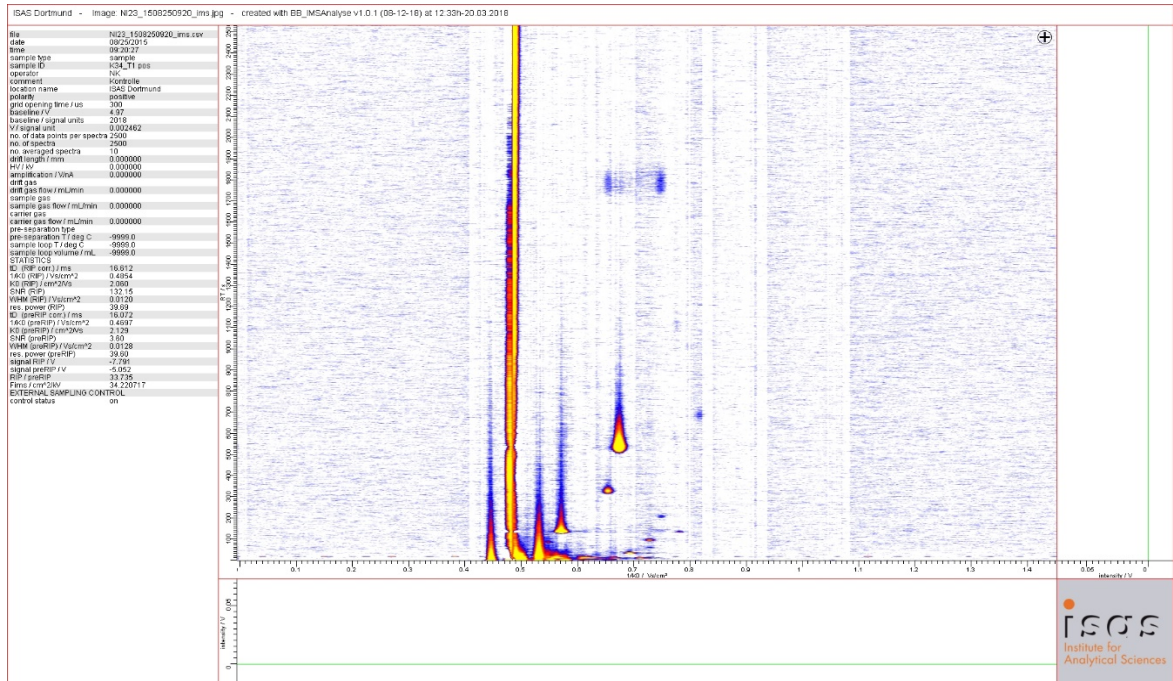


Abbildung 9: Zweidimensionale Darstellung eines MCC-IMS-Chromatogramms mittels der Software *BB_IMSAnalyse* (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS e.V., Dortmund, Deutschland). X-Achse: Inverse Reduzierte Ionenmobilität $1/K_0$ [V/cm^2]. Y-Achse: Retentionszeit RT [s]. Die technischen Parameter sind dem Darstellungsfenster auf der linken Bildschirmseite zu entnehmen.

2.6.3 Normierungsprozesse

Es erfolgte ein Alignment (Ausrichtung) der Retentionszeit (RT) an Propofol auf die RT 470s sowie die Normalisierung des Reaktantionenpeaks (RIP) auf die Position $2,060 \text{ cm}^2V^{-1}s^{-1}$. Die Signalintensität wurde an 1 Volt als Maximum der Signalintensität des RIP normiert (Perl et al. 2010). Da Propofol bei allen Tieren Teil der Narkose war, konnte die Substanz als interner Standard zur Qualitätskontrolle der expiratorischen Atemgasprobe verwendet werden (vgl. Carstens 2010).

2.6.4 Auswertung der MCC-IMS-Datensätze

Die Auswertung der Datensätze erfolgte ebenfalls mit der Visualisierungs- und Auswertungssoftware *BB_IMSAnalyse* (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS e.V., Dortmund, Deutschland). Nach Bildung eines Datensatzes mit allen zu untersuchenden Spektren (IMS-Set) ermöglicht diese den computergestützten Vergleich zuvor definierter Regionen, die durch ihre Position im IMS-Topogramm definiert sind. Es erfolgt eine vergleichende Darstellung der Messergebnisse der analysierten Regionen samt Angabe der vorhandenen Parameter. Die Identifikation einer Substanz anhand ihres Signals wird durch den Vergleich mit Referenzmessungen ermöglicht (Bödecker et al. 2008). Unbekannte Substanzen wurden entsprechend ihrer Position im IMS-Plot

als „P_1/k0 x 1000_RT“ bezeichnet. Beispielsweise wurde die Substanz mit der inversen Ionenmobilität ($1/k_0$) von $0,720 \text{ Vs/cm}^2$ und einer Retentionszeit von 16 s als „P_720_16“ bezeichnet.

2.7 Auswertung der computertomographischen Lungenaufnahmen

Der Kontrast im Röntgenbild und im CT ist abhängig von der lokalen Schwächung der Röntgenstrahlung. Dieser Effekt findet hauptsächlich in der Elektronenhülle eines Materials statt. Daher ist die Helligkeit einer Struktur im CT proportional zur relativen Elektronendichte. Luft mit einer sehr geringen Elektronendichte hat daher einen niedrigen Grauwert und Flüssigkeit einen höheren. Somit können beide Komponenten durch eine schwellenwert-basierte Segmentierung getrennt werden. Die Differenzierung zwischen Flüssigkeit und Weichgewebe ist anhand ihrer ähnlichen Grauwerte nur bedingt möglich.

Analog zu Bildpunkten in zweidimensionalen Bildern (Pixel) besteht eine dreidimensionale CT-Darstellung aus Bildpunkten in einem dreidimensionalen Raum. Diese sogenannten Voxel (volumetric pixel) haben in Abhängigkeit zur Elektronendichte des untersuchten Mediums gewisse Grauwerte. Definiert man z. B. für eine Flüssigkeit einen bestimmten Grauwertbereich, so kann man Anhand der Anzahl der Voxel innerhalb dieses Grauwertbereiches das Volumen der Flüssigkeit im untersuchten Volumen bestimmen. Erschwert wird dieses Vorgehen durch den sogenannten Partialvolumeneffekt. Da die Voxel eine bestimmte Kantenlänge haben, kann es besonders an Gewebeübergängen dazu kommen, dass Anteile unterschiedlicher Gewebe in einem Voxel zusammenfallen. Für die vorliegende Studie wurde eine Kantenlänge von $0,14 \times 0,14 \times 0,14 \text{ mm}$ verwendet. Der Grauwert eines solchen Voxels ergibt sich dann als Mischung der Grauwerte der beteiligten Gewebe mit ihren jeweiligen Volumenanteilen am Voxel. Es entstehen daher Mischgrauwerte, die zwischen denen der beiden Gewebe liegen. Mit der angesprochenen Voxelgröße lässt sich die Struktur der Lunge nicht mit Sicherheit bis auf die alveoläre Ebene auflösen, die Daten sind daher immer mit Partialvolumeneffekten behaftet. Es können aber trotzdem Aussagen über pathologische Veränderungen unterhalb der Auflösungsgrenze getroffen werden, da diese in charakteristischer Weise den Partialvolumeneffekt beeinflussen und somit das Grauwert-Histogramm verändern (Valencia et al. 2006).

Kommt es im Lungenparenchym zu einer Entzündung, so steigt mit zunehmendem Entzündungsgrad der Flüssigkeitsanteil im Gewebe (Dullin et al. 2015). Hierdurch verringert sich gleichzeitig der Luftanteil im untersuchten Lungenvolumen, sodass das Luft-Flüssigkeits-Verhältnis sinkt. Ziel der Auswertung der Lungenaufnahmen war die Bestimmung des tatsächlich belüfteten Lungenvolumens innerhalb definierter Areale und dessen Veränderung über die Zeit und mit zunehmenden Infiltraten.

Für die Auswertung der computertomographischen Lungenaufnahmen kam die Software Scry (Scry v5, Kuchel & Sautter GbR, Bad Teinach-Zavelstein-Rötenbach, Deutschland) zur Anwendung. Verglichen wurden die Lungenaufnahmen der Messblöcke 1 (Zeitpunkt T1, keine Pneumonie) zu Beginn des Versuchs und 4 (Zeitpunkt T4, mutmaßlich ausgedehnte Pneumonie) am Ende des Versuchs (vgl. Abb. 4).

Im Lungenparenchym der linken und rechten Lunge wurden auf drei Ebenen (apikal, medial, basal) jeweils drei (ventral, medial, dorsal) nicht überlappende, kubische Volumen (sog. *volumes of interest*, VOIs) mit jeweils 5 mm Kantenlänge (Volumen = 125 mm³) manuell platziert. In einem bei Kaninchen vorhandenen, retrokardial gelegenen dritten Lungensegment wurden ebenfalls zwei VOIs platziert. Somit wurden zu den Messzeitpunkten T1 und T4 jeweils insgesamt 20 VOIs (9 VOIs im linken, 9 VOIs im rechten und zwei VOIs im mittleren Lungensegment) ausgewertet. Die Positionierung der VOIs erfolgte möglichst gänzlich im Lungenparenchym unter Ausschluss größerer Bronchien und Blutgefäße, um endoluminale Luft- bzw. Flüssigkeitsvolumina zu meiden. Abbildung 10 zeigt beispielhaft die Positionierung der VOIs im Lungen-CT mittels der Software Scry.

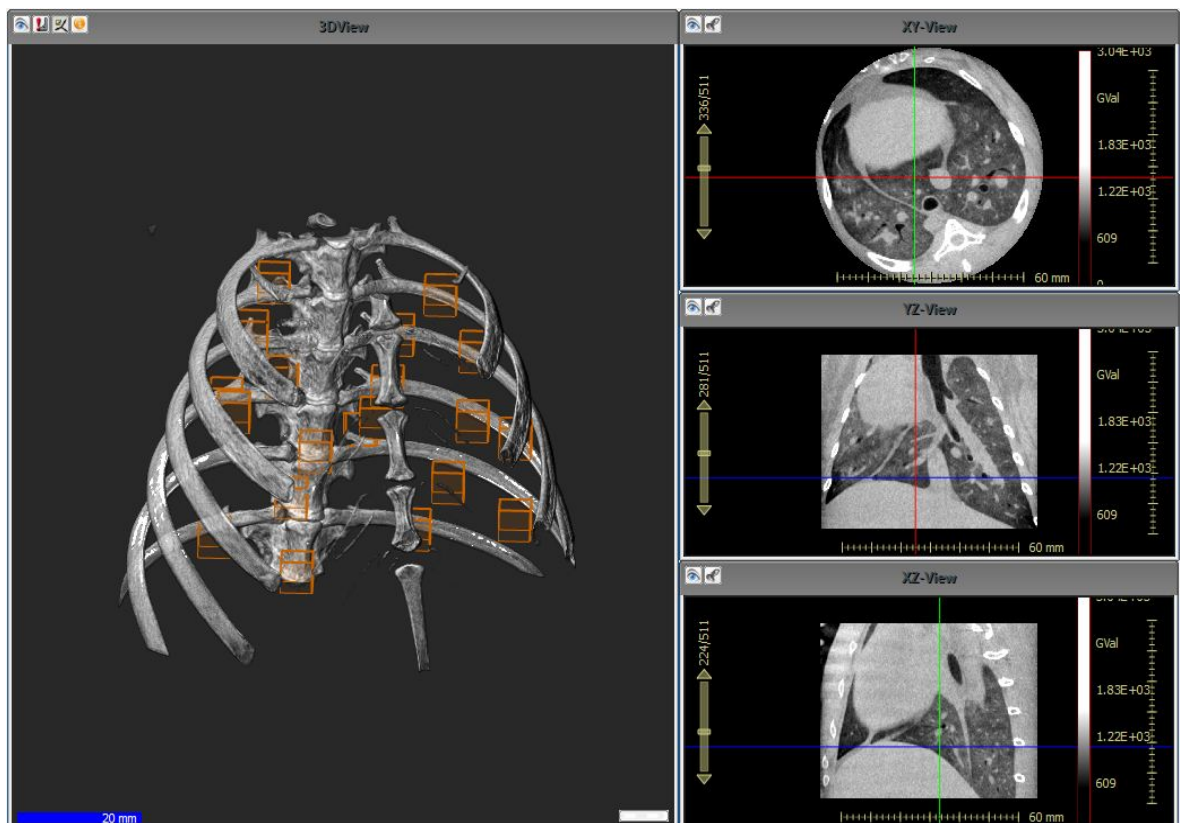


Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung der VOI-Positionierung im 3D-Lungen-CT mittels der Software Scry v5. Rechts Darstellung der Koronar-, Axial- und Sagittalebene der ausgewählten Position im CT.

Das Grauwert-Histogramm eines VOI zeigt jeweils zwei Peaks, die Luft bzw. Weichgewebe/Flüssigkeit repräsentieren. Der mittlere Grauwert zwischen diesen Peaks wurde als Grenzwert

für die Unterscheidung von Luft gegenüber Weichgewebe und Flüssigkeit gewählt. Dieser wurde für alle Versuchstiere unverändert beibehalten (vgl. Dullin et al. 2015). Das Volumen aller Voxel für Flüssigkeit und Weichgewebe wurde bestimmt und in Relation zum Gesamtvolumen des untersuchten VOI gesetzt. Anhand dieses relativen lokalen Flüssigkeits-Weichgewebeanteils konnte das belüftete Lungenvolumen bestimmt werden.

2.8 Histopathologische Untersuchung des Lungenparenchyms

Zu Versuchsende erfolgte die Entnahme des oberen und unteren Respirationstraktes in toto und dessen Fixierung in Formalinlösung (4,5%). Die histopathologische Untersuchung erfolgte durch das Institut für Pathologie der UMG. Hier erfolgte die Einbettung der Lungen in Paraffin, die Hämatoxylin-/Eosin-Färbung sowie der Schnitt des Parenchyms in Scheiben mit einer Dicke von 5 µm. Jeweils drei Segmente jeder Lunge (apikal, medial, basal) wurden histopathologisch untersucht.

Die Bestimmung der Pneumonieschwere in jedem der insgesamt sechs Segmente erfolgte anhand eines auf dem mikroskopischen Bild basierenden numerischen Pneumonie-Scores (0-5). Tabelle 6 gibt diesen Score wieder (vgl. hierzu Sommer et al. 2009). Der erhobene Score wurde anschließend für jedes der sechs Lungensegmente über alle Tiere der jeweiligen Gruppe gemittelt und graphisch dargestellt. Kapitel 3.1 gibt das Ergebnis der histopathologischen Untersuchung wieder.

Tabelle 6: Pneumonie-Score für die histopathologische Untersuchung des Lungenparenchyms nach Sommer et al. 2009

Score	Lichtmikroskopisches Korrelat
0	<i>Normales Parenchym, keine Entzündungszeichen</i>
1	<i>Minimale perivaskuläre, peribronchiale oder interstitielle Entzündung. < 10% des Lungenvolumens</i>
2	<i>Milde perivaskuläre, peribronchiale oder interstitielle Entzündung. 10-20% des Lungenvolumens</i>
3	<i>Moderate perivaskuläre, peribronchiale oder interstitielle Entzündung. 20-50% des Lungenvolumens</i>
4	<i>Ausgedehnte, diffuse Entzündung. 50-75% des Lungenvolumens</i>
5	<i>Schwere, diffuse Entzündung. >75% des Lungenvolumens</i>

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Studienergebnisse erfolgte mit der Software Prism (Prism 7, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Alle Parameter wurden zunächst mittels Shapiro-Wilks-Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Um die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hin zu überprüfen, wurde für normalverteilte Parameter eine One-Way-ANOVA und für nicht-normalverteilte Parameter ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Als Signifikanzniveau wurde ein $p < 0,05$ definiert. Sofern nicht anders bezeichnet, sind alle Ergebnisse in dieser Arbeit als Mittelwerte (\pm Standardabweichung) dargestellt.

3 ERGEBNISSE

Die Bestimmung der Schwere der induzierten Pneumonie erfolgte anhand der histopathologischen Untersuchung, computertomographischer Lungenaufnahmen, der Oxygenierung und der Leukozytenzahl.

3.1 Pneumonieschwere

Die Tiere der Pneumoniegruppen zeigten signifikant höhere Pneumonie-Score-Werte als die Tiere der Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe traten in allen Segmenten durchschnittlich nur leichte entzündliche Veränderungen auf mit Beteiligung von < 10 % des Lungenparenchyms. Bei den Tieren der Pneumoniegruppen zeigten sich in allen Lungensegmenten schwere entzündliche Veränderungen mit leukozytärer Infiltration, wobei dieses bei den Tieren der EC-Pneumoniegruppe am stärksten ausgeprägt war (Kontrolle: 0,1 Punkte \pm 0,3; EC: 4,0 Punkte \pm 0,8; PA: 3,3 Punkte \pm 0,4; Angabe von Mittelwert und Standardabweichung). Der durchschnittliche Pneumonie-Score aller Lungensegmente der EC-Versuchsgruppe lag über dem der PA-Versuchsgruppe. Die Abbildungen 11-14 veranschaulichen diese Ergebnisse und zeigen das lichtmikroskopische Bild des Lungenparenchyms.

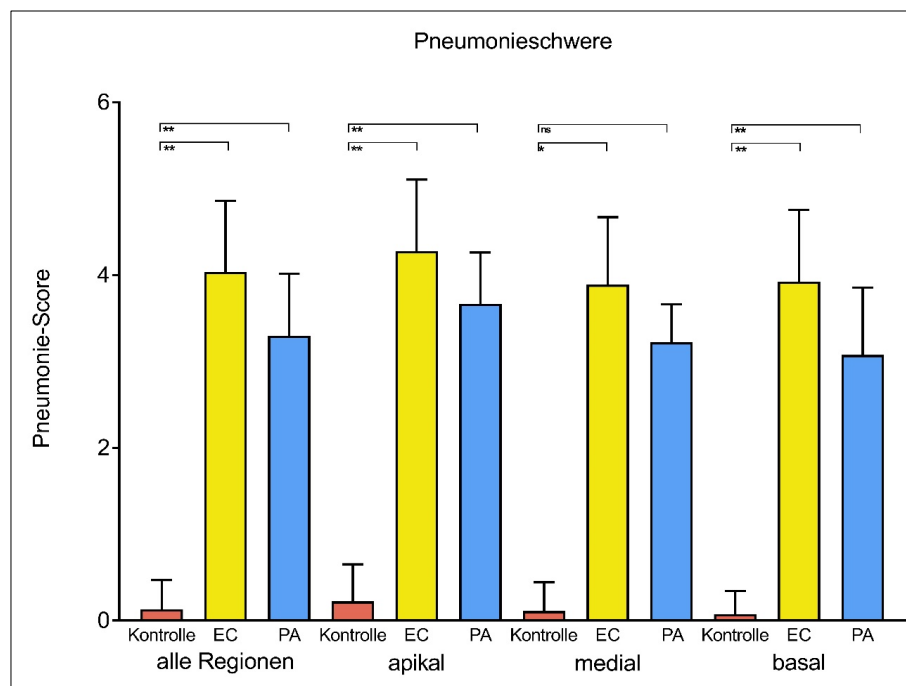


Abbildung 11: Pneumonie-Score aller Versuchsgruppen in den jeweiligen Lungenabschnitten. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$. „ns“ = statistisch nicht signifikant.

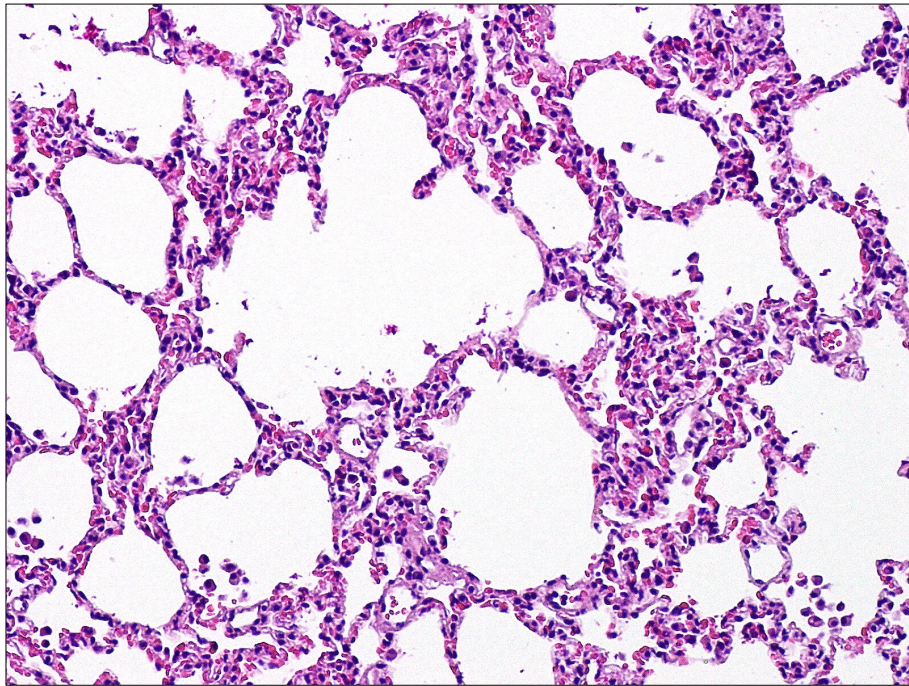


Abbildung 12: Lungenparenchym der Kontrollgruppe, HE-Färbung, 100fache Vergrößerung: Es ist kaum leukozytäre Infiltration sichtbar.

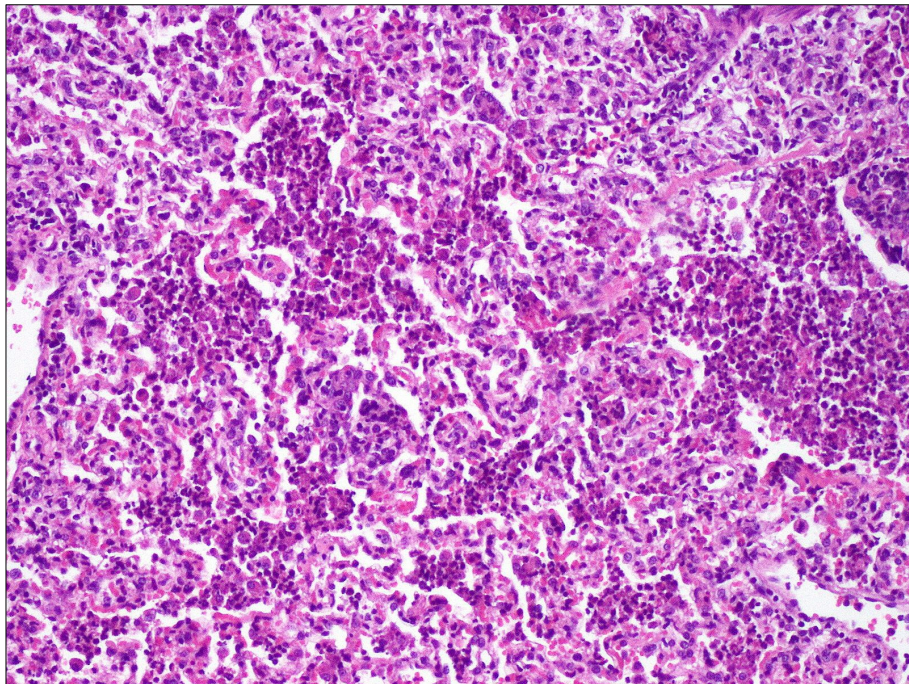


Abbildung 13: Lungenparenchym der *E. coli*-Gruppe, HE-Färbung, 100fache Vergrößerung: Es sind deutliche leukozytäre Infiltrationen erkennbar.

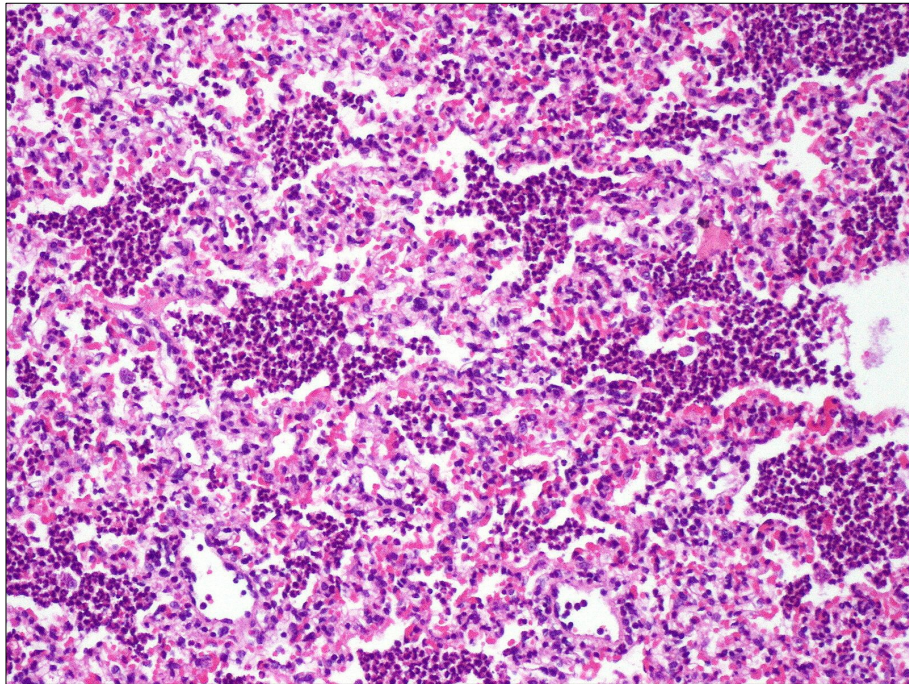


Abbildung 14: Lungenparenchym der *P. aeruginosa*-Gruppe, HE-Färbung, 100fache Vergrößerung: Es sind deutliche leukozytäre Infiltrationen erkennbar.

3.1.1 Oxygenierung

Die Beurteilung der Oxygenierungsleistung der Lungen im Verlauf der Versuche erfolgte anhand eines Oxygenierungsindex. Folgende Gleichung beschreibt diesen Oxygenierungsindex (auch Horovitz-Index):

$$\text{Oxygenierungsindex} = \frac{P_aO_2}{F_iO_2}$$

P_aO₂: arterieller Sauerstoffpartialdruck [mmHg]

F_iO₂: inspiratorische Sauerstofffraktion

Bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein geringer, nicht signifikanter Abfall der Oxygenierung. Es erfolgt die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung. Zum Zeitpunkt T1 betrug der Oxygenierungsindex in der Kontrollgruppe im Mittel 472,3 mmHg ± 87,71. Zum Zeitpunkt T4 zeigte sich in der Kontrollgruppe ein mittlerer Oxygenierungsindex von 414,7 mmHg ± 60,52.

Im Unterschied hierzu zeigte sich bei den Tieren beider Pneumoniegruppen ein statistisch signifikanter Abfall der Oxygenierungsleistung. Zum Zeitpunkt T1 betrug der Oxygenierungsindex in der *E.-coli*-Gruppe im Mittel 415,8 mmHg ± 80,95 und in der *P.-aeruginosa*-Gruppe im Mittel 492,9 mmHg ± 59,38. Zum Zeitpunkt T4 zeigte sich in der *E.-coli*-Gruppe ein mittlerer Oxygenierungsindex von 303,2 mmHg ± 80,33 und in der *P.-aeruginosa*-Gruppe von 294,8 mmHg ± 52,45.

Abb. 15 veranschaulicht den Verlauf der Oxygenierung der Kontroll- und der Pneumoniegruppen anhand des Oxygenierungsindex.

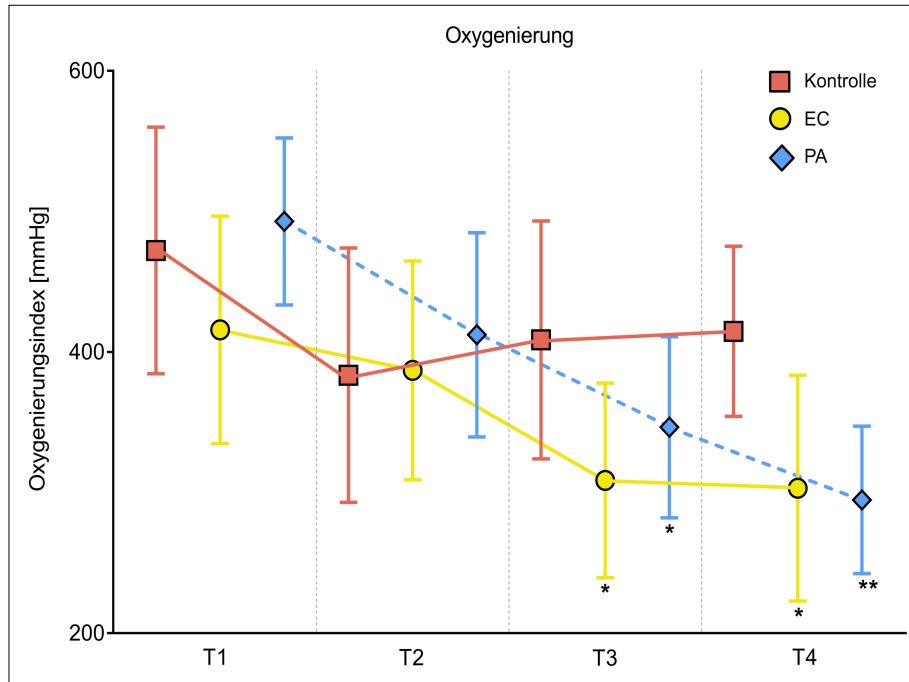


Abbildung 15: Oxygenierungsindex der Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten. ** = $p < 0,0001$. * = $p < 0,05$ im Vergleich zu T1.

3.1.2 Verlauf der Leukozytenzahlen

Im zeitlichen Verlauf von T1 bis T4 zeigte sich in der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl. Es erfolgt die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung. Zum Zeitpunkt T1 betrug die Leukozytenzahl in der Kontrollgruppe im Mittel $2432/\mu\text{l} \pm 536$. Zum Zeitpunkt T4 zeigte sich in der Kontrollgruppe eine mittlere Leukozytenzahl von $3.886/\mu\text{l} \pm 688$. Im Unterschied hierzu kam es in den Pneumoniegruppen zu einem abnehmenden Trend der Leukozyten. In der *E.-coli*-Gruppe kam es zu einem signifikanten Abfall der Leukozytenzahl. Zum Zeitpunkt T1 betrug die Leukozytenzahl in der *E.-coli*-Gruppe im Mittel $2294/\mu\text{l} \pm 727$ und in der *P.-aeruginosa*-Gruppe im Mittel $2504/\mu\text{l} \pm 1079$. Zum Zeitpunkt T4 zeigte sich in der *E.-coli*-Gruppe eine mittlere Leukozytenzahl von $1495/\mu\text{l} \pm 522$ und in der *P.-aeruginosa*-Gruppe von $1475/\mu\text{l} \pm 691$.

Abb. 16 zeigt den Verlauf der Leukozytenzahlen in den Studiengruppen über die Versuchsdauer.

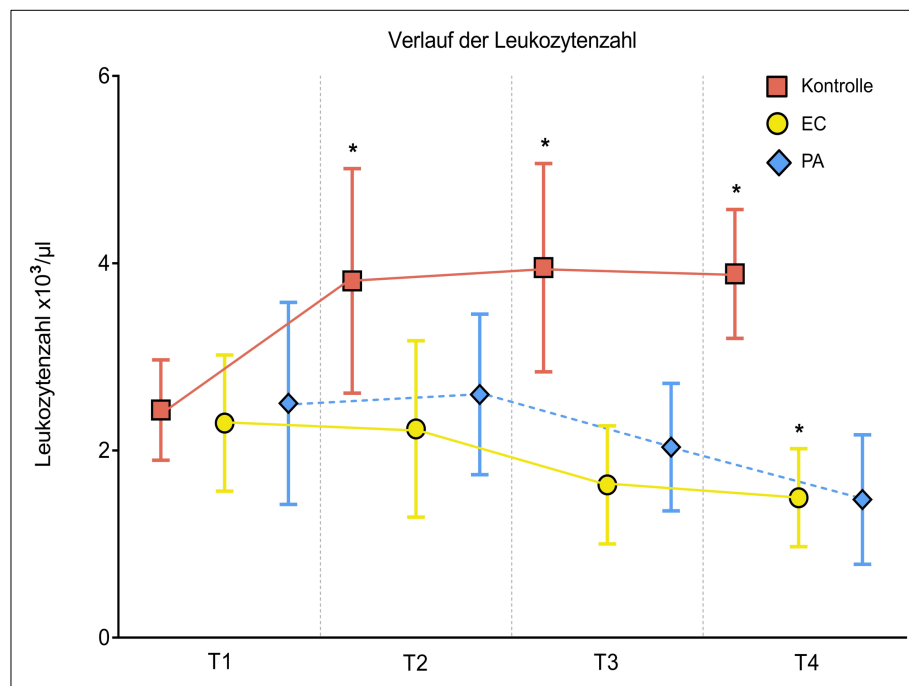


Abbildung 16: Verlauf der Leukozytenzahlen der Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten. ** = $p < 0,0001$. * = $p < 0,05$ im Vergleich zu T1.

3.1.3 Ergebnisse der computertomographischen Lungenaufnahmen

Das belüftete Lungenvolumen zum Zeitpunkt T1 betrug in allen betrachteten Lungenabschnitten im Mittel $104,3 \text{ mm}^3 \pm 17,32$. Zum Zeitpunkt T4 betrug das belüftete Lungenvolumen im Mittel in der Kontrollgruppe $76,64 \text{ mm}^3 \pm 39,23$, in der *E.-coli*-Gruppe $56,97 \text{ mm}^3 \pm 41,46$ und in der *P.-aeruginosa*-Gruppe $68,01 \text{ mm}^3 \pm 36,9$. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das belüftete Lungenvolumen bei beiden Pneumoniegruppen signifikant reduziert (Angabe jeweils von Mittelwert und Standardabweichung). Abbildung 17 veranschaulicht den Verlauf des belüfteten Lungenvolumens.

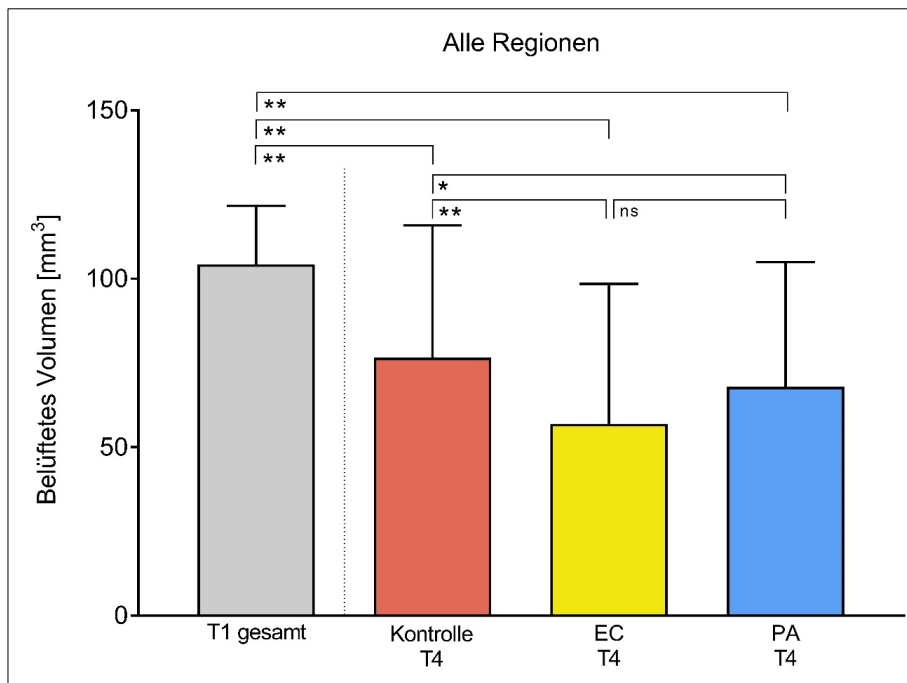


Abbildung 17: Belüftetes Lungenvolumen aller Regionen zum Zeitpunkt T1 und T4. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$. ns = statistisch nicht signifikant.

3.2 Atemgasanalysen

Im positiven Ionenmodus veränderte sich bei 53 Signalen die gemessene Intensität zwischen Baseline-Messung (T1) und den späteren Messpunkten (T2-T4). Im negativen Ionenmodus veränderten sich die Intensitäten von 14 Signalen. Abbildung 18 und Tabelle 7 geben eine Übersicht über alle 67 Signale, die für diese Arbeit analysiert wurden sowie deren Position im MCC-IMS-Topogramm. Bei zehn im positiven Ionenmodus gemessenen Signalen und bei drei Signalen im negativen Ionemodus zeigten sich im Versuchsverlauf Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Diese Substanzen wurden daher als potentiell differenzierend zwischen der Kontroll- gegenüber den Pneumoniegruppen bzw. zwischen den Pneumoniegruppen erachtet. Fünf dieser Signale (*P_648_36*, *P_727_557*, *Indol*, *P_714_278* und *P_700_549*) zeigten statistisch signifikante Veränderungen der gemessenen Intensität. Die Abbildungen 19 bis 31 geben die Signalintensitäten dieser Substanzen wieder, die sich in den Studiengruppen unterschiedlich veränderten.

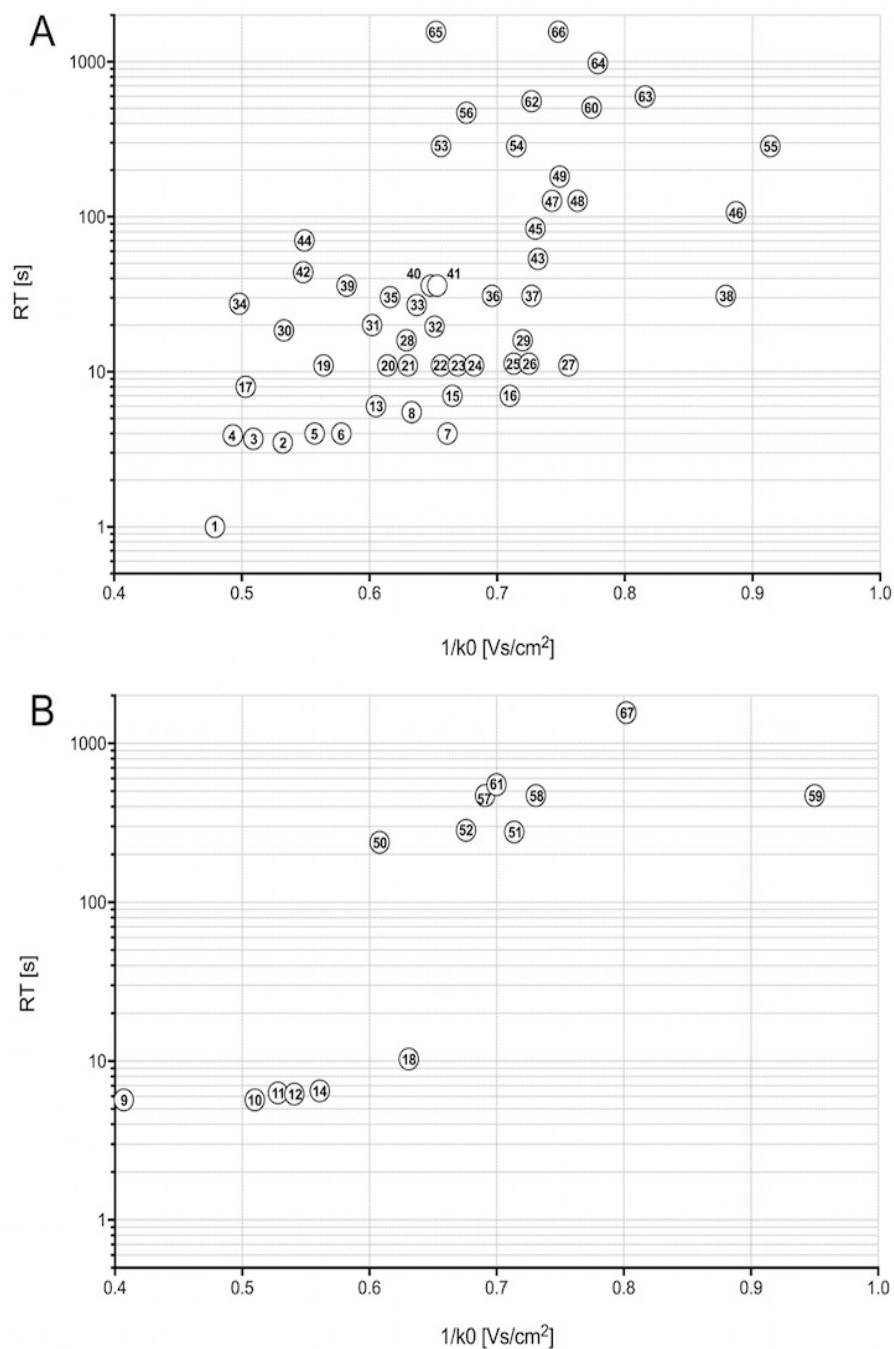


Abbildung 18: MCC-IMS-Topogramm mit Position aller untersuchten 67 Signale. **A** zeigt die im positiven Ionenmodus detektierten 53 Peaks. **B** zeigt die im negativen Ionenmodus detektierten 14 Peaks. X-Achse = inverse reduzierte Ionenmobilität ($1/k_0$); Y-Achse = logarithmische Darstellung der Retentionszeit (RT). Die Nummerierung der Peaks entspricht Tab. 7.

Tabelle 4.1: Liste aller in dieser Arbeit untersuchten IMS-Signale.

Nr.	Substanzname	1/k0	RT	Ionenmodus	Zugehörigkeit
1	P_479_1	0,479	1	positiv	-
2	P_532_3,5	0,532	3,5	positiv	-
3	Ethanol	0,509	3,7	positiv	-
4	2-Propanon	0,493	3,9	positiv	-
5	P_557_4	0,557	4	positiv	-
6	P_578_4	0,578	4	positiv	-
7	P_661_4	0,661	4	positiv	-
8	P_633_5,5	0,633	5,5	positiv	VAP
9	P_407_6	0,407	5,7	negativ	-
10	P_510_6	0,510	5,7	negativ	-
11	P_528_6	0,528	6,3	negativ	-
12	P_541_6	0,541	6,2	negativ	-
13	P_605_6	0,605	6	positiv	-
14	P_561_6,5	0,561	6,5	negativ	-
15	P_665_7	0,665	7	positiv	EC
16	P_710_7	0,710	7	positiv	EC+VAP
17	P_503_8	0,503	8	positiv	-
18	P_631_10	0,631	10,3	negativ	-
19	P_564_11	0,564	11	positiv	-
20	P_614_11	0,614	11	positiv	-
21	P_630_11	0,630	11	positiv	PA
22	P_656_11	0,656	11	positiv	-
23	P_669_11	0,669	11	positiv	-
24	P_682_11	0,682	11	positiv	-
25	P_713_11	0,713	11,3	positiv	EC+VAP
26	P_725_11	0,725	11,3	positiv	-
27	P_756_11	0,756	11	positiv	PA
28	5-Methylheptan-3-on	0,629	16	positiv	PA
29	P_720_16	0,720	16	positiv	-
30	P_533_18,5	0,533	18,5	positiv	-
31	P_602_20	0,602	20	positiv	-
32	P_651_20	0,651	19,6	positiv	-
33	P_637_27	0,637	27	positiv	-
34	P_498_27,5	0,498	27,5	positiv	-
35	2-Phenylacetaldehyd	0,616	30,4	positiv	-
36	2-Ethylhexan-1-ol	0,696	31	positiv	-
37	P_727_31	0,727	31	positiv	-
38	P_879_31	0,879	31	positiv	-
39	P_582_36	0,582	36	positiv	-
40	P_648_36	0,648	36	positiv	PA
41	P_653_36	0,653	36	positiv	PA
42	P_548_44	0,548	44	positiv	-
43	Nonanal	0,732	53,5	positiv	-
44	P_549_70	0,549	70,4	positiv	-
45	P_730_84	0,730	84	positiv	-

Nr.	Substanzname	1/k0	RT	Ionenmodus	Zugehörigkeit
46	P_887_107	0,887	107	positiv	-
47	P_743_127	0,743	127	positiv	-
47	P_743_127	0,743	127	positiv	-
48	P_763_127	0,763	127	positiv	-
49	P_749_182	0,749	182	positiv	-
50	Indol	0,608	239	negativ	EC
51	P_714_278	0,714	277,6	negativ	VAP
52	P_676_284	0,676	284,3	negativ	-
53	P_656_286	0,656	286	positiv	-
54	P_715_286	0,715	286	positiv	-
55	P_941_286	0,914	286	positiv	-
56	Propofolmonomer	0,676	470	positiv	-
57	P_691_470	0,691	470	negativ	-
58	Propofolmonomer	0,731	470	negativ	-
59	Propofoldimer	0,950	470	negativ	-
60	P_774_506	0,774	506	positiv	-
61	P_700_549	0,700	549	negativ	EC
62	P_727_557	0,727	557	positiv	EC+VAP
63	P_816_599	0,816	599	positiv	-
64	P_779_983	0,779	983	positiv	-
65	P_652_1560	0,652	1560	positiv	-
66	P_748_1560	0,748	1560	positiv	-
67	P_802_1560	0,802	1560	negativ	-

EC = *E. coli*, PA = *P. aeruginosa*, VAP = Ventilator-assoziierte Pneumonie

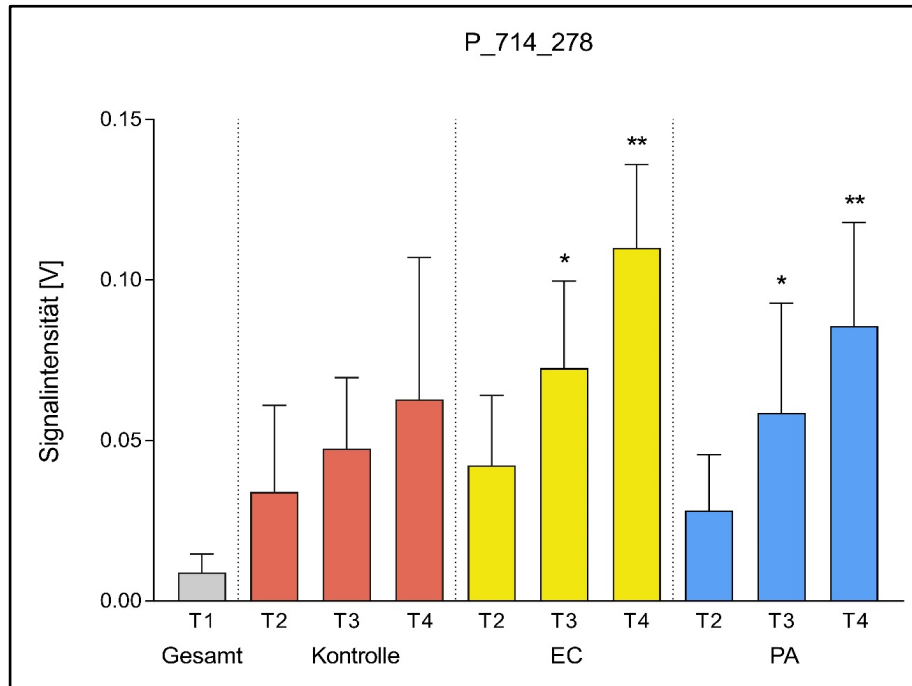


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_714_278 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

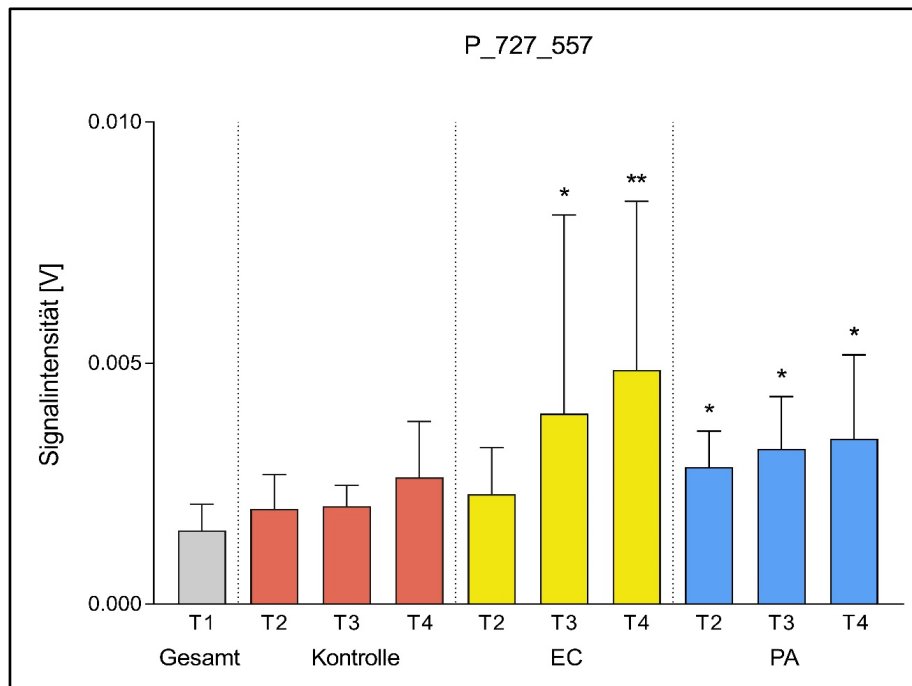


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_727_557 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

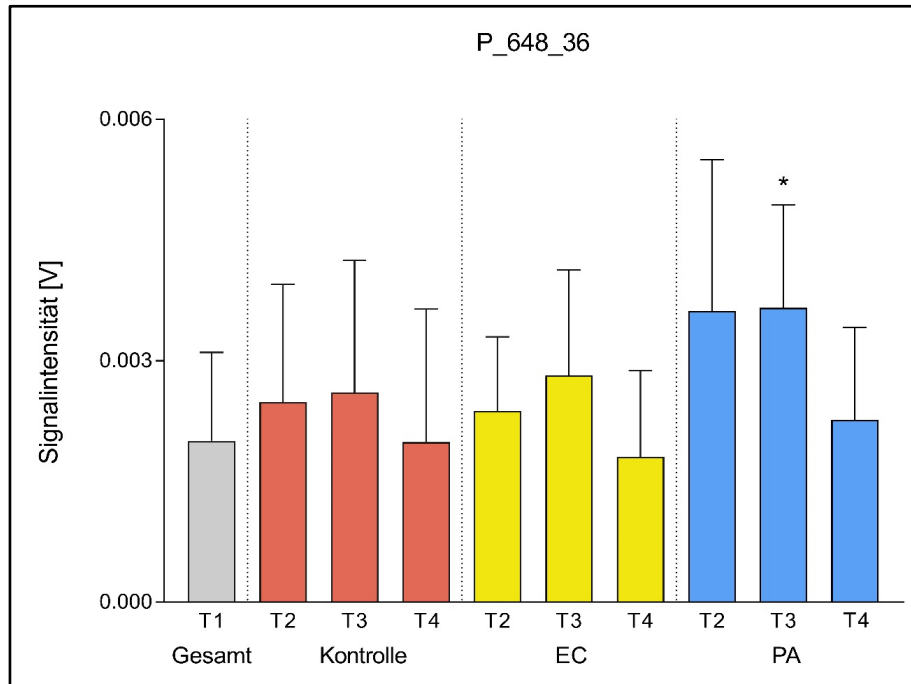


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_648_36 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

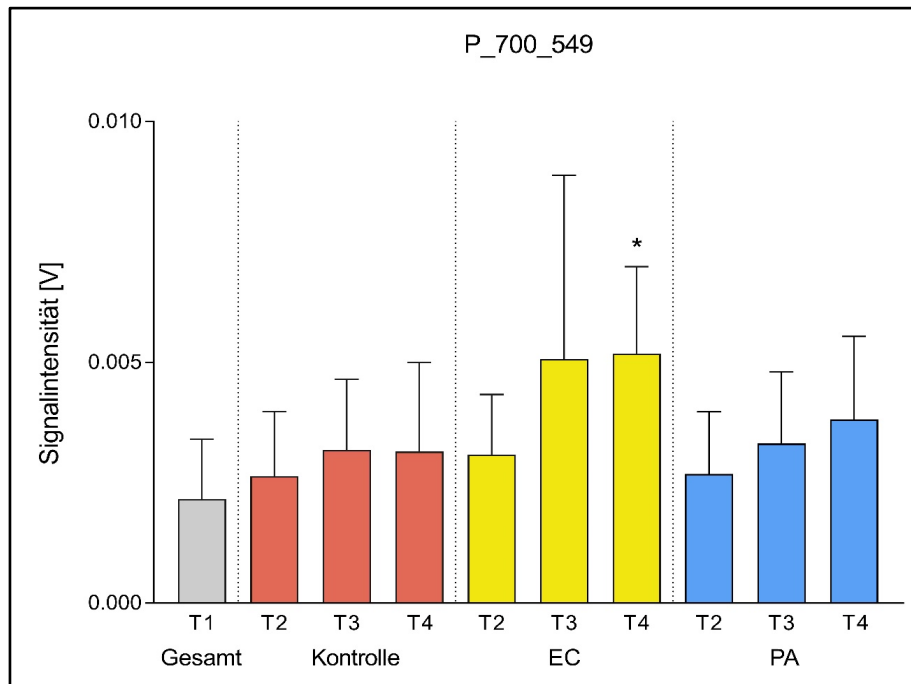


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_700_549 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

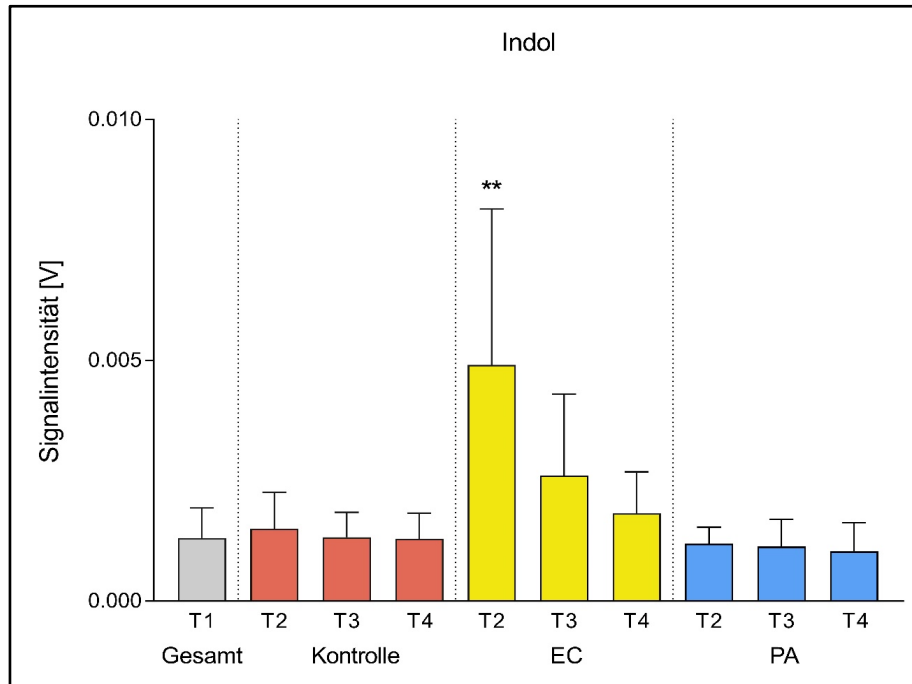


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Substanz Indol in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

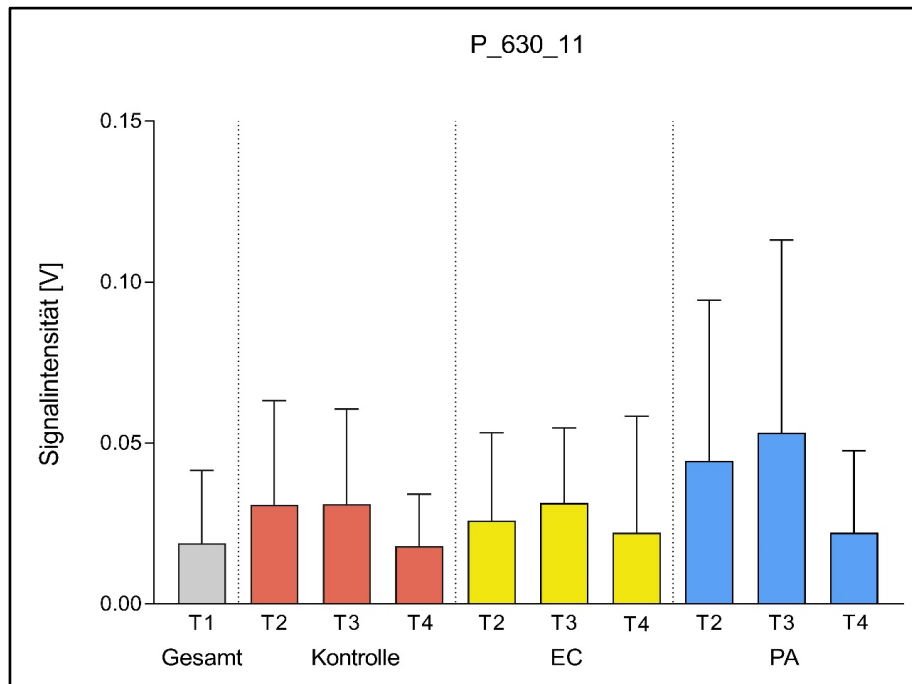


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_630_11 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

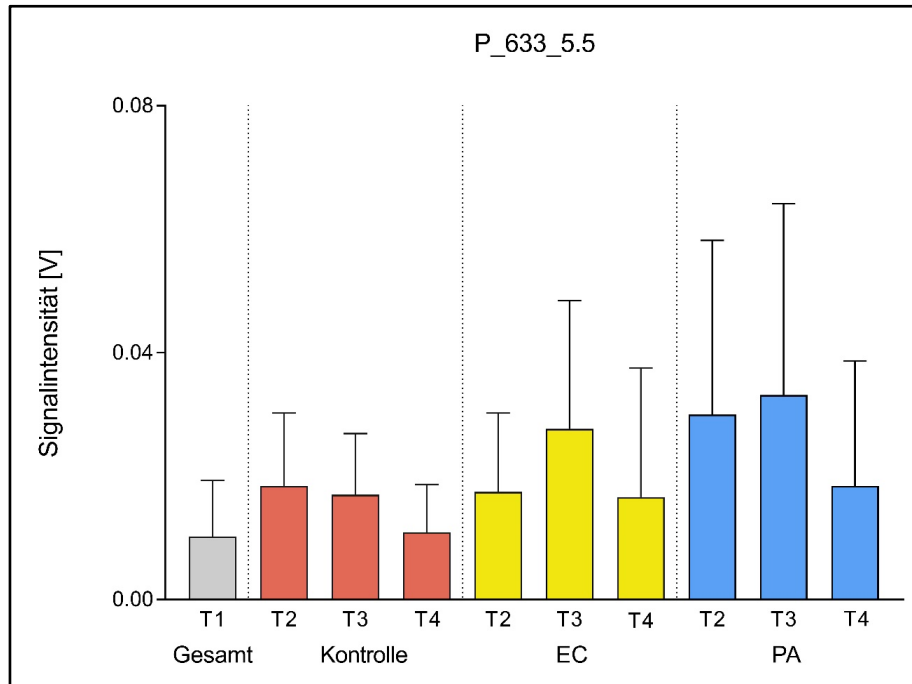


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_633_5.5 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

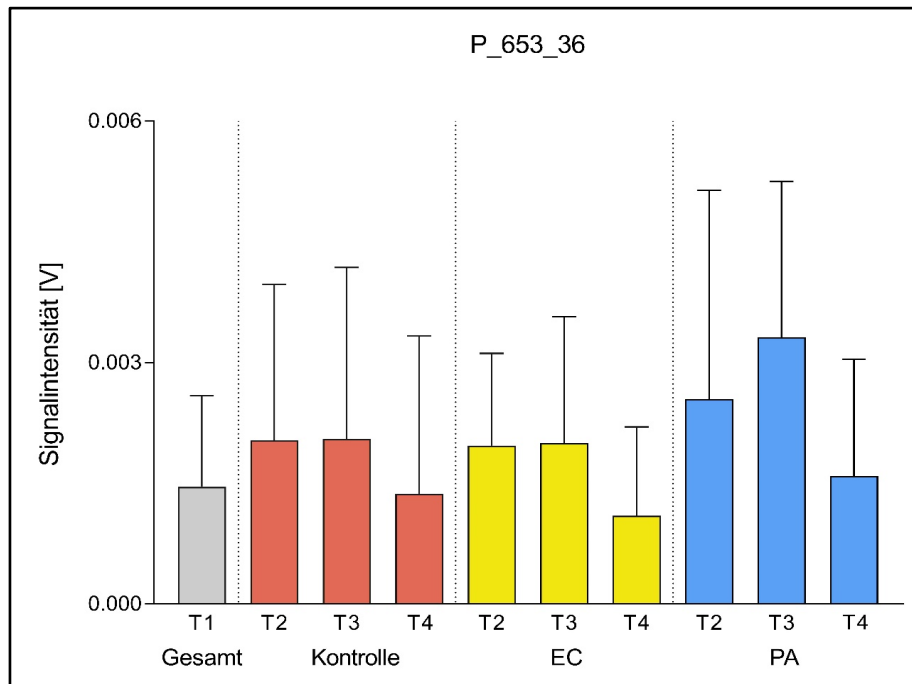


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_653_36 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

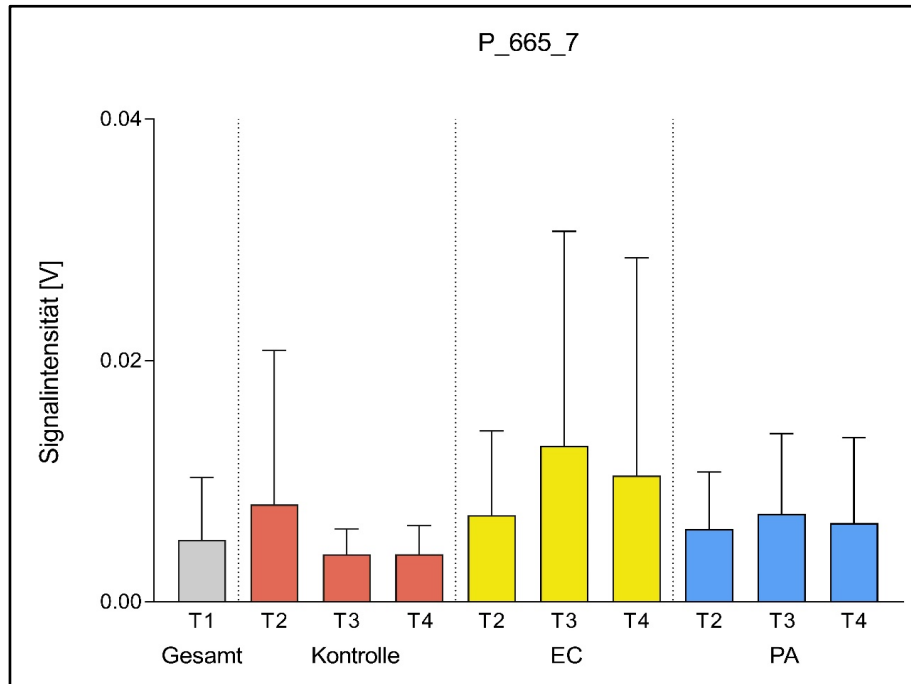


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_665_7 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

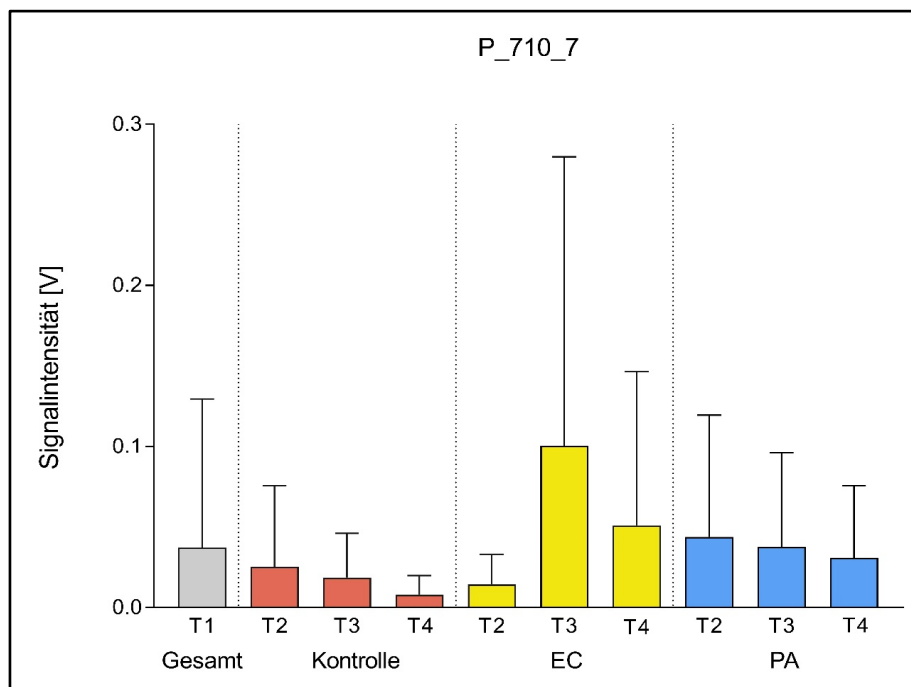


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_710_7 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

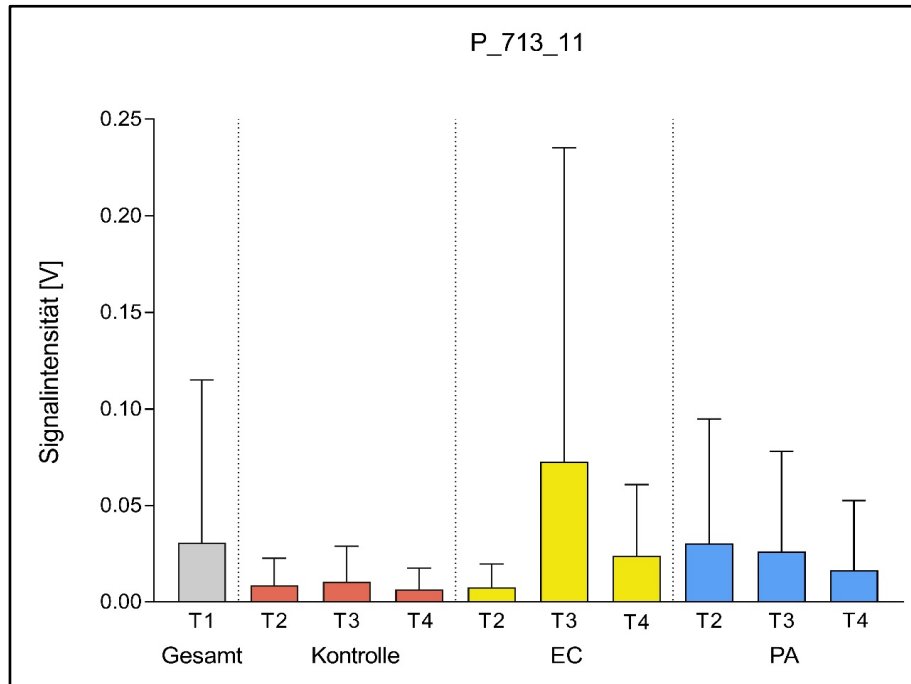


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_713_11 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

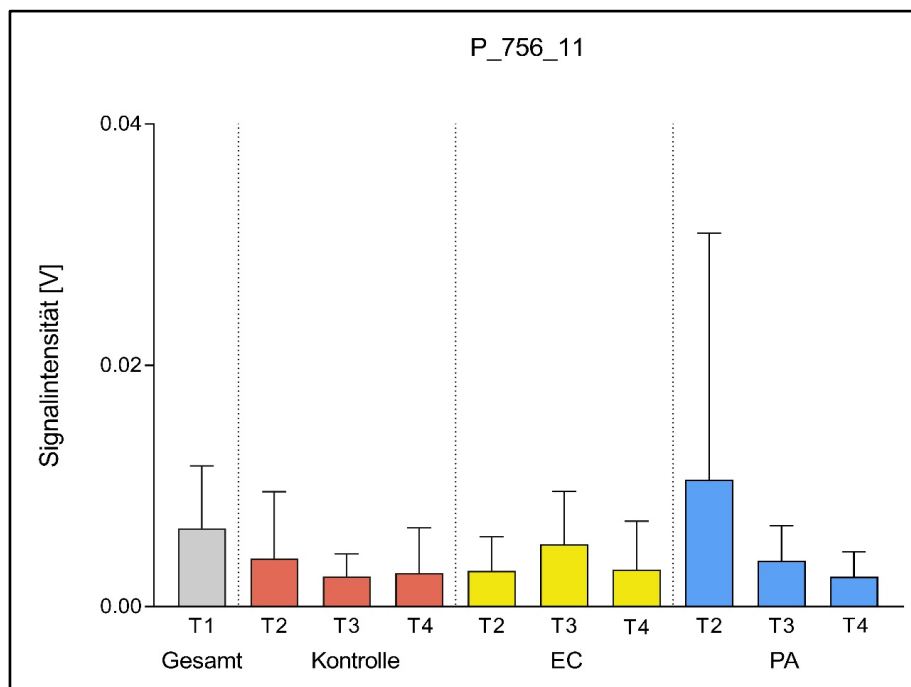


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der Substanz P_756_11 in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

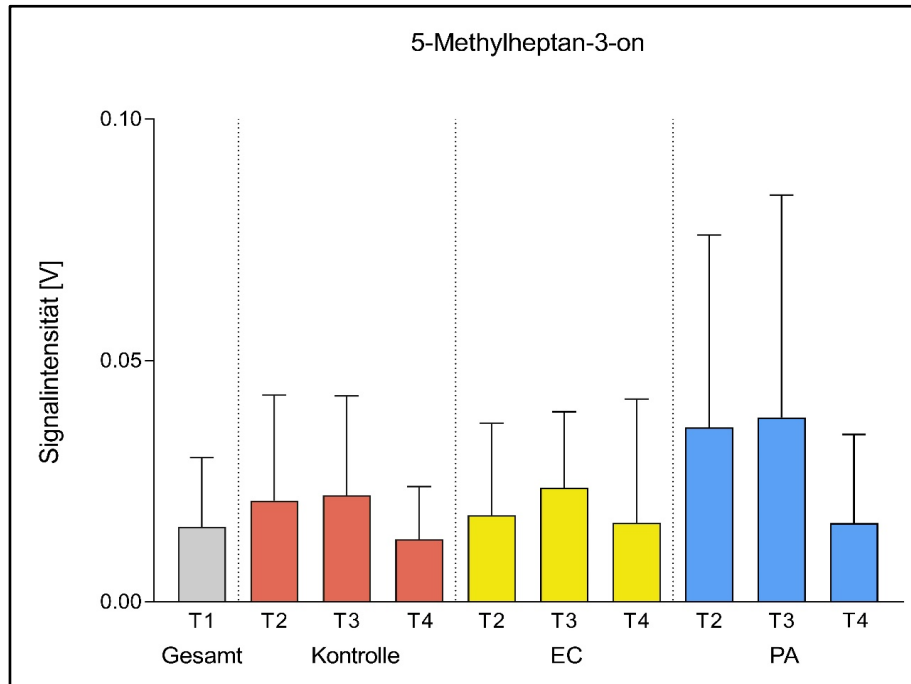


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf der Substanz 5-Methylheptan-3-on in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

Propofol ist hinsichtlich seiner chemischen Eigenschaften gut erforscht und das Propofol-Signal im MCC-IMS aus Voruntersuchungen bekannt (vgl. Perl et al. 2009; Carstens 2010).

Carstens 2010 gab die Koordinaten von mittels MCC-IMS gemessenem Propofol im Exspirium mit einer inversen reduzierten Ionenmobilität $1/k_0$ von $0,674 \text{ Vs/cm}^2$ bei einer Retentionszeit von $474,5 \text{ s}$ an. Diese Werte für das Propofol-Signal konnten in vorliegender Untersuchung reproduziert werden. Betrachtung fanden die gemittelten Signalintensitäten aller Versuchstiere zum Zeitpunkt T1, sowie die gemittelten Signalintensitäten aller Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe zu den Zeitpunkten T2 bis T4. Das Propofol-Signal zeigte bei allen Versuchstieren einen deutlichen Anstieg im Verlauf des Versuchs. Dies kann im Sinne einer Kumulation dieser lipophilen Substanz im Organismus der Versuchstiere interpretiert werden. Um die Qualität der Atemgas-Probennahme sicherzustellen, wurde das Propofol-Signal für eine Qualitätskontrolle als interner Standard verwendet.

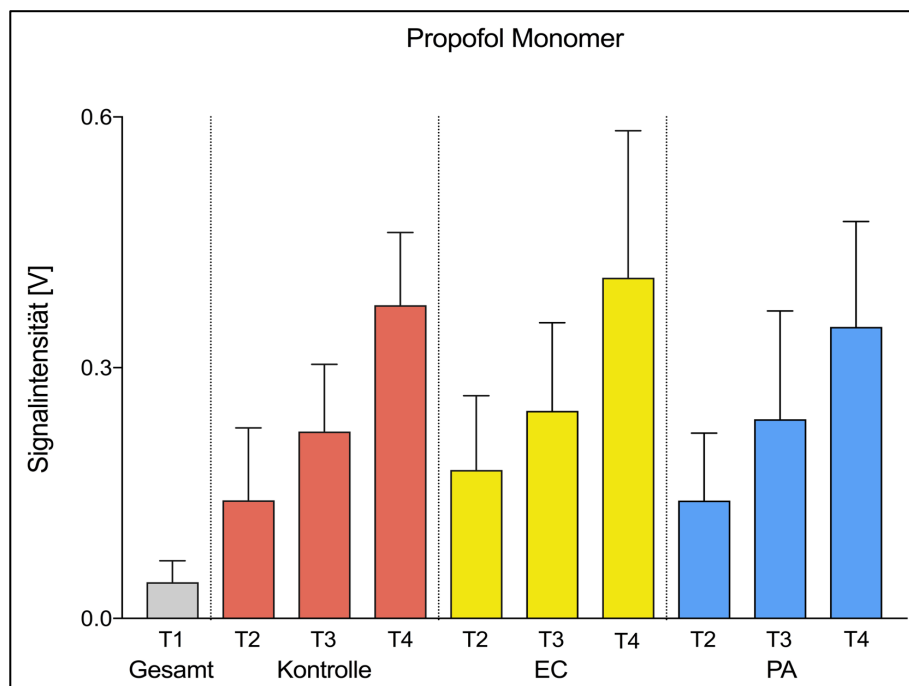


Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der Substanz Propofol in den jeweiligen Versuchsgruppen. ** = $p < 0.0001$. * = $p < 0.05$.

4 DISKUSSION

Das ursprünglich von Cohen und Karasek 1970 unter dem Namen Plasma-Chromatographie eingeführte Verfahren der Ionenmobilitätsspektrometrie wurde in den letzten Jahrzehnten in vielen technischen Bereichen erprobt und weiterentwickelt. Es erfolgten Anwendungen u. a. bei der Detektion von chemischen Kampfstoffen, Sprengstoffen und Drogen. Auch in der industriellen Prozesskontrolle und zur umwelttechnischen Luftgütekontrolle findet die Ionenmobilitätsspektrometrie Anwendung (Tiebe 2010).

Aufgrund der kurzen Analysezeit, geringen Nachweisgrenzen und der relativ geringen technischen Anforderungen war die Ionenmobilitätsspektrometrie in den letzten Jahren auch Gegenstand verschiedener Untersuchungen im humanmedizinischen Bereich (Chouinard et al. 2016). So wurde beispielsweise die Anwendbarkeit zur Erkennung vaginaler Infektionen (Karpas et al. 2002) oder zur Quantifizierung von Arbeitsplatzbelastungen durch Narkosegas (Kunze et al. 2015b) untersucht.

Baumbach beschrieb 2009 die Möglichkeit der Anwendung der Multikapillarsäulen gekoppelten Ionenmobilitätsspektrometrie (MCC-IMS) zur Analyse komplexer Mischgasproben mit hohem Feuchtegehalt wie beispielsweise Atemgasen (Baumbach 2009).

Die Atemluft von Säugetieren enthält hunderte volatiler Substanzen, die in den Fokus MCC-IMS basierter Untersuchungen gerückt sind (Schubert et al. 2004). Atemgasanalytische Untersuchungen wurden unter anderem zum Narkosemonitoring (Carstens 2010), zur Vorhersage von Tumorerkrankungen (Darwiche et al. 2011), zur Polychondritis (Usuba et al. 2015), zum Organversagen (Hüppe et al. 2016) und zu anderen systemischen Erkrankungen (Chouinard et al. 2016) durchgeführt.

Die Differenzierung und Identifikation humanpathogener Erreger anhand ihres VOC-Musters ist Fokus von Voruntersuchungen zur vorliegenden Arbeit gewesen. Während Perl et al. 2011 die Möglichkeit der Differenzierung verschiedener humanpathogener Pilze mittels MCC-IMS-Messungen aufzeigten, erwies sich in Untersuchungen von u. a. Jünger et al. 2012 und Kunze et al. 2013 auch die Differenzierung klinisch relevanter Bakterien anhand ihres volatilen Metaboloms mittels MCC-IMS als möglich (Perl et al. 2011; Jünger et al. 2012; Kunze et al. 2013).

Vorarbeiten zeigten zudem den zeitlichen Verlauf der bakteriellen VOC in Abhängigkeit zur Wachstumsphase von *E.-coli*- und *P.-aeruginosa*-Kulturen auf (Kunze et al. 2013). So traten die meisten Veränderungen von Signalen, anhand derer eine Differenzierung der beiden Erreger möglich schien, in der späten logarithmischen und in der statischen Wachstumsphase der Kulturen auf. Da das volatile Metabolom bakterieller Kulturen abhängig vom jeweiligen Nährmedium und der Wachstumsphase ist, war eine einfache Übertragbarkeit dieser *in-vitro* Ergebnisse auf eine vitale

Säugetierlunge als Nährmedium nicht ohne weiteres gegeben (O'Hara und Mayhew 2009; Jünger et al. 2012; Kunze et al. 2013).

Die Untersuchungen von Jünger et al. 2012 und Kunze et al. 2013 können als besonders relevante Voruntersuchungen für vorliegende Arbeit angesehen werden, da hier übereinstimmende Erreger (*P. aeruginosa* und *E. coli*) mittels MCC-IMS-Messungen untersucht wurden. Ausgehend von diesen *in-vitro* Untersuchungen galt es nun das Wissen auf *in-vivo* Untersuchungen anzuwenden und die Eignung der Methode zur Bestimmung und Quantifizierung bakterieller VOC in der Atemluft eines Säugetieres zu prüfen.

Zentrale Frage der vorliegenden Untersuchung war, ob eine ventilatorassoziierte Pneumonie bei intubierten und maschinell beatmeten Versuchstieren mittels MCC-IMS nachweisbar, ob eine Differenzierung der Erreger anhand ihres volatilen Metaboloms möglich ist und wann diese Unterscheidung ggf. möglich ist.

Hierfür erfolgten anhand eines Kleintier-Pneumoniemodells MCC-IMS-Atemgasanalysen. Um eine Korrelation der MCC-IMS-Ergebnisse mit der Schwere der induzierten Pneumonie zu ermöglichen, erfolgten arterielle Blutgasanalysen, Bestimmungen der Leukozytenzahl sowie computertomographische Lungenaufnahmen an insgesamt vier Messzeitpunkten während eines Versuchs. Zum Ende eines jeden Versuchs erfolgte die histopathologische Untersuchung der Lungen mit Bestimmung des Entzündungsgrades anhand eines Pneumonie-Scores.

In den computertomographischen Lungenaufnahmen zeigte sich eine Abnahme des ventilerten Lungenvolumens in allen Gruppen, wobei diese in den Pneumoniegruppen signifikant stärker ausgeprägt war als in der Kontrollgruppe. In den apikalen Lungenabschnitten kam es in allen Versuchsgruppen zur deutlichsten Volumenabnahme, mit einem Maximum bei den Tieren der Pneumoniegruppen. Dies könnte sich durch die Seitenlagerung der Versuchstiere erklären, bei der sich der Kopf und die apikalen Lungenabschnitte in Tieflage befanden. Hieraus ergab sich zum einen ein entsprechend vermindertes Ventilations-Perfusions-Verhältnis, wohl aber auch eine stärkere Ansammlung der endotracheal eingebrachten Keimsuspension in den tiefliegenden Lungenabschnitten mit der Folge schwererer Pneumonie-Zeichen in diesen Arealen.

Die Beeinträchtigung der Ventilation und Oxygenierung im Rahmen einer progredienten Pneumonie kann mit dem signifikanten Abfall des p_aO_2 bei den Tieren der Pneumoniegruppen in Einklang gebracht werden. Bei den Tieren der Kontrollgruppe kam es hingegen zu keiner signifikanten Abnahme der Oxygenierung. In den Pneumoniegruppen ergab die histopathologische Untersuchung der Lungen schwere entzündliche Veränderungen des Lungenparenchyms mit signifikant höheren

Pneumonie-Scores als in der Kontrollgruppe. Dabei lag der durchschnittliche Pneumonie-Score der *E.-coli*-Gruppe über dem der Tiere der *P. aeruginosa*-Gruppe.

Die Leukozytenzahlen zeigten einen sinkenden Trend in den Pneumoniegruppen mit einer signifikanten Abnahme der Leukozytenzahl bei den Tieren der *E.-coli*-Gruppe. In Zusammenschau mit der histologisch nachgewiesenen massiven Ansammlung von Leukozyten im Lungenparenchym der VAP-Tiere erscheint diese Abnahme durch eine entzündungsbedingte Extravasation der Leukozyten erklärbar. In der Kontrollgruppe hingegen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Leukozyten. Dies könnte durch eine milde generalisierte Inflammation nach endotrachealer Intubation, Beatmung und arterieller sowie venöser Punktion bedingt sein. Relevante pulmonale Entzündungszeichen fanden sich in der Kontrollgruppe histologisch nicht.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine schwere Entzündungsreaktion und das Vorliegen einer VAP bei den Tieren der Pneumoniegruppen. Es wurde somit bestätigt, dass die Induktion einer Pneumonie mit der hier verwendeten Methode erfolgreich war und die MCC-IMS-Messungen bei den entsprechenden Tieren auf dem Boden einer progredienten Pneumonie durchgeführt wurden.

Damit einher gingen Veränderungen der gemessenen Signalintensitäten in insgesamt 67 Peak-Arealen des MCC-IMS-Plots. Bei insgesamt 13 dieser detektierten Signale zeigten sich Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, sodass diese als potentielle Diskriminatoren angesehen wurden. Bei fünf Substanzen (*P_648_36*, *P_727_557*, *Indol*, *P_714_278* und *P_700_549*) kam es zu statistisch signifikanten Signalveränderungen.

P_714_278 und *P_727_557* zeigten im Vergleich zu den Ausgangsmessungen (T1) einen signifikanten Anstieg der Signalintensität im Versuchsverlauf nach Instillation von Keimsuspension. Bei den Tieren der Kontrollgruppe war dieser Anstieg nicht statistisch signifikant. Die *E.-coli*- und *P. aeruginosa*-Gruppe unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

P_714_278 und *P_727_557* erlaubten somit eine Differenzierung der Kontrollgruppe von den Pneumoniegruppen und könnten daher potentielle frühe Marker einer VAP darstellen.

Gleiches galt für die Substanzen *P_648_36* und *P_700_549*. Sie zeigten jeweils nur in einer der beiden Pneumoniegruppen einen signifikanten Signalanstieg gegenüber der Baseline-Messung (T1), während es in der Kontrollgruppe nicht zu einem relevanten Anstieg kam. Der Signalanstieg von *P_648_36* war in der *P. aeruginosa*-Gruppe signifikant. *P_700_549* zeigte ausschließlich in der *E.-coli*-Gruppe einen signifikanten Signalanstieg. *P_648_36* und *P_700_549* könnten eine

Differenzierung zwischen den beiden Pneumoniegruppen erlauben und in zukünftigen Studien daher als Marker einer *P. aeruginosa*- bzw. *E. coli*-Pneumonie oder zur Differenzierung dieser Pathogene herangezogen werden.

Eine Identifizierung der bisher unbekannt Substanzen *P_648_36*, *P_727_557*, *P_714_278* und *P_700_549* könnte weitere Klarheit hinsichtlich ihres Ursprungs und der zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse schaffen.

Zwar ermöglicht die MCC-IMS Technik eine schnelle Detektion von VOC mit hoher Sensitivität auch in komplexen Gasproben, jedoch stellt die eindeutige Zuordnung eines MCC-IMS Signals zu einer Verbindung nach wie vor eine Herausforderung dar. Die Identifikation von VOC anhand ihrer MCC-IMS-Signale setzt eine umfangreiche Referenzdatenbank mit den Werten Retentionszeit und Ionenmobilität verschiedener Analyten voraus. Diese Daten können durch multiple Messungen vorher bereits bekannter Substanzen erhoben werden. Parallele Vergleichsmessungen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) können mit relativ viel Aufwand eine eindeutige Identifikation von Analyten durch Abgleich mit GC-MS Datenbanken ermöglichen. Um alleine mittels MCC-IMS in Zukunft VOC in komplexen Gasproben eindeutig identifizieren zu können, ist daher in Zukunft der Aufbau einer Referenzdatenbank notwendig (Jünger et al. 2010; Jünger et al. 2012).

Weiterhin ist die Zuordnung identifizierter Substanzen zu den zugrundeliegenden metabolischen Prozessen notwendig, um diese als valide Biomarker im volatilen Metabolom von Erregern verwenden zu können.

Die Signalintensität von *Indol* war zu einem frühen Zeitpunkt der Versuche in der *E. coli*-Gruppe signifikant höher als in der *P. aeruginosa*- und der Kontroll-Gruppe. Signifikante Signalunterschiede bestanden auch zwischen den Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit einem Maximum in der *E. coli*-Pneumoniegruppe. Auch und besonders für *Indol* könnte sich durch zukünftige Untersuchungen eine klinische Relevanz als früher Marker einer *E. coli* bedingten VAP ergeben.

Indol entsteht beim Abbau der Aminosäure Tryptophan durch eine bakterielle Tryptophanase (Botsford und Demoss 1972) und spielt in *E. coli* unter anderem eine Rolle für die Steuerung der Populationsdichte und Biofilmproduktion (Schulz und Dickschat 2007; Mueller et al. 2009). *In vitro* ist *Indol* über wachsenden *E. coli* Kulturen vor allem während der stationären Wachstumsphase mittels MCC-IMS nachweisbar und kann eine Identifikation der Kulturen ermöglichen (Müller et al. 2009; Jünger et al. 2012; Kunze et al. 2013).

Obwohl *Indol* ein Hauptmetabolit des volatilen Metaboloms von *E. coli* ist, besitzt *Indol* keine vollkommene Spezifität für dieses Bakterium. Es wird jedoch von vergleichsweise wenigen humanpathogenen Bakterien produziert. So ist *Indol* ebenfalls Bestandteil des Metaboloms von *K.*

oxytoca (Schulz und Dickschat 2007; Jünger et al. 2012) und *E. agglomerans* (Robacker et al. 2004). Bei Versuchen der Keimidentifikation im Rahmen von *in-vivo* Untersuchungen anhand des VOC Musters muss diesem Umstand Rechnung getragen werden.

Vorliegende Untersuchung erfolgte an zuvor klinisch gesunden Kaninchen, in denen durch endotracheale Keiminstallation eine Pneumonie induziert wurde. Der Nachweis der Pneumonie erfolgte laborchemisch, radiologisch und histopathologisch. Zwar kann eine vorbestehende Infektion der Kaninchen z. B. mit *K. oxytoca* nicht restlos ausgeschlossen werden, erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich. Es kann in vorliegender Untersuchung davon ausgegangen werden, dass *Indol* seinen Ursprung in der Besiedlung des Respirationstraktes der entsprechenden Versuchstiere mit *E. coli* hat.

In vorliegender Untersuchung konnten die Ergebnisse von Kunze et al. (2013) partiell reproduziert werden und es ergaben sich keine grundsätzlich im Widerspruch stehenden Ergebnisse. Über *in-vitro* wachsenden *E. coli*- und *P. aeruginosa* Kulturen waren hier insgesamt 19 Substanzen identifiziert worden, die über den wachsenden Kulturen neu auftraten bzw. deren Signalintensitäten sich während des bakteriellen Wachstums änderten. Neun dieser Substanzen konnten auch in vorliegender Studie detektiert werden: *2-Propanon (Azeton)*, *Ethanol*, *2-Ethylhexan-1-ol*, *5-Methylheptan-3-on*, *Nonanal*, *2-Phenylacetaldehyd*, *P_720_16*, *Indol*, *P_648_36*.

Außer der oben bereits beschriebenen Substanz *P_648_36* werden diese im Folgenden näher erläutert.

Die Substanz *2-Propanon (Azeton)* konnte im Exspirium aller Versuchstiere nachgewiesen werden, eine Assoziation zu einer der Versuchsgruppen zeigte sich nicht. *2-Propanon* entsteht bei der β -Oxidation und Decarboxylierung geradzahliger Fettsäuren in vielen Bakterien und ist weiterhin Bestandteil der Atemluft von Säugetieren (Bos et al. 2013). Dies erlaubt die Annahme, dass *2-Propanon* Teil des normalen VOC-Musters der narkotisierten und beatmeten Kaninchen ist und lässt seinen Nutzen als Biomarker eingeschränkt erscheinen.

Ethanol wird unspezifisch von einer Vielzahl von Mikroben als VOC abgegeben und ist üblicherweise über wachsenden Bakterienkulturen und in der Atemluft von Säugetieren nachweisbar (Bos et al. 2013; Oort et al. 2018). Nichtsdestotrotz kann das Fehlen von Ethanol über wachsenden Bakterienkulturen ein Unterscheiden verschiedener Bakterien in *in-vitro*-Untersuchungen ermöglichen (Jünger et al. 2012; Kunze et al. 2013).

Für Atemgasanalysen in einem medizinischen Umfeld scheint es ungeeignet, da es häufig zur Desinfektion verwendet wird und daher der Nachweis von Spuren auch in Atemgasanalysen wahrscheinlich ist.

2-Ethylhexan-1-ol findet als chiraler Alkohol breite Verwendung in der Industrie und wurde von Amavizca et al. (2017) als VOC des apathogenen *E.-coli*-Stamms DH5A beschrieben. In der *in-vitro* Untersuchung von Kunze et al. (2013) konnte *2-Ethylhexan-1-ol* über sterilem LB-Flüssigmedium nachgewiesen werden und war auch in vorliegender Untersuchung in allen Versuchsgruppen detektierbar. Unterschiede der Signalintensitäten zwischen den Versuchsgruppen zeigten sich nicht. Die industrielle Verwendung von *2-Ethylhexan-1-ol* könnte das Vorkommen in beiden Studien erklären, da es sowohl im LB-Flüssigmedium, als auch in verwendeten Medikamenten enthalten gewesen sein könnte.

5-Methylheptan-3-on zeigte *in-vitro* keine Spezifität für *E. coli* oder *P. aeruginosa*. In vorliegender Untersuchung ergaben sich höhere Signalintensitäten in der *P.-aeruginosa*-Gruppe, die allerdings keine Signifikanz erreichten. Eine Eignung von *5-Methylheptan-3-on* als potentieller Marker muss ggf. in zukünftigen Studien weiter evaluiert werden.

Nonanal trat in allen Versuchsgruppen gleichermaßen auf. Zwar produzieren Myxobakterien diese Verbindung, jedoch ist bisher keine humanpathogene Spezies bekannt, die Nonanal emittiert. Weiterhin enthalten Nährmedien und Pharmazeutika oft Nonanal (Schulz und Dickschat 2007). Daher ist der Nachweis von Nonanal mit großer Wahrscheinlichkeit auf das verwendete LB-Medium und die applizierten Medikamente zurückzuführen.

2-Phenylacetaldehyd zeigte *in-vitro* abnehmende Signalintensitäten während des bakteriellen Wachstums und wurde in Voruntersuchungen als VOC verschiedener humanpathogener Bakterien wie *Serratia marcescens* beschrieben (Schulz und Dickschat 2007). *2-Phenylacetaldehyd* konnte in vorliegender Untersuchung in allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden, jedoch mit sehr geringen Signalintensitäten. Ein abnehmender Trend der Signalintensitäten im Versuchsverlauf zeigte sich im Unterschied zu den *in-vitro*-Ergebnissen nicht.

P_720_16 konnte in allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede seiner Signalintensitäten im Verlauf. Eine weitere Relevanz dieser bisher unbekannt Substanz ergab sich daher nicht.

Wie oben bereits beschrieben, wies *Indol* im Einklang mit den *in-vitro* Ergebnissen von Kunze et al. 2013 eine Spezifität für die *E.-coli*-Gruppe auf und erlaubte eine frühzeitige Differenzierung. Die Signalintensitäten waren in vorliegender Studie jedoch deutlich geringer als *in-vitro*. Ursächlich hierfür könnten zum einen die geringeren verwendeten Bakterienkonzentrationen beim VAP-Modell, aber auch ein möglicherweise verändertes *in-vivo* Wachstumsverhalten von *E. coli* sowie

unterschiedliche Bedingungen für die Detektion von VOC sein.

Wenngleich sich keine Widersprüche ergaben, wichen die Ergebnisse dieser Studie insgesamt von den Ergebnissen vorheriger *in-vitro* Untersuchungen ab. Bakterielle Metabolitmuster sind stark vom Nährmedium und den Wachstumsbedingungen abhängig, so dass sich bereits hieraus Unterschiede ableiten (Kunze et al. 2013). Weiteren Einfluss könnten pathophysiologische pulmonale und systemische Faktoren der Versuchstiere gehabt haben und die eher geringe Anzahl identifizierbarer Marker erklären. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

Das Expirium enthält neben Gasen und Wasserdampf hunderte VOCs (Carstens 2010). Diese können an verschiedenen Orten des Organismus (Transport durch das Blut zur Lunge), im Blut selbst, im und am Lungenparenchym sowie im Respirationstrakt entstehen. Des Weiteren könnten VOCs dem Hypo- und Oropharynx sowie den Sinus des Gesichtsschädels entspringen, wobei dieser Umstand bei Beatmung und Probengewinnung über einen Endotrachealtubus vernachlässigt werden kann. Bakterielle VOCs aus den großen und kleinen Bronchien können hierbei jedoch nicht sicher von denen aus tieferen Lungenabschnitten abgegrenzt werden, wodurch eine Unterscheidung zwischen (Tracheo-)Bronchitis und Pneumonie mittels MCC-IMS ohne weitere Parameter nicht unbedingt möglich ist. Durch wiederholte tomographische Aufnahmen der Lungen zu den jeweiligen Messzeitpunkten und Korrelation dieser Aufnahmen mit den Ergebnissen der Blutgasanalysen, Leukozytenzahl und Histopathologie konnte in vorliegender Untersuchung das Vorliegen einer Pneumonie bewiesen werden.

Die einsetzende (v. a. zelluläre) Immunantwort der Versuchstiere und der entzündungsbedingte Untergang von Bakterien und Wirtszellen verschiedener Typen (z. B. Pneumozyten, Epithelzellen, Granulozyten etc.) könnte einen Einfluss auf das messbare VOC-Spektrum gehabt haben. Bisher liegen kaum Daten zu diesen Einflüssen aus Voruntersuchungen vor. Im Rahmen pneumonischer Veränderungen und lagebedingt kann es an der Lunge zur Ausbildung von Atelektasen kommen. Dieses könnte mutmaßlich gerade am Ort eines verstärkten bakteriellen Wachstums geschehen, wodurch die Detektion der hier gebildeten VOCs aufgrund des verringerten Gasaustausches erschwert werden könnte.

Hinsichtlich messbarer VOCs, die über das Blut eliminiert werden, spielt die systemische und pulmonale Hämodynamik eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung dieser Verbindungen im Expirium. So kann ein steigendes Herz-Zeit-Volumen zu Veränderungen der VOC-Muster in der Atemluft führen (King et al. 2010), während schlechte Perfusionsverhältnisse oder niedriger Blutdruck die Elimination von VOCs beeinträchtigen könnten. In minderbelüfteten Bereichen wäre eine Beeinflussung des VOC-Musters durch eine hypoxische Vasokonstriktion denkbar (Euler-Liljestrand-Mechanismus). Weiterhin könnte eine Veränderung des Ventilations-Perfusions-

Verhältnisses durch z. B. unphysiologische Lagerung oder eine septische Hyperperfusion des Parenchyms Einfluss auf das VOC-Muster haben. Um der Bildung lagebedingter Atelektasen und einer damit einhergehenden Verringerung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses vorzubeugen, erfolgte bei den Versuchstieren zu jedem der drei Messzeitpunkte (s. Abb. 4) ein Lagerungswechsel sowie, wenn nötig, ein sog. *Recruitmentmanöver*.

Sollte die Detektion von VOC durch pneumoniebedingte Atelektasen erschwert worden sein, so könnte in zukünftigen Untersuchungen ein *Recruitmentmanöver* vor den MCC-IMS Messungen positiven Einfluss auf diesen Faktor haben. Durch temporäre Erhöhung des Atemwegdrucks könnten so zumindest kurzfristig (teil-)atelektatische Bereiche geöffnet und so ein Gasaustausch in diesen Bereichen hergestellt werden. Dieses könnte die Möglichkeit der Detektion von dort gebildeten VOCs erhöhen. Hierbei sollte allerdings eine standardisierte und evtl. automatisierte Durchführung und Messung angestrebt werden, um weiterhin eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Ebenso könnte eine dauerhafte Erhöhung des PEEP der Bildung von Atelektasen entgegenwirken.

Bei Weiterentwicklung der Atemgasanalytik mittels MCC-IMS Messungen sollte das komplexe Zusammenspiel der systemischen und pulmonalen Hämodynamik, der bronchialen und pulmonalen Ventilationsverhältnisse und systemischer Reaktionen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Kunze et al. (2013) konnten zeigen, dass das Auftreten bzw. die Änderung von VOC-Signalen in MCC-IMS-Messungen nicht nur abhängig vom Nährmedium ist, sondern auch von der bakteriellen Wachstumsphase. Da bisher wenige Erkenntnisse über das bakterielle Wachstum in einer Säugertierlunge vorliegen, stellt dies eine Herausforderung für die vorliegende aber auch für zukünftige Untersuchungen und die Atemgasanalyse im klinischen Umfeld dar. Es ist davon auszugehen, dass das intrapulmonale Wachstum der Erreger z. B. aufgrund der Immunantwort des Wirtstieres vom beobachtbaren *in-vitro* Wachstum abweicht. So könnte es z. B. durch die einsetzende Immunantwort bereits früher zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kommen. Dies könnte sich auf den Zeitpunkt der Detektierbarkeit bzw. die Signalintensität einzelner VOC auswirken. In vorliegender Untersuchung erfolgte die letzte Atemgasanalyse acht Stunden nach Einbringen der Keimlösung. Eine exakte Bestimmung der bakteriellen Wachstumsphase war im Rahmen dieser Untersuchung nicht möglich. Die computertomographischen Lungenaufnahmen erlaubten lediglich Rückschlüsse auf die Pneumonieschwere bzw. -ausdehnung. Sollte ein verlangsamtes bakterielles Wachstum vorgelegen haben, wären z. B. signifikante Signalveränderungen möglicherweise erst zu einem noch späteren Zeitpunkt detektierbar gewesen. In zukünftigen Studien könnte diesem Umstand durch Verlängerung der Beatmungsdauer und weitere MCC-IMS-Messungen zu späteren Zeitpunkten begegnet werden.

In kommenden Untersuchungen zu krankheitsspezifischen Veränderungen des VOC-Musters im Expirium könnten diese pulmonalen Einflussfaktoren durch Verwendung von Sepsis- bzw. Infektionsmodellen mit stabilen pulmonalen Ventilations-Perfusionsverhältnissen (z. B. Harnwegsinfekte) und ohne pulmonale Infektion minimiert werden. Hierdurch könnte die Anwendbarkeit der Atemgasanalyse mittels MCC-IMS auch bei weiteren nicht-pulmonalen Erkrankungen überprüft werden.

Verschiedene Verfahren der Atemgasanalyse wurden hinsichtlich ihrer klinischen Anwendbarkeit untersucht. Unter diesen können u. a. online- und offline-Analyseverfahren unterschieden werden. Bei offline-Verfahren findet die Probennahme und Analyse räumlich getrennt voneinander statt, es ist also ein Transport der Probe notwendig. Zur Probengewinnung und ggf. Präkonzentration werden verschiedene Verfahren eingesetzt. Eine Sammlung von Atemluft kann z. B. durch Tedlar-Bags erfolgen, eine anschließende Präkonzentration mittels Festphasenmikroextraktion oder Needle-Traps. Durch verschiedene Adsorptions- und Desorptionseigenschaften der verwendeten Materialien kann es hierbei zum Verlust von Analyten kommen, da diese z. B. nicht adsorbiert oder nicht vollständig desorbiert werden können (Schubert et al. 2004; Jünger et al. 2010; Lawal et al. 2017).

Bei online-Verfahren finden Probennahme und -analyse im gleichen Gerät oder zumindest in einem zusammenhängenden Geräteverbund statt. Diese teils auch bettseitig einsetzbaren Verfahren können somit kontinuierlich und mit nur geringer Verzögerung ablaufen. Hierbei stellt die real-time-Analyse eine Besonderheit unter den online-Verfahren dar. Hinsichtlich der Atemgasanalyse bedeutet dies die kontinuierliche Echtzeitanalyse des In- und Expiriums. Bei der Atemgasanalyse kommen hierfür die Protonen-Transfer-Reaktion-Massenspektrometrie (PTR-MS) (King et al. 2010) und die Ionen-Molekül-Reaktion-Massenspektrometrie (IMR-MS) (Hornuss et al. 2007) in Betracht.

Die MCC-IMS stellt kein real-time-Verfahren, sondern ein online-Verfahren dar. Die Analyse findet direkt nach der Probengewinnung statt, weshalb sich dieses Verfahren zur Atemgasanalyse anbietet. Für eine möglichst hohe Messgenauigkeit ist hierfür die Probennahme zum richtigen Zeitpunkt essentiell. Um Alveolarluft zu gewinnen, ist daher die exakte und reproduzierbare Identifizierung der endexpiratorischen Phase des Atemzyklus notwendig. Aufgrund der hohen verwendeten Atemfrequenz (45/min) und der kurzen endexpiratorischen Phase (Dauer der Expiration insgesamt ca. 880ms bei einem Inspiration:Expiration-Verhältnis von 1:1,5, angenommene Dauer der endexpiratorischen Phase < 400ms) ist hierbei eine möglichst kurze technische Verzögerung wünschenswert. Eine automatisierte Probennahme zeigte sich hierbei in einer Untersuchung von Vautz et al. (2010) hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer manuellen Probengewinnung überlegen. Daher wurde in vorliegender Arbeit eine in der gleichen Untersuchung be-

schriebene automatisierte, Flow-Sensor gesteuerte Probengewinnung im Bypass-Verfahren durchgeführt. Der verwendete Flow-Sensor wies hierbei eine Latenz von ca. 30ms auf. Trotz der kurzen Latenz kann mit diesem Verfahren eine Beimengung von Atemgasen aus den oberen Atemwegen nicht sicher ausgeschlossen werden. Daher wäre eine hierdurch bedingte Dilution der Probe zwar möglich, aber bei allen Versuchstieren und Messungen gleichermaßen zu erwarten gewesen. Das im Vergleich zum erwachsenen Patienten geringe Atemzugvolumen der Versuchstiere und die kurze endexpiratorische Phase könnte in vorliegender Untersuchung den Nachweis gering konzentrierter volatiler Substanzen erschwert haben.

Häufig werden in der Anästhesie halbgeschlossene bzw. geschlossene Narkosesysteme genutzt. In diesen kann es zu einer Rückatmung von VOC kommen (Takita et al. 2007). Eine Kumulation dieser und falsch hohe Ergebnisse wären eine mögliche Folge. Dieser Umstand sollte in zukünftigen Studien bei Verwendung von Rückatemsystemen berücksichtigt werden. In vorliegender Untersuchung wurde die Narkose mittels total-intravenöser-Anästhesie durchgeführt und es kam ein halboffenes Nichtrückatemsystem (Intensivrespirator) zum Einsatz. Eine Rückatmung von VOC war in diesem Rahmen somit ausgeschlossen.

Aufgrund der Funktionsweise eines IMS können nur ionisierbare Substanzen im elektrischen Feld beschleunigt und somit detektiert werden. Dies erklärt bestehende Diskrepanzen von IMS- zu GC-MS-Messungen hinsichtlich der detektierten Substanzen. Des Weiteren können nicht alle Signale in IMS-Spektren zweifelsfrei einer Substanz zugeordnet werden. Dies hängt von Umfang und Qualität der bestehenden Referenz-Daten ab. GC-MS-Techniken können hierbei die Identifizierung unbekannter IMS-Peaks erleichtern bzw. ermöglichen. Gerade hinsichtlich des volatilen Metaboloms humanpathogener Bakterien ist hier weitere Forschung mit dem Ziel der Erweiterung der mikrobiologischen Referenz-Datenbanken notwendig (Jünger et al. 2012).

Verschiedene Analyten weisen unterschiedliche Retentionszeiten auf. Die maximale Retentionszeit betrug in vorliegender Untersuchung 2000 sek. Substanzen mit höherer Retentionszeit hätten sich somit der Messung entziehen können. Allerdings zeigten Voruntersuchungen, dass keine Relevanten Peaks für längere Retentionszeiten zu erwarten waren.

Die Ionisierung der Analyten geschieht im MCC-IMS mittels Reaktionsionen, die aus den Driftgasmolekülen hervorgehen. Diese weisen ihrerseits eine Drift auf und finden in Form des Reaktionsionen-Peaks (RIP) im IMS-Spektrum Darstellung. Da im Drift- und Ionisationsraum des IMS ein konstanter Driftgasfluss anliegt, sind die RIP für $H^+(H_2O)_n$ -Ionen mit nahezu konstanter Driftzeit zu jeder Retentionszeit darstellbar. Auch $NH_4^+(H_2O)_n$ -Ionen kommen zur Darstellung. Da diese allerdings durch minimale Verunreinigungen des Driftgases (Luft) mit Ammoniak (NH_3) entstehen und dieses wiederum einer Retention in der MCC unterliegt, zeigt sich der RIP für $NH_4^+(H_2O)_n$ -

Ionen lediglich in einem Retentionszeitraum von ca. 2s-15s (vgl. Baumbach 2009; Abb.6; S.5). Für Analyten mit Retentionszeiten von ca. 2s-15s und Driftzeiten in den Größenordnungen der o. g. Reaktionen-Peaks könnte somit eine Detektion durch Koelution erschwert werden.

Im intensivmedizinischen Bereich könnten frühe und nicht-invasiv bestimmbare Marker das rasche Erkennen einer VAP ermöglichen, die Zeit bis zum Beginn einer adäquaten kalkulierten Antibiose verringern und sich somit positiv auf das Patientenoutcome, die Liegezeit auf Intensivstationen und die Behandlungskosten auswirken.

Die vorliegende Studie zeigte, dass die Detektion bakterieller Metabolite *in-vivo* am Kleintiermodell mittels MCC-IMS möglich ist. Hierdurch konnte eine VAP bei den Versuchstieren mittels MCC-IMS-Messungen der Atemluft erkannt werden.

Weiterhin konnten signifikante Unterschiede der VOC-Muster zwischen den Versuchstier-Gruppen aufgezeigt werden. Anhand dieser war nicht nur eine Identifizierung der Tiere der Kontrollgruppe möglich, sondern es konnte auch eine Differenzierung der Tiere mit einer *E.-coli*- von denen mit *P.-aeruginosa*-Pneumonie erfolgen.

Der technische Aufwand der Ionenmobilitätsspektrometrie ist vergleichsweise gering und die Befundumlaufzeiten kurz. Ein Einsatz als Point-of-Care Verfahren scheint daher möglich. Die Bestimmung weiterer erregerspezifischer VOC-Muster und die Erweiterung der entsprechenden Datenbanken ist eine notwendige Voraussetzung für den klinischen Einsatz dieser Technik.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob eine Identifizierung weiterer Pathogene möglich ist und die Ergebnisse auch am Menschen reproduzierbar sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die ventilatorassoziierte-Pneumonie (VAP) ist vor allem in der Intensivmedizin ein häufig anzutreffendes Krankheitsbild und gehört zu den häufigsten nosokomialen Infektionen im intensivmedizinischen Bereich. Für beatmete Patienten stellt die VAP eine ernste Komplikation dar, welche die Beatmungs- und Verweildauer auf Intensivstationen verlängert, somit ebenfalls die Behandlungskosten erhöht und mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist.

Das rasche Erkennen einer VAP und eine Verkürzung der Befundumlaufzeiten von etwa 48-96 Stunden bei der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik könnte eine frühzeitige und adäquate antibiotische Intervention ermöglichen. Der frühe Beginn einer adäquaten antibiotischen Therapie bei einer VAP hat positiven Einfluss auf das Outcome von Intensivpatienten, die Liegedauer und die Behandlungskosten. Ebenso könnte das Risiko der Resistenzentwicklung durch inadäquate antibiotische Therapien vermindert werden.

Innovative genomische Verfahren, wie z. B. multiplex-PCR, und proteomische Verfahren, wie z. B. MALDI-TOF-MS, konnten bisher die Zeitspanne bis zur Identifizierung des Erregers verkürzen. Einen weiteren und vergleichsweise neuen Ansatz für eine schnelle Erregerdiagnostik stellt die Messung volatiler organischer Verbindungen (VOC) mittels Ionenmobilitätsspektrometrie dar. Grundlage dieses metabolomischen Verfahrens ist der Umstand, dass Bakterien und Pilze spezifische volatile Metabolite an ihre Umwelt abgeben, anhand derer ihre Differenzierung bzw. Identifizierung möglich sein kann.

Verschiedene *in-vitro* Voruntersuchung zeigten erfolgreich, dass eine Differenzierung von Erregern anhand volatiler organischer Verbindungen mittels der Ionenmobilitätsspektrometrie in kurzer Zeit möglich ist. Ausgehend von diesen Studien untersucht vorliegende Studie die Anwendbarkeit der Multikapillarsäulen-gekoppelten Ionenmobilitätsspektrometrie (MCC-IMS) zur Atemgasanalyse bei einer VAP an einem *in-vivo* Säugetiermodell. Ziel hierbei ist das frühzeitige Erkennen einer VAP sowie die Differenzierung zwischen den zwei bedeutenden Erregern dieses Krankheitsbildes *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

Die Ionenmobilitätsspektrometrie ist ein analytisches Verfahren, das bisher v. a. in nicht-medizinischen Bereichen Anwendung findet. So etablierte es sich z. B. in der industriellen Prozesskontrolle für den Nachweis von Verunreinigungen, der umwelttechnischen Luftgütekontrolle oder für die Detektion chemischer Kampfstoffe. Die Ionenmobilitätsspektrometrie basiert auf der Bewegung ionisierter Analyten in einem Magnetfeld. Durch einen dieser Bewegung entgegengesetzten Driftgasfluss kommt es zur Auftrennung der Analytionen im Magnetfeld in Abhängigkeit von ihrer Mobilität. Die spezifische Ionenmobilität bzw. Driftzeit ermöglicht hierbei die Identifizierung, die gemessene Signalintensität die Quantifizierung einer Substanz. Zur Analyse komplexer

und feuchter Gasproben wie der Expirationsluft ist eine gaschromatographische Vortrennung der Probe notwendig. Hierfür erfolgte in vorliegendem Versuchsaufbau die Kopplung des Ionenmobilitätsspektrometers mit einer Multikapillarsäule. In dieser kommt es durch Retention zur Auftrennung verschiedener Substanzen in der zu untersuchenden Probe. Die sich aus dieser Vortrennung ergebende Retentionszeit erleichtert als weiterer Parameter die Identifizierung der Analyten.

In vorliegender Untersuchung erfolgten Messungen an insgesamt 33 Kaninchen. Diese wurden randomisiert in zwei Pneumonie-Gruppen (*E.-coli*-Gruppe und *P.-aeruginosa*-Gruppe) von jeweils 11 Versuchstieren und eine Kontrollgruppe von 11 Versuchstieren eingeteilt. Alle Tiere wurden narkotisiert, endotracheal intubiert und für insgesamt 10 Stunden maschinell beatmet.

Bei den Tieren der Pneumonie-Gruppen erfolgte nach zweistündiger Beatmung die Induktion einer Pneumonie mittels endobronchialer Installation von Keimlösungen mit *E. coli* bzw. *P. aeruginosa*. In der Kontrollgruppe erfolgte lediglich die Installation von sterilem LB-Flüssigmedium. Hiernach wurden alle Versuchstiere weitere acht Stunden beatmet. An insgesamt vier Messzeitpunkten erfolgte die Atemgasanalyse mittels MCC-IMS. Außerdem erfolgten zu allen Messzeitpunkten CT-Aufnahmen der Lungen, Blutgasanalysen und die Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut. Zum Abschluss eines jeden Versuchs erfolgte des Weiteren post-mortem die histopathologische Untersuchung des Lungenparenchyms und die mikroskopische Bestimmung des Entzündungsgrades anhand eines Pneumonie-Scores. Die korrelierenden Ergebnisse der Blutgasanalyse, Leukozytenzahlen, CT-Aufnahmen und der histopathologischen Untersuchung zeigten, dass mit der hier verwendeten Technik die Induktion einer ausgedehnten Pneumonie erfolgreich war, auf deren Grundlage die Messungen in den Pneumoniegruppen erfolgten.

Bei 13 der insgesamt 67 untersuchten Peak-Areale kam es zu relevanten Unterschieden der Signalintensitäten zwischen den Versuchsgruppen. Diese wurden daher als potentielle Diskriminatoren der einzelnen Versuchsgruppen erachtet und weitergehend untersucht. Die meisten Unterschiede der Signalintensitäten erwiesen sich als nicht signifikant. In den fünf Peak-Arealen *P_648_36*, *P_727_557*, *Indol*, *P_714_278* und *P_700_549* kam es zu signifikanten Signalveränderungen.

Im Ergebnis war eine Differenzierung der Pneumonie-Gruppen von der Kontrollgruppe anhand der Substanzen *P_714_278* und *P_727_557* möglich. Ebenfalls erwies sich eine Differenzierung der *E.-coli*-Pneumoniegruppe von der *P.-aeruginosa*-Pneumoniegruppe anhand der Substanzen *P_648_36*, *P_700_549* und *Indol* als möglich. Als bedeutender Diskriminator zwischen den beiden Pneumoniegruppen erwies sich die auch aus *in-vitro* Voruntersuchungen bekannte Substanz *Indol*, die eine frühzeitige Differenzierung zwischen den Pneumoniegruppen erlaubte.

Die kurze Dauer bis zum Vorliegen der Ergebnisse lässt den Einsatz der MCC-IMS als online-Verfahren möglich erscheinen. Der technische Aufwand der Ionenmobilitätsspektrometrie ist im Vergleich zu massenspektrometrischen Verfahren vergleichsweise gering. Allerdings bestehen

technische Limitationen, wie z. B. die zuverlässige Identifizierung der endexpiratorischen Phase, aber auch pathophysiologische Limitationen, die weitergehender Untersuchungen bedürfen.

Die Multikapillarsäulen-gekoppelte Ionenmobilitätsspektrometrie erwies sich als ein innovatives, nicht-invasives, zuverlässiges und schnelles Verfahren der Atemgasanalyse zur Identifizierung von zwei exemplarischen Pneumonie-Erregern. Ein zukünftiger Einsatz als ein bettseitig einsetzbares online-Analyseverfahren erscheint insgesamt, eine Weiterentwicklung und Verbesserung vorausgesetzt, als denkbar. Eine Verwendung als Diagnostikum im klinischen Alltag könnte die Zeit bis zum Beginn einer adäquaten kalkulierten antibiotischen Therapie bei VAP deutlich verringern und somit positiven Einfluss auf das Outcome von Intensivpatienten haben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Amavizca E, Bashan Y, Ryu C - M, Farag MA, Bebout BM, de-Bashan LE (2017): Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. *Scientific Reports* 7, 41310

Baumbach JI (2009): Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath. *J Breath Res* 3, 034001

Baumbach JI, Eiceman GA, Klockow D, Sielemann S, Irmer AV (1997): Exploration of a multi-capillary column for use in elevated speed gas chromatography. *Int J Environ Anal* 66, 225–239

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

Bödecker B, Vautz W, Baumbach JI (2008): Peak comparison in MCC/IMS-data—searching for potential biomarkers in human breath data. *Int J Ion Mobil Spec* 11, 89-93

Bödecker B, Vautz W, Baumbach JI (2008 a): Visualisation of MCC/IMS-data. *Int J Ion Mobil Spec* 11, 77-81

Bos LDJ, Sterk PJ, Schultz MJ (2013): Volatile metabolites of pathogens: A systematic review. *PLOS Pathogens* 9, e1003311

Botsford JL, Demoss RD (1972): *Escherichia coli* Tryptophanase in the enteric environment. *J Bacteriol* 109, 74–80

Bundesgesundheitsblatt 56 (2013): siehe Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO)

Carstens ETH: Quantifizierung von Propofol in der Atemluft mittels endtidaler Ionenmobilitätsspektrometrie. Med. Diss. Göttingen 2010

Charles PE, Piroth L, Desbiolles N, Lequeu C, Martin L, Portier H, Chavanet P (2002): New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits. *Crit Care Med* 10, 2278-83

Chastre J, Fagon J-Y (2002): Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 867–903

Chouinard CD, Wei MS, Beekman CR, Kemperman RHJ, Yost RA (2016): Ion mobility in clinical analysis: Current progress and future perspectives. *Clin Chem* 62, 124–133

Cohen MJ, Karasek FW (1970): Plasma ChromatographyTM – A new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 8, 330–337

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

Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, Deja M, Ewig S, Gastmeier P, Gatermann S, Gerlach H, Grabein B, Heußel CP, et al. (2018): [Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten mit nosokomialer Pneumonie – Update 2017- S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin e.V., der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie e.V., der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., der Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V., der Deutschen Röntgengesellschaft und der Gesellschaft für Virologie]. *Pneumologie* 72, 15–63

Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R (2006): Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 94, 821–829

Darwiche K, Baumbach JI, Sommerwerck U, Teschler H, Freitag L (2011): Bronchoscopically obtained volatile biomarkers in lung cancer. *Lung* 189, 445–452

Dullin C, Larsson E, Tromba G, Markus AM, Alves F (2015): Phase-contrast computed tomography for quantification of structural changes in lungs of asthma mouse models of different severity. *J Synchrotron Radiat* 22, 1106–1111

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

Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M (2004): Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* 186, 4596–4604

Fabregas N, Ewig S, Torres A, El-Ebiary M, Ramirez J, de la Bellacasa JP, Bauer T, Cabello H (1999): Clinical diagnosis of ventilator associated pneumonia revisited: comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies. *Thorax* 54, 867–873

Gastmeier P, Geffers C (2008): Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? Eine Schätzung für das Jahr 2006
Dtsch Med Wochenschr 133, 1111–1115

Hahn H, Kaufmann S, Schulz TF, Suerbaum S (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie und Infektio-
logie (Springer-Lehrbuch)*. 6. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2009

Hamilton-Kemp T, Newman M, Collins R, Elgaali H, Yu K, Archbold D (2005): Production of the long-chain alcohols octanol, decanol, and dodecanol by *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 51, 82–86

Hornuss C, Praun S, Villinger J, Dornauer A, Moehnle P, Dolch M, Weninger E, Chouker A, Feil C, Briegel J, et al. (2007): Real-time monitoring of propofol in expired air in humans undergoing total intravenous anesthesia. *Anesthesiology* 106, 665–674

Hüppe T, Lorenz D, Maurer F, Albrecht FW, Schnauber K, Wolf B, Sessler DI, Volk T, Fink T, Kreuer S (2016): Exhalation of volatile organic compounds during hemorrhagic shock and reperfusion in rats: an exploratory trial. *J Breath Res* 10, 016016

Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH (2002): Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 122, 262–268

Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD (1972): Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med* 77, 701–706

Jones RN (2010): Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis* 51 Suppl 1, S81-87

- 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 471–482
- Jünger M, Vautz W, 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
- Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O’Grady NP, Bartlett JG, Carratalà J, et al. (2016): Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 63, e61
- Kalscheuer R, Stölting T, Steinbüchel A (2006): Microdiesel: Escherichia coli engineered for fuel production. *Microbiology* 152, 2529–2536
- Karpas Z, Chaim W, Gdalevsky R, Tilman B, Lorber A (2002): Novel application for ion mobility spectrometry: diagnosing vaginal infections through measurement of biogenic amines. *Analytica Chimica Acta* 474, 115–123
- Kayser H, Böttger E, Haller O, Deplazes P, Roers A (Hrsg.): Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. 13. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2014
- King J, Mochalski P, Kupferthaler A, Unterkofler K, Koc H, Filipiak W, Teschl S, Hinterhuber H, Amann A (2010): Dynamic profiles of volatile organic compounds in exhaled breath as determined by a coupled PTR-MS/GC-MS study. *Physiol Meas* 31, 1169
- Kohlenberg A, Schwab F, Behnke M, Geffers C, Gastmeier P (2010): Pneumonia associated with invasive and noninvasive ventilation: an analysis of the German nosocomial infection surveillance system database. *Intensive Care Med* 36, 971-8
- Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ (1999): Inadequate antimicrobial treatment of infections: A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 115, 462-74
- KRINKO 2013: Prävention der nosokomialen beatmungsassoziierten Pneumonie. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsbl* 56, 1578–1590

Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar AS, Simon D et al. (2009): Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 136, 1237-48

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 T (2015a): 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

Kunze N, Weigel C, Vautz W, Schwerdtfeger K, Jünger M, Quintel M, Perl T (2015b): Multi-capillary column-ion mobility spectrometry (MCC-IMS) as a new method for the quantification of occupational exposure to sevoflurane in anaesthesia workplaces: an observational feasibility study. *J Occup Med Toxicol* 10

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

Lawal O, Ahmed WM, Nijssen TME, Goodacre R, Fowler SJ (2017): Exhaled breath analysis: a review of ‘breath-taking’ methods for off-line analysis. *Metabolomics* 13

Leitlinie nosokomiale Pneumonie: s. Dalhoff K et al. (2018)

Lorenz D, Maurer F, Trautner K, Fink T, Hüppe T, Sessler DI, Baumbach JI, Volk T, Kreuer S (2017): Adhesion of volatile propofol to breathing circuit tubing. *J Breath Res* 11, 036005

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

Meersseman W, Lagrou K, Spriet I, Maertens J, Verbeken E, Peetermans WE, Wijngaerden EV (2009): Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study. *Intensive Care Med* 35, 1526–1531

Mueller RS, Beyhan S, Saini SG, Yildiz FH, Bartlett DH (2009): Indole acts as an extracellular cue Regulating gene expression in *Vibrio Cholerae*. *JB* 191, 3504–3516

Muscledere JG, Day A, Heyland DK (2010): Mortality, attributable mortality, and clinical events as end points for clinical trials of ventilator-associated pneumonia and hospital-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 51, S120–S125

Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.): *Mikrobiologische Diagnostik*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009

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, 027001

Okuda N, Ninomiya K, Takao M, Katakura Y, Shioya S (2007): Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. *J Biosci Bioeng* 103, 350–357

Oort PM van, Povoia P, Schnabel R, Dark P, Artigas A, Bergmans DCJJ, Felton T, Coelho L, Schultz MJ, Fowler SJ, and LDB (2018): The potential role of exhaled breath analysis in the diagnostic process of pneumonia—a systematic review. *J Breath Res* 12, 024001

Perl T, Carstens E, Hirn A, Quintel M, Vautz W, Nolte J, Jünger M (2009): Determination of serum propofol concentrations by breath analysis using ion mobility spectrometry. *Br J Anaesth* 103, 822–827

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

Perl T, Jünger M, Vautz W, Nolte J, Kuhns M, Borg-von Zepelin M, Quintel M (2011): Detection of characteristic metabolites of *Aspergillus fumigatus* and *Candida* species using ion mobility spectrometry –metabolic profiling by volatile organic compounds. *Mycoses* 54, e828–e837

Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM (1991): Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic „blind“ bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 143, 1121–1129

Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, Kollef MH (2002): Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 122, 2115-2121

Restrepo MI, Anzueto A, Arroliga AC, Afessa B, Atkinson MJ, Ho NJ, Schinner R, Bracken RL, Kollef MH (2010): Economic burden of ventilator-associated pneumonia based on total resource utilization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31, 509–515

Reupke V, Walliser K, Perl T, Kimmina S, Schraepfer A, Quintel M, Kunze-Szikszay N (2017): Total intravenous anaesthesia using propofol and sufentanil allows controlled long-term ventilation in rabbits without neuromuscular blocking agents. *Lab Anim* 51, 284–291

Revercomb HE, Mason EA (1975): Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis. Review. *Anal Chem* 47, 970–983

Robacker DC, Lauzon CR, He X (2004): Volatiles production and attractiveness to the mexican fruit fly of enterobacter agglomerans isolated from apple maggot and mexican fruit flies. *J Chem Ecol* 30, 1329–1347

Rosseau S, Schütte H, Suttorp N (2013): Ventilatorassoziierte Pneumonie. *Internist* 54, 954–962

Safdar N, Dezfulian C, Collard HR, Saint S (2005): Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: A systematic review. *Crit Care Med* 33, 2184-93.

S-3 Leitlinie nosokomiale Pneumonie s. Dalhoff K et al. (2018)

Schubert JK, Miekisch W, Geiger K, Nöldge-Schomburg GFE (2004): Breath analysis in critically ill patients: potential and limitations. *Expert Rev Mol Diagn* 4, 619–629

Schulte am Esch J, Bause H, Kochs E, Scholz J, Standl T, Werner C: Duale Reihe Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie. 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011

Schulz S, Dickschat JS (2007): Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep.* 24, 814-42

Scott-Thomas AJ, Syhre M, Pattemore PK, Epton M, Laing R, Pearson J, Chambers ST (2010): 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm Med* 10, 56

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola BL, Fournier P-E, Rolain JM, Raoult D (2009): Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49, 543–551

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

Sommer K, Njau F, Wittkop U, Thalmann J, Bartling G, Wagner A, Klos A (2009): Identification of high- and low-virulent strains of *Chlamydia pneumoniae* by their characterization in a mouse pneumonia model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55, 206–214

Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010): Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 48, 3482–3486

Süßmuth R, Eberspächer J, Haag R, Springer W (1987): Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1987.

Takita A, Masui K, Kazama T (2007): On-line monitoring of end-tidal Propofol concentration in anesthetized patients. *Anesthesiology* 106, 659–664

Tiebe C: Detektion leicht flüchtiger organischer Verbindungen mikrobiellen Ursprungs (MVOC) mittels Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS). Diss. Rer. nat. TU Ilmenau (2010)

Usuba A, Handa H, Inoue T, Azagami S, Yamano Y, Mineshita M, Miyazawa T, Baumbach JI (2015): Breath analysis for relapsing polychondritis assessed by ion mobility spectrometry. *Int J Ion Mobil Spec* 18, 177–183

Valencia R, Stuermer EK, Dullin C, Herrmann KP, Kluever I, Zaroban A, Sehmisch S, Funke M, Knollmann F (2006): Erste Erfahrungen mit einem Flächendetektor-Volumen-CT (fpVCT) in der experimentellen Osteoporosediagnostik am Kleintiermodell. *Radiologe* 46, 893–900

van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010): High-throughput identification of bacteria and yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 48, 900–907

Vautz W, Baumbach JI, Westhoff M, Züchner K, Carstens ETH, Perl T (2010): Breath sampling control for medical application. *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 13, 41–46

Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE (2012): Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLOS ONE* 7, e32589

Warhurst G, Maddi S, Dunn G, Ghrew M, Chadwick P, Alexander P, Bentley A, Moore J, Sharman M, Carlson GL, et al. (2015): Diagnostic accuracy of SeptiFast multi-pathogen real-time PCR in the setting of suspected healthcare-associated bloodstream infection. *Intensive Care Med* 41, 86–93

Wilke M, Grube R (2013): Update on management options in the treatment of nosocomial and ventilator assisted pneumonia: review of actual guidelines and economic aspects of therapy. *Infect Drug Resist* 7, 1-7

Winer-Muram HT, Rubin SA, Ellis JV, Jennings SG, Arheart KL, Wunderink RG, Leeper KV, Meduri GU (1993): Pneumonia and ARDS in patients receiving mechanical ventilation: diagnostic accuracy of chest radiography. *Radiology* 188, 479–485

Zhu L-X, Zhang Z-W, Wang C, 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

Zilberberg MD, Shorr AF (2010): Ventilator-associated pneumonia: the *clinical pulmonary infection score* as a surrogate for diagnostics and outcome. Clin Infect Dis 51 Suppl 1, S131-135

Zoller HF, Clark WM (1921): The production of volatile fatty acids by bacteria of the dysentery group. J Gen Physiol 3, 325–330

DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit einer Dissertation und Mitarbeit in einem wissenschaftlichen Projekt danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Quintel sowie PD Dr. med. Thorsten Perl.

Tiefe Dankbarkeit möchte ich meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn PD Dr. med. Nils Kunze-Szikszay ausdrücken, der mir stets mit Rat und Tat beiseite stand, mich motivierte und bei der Anfertigung meiner Dissertationsschrift eine sehr große Unterstützung war.

Darüber hinaus danken möchte ich den weiteren MitarbeiterInnen des Projekts aus dem Zentrum für Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin der Universitätsmedizin Göttingen, Claudia Ottersbach, Dr. rer. nat. Christian Dullin, Dr. med. Karoline Walliser, Dr. med. vet. Verena Reupke, Barbara Cambiagli, Dr. med. Felix Brunner, die für mich stets ansprechbar waren und mich wo nötig beraten haben.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf steht in der elektronischen Fassung nicht zur Verfügung.