

Entwicklung einer nichtinvasiven Diagnostikmethode zum Nachweis von Infektionserregern

Isabel Steppert

Univ.-Diss.

**zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Bioanalytik"**

**durchgeführt am
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI, Leipzig**

und

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Biochemie und Biologie
der Universität Potsdam**

Ort und Tag der Disputation: Potsdam, 09.12.2022

Soweit nicht anders gekennzeichnet, ist dieses Werk unter einem Creative-Commons-Lizenzvertrag Namensnennung 4.0 lizenziert.
Dies gilt nicht für Zitate und Werke, die aufgrund einer anderen Erlaubnis genutzt werden.
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

Hauptbetreuer: Prof. Dr. Frank Bier
Gutachter: Prof. Dr. Matthias Noll
Prof. Dr. Philipp Weller

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-57544>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-575441>

Kurzzusammenfassung

Die aktuelle COVID-19-Pandemie zeigt deutlich, wie sich Infektionskrankheiten weltweit verbreiten können. Neben Viruserkrankungen breiten sich auch multiresistente bakterielle Erreger weltweit aus. Dementsprechend besteht ein hoher Bedarf, durch frühzeitige Erkennung Erkrankte zu finden und Infektionswege zu unterbrechen.

Herkömmliche kulturelle Verfahren benötigen minimalinvasive bzw. invasive Proben und dauern für Screeningmaßnahmen zu lange. Deshalb werden schnelle, nichtinvasive Verfahren benötigt.

Im klassischen Griechenland verließen sich die Ärzte unter anderem auf ihren Geruchssinn, um Infektionen und andere Krankheiten zu differenzieren. Diese charakteristischen Gerüche sind flüchtige organische Substanzen (VOC), die im Rahmen des Metabolismus eines Organismus entstehen. Tiere, die einen besseren Geruchssinn haben, werden trainiert, bestimmte Krankheitserreger am Geruch zu unterscheiden. Allerdings ist der Einsatz von Tieren im klinischen Alltag nicht praktikabel. Es bietet sich an, auf technischem Weg diese VOCs zu analysieren.

Ein technisches Verfahren, diese VOCs zu unterscheiden, ist die Ionenmobilitätsspektrometrie gekoppelt mit einer multikapillaren Gaschromatographiesäule (MCC-IMS). Hier zeigte sich, dass es sich bei dem Verfahren um eine schnelle, sensitive und verlässliche Methode handelt.

Es ist bekannt, dass verschiedene Bakterien aufgrund des Metabolismus unterschiedliche VOCs und damit eigene spezifische Gerüche produzieren. Im ersten Schritt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Bakterien *in-vitro* nach einer kurzen Inkubationszeitzeit von 90 Minuten anhand der VOCs differenziert werden können. Hier konnte analog zur Diagnose in biochemischen Testreihen eine hierarchische Klassifikation der Bakterien erfolgen.

Im Gegensatz zu Bakterien haben Viren keinen eigenen Stoffwechsel. Ob virusinfizierte Zellen andere VOCs als nicht-infizierte Zellen freisetzen, wurde an Zellkulturen überprüft. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Fingerprints der VOCs in Zellkulturen infizierter Zellen mit Respiratorischen Synzytial-Viren (RSV) von nicht-infizierten Zellen unterscheiden.

Virusinfektionen im intakten Organismus unterscheiden sich von den Zellkulturen dadurch, dass hier neben Veränderungen im Zellstoffwechsel auch durch Abwehrmechanismen VOCs freigesetzt werden können.

Zur Überprüfung, inwiefern sich Infektionen im intakten Organismus ebenfalls anhand VOCs unterscheiden lassen, wurde bei Patienten mit und ohne Nachweis einer Influenza A Infektion als auch bei Patienten mit Verdacht auf SARS-CoV-2 (Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2) Infektion die Atemluft untersucht. Sowohl Influenza-infizierte als auch SARS-CoV-2 infizierte Patienten konnten untereinander und von nicht-infizierten Patienten mittels MCC-IMS Analyse der Atemluft unterschieden werden.

Zusammenfassend erbringt die MCC-IMS ermutigende Resultate in der schnellen nichtinvasiven Erkennung von Infektionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Abstract

The current COVID-19 pandemic demonstrates the worldwide spread of infectious diseases. Besides virus infections there is also a worldwide dissemination of multiresistant bacterial strains. Therefore, there is an urgent need for rapid non-invasive screening methods. There is an unmet need to cut infection chains by early detection of infected subjects.

Conventional cultural methods require minimally invasive or invasive samples and are not feasible for mass screening due to a long analysis time.

In classical Greece, physicians also used their olfactory senses to differentiate infections from other diseases. These characteristic odors are volatile organic compounds (VOC) produced by the metabolism of an organism. Animals with a much better olfactory sense have been trained to detect different germs by their odors. However, the use of sniffing animals is not practicable in clinical settings. A technical detection of VOCs is therefore desirable.

One technical approach for the differentiation of VOCs is ion mobility spectrometry coupled with a multicapillary gas chromatography (MCC-IMS). It could be shown that this method is a rapid, sensitive, and reliable method.

It is known that various bacteria produce VOCs by their metabolism and therefore different specific smells. By the MCC-IMS method, different bacterial species could be distinguished based on the VOCs after an incubation time as short as 90 minutes *in vitro*. Comparable to biochemical series of tests a decision tree for the classification of bacteria could be implemented. In contrast to bacteria viruses have no own metabolism and thus are dependent on the host metabolism. Cell cultures were used to determine whether virus-infected cells release other VOCs than non-infected cells. It could be shown here that cell cultures infected with respiratory syncytial virus (RSV) differ from non-infected cell cultures in VOC profiles.

Unlike in cell cultures, in the intact organism changes in VOC profiles are not only dependent on cell metabolism alterations but also in defense mechanisms.

To investigate infection induced VOC changes in intact organisms, nasal breath of patients with and without influenza A infection as well as of patients with suspected SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2) infection were analyzed. It was proven that a breath analysis using a MCC-IMS is able to distinguish infected patients from non-infected as well as SARS-CoV-2 from influenza A infections.

In summary, MCC-IMS delivers encouraging results in the rapid, non-invasive detection of infections *in vitro* as well as *in vivo*.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Motivation und Problemstellung	1
1.2 Stand der mikrobiologischen Diagnostik	2
1.2.1 Probennahme	2
1.2.2 Bakteriendiagnostik	3
1.2.3 Virusdiagnostik	4
1.3 Geruch – Ein diagnostisches Potential.....	5
1.3.1 Volatile organische Substanzen (VOCs) als Biomarker.....	5
1.3.2 Diagnostik durch VOC-Analyse.....	7
1.3.3 Stand der Infektionsforschung mit der IMS und Forschungsbedarf	10
1.4 Zielstellung und Aufbau der Arbeit	12
2 Theoretische Grundlagen	14
2.1 Ionenmobilitätsspektrometrie	14
2.1.1 Aufbau und Prinzip eines Ionenmobilitätsspektrometers	14
2.1.2 Ionenmobilität	15
2.1.3 Ionisationsprinzip	15
2.1.4 Kopplung mit Gaschromatographie zur Vortrennung	17
2.2 Datenanalyse von GC-IMS-Daten.....	19
2.2.1 Targeted vs. Non-Targeted Datenanalyse	19
2.2.2 Datenvorverarbeitung und Peakselektion	20
2.2.3 Statistische Analyse.....	21
3 Materialien und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 IMS-Versuche.....	25
3.1.2 Mikrobiologische und zellkulturtechnische Arbeiten	25
3.2 MCC-IMS der Firma STEP	27

3.2.1	Funktionsprinzip	27
3.2.2	Geräteeinstellung für die Versuche.....	29
3.3	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Bakterienkulturen.....	30
3.3.1	Bakterienstämme	30
3.3.2	Nährmedien und Kultivierung	31
3.3.3	Probenvorbereitung und IMS-Analyse der Bakterienkulturen.....	31
3.3.4	Studiendesign	33
3.4	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Virus-infizierten Zellkulturen.....	35
3.4.1	MCC-IMS-Analyse von Zellkulturen ohne RSV-Infektion	35
3.4.2	MCC-IMS-Analyse von Zellkulturen mit RSV-Infektion	38
3.5	<i>In-vivo</i> Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen	39
3.5.1	Patienten.....	39
3.5.2	Virusnachweis mit PCR.....	40
3.5.3	Atemluftanalyse mit der MCC-IMS.....	40
3.6	Datenauswertung	41
3.7	Verarbeitung der IMS-Daten.....	41
3.7.1	Struktur der MCC-IMS-Daten	41
3.7.2	Auswertung der MCC-IMS-Daten	42
3.8	Statistische Analyse	44
3.8.1	Prinzip der Diskriminanzanalyse und ROC-Analyse	46
3.8.2	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Bakterienkulturen.....	47
3.8.3	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Zellkulturen mit und ohne RS-Viren	49
3.8.4	<i>In-vivo</i> Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Bakterienkulturen.....	51
4.1.1	Einfluss der Inkubationsdauer	51
4.1.2	Bakterien in verschiedenen Nährmedien	52
4.1.3	Differenzierung zwischen nicht-resistenten und resistenten Bakterien.....	58
4.1.4	Mischkulturen	61
4.1.5	Einfluss verschiedener Bakterienkonzentrationen	63
4.1.6	Verschiedene Stämme einer Bakterienspezies.....	64
4.2	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Zellkulturen mit und ohne RS-Viren	65
4.2.1	Vergleich der Probennahme-Strategien.....	65
4.2.2	Einfluss verschiedener Konzentrationen der HEp-2-Zellen.....	67
4.2.3	Einfluss einer RS-Virusinfektion auf HEp-2-Zellen.....	68
4.3	<i>In-vivo</i> Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen	75
5	Diskussion.....	77

5.1	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Bakterienkulturen	77
5.1.1	Inkubationsdauer	77
5.1.2	Nährmedien	79
5.1.3	VOC-Marker zur Bakteriendifferenzierung	81
5.1.4	Mischkultur	85
5.1.5	Bakterienkonzentration	85
5.1.6	Verschiedene Stämme einer Bakterienspezies	86
5.1.7	<i>In-vitro in-vivo</i> Translation.....	87
5.2	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Zellkulturen mit und ohne RS-Viren.....	88
5.2.1	Probennahme	88
5.2.2	RSV-Kulturen.....	90
5.3	<i>In-vivo</i> Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen.....	94
6	Ausblick	99
	Literaturverzeichnis	XV
	Danksagung.....	XXXIII
	Eidesstattliche Erklärung	XXXV
	Publikationsliste.....	XXXVII
	Anhang.....	XXXIX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Hauptunterschiede zwischen kapillarer Säule und Multikapillarsäule (MCC) für GC-IMS [106, 107, 133]	18
Tabelle 2	Verwendete Referenzstämme für die VOC-Analyse	30
Tabelle 3	Studien zur Untersuchung der methodologischen und biologischen Faktoren auf VOCs im Headspace der Bakterienkulturen	33
Tabelle 4	Details zu den Studien zur Headspace-Analyse der Bakterienkulturen	34
Tabelle 5	Zusammensetzung der Komplexnährmedien: Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Mueller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB).....	34
Tabelle 6	Virusstamm und Zelllinie	35
Tabelle 7	Methodologische Aspekte der Versuche für die Headspace-Analysen von Zellkulturen ohne Virusinfektion	38
Tabelle 8	Verwendete Parametereinstellungen für die Clusteranalyse mittels AirInterpreterGUI.....	43
Tabelle 9	Verwendete Datenanalysestrategien und statistische Methoden für <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i> Untersuchungen.....	45
Tabelle 10	Medienunabhängige signifikante VOC-Cluster freigesetzt von Bakterien. n = 11.....	55
Tabelle 11	Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse mit 12 medienunabhängigen VOC-Cluster freigesetzt von Bakterien, n = 11.	55
Tabelle 12	Zusammenfassung der Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse zur Unterscheidung der Bakterien in jedem der drei Nährmedien: BHIB, MHB und TSB. n = 11.....	56
Tabelle 13	Präzision der drei medienunabhängigen Cluster in Signalintensität [V] für <i>K. pneumoniae</i> verglichen mit Kontrolle	57
Tabelle 14	Präzision des RIP bezogen auf Driftzeit [ms] und Signalintensität [V].....	58
Tabelle 15	Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) sowie Bestimmtheitsmaß für <i>K. pneumoniae</i> spezifische VOC-Cluster. n = 3.....	64
Tabelle 16	Emittierte VOC-Cluster von zwei <i>E. coli</i> -Stämmen – Unterscheidung gegenüber der Kontrolle (Ctrl.) und innerhalb der <i>E. coli</i> -Stämme. Ctrl.: n = 21, DSM 1103: n = 10, DSM 1576: n = 11.....	65
Tabelle 17	Cluster für HEp-2-Zellen mit Retentionszeit (t_r) und relativer Driftzeit (rel. t_d)	67

Tabelle 18	Ergebnisse der ROC-Analyse (AUC > 0,8) zur Selektion von VOC-Cluster zur Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten Kulturen. n = 3. . 70	
Tabelle 19	Differenzierung der RSV-infizierten Kulturen gegenüber nicht-infizierten Kulturen: Angabe der p-Werte im Mann-Whitney-U-Test, hervorgehobene p-Werte ≤ 0,05 weisen signifikante Unterschiede aus. n = 10. 74	
Tabelle 20	Ergebnisse der Validierung anhand der mittels Kennard-Stone Algorithmus gesplitteten Daten zur Unterscheidung der drei Gruppen: Nicht-infizierte, Influenza-A- und SARS-CoV-2-infizierte Patienten 76	
Tabelle 21	Spezifikation des verwendeten MCC-IMS.....XL	
Tabelle 22	Liste der 66 VOC-Peaks emittiert von <i>E. coli</i> DSM 1576, <i>S. aureus</i> DSM 346, <i>P. aeruginosa</i> DSM 1117 zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation ..XLI	
Tabelle 23	Liste der 60 VOC-Peaks emittiert von Nährmedien (Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Müller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB))..... XLIII	
Tabelle 24	Zusammenfassung der 77 detektierten VOC-Peaks im Headspace der Bakterienkulturen in drei verschiedenen Nährmedien (Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Mueller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB)) XLIV	
Tabelle 25	Liste der 63 VOC-Peaks emittiert von verschiedenen Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme XLIX	
Tabelle 26	Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse mit sieben VOC-Cluster selektiert durch ROC-Analyse zur Unterscheidung der Bakterien einschließlich resistenter Stämme LIII	
Tabelle 27	Die drei diskriminatorischen VOC-Cluster mit den höchsten AUC-Werten für die jeweilige Bakterienspezies als Variablen für die targeted Datenanalyse LIV	
Tabelle 28	Lebendzellzahlbestimmung für die OD ₆₀₀ von 0,1. Referenzstamm: <i>E. coli</i> DSM 1103, Nährmedium: Tryptic Soy Broth. LVII	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Aufbau eines Ionenmobilitätsspektrometers.....	14
Abbildung 2	Schematische Darstellung eines GC-IMS-Spektrums. Modifiziert nach [139]	19
Abbildung 3	Schritte der Datenanalyse von IMS-Chromatogrammen.....	20
Abbildung 4	Schematische Funktion des verwendeten MCC-IMS-Gerätes, modifiziert nach [161].....	28
Abbildung 5	Probennahme einer Headspace-Probe mit der MCC-IMS.....	32
Abbildung 6	Direkte Probennahme in einer Zellkulturflasche mit der MCC-IMS.....	37
Abbildung 7	Darstellung eines IMS-Spektrums ausgegeben vom IMS-Gerät [172].....	41
Abbildung 8	Einfluss der Inkubationsdauer auf emittierte VOCs der drei Bakterienspezies: <i>E. coli</i> (EC), <i>S. aureus</i> (SA) und <i>P. aeruginosa</i> (PA), n = 3. (A) Anzahl der von Bakterien emittierten VOCs abhängig der Inkubationsdauer. (B-D) Boxplots von drei exemplarischen Inkubationszeit-unabhängigen VOC- Cluster für die jeweilige Bakterienspezies.	52
Abbildung 9	Analyse der 60 VOC-Cluster in drei verschiedenen Nährmedien: BHIB, MHB und TSB, n = 11. (A) Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse. (B) Prozentuale Verteilung der gemeinsamen VOCs in drei Nährmedien als Kreisdiagramm.....	53
Abbildung 10	Anzahl der von Bakterien emittierten VOC-Cluster in drei Nährmedien. n = 11.....	54
Abbildung 11	Boxplots der vier exemplarischen VOC-Cluster, die nur im Headspace der <i>E. coli</i> -, <i>K. pneumoniae</i> - und ESBL produzierenden <i>K. pneumoniae</i> -Kulturen präsent waren. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.....	59
Abbildung 12	Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse mit 63 VOC-Cluster zur Differenzierung zwischen den resistenten und nicht-resistenten sowie innerhalb der nicht-resistenten Bakterienstämme. A: 3D-Plot, B: Klassifizierungstabelle. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.....	60
Abbildung 13	Klassifizierungsbaum mit sieben VOC-Clustern mit Cut-off-Werten der Signalintensität in V als Entscheidungspunkte zur Differenzierung verschiedener Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme. Nicht- resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.....	61

Abbildung 14 Spektrenverläufe – Einfluss der Mischkulturen auf charakteristische VOC-Cluster für <i>S. aureus</i> . Kontrolle (Ctrl.) und Reinkulturen (SA und KP): n = 11, Mischkulturen: n = 10.	62
Abbildung 15 Spektrenverläufe – Einfluss der Mischkulturen auf charakteristische VOC-Cluster für <i>K. pneumoniae</i> . Kontrolle (Ctrl.) und Reinkulturen (SA und KP): n = 11, Mischkulturen: n = 10.	62
Abbildung 16 Regressionskurven – Einfluss der Mischkulturen auf charakteristische VOC-Cluster für <i>S. aureus</i> und <i>K. pneumoniae</i> . Reinkulturen (SA und KP): n = 11, Mischkulturen: n = 10.	63
Abbildung 17 Einfluss verschiedener Bakterienkonzentrationen auf <i>K. pneumoniae</i> spezifische VOC-Cluster. n = 3.....	63
Abbildung 18 Heatmaps der <i>E. coli</i> -Reinkulturen (gemittelte Differenzspektren nach Subtraktion des gemittelten Werts der Kontrollprobe). DSM 1103: n = 10, DSM 1576: n = 11.	64
Abbildung 19 Gemittelte IMS-Chromatogramme für die zwei Strategien „Zellkultur“ und „Überstand“ zur Probennahme von VOCs. Überstand: n = 6, Zellkultur: n = 8.	66
Abbildung 20 Gemittelte IMS-Spektren bei $t_r = 15$ s mit Unterschieden zwischen HEp-2-Zellen (HEp-2) und dem Kulturmedium (Ctrl.) in den Signalintensitäten für vier Peaks (c_3, c_4, c_5 und c_6).	67
Abbildung 21 Zusammenhang zwischen Zellkonzentration und Signalintensität für vier HEp-2 zellspezifische Peaks in Form von Spektrenverläufen und Regressionen	68
Abbildung 22 Einfluss der Viruskonzentration (MOI = 0, MOI = 0,05 und MOI = 0,1) auf HEp-2 zellspezifische VOC-Peaks nach zwei Inkubationszeiten (48 h und 70 h). n = 3.	69
Abbildung 23 Einfluss der Inkubationszeit (48 h und 70 h) auf HEp-2 zellspezifische VOC-Peaks ohne und mit RSV-Infektion mit zwei Viruskonzentrationen (MOI = 0,05 und MOI = 0,1). n = 3.....	69
Abbildung 24 Einfluss der Viruskonzentration (MOI = 0, MOI = 0,05 und MOI = 0,1) auf emittierte VOCs der HEp-2-Zellen nach zwei Inkubationszeiten (48 h und 70 h). n = 3.....	70
Abbildung 25 Einfluss der Inkubationszeit (48 h und 70 h) auf emittierte VOCs der HEp-2-Zellen ohne und mit RSV-Infektion mit zwei Viruskonzentrationen (MOI = 0,05 und MOI = 0,1). n = 3.....	71

Abbildung 26 Mikroskopie (Phasenkontrast, 10x Vergrößerung) der nicht-infizierten und RSV-infizierten HEp-2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion	72
Abbildung 27 Signalintensitätsänderungen der vier HEp-2 zellspezifischen Peaks im Headspace der nicht-infizierten und RSV-infizierten Kulturen im zeitlichen Verlauf. n = 10.....	73
Abbildung 28 Unterschiede zwischen nicht- und RSV-infizierten Zellen in der Signalintensität für den Cluster c_10 (97_2,12). n = 10.....	74
Abbildung 29 Ergebnisse der Diskriminanzanalyse mit 32 Clustern zur Unterscheidung der drei Gruppen: Nicht-infizierte, Influenza-A- und SARS-CoV-2-infizierte Patienten. Links: Streudiagramm, rechts: Klassifizierungstabelle.	76
Abbildung 30 Position der von Bakterien emittierten signifikanten VOC-Cluster in jedem der drei Nährmedien (Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Müller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB)) in Abhängigkeit der Retentionszeit und der relativen Driftzeit	XLVI
Abbildung 31 Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse für die Differenzierung verschiedener Bakterien in dem jeweiligen Nährmedium: Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Müller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB) .	XLVII
Abbildung 32 MCC-IMS-Heatmaps der Kulturen verschiedener Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme (gemittelte Differenzspektren nach Subtraktion des gemittelten Spektrums des Nährmediums (Kontrolle)). Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.....	XLVIII
Abbildung 33 2D-Plot mit Position der 63 selektierten VOC-Peaks im IMS-Chromatogramm	LI
Abbildung 34 Boxplots der sieben VOC-Peaks, die eine Klassifizierung der verschiedenen Bakterienspezies einschließlich resistenter Bakterienspezies unter Verwendung des Klassifizierungsbaums erlauben. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.....	LII
Abbildung 35 Zusammenhang zwischen Zellzahl und Signalintensität für vier HEp-2 zellspezifische VOC-Peaks (Cluster) in Form von Boxplots. n = 3.....	LV
Abbildung 36 Position der selektierten 32 Cluster im IMS-Chromatogramm. td (RIP) = 2,5 ms.....	LVI
Abbildung 37 MCC-IMS-Messungen der leeren Zellkulturflaschen und Umgebungsluft	LVIII

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Acinetobacter</i>
AB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
Ctrl.	Kontrolle
DA	Diskriminanzanalyse
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMS	Differentielle Ionenmobilitätsspektrometrie
E.	<i>Escherichia</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum-Betalaktamase
FAIMS	Feldasymmetrische Ionenmobilitätsspektrometrie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-Säule	Gaschromatographiesäule
h. i. FBS	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
HS-Vial	Headspace-Vial
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
K.	<i>Klebsiella</i>
KP	<i>K. pneumoniae</i>
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
LOO-CV	Leave-One-Out-Kreuzvalidierung
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation Flugzeit-Massenspektrometrie
MCC-IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie gekoppelt mit einer Multikapillarsäule
MHB	Mueller Hinton Broth
MOI	Multiplizität der Infektion
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P.	<i>Pseudomonas</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal component analysis)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
ppt	parts per trillion (ppt = 10 ⁻¹²)

qPCR	Echtzeit-PCR
rel. td	relative Driftzeit
RIP	Reaktionsionenpeak
ROC	Receiver-Operating-Characteristic
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
S.	<i>Staphylococcus</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2
SESI-MS	Sekundäre Elektronensprayionisation Massenspektrometrie
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl. solid phase microextraction)
td	Driftzeit
tr	Retentionszeit
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
VOC	flüchtige organische Substanzen (engl.: volatile organic compounds)

1 Einleitung

1.1 Motivation und Problemstellung

Infektionserreger stellen nicht nur eine klinische, sondern auch eine globale Herausforderung dar. Besonders der Flugverkehr ermöglicht ein schnelles weltweites Reisen nicht nur für Passagiere, sondern auch für Infektionserreger [1]. Dies hat zu einem weltweiten Ausbruch der SARS-Pandemie 2002/2003, der Influenzapandemie A (H1N1) 2009, bekannt als Schweinegrippe, sowie der aktuellen COVID-19 Pandemie geführt [2, 3]. Neben Viren können sich auch multiresistente Bakterien von einem Land zum anderen ausbreiten [4] und damit eine globale Bedrohung in der post-antibiotischen Ära verkörpern.

In den Niederlanden werden Patienten bei der Aufnahme in die Klinik gemäß der Krankenhauspolitik auf Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) untersucht und bis zum Vorliegen eines negativen Tests isoliert. Diese Maßnahmen haben zu einer vergleichsweise niedrigen MRSA-Prävalenz in den Niederlanden beigetragen [5]. Dies zeigt, dass eine frühzeitige Erkennung infizierter Personen in der Unterbrechung von Infektionsketten essenziell ist.

Außerhalb der klinischen Umgebung wurden im Rahmen der SARS-Pandemie 2002/2003 Fragebögen sowie Fiebertemperaturen als Screeningmethoden am Flughafen implementiert. Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität sind diese ineffektiv und ermöglichen keinen spezifischen Nachweis von Infektionserregern [6, 7].

Derzeit werden pathogene Erreger in einem mikrobiologischen Labor mit kulturellen, molekularen und/oder immunologischen Verfahren nachgewiesen [8, 9]. Dies kann Stunden bis Tage dauern. Für eine Vor-Ort-Infektionskontrolle sind diese diagnostischen Methoden zu laborintensiv, teilweise zeitraubend und kostspielig und benötigen den Personaleinsatz mit Fachexpertise. Obendrein ist eine gezielte Probennahme für ein valides Diagnostikergebnis vorauszusetzen [10], die für eine Vor-Ort- Analyse entweder zu invasiv (z. B. Blutabnahme) oder zu umständlich und unangenehm (z. B. Urin, Stuhl) ist.

Die aktuelle COVID-19-Pandemie zeigt die Notwendigkeit eines schnellen, nichtinvasiven Vor-Ort-Screenings [11]. Antigenschnelltests, basierend auf dem Lateral-Flow-Prinzip, gelten aufgrund der einfachen und kostengünstigen Durchführung als weitverbreitete Alternative zu teuren, laborintensiven PCR-Verfahren [12, 13]. Einerseits ermöglichen diese eine

schnelle Vor-Ort-Diagnostik in 15 bis zu 30 Minuten. Andererseits sind die Antigenschnelltests in der Gesamtsensitivität niedriger und sind bei niedriger Viruslast weniger zuverlässig als PCR-Verfahren [14]. Außerdem setzt die Mehrheit dieser Tests einen Abstrich aus dem Nasopharynx voraus, der von Menschen oft als unangenehm empfunden wird.

Der Fokus dieser Arbeit ist die Entwicklung einer preiswerten, benutzerfreundlichen nicht-invasiven Diagnostikmethode, die Ergebnisse zeitnah innerhalb weniger Minuten liefert und für eine Vor-Ort-Analyse ohne Laborinfrastruktur tauglich ist.

Als vielversprechender Ansatz für eine nichtinvasive Diagnostik gilt die Analyse von flüchtigen organischen Substanzen (volatile organic compounds, VOCs) als Biomarker [15]. Als Analysemethode wurde die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) für die Untersuchung von VOCs herangezogen. Die IMS ist in der Analyse mit der Massenspektrometrie verwandt. Durch den Entfall eines Hochvakuums ist ein IMS-Gerät sehr kompakt und somit ideal für eine Vor-Ort-Analyse.

Dementsprechend widmet sich diese Dissertation der Anwendung der Ionenmobilitätsspektrometrie zum Nachweis von VOCs als Biomarker für bakterielle und virale Infektionserreger.

1.2 Stand der mikrobiologischen Diagnostik

Heutzutage gibt es eine Vielzahl an Methoden zur eindeutigen Speziesidentifikation der bakteriellen und viralen Erreger. Diese erstrecken sich von Kulturverfahren bis hin zu modernen immunologischen und molekularbiologischen Ansätzen. In der Routine wird die mikrobiologische Methode abhängig der Indikation eingesetzt [10].

1.2.1 Probennahme

Für aussagekräftige Befunde ist eine adäquate Probennahme aus Infektionsstellen entscheidend. Abhängig vom Infektionsort können Proben aus dem Körper auf unterschiedliche Weise entweder invasiv oder nichtinvasiv entnommen werden. Ein Großteil der Probennahmetechniken (z. B. Blutentnahme, Biopsie und Punktion) gehen mit einer invasiven Prozedur einher. Nichtinvasiv können unter anderem Urin, Stuhl, Sputum und Abstriche (z. B. aus Nasen-Rachenraum, Wunde) auf Infektionen getestet werden. Limitierend ist, dass die Probennahme meist unter medizinischer Aufsicht oder durch medizinisches Personal durchgeführt werden muss. Als wenig invasive Probennahme sind Abstriche beliebt, aber erzielen häufig nicht repräsentatives Probematerial für eine genaue mikrobiologische Untersuchung [16]. Die gewonnenen Probenmaterialien werden anschließend in das

mikrobiologische Labor für die Analyse transportiert oder gelagert. Eine falsche Entnahme, Lagerung oder ein falscher Transport der Proben können Analyseergebnisse verfälschen. [10]

1.2.2 Bakteriendiagnostik

Kulturverfahren gehören zu den ältesten und zu den am häufigsten angewandten Methoden zur Identifizierung von Bakterien. In diesem Prozess werden Bakterien aus klinischen Proben in Kulturen kombiniert mit biochemischen Testreihen über Stoffwechselaktivitäten phänotypisch nachgewiesen [8, 17]. Bis zum Vorliegen einer Diagnose benötigt dieses Verfahren abhängig des Wachstums der jeweiligen Bakterienspezies einige Tage oder sogar mehrere Wochen und ist somit zeitaufwendig [18].

In modernen klinischen Laboren wurde die kulturelle, biochemische Bakterienidentifikation von Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) abgelöst [19]. Hierbei werden Bakterien basierend auf ribosomalen Proteinen durch Vergleich spezifischer Peptid-Massen-Spektren als Fingerabdruck mit einer Datenbank in wenigen Minuten mit hohem Durchsatz (ca. 100 Stämme pro Tag) nachgewiesen [8]. Nachteilig an diesem Verfahren ist die Notwendigkeit von Vorkulturen, sodass ein Diagnoseergebnis frühestens nach einem Tag vorliegt [8]. In Bezug auf die Resistenzbestimmung ist das System für die Routine bisher nicht praktikabel [20–22].

In wenigen Stunden können Bakterien basierend auf spezifischen DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Technologien direkt aus Patientenproben identifiziert werden [8]. Da PCR-Verfahren keine Kultivierung voraussetzen, kommt dieser Ansatz insbesondere für nicht-kultivierbare sowie langsam-wachsende Mikroorganismen in Frage [8, 19]. Aus ökonomischen Gründen wird die PCR begrenzt in der Routine eingesetzt [10]. Trotz der hohen Kosten ist die PCR gegenwärtig die schnellste und sensitivste Methode, die ein Diagnoseergebnis innerhalb von zwei Stunden liefern kann [23]. Wie alle molekularbiologischen Verfahren detektiert die PCR nur die Anwesenheit bestimmter Gene bzw. Mutationen, die nicht mit der phänotypischen Erscheinung in Beziehung stehen müssen [24, 25]. Deshalb werden die Kulturen für die Resistenzbestimmung bevorzugt, da die reale Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Antibiotika gemessen werden kann [25].

1.2.3 Virusdiagnostik

Die Anzucht der Viren auf Zellkulturen mit nachfolgender immunchemischer Identifikation, auch Virusisolierung genannt, wird heutzutage in spezialisierten Labor- und Forschungseinrichtungen durchgeführt [26]. Angesichts der aufwendigen und zeitintensiven Durchführung ist dieses Verfahren für eine Routinediagnostik nicht geeignet [27, 28].

Anders als bei Bakterien hat sich die PCR-Technologie als sensitives Standardroutineverfahren in der Virusdiagnostik etabliert [26, 29, 30]. Gegenüber der konventionellen PCR wird die Echtzeit-PCR (qPCR) durch Wegfall der Gelelektrophorese bevorzugt in der Routinediagnostik eingesetzt [31, 32]. Für den Nachweis von RNA, insbesondere bei respiratorischen Viren, kann qPCR mit reverser Transkriptase zur Umwandlung von RNA in cDNA kombiniert werden [9]. Eine gleichzeitige Detektion von zwei oder mehr Spezies kann durch Multiplex qPCR unter Verwendung verschiedener Primer in einer Analyse realisiert werden [9, 29, 33]. Einerseits liefert qPCR schnelle Ergebnisse in wenigen Stunden bis innerhalb eines Tages, andererseits ist diese Methode mit zeitaufwendiger Probenvorbereitung und Personalaufwand behaftet [28, 34–36]. Um eine Hochdurchsatzkapazität mit geringem Personalaufwand zu betreiben, wurden qPCR in einem vollautomatisierten Stil und mit einer Probenvorbereitung in einem Gerät weiterentwickelt. Je nach Plattform ermöglicht diese automatisierte Version eine Point-of-Care-Diagnostik in weniger als 90 Minuten [36, 37]. Für die Durchführung von PCR-Tests werden spezielle Geräte sowie Kits vorausgesetzt, die aufgrund der hohen Kosten für eine Durchführung im großen Stil, z. B. in einer Pandemie, für den breiten Einsatz ungeeignet sind [9, 28, 35].

Immunologisch können Viren, aber auch Bakterien, basierend auf Erregerantigenen direkt in klinischem Material identifiziert werden. Die Antigentestverfahren reichen von klassischen labor- und zeitintensiven Enzymimmunoassays (ELISA) bis hin zu kommerziellen immunographischen Schnelltests (Antigenschnelltests) [9, 35]. Das letztere Verfahren ermöglicht eine schnelle, unkomplizierte patientennahe Diagnostik von direkten Abstrichen von Körperproben innerhalb von 15 Minuten [30]. Hierbei werden die Erregerantigene durch Bindung mit spezifischen, konjugierten Antikörpern auf Teststreifen qualitativ nachgewiesen, die bei einer positiven Reaktion zu farbigen Banden führt [28, 38]. Eine Durchführung dieses Tests kann bequem außerhalb der Laborumgebung ohne methodische Kenntnisse erfolgen, weshalb Antigenschnelltests für eine hohe Testkapazität in Ausbruchssituationen geeignet sind [28, 30, 38]. Auf der anderen Seite wird damit das Pathogen nur mit einer geringeren Sensitivität im Vergleich zu PCR nachgewiesen [39–41].

Unter diesem Gesichtspunkt besteht ein hoher Bedarf an kostengünstigen, benutzerfreundliche Vor-Ort-Tests, die eine schnelle Identifikation einer breiten Palette von Infektionserregern ohne Probenvorbereitung erlauben. Für ein Vor-Ort-Screening soll die Probennahme idealerweise nichtinvasiv und benutzerfreundlich erfolgen. Urin-, Stuhl- und Sputumproben entfallen, da diese für die Analyse eine Laborumgebung erfordern und unangenehm empfunden werden können.

1.3 Geruch – Ein diagnostisches Potential

Bereits seit der hippokratischen Ära ist bekannt, dass verschiedene Erkrankungen durch die menschliche Nase wahrnehmbar sind [15]. Süßliche Atemluft verursacht durch Aceton gilt als eines der klassischen Symptome für eine Diabetes-Erkrankung, während fischige Gerüche mit Lebererkrankungen assoziiert sind [15, 42]. Erfahrene Kliniker sind in der Lage, bestimmte Infektionserreger durch Gerüche bzw. Schnüffeln von Kulturen zu erkennen. So riecht beispielsweise *Pseudomonas (P.) aeruginosa* nach Lindenblüten, verursacht durch 2'Aminoacetophenon. *Clostridium difficile* wird durch den ranzigen Geruch in Durchfall erkannt [42–44].

1.3.1 Volatile organische Substanzen (VOCs) als Biomarker

Die obengenannten charakteristischen, wahrnehmbaren Gerüche sind auf die flüchtigen organischen Substanzen (VOCs) zurückzuführen [15]. Bei VOCs handelt es sich um organische Verbindungen, die aufgrund eines hohen Dampfdrucks bei Umgebungstemperaturen flüchtig sind [45]. Zu den bekannten Vertretern der VOCs zählen unter anderem Terpene, Aldehyde, Alkane, Alkene, Ester und Aromaten. Die Herkunft der VOCs kann entweder anthropogen (z. B. industrielle Prozesse, Reinigungsmittel) oder biogen (produziert durch Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen) sein [45]. Demzufolge hat das Interesse, VOCs als Marker zu nutzen, in den letzten Jahrzehnten enorm zugenommen. Nicht nur in der medizinischen Diagnostik, sondern auch in anderen Bereichen wie z. B. des Lebensmittel und Umweltbereichs stößt die VOC-Analyse auf großes Interesse [46, 47].

Im menschlichen Körper werden VOCs als gasförmige Stoffwechselprodukte im Rahmen metabolischer Zellprozesse, Immunreaktionen sowie des Mikrobioms emittiert [15, 48]. Pathologische Prozesse wie Infektionen und Tumore können eine Veränderung der VOC-Zusammensetzung bewirken, indem sie neue VOCs produzieren und/oder das Verhältnis der im Normalzustand vorhandenen VOCs ändern [15, 49]. Bei einer Infektion können sich

charakteristische VOCs durch Erregermetabolismus, Wirt-Pathogen-Interaktion und/oder immunologische Wirtsabwehrreaktionen ergeben [50]. In jüngster Zeit haben sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* Untersuchungen belegt, dass charakteristische VOC-Muster mit einer Vielzahl von Krankheiten (z. B. respiratorische Infektionen, Krebs, Alzheimer) sowie Infektionserreger in Verbindung gebracht werden können [51–56]. Somit sind VOCs als Biomarker zur Infektionserkennung vielversprechend.

VOCs werden nicht nur in der Atemluft, sondern auch in diversen Körperflüssigkeiten unter anderem Urin, Stuhlgang und Schweiß abgegeben [15, 57]. Die Atemluftanalyse erfährt eine hohe Beliebtheit in der VOC-Diagnostik, da diese nichtinvasiv ist und jederzeit ohne Unannehmlichkeiten durchgeführt werden kann [58, 59].

1.3.1.1 VOCs in der Atemluft

Die Zusammensetzung der Atemluft ist komplex. Die ausgeatmete Luft birgt über hundert verschiedene VOCs, die im Spurenbereich bis zu „parts per trillion“ (ppt) in Relation zu Hauptbestandteilen (Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoffdioxid, Wasserdampf und Inertgase) und anorganischen Substanzen vorliegen [60, 61]. Diese VOCs lassen sich in zwei Gruppen einteilen: exogene und endogene VOCs. Exogene VOCs sind flüchtige Bestandteile, die aus der Umgebung eingeatmet oder über die Haut absorbiert beziehungsweise von (residenten) Mikroorganismen produziert werden [62, 63]. Dagegen sind die endogenen VOCs Resultat der körpereigenen Stoffwechselwege [49, 63]. Metabolische VOCs gelangen aus verschiedenen Körperregionen über das Blut in die Lunge und in die Atemluft [49, 64]. Auf diese Weise reflektiert eine Atemluftanalyse den aktuellen physiologischen Zustand des Körpers.

Darüber hinaus variieren die VOCs in der menschlichen Atemluft intra- und interindividuell sowohl quantitativ als auch qualitativ [65, 66]. Deshalb ist eine Standardisierung der Atemluft gesunder Menschen nicht möglich. Die Atemluft eines gesunden Menschen wird durch diverse äußere Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten, Lebensstil sowie die Umgebung beeinflusst [15, 67]. Die Herausforderung ist, krankheitsspezifische VOCs von diesen erwähnten Quellen, die hier zu Störfaktoren werden, zu unterscheiden.

1.3.1.2 Infektionserreger und *in-vitro* Untersuchungen

Um die Komplexität zu reduzieren, kann das Konzept der Atemanalyse durch *in-vitro* Messungen von Kulturen unter kontrollierten Bedingungen ergänzt werden. Durch *in-vitro*

Untersuchungen werden zusätzliche Informationen zum Stoffwechsel der Bakterien sowie der infizierten Zelle bereitgestellt. [68]

Aufgrund des eigenen Metabolismus sind Bakterien in der Lage, olfaktorische VOCs diverser chemischer Klassen zu produzieren [69]. Diese VOCs werden als Endprodukte verschiedener Stoffwechselwege im Zuge des primären oder sekundären Metabolismus unter verschiedenen physikalisch-chemischen Bedingungen freigesetzt [70, 71]. Durch die unterschiedlichen Stoffwechseleigenschaften generieren verschiedene Bakterienspezies einzigartige VOC Kombinationen, die als Biomarker zur Identifikation der Gattung und Art fungieren könnten [72, 73]. Beispielsweise wurde im Headspace der *P. aeruginosa*-Kulturflaschen 2'Aminoacetophenon als charakteristischer Marker für *P. aeruginosa* identifiziert, das auch in der Atemluft infizierter Mukoviszidose-Patienten auffindbar war [74].

Anders als Bakterien und Menschen verfügen Viren über keinen eigenständigen Metabolismus. Folglich ist der Nachweis von virusspezifischen VOCs nicht ohne weiteres möglich. Es ist bekannt, dass Viren den Wirtsstoffwechsel für ihre Replikation in Anspruch nehmen. Viren können Stoffwechselwege u. a. Glykolyse, Fettsäuresynthese und Glutaminolyse modifizieren, um Energie sowie Baustoffe (z. B. Nukleotide, Aminosäuren, Lipide) für die Bildung neuer Viren bereitzustellen [75]. Verschiedene Viren beeinflussen den Wirtsstoffwechsel unterschiedlich [76]. Virus-assoziierte VOCs könnten durch Wirt-Pathogen-Interaktion im Headspace der Zellkulturen nachgewiesen werden.

Neben Eingriffen in den Stoffwechsel induziert eine Virusinfektion eine Vielzahl von immunologischen Abwehrmechanismen, die zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Produkten (z. B. Zytokinen) sowie Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen kann [77, 78]. Im Gegensatz zur Zellkultur könnten durch immunologische Mechanismen entstandene VOCs in der menschlichen Atemluft nachgewiesen werden.

1.3.2 Diagnostik durch VOC-Analyse

Einige Tiere haben im Vergleich zu Menschen ein besser ausgeprägtes Riechvermögen. Hunde werden seit Jahrzehnten zum Aufspüren von illegalen Substanzen, Sprengstoffen sowie Menschen eingesetzt [79]. Der Einsatz von Tieren als diagnostisches Werkzeug für Krankheiten ist noch in Erforschung. Einige Studien belegen, dass Hunde in der Lage sind, verschiedene Tumore in Körperproben riechen zu können [80–82]. Afrikanische Riesenhamsterratten durch Riechen von Sputum-Proben Tuberkulosepatienten von Nichterkrankten unterscheiden [83, 84]. Obwohl Tiere gegenüber aktuellen mikrobiologischen

Standardverfahren in Bezug auf die Geschwindigkeit überlegen sind [42], sind diese für eine flächendeckende Anwendung zu kostenintensiv und im klinischen Alltag nicht praxistauglich [79].

Es bieten sich technische Ansätze zur Unterscheidung von Krankheiten und Infektionserregern auf Grundlage von VOCs an. Den technischen Grundstein der modernen, medizinisch-diagnostischen VOC-Analytik legte hier die Arbeit vom Nobelpreisträger Linus Pauling und seinen Kollegen im 1971 [85]. In dieser Untersuchung wurden über 250 verschiedene Substanzen in der Atemluft und im Urin mittels eines Gaschromatographen quantitativ bestimmt [85]. Seitdem nimmt die Anzahl der Studien sowie technischen Entwicklungen auf dem Gebiet der diagnostischen VOC-Analytik rapide zu [59].

In Bezug auf die Analyse und Probennahme von VOCs aus Körperproben wurden vielfältige Technologien entwickelt und deren Anwendung beforscht. Aber keine davon hat sich aufgrund fehlender Standardisierung für die Routineanwendung in der klinischen Praxis durchgesetzt [67]. Herausfordernd sind die niedrige Konzentration an VOCs in komplexen Körperproben und die hohe Feuchtigkeit der Atemluft, die sowohl sensitive Analyseverfahren als auch geeignete Probennahmesysteme voraussetzt [60, 67, 86].

1.3.2.1 Probennahme

Die Probennahme ist ein Schlüsselpunkt in der VOC-Analyse, da diese die Analyseergebnisse beeinflusst. Welche Probennahme-Methode in Betracht gezogen werden soll, hängt von der Anwendung und der Probenmatrix ab.

Die VOC-Zusammensetzung in der Atemluft wird von der Art der Probennahme und der Atemtiefe beeinflusst. Während der normalen Atmung treten durchschnittlich 150 ml Atemluft aus den oberen Atemwegen (Nase, Rachen und Luftröhre) aus [67, 87]. Die restliche Atemluft kommt vorwiegend aus dem Alveolarraum [61, 67], die durch tiefe Ausatmung erreicht werden kann [87]. Hierdurch werden die metabolischen VOCs aus dem Körper gewonnen, die über das Blut in die Lunge transportiert werden [61, 67]. Darüber hinaus kann die Atemluft abhängig von der Fragestellung über Mund oder Nase gesammelt werden. Bei Infektionen des Nasenrachenraums z. B. Influenza dürfte die Nasenluft besser geeignet sein, während bei Lungenkrebs die Probennahme über die tiefe Ausatmung geeigneter scheint.

Die VOCs in Atemluftproben können entweder direkt in einem Schritt oder indirekt (offline) entnommen und analysiert werden [48, 88]. Direkt werden VOCs während der Ausatmung

über ein Einweg-Mundstück oder -Nasenadapter in das Analysegerät eingesaugt [48]. Zur Kontrolle des Atemvolumens kann ein Spirometer dazwischengeschaltet werden [48]. Indirekt werden VOCs zunächst in einem Behälter (z. B. Tedlar-Beutel, Edelstahlkanister) gesammelt und/oder mit Hilfe von Adsorptionsmaterialien (z. B. Festphasenmikroextraktion (SPME), Tenax-Röhrchen) aufkonzentriert und im zweiten Schritt im Labor offline analysiert [88, 89]. Im Gegensatz zur direkten Analyse, sind die offline Probennahme-Methoden mit vielen Nachteilen verbunden, die vom Verlust von VOCs bis hin zu einer zeitaufwendigen Durchführung in Anreicherung sowie Freisetzung von VOCs reichen [67, 88, 90, 91]. Dafür erreichen die Anreicherungsmethoden durch die Aufkonzentrierung noch eine niedrigere Nachweisgrenze [88, 92].

Als Probenmatrix setzen die Technologien in der VOC-Analyse gasförmige Proben voraus. Neben der Atemluft liegen die VOCs von Interesse in biologischen Proben entweder in der flüssigen oder festen Phase vor. Zu der meistverbreiteten Methode zur Überführung von flüssigen oder festen Substanzen in volatile Analyten zählt die Headspace-Technik [54, 93–95]. Hierbei wird eine Probe in ein Gefäß transferiert und anschließend verschlossen [96]. Im geschlossenen System reichern sich die VOCs durch Gleichgewichtsbildung im Headspace über der Probe an [96]. Die im Headspace befindlichen VOCs stehen für die direkte oder indirekte (SPME) Analyse zur Verfügung.

1.3.2.2 Analyse

Zur Detektion von VOCs stehen verschiedene technische Verfahren zur Verfügung. Diese erstrecken sich von verschiedenen Massenspektrometern über chromatographische Methoden bis hin zu chemischen Sensoren [48, 61]. VOCs in einer Probe können als Einzelsubstanzen und/oder in der Gesamtheit als Fingerabdruck ohne individuelle Substanzidentifizierung detektiert werden [62].

Als Standardverfahren in der VOC-Forschung gilt die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). GC-MS ermöglicht eine Identifikation der individuellen VOC-Substanzen in einer komplexen Probe auf der Basis des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses nach der Elution durch die Gaschromatographiesäule (GC-Säule) [62]. Vorteilhaft ist die chemische Charakterisierung unbekannter Substanzen mit Hilfe der gut definierten Referenzdatenbank z. B. National Institute of Standards and Technology (NIST) [97, 98]. Andererseits ist das Verfahren im Analyseprozess kostspielig und laboraufwendig sowie Expertise des Personals voraussetzend [62, 64, 99]. Ein weiterer Nachteil ist die Größe der Geräte bedingt durch das Hochvakuum, weshalb GC-MS für eine Point-of-Care-Anwendung weniger

geeignet ist [64, 100]. Zudem erfordert die GC-MS-Analyse eine vorherige Probenvorbereitung [89].

Transportfreundlicher ist die Elektronische Nase, die das Riechen technisch imitiert. Die Elektronische Nase besteht aus einer Reihe von chemischen Sensoren, die mit VOCs abhängig von deren Sensoraffinität in Kontakt treten und als Resultat ein Muster von Sensorreaktionen als VOC-Fingerabdruck auslöst [62, 101, 102]. Das resultierende Muster wird im Anschluss mit Hilfe von Mustererkennungs-Algorithmen durch Vergleich mit bekannten VOC-Mustern identifiziert [62, 101, 102]. Elektronische Nasen liefern schnelle Ergebnisse, sind aber nicht in der Lage einzelne volatile Substanzen zu identifizieren [62, 67].

Die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) ist eine aufkommende Alternative zu Massenspektrometrie. IMS ähnelt einer Massenspektrometrie ohne Vakuum, bei der die volatilen Bestandteile basierend auf deren Ionenmobilitäten in einem elektrischen Feld bei Normaldruck nachgewiesen werden [103, 104]. Es gibt verschiedene IMS-Varianten u. a. die klassische Driftröhren-IMS (DT-IMS), Differentielle IMS (DMS) und Feldasymmetrische IMS (FAIMS), die unterschiedliche Trennungs- und Detektionsprinzipien verwenden [104]. Aufgrund ihrer kompakten Größe und einfachen Bedienung ermöglicht die IMS eine schnelle, kostengünstige und räumlich flexible Vor-Ort-Detektion [61, 64, 103]. Bei einer niedrigen Nachweisgrenze bis in den ppt-Bereich ist die IMS bereits in der Routine zur Detektion von Sprengstoffen, chemischen Kampfstoffen und Drogen im Sicherheitsbereich von Flughäfen implementiert [103]. Für die biologische Applikation wird die IMS in der Regel mit einer kapillaren GC-Säule oder Multikapillarsäule (MCC) für eine bessere Auftrennung der komplexen Gasgemische kombiniert [105, 106]. Eine chemische Charakterisierung unbekannter Analyten ist mit der IMS möglich, wenn Referenzmessungen verfügbar sind [107]. IMS ist für einen Routineeinsatz im Bereich der Atemluftanalyse vielversprechend und wird als Analysemethode in dieser Arbeit untersucht.

1.3.3 Stand der Infektionsforschung mit der IMS und Forschungsbedarf

Zur Detektion von infektionsbezogenen VOCs fokussierte sich der Großteil der bisher durchgeführten Studien auf die Verwendung der massenspektrometrischen Verfahren. Dagegen wurde bisher eine geringe Anzahl an Infektionsforschungen mit den IMS-Technologien publiziert.

Diverse IMS-Technologien ermöglichen einen zeitlichen Vorteil im *in-vitro* Nachweis von Bakterien gegenüber den herkömmlichen Kulturverfahren. Nach drei bis 24 Stunden Kultivierung lassen sich verschiedene pathogene Bakterienspezies auf Basis der Unterschiede

der VOCs im Headspace der Kulturen mit der MCC-IMS detektieren [108, 109]. Im Gegensatz zum langwierigen Kulturnachweis in bis zu acht Wochen [110] ermöglichte GC-DMS eine Identifikation langsam wachsender Mykobakterien bereits nach einer Woche der Kultivierung [111].

Bei der Implementation von IMS zur Detektion von Bakterien ist zu berücksichtigen, dass sie als neu entwickelte *in-vitro* Diagnostikmethode den bisherigen Konkurrenzmethoden in der Mikrobiologie in Hinblick auf diagnostische Sensitivität und Spezifität, Personalaufwand, Kosten oder aber Zeitvorteil überlegen sein muss [112]. Daneben spielen die methodologischen Faktoren (z. B. Nährmedien, Inokulationsdichte), die eine Änderung der VOC-Zusammensetzung bewirken, eine Rolle in der Entwicklung einer standardisierten Methode [113].

Durch den aktuell zu breiten Antibiotikaeinsatz entstehen neue multiresistente Erreger, die aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an Antibiotika ein globales, therapeutisches Problem darstellen [114]. Die zeitnahe Resistenzbestimmung von Bakterien nimmt deshalb einen hohen Stellenwert in der Entwicklung neuer Testverfahren ein [115]. Bislang wurde noch keine Arbeit publiziert, die untersucht hat, ob sich die multiresistenten Erreger untereinander sowie von nicht-resistenten Bakterien hinsichtlich der VOC-Muster mit der IMS unterscheiden lassen.

In der Praxis liegen klinische Proben selten in Form von Einzelkulturen vor, vielmehr handelt es sich meist um Mischkulturen. Häufig sind neben den pathologischen Erregern auch Bakterien des Mikrobioms präsent. Eine Studie analysierte VOCs im Headspace von Mischkulturen mittels sekundärer Elektronensprayionisation Massenspektrometrie (SESI-MS) [72], für IMS gibt es derzeit hierzu keine Untersuchung.

Auf der *in-vivo* Ebene hat die IMS-Technologie bereits ihr Potenzial als nichtinvasive Point-of-Care-Methode aufgezeigt. Volatile Bestandteile von Mykobakterien lassen sich sowohl in der Atemluft als auch im Headspace der Stuhlproben infizierter Ziegen mit DMS nachweisen [116]. Infizierte und nicht-infizierte Ziegen ließen sich besser in der Atemluft als in den Stuhlproben voneinander unterscheiden. Übertragen auf den Menschen ermöglicht die FAIMS einen Nachweis von Tuberkuloseerregern in der Atemluft von Patienten mit einer Sensitivität und Spezifität von über 80% [52].

In den letzten Jahrzehnten wurde vermehrt über eine Verbreitung von Viren im Flugverkehr berichtet. Derzeit existieren vereinzelte Studien, die VOCs in Zusammenhang mit Virusinfektionen untersucht haben [93, 117–119]. Bei Influenzaviren konnten Subtypen basierend

auf den volatilen Bestandteilen im Headspace von Zellkulturen mittels GC-MS unterschieden werden [93]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nach einer Impfung mit abgeschwächtem Influenza-Lebendimpfstoff eine Veränderung der volatilen Bestandteile in der Atemluft der Probanden mit GC-MS feststellbar ist [120]. Es war zu Beginn der Arbeit unbekannt, ob auch die IMS-Technologie Virusinfektionen im Headspace von Zellkulturen und in der Atemluft nachweisen kann.

1.4 Zielstellung und Aufbau der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, eine IMS-basierte Methode zum schnellen Nachweis von bakteriellen und viralen Infektionserregern unter Verwendung von VOC-Mustern als Biomarker zu entwickeln. Diese Methode soll für eine Vor-Ort-Analyse am Flughafen und für eine Identifikation von Infektionserregern in der klinischen Umgebung durchführbar sein. Aufgrund der Vorteile der Probennahme wird Atemluft als nichtinvasive Probe für eine Vor-Ort-Analyse untersucht.

Die IMS-Methode wurde in dieser Arbeit an verschiedenen diagnostischen Szenarien evaluiert. Die Dissertation beginnt mit der Untersuchung von Bakterienkulturen gefolgt von Viruszellkulturen und menschlicher Atemluft. Die Untersuchungen wurden mit der IMS gekoppelt mit einer Multikapillarsäule (MCC-IMS) durchgeführt.

In dieser Arbeit ist die Machbarkeitsstudie in drei Teile gegliedert:

Teil 1: *In-vitro* Untersuchung der Bakterienkulturen

Aufgrund des eigenen Metabolismus der Bakterien galt die Untersuchung der Bakterienkulturen mit der MCC-IMS als erster Ansatz, ob sich verschiedene nicht-resistente Bakterienpezies untereinander sowie von resistenten Stämmen anhand volatiler Metabolite innerhalb von zwei Stunden differenzieren lassen. In Vorversuchen wurden die Inkubationsdauer und Nährmedien, die einen Einfluss auf VOC-Muster ausüben, untersucht und festgelegt. Die methodologischen Einflüsse (Bakterienkonzentration, Mischkultur und verschiedene Stämme einer Spezies) wurden parallel analysiert.

Teil 2: *In-vitro* Untersuchung der Virus-infizierten Zellkulturen

Durch den Flugverkehr wurden bisher meist Virusinfektionen verbreitet. Deshalb war die Grundfragestellung, ob es möglich ist, mit der MCC-IMS eine Änderung der VOC-Muster der Wirtszellen im Vergleich zu Virus-infizierten Zellen zu erfassen. Die VOC-Veränderungen wurden im Rahmen des Infektionszeitverlaufs in Kombination mit mikroskopischer

Untersuchung der Zellen evaluiert.

Teil 3: *In-vivo* Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen

Der intakte Organismus des Menschen reagiert mittels seines Immunsystems auf die Virusinfektion. VOCs dieser Immunreaktion lassen sich in Zellkulturen nicht erfassen. Es stellt sich deshalb die Frage, inwiefern sich VOCs in der Atemluft zwischen infizierten und nicht-infizierten Menschen unterscheiden. Hierzu diente eine Untersuchung der Atemluft mit der MCC-IMS. Es wurden die Unterschiede der VOC-Profile bei Influenza- und SARS-CoV-2-Infektion mit der MCC-IMS in der Atemluft untersucht.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Ionenmobilitätsspektrometrie

2.1.1 Aufbau und Prinzip eines Ionenmobilitätsspektrometers

Die Ionenmobilitätsspektrometrie ist ein Verfahren zur Analyse von gasförmigen Proben und basiert auf der Trennung und Detektion der erzeugten Ionen anhand deren Mobilitäten im elektrischen Feld bei Umgebungsdruck.

Der Aufbau und das grundlegende Funktionsprinzip eines Ionenmobilitätsspektrometers ist im englischsprachigen Standardwerk von Eiceman und Karpas [121] sowie in der Arbeit von Stach und Baumbach [122] detailliert beschrieben.

Abbildung 1 veranschaulicht den grundlegenden Aufbau eines IMS-Systems bestehend aus drei Hauptkomponenten: Reaktionsraum, Driftstrecke und Faraday-Detektor.

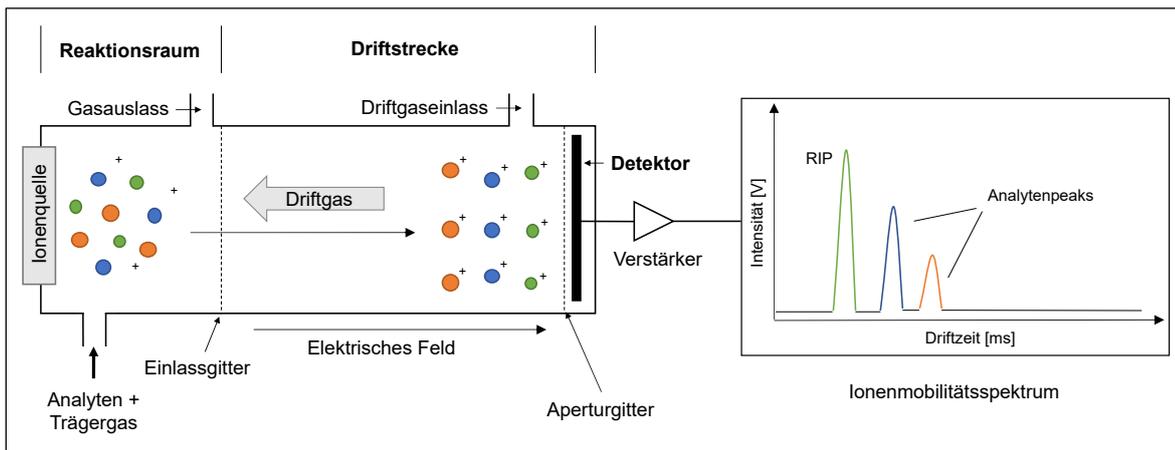


Abbildung 1 Schematischer Aufbau eines Ionenmobilitätsspektrometers

Die gasförmige Probe wird über ein Probeneinlasssystem in den Reaktionsraum des IMS-Systems geleitet. Im Reaktionsraum findet die Ionisierung der in der Probe enthaltenen Analyten durch eine Ionenquelle statt. Die dadurch erzeugten Ionen gelangen durch ein periodisch öffnendes Einlassgitter kontrolliert in die Driftstrecke, die die zentrale Einheit des IMS bildet.

Die Driftstrecke besteht aus einer Röhre aufbauend aus einem Wechsel von Metall- und Isolatorringen, die ein homogenes elektrisches Feld erzeugt. Im elektrischen Feld bewegen sich die Ionen entgegen der Strömungsrichtung eines Driftgases entlang der Feldlinien zum Detektor. Auf diesem Wege werden die Ionen durch Kollision mit neutralen

Driftgasmolekülen abgebremst und erreichen je nach Länge der Driftstrecke aufgrund ihrer Struktur und Masse charakteristische Driftgeschwindigkeiten (Ionenmobilität). Dadurch werden die Ionen vor dem Erreichen des Detektors voneinander getrennt.

Vor dem Faraday-Detektor ist ein Aperturgitter vorgeschaltet, das als kapazitiver Entkoppler zwischen herannahenden Ionen und dem Detektor fungiert. Beim Auftreffen auf den Detektor erzeugen die Ionen ein elektrisches Signal, das im Anschluss verstärkt und digitalisiert wird. Dadurch ergibt sich ein Ionenmobilitätsspektrum, in dem die Signalintensität [V] als Funktion der Driftzeit in Millisekunden [ms] dargestellt ist. Die Driftzeit ist die Zeit, die die Ionen für die Wegstrecke vom Einlassgitter zum Detektor benötigen.

2.1.2 Ionenmobilität

Die Ionenmobilität (K) ist gemäß der Gleichung 1 als Quotient aus Driftgeschwindigkeit (v_d) und elektrischer Feldstärke (E) physikalisch beschrieben:

$$(1) \quad K = \frac{v_d}{E}$$

Die Mobilität der Ionen wird durch die Eigenschaften des Ions sowie die ständige Interaktion mit den Driftgasmolekülen beeinflusst. Demzufolge unterliegt diese den gaskinetischen Gesetzen. Abgeleitet kann die Ionenmobilität nach der postulierten Gleichung (2) von Reverbomb und Mason [123] berechnet werden:

$$(2) \quad K = \frac{3}{16} \cdot \frac{q}{N} \cdot \left(\frac{m+M}{m \cdot M}\right)^{\frac{1}{2}} \cdot \left(\frac{2\pi}{k_B \cdot T_{eff}}\right)^{\frac{1}{2}} \cdot \left(\frac{1+\alpha}{\Omega_D(T_{eff})}\right)$$

Die Ionenmobilität hängt von folgenden Parametern ab: der Ladungszahl des Ions (q), der Teilchendichte des Driftgases (N), der Ionenmasse (m), der Masse der Driftgasmoleküle (M), der Boltzmann-Konstante (k_B), der effektiven Temperatur des Ions (T_{eff}) und des temperaturabhängigen Stoßquerschnitts zwischen Ion und Driftgasmolekül ($\Omega_D(T_{eff})$). Bei α handelt es sich um einen Korrekturfaktor, der für $m > M$ kleiner als 0,02 ist [123].

2.1.3 Ionisationsprinzip

Die Analyten können bei IMS auf verschiedene Arten ionisiert werden. Die meistangewandte Methode ist die Ionisation mit Beta-Strahlern (Nickel-Isotop (^{63}Ni) oder Tritium (^3H)) [104, 124]. Daneben können nicht-radioaktive Strahlungsquellen wie Laser-, Koronaentladung- und Photoionisation mit Ultra-Violett (UV)-Licht zum Einsatz kommen [125–127]. Die

letzte genannte ist als nicht-radioaktive Ionisationsmethode weit verbreitet. Allerdings werden weniger Moleküle mit UV ionisiert als mit dem Beta-Strahler [104].

In dieser Arbeit wurde ein IMS-Gerät mit Tritium-Strahlungsquelle verwendet. Deshalb wird auf das Prinzip der radioaktiven Ionisation näher eingegangen. Mit diesem Ionisationsverfahren können sowohl positive als auch negative Ionen gebildet werden. Die Reaktionen der Ionenbildung ist an anderer Stelle [121, 122] ausführlich beschrieben.

Im ersten Schritt werden die Hauptbestandteile der Luft (Driftgas) durch vom Beta-Strahler emittierte Elektronen (β^-) ionisiert. Dies löst eine Reaktionskaskade unter Bildung von stabilen Reaktantionen ($R^{+/-}$) als Produkt aus (vereinfacht dargestellt in Gleichung 3). Als Reaktantionen entstehen protonierte Wassercluster ($H^+(H_2O)_n$) im positiven Ionenmodus und im negativen Modus die Ionen des Typs $O_2^-(H_2O)_n$. Die Anzahl (n) der Wassermoleküle im Cluster hängt von der Temperatur und der Feuchte des Driftgases ab.



Sobald die Analyten im Reaktionsraum sind, erfolgt im zweiten Schritt eine Ladungsübertragung von Reaktantionen ($R^{+/-}$) auf neutrale Analyt-Moleküle (M). Als Resultat ergeben sich positive oder negative Produkt-Ionen als Monomere ($M^{+/-}$) wie folgt in Gleichung 4 dargestellt:



Diese Reaktion der Produkt-Ionenbildung tritt nur ein, wenn die Analyt-Moleküle eine höhere Protonen- bzw. Elektronenaffinität als die Reaktantionen aufweisen. Mit steigender Analytkonzentration können die Monomer-Produkt-Ionen mit weiteren neutralen Analyt-Molekülen reagieren. Dadurch werden protonengebundene Dimere entsprechend nachfolgender Reaktion in Gleichung 5 gebildet:



Die Dimere können sich wiederum an weitere neutrale Analyt-Moleküle heften, wodurch Trimer-Produkt-Ionen ($M_3^{+/-}$) hervorgehen. Dieser Effekt ist im Regelfall unter Umgebungs- oder Laborbedingungen nicht zu beobachten [128].

Die Differenzierung der Spektren kann durch das Auftreten von mehreren Substanzen als Monomer, Dimer und/oder Trimer im Gasgemisch erschwert werden [129].

Erfolgt die Ionisierung durch radioaktive Strahler, treten im IMS-Spektrum die Reaktantionen als Hauptpeak, dem sogenannten Reaktionsionenpeak (RIP), auf. Der RIP kann als

Reservoir der Ionen betrachtet werden. Die Höhe des RIP wird durch das Auftreten weiterer Produkt-Ionen-Peaks durch Entladung der Reaktantionen entsprechend Gleichung 4 im Spektrum verringert. [130]

2.1.4 Kopplung mit Gaschromatographie zur Vortrennung

Biologische Proben, wie Atemluft oder Headspace von Bakterienkulturen, bestehen aus einer Zusammensetzung unterschiedlicher gasförmigen Analyte. Diese Analyten können ähnliche oder gleiche Driftzeiten aufweisen. Deshalb ist die IMS für eine Analyse derartiger Gasgemische allein nicht ausreichend [105, 106]. Infolgedessen werden die meisten Ionenmobilitätsspektrometer mit einer Gaschromatographiesäule (GC-IMS) gekoppelt [105, 106]. Die vorgeschaltete GC-Säule dient zur Vortrennung von Analyten. Folglich wird die Auflösung der IMS verbessert und eine bessere Trennung von Analyten in einem Gemisch erreicht.

In der GC-Säule wird die Probe abhängig von der Verteilung in der mobilen (Trägergas) und stationären Phase (Flüssigkeitsfilm- / Trägermaterial in der Säule) aufgetrennt [131]. Dies passiert, indem die unterschiedlichen chemischen Analyten je nach Dampfdruck und/oder Grad der Wechselwirkungen mit der stationären Phase unterschiedlich lang in der Säule verweilen [131]. Diese Verweildauer entspricht der Retentionszeit in Sekunden [s]. Im Anschluss gelangen die vorgetrennten Substanzen nach der Retentionszeit in die IMS-Messzelle zur Ionisierung, Trennung und Detektion nach dem IMS-Prinzip.

Parallel wird das Problem mit der Feuchtigkeit z. B. in der Atemluft beseitigt, die sich durch Clusterbildung der Wassermoleküle mit Analytionen auf die IMS-Analyse negativ auswirkt [106]. Durch die Vortrennung mit der GC-Säule gelangen die Wasser- und Analytmoleküle getrennt in den Ionisationsraum. Diese vollständige Auftrennung ist bis zu 100% Feuchtigkeit gewährleistet [132].

2.1.4.1 Gaschromatographiesäule

Heutzutage werden die IMS-Geräte entweder mit einer konventionellen kapillaren Säule (z. B. von Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) oder mit einer Multikapillarsäule (z. B. MCC OV-5, Multichrom. Ltd., Novosibirsk, Russland) ausgestattet [106, 107, 133]. Die wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Typen sind der Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Hauptunterschiede zwischen kapillarer Säule und Multikapillarsäule (MCC) für GC-IMS [106, 107, 133]

	Kapillare Säule	MCC
Anzahl der Kapillaren	1	1000 im Bündel
Länge der Säule	10 – 30 m	20 cm
Kapillardurchmesser	0,28 – 0,53 mm	Einzelkapillare: 40 μm Gesamt: 3 mm
Filmdicke	1 - 2 μm	0,2 μm

Neben der stationären Phase, der Filmdicke und der inneren Säulendurchmesser ist die Länge der Säule entscheidend für die chromatographische Trennung. Je länger die Säule, desto länger ist die Retentionszeit und umso größer ist die Trennungsauflösung [134].

Ein großer Vorteil der MCC ist der Betrieb mit hohen Flussraten von 5 bis über 300 ml/min bedingt durch den größeren Gesamt-Säulenquerschnitt [135]. Dies entspricht der im IMS verwendeten Trägergasflussrate und erleichtert die Kopplung [136]. Mittels MCC kann die Analyse auf wenige Minuten bis zu wenigen Sekunden beschleunigt werden [137]. Auf der anderen Seite ist die Trennungsleistung der MCC schlechter als die der konventionellen kapillaren Säule [136].

2.1.4.1 Struktur der GC-IMS-Daten

Das Resultat einer Probenanalyse mit GC-IMS ist ein Spektrum mit den Parametern Retentionszeit [s], Driftzeit [ms] und Signalintensität [V] (siehe Abbildung 2) [138]. In diesem Spektrum sind die Signalintensitäten der Analyten-Peaks in Abhängigkeit der Retentionszeit auf der y-Achse und der Driftzeit auf der x-Achse als Heatmap farbig aufgetragen. Hier sind die Peaks nicht mehr als Gaußform, sondern in kreis- oder ovalförmigen Flächen dargestellt [138].

Neben den Analytenpeaks tritt ein weiterer Peak als Bande auf. Bei dieser Bande handelt es sich um den RIP, der durch Ionisierung des Driftgases zustande kommt und bei radioaktiven Ionenquellen unabhängig von der Retentionszeit immer auftritt.

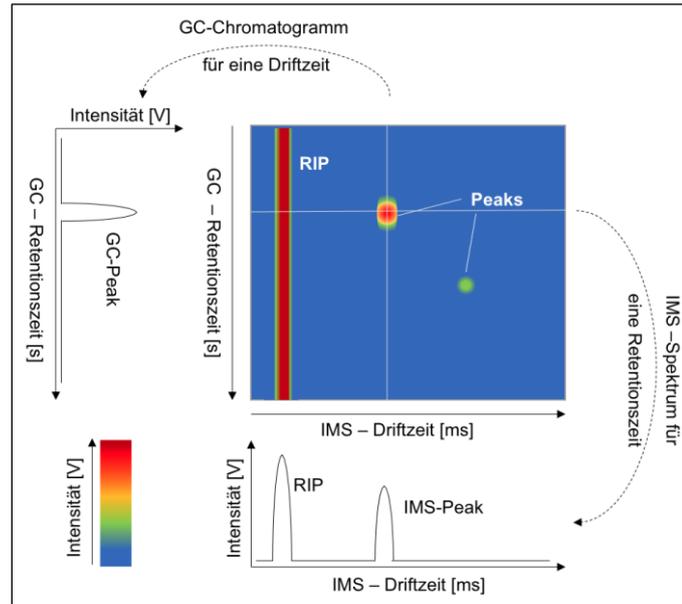


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines GC-IMS-Spektrums. Modifiziert nach [139]

2.2 Datenanalyse von GC-IMS-Daten

Mit GC-IMS können Veränderungen biologischer Proben durch Anwesenheit, Abwesenheit oder Konzentrationsänderung der VOCs, oder durch Vergleich von IMS-Chromatogrammen als VOC-Muster nachgewiesen. Um diesen Nachweis zu ermöglichen, ist eine umfangreiche bioinformatische Datenanalyse notwendig.

2.2.1 Targeted vs. Non-Targeted Datenanalyse

Die Analyse der Daten kann auf zwei Arten vorgenommen werden: zielgerichtet (targeted) und nicht-zielgerichtet (non-targeted).

Das Prinzip der zielgerichteten Analyse ist, ausgewählte Analyte (Zielanalyte) in einer Probe zu identifizieren und zu quantifizieren [140, 141]. Dabei werden die anderen in der Probe vorhandenen Analyte nicht berücksichtigt. Dagegen wird im Rahmen der nicht-zielgerichteten Analyse eine umfangreiche Analyse aller vorhandenen Analyte in einer Probe durchgeführt, um neue vermeintliche Biomarker zu charakterisieren [140, 141]. Hierbei werden die IMS-Chromatogramme als charakteristische Fingerabdrücke (VOC-Muster) der analysierten Proben verwendet. Die nicht-zielgerichteten Methode werden häufig für die VOC-Analyse von biologischen Proben angewendet.

2.2.2 Datenvorverarbeitung und Peakselektion

Messungen mit der GC-IMS erzeugen eine hohe Menge an Daten. Diese können sowohl relevante als auch irrelevante Informationen enthalten. Es ist eine differenzierte Datenanalysestrategie notwendig, um die relevanten Informationen zu extrahieren. Deshalb besteht die Datenanalyse der IMS-Daten aus drei grundlegenden Schritten: Datenvorverarbeitung, Peakselektion und statistische Analyse. Der Ablauf einer Datenanalyse ist in der Abbildung 3 illustriert.

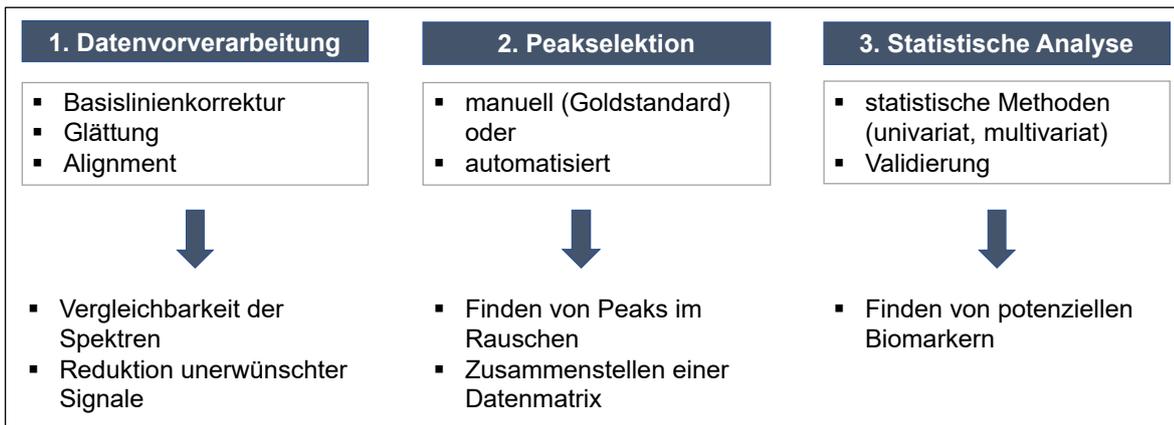


Abbildung 3 Schritte der Datenanalyse von IMS-Chromatogrammen

Die Datenvorverarbeitung der Rohdaten umfasst verschiedene Teilschritte wie Basislinienkorrektur, Glättung und Angleichung verschiedener Probandaten. Hierdurch werden die Spektren für die Vergleichbarkeit verbessert und unerwünschte Signale reduziert.

Im nächsten Schritt erfolgt eine Extraktion der Peaks aus den vorverarbeiteten Spektren. Peaks sind im IMS-Chromatogramm durch ihre Lage (Retentionszeit und Driftzeit) und der Signalintensität (siehe Kapitel 2.1.4.1) definiert. Diese Parameter geben eine Auskunft über einen bestimmten Substanzbestandteil und dessen Konzentration.

Das Aufspüren von Peaks kann manuell oder automatisiert mit Hilfe einer Software erfolgen. Als Goldstandard gilt das visuelle Finden von Peaks in 2D-Spektren wie Heatmaps [142]. Dieser Prozess wird für jede einzelne Messung durchgeführt. Die visuelle Methode ist aufgrund des hohen Zeitaufwands für einen hohen Durchsatz nicht realisierbar [142]. Die resultierenden Ergebnisse sind subjektiv und kaum reproduzierbar [142]. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene computergestützte Verfahren für die automatisierte Detektion von Peaks in IMS-Chromatogrammen, teilweise integriert in die Datenvorverarbeitung, entwickelt [143, 144]. Wesentliche Unterschiede sind die verwendeten mathematischen Algorithmen zur Erkennung von Peaks. Dazu zählen z. B. Clustering-Algorithmen,

Wasserscheidenstransformation (WST) und statistische Peak-Modellschätzung (PME) [143, 145–147]. Die automatisierten Ansätze sind vor allem durch schnelle Verarbeitung hoher Datenmengen vorteilhaft. Dagegen zeichnet sich der manuelle Ansatz durch hohe Flexibilität aus.

Das Resultat der Datenvorbereitung mit Peakextraktion ist eine Matrix, in der die Peaks (Spalten) mit ihren Signalintensitäten in Abhängigkeit der Beobachtungen / Messungen (Zeilen) aufgelistet sind. Peaks mit ihren Koordinaten im IMS-Chromatogramm sind in den Spaltenüberschriften hinterlegt. Die erzeugte Matrix dient als Datensatz für die weitere statistische Untersuchungen. [138, 142]

2.2.3 Statistische Analyse

2.2.3.1 VOCs als Biomarker

Das Ziel der statistischen Untersuchungen ist, diskriminatorische VOC-Biomarker zur Unterscheidung von Gruppen zu identifizieren. Biomarker sind in der Biomedizin messbare Indikationsparameter, die Hinweise auf eine Krankheit bzw. Veränderung der biologischen Prozesse liefern [148]. In der VOC-Analyse handelt es sich bei Biomarkern um gasförmige Metabolite.

Das Wunschbestreben ist, einen einzelnen charakteristischen VOC-Biomarker für einen biologischen Zustand, z. B. eine Erkrankung, zu finden, was aufgrund der Stoffwechselkomplexität in der Realität unwahrscheinlich ist. Bei Stoffwechselveränderungen werden nicht nur neue Metabolite geschaffen, sondern auch eine Fülle von Metaboliten gleichzeitig in der Konzentration verändert [149]. Daher ist es sinnvoller einen Satz von VOCs mit Konzentrationsveränderungen (VOC-Muster) zu betrachten, anstatt einzelne spezifische VOCs zu suchen.

Zur Identifizierung von signifikanten VOC-Biomarkern können univariate und multivariate statistische Methoden angewendet werden. Der Fokus der univariaten Ansätze liegt auf Analyse einzelner Variablen (jeweils ein Biomarker). Dagegen analysieren die multivariaten Ansätze mehrere Variablen (mehrere Biomarker) gleichzeitig. [138]

Zu den univariaten statistischen Methoden zählen z. B. Hypothesentests wie Mann-Whitney U-Test oder t-Test. Hierbei dient der resultierende p-Wert als Kriterium, um die Hypothese anzunehmen oder zu verwerfen. Dennoch liefert dieser Wert keine Information über die Unterschiede. Demzufolge ist die Nutzung des p-Werts als Qualitätsmerkmal zum

Aufzeigen von signifikanten Befunden in der biomedizinischen Forschung eingeschränkt [150]. Außerdem kann durch das Testen von mehreren Biomarkern statt einem Biomarker auf derselben alpha-Ebene ein „Mehrfachtestproblem“ entstehen [151]. Dies führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit unter den Tests mindestens ein rein zufällig falsch positives Ergebnis zu finden.

Unter diesem Gesichtspunkt sind die multivariaten Methoden für die Analyse verschiedener Biomarker bzw. VOC-Muster besser geeignet. Gegenüber univariaten Methoden werden damit die Beziehungen zwischen Variablen und das gesamte Muster gleichzeitig betrachtet. Hingegen können signifikante Variablen übersehen bzw. maskiert werden. Deshalb ist eine Kombination aus univariaten und multivariaten Methoden zum Finden von potentiellen VOC-Markern erstrebenswert [152].

2.2.3.2 Multivariate Analyse

Das Gebiet der multivariaten Statistik lässt sich in unüberwachte und überwachte Ansätze einteilen. Die multivariate Analyse beginnt häufig mit dem ersten Ansatz, um Strukturen in den Daten ohne *a priori* Annahmen aufzuschlüsseln und damit einen Überblick über die Daten zu gewinnen [138]. Zu den am weitesten verbreiteten unüberwachten Analysemethoden zählt die Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal component analysis (PCA)) [138]. Das Ziel bei dieser Methode besteht darin, eine große Anzahl von Variablen mit möglichst wenig Informationsverlust auf nur wenige Hauptkomponenten durch Linearkombinationen mathematisch zu reduzieren und damit die Varianz der Daten in Abhängigkeit der Hauptkomponenten zu visualisieren [153]. Eine andere bekannte unüberwachte Methode ist die Clusteranalyse. Hierbei werden die Daten aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Gruppen (Cluster) zusammengefasst [154]. Die Ähnlichkeit wird durch den Distanzabstand von Objekten bzw. Variablen im Datensatz bestimmt. Die unüberwachten Methoden eignen sich primär für die Datenvisualisierung [89].

In der Regel wird der unüberwachte Ansatz mit einer überwachten Analyse fortgesetzt. Diese nutzt *a priori* Wissen (z. B. Informationen zu Gruppen) für die Entwicklung eines Modells, um eine Gruppe basierend auf ausgewählten Variablen (VOCs) zu differenzieren und prognostizieren [155]. Methoden der überwachten Analyse zielen darauf ab, Beziehungen zwischen Eingangsvariablen (VOCs) und Zielvariablen (Gruppen) zu finden. Es existiert eine breite Palette an linearen und nicht-linearen Methoden. Die Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) ist die meistangewandte lineare Methode für IMS-Daten [138]. LDA erstellt lineare Funktionen auf der Grundlage der Variablen, um zwischen den untersuchten Gruppen

zu differenzieren [156]. Daneben werden Variablen aufgezeigt, die für die Diskriminierung verantwortlich sind. Um das Problem mit den multikollinearen Variablen zu umgehen, wird LDA oft mit der Regression der kleinsten Quadrate kombiniert (PLS-DA) [155]. Bei der PLS-DA können verantwortliche Variablen für die Unterscheidung zwischen Gruppen parallel identifiziert werden. Außerdem können Metabolomik-Daten nicht-lineare Strukturen enthalten, wofür die linearen Methoden weniger geeignet sind [89, 155]. Für die Untersuchung nicht-linearer Beziehungen können Kernel-Methoden (z. B. Support Vector Machine), künstliche neuronale Netzwerke (ANN) oder baumbasierte Modelle (z. B. Random forest) eingesetzt werden [155]. Diese Methoden setzen eine hohe Rechenleistung sowie eine komplexe Interpretation der Ergebnisse voraus [155]. Deshalb werden die nicht-linearen Methoden nur empfohlen, falls die linearen Methoden nicht ausreichend sind [155].

2.2.3.3 Validierung

Die Mehrheit der Studien im Bereich der VOC-Analyse generieren eine Fülle von Variablen, die häufig die Anzahl der gemessenen Proben übersteigen. Infolgedessen neigen die entwickelten Modelle der überwachten Analyse zu einer Überanpassung der Daten [155, 157]. Um die Qualität und Robustheit der Ergebnisse zu erhöhen, ist hierzu eine Validierung unerlässlich. Im Zuge der Validierung wird die Eignung des entwickelten überwachten Modells hinsichtlich der Fragestellung bewertet.

Im Idealfall wird ein Datensatz in drei Teilsätze aufgeteilt: Trainings-, Validierungs- und Testsatz. Mit dem Trainingssatz werden Klassifikationsmodelle im Zuge der überwachten Analyse mit verschiedenen Parametern entwickelt. In der nächsten Phase wird die Qualität dieser Modelle mit dem Validierungssatz überprüft. Anschließend wird die Vorhersageleistung des besten Modells mit dem unabhängigen Testsatz bewertet. [158]

Da die erhobene Datenmenge der meisten klinischen VOC-Analysen zu klein ist, wird das Modell in der überwachten Analyse mit dem Trainingssatz aufgebaut und abschließend mit dem Testsatz verifiziert [155].

Zu den gängigen Validierungsmethoden zählen unter anderem die Kreuzvalidierung (CV), Bootstrapping sowie Permutationstests [159]. Die Leistung der Validierung wird durch Fehlerquoten, z. B. Anzahl der Fehlklassifizierungen (Sensitivität und Spezifität) bestimmt. Die Anzahl der Proben in einem Datensatz bestimmt die Wahl der Methode [138].

Bei kleinen Stichproben wird üblicherweise die Leave-One-Out Variante der Kreuzvalidierung (LOO-CV) eingesetzt [155]. Für ein besseres Verständnis wird zunächst das Prinzip

der klassischen Kreuzvalidierung (k-fache Kreuzvalidierung) erklärt. Hierbei wird der Ausgangsdatensatz in eine Anzahl k von Teilmengen gleicher Größe zerlegt. Eine der Teilmengen dient als Testsatz zum Validieren, während die restlichen Teilmengen ($k - 1$) zum Trainieren des Modells genutzt werden [160]. Die Prozedur wird k-fach wiederholt, bis jede Teilmenge einmal als Testsatz verwendet wurde. Bei der LOO-CV entspricht k jeder der einzelnen Beobachtungen in einem Datensatz [160]. Jede Beobachtung wird in einem iterativen Prozess als Testsatz herangezogen. Die Gesamtfehlerquote errechnet sich aus dem Mittelwert der Einzelfehlerwerte bei jeder Iteration [155].

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 IMS-Versuche

3.1.1.1 Geräte

Geräte und Zubehör	Hersteller
Ionenmobilitätsspektrometer gekoppelt mit einer multikapillaren GC-Säule	Sensortechnik und Elektronik Pockau (STEP)
Multikapillare GC-Säule (im IMS), OV-5, 20 cm	Multichrom Ltd.
Heizblock, Model: HB-2	Wealtec Corp.
Aluminium-Block mit 8 Stellplätzen für 20 ml Headspace-Vials	Anfertigung nach einer Skizze durch Rothe Feinmechanik

3.1.1.2 Materialien

Material	Hersteller
Rollrandflasche, N 20, 20 ml (Headspace-Vial)	Macherey-Nagel
Bördelverschluss mit 3 mm dickem Silikon/PTFE Septum, N 20	Macherey-Nagel
Silikon/PTFE Septum (ø: 17,5 mm, Dicke: 1,5 mm)	Supelco
PTFE-Schlauch (ø innen: 2 mm, ø außen: 3 mm)	Carl Roth
Luer-Schlauchverbinder	Carl Roth
Verschließzange für 20 mm Bördelkappen	Macherey-Nagel
Öffnungszange für 20 mm Bördelkappen	neoLab
Einmalkanülen, G 21 x 1 1/2", ø 0,80 x 40 mm	B. Braun Melsungen
Aktivkohlefilter (STEP Kreislauffilter)	Sensortechnik und Elektronik Pockau GmbH

3.1.2 Mikrobiologische und zellkulturtechnische Arbeiten

3.1.2.1 Reagenzien und Medien

Reagenzien / Medien	Hersteller
Destilliertes Wasser	Im Hause hergestellt
Glycerin, ≥98 % Ph.Eur.	Carl Roth
Brain Heart Infusion Broth (BHIB)	Sigma-Aldrich
Mueller Hinton Broth (MHB)	Carl Roth
Tryptic Soy Broth (TSB)	Oxoid
Agar, Agar-Agar Kobe I	Carl Roth
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich

Materialien und Methoden

Trypsin-EDTA (10x)	Biochrom
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit hohem Glukosegehalt (GlutaMAX™)	Gibco
Fetales Kälberserum	Gibco
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	Gibco Eigene Herstellung*

*für Zellkulturvorversuche ohne Viren (Kapitel 3.4.1)

Rezept für 10x PBS, pH = 7,4 (800 ml)

80 g Natriumchlorid (NaCl, M = 58,44 g/mol)
2 g Kaliumchlorid (KCl, M = 75,55 g/mol)
14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄, M = 141,96 g/mol)
2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄, M = 136,09 g/mol)
Mit 800 ml destilliertem Wasser auffüllen und pH-Wert auf 7,4 einstellen

3.1.2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Präzisionstücher, fusselfrei	Kimberly-Clark
Papierhandtücher, 1-lagig	Tapira
Aluminiumfolie	Carl Roth
Autoklavier- / Spezialvernichtungsbeutel	nerbe plus
Einweghandschuhe aus Nitril, TouchNTuff™	Ansell
Armstulpen, PE-Schutzärmel	Hygonorm
Küvetten (50-2000 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filter	nerbe plus
Pipettenspitzen	Greiner BioOne
Parafilm	Bemis
Einwegimpfösen	VWR
Einweg-Drigalskispatel	VWR
Kryoröhrchen (2 ml)	VWR
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner BioOne
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	nerbe plus
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml), steril	Greiner BioOne
Petrischalen, steril	Greiner BioOne
Flächendesinfektionsmittel, Bacillo® AF	Paul Hartmann AG
Wägeschalen	Carl Roth
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner BioOne

3.1.2.3 Laborhilfsmittel

Laborhilfsmittel	Hersteller
Magnetrührstäbchen	
Magnetstab-Entferner	
Messzylinder (1000 ml)	Brand
Laborflasche (1000 ml)	Schott
Ausplattierkugeln	

Löffelspatel	
Pinzetten	
<u>Pipetten</u>	
Pipetman	Gilson
Eppendorf Reference	Eppendorf
Elektronische Pipettierhelfer, accu-jet® pro	Brand
Neubauer-Zählkammer	Heinz Herenz Hamburg
Alkoholfeste Stifte, VWR Lab Marker	VWR
Gefrierbehälter, Mister Frosty	Nalgene

3.1.2.4 Geräte

Geräte	Hersteller
Inkubationsschüttler, Innova® 40	New Brunswick Scientific
Kühlzelle, 4 °C	Viessmann
<u>Kühl- und Gefrierschränke</u>	
Gefrierschrank, VIP™ Series -86 °C	Sanyo
Gefrierschrank, VIP eco -86 °C, Produktlinie von PHCbi	PHC
Tiefkühlschrank, MedLine, -20 °C	Liebherr
<u>Inkubatoren</u>	
Mikrobiologischer Inkubator, Heraeus	Thermo Scientific
CO ₂ -Inkubator, Hera Cell 240	Thermo Scientific
Trockenschrank	Binder
Sicherheitswerkbank HERA safe	Thermo Scientific
Magnetrührer, VMS-A	VWR
Waage, Extend	Sartorius
<u>Vortex-Schüttler</u>	
VV3	VWR
IKA® Vortex Genius 3	IKA
pH-Meter, Lab 870	Schott Instruments
<u>Zentrifugen</u>	
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific
Photometer, Bio-Photometer	Eppendorf
Wasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik
Fluoreszenzmikroskop, Leica DFC310 FX	Leica

3.2 MCC-IMS der Firma STEP

3.2.1 Funktionsprinzip

Zur Analyse der volatilen organischen Metaboliten wurde ein Ionenmobilitätsspektrometer gekoppelt mit einer multikapillaren gaschromatographischen Säule (MCC-IMS) der Firma STEP (Sensortechnik und Elektronik Pockau GmbH, Pockau, Deutschland) verwendet. Die

Spezifikation des verwendeten MCC-IMS ist in der Tabelle 21 im Anhang 1.1 zusammengefasst.

In diesem Gerät ist eine 20 cm lange multikapillare GC-Säule (Durchmesser: 2 mm, Multichrom Ltd, Novosibirsk, Russland) bestehend aus circa 1000 Kapillaren eingebaut. Die einzelnen Kapillaren weisen einen Innendurchmesser von 40 μm und eine Filmdicke von 0,2 μm auf. Die Multikapillaren sind mit einer schwach polaren stationären Phase aus 95 % Dimethylpolysiloxan und 5 % Diphenyl (OV-5) beschichtet.

In Bezug auf die Gasversorgung verfügt das IMS-Gerät über einen internen Gaskreislauf mit einem integrierten Aktivkohlefilter. Dieser ist durch eine Kreislaufpumpe reguliert, die dem IMS-Gerät gefilterte Umgebungsluft als Driftgas und Trägergas zur Verfügung stellt. Damit entfällt eine externe Versorgung durch Gasflaschen.

Das Funktionsprinzip des verwendeten MCC-IMS ist in der Abbildung 4 schematisch veranschaulicht.

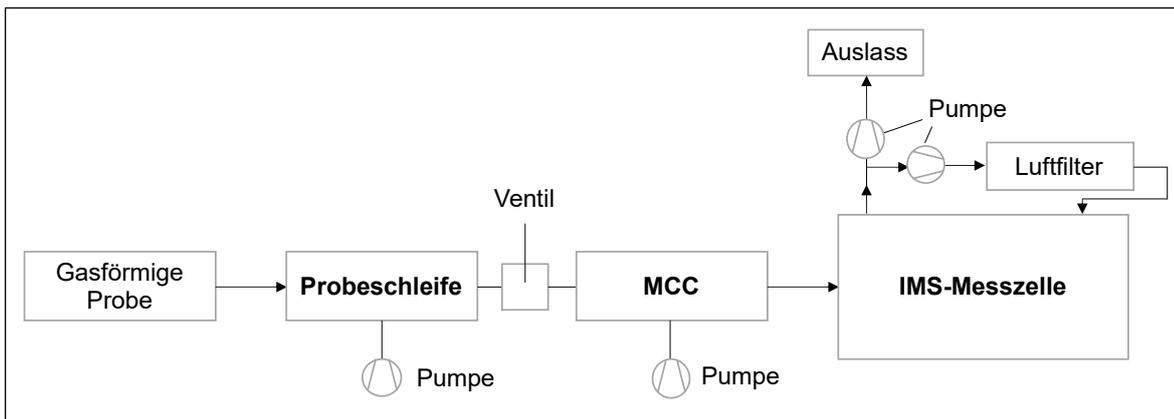


Abbildung 4 Schematische Funktion des verwendeten MCC-IMS-Gerätes, modifiziert nach [161]

Für die Probennahme besitzt das IMS-Gerät eine interne Pumpe, die die gasförmige Probe von außen über einen Schlauch in die Probeschleife mit einer Rate von 200 ml/min aktiv einsaugt. Die Dauer der Probennahme kann je nach Anwendung in Sekundenschritten festgelegt werden. Während der Probennahme passiert die Probe die Probeschleife und wird so lange am Probeschleifenausgang wieder nach außen transportiert, bis die Pumpe deaktiviert wird. Das Ableiten der verbliebenen Probenluft erfolgt über ein internes Filter.

Die in der Probeschleife gesammelte Probe wird durch Öffnung eines Ventils mit dem Trägergas in die isotherm beheizte multikapillare GC-Säule befördert. Dort werden die Substanzen nach ihrer Retentionszeit getrennt und mit dem Trägergas in die IMS-Messzelle

überführt. In der IMS-Messzelle werden die Substanzen nach dem IMS-Prinzip (siehe Kapitel 2.1.1) ionisiert, getrennt und detektiert.

Die Messzelle besteht aus einem Reaktionsraum und einer Driftröhre, die durch ein Einlassgitter unterteilt sind. Im Reaktionsraum werden die Analyten durch eine radioaktive Ionisationsquelle (Tritium ^3H) ionisiert. Die Aktivität dieser Strahlungsquelle (≤ 100 MBq) liegt unterhalb der gesetzlichen Freigrenze. Das Einlassgitter kontrolliert den Einlass der Ionen in die Driftröhre mit einer Pulsrate von 30 ms und einer Öffnungszeit von 100 μs . In der Driftröhre (Länge: 5 cm, Durchmesser: 10 mm) wird ein homogenes elektrisches Feld mit einer Feldstärke von 400 V/cm erzeugt.

Der Detektor erfasst die auftreffende Ionenladung in Strom mit einer Abtastzeit von 10 μs . Der Ionenstrom wird im Anschluss durch einen Strom/Spannungswandler verstärkt und digitalisiert. Die Datenverarbeitung von IMS-Spektren sowie die Steuerung des IMS-Geräts erfolgt durch die Software „IMS-Control“ im integrierten PC des IMS-Systems. Mit dieser Messsoftware werden die erfassten IMS-Spektren durch Mittelwertbildung aus 16 Einzelspektren pro Sekunde auf der Basis der Wavelet-Transformation entrauscht und im Gerät intern abgespeichert. Diese entrauschten Spektren stehen für die weitere Auswertung zur Verfügung.

3.2.2 Geräteeinstellung für die Versuche

Mit dem MCC-IMS-Gerät der Firma STEP können verschiedene Einstellungen der IMS-Parameter vorgenommen werden. Diese müssen im Vorfeld einer Messung festgelegt werden. Die Festlegung der IMS-Parameter hängt von der Art der Analyse ab.

Durch Erfahrung aus vorherigen Untersuchungen an Bakterienkulturen und Atemluft wurde das verwendete IMS-Gerät bereits auf Standardeinstellung (MCC: 60 °C, Detektor: 60 °C, Probeschleife: 50 °C, Sampling-Zeit: 10 s) programmiert. Mit dem IMS-Gerät können entweder positive oder negative Ionen gemessen werden. Dies erfolgt durch die Umschaltung der Hochspannungspolarität des elektrischen Feldes. Der positive Ionenmodus wurde ausgewählt, da die positiven IMS-Spektren mehr Informationen liefern [107, 111]. Die MCC-IMS-Parameter wurden je nach Analyse in dieser Arbeit angepasst.

Mit einer Ventilöffnungszeit von 10 s und einer Analysezeit von 240 s dauerte eine Messung, ausgenommen die Dauer der Probennahme, circa 4 Minuten (250 s).

3.3 *In-vitro* Untersuchung der Bakterienkulturen

3.3.1 Bakterienstämme

Für die Untersuchung auf bakterielle volatile Substanzen wurden fünf verschiedene Bakterienspezies verwendet. Diese wurden ausgewählt, da insbesondere die multiresistenten Stämme dieser Bakterienspezies zu den kritischen Keimen von hoher Priorität in Bezug auf die Antibiotikatherapie zählen [162].

Für die vorliegende Arbeit wurden klassifizierte Referenzstämme, darunter zwei antibiotikaresistente Stämme, des Leibniz-Instituts DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) und der American Type Culture Collection (ATCC) verwendet. Diese sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2 Verwendete Referenzstämme für die VOC-Analyse

Referenzstamm	DSM / ATCC	Abkürzung
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1576	EC
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	EC
(Methicillin-sensitiver) <i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 346	SA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	PA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 30104	KP
<i>Acinetobacter baumannii</i>	DSM 3007	AB
Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC 43300	MRSA
ESBL-produzierender <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	KP ESBL

Die zwei antibiotikaresistenten Stämme, MRSA (ATCC 43300) und Extended-Spectrum-Betalaktamase (ESBL) produzierender *Klebsiella (K.) pneumoniae* (ATCC 700603), werden als Referenzstämme für die Untersuchung auf Antibiotikaempfindlichkeit nach „Clinical and Laboratory Standards Institute“ (CLSI) – Leitfaden genutzt [163]. Deshalb wurden diese Stämme für die VOC-Analyse ausgewählt.

Der MRSA-Stamm (ATCC 43300) weist eine Resistenz gegenüber penicillinasefesten Penicillinen wie Methicillin oder Oxacillin auf. Der Resistenzmechanismus in diesem Stamm wird durch das *mecA*-Gen reguliert [163]. Dieses Gen kodiert ein Penicillin-Bindeprotein (PBP2a) mit einer geringeren Affinität zu Betalaktam-Antibiotika [164]. Dagegen produziert der ESBL-Stamm (ATCC 700603) SHV-18 Betalaktamasen, die weitere Betalaktam-Antibiotika der Drittgenerationscephalosporine (Oxyimino-Cephalosporine) spaltet [165].

3.3.2 Nährmedien und Kultivierung

Die kulturelle Anzucht der Bakterien erfolgte in drei verschiedenen Komplexnährmedien: Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Mueller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB). Diese Medien ermöglichen ein Wachstum einer Vielzahl pathogener Bakterien. Für die VOC-Analyse wurden Bakterien in flüssigen Kulturen und zur Stammhaltung auf dem festen Nährmedium Tryptic Soy Agar (TSA) kultiviert.

Die Flüssignährmedien wurden gemäß der Anleitung des Herstellers jeweils in einer Menge von 800 ml in einer Laborflasche hergestellt und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Es wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert entsprechend der jeweiligen Flüssignährmedien gleich eingestellt ist (BHIB: ~ 7,5, MHB: ~ 7,5, TSB: ~7,4).

Die Herstellung von 800 ml Tryptic Soy Agar für die Agarplatten erfolgte nach dem Rezept für Tryptic Soy Broth mit Zusatz von Agar. Nach Autoklavieren wurden Petrischalen mit Agar unter der sterilen Werkbank gegossen. Die Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Stammhaltung wurden Reinkulturen einmal im Monat auf frischem TSA als Stammkulturen überimpft. Diese wurden für 24 h in einem Brutschrank (37 °C) inkubiert und am Folgetag unter Verschluss mit Parafilm bei 4 °C aufbewahrt. Die Stammkulturen dienen als Ausgangsmaterial für das Ansetzen von Vorkulturen, die für Versuche eingesetzt wurden. Langfristig wurden Bakterien in einem flüssigen Nährmedium mit 10 % Glycerol versetzt bei - 80 °C konserviert.

3.3.3 Probenvorbereitung und IMS-Analyse der Bakterienkulturen

3.3.3.1 Probenvorbereitung

Die ausgewählten Bakterienstämme wurden auf frischen TSA-Platten aus den Stammkulturen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Am Folgetag wurde 30 ml des Flüssignährmediums mit circa einer Bakterienkolonie inokuliert und unter Schütteln bei 37 °C für 20 h inkubiert (Vorkultur). Am Tag der MCC-IMS-Messung wurde eine Startkultur durch Verdünnung der Vorkultur mit dem Nährmedium auf eine experimentenspezifisch definierte optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm hergestellt. Die optische Dichte wurde mit einem Photometer bestimmt. Aus der Startkultur wurde je 5 ml in die autoklavierten 20 ml Headspace-Vials (HS-Vials) überführt und mit autoklavierten Aluminiumkappen mit integriertem PTFE/Silikon-Septum verschlossen. Um den VOC-Blindwert zu erhalten, wurden HS-Vials mit je 5 ml unbeimpftem Flüssignährmedium als Kontrollproben

ergänzend vorbereitet. Alle befüllten HS-Vials wurden bis zur MCC-IMS-Messung in einem Heizblock für 90 Minuten bei 37 °C bebrütet. Die Inkubation der Bakterienkulturen in HS-Vials erfolgte in einem maßgeschneiderten Aluminiumblock im Heizblock.

3.3.3.2 Probennahme

Für die Probennahme wurde der Headspace über Kulturen in HS-Vials über einen 30 cm langen Schlauch, bestehend aus Polytetrafluorethylen (PTFE), einen Luer-Lock-Verbinder und eine Probekanüle in das MCC-IMS-Gerät eingesaugt und auf VOCs analysiert. Hierfür wurde das Septum einer Probeflasche mit zwei Kanülen durchgestochen. Eine Kanüle diente zur Probennahme und die andere zum Druckausgleich im HS-Vial. Die letztere Kanüle wurde mit einem Aktivkohlefilter über Luer-Lock-Verbinder verbunden, um den Einfluss in der Luft vorhandener störender Substanzen auf die Messung zu minimieren. Die Abbildung 5 veranschaulicht eine Probennahme einer Headspace-Probe mit der MCC-IMS.



Abbildung 5 Probennahme einer Headspace-Probe mit der MCC-IMS

3.3.3.3 MCC-IMS-Analyse

Für die Messungen der Bakterienkulturen wurden die voreingestellten MCC-IMS-Parameter übernommen und im Zuge der Vorversuche an nicht-inokulierten Kulturmedien in HS-Vials angepasst. Folgende Einstellungen haben sich als optimal ergeben: MCC = 40 °C, IMS-Detektor = 60 °C, Probeschleife = 50 °C und Probennahme-Dauer = 3 s, entsprechend einem Volumen von circa 10 ml.

Alle Messungen in dieser Arbeit wurden nach dem gleichen Schema durchgeführt. Zum Konditionieren des IMS-Systems fand eine doppelte Messung der Raumluft zum Beginn

einer Messreihe statt. Die Kulturen wurden nacheinander gemessen. Für jede Studie wurden Kulturproben ohne Bakterien (Kontrollproben) zur Bestimmung des Blindwerts vermessen. Um eine mögliche Verschleppung von Markern bzw. Probensubstanzen zu vermeiden, wurden zur Messung eines anderen Probentyps frische Kanülen (Probe- und Druckausgleichkanüle) verwendet.

In den Messpausen sowie über Nacht vor jeder Messung wurde eine Reinigung des MCC-IMS-Systems ausgeführt, um mögliche Analyten-Reste in der MCC Säule zu eliminieren. Dazu erfolgte eine automatisierte Messung der Raumluft in Form einer Dauerschleife mit selbst-aktivem Ventil im Abstand von 4 Minuten.

3.3.4 Studiendesign

Zur VOC-Analyse der Bakterienkulturen wurden sechs verschiedene Untersuchungen realisiert (siehe Tabelle 3). Diese konzentrierten sich auf die methodologischen und biologischen Einflussfaktoren auf VOCs im Headspace der Bakterienkulturen. Eine Differenzierung verschiedener Bakterienspezies, einschließlich antibiotikaresistenter Stämme, stand im Fokus der Studien.

Die Studien wurden nach dem standardisierten Protokoll der Probenvorbereitung (siehe Kapitel 3.3.3.1) implementiert. Die näheren methodologischen Details der Studien sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Anzahl der Replikate bezog sich auf die jeweilige Probe, d. h. den Stamm, die Inkubationszeit, die Bakterienkonzentration bzw. das Mischverhältnis bei Mischkulturen. Ein Teil der bzw. alle Messungen aus der Studie 2 wurden für die Auswertung der Studien 3, 4 und 6 mitverwendet.

Tabelle 3 Studien zur Untersuchung der methodologischen und biologischen Faktoren auf VOCs im Headspace der Bakterienkulturen

Nr.	Studie
1	Einfluss der Inkubationsdauer
2	Einfluss der Nährmedien
3	Differenzierung verschiedener Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme
4	Mischkulturen
5	Einfluss der Bakterienkonzentration
6	Verschiedene Stämme einer Bakterienspezies

Zur Einstellung einer definierten Ausgangsbakterienkonzentration bei der Inokulation diente eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1. Für die Untersuchung des Einflusses der Bakterienkonzentration (Studie 5) wurden die Verdünnungen ausgehend von der Ausgangssuspension (0,1 OD_{600}) angesetzt. Bei den Mischkulturen (Studie 4) wurde eine

Ausgangssuspension (0,1 OD₆₀₀) jeweils für *Staphylococcus (S.) aureus* und *K. pneumoniae* hergestellt. Die beiden Ausgangssuspensionen wurden zu den drei verschiedenen Verhältnissen: 3:1, 1:1 und 1:3 (*S. aureus* zu *K. pneumoniae*) gemischt.

Tabelle 4 Details zu den Studien zur Headspace-Analyse der Bakterienkulturen

Studie	Referenzstamm	DSM / ATCC	Nährmedium	Inkubationsdauer	Bakterienkonzentration	Anzahl der Replikate (n)
1	EC	DSM 1157	TSB	30, 60 und 120 Min.	0,1 OD ₆₀₀	3
	PA	DSM 1117				
	SA	DSM 346				
2	AB	DSM 30007	BHIB MHB TSB	90 Min.	0,1 OD ₆₀₀	11
	EC	DSM 1576				
	KP	DSM 30104				
	PA	DSM 1117				
	SA	DSM 346				
3*	MRSA	ATCC 43300	TSB	90 Min.	0,1 OD ₆₀₀	10
	KP ESBL	ATCC 700603				
4	KP	DSM 30104	TSB	90 Min.	0,1 OD ₆₀₀ Mischverhältnis: 1:3, 1:1 und 3:1	10
	SA	DSM 346				
5	KP	DSM 30104	TSB	90 Min.	0,01; 0,0175; 0,025 und 0,05 OD ₆₀₀	3
6	EC	DSM 1103	TSB	90 Min.	0,1 OD ₆₀₀	DSM 1576: 11
	EC	DSM 1576				DSM 1103: 10

* alle Stämme von der Studie durch zwei resistente Stämme erweitert

Im Rahmen der Studie 2 erfolgte die Probenvorbereitung sowie die Headspace-Analyse der Bakterienkulturen an drei unterschiedlichen Tagen, um parallel die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen. Zur Bewertung des Einflusses der Nährmedien auf VOC-Muster wurden Bakterien in drei Komplexnährmedien: BHIB, MHB und TSB kultiviert. Die Zusammensetzung dieser Nährmedien ist in der Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5 Zusammensetzung der Komplexnährmedien: Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Mueller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB)

	BHIB (in g/l)	MHB (in g/l)	TSB (in g/l)
Komplexe Naturprodukte	– Proteosepepton (10,0) – Rinderherzinfusion (5,0) – Kalbshirninfusion (12,5)	– Caseinpepton, säurehydrolysiert (17,5) – Rinderinfus (2,0)	– Caseinpepton, pankreatisch (Trypton) (17,0) – Pepton aus Sojamehl (3,0)
Energiequelle	Glucose (2,0)	Maisstärke (1,5)	Glucose (2,5)
Phosphatpuffer	Dinatriumhydrogenphosphat (2,5)	-	Dikaliumhydrogenphosphat (2,5)
Salze	Natriumchlorid (5,0)	-	Natriumchlorid (5,0)

3.4 *In-vitro* Untersuchung der Virus-infizierten Zellkulturen

Neben Inflenzaviren treten Atemwegsinfektionen mit Respiratorischem Synzytial-Virus (RSV) im Rahmen saisonaler Epidemien auf. Deshalb wurde RSV als Virus für die Machbarkeitsstudien ausgewählt. Außerdem lassen sich die RS-Viren im Vergleich zu Influenza-Viren leichter in Zellkulturen kultivieren. HEp-2-Zellen (humane Epithelzellen Typ 2) wurden als Zelllinie für die Kultivierung von RS-Viren herangezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche an Zellkulturen mit und ohne RSV-Infektion durchgeführt. Die Durchführung der MCC-IMS-Analysen an virusinfizierten Zellen sowie die Probenvorbereitung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Präklinische Validierung“ von Dr. Grunwald am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI, Leipzig. Hierfür wurden die HEp-2-Zellen freundlicherweise von seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Die Versuchsreihe ohne RSV-Infektion diente zur Durchführung von Vorversuchen, Etablierung einer Probennahme-Methode sowie Identifizierung von HEp-2 zellspezifischen VOCs.

Der verwendete Virusstamm sowie die verwendete Zelllinie für die vorliegende Arbeit sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 Virusstamm und Zelllinie

Virus und Zelllinie	Bezugsquelle
RSV-A/Long, Laborisolat des Respiratorischen Synzytial-Virus, Subgruppe A, Stamm long	ATCC (VR-26)
HEp-2, humane Epithelzellen Typ 2	ATCC (CCL-23)

3.4.1 MCC-IMS-Analyse von Zellkulturen ohne RSV-Infektion

3.4.1.1 Kultivierung und Aussaat der HEp-2-Zellen

Die HEp-2-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen mit 12 ml Zellkulturmedium bei Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit hohem Glukosegehalt supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (h. i. FBS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) verwendet. Die Zellen wurden im vier- bis fünftägigen Rhythmus passagiert. Hierzu wurde das alte Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml frisches Zellkulturmedium

überführt und bei 300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen vom Überstand wurden die gewonnenen Zellen im Verhältnis 1:7 bis 1:12 in neue Zellkulturflaschen mit frischem Zellkulturmedium ausgesät und weiterkultiviert. Für die Aussaat der Zellen in einer gewünschten Menge, wurden die Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

3.4.1.2 Probenvorbereitung für die MCC-IMS-Analyse

Für die IMS-Untersuchungen wurden die HEp-2-Zellen in einer bestimmten Zelldichte in T25-Flaschen in 4 ml Zellkulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen, mit PBS gewaschen und 4 ml DMEM mit 1 % Pen-Strep hinzugegeben. Darauf folgte eine dreistündige Inkubation mit anschließendem Medienwechsel gegen DMEM mit 1 % h. i. FBS und 1 % Pen-Strep. Parallel wurden frische T25-Zellkulturflaschen mit 4 ml DMEM mit 1 % h. i. FBS und 1 % Pen-Strep ohne Zellen als Kontrollproben vorbereitet. Alle Zellkulturflaschen mit und ohne HEp-2-Zellen wurden bis zur MCC-IMS-Messung bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 h inkubiert.

3.4.1.3 Versuchsaufbau, Probennahme und MCC-IMS-Analyse

Die Herausforderung in dieser Arbeit lag in der Gewinnung von VOCs aus Zellen für die IMS-Analyse. Einerseits besitzen Viren keinen Metabolismus und sind somit zur Replikation auf Wirtszellen angewiesen. Andererseits handelt es sich bei der verwendeten Zelllinie HEp-2 um adhärente Zellen. Zur Bindung an die feste Oberfläche müssen diese in Zellkulturflaschen, die eine spezielle Beschichtung zur Adhäsion enthalten, kultiviert werden. Diese Flaschen enthalten eine Belüftungskappe mit Filter, um einen Gasaustausch zu gewährleisten. Durch den Gasaustausch könnten die VOCs im Headspace der Zellkulturflaschen verdünnt vorliegen und daher sind diese Gefäße für eine VOC-Analyse nicht optimal.

Deshalb wurden zwei Strategien zur Probennahme der VOCs von Zellen getestet:

- **Zellkultur:** Der Headspace der HEp-2-Zellen in der Zellkulturflasche wurde direkt über einen PTFE-Schlauch in das IMS-Gerät eingesaugt und analysiert. Um das mögliche Entweichen von VOCs zu vermeiden, wurde ein autoklaviertes 17,5 mm Septum aus Silikon und PTFE eine Stunde vor der IMS-Analyse in die Kappe der Flasche eingelegt und anschließend zugeschraubt. Dies erfolgte mittels einer desinfizierten Pinzette unter der sterilen Werkbank. Die Kulturflaschen mit Septum wurden bis zur MCC-IMS-Analyse weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

- **Überstand:** Nach 48-stündiger Inkubation wurden Überstände aus den Zellkulturflaschen entnommen und jeweils 5 ml in autoklavierte Headspace-Vials überführt. Diese wurden mit einer Aluminium-Bördelkappe mit einem integrierten Silikon/PTFE-Septum verschlossen. Durch den Probentransfer können VOCs verloren gehen. Deshalb wurden die HS-Vials mit Überstand vor der IMS-Messung im Heizblock bei 37 °C für 10 Minuten erhitzt, um die VOCs im Headspace anzureichern. Die Probennahme erfolgte wie bei den Bakterienkulturen.

Der Versuchsaufbau mit den Zellkulturen ähnelte dem Aufbau für die Studie mit Bakterienkulturen (siehe Kapitel 3.3.3.2). Für die Absaugung des Headspace der Zellkulturflaschen wurde für die Arbeit unter der sterilen Sicherheitswerkbank ein längerer PTFE-Schlauch (1 m) verwendet (siehe Abbildung 6). Aufgrund des größeren Headspace-Volumens der Zellkulturflasche (45 ml mit Probe) wurde der IMS-Parameter „Dauer der Probennahme“ auf 5 s im Zuge eines Vorversuchs optimiert. Für den Druckausgleich im Headspace wurde die Druckausgleichkanüle mit dem Aktivkohlefilter über einen 1 m PTFE-Schlauch sowie Luer-Lock-Verbinder verbunden. Die MCC-IMS-Messungen der Zellkulturen erfolgten mit den gleichen IMS-Einstellungen wie für die Bakterienkulturen. Für die Headspace-Analyse wurde jede Zellkulturflasche einzeln aus dem Inkubator entnommen. Die Probennahmedauer für die Analyse von Proben in HS-Vials betrug 3 s.



Abbildung 6 Direkte Probennahme in einer Zellkulturflasche mit der MCC-IMS

Vor jeder Messung von Proben fand eine Reinigung des IMS-Systems über Nacht statt. Zwischen den Messungen verschiedener Probentypen wurden Messungen der Umgebungsluft durchgeführt, um die Verschleppung der vorherigen Messung auf die andere Messung zu reduzieren. Am Messtag wurde pro Probentyp eine frische Probennahme- sowie eine frische Druckausgleichkanüle verwendet.

Die Probenvorbereitung sowie die Headspace-Analysen über Zellkultur in Zellkulturflaschen sowie Überstand in HS-Vials fand an 2 bzw. 3 unterschiedlichen Tagen statt. Es diente, neben der Überprüfung der Reproduzierbarkeit, zum Herausfiltern von HEp-2 zellspezifischen Peaks aus den Spektren. Im Anschluss erfolgte ein MCC-IMS-Versuch mit verschiedenen Zellkonzentrationen. In diesem wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen Zellkonzentration und Signalintensität der HEp-2 zellspezifischen Peaks existiert. Die methodologischen Aspekte (Zellkonzentration und Anzahl der Replikate) der Versuche „Probennahme“ und „Zellkonzentration“ sind in der Tabelle 7 zusammengefasst. Die Zellkonzentration bezieht sich auf die Zellzahl bei der Aussaat in eine T25-Flasche.

Tabelle 7 Methodologische Aspekte der Versuche für die Headspace-Analysen von Zellkulturen ohne Virusinfektion

Versuch	Probe	Zellkonzentration	Anzahl der Replikate (n)
Probennahme	Zellkultur	2×10^6	8 (Tag 1: n = 3, Tag 2: n = 2, Tag 3: n = 3)
Probennahme	Überstand	2×10^6	6 (Tag 1: n = 3, Tag 2: n = 3)
Zellkonzentration	Zellkultur	$1,33 \times 10^6$, 2×10^6 und $2,66 \times 10^6$	3 (pro Zellkonzentration)

3.4.2 MCC-IMS-Analyse von Zellkulturen mit RSV-Infektion

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Für die MCC-IMS-Analyse der RSV-infizierten Zellkulturen wurden die Proben (HEp-2-Zellkulturen mit und ohne RSV-Infektion) von der Arbeitsgruppe von Dr. Grunwald zur Verfügung gestellt.

Als Proben dienten HEp-2-Zellen kultiviert in T25-Flaschen mit Kulturmedium (DMEM mit 1 % h. i. FBS und 1 % Pen-Strep) mit und ohne RSV-Infektion.

3.4.2.2 Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Studien mit der MCC-IMS an RSV-infizierten Kulturen durchgeführt. Studie 1 bezog sich auf den Einfluss verschiedener Viruskonzentrationen. Studie 2 beschäftigte sich mit der Auswirkung der Virusinfektion auf Zellen im zeitlichen Verlauf.

Für die Studie 1 wurden insgesamt 9 Zellkulturflaschen (T25) mit je $1,5 \times 10^6$ HEp-2-Zellen in 4 ml Zellkulturmedium vorbereitet. Zellen in 6 Zellkulturflaschen wurden mit zwei

verschiedenen RS-Viruskonzentrationen in Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,05 und 0,1 infiziert ($n = 3$ pro Viruskonzentration). Die restlichen drei Flaschen wurden als nicht-infizierte Kontrollproben herangezogen. Alle Kulturflaschen wurden 48 h und 70 h nach der Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit der MCC-IMS gemessen.

In der Studie 2 wurden 10 Zellkulturflaschen (T25) mit je $1,5 \times 10^6$ HEp-2-Zellen in 5 ml Zellkulturmedium mit RS-Viren mit einer MOI von 0,1 inokuliert und die weiteren 10 Flaschen wurden ohne Virusinfektion gleichartig behandelt (Kontrollproben). Der Headspace jeder Flasche wurde zu vier verschiedenen Zeiten 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) analysiert. Parallel erfolgte eine mikroskopische Begutachtung der nicht- und RSV-infizierten Zellen zu jedem Inkubationszeitpunkt.

3.4.2.3 Probennahme und IMS-Analyse

Die Probennahme sowie MCC-IMS-Messung erfolgten nach dem direkten Schema beschrieben im Kapitel 3.4.1.3. Die Proben wurden nacheinander mit der MCC-IMS vermessen. Für jede Probe wurde eine frische Probennahme- und Druckausgleichkanüle verwendet. Nach Beendigung der Probennahme wurde die Kappe mit eingelegtem Septum der jeweiligen Flasche verworfen. Im Anschluss wurde die Flasche mit einer frischen Kappe verschlossen. Für die weiteren Zeitmessungen wurden die Zellkulturflaschen in den Inkubator zurückgestellt und weiter inkubiert.

3.5 *In-vivo* Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen

Die Durchführung der Atemluftmessungen mit der MCC-IMS erfolgte am Klinikum Bayreuth.

3.5.1 Patienten

Während der Influenzaepidemie 2020 wurden Patienten mit Verdacht auf eine Influenza-A-Virusinfektion in der Notaufnahme des Klinikums Bayreuth untersucht. Eingeschlossen wurden 20 weibliche und männliche Patienten im Alter von ≥ 18 Jahren und vier weitere asymptomatische klinische Mitarbeiter. Bei der Aufnahme wurde von allen untersuchten Personen ein Nasopharyngealabstrich für die PCR-Analyse genommen.

Aufgrund der Präventionsmaßnahmen bei der aufkommenden COVID-19-Pandemie flaute die Influenza-A-Epidemie 2020 rapide ab. Mit gleichem Protokoll wurde die Studie auf

Patienten infiziert mit Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (SARS-CoV-2) ausgeweitet. Zwischen dem 8. April und dem 7. Mai 2020 wurden 51 weibliche und männliche Patienten (Alter \geq 18 Jahre) mit Verdacht auf eine SARS-CoV-2 Infektion rekrutiert, die alle eine PCR des Nasopharyngealabstrichs erhielten.

Innerhalb von 24 Stunden nach der Aufnahme wurden alle Patienten zur Teilnahme an der Studie zur Atemluftanalyse mit der MCC-IMS gebeten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Erlangen (Nr. 426_18 B) genehmigt und nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki, der guten klinischen Praxis und Datenschutz-Grundverordnung implementiert. Ergänzend wurde die Studie bei ClinicalTrials.gov (NCT04282135) registriert. Vor der Studienteilnahme wurde von jedem Patienten eine schriftliche dokumentierte Einwilligungserklärung eingeholt.

3.5.2 Virusnachweis mit PCR

Nasopharyngealabstriche wurden mit Reverse-Transkriptase (RT)-PCR auf Influenza-A bzw. SARS-CoV-2 Infektion getestet. Die PCR-Untersuchungen wurden im Mikrobiologielabor des Klinikums Bayreuth durchgeführt. Die Methodik ist in Anhang 1.2 beschrieben.

3.5.3 Atemluftanalyse mit der MCC-IMS

Die Atemluftanalyse wurde mit einem anderen baugleichen MCC-IMS-Gerät der Firma STEP im Vergleich zu den *in-vitro* Untersuchungen am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI in Leipzig durchgeführt. Folgende IMS-MCC-IMS-Einstellungen wurden vorgenommen: MCC = 60 °C, IMS-Detektor = 60 °C, Ventil = 60 °C und Probenahme-Dauer = 10 s. Alle Atemluftmessungen von Patienten wurden durch das Klinikum Bayreuth durchgeführt. Bezüglich der Probennahme darf auf die Publikationen verwiesen werden [166, 167].

Sowohl Influenza-A- als auch Corona-Viren greifen den humanen Respirationstrakt an. Im Nasen-Rachenraum liegen die Influenza-Viren in hoher Konzentration vor [168]. Das trifft auch auf SARS-CoV-2-Viren im Anfangsstadium der Infektion zu [169–171]. Deshalb wurde die Nasenatemluft als Probe zur MCC-IMS-Analyse verwendet.

Die Atemluft der Patienten wurde in den ersten 24 Stunden nach der stationären Aufnahme mit der MCC-IMS analysiert, um eine genügende Viruslast im oberen Atemtrakt sicherzustellen. Nach jeder Messung wurde das Probeentnahmesystem gewechselt.

3.6 Datenauswertung

3.7 Verarbeitung der IMS-Daten

3.7.1 Struktur der MCC-IMS-Daten

Als Resultat einer MCC-IMS-Analyse ergeben sich mehrere Ionenmobilitätsspektren mit einer Länge von 20,48 ms bzw. 2048 Messpunkten (siehe Abbildung 7). In den Spektren sind die Analyten-Peaks in Abhängigkeit der Driftzeit [ms] bzw. Messpunkt auf der Abszisse und der Signalintensität [V] auf der Ordinate dargestellt.

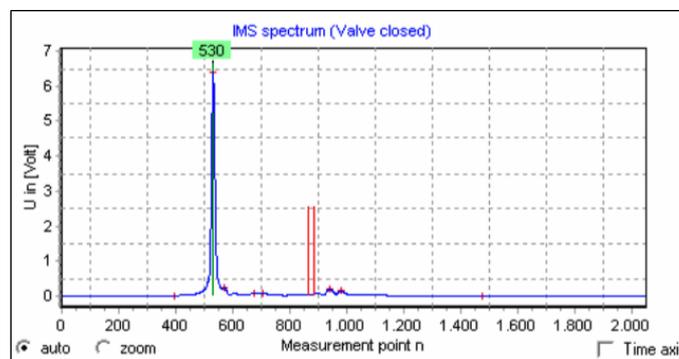


Abbildung 7 Darstellung eines IMS-Spektrums ausgegeben vom IMS-Gerät [172]

Mit den genutzten IMS-Einstellungen wurden in dieser Arbeit pro Messung 250 Spektren aufgenommen; pro Sekunde ein Spektrum. Durch die Kopplung der IMS mit der MCC entspricht dies ein Spektrum zu jeder Sekunde der Retentionszeit [s].

Um die Ergebnisse einer MCC-IMS-Messung, bestehend aus 250 Spektren, darzustellen, wurde eine Datenmatrix in Form einer Heatmap mittels der Software OriginPro Version 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) generiert. Wie bereits im Kapitel 2.1.4.1 beschrieben, sind VOC-Peaks im IMS-Chromatogramm durch drei Parameter: Retentionszeit [s], Driftzeit [ms] und Signalintensität [V] charakterisiert.

Die Peaks bilden zusammen ein charakteristisches VOC-Muster für eine Probe. Für die Datenauswertung in dieser Arbeit wurden in erster Linie die Muster der Peaks ohne Substanzidentifikation hinter dem RIP betrachtet. Aus diesem Grund wurde nicht näher analysiert, ob einer der Peaks ein Monomer, Dimer oder Trimer einer VOC-Substanz darstellt.

Um die verschiedenen Daten bei den auftretenden Schwankungen in Druck und Temperatur besser zu vergleichen, wurde die relative Driftzeit (rel. td) berechnet. Diese wurde durch Division der Analyten-Driftzeit durch die Driftzeit des RIP ermittelt.

3.7.2 Auswertung der MCC-IMS-Daten

Die MCC-IMS Daten wurden sowohl visuell über Spektren als auch mit Hilfe einer Klassifizierungssoftware (AirInterpreterGUI) ausgewertet. Das Auswertungsprinzip dieser Software ist in der Diplomarbeit und in Publikationen von R. Purkhart beschrieben [116, 143, 173].

Für die visuelle Auswertung der Spektren der *in-vitro* Messungen des Headspaces über den Kulturen, wurde ein Spektrum aus dem arithmetischen Mittel mehrerer Messungen einer Probe (Probenspektrum) gebildet. Aufgrund der Druckschwankungen in der IMS-Driftrohre, die unter anderem mit den Umgebungsbedingungen assoziiert sind, bewegte sich der RIP im Driftzeitbereich zwischen 4,0 und 4,3 ms. Das Zeitverhältnis der Analyten-Peaks zum RIP bleibt gleich, unerheblich davon bei welcher Driftzeit (td) der RIP liegt. Deshalb wurde der RIP arbiträr auf 4 ms (td) gesetzt, um die Spektren besser vergleichen zu können. Die Spektren mehrerer Messungen jeweiliger Proben wurden entweder als Heatmap (IMS-Chromatogramm) oder eindimensional als Probenspektrum (Peakverlauf) analysiert. Um die Ergebnisse in Heatmaps besser miteinander vergleichen zu können, wurden gemittelte Differenzspektren aus den Probespektren und den dazugehörigen gemittelten Kontrollproben erstellt. Die Peakverläufe für den Spektrenvergleich wurden mit Microsoft Excel (Version 2019) aus den IMS-Daten erstellt.

Die VOC-Peaks in Spektren verschiedener Messungen wurden mit der AirInterpreterGUI-Software näher ausgewertet. In dieser sind die Datenvorverarbeitungs-Schritte (Basislinienkorrektur, Glättung) bereits implementiert. Das darauffolgende Hauptprinzip besteht aus zwei Schritten: Peakerkennung und Clustering von Peaks. Im ersten Schritt wird ein Schwellenwert (Signalintensität) für die Peakerkennung festgelegt. Nur Peaks über der festgelegten Signalintensität werden als relevante Peaks für die Analyse definiert und der Rest dem Grundrauschen zugeordnet. Die Peakerkennung erfolgte über lokale Maxima mittels 8-connected-Nachbarschaft. Im zweiten Schritt werden Peaks über den euklidischen Abstand mit Hilfe des hierarchischen Complete-Linkage-Clusterverfahrens zu einem Peak-Cluster zusammengeführt. Die Peaks mit ähnlicher Retentionszeit (t_r) und Driftzeit in verschiedenen Messungen werden zu einem Peak-Cluster kombiniert. Das Clustering basiert auf der Annahme, dass jeder Peak-Cluster eine bestimmte Substanzkomponente einer

Probe repräsentiert. Durch diesen Ansatz wird das Problem mit Peaks, die von einer Messung zur anderen in ihrer Position leicht verschoben sind, umgangen.

Mit der Software können die Spektren in Form von Heatmaps unter Verwendung verschiedener Parametereinstellungen zur Auswertung eingegrenzt werden. In der Software kann eingestellt werden, ab welcher Driftzeit die Peaks analysiert werden. Die „Region of Interest“ (ROI) ist in der Software auf eine Länge von 500 Messpunkten im Abstand von 10 μ s Driftzeit vorgegeben. Die verwendeten Softwareeinstellungen für diese Arbeit sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8 Verwendete Parametereinstellungen für die Clusteranalyse mittels AirInterpreter-GUI

Parameter	<i>In-vitro</i> Untersuchung		<i>In-vivo</i> Untersuchung (Atemluft)	
	Bakterienkulturen	(Virus-) Zellkulturen	Influenza-A	SARS-CoV-2
Schwellenwert für die Peakerkennung [V]	0,05		0,01	0,05
Driftzeitbereich [ms]	4 - 9		2,4 – 7,4	
Retentionszeitbereich [s]	1 - 253	1 - 255	1 - 200	
Clustergröße in tr [s] x td [0,01 ms]	3 x 3		5 x 5	
RIP-Korrektur	aktiviert		deaktiviert	
Fast-Clustering	deaktiviert		aktiviert	deaktiviert

In den *in-vivo* Untersuchungen wurde ein anderes, baugleiches IMS-Gerät des gleichen Herstellers verwendet. Bei diesem Gerät war der RIP circa bei einer Driftzeit von 2,4 ms, bei den *in-vitro* Untersuchungen bei 4 ms. In beiden Fällen wurde der ausgewertete Driftzeitbereich „ROI“ beginnend nahe dem RIP für die Analyse verwendet. Die Dauer der Probennahme ist im Retentionszeitbereich inbegriffen, weshalb der Retentionszeitbereich bei *in-vitro* Untersuchungen auf die Probennahme-Dauer angepasst wurde. In der Software wurden die importierten Messungen einzeln zu den jeweiligen Gruppen (z. B. Kontrollen, Bakterienspezies, Infektion) zugeordnet, die miteinander verglichen werden sollten.

Vor dem Start der Analyse wurden die Clustergröße eingestellt und die RIP-Korrektur sowie optional das „Fast-Clustering“ aktiviert. Mit der RIP-Korrektur wurden die Peaks am RIP ausgerichtet. Eine Clustergröße von z. B. 3x3 bedeutet, dass die Peaks im Bereich 3 s (tr) x 30 μ s (td) zu einem Cluster zusammengefasst werden. Die Einstellung „Fast Clustering“ dient zur Verringerung der Rechenzeit.

Als Output der Clusteranalyse ergibt sich ein Textfile. In diesem sind die Werte aller erkannten Peak-Cluster in Signalintensität [V] nach Messung und Clusternummer mit

Peakkoordinaten im IMS-Chromatogramm sortiert. Diese Daten wurden für die weitere statistische Analyse verwendet.

Für die Analyse der *in-vitro* Daten wurde ein semi-automatisierter Ansatz zur Peakerkennung angewendet. In diesem Fall wurde eine automatisierte Analyse der IMS-Daten mit der Software (AirInterpreterGUI) durchgeführt. Die Peaks, die nach dem Software-Algorithmus falsch getrennt wurden, wurden manuell zusammengefügt. Im Anschluss wurde die von der Software resultierende Peakliste manuell angepasst.

3.8 Statistische Analyse

Die VOC-Peaks wurden mit Hilfe der Klassifizierungssoftware als Cluster identifiziert (beschrieben im Kapitel 3.7.2) und weiter mit statistischen Methoden analysiert. In allen statistischen Untersuchungen wurde die Signalintensität der Cluster in Volt als Schwellenwert für die Unterscheidung betrachtet.

Die VOCs (Cluster) wurden für jede Untersuchung je nach der Fragestellung non-targeted oder targeted analysiert und unterschiedlich statistisch ausgewertet (siehe Tabelle 9). Beim non-targeted Ansatz wurden alle von der Klassifizierungssoftware identifizierten Cluster analysiert, dagegen in der targeted Analyse das Verhalten bestimmter Cluster näher untersucht. Als statistische Methoden kamen die lineare kanonische Diskriminanzanalyse (DA) mit oder ohne schrittweise Methode, Hauptkomponentenanalyse (PCA), Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analyse, Regressionsanalyse sowie Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz.

Tabelle 9 Verwendete Datenanalysestrategien und statistische Methoden für *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen

Untersuchungen	Datenanalyse-Strategie	Statistische Methode
1. <i>In-vitro</i> Untersuchung der Bakterienkulturen		
1.1 Einfluss der Inkubationsdauer	Non-targeted	ROC-Analyse
1.2 Einfluss der Nährmedien		
1.2.1 VOCs freigesetzt von Nährmedien	Non-targeted	PCA
1.2.2 VOCs freigesetzt von Bakterien	Non-targeted	DA
1.2.3 Reproduzierbarkeit der Methode	Targeted	Deskriptiv
1.3 Differenzierung verschiedener Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme	Non-targeted	DA ROC-Analyse
1.4 Mischkulturen	Targeted	Regressionsanalyse
1.5 Einfluss der Bakterienkonzentration	Targeted	Regressionsanalyse
1.6 Verschiedene Stämme einer Bakterienspezies	Targeted	Mann-Whitney-U-Test
2. <i>In-vitro</i> Untersuchung der Zellkulturen mit und ohne RS-Viren		
2.1 Vergleich der Probennahme-Strategien	Non-targeted	ROC-Analyse
2.2 Einfluss verschiedener Konzentrationen der HEP-2-Zellen	Targeted	Regressionsanalyse
2.3 Einfluss verschiedener RS-Viruskonzentrationen	Non-targeted und targeted	ROC-Analyse
2.4 Einfluss der RSV-Infektion im Rahmen des Zeitverlaufs	Non-targeted und targeted	ROC-Analyse, Mann-Whitney U-Test
3. <i>In-vivo</i> Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen		
3.1 Influenza-A	Non-targeted	DA*
3.2 SARS-CoV-2	Non-targeted	DA*

* mit schrittweiser Methode

Die Daten, die non-targeted untersucht wurden, wurden für jede Teiluntersuchung der *in-vitro* Untersuchungen separat mit der Clusteranalyse-basierten Klassifizierungssoftware analysiert. Dies hat zur Folge, dass die Cluster von der Klassifizierungssoftware in c_Nr. ohne Bedeutung nummeriert wurden. Die Cluster von allen Teiluntersuchungen einer Hauptuntersuchung wurden zusammengeführt und nach der Retentionszeit und dann nach der Driftzeit sortiert und neu nummeriert. Ein Teil der Cluster trat in mehreren Untersuchungen auf. Für diese Cluster wurden die Retentions- sowie die Driftzeit der Mittelwert berechnet.

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS Version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA), Stata 16 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) und Microsoft Excel Version 2019 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) durchgeführt. Die graphischen Abbildungen und Tabellen wurden mittels Microsoft Excel Version 2019 und der Software OriginPro Version 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) erstellt.

3.8.1 Prinzip der Diskriminanzanalyse und ROC-Analyse

Die Prinzipien der Diskriminanz- und ROC-Analyse in Bezug auf diese Arbeit werden in diesem Abschnitt detaillierter erörtert.

Bei der linearen kanonischen DA handelt es sich um ein multivariates Klassifikationsverfahren. Diese Methode wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Gruppenunterschiede hinsichtlich der ausgewählten Cluster eingesetzt. In der Analyse wurden Diskriminanzfunktionen als lineare Kombinationen der unabhängigen Variablen (Cluster) gebildet, die die beste Diskrimination zwischen den Gruppen ermöglichen [156]. Mit diesen Funktionen wurden die Proben anhand ihrer Merkmale (Variablen) in Gruppen klassifiziert und deren Gruppenzugehörigkeit prognostiziert. Die Klassifizierungsgüte der Diskriminanzfunktionen wurde im Anschluss mit Leave-One-Out-Kreuzvalidierung eingebettet in der SPSS-Software validiert. [174]

Der Output einer Diskriminanzanalyse ist unter anderem eine Klassifizierungstabelle sowie ein Scatterplot. In der Klassifizierungstabelle wird die Anzahl der korrekt und falsch klassifizierten Proben für die jeweiligen Gruppen angegeben. Der Scatterplot visualisiert die Streuungen der Proben in Abhängigkeit der Diskriminanzfunktionen und dient zur Untersuchung der Beziehungen zwischen den Gruppen.

Bei einer hohen Anzahl an unabhängigen Variablen kann die schrittweise Methode der Diskriminanzanalyse bei der Selektion von Variablen für das Modell hilfreich sein. Hierbei werden Variablen automatisch aufgenommen, die den Gesamtwert von Wilks' Lambda am besten minimiert [156, 174]. Dies geschieht durch schrittweise Überprüfung einzelner Variablen, in dem sie in das Modell eingefügt und ggf. auch herausgenommen werden. Parallel wird der Beitrag einzelner Variablen zur signifikanten Änderung des Lambda-Werts mittels F-Statistik bewertet [174]. Als Signifikanzniveaus (F-Wahrscheinlichkeit) wurden in dieser Arbeit für die Aufnahme 0,05 und den Ausschluss von Variablen 0,1 verwendet.

Die ROC-Analyse wurde als statistisches Verfahren zum Finden von Clustern als potenzielle Klassifikatoren zur Unterscheidung verwendet. Die Aussagekraft verschiedener Cluster kann über die Fläche unter der Kurve (AUC) der ROC-Kurve bestimmt und miteinander verglichen werden. Je höher die AUC ist, desto besser ist die Diskriminierungsfähigkeit eines Clusters. Neben AUC können über ROC-Kurven die Sensitivität und Spezifität eines Clusters für verschiedene Cut-Off-Werte in Signalintensität [V] berechnet werden. [175, 176]

3.8.2 *In-vitro* Untersuchung der Bakterienkulturen

Vor der statistischen Auswertung erfolgte im ersten Schritt der non-targeted Datenanalyse eine Variablenselektion. Der Datensatz nach der Clusteranalyse enthielt sowohl relevante als auch irrelevante Cluster. Im Headspace der Kulturen sind nicht nur VOCs von Bakterien, sondern auch von Nährmedien sowie Materialien der Flasche mit Verschluss und des Probennahmesets vorhanden. Relevante VOC-Cluster, die als potenzielle Marker für Bakterien dienen, wurden anhand nachfolgender Kriterien selektiert:

- (a) Bei mindestens 80% der Replikate der jeweiligen Bakterienspezies findet sich der Peak. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs ($n = 3$) wurde dieses Kriterium nicht für die Untersuchung 1 angewendet.
- (b) Jede Bakterienspezies weist einen statistisch signifikant höheren Medianwert als die Kontrollproben zu jedem Zeitpunkt der Inkubation bzw. in dem jeweiligen Nährmedium auf (Mann-Whitney-U-Test). Werte mit einem p-Wert kleiner als 0,05 wurden in dieser Arbeit als statistisch signifikant eingestuft.

Das Kriterium (b) basiert auf der Annahme, dass die Signalintensität der VOC-Cluster durch die abgegebenen VOCs der vorhandenen Bakterien erhöht wird. Da für die Signalintensitäten der VOC-Cluster in MCC-IMS-Spektren keine Normalverteilung angenommen wurde, wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrisches Verfahren zur Anwendung gebracht [177].

Die selektierten Cluster wurden für jede Untersuchung unterschiedlich statistisch analysiert (siehe Tabelle 9).

Untersuchung 1.1 - Zur Evaluierung des Einflusses der Inkubationsdauer wurden diskriminatorische Cluster für jede Bakterienspezies zu jedem Inkubationszeitpunkt mittels ROC-Analyse ermittelt. Als Selektionskriterium wurde $AUC \geq 0,8$ gewählt.

Untersuchung 1.2.1 - Um die Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede im VOC-Muster zwischen den drei Nährmedien (BHIB, MHB und TSB) zu visualisieren, wurde die Hauptkomponentenanalyse eingesetzt. Ähnlich wie bei der Diskriminanzanalyse werden hier die Variablen auf Hauptkomponenten (statt Diskriminanzfunktionen) ohne Analyse der Gruppenzugehörigkeit reduziert. Als Variablen wurden Cluster herangezogen, die in mindestens 80 % der Replikate pro Nährmedium vorhanden waren.

Untersuchung 1.2.2 - Die Differenzierung verschiedener Bakterienspezies einschließlich der Kontrolle wurde mittels der Diskriminanzanalyse anhand der selektierten Cluster bzw. der medienunabhängigen Cluster überprüft.

Untersuchung 1.2.3 – Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde anhand der Signalintensität [V] der drei medienunabhängigen Cluster für *K. pneumoniae* in drei Nährmedien im Vergleich zu Kontrollproben (Kapitel 3.3.4) an drei verschiedenen Tagen überprüft. Als Maß für die Variation der Messergebnisse bei wiederholter Durchführung wurde die Präzision als Variationskoeffizient in % (VK %) ermittelt. Der Variationskoeffizient errechnet sich aus dem Quotienten von Standardabweichung und Mittelwert multipliziert mit 100. Die Präzision wurde in der Serie und von Tag zu Tag bestimmt. Für die Ermittlung der Präzision wurden die Daten der Cluster aus der Untersuchung 2 verwendet. Für die Kontrollproben wurden die Variationskoeffizienten aus den ausreißerfreien Werten berechnet, da die Cluster teilweise eine Signalintensität von 0 V in zwei von drei bzw. vier von 5 Messungen aufwiesen. In Anlehnung an den Leitfaden für die „Validierung bioanalytischer Methoden M10“ der Europäischen Arzneimittelagentur [178] gelten Variationskoeffizient-Werte kleiner als 15 % akzeptabel.

Der RIP gilt als eine der bedeutsamsten IMS-Kennzahlen in Bezug auf die Identifizierung von Peaks. Deshalb wurden ergänzend die Schwankungen des RIP in Driftzeit [ms] und Signalintensität [ms] zur Beurteilung der analytischen Genauigkeit des Geräts ermittelt. Für die Bestimmung der Präzision (VK %) des RIP wurde die erste Sekunde der jeweiligen ersten Messung der 54 Messreihen aus der Untersuchung 2 verwendet. Diese Daten wurden an 18 Tagen verteilt über 10 Wochen erhoben. Die Präzision (VK %) des RIP wurde hierbei innerhalb eines Tages und von Tag zu Tag bestimmt. Als Akzeptanzkriterien wurde ein VK kleiner 2 % analog der Systemstabilität bei Chromatographie definiert [179].

Untersuchung 1.3 – Zur Unterscheidung zwischen nicht-resistenten und resistenten sowie innerhalb der nicht-resistenten Bakterien hinsichtlich des VOC-Musters wurde die Diskriminanzanalyse eingesetzt. Um zu untersuchen, ob sich die jeweilige Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme anhand bestimmter VOC-Cluster klassifizieren lassen, wurde ein Klassifizierungsbaum konstruiert. Als Klassifikatoren für die Verzweigung im Baum wurden die VOC-Cluster mit den höchsten AUC-Werten, ermittelt durch die ROC-Analyse, herangezogen. Der Cut-off-Wert mit der höchsten Sensitivität und Spezifität wurde als Entscheidungspunkt verwendet.

Als Variablen für die targeted Datenanalyse wurden die besten drei diskriminatorischen Cluster mit den höchsten AUC-Werten für die jeweilige Bakterienspezies aus der

Untersuchung 2.3 verwendet (siehe Tabelle 27 im Anhang 2.1). Diese wurden mittels ROC-Kurven durch Analyse jeweiliger Bakterienspezies versus andere Stämme und Kontrollen identifiziert.

Untersuchung 1.4 - Das Verhältnis der Signalintensitäten diskriminatorischer Peaks für *S. aureus* und *K. pneumoniae* in den Mischkulturen wurden mittels der Regressionsgerade und dem Bestimmtheitsmaß über die Spektrenverläufe bestimmt.

Untersuchung 1.5 - Zur Evaluation des Einflusses verschiedener Bakterienkonzentrationen wurde der Zusammenhang zwischen der gemittelten Peak-Signalintensität [V] und der Bakteriendichte in OD₆₀₀ mittels Regressionsfunktion in den Spektrenverläufen überprüft. Die Güte der Regression wurde durch das Bestimmtheitsmaß (R²) als Quadrat des Korrelationskoeffizienten bestimmt. Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) für die Peaks wurden über die Standardabweichung des Leerwerts und die Steigung der Regressionsgerade nach der ICH-Richtlinie Q2 (R1) „Validation of Analytical Procedures“ [180] berechnet. Als Leerwert wurden die Peak-Signalintensitäten des nicht-inokulierten Nährmediums (Kontrollproben) herangezogen.

Untersuchung 1.6 - Zur Untersuchung der VOC-Emission durch zwei Stämme der Bakterienspezies *Escherichia (E.) coli* wurden alle für *E. coli* gefundenen Peaks in der Untersuchung 2.3, die sich von der Kontrolle signifikant unterscheiden, als Variablen verwendet. Die Unterschiede der Variablen zwischen den zwei Gruppen der ungepaarten Daten wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ($p \leq 0,05$) statistisch analysiert.

3.8.3 *In-vitro* Untersuchung der Zellkulturen mit und ohne RS-Viren

Die VOC-Peaks als Cluster wurden ähnlich wie für die *in-vitro* Untersuchung von Bakterienkulturen statistisch ausgewertet. Sowohl die targeted als auch die non-targeted Strategie mit Variablenselektion wurde angewendet (siehe Tabelle 9). Die Variablenselektion erfolgte nach den genannten Kriterien: (a) Die Medianwerte für Kulturen mit HEP-2-Zellen bzw. RSV-infizierten Zellen sind größer als bei zellfreien bzw. nicht-infizierten Kulturen (zu dem jeweiligen Zeitpunkt pro Viruskonzentration); (b) Cluster sind in mindestens 80 % oder 2/3 der Replikate (n = 3) präsent.

Zum Finden von diskriminatorischen Clustern für HEP-2-Zellen bzw. für RSV-infizierte Kulturen wurde eine ROC-Analyse ($AUC \geq 0,8$) durchgeführt. In der Untersuchung 2.3 wurden alle infizierten Kulturen gegen nicht-infizierte Kulturen unabhängig von den Zeitpunkten und

der Viruskonzentrationen analysiert, dagegen in der Untersuchung 2.4 zu jedem Zeitpunkt der Infektion (siehe Tabelle 9).

Als Variablen für die targeted Analyse wurden die diskriminatorischen Cluster für HEp-2-Zellen mit den höchsten AUC-Werten herangezogen. Diese dienten als Marker zur Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf den Metabolismus der HEp-2-Zellen. Die Korrelation zwischen den Signalintensitäten der diskriminatorischen Cluster und der HEp-2-Zellkonzentrationen wurde mittels der Regressionsanalyse bestimmt.

3.8.4 *In-vivo* Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen

Die statistische Auswertung der Daten erhoben durch MCC-IMS-Messungen von Atemluft erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Klinikum Bayreuth.

Zur Auswertung der IMS-Daten wurden die Patienten anhand der PCR-Information in Gruppen (positiv/negativ) in Bezug auf die Virusinfektion eingeteilt. Die IMS-Daten von Influenza- und COVID-19 Patienten einschließlich der nicht-infizierten Patienten als Kontrollgruppe wurden mittels der Clusteranalyse non-targeted analysiert. Aufgrund der hohen Kreuzkorrelation einzelner Cluster wurde der Datensatz auf Unterschiede zwischen nicht-infizierten und infizierten Patienten hinsichtlich der VOCs in der Atemluft mittels der schrittweisen Diskriminanzanalyse untersucht.

Ergänzend wurden die Daten für die Validierung basiert auf dem Kennard-Stone Algorithmus (KS) im Verhältnis von 4:1 in einen Trainings- und Validierungssatz geteilt. Beim KS handelt sich um eine computerbasierte Methode zur Selektion von Stichproben. Die Selektion der Stichproben erfolgt in einer schrittweisen Prozedur basierend auf dem euklidischen Abstand zwischen den Proben [181]. Die Proben, die den größten Abstand zu den selektierten Proben aufweisen, werden als repräsentative Proben für den Trainingssatz herangezogen. Die übrigen Proben dienen als Validierungssatz. Mit dem Trainingssatz wurde ein Diskriminanzmodell erstellt und anhand des Validierungssatzes bewertet.

4 Ergebnisse

Für den Ergebnisteil sind die VOC-Peaks in Cluster nach der Position im IMS-Chromatogramm als Clusternummer (c_Nr.) mit der Retentionszeit in Sekunden und der Driftzeit relativ zum Reaktantenpeak, z. B. c_117 (224_1,56), definiert. Die verwendeten Cluster für die Untersuchungen und ihr Auftreten in den untersuchten Gruppen sind in Tabellen im Anhang 2 aufgelistet.

4.1 *In-vitro* Untersuchung der Bakterienkulturen

Die Namen der verwendeten Bakterien wurden für die Tabellen und Abbildungen wie folgt abgekürzt: EC = *E. coli*, SA bzw. MSSA = (Methicillin sensibler) *S. aureus*, PA = *P. aeruginosa*, KP = *K. pneumoniae*, AB = *Acinetobacter (A.) baumannii*, MRSA = Methicillin resistenter *S. aureus* und KP ESBL = ESBL produzierender *K. pneumoniae*.

4.1.1 Einfluss der Inkubationsdauer

Die Emission der VOCs durch eine grampositive (*S. aureus* DSM 346) und zwei gramnegative Bakterienspezies (*E. coli* DSM 1576 und *P. aeruginosa* DSM 1117) wurden im Headspace der TSB-Reinkulturen zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation (30, 60 und 120 min) untersucht.

Im Headspace der Bakterienkulturen wurden insgesamt 66 VOC-Cluster mittels ROC-Analyse mit $AUC \geq 0,8$ zu allen Inkubationszeitpunkten identifiziert (siehe Tabelle 22 im Anhang 2.1). Diese erlauben eine signifikante Unterscheidung zwischen der jeweiligen Bakterienspezies und der Kontrolle (Ctrl.). Wie die Abbildung 8A veranschaulicht, variiert die Anzahl der emittierten VOC-Cluster im Laufe der Inkubationszeit innerhalb der Bakterienspezies. Für *E. coli* und *S. aureus* nimmt die Anzahl der VOC-Cluster mit der Inkubationsdauer zu. Dagegen weist *P. aeruginosa* nach einer Stunde der Inkubation die meisten VOC-Cluster auf.

Unter den VOC-Clustern existieren für jede Bakterienspezies mindestens zwei VOC-Cluster, die zu allen Inkubationszeitpunkten aufgetreten sind (siehe Tabelle 22 im Anhang 2.1). Insgesamt wurden sieben derartige VOC-Cluster gefunden. In der Abbildung 8B-D sind drei dieser Inkubationszeit-unabhängigen VOC-Cluster (c_12, c_13 und c_14) exemplarisch als Boxplots der Signalintensität [V] im Verlauf der Inkubationsdauer für jede Bakterienspezies

dargestellt. Anhand dieser Zeitverläufe ist ersichtlich, dass eine Differenzierung zwischen diesen drei Keimen zu allen Zeitpunkten der Inkubation anhand von VOCs möglich ist.

Als Kompromiss in Bezug auf die Differenzierung verschiedener Bakterienspezies und der Anzahl an VOC-Clustern im Verlauf der Inkubation wurden 90 min als Inkubationszeitpunkt für die weiteren Untersuchungen mit anderen Bakterienspezies herangezogen.

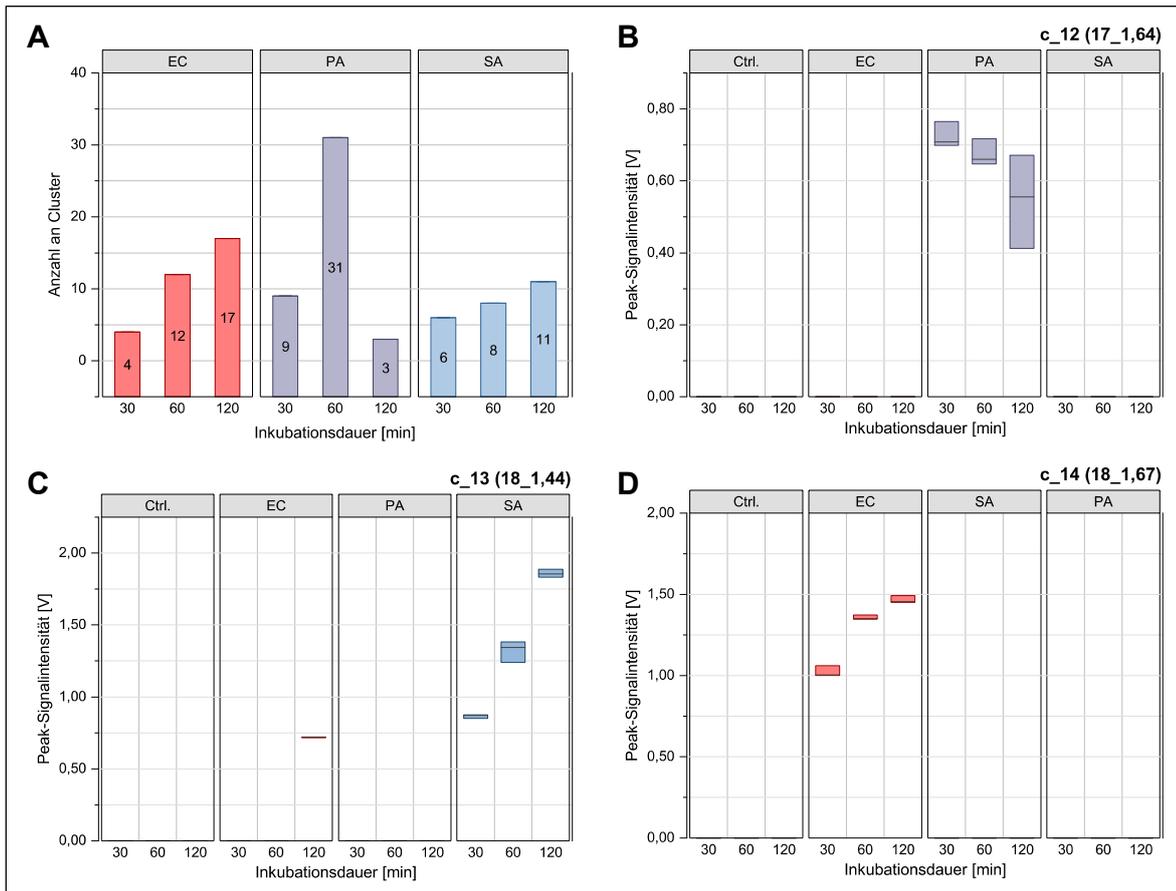


Abbildung 8 Einfluss der Inkubationsdauer auf emittierte VOCs der drei Bakterienspezies: *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA) und *P. aeruginosa* (PA), n = 3. (A) Anzahl der von Bakterien emittierten VOCs abhängig der Inkubationsdauer. (B-D) Boxplots von drei exemplarischen Inkubationszeit-unabhängigen VOC-Cluster für die jeweilige Bakterienspezies.

4.1.2 Bakterien in verschiedenen Nährmedien

In dieser Untersuchung wurde die Differenzierung verschiedener Bakterienspezies anhand des VOC-Musters in verschiedenen Nährmedien sowie der Einfluss verschiedener Nährmedien auf die von Bakterien emittierten VOC-Muster untersucht. IMS-Messungen erfolgten an Reinkulturen der fünf verschiedenen Bakterienspezies *E. coli* DSM 1576, *S. aureus* DSM 346, *P. aeruginosa* DSM 1117, *K. pneumoniae* DSM 30104 und *A. baumannii* in den

drei verschiedenen Komplexnährmedien BHIB, MHB und TSB. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu zeigen, wurden die Bakterienreinkulturen und nicht-beimpften Nährmedien an drei verschiedenen Tagen vorbereitet und mit der IMS analysiert (Tag 1: n = 5; Tag 2: n = 3; Tag 3: n = 3).

4.1.2.1 Nährmedien

Die Nährmedien enthalten Substanzen, die als VOCs im Headspace freigesetzt werden. Die VOC-Profile der drei Nährmedien wurden mittels PCA untersucht. Das Streudiagramm der PCA (siehe Abbildung 9A) visualisiert die Beziehung der drei Nährmedien unter Verwendung der 60 VOC-Cluster (siehe Tabelle 23 im Anhang 2.1) entlang der zwei Hauptkomponenten, die eine Gesamtstreuung von 53,36 % erklären. Dieser Plot zeigt eine klare Separation zwischen den drei Nährmedien. Durch die 1. Hauptkomponente wird TSB deutlich von den zwei anderen Medien getrennt. BHIB und MHB weisen ähnliche Werte für die 1. Hauptkomponente auf, die auf eine Ähnlichkeit im VOC-Profil zwischen BHIB und MHB hindeuten.

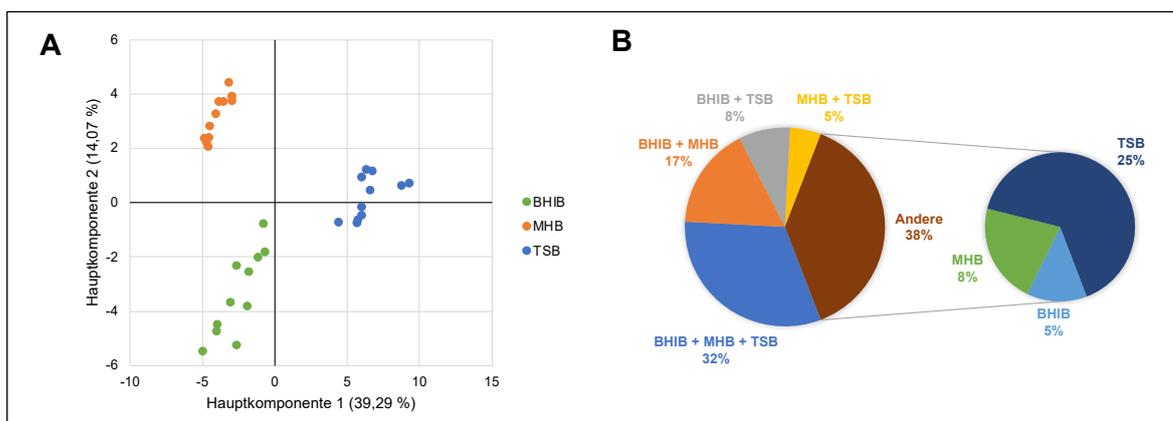


Abbildung 9 Analyse der 60 VOC-Cluster in drei verschiedenen Nährmedien: BHIB, MHB und TSB, n = 11. (A) Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse. (B) Prozentuale Verteilung der gemeinsamen VOCs in drei Nährmedien als Kreisdiagramm.

Die prozentuale Verteilung der VOCs in den drei Nährmedien ist durch das Kreisdiagramm in Abbildung 9B detailliert wiedergegeben. Rund ein Drittel (32 %) der VOCs sind medienunabhängig. Die anderen rund zwei Drittel (68 %) der VOCs treten entweder in zwei der drei Nährmedien oder in nur einem Nährmedium auf. Insgesamt emittieren BHIB und MHB zu 49 % gemeinsame VOCs, wogegen TSB mehr medienspezifische VOCs generiert.

4.1.2.2 Einfluss der verschiedenen Nährmedien

Insgesamt wurden 77 signifikante VOC-Cluster im Headspace der in verschiedenen Nährmedien kultivierten Bakterien detektiert (siehe Tabelle 24 im Anhang 2.1). Circa zwei Drittel dieser VOC-Cluster waren bei der Kultivierung in jedem Nährmedium zu finden (BHIB: 43, MHB: 44, TSB: 39). Die Zusammensetzung der von Bakterien emittierten VOCs ist von dem jeweiligen Nährmedium abhängig (siehe Abbildung 30 im Anhang 2.1).

Abbildung 10 vergleicht die Anzahl der emittierten, signifikanten VOC-Cluster zwischen den Bakterienspezies in drei Nährmedien. Von allen Bakterienspezies setzt *K. pneumoniae* am meisten VOCs frei. *A. baumannii*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* produzieren eine ähnliche Anzahl an VOCs in jedem Nährmedium. Dagegen emittiert *S. aureus* am meisten VOCs in MHB, umgekehrt *E. coli* in BHIB und TSB.

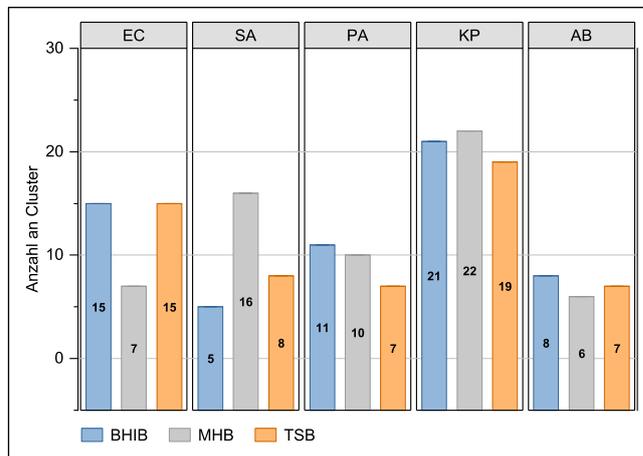


Abbildung 10 Anzahl der von Bakterien emittierten VOC-Cluster in drei Nährmedien. n = 11.

Im Headspace der Bakterienkulturen wurden insgesamt 12 medienunabhängige VOC-Cluster (siehe Tabelle 10) gefunden, die in allen drei Nährmedien präsent waren und einen höheren Signalwert für kultivierte Bakterien als in der Kontrolle des jeweiligen Nährmediums aufwiesen. *K. pneumoniae* emittiert deutlich mehr medienunabhängige VOC-Cluster (7), im Gegensatz zu nur ein bis drei VOC-Clustern der anderen Keime.

Tabelle 10 Medienunabhängige signifikante VOC-Cluster freigesetzt von Bakterien. n = 11.

Cluster	tr [s]	rel. td	EC	SA	PA	KP	AB
c_3	9	1,12			X		
c_4	9	1,20				X	
c_11	17	1,51	X				
c_12	17	1,64					X
c_14	18	1,67	X			X	
c_17	20	1,34	X			X	
c_34	43	1,75				X	
c_35	43	1,89				X	
c_36	44	1,36				X	
c_68	93	1,49					X
c_84	135	1,34		X			
c_117	224	1,56				X	

Ob eine Unterscheidung zwischen Bakterienspezies hinsichtlich der 12 medienunabhängigen Cluster möglich ist, wurde mittels Diskriminanzanalyse mit LOO-Kreuzvalidierung überprüft. Die folgende Klassifikationstabelle (siehe Tabelle 11) liefert das Ergebnis der Gruppenvorhersage auf der Grundlage der Diskriminanzanalyse. Demnach werden insgesamt 92,9 % der Bakterien korrekt der jeweiligen Gruppe zugeordnet. Die Kreuzvalidierung bestätigt die korrekte Zuordnung der Fälle mit 90,9 %. Hierbei werden überwiegend die *S. aureus* Proben falsch in die Kontrollgruppe kategorisiert und umgekehrt.

Tabelle 11 Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse mit 12 medienunabhängigen VOC-Cluster freigesetzt von Bakterien, n = 11.

	Gruppe	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit						Gesamt
		Ctrl.	EC	SA	PA	KP	AB	
Original	Ctrl.	28	0	5	0	0	0	33
	EC	0	33	0	0	0	0	33
	SA	6	0	27	0	0	0	33
	PA	0	0	0	31	0	2	33
	KP	0	0	0	0	33	0	33
	AB	0	0	0	1	0	32	33
Kreuzvalidiert	Ctrl.	27	0	6	0	0	0	33
	EC	1	32	0	0	0	0	33
	SA	6	0	27	0	0	0	33
	PA	0	0	0	30	0	3	33
	KP	0	0	0	0	33	0	33
	AB	0	0	0	2	0	31	33

92,9 % der ursprünglichen gruppierten Fälle ordnungsgemäß klassifiziert.

90,9 % der kreuzvalidierten gruppierten Fälle ordnungsgemäß klassifiziert.

4.1.2.3 Differenzierung verschiedener Bakterien

Für eine praktische Anwendung hinsichtlich der *in-vitro* Identifizierung von Bakterien ist es bedeutsam, in welchem Nährmedium sich die verschiedenen Bakterienspezies am besten differenzieren lassen. Mittels der Diskriminanzanalyse wurde die Diskriminierungsfähigkeit von VOC-Mustern der fünf verschiedenen Keime in jedem Nährmedium analysiert. Als Variablen dienten die signifikanten Cluster in jedem Nährmedium, die einen höheren Signalwert für Bakterien als in der Kontrolle aufweisen.

Die Tabelle 12 zeigt die zusammengefassten Klassifikationsergebnisse der Diskriminanzanalyse. Ausführlichere Ergebnisse können der Abbildung 31 im Anhang 2.1 entnommen werden. In jedem der Nährmedien lassen sich die Bakterien ähnlich gut differenzieren. Die Diskriminanzanalyse erlaubt eine 100 % korrekte Zuordnung der Bakterien in dem jeweiligen Nährmedium. Je nach Nährmedium werden Bakterien in der Kreuzvalidierung zu 95,5 % bis 98,5 % der Fälle korrekt klassifiziert. Gemäß der Kreuzvalidierung wurden ein bzw. zwei der *P. aeruginosa*-Proben in TSB bzw. BHIB falsch zugeordnet. Bei MHB wurden zwei der *P. aeruginosa*-Proben in die Gruppe „*A. baumannii*“ und eine *S. aureus*-Probe in die Kontrollgruppe falsch kategorisiert.

Tabelle 12 Zusammenfassung der Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse zur Unterscheidung der Bakterien in jedem der drei Nährmedien: BHIB, MHB und TSB. n = 11.

	BHIB	MHB	TSB
Diskriminanzanalyse	100,0 %	100,0 %	100,0 %
LOO-Kreuzvalidierung	97,0 %	95,5 %	98,5 %

Um die Komplexität zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit mit TSB weitergearbeitet.

4.1.2.4 Reproduzierbarkeit der Methode

Die Reproduzierbarkeit der medienunabhängigen Cluster (c_35, c_36 und c_117) für *K. pneumoniae* wurde in drei Nährmedien im Vergleich zu Kontrollproben an drei verschiedenen Tagen ermittelt. Diese Cluster wurden im Rahmen der ROC-Analyse für die targeted Datenanalyse als charakteristische Peaks für *K. pneumoniae* identifiziert (siehe Tabelle 27 im Anhang 2.1). Die Präzision (VK %) wurde innerhalb eines Tages und von Tag zu Tag berechnet. In der Tabelle 13 sind die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) sowie Variationskoeffizienten zusammengestellt. Die hervorgehobenen Werte stellen die Abweichungen von den Akzeptanzkriterien dar. Alle ermittelten Variationskoeffizienten für die Nährmedien ohne Bakterien lagen unter dem Schwellenwert der Akzeptanzkriterien

(VK < 15 %). Für *K. pneumoniae* wies die Präzision innerhalb eines Tages zum Teil mehr Variation in der Signalintensität, insbesondere für Cluster 35, auf. Dagegen sind die Signalintensitäten über drei Tage reproduzierbar.

Tabelle 13 Präzision der drei medienunabhängigen Cluster in Signalintensität [V] für *K. pneumoniae* verglichen mit Kontrolle

Tag	Statistische Kennzahlen	c_35 (43_1,89)			c_36 (44_1,36)			c_117 (224_1,56)		
		BHIB	MHB	TSB	BHIB	MHB	TSB	BHIB	MHB	TSB
Nährmedium (Kontrolle)										
Tag 1 (n = 5)	MW	0,000	0,000	0,000	0,255	0,000	0,329	0,000	0,000	0,000
	SD	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
	VK [%]	0,00	0,00	0,00	7,42	0,00	2,75	0,00	0,00	0,00
Tag 2 (n = 3)	MW	0,000	0,000	0,062	0,337	0,000	0,391	0,000	0,000	0,000
	SD	0,000	0,000	0,003	0,013	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
	VK [%]	0,00	0,00	4,90	3,71	0,00	2,19	0,00	0,00	0,00
Tag 3 (n = 3)	MW	0,000	0,000	0,056	0,304	0,000	0,379	0,000	0,000	0,000
	SD	0,000	0,000	0,004	0,014	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000
	VK [%]	0,00	0,00	7,58	4,74	0,00	2,65	0,00	0,00	0,00
Tag zu Tag	MW	0,000	0,000	0,039	0,299	0,000	0,366	0,000	0,000	0,000
	SD	0,000	0,000	0,002	0,003	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
	VK [%]	0,00	0,00	5,55	1,11	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00
<i>K. pneumoniae</i>										
Tag 1 (n = 5)	MW	0,173	0,057	0,229	0,710	0,509	0,685	0,796	0,481	0,828
	SD	0,036	0,005	0,061	0,038	0,018	0,047	0,120	0,039	0,146
	VK [%]	20,65	8,14	26,45	5,39	3,54	6,81	0,00	8,15	17,66
Tag 2 (n = 3)	MW	0,258	0,100	0,276	0,816	0,634	0,692	0,960	0,586	0,883
	SD	0,048	0,003	0,046	0,028	0,009	0,015	0,118	0,029	0,092
	VK [%]	18,60	3,46	16,56	3,44	1,46	2,17	0,00	4,97	10,36
Tag 3 (n = 3)	MW	0,269	0,096	0,267	0,831	0,651	0,709	1,031	0,583	0,925
	SD	0,021	0,016	0,039	0,022	0,015	0,006	0,066	0,045	0,082
	VK [%]	7,67	17,07	14,75	2,63	2,23	0,88	6,42	7,68	8,88
Tag zu Tag	MW	0,234	0,085	0,257	0,786	0,598	0,695	0,929	0,550	0,879
	SD	0,014	0,007	0,011	0,008	0,004	0,021	0,030	0,008	0,035
	VK [%]	5,87	8,49	4,21	1,06	0,73	3,06	3,27	1,44	3,93

n = Anzahl der Proben, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

Die Verlässlichkeit des analytischen Systems wurde anhand der Driftzeit [ms] und Signalintensität [V] des RIP überprüft (siehe Tabelle 14). Die Präzision wurde für die erste jeweilige Messung der Messreihen innerhalb eines Tages und Tag zu Tag bestimmt. In der Driftzeit ist der RIP mit Variationskoeffizienten kleiner 1 % insgesamt robust. Bis auf zwei Werte liegen alle ermittelten Variationskoeffizienten der RIP-Signalintensität unter 2 %. Insgesamt

zeigen die Ergebnisse, dass die Driftzeiten sowie die Signalintensitäten des RIP an 18 Tagen verteilt über 10 Wochen reproduzierbar sind.

Tabelle 14 Präzision des RIP bezogen auf Driftzeit [ms] und Signalintensität [V]

Tag	n	Driftzeit [ms]			Signalintensität [V]		
		MW	SD	VK [%]	MW	SD	VK [%]
Präzision innerhalb eines Tages							
1	2	4,21	0,01	0,17	9,789	0,043	0,44
2	2	4,15	0,01	0,17	9,848	0,006	0,06
3	4	4,16	0,01	0,23	9,739	0,154	1,58
4	3	4,19	0,02	0,48	9,642	0,181	1,87
5	4	4,15	0,01	0,30	9,738	0,087	0,89
6	3	4,15	0,02	0,56	9,620	0,279	2,90
7	3	4,23	0,03	0,59	9,769	0,132	1,35
8	3	4,18	0,02	0,50	9,800	0,063	0,64
9	3	4,18	0,01	0,14	9,705	0,275	2,84
10	3	4,17	0,01	0,28	9,833	0,030	0,30
11	3	4,16	0,02	0,50	9,846	0,023	0,23
12	3	4,19	0,02	0,36	9,861	0,021	0,21
13	3	4,20	0,03	0,63	9,829	0,047	0,48
14	3	4,23	0,01	0,14	9,829	0,035	0,36
15	3	4,20	0,02	0,50	9,836	0,071	0,72
16	3	4,20	0,02	0,36	9,824	0,045	0,46
17	3	4,22	0,02	0,36	9,871	0,009	0,09
18	3	4,30	0,00	0,00	9,752	0,041	0,42
Präzision von Tag zu Tag							
MW			4,19			9,78	
SD			0,04			0,07	
VK [%]			0,89			0,75	

n = Anzahl der Messungen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

4.1.3 Differenzierung zwischen nicht-resistenten und resistenten Bakterien

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob eine Differenzierung innerhalb der nicht-resistenten und zwischen nicht-resistenten und resistenten Bakterienspezies hinsichtlich der VOC-Muster in TSB mit MCC-IMS möglich ist. Als antibiotikaresistente Stämme wurden Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und ESBL-bildender *Klebsiella pneumoniae* herangezogen. Für die Datenanalyse mittels Clusteranalyse und statistischen Methoden wurden die in TSB gewonnenen Messdaten aus der Untersuchung der Bakterien in verschiedenen Nährmedien (Kapitel 4.1.2) mit den Daten von Messungen an Reinkulturen der resistenten Bakterienstämme kombiniert. Die nachfolgenden Ergebnisse wurden bereits publiziert [182].

In den Heatmaps der MCC-IMS-Spektren sind die Unterschiede zwischen den sieben Mikroorganismen anhand des VOC-Musters bereits visuell zu entnehmen (siehe Abbildung 32 im Anhang 2.1). Als Ergebnis der Clusteranalyse gefolgt von der Variablenselektion ergaben sich 63 signifikante VOC-Cluster mit p-Werten $\leq 0,05$, in denen sich Bakterien in höheren Signalwerten von der Kontrolle statistisch abheben (siehe Tabelle 25 im Anhang 2.1). Die meisten VOC-Cluster wurden für resistente Stämme, ESBL-produzierender *K. pneumoniae* (29) und Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (26), gefunden. Unter den nicht-resistenten Bakterien generieren *E. coli* (18) und *K. pneumoniae* (18) verglichen mit Methicillin sensitiven *S. aureus* (8), *A. baumannii* (7) und *P. aeruginosa* (6) mehr VOCs. Einige VOCs (z. B. c_107 und c_116) können nur einem Stamm zugeordnet werden, dagegen andere mehreren Stämmen (z. B. c_2, c_12 und c_13). Auffällig ist, dass insbesondere *E. coli* und Klebsiellen, sowohl der sensitive als auch der resistente Stamm, einige gemeinsame Peaks teilen, wohingegen die anderen Keime und die Kontrolle kein Signal für diese Peaks aufweisen (siehe Abbildung 11).

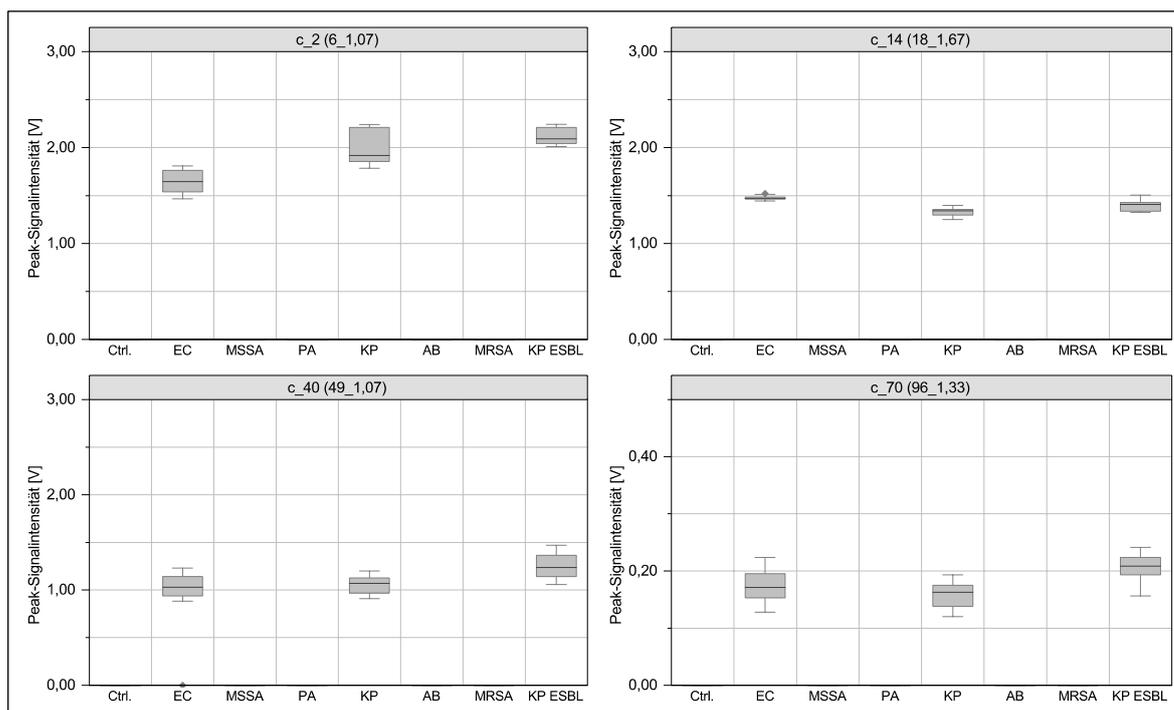


Abbildung 11 Boxplots der vier exemplarischen VOC-Cluster, die nur im Headspace der *E. coli*-, *K. pneumoniae*- und ESBL produzierenden *K. pneumoniae*-Kulturen präsent waren. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.

Um die Differenzierung zwischen den sieben Bakterienstämmen hinsichtlich der 63 VOC-Cluster zu analysieren, wurde eine Diskriminanzanalyse durchgeführt. Ein drei-dimensionaler Scatterplot wurde für die ersten drei Diskriminanzfunktionen erstellt. In diesem Plot

sind Bakterien sowie die Kontrolle als farbige Datenpunkte aufgetragen (ein Datenpunkt für jedes Replikat). In Abbildung 12A ist zu sehen, dass sich alle Gruppen anhand der drei Diskriminanzfunktionen klar differenzieren lassen. Alle drei Funktionen zusammen erklären eine Gesamtstreuung von 99,2 %. Die Trennung mit höchster Distanz zwischen den Bakteriengruppen wurde für *E. coli* und für die beiden *K. pneumoniae*-Stämme gefunden. Im Gegensatz dazu sind die Datenpunkte der *S. aureus*-Stämme (MSSA und MRSA) nah beieinander, was auf eine Ähnlichkeit in VOC-Muster zwischen den beiden Stämmen deutet. Entsprechend der Klassifizierungsergebnisse können alle Bakterienstämme mittels LOO-Kreuzvalidierung zu 100 % korrekt der jeweiligen Gruppen zugeordnet werden (siehe Abbildung 12B).

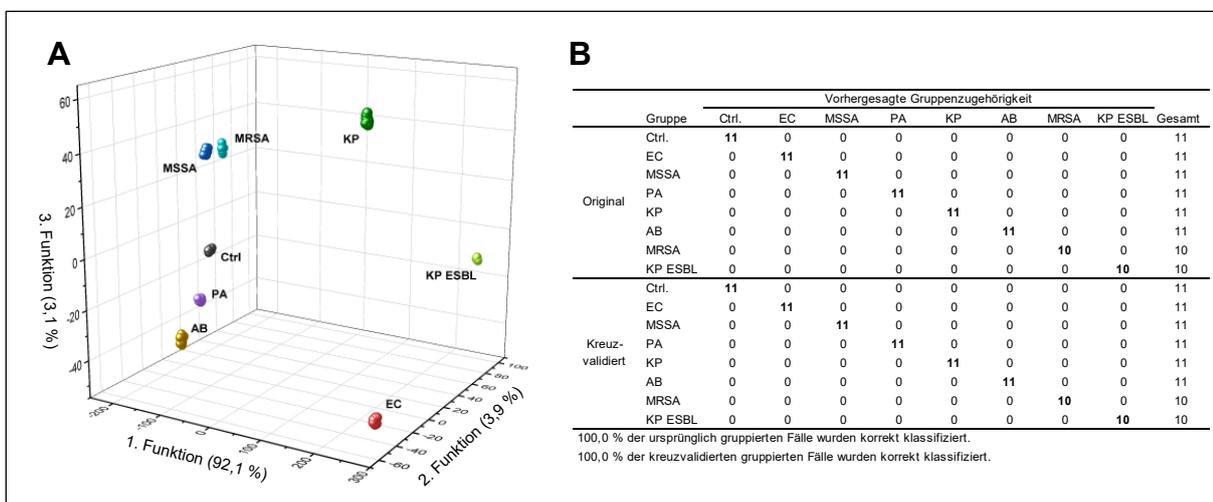


Abbildung 12 Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse mit 63 VOC-Cluster zur Differenzierung zwischen den resistenten und nicht-resistenten sowie innerhalb der nicht-resistenten Bakterienstämme. A: 3D-Plot, B: Klassifizierungstabelle. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.

Zur Überprüfung der Klassifizierung der einzelnen Bakterienstämme hinsichtlich bestimmter VOC-Cluster wurde ein Klassifizierungsbaum konstruiert (siehe Abbildung 13). Eine ROC-Analyse wurde angewendet, um die obengenannten 63 VOC-Cluster als Klassifikatoren für die Aufspaltung der Bakterien im Klassifizierungsbaum zu selektieren. Für mehrere Bakterienstämme konnte mehr als ein VOC-Cluster für die Verzweigung verwendet werden [182].

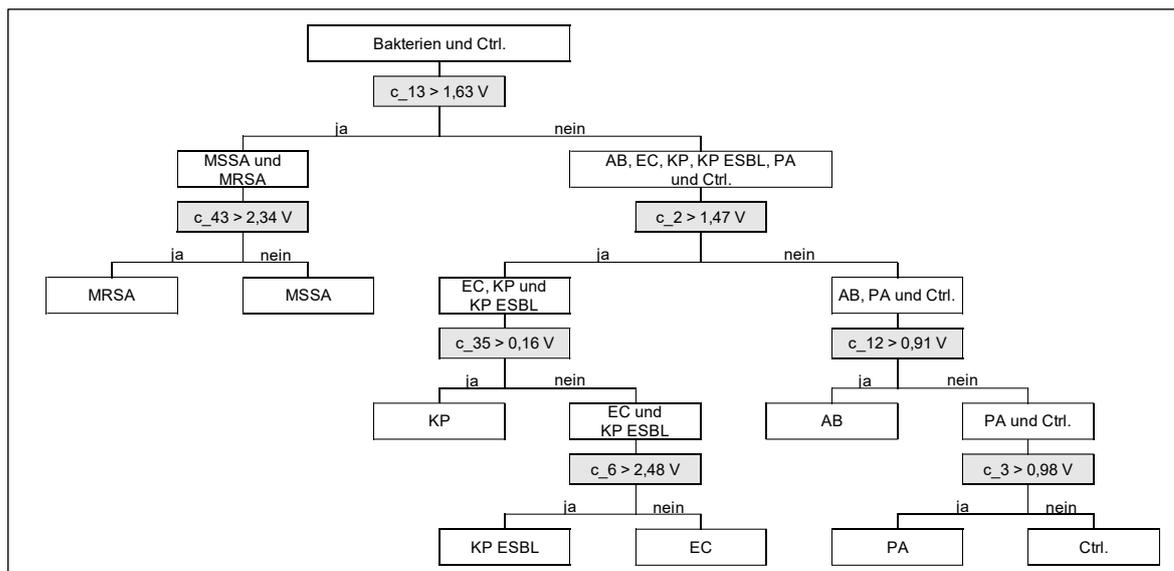


Abbildung 13 Klassifizierungsbaum mit sieben VOC-Clustern mit Cut-off-Werten der Signalintensität in V als Entscheidungspunkte zur Differenzierung verschiedener Bakterien-spezies einschließlich resistenter Stämme. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.

Der resultierende Klassifizierungsbaum (siehe Abbildung 13) mit sieben VOC-Clustern erlaubt eine Klassifizierung aller Bakterienstämme mit einer AUC von 1,0. Beginnend mit Cluster c_{13} mit einem Schwellenwert von 1,63 V trennen sich die Staphylokokken von gramnegativen Bakterien. Abhängig von Cluster c_2 teilen sich die gramnegativen Bakterien in Enterobakterien (*E. coli*, *K. pneumoniae* und ESBL produzierender *K. pneumoniae*) und Nicht-Fermenter (*P. aeruginosa* und *A. baumannii*) ein. Die Klassifikation in die darauffolgenden Klassen kann durch spezifische VOC-Cluster gemäß der Abbildung 13 weiter erfolgen. In der Diskriminanzanalyse lassen sich alle Bakterien hinsichtlich der sieben VOC-Cluster mit einer 96,5 % korrekten Zuordnung unter Verwendung der LOO-Kreuzvalidierung klassifizieren (siehe Tabelle 26 im Anhang 2.1). Die sieben VOC-Cluster sind in der Abbildung 34 im Anhang 2.1 als Boxplots dargestellt.

4.1.4 Mischkulturen

In klinischen Proben sind häufig nicht nur ein Bakterium, sondern verschiedene Bakterien-spezies präsent. Demzufolge wurde die Nachweiskapazität des MCC-IMS-Systems an Mischkulturen mit den Lungenkeimen *S. aureus* (SA) und *K. pneumoniae* (KP) *in vitro* untersucht.

Die drei charakteristischsten Peaks für *S. aureus* (c_{13} , c_{24} und c_{38}) sowie für *K. pneumoniae* (c_{35} , c_{36} und c_{117}) sind in allen Mischkulturen mit verschiedenen Proportionen

von *S. aureus* zu *K. pneumoniae* (3:1, 1:1 und 1:3) detektierbar (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Wie in Abbildung 16 dargestellt, korreliert das Peak-Signal mit der Bakterienkonzentration linear ($R^2 > 0,934$). Je höher die Konzentration an *S. aureus*, desto höher ist die Signalintensität für *S. aureus*-typische Peaks und desto niedriger für *K. pneumoniae*-typische Peaks und umgekehrt.

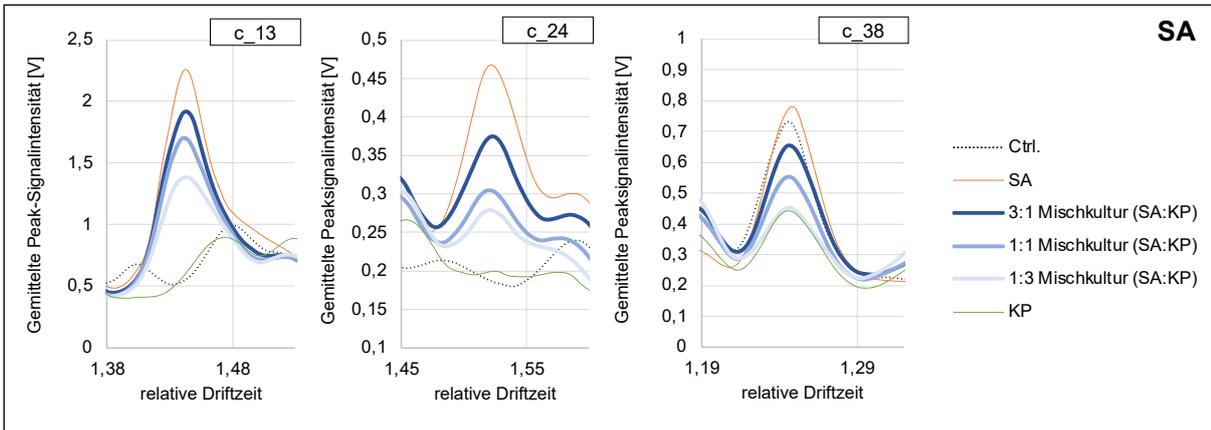


Abbildung 14 Spektrenverläufe – Einfluss der Mischkulturen auf charakteristische VOC-Cluster für *S. aureus*. Kontrolle (Ctrl.) und Reinkulturen (SA und KP): n = 11, Mischkulturen: n = 10.

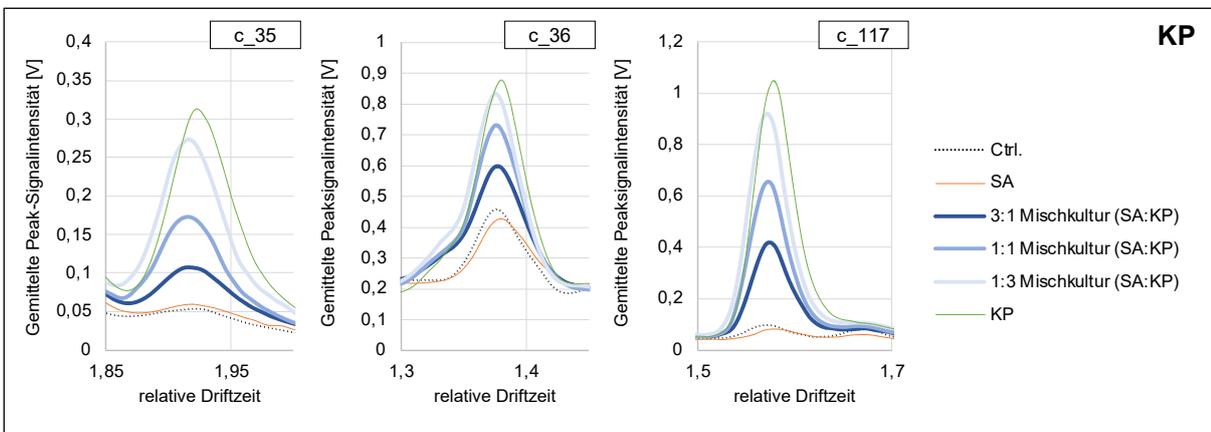


Abbildung 15 Spektrenverläufe – Einfluss der Mischkulturen auf charakteristische VOC-Cluster für *K. pneumoniae*. Kontrolle (Ctrl.) und Reinkulturen (SA und KP): n = 11, Mischkulturen: n = 10.

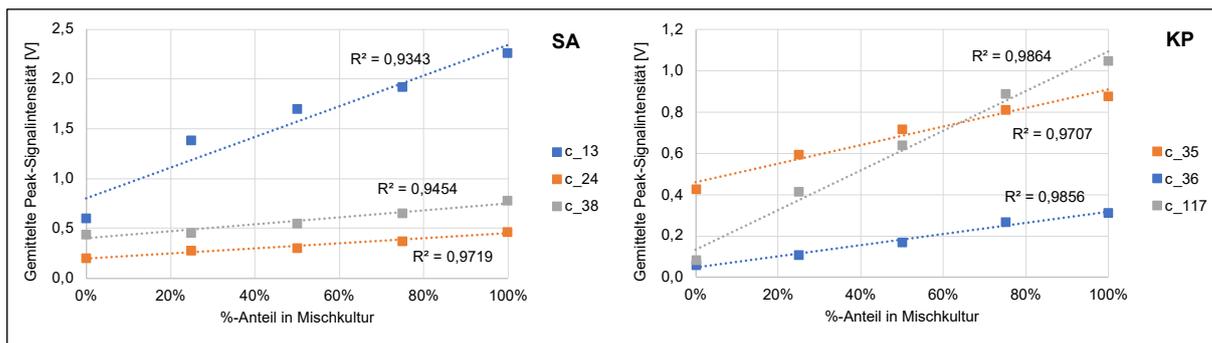


Abbildung 16 Regressionskurven – Einfluss der Mischkulturen auf charakteristische VOC-Cluster für *S. aureus* und *K. pneumoniae*. Reinkulturen (SA und KP): n = 11, Mischkulturen: n = 10.

4.1.5 Einfluss verschiedener Bakterienkonzentrationen

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Bakterienkonzentrationen auf VOCs, wurden Kulturen mit *K. pneumoniae* in unterschiedlichen Startkonzentrationen (0,01; 0,0175; 0,025 und 0,05 OD₆₀₀) inokuliert und mit der MCC-IMS vermessen.

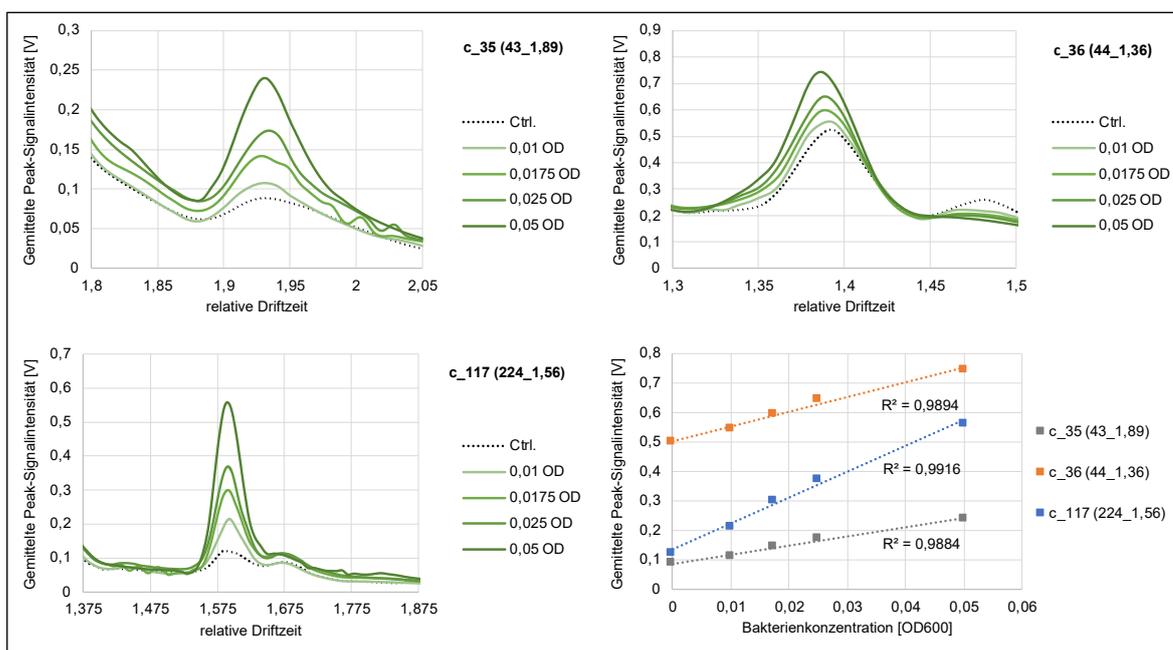


Abbildung 17 Einfluss verschiedener Bakterienkonzentrationen auf *K. pneumoniae* spezifische VOC-Cluster. n = 3.

Die drei *K. pneumoniae* spezifischen Peaks (c_35, c_36 und c_117) sind in allen gemessenen Konzentrationen im Headspace der Kulturen messbar (siehe Abbildung 17). Es existiert ein linearer Zusammenhang zwischen der Bakterienkonzentration und der Peak-Signalintensität ($R^2 > 0,98$). Für diese Peaks wurden die Nachweis- (LOD) und

Bestimmungsgrenze (LOQ) mittels der Funktionsgleichung der Kalibrierungskurve ermittelt. Tabelle 15 ist zu entnehmen, dass die Nachweisgrenze für bakterielle VOCs von einem Peak zum anderen variiert und zwischen 0,001 bis 0,007 OD₆₀₀ liegt. Nach der Bestimmungsgrenze (LOQ) lassen sich die genannten Peaks ab einer Mindestbakteriendichte von 0,004 bis 0,013 OD₆₀₀ quantifizieren.

Tabelle 15 Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) sowie Bestimmtheitsmaß für *K. pneumoniae* spezifische VOC-Cluster. n = 3.

Cluster	LOD [OD ₆₀₀]	LOQ [OD ₆₀₀]	Bestimmtheitsmaß [R ²]
c_35 (43_1,89)	0,003	0,006	0,988
c_36 (44_1,36)	0,007	0,013	0,989
c_117 (224_1,56)	0,001	0,004	0,992

4.1.6 Verschiedene Stämme einer Bakterienspezies

Für die zwei verschiedenen *E. coli*-Stämme DSM 1103 und DSM 1576 wurde untersucht, ob diese gleiche VOCs generieren.

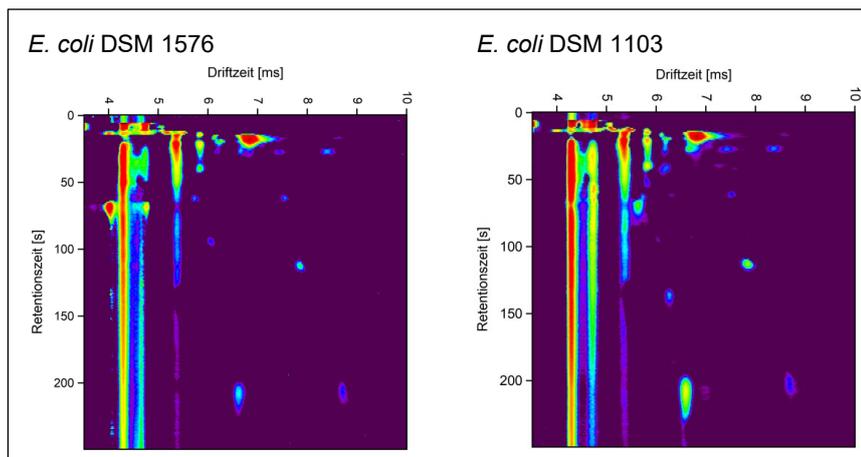


Abbildung 18 Heatmaps der *E. coli*-Reinkulturen (gemittelte Differenzspektren nach Subtraktion des gemittelten Werts der Kontrollprobe). DSM 1103: n = 10, DSM 1576: n = 11.

Die beiden Stämme zeigen ähnliche VOC-Muster (siehe Abbildung 18). In der Untersuchung „Differenzierung zwischen nicht-resistenten und resistenten Bakterien“ (siehe Kapitel 4.1.3) wurden insgesamt 18 VOC-Cluster (siehe Tabelle 16) für den *E. coli*-Stamm DSM 1576 identifiziert. 15 der 18 Cluster wurden im Headspace der DSM 1103-Kulturen nachgewiesen, die einen signifikanten Unterschied zu Kontrollproben aufweisen. Bei der Mehrheit der VOC-Cluster differenzieren sich die zwei *E. coli*-Stämme in der Signalintensität signifikant voneinander.

Tabelle 16 Emittierte VOC-Cluster von zwei *E. coli*-Stämmen – Unterscheidung gegenüber der Kontrolle (Ctrl.) und innerhalb der *E. coli*-Stämme. Ctrl.: n = 21, DSM 1103: n = 10, DSM 1576: n = 11.

Cluster	tr [s]	rel. td	DSM 1576 vs. Ctrl.	DSM 1103 vs. Ctrl.	DSM 1576 vs. DSM 1103
c_2	6	1,07	0,0000	0,0000	0,0002
c_4	9	1,20	0,0338	0,0000	0,0025
c_11	17	1,51	0,0001	ns	-
c_13	18	1,44	0,0000	0,0000	ns
c_14	18	1,67	0,0000	0,0000	ns
c_15	20	1,09	0,0000	0,0000	0,0074
c_17	20	1,34	0,0000	0,0000	0,0015
c_30	40	1,43	0,0000	0,0000	0,0004
c_40	49	1,07	0,0000	0,0000	0,0075
c_54	68	1,32	0,0000	0,0095	0,0125
c_62	83	1,33	0,0000	0,0000	ns
c_70	96	1,33	0,0000	0,0000	ns
c_74	105	1,33	0,0000	0,0005	ns
c_107	208	1,63	0,0000	0,0000	0,0001
c_115	223	1,33	0,0002	0,0083	ns
c_120	231	1,32	0,0000	0,0095	0,0224
c_124	236	1,32	0,0000	ns	-
c_128	242	1,32	0,0000	ns	-

Angabe der p-Werte im Mann-Whitney-U-Test, ns = $p > 0,05$

4.2 *In-vitro* Untersuchung der Zellkulturen mit und ohne RS-Viren

4.2.1 Vergleich der Probennahme-Strategien

Zwei verschiedene Probennahme-Strategien wurden in Bezug auf VOC-Muster evaluiert. Mit der ersten Strategie „Zellkultur“ wurden die VOCs im Headspace der mediumhaltigen Zellkulturflaschen mit und ohne HEp-2-Zellen mit der IMS analysiert. Bei der anderen Strategie „Überstand“ handelt es sich um die Untersuchung von VOCs emittiert vom Überstand, der von Zellkulturflaschen mit und ohne HEp-2-Zellen in HS-Vials überführt wurde.

Wie in Abbildung 19 zu sehen, beinhalten die gemittelten IMS-Chromatogramme messbare VOC-Peaks für die beiden Probennahme-Strategien. Verglichen mit dem Überstand in HS-Vials, weisen die mediumhaltigen Zellkulturflaschen mit und ohne HEp-2-Zellen, mehr und zum Teil intensivere Peaks auf. Dies könnte darauf deuten, dass die Zellkulturflaschen Kunststoffmaterialien enthalten, die eigene VOCs freisetzen.

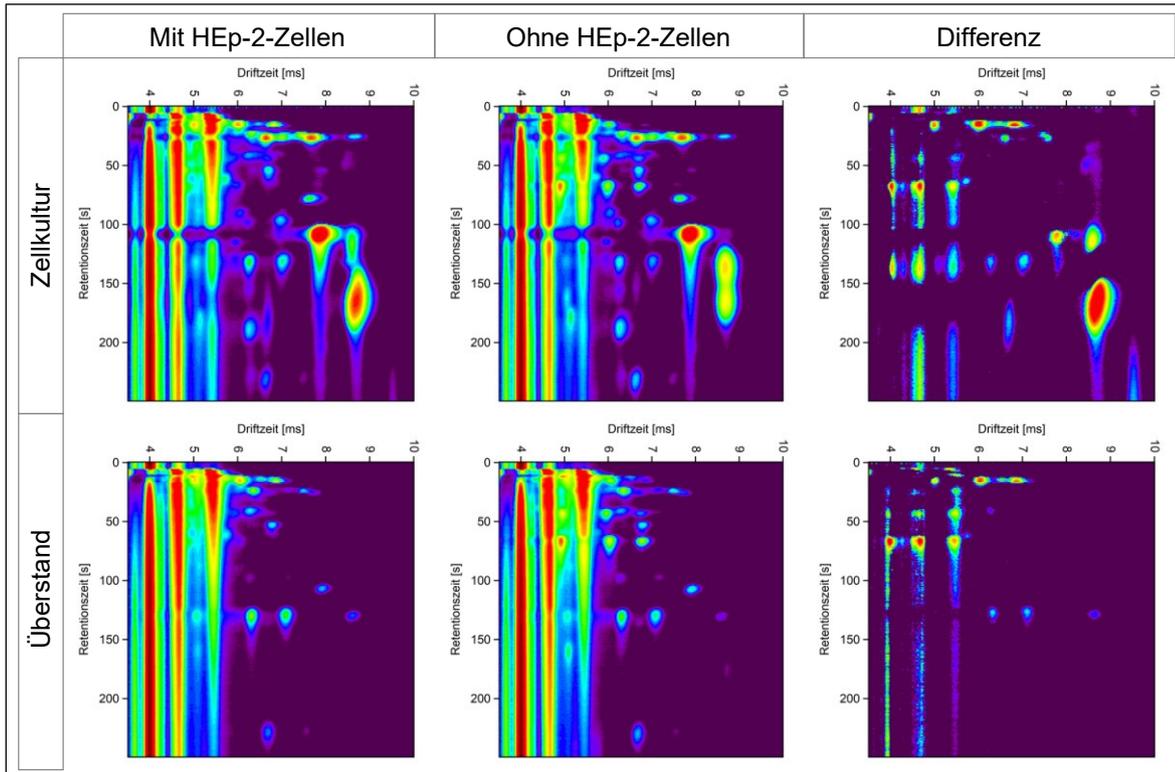


Abbildung 19 Gemittelte IMS-Chromatogramme für die zwei Strategien „Zellkultur“ und „Überstand“ zur Probennahme von VOCs. Überstand: $n = 6$, Zellkultur: $n = 8$.

Um die VOC-Unterschiede zwischen HEp-2-Zellen und dem Kulturmedium visuell hervorzuheben, wurden Differenzspektren (HEp-2-Zellen abzüglich Kulturmedium, siehe rechte Spalte in der Abbildung 19) erstellt. Die Unterschiede zwischen dem Kulturmedium und HEp-2-Zellen sind für die beiden Probennahme-Strategien vorhanden. Bis auf wenige Peaks, treten alle im Überstand detektierbaren Peaks auch in den Messdaten der Zellkultur auf.

Im Vergleich zum „Überstand“ erfasst die Strategie „Zellkultur“ das gesamte Volatilom der Zellkultur (Überstand und Zellen). Zudem besitzen Viren keinen eigenen Metabolismus und sind somit auf Wirtszellen zur Replikation angewiesen. Deshalb wurde die Strategie „Zellkultur“ im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Zur Identifizierung von HEp-2 zellspezifischen VOCs wurden die VOC-Muster der Zellkulturflaschen mit und ohne Zellen mittels der Clusteranalyse-basierten Software und statistisch ausgewertet. Mittels ROC-Analyse wurden vier VOC-Cluster gefunden, durch die sich die HEp-2-Zellen im Headspace der Kulturen vom Kulturmedium in höheren Signalintensitäten mit einer AUC von 1,0 (95 % CI [1,1]) signifikant unterscheiden. Bei diesen handelt es sich um leicht flüchtige Substanzen, die bereits nach einer Retentionszeit von

17 Sekunden im IMS-Chromatogramm erscheinen. Alle diese vier Peaks sind im Head-space der Zellkultur sowie des Überstands wiederzufinden (siehe Abbildung 20). Die Spektren weisen durchweg gleichartige Peakverläufe für die beiden Probennahme-Methoden auf. Die relativen Driftzeiten und die Retentionszeiten für die vier gefundenen Peaks sind in der Tabelle 17 wiedergegeben.

Tabelle 17 Cluster für HEP-2-Zellen mit Retentionszeit (t_r) und relativer Driftzeit (rel. td)

Cluster	t_r [s]	rel. td
c_3	15	1,25
c_4	15	1,61
c_5	16	1,69
c_6	17	1,49

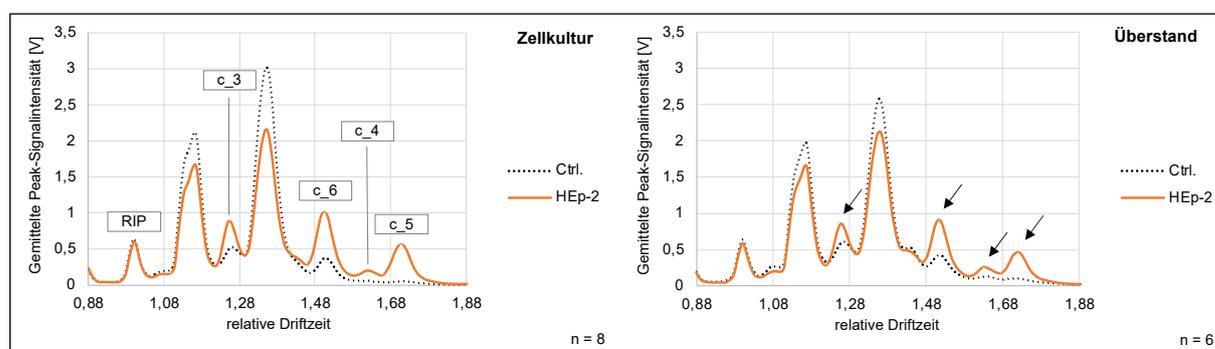


Abbildung 20 Gemittelte IMS-Spektren bei $t_r = 15$ s mit Unterschieden zwischen HEP-2-Zellen (HEp-2) und dem Kulturmedium (Ctrl.) in den Signalintensitäten für vier Peaks (c_3, c_4, c_5 und c_6).

Zusammengefasst sind Unterschiede in den VOC-Mustern zwischen Kulturen mit und ohne HEP-2-Zellen zu erkennen. Die vier selektierten Peaks könnten als HEP-2 zellspezifischer VOC-Marker in Betracht gezogen werden. Deshalb wurden diese als Referenzpeaks in weiteren Untersuchungen validiert.

4.2.2 Einfluss verschiedener Konzentrationen der HEP-2-Zellen

In dieser Untersuchung wurde geprüft, ob die vier diskriminierenden VOC-Cluster für HEP-2-Zellen mit der Zellkonzentration korrelieren. Hierzu wurde eine Analyse der Kulturen mit drei verschiedenen Zellkonzentrationen ($1,33 \times 10^6$, $2,00 \times 10^6$ und $2,67 \times 10^6$ Zellen pro Kulturflasche zum Zeitpunkt der Aussaat) durchgeführt.

Die gemittelten Spektrenverläufe in Abbildung 21 zeigen, dass die vier Peaks in allen Kulturen mit verschiedenen Zellkonzentrationen nachweisbar sind. Für diese Peaks besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellkonzentration und der Peak-Signalintensität

($R^2 = 0,90 - 1,00$). Hierbei verläuft die Korrelation positiv. Diese Linearität ist auch in den Boxplots ersichtlich (siehe Abbildung 35 im Anhang 2.2).

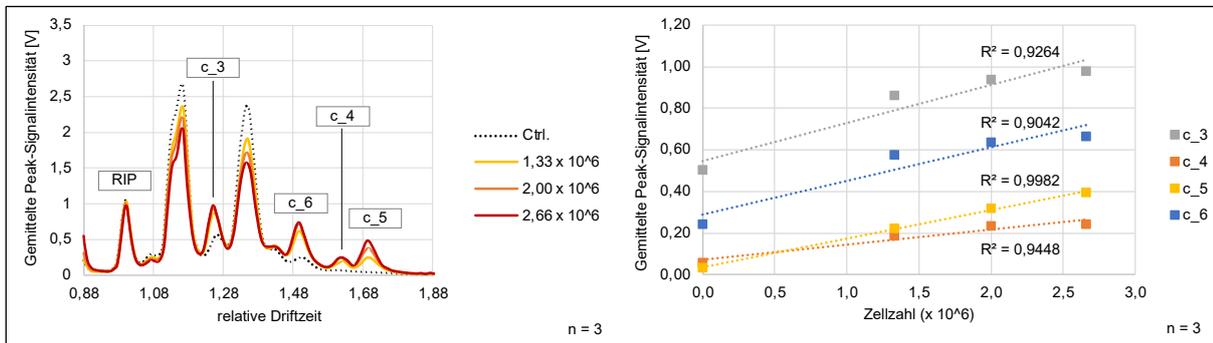


Abbildung 21 Zusammenhang zwischen Zellkonzentration und Signalintensität für vier HEP-2 zellspezifische Peaks in Form von Spektrenverläufen und Regressionen

Durch den linearen Zusammenhang kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den vier VOC-Clustern um Marker der HEP-2-Zellen handelt.

4.2.3 Einfluss einer RS-Virusinfektion auf HEP-2-Zellen

HEP-2-Zellkulturen wurden mit und ohne RSV-Infektion analysiert, ob Viren den Metabolismus der HEP-2-Zellen beeinflussen und dadurch eine Veränderung in der VOC-Zusammensetzung auslösen. Hierzu wurde der Headspace der RSV-infizierten Kulturen auf VOCs spezifisch für HEP-2-Zellen sowie VOCs im Zusammenhang mit der Virusinfektion untersucht. Die Einflüsse der Viruskonzentration und der Inkubationsdauer nach Infektion auf VOC-Muster wurden untersucht. Parallel wurde eine Differenzierung zwischen nicht- und RSV-infizierten Zellkulturen überprüft.

4.2.3.1 Einfluss verschiedener Viruskonzentrationen

Die VOCs der nicht-infizierten und infizierten Zellkulturen mit zwei verschiedenen RS-Viruskonzentrationen (MOI = 0,05 und MOI = 0,1) wurden nach 48 Stunden und 70 Stunden der Infektion miteinander verglichen.

In den Scatterplots (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23) wurden zunächst die Signalintensitäten der HEP-2 zellspezifischen VOC-Cluster (c_3 bis c_6) betrachtet. 48 Stunden nach Infektion blieben die Peaks trotz der Infektion in ihren Signalintensitäten konstant. Hingegen nehmen die Peaks 70 Stunden nach Infektion mit zunehmender Viruskonzentration in ihrer Signalintensität ab (siehe Abbildung 22).

Im Vergleich zu den infizierten Zellen nimmt die Signalintensität der Peaks für nicht-infizierte Zellen mit der Inkubationszeit steiler zu. Dagegen bleibt die VOC-Konzentration bei infizierten Zellen mit der MOI von 0,1 konstant oder nimmt ab (siehe Abbildung 23).

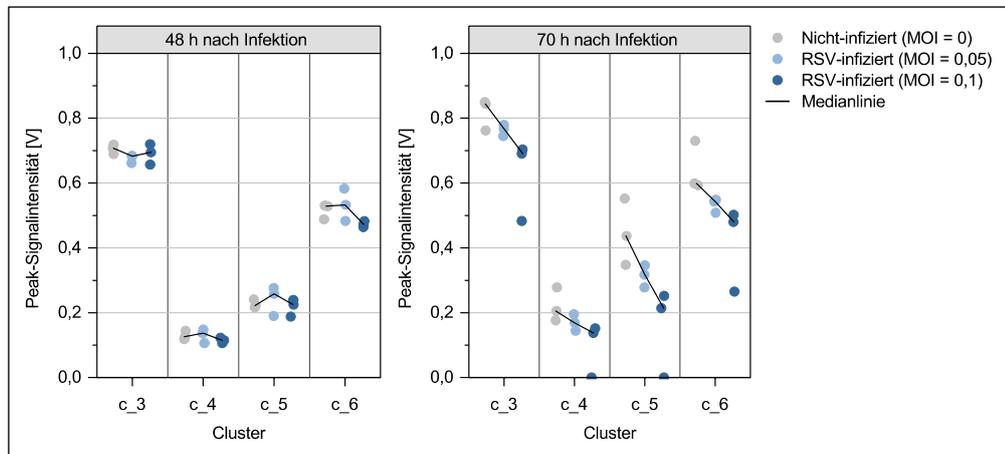


Abbildung 22 Einfluss der Viruskonzentration (MOI = 0, MOI = 0,05 und MOI = 0,1) auf HEp-2 zellspezifische VOC-Peaks nach zwei Inkubationszeiten (48 h und 70 h). n = 3.

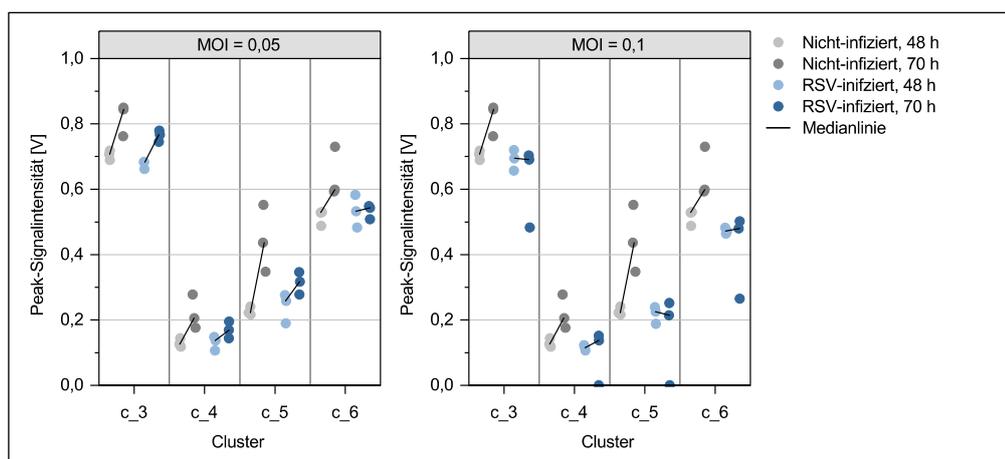


Abbildung 23 Einfluss der Inkubationszeit (48 h und 70 h) auf HEp-2 zellspezifische VOC-Peaks ohne und mit RSV-Infektion mit zwei Viruskonzentrationen (MOI = 0,05 und MOI = 0,1). n = 3.

Darüber hinaus wurden weitere VOCs gefunden, in denen sich die infizierten Kulturen von nicht-infizierten Kulturen durch höhere Peak-Signalintensitäten abheben. Insgesamt wurden acht VOC-Cluster mit einer AUC > 0,8 mittels ROC-Analyse identifiziert (siehe Tabelle 18). Um die Einflüsse der Infektion zu untersuchen, wurden die VOC-Cluster mit den fünf höchsten AUC-Werten herangezogen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25).

Tabelle 18 Ergebnisse der ROC-Analyse (AUC > 0,8) zur Selektion von VOC-Cluster zur Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten Kulturen. n = 3.

Rang	Cluster	tr [s]	rel. td	Obs	AUC	SE	95 % Konfidenzintervall
1	c_1	1	1,93	18	0,944	0,060	[0,83; 1]
2	c_13	242	2,13	18	0,938	0,063	[0,81; 1]
3	c_12	233	2,13	18	0,875	0,086	[0,71; 1]
4	c_11	106	2,13	18	0,868	0,133	[0,61; 1]
5	c_8	78	2,13	18	0,854	0,114	[0,63; 1]
6	c_2	1	2,13	18	0,833	0,167	[0,51; 1]
7	c_9	90	2,13	18	0,819	0,114	[0,60; 1]
8	c_7	54	1,93	18	0,806	0,120	[0,57; 1]

Obs = Beobachtungen; AUC = Fläche unter der Kurve; SE = Standardfehler

Die infizierten Zellen weisen ein wesentlich höheres Signal auf und lassen sich gut von nicht-infizierten Zellen trennen. Die Signalintensität der Peaks nimmt 48 Stunden nach Infektion mit der Viruskonzentration zu. Hingegen unterscheiden sich Kulturen in ihren Peak-Signalintensitäten 70 Stunden nach Infektion zwischen den beiden Viruskonzentrationen nicht. Für beide Viruskonzentrationen nimmt die VOC-Konzentration einiger Peaks nach 70 Stunden Inkubation ab.

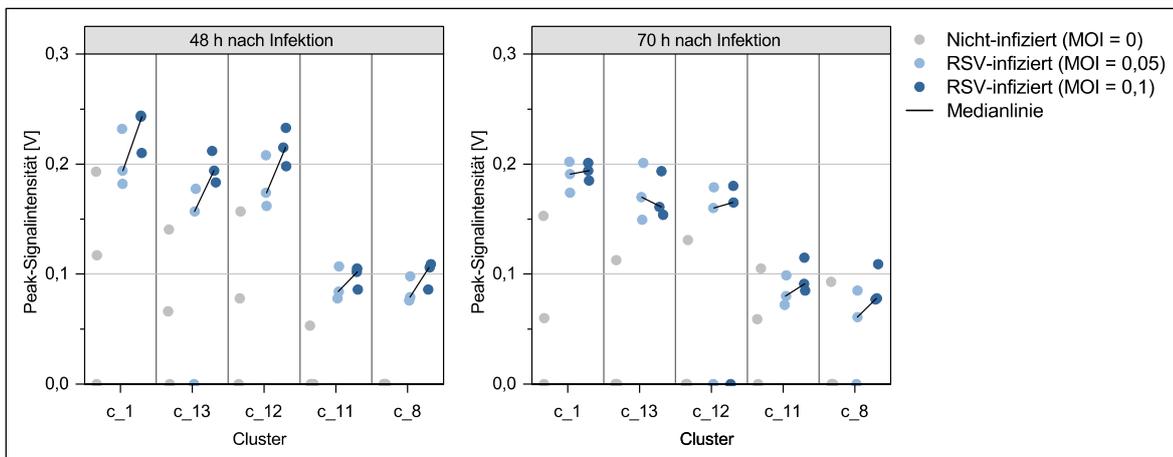


Abbildung 24 Einfluss der Viruskonzentration (MOI = 0, MOI = 0,05 und MOI = 0,1) auf emittierte VOCs der HEp-2-Zellen nach zwei Inkubationszeiten (48 h und 70 h). n = 3.

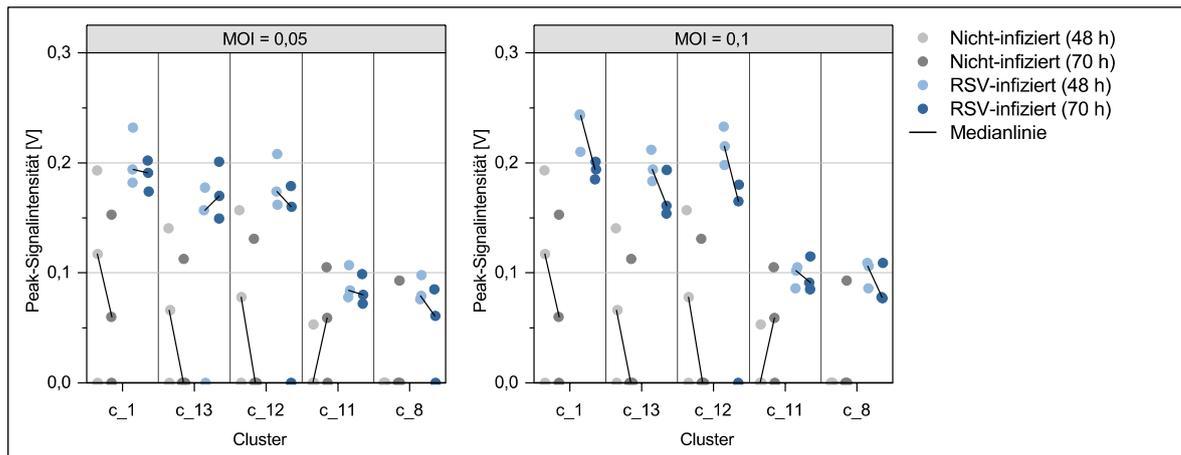


Abbildung 25 Einfluss der Inkubationszeit (48 h und 70 h) auf emittierte VOCs der HEP-2-Zellen ohne und mit RSV-Infektion mit zwei Viruskonzentrationen (MOI = 0,05 und MOI = 0,1). n = 3.

Zusammenfassend sind Unterschiede der VOCs zwischen infizierten und nicht-infizierten Kulturen feststellbar. Die Signalintensität der VOC-Cluster, spezifisch für die HEP-2-Zellen, ändert sich mit der Viruskonzentration.

4.2.3.2 Infektionszeitverlauf

Die nicht- und RSV-infizierten Zellkulturen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten (6, 24, 48 und 72 Stunden) nach Infektion analysiert. Parallel wurde eine mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie zu jedem Zeitpunkt der Infektion durchgeführt.

4.2.3.2.1 Morphologie der HEP-2-Zellen mit und ohne RSV-Infektion

Die Morphologie der nicht-infizierten und RSV-infizierten HEP-2-Zellen ist in Abbildung 26 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion veranschaulicht.

24 Stunden nach Infektion fusionierten RSV-infizierte HEP-2-Zellen mit benachbarten Zellen zu größeren Aggregaten (Synzytien, mit orangen Pfeilen exemplarisch markiert). Im weiteren Infektionsverlauf lösten und kugelten sich die infizierten Zellen, einschließlich der Synzytien als Aggregate, vermehrt von der Oberfläche ab und verteilten sich in allen Schichten des Überstands. Dadurch fanden sich zunehmend Aussparungen im Zellrasen.

Die nicht-infizierten HEP-2-Zellen blieben während der Beobachtungsdauer morphologisch unverändert, wobei diese nach 48 Stunden eine Konfluenz von 100 % erreichten. Nach 72 Stunden waren die nicht-infizierten HEP-2-Zellen unter einer Schicht der anscheinend toten Zellen (weiße Bläschen) erkennbar.

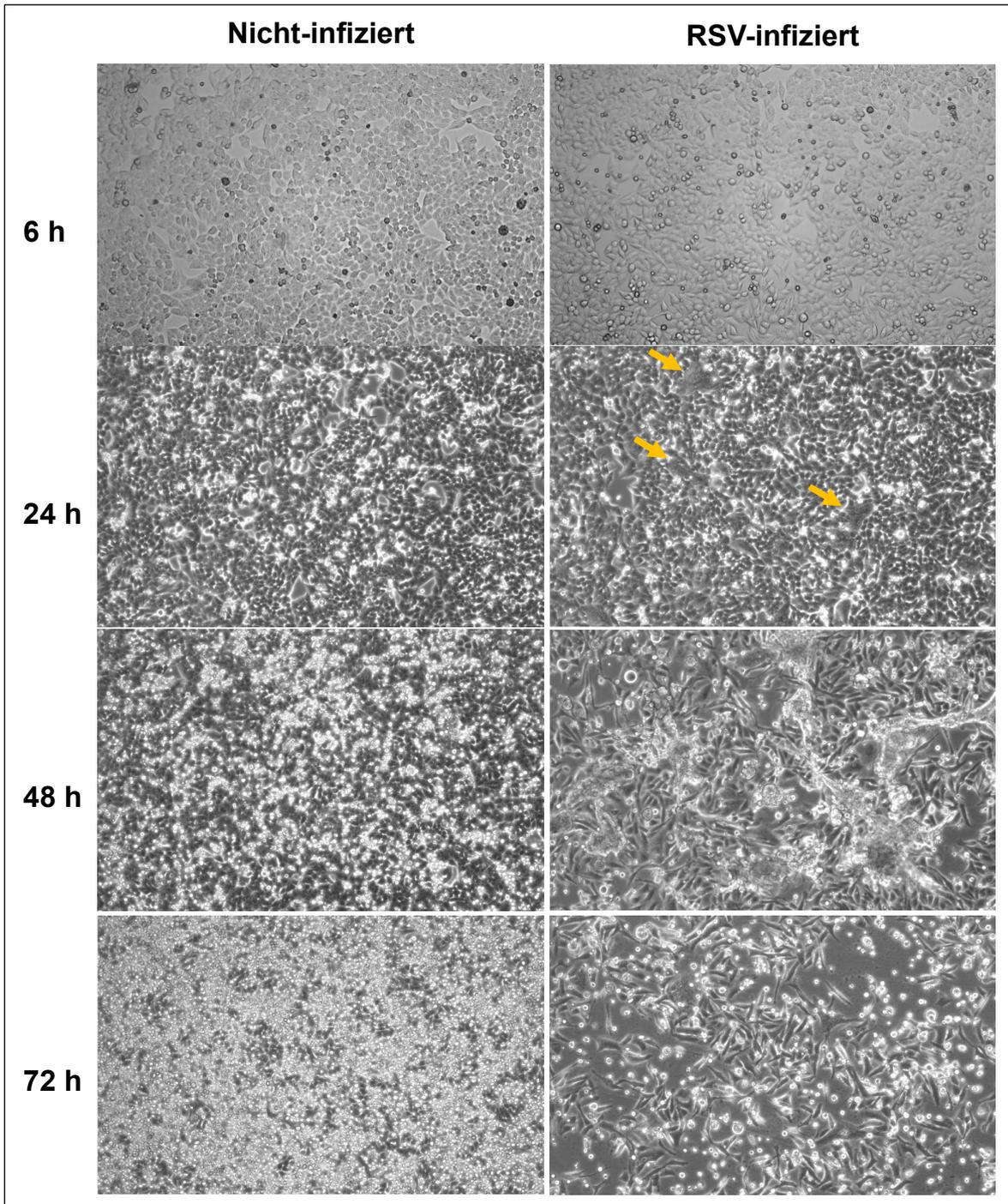


Abbildung 26 Mikroskopie (Phasenkontrast, 10x Vergrößerung) der nicht-infizierten und RSV-infizierten HEp-2-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

4.2.3.2.2 MCC-IMS-Analyse der Zellkulturen

Für die IMS-Untersuchung des Einflusses der RSV-Infektion auf die vier für HEp-2-Zellen spezifischen VOC-Cluster im zeitlichen Verlauf wurden die Daten in Boxplots dargestellt

(siehe Abbildung 27). In diesen Boxplots sind die Zeitverläufe der Peak-Signalintensität in Abhängigkeit der Zeitpunkte nach Infektion für nicht- und RSV-infizierte Kulturen aufgetragen. Die Zeitverläufe der VOC-Konzentrationen, gemessen als Signalintensität, unterscheiden sich für die verschiedenen Peaks.

Bis auf Cluster c_4 nach sechs Stunden sind alle vier VOC-Cluster zu allen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs im Headspace der nicht- und infizierten Kulturen messbar. Besonders auffällig ist, dass die Signalintensität der Cluster für nicht-infizierte Zellen verglichen mit RSV-infizierten Zellen im zeitlichen Verlauf zunimmt. Dagegen nehmen die Cluster 4 und 5 für RSV-infizierte Zellen im Verlauf zwischen 24 und 72 Stunden nach Infektion in ihrer Signalintensität ab. In infizierten Zellkulturen zeigen die Signalintensitäten der Cluster 3 und 6 verglichen mit nicht-infizierten Kulturen einen verlangsamten Anstieg mit der Infektionszeit.

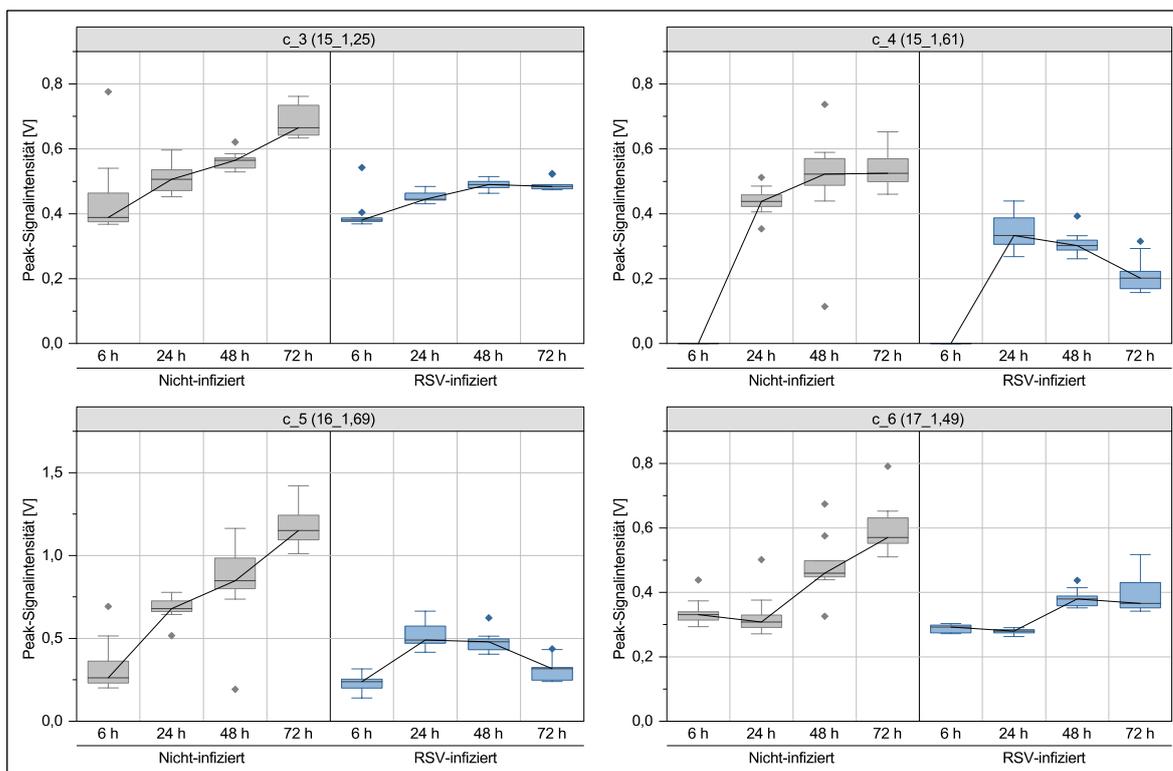


Abbildung 27 Signalintensitätsänderungen der vier HEp-2 zellspezifischen Peaks im Headspace der nicht-infizierten und RSV-infizierten Kulturen im zeitlichen Verlauf. n = 10.

Zu welchem Zeitpunkt nach Infektion eine signifikante Unterscheidung zwischen RSV- und nicht-infizierten Kulturen anhand von HEp-2 zellspezifischen VOC-Markern möglich ist, wurde mit dem U-Test unter Angabe des p-Werts ($\leq 0,05$) untersucht. Unter Verwendung der Mehrheit der Cluster lassen sich anhand der Peak-Signalintensitäten die RSV-Kulturen

von nicht-infizierten Kulturen nach 24 Stunden signifikant differenzieren (siehe Tabelle 19). Die Signifikanzwerte sind in der Tabelle 19 hervorgehoben.

Tabelle 19 Differenzierung der RSV-infizierten Kulturen gegenüber nicht-infizierten Kulturen: Angabe der p-Werte im Mann-Whitney-U-Test, hervorgehobene p-Werte $\leq 0,05$ weisen signifikante Unterschiede aus. $n = 10$.

	6 h	24 h	48 h	72 h
c_3 (15_1,25)	0,6225	0,0012	0,0002	0,0002
c_4 (15_1,61)	1,0000	0,0036	0,0025	0,0002
c_5 (16_1,69)	0,0588	0,0011	0,0025	0,0002
c_6 (17_1,49)	0,0007	0,0036	0,0025	0,0002

Zur Ermittlung weiterer Peaks, die mit der Virusinfektion in Verbindung stehen, wurde eine ROC-Analyse angewendet. Zunächst wurden 15 Cluster identifiziert, wodurch sich die RSV-infizierten Kulturen von nicht-infizierten Kulturen zu jedem Zeitpunkt der Infektion durch höhere Peak-Signalintensitäten mit einer AUC von mindestens 0,8 unterscheiden. Nur ein Cluster davon (c_10 (97_2,12)) zeigt einen Zusammenhang zwischen der Peak-Signalintensität und der Inkubationszeit für RSV-infizierte Zellen gegenüber nicht-infizierten Zellen. Dessen Signalintensitätsverlauf ist in der Abbildung 28 veranschaulicht. Die Peak-Signalintensität nimmt bei den infizierten Zellen mit der Zeit stetig zu, wogegen bei den nicht-infizierten Zellen kein solcher Zeitverlauf zu beobachten ist. Bis zu 48 Stunden nach Infektion unterscheiden sich infizierte Zellen in der Signalintensität von nicht-infizierten Zellen signifikant. 72 Stunden nach Infektion dagegen existiert keine signifikante Abgrenzung zwischen beiden Kulturen.

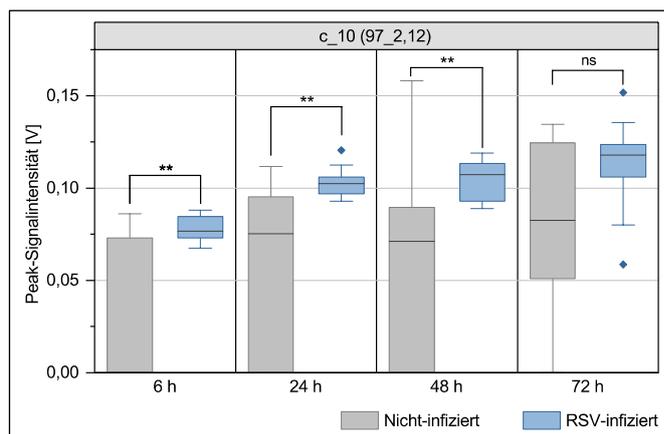


Abbildung 28 Unterschiede zwischen nicht- und RSV-infizierten Zellen in der Signalintensität für den Cluster c_10 (97_2,12). $n = 10$.

4.3 *In-vivo* Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen

Die Ergebnisse zu den Atemluftuntersuchungen von Patienten auf Influenza-A- bzw. SARS-CoV-2-Infektion wurden in zwei Publikationen [166, 167] veröffentlicht.

Die initial durchgeführte Studie mit Influenza-A infizierten Patienten wurde auf die Analyse von Patienten mit Verdacht auf eine Infektion mit SARS-CoV-2 ausgeweitet. Bei einem ausschließlichen Vergleich einer Virusinfektion mit Nichtinfizierten könnten die VOCs auch das Resultat einer Wirtsreaktion auf eine unspezifische Virusinfektion sein. Durch die Zusammenlegung der Daten aus den beiden Studien kann auch überprüft werden, ob sich die VOCs beider unterschiedlicher Virusinfektionen unterscheiden.

Bei 14 der 24 Patienten, die mit Verdacht auf Influenza-A in der Klinik aufgenommen wurden, konnte mittels PCR Influenza-Virus-RNA im Nasopharyngealabstrich nachgewiesen werden. In der COVID-19-Kohorte wurden insgesamt 16 der 51 rekrutierten Patienten mittels RT-PCR positiv für SARS-CoV-2 getestet. Bei einem Patienten war das RT-PCR-Testergebnis anfangs nicht eindeutig. Diese Person wurde in der Datenanalyse der IMS-Daten als unbekannte Gruppe eingeteilt.

In der Zwischenzeit hatte der Hersteller des PCR-Tests (Seegene) die Akzeptanzkriterien für positive Ergebnisse neu definiert. Demnach wurde der Patient mit unschlüssigem PCR-Ergebnis nun als positiv für SARS-CoV-2 eingestuft. Das Ergebnis war in einem zweiten PCR-Test reproduzierbar.

Die Unterscheidung zwischen nicht-infizierten, Influenza-A-infizierten und SARS-CoV-2-infizierten Patienten hinsichtlich des VOC-Musters wurde mittels der schrittweisen Diskriminanzanalyse überprüft. In dieser Analyse wurde der Patient mit dem ursprünglich unschlüssigen PCR-Ergebnis nicht zu einer der definierten Gruppen zugeordnet. Als Ergebnis ergaben sich 32 Cluster, die Wilks' Lambda größtmöglich minimierten. Die Position dieser Cluster im IMS-Chromatogramm ist in Abbildung 36 im Anhang 2.3 graphisch dargestellt. In dem Plot in Abbildung 29 lassen sich alle drei Gruppen entlang der zwei Diskriminanzfunktionen, die eine Gesamtvarianz von 100 % erklären, klar auftrennen. Der Patient mit dem ursprünglich unschlüssigen Ergebnis wurde der SARS-CoV-2-Gruppe zugeordnet. In der LOO-Kreuzvalidierung wurden insgesamt 97,3 % der Fälle korrekt in die Gruppen zugeordnet (siehe Abbildung 29 rechts). Jeweils ein nicht-infizierter Patient und ein Influenza-A-infizierter Patient wurde fälschlicherweise als SARS-CoV-2-infiziert eingestuft. Insgesamt gab es keine falsch-negativen Ergebnisse.

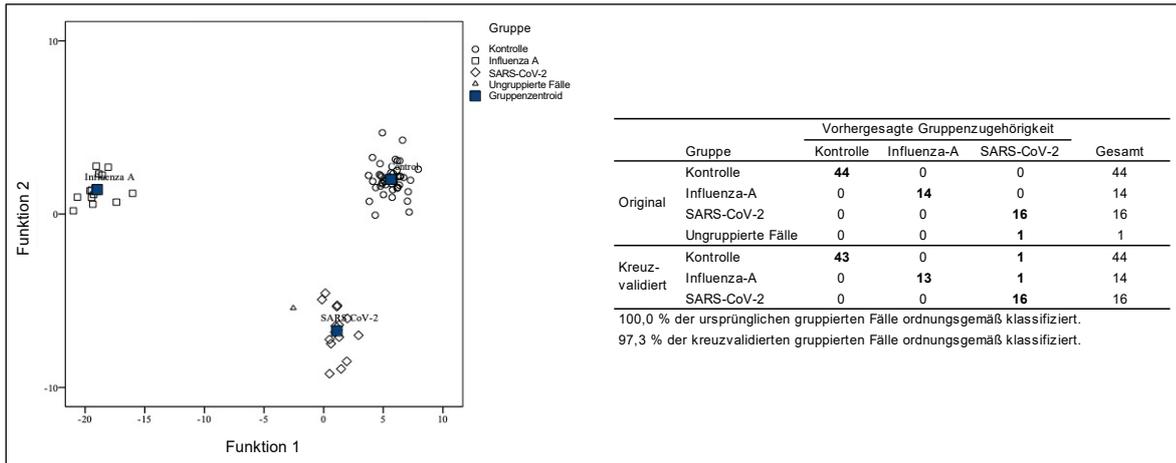


Abbildung 29 Ergebnisse der Diskriminanzanalyse mit 32 Clustern zur Unterscheidung der drei Gruppen: Nicht-infizierte, Influenza-A- und SARS-CoV-2-infizierte Patienten. Links: Streudiagramm, rechts: Klassifizierungstabelle.

Alternativ wurden zur Validierung die Daten mit einer Methode basierend auf dem Kennard-Stone Algorithmus gesplittet. Der Trainingssatz bestand aus 59 Proben (Kontrolle = 35, Influenza A = 11, SARS-CoV-2 = 13) und der Validierungssatz aus 15 Proben (Kontrolle = 9, Influenza-A = 3, SARS-CoV-2 = 3). Nach Erstellung eines Diskriminanzmodells mit dem Trainingssatz wurden in der Validierung 80 % der Fälle richtig zugeordnet (siehe Tabelle 20). Keine der Influenza-A-infizierten oder SARS-CoV-2-infizierten Patienten wurden fälschlicherweise als nicht-infizierte Patienten klassifiziert.

Tabelle 20 Ergebnisse der Validierung anhand der mittels Kennard-Stone Algorithmus gesplitteten Daten zur Unterscheidung der drei Gruppen: Nicht-infizierte, Influenza-A- und SARS-CoV-2-infizierte Patienten

Gruppe	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit			Gesamt
	Kontrolle	Influenza-A	SARS-CoV-2	
Kontrolle	7	0	2	9
Influenza-A	0	3	0	3
SARS-CoV-2	0	1	2	3

80 % der gruppierten Fälle korrekt klassifiziert.

5 Diskussion

Metabolomik-Ansätze und insbesondere die Analyse von metabolischen VOCs haben ein großes Zukunftspotenzial in der Infektionsdiagnostik [98, 183, 184]. Eine Änderung der biochemischen Reaktionen führt zu einer Änderung der VOC-Zusammensetzung, die als Signal für das Auftreten von Krankheiten dienen kann [15]. VOCs als Biomarker werden nicht nur von Krankheitserregern selbst generiert, sondern auch von Interaktionen der Krankheitserreger mit dem Wirt und Wirtsreaktionen [50, 185]. Dies ist ein großer potenzieller Vorteil der VOC-Analyse gegenüber den herkömmlichen mikrobiologischen Methoden, die sich ausschließlich auf die Pathogen-Biomarker konzentrieren [186].

VOCs als leichtflüchtige Substanzen können in verschiedenen Proben nachgewiesen werden [15]; durch die direkte Kommunikation der Atmung stellt Atemluft einen besonders interessanten Ansatz dar. Im Sinne einer Vor-Ort-Analyse ist Atemluft ein geeigneter Probentyp, da die Probennahme sowohl eine geringe Belastung für den Menschen darstellt als auch eine Online-Analyse ermöglicht [59, 187]. Dennoch ist Atemluft mit exogenen Störfaktoren behaftet [67]. Die größte Herausforderung besteht darin, VOCs der Erreger „als Nadel im Heuhaufen von Störfaktoren“ nachzuweisen.

So wurden die *in-vitro*-Studien als Bottom-up-Ansatz genutzt, um die Machbarkeit der MCC-IMS als Analysemethode zum Nachweis von Pathogen-VOCs und Veränderungen der VOC-Profile aufgrund der Wirt-Virus-Interaktionen unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen.

5.1 *In-vitro* Untersuchung der Bakterienkulturen

In Anbetracht des eigenen Metabolismus galten die *in-vitro* Bakterienuntersuchungen als erster Schritt, um die Machbarkeit der IMS-Methode zur Identifikation infektiopathogener VOCs zu evaluieren.

5.1.1 Inkubationsdauer

Die optimale Dauer der Inkubation ist vom bakteriellen Wachstum abhängig. Über die Inkubationsdauer hinweg verändert sich die VOC-Zusammensetzung sowohl in der Art der Substanzen als auch in den Konzentrationen [188], da die messbaren VOCs mit metabolischen Prozessen, u. a. Zellteilung und Zellwandbau, korrelieren. Abhängig von der bakteriellen Wachstumsphase werden bestimmte VOC-Substanzen im Zuge des primären oder

sekundären Stoffwechsels gebildet [70]. Hierbei bestimmen sowohl die Wachstumsgeschwindigkeiten der jeweiligen Bakterienspezies als auch die Substratverfügbarkeit der Kulturmedien den zeitlichen Verlauf der VOCs [71, 109, 188].

Nachdem die Zeit bis zur Diagnose eine wesentliche Rolle in der Therapie bakterieller Infektionen spielt, fokussiert sich diese Arbeit auf eine kurze Kultivierungszeit von maximal zwei Stunden. Obwohl eine Untersuchung mit dem Ziel einer frühen Diagnostik über VOCs angestrebt ist, konzentrierten sich die meisten der bisherigen VOC-Studien auf eine Bakterienidentifikation nach 18 Stunden [54, 72, 108, 189]. In einer der vereinzelt Studien zu früherer VOC-Bakteriendiagnostik zeigten Filipiak *et al.* [190] auf, dass *S. aureus* und *P. aeruginosa* zwischen 1,5 Stunden und 3 Stunden nach der Inokulation signifikante spezies-spezifische volatile Metabolite freisetzen.

In Übereinstimmung zeigte die vorliegende Arbeit, dass sich drei verschiedene Bakterienspezies, neben *S. aureus* und *P. aeruginosa* auch *E. coli*, nach bereits weniger als 2 Stunden Inkubation, sogar nach 30 Minuten, mit MCC-IMS in den VOC-Profilen unterscheiden. Für jede Bakterienspezies wurden mindestens zwei signifikante spezies-spezifische VOC-Peaks identifiziert, die zu allen Zeitpunkten (30, 60 und 120 Minuten) der Kultivierung im Headspace der Kulturen präsent waren.

Die untersuchten Bakterienspezies wurden aufgrund der unterschiedlichen Generationszeiten herangezogen. *E. coli* ist für eine kurze Generationszeit von 20 Minuten unter optimalen Laborbedingungen bekannt, wogegen sich *P. aeruginosa* durch ein langsames Wachstum auszeichnet [191]. Während der Inkubationsdauer nahm die Anzahl der VOC-Peaks für *E. coli* und *S. aureus* stetig zu, umgekehrt fielen die meisten VOCs bei *P. aeruginosa* bereits nach einer Stunde Inkubation wieder ab. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Sauerstoffgehalt in einem geschlossenen HS-Vial begrenzt ist und mit der Inkubationsdauer abnimmt. Im Gegensatz zu den anderen zwei Bakterienspezies ist *P. aeruginosa* aerob [192]. Als Inkubationszeit für alle nachfolgenden Versuche wurde 90 Minuten gewählt, da bei den genannten Bakterienspezies die optimalen VOCs zwischen 60 und 120 Minuten gefunden werden konnten.

Mit GC-IMS untersuchten Drees *et al.* [107] die VOC-Profile der gleichen untersuchten Bakterienspezies im Headspace von Blutkulturen stündlich bis zu 8 Stunden. In dieser Studie konnte die beste Differenzierung mittels PCA nach 6 Stunden Inkubation erreicht werden. In der Arbeit von Kunze *et al.* [109] mit MCC-IMS unterschieden sich *E. coli* und *P. aeruginosa* ab der späten logarithmischen Phase zwischen 3:45 Stunden und 8 Stunden in den VOCs signifikant.

Die frühe Differenzierung innerhalb von weniger als zwei Stunden in der vorliegenden Arbeit könnte auf die hohen anfänglichen Bakterienkonzentrationen zurückzuführen sein, die zu einem früheren Auftreten von diskriminatorischen VOCs führten. Hingegen wurde die Bakterienkonzentration in den Arbeiten von Kunze *et al.* und Drees *et al.* nicht spezifiziert. Diese dürfte geringer als in der vorliegenden Arbeit gewesen sein. Im Vorversuch (siehe Tabelle 28 im Anhang 3) entsprach eine optische Dichte von 0,1 circa 8×10^7 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) für *E. coli*. Die verwendete hohe Bakterienmenge reflektiert möglicherweise nicht die reale Bakterienkonzentration in klinischen Proben.

5.1.2 Nährmedien

Verfügbare Substanzen in Nährmedien dienen als Substrate für den bakteriellen Metabolismus. Je nach Metabolismus ergeben sich spezifische VOC-Produkte, die charakteristisch für eine Bakterienspezies sind [71]. Aufgrund der unterschiedlichen Nähransprüche der Bakterien gibt es eine Vielfalt an Nährmedien [193], die je nach der Substratzusammensetzung zu unterschiedlichen spezies-spezifischen VOC-Profilen führen [194, 195].

Um die Nähransprüche einer Vielzahl der Mikroorganismen abzudecken, wurden BHIB, MHB und TSB als Komplexnährmedien gewählt. MHB ist als Medium zur Antibiotika-Resistenzbestimmung in der medizinischen Mikrobiologie verbreitet [196]. Neben dem Columbia-Blutagar wird BHIB als Flüssigmedium zur Anreicherung pathogener Bakterien in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt, wogegen TSB als bekanntes Medium für den allgemeinen Laborgebrauch gilt [197].

Die obengenannten drei Medien enthalten unterschiedliche komplexe Nährbestandteile (siehe Tabelle 5 im Kapitel 3.3.4), deren chemische Zusammensetzung nicht genau definiert ist. Wegen der unterschiedlichen Zusammensetzung emittieren alle untersuchten Bakterienspezies in jedem Nährmedium ein anderes VOC-Profil. Mehrere *in-vitro* Analysen, die mit massenspektrometrischen Verfahren durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls, dass die bakterielle VOC-Produktion erheblich von der Medienwahl sowohl qualitativ als auch quantitativ beeinflusst wird [113, 194, 195, 198]. Küntzel *et al.* [113] kultivierten Mykobakterien in fünf verschiedenen Nährmedien und stellten fest, dass die VOC-Profile basierend auf Gemeinsamkeiten der Medienbestandteile entweder zu eihaltigen oder synthetischen Medien geordnet werden könnten.

In Arbeiten von Rees *et al.* [198] sowie Jenkins und Bean [194] wurden die Einflüsse der vier Komplexnährmedien BHIB, MHB, TSB und "Lysogeny Broth" (LB) in Bezug auf VOCs emittiert von *K. pneumoniae* bzw. von zwei Spezies Staphylokokken (*S. aureus* und

S. epidermidis) evaluiert. Analog zu dieser Arbeit variierte die Anzahl und Vielfalt der VOCs in Abhängigkeit der Bakterienspezies und Nährmedien. Das Wachstum im MHB-Medium erzielte in beiden oben benannten Studien die geringste Anzahl an bakterienspezifischen VOCs verglichen mit anderen Nährmedien. Umgekehrt produzierte *S. aureus* in dieser Arbeit am meisten signifikante VOC-Peaks in MHB im Vergleich zu Kontrollproben.

Die Analysen von Jenkins und Bean [194] legen nahe, dass die spezies-spezifischen unterschiedlichen VOC-Profile der Bakterien die Unterschiede in Medien übertreffen. Hierbei wurde auch die Medienwahl für die Analyse bakterieller VOC-Metabolite diskutiert. LB gilt als optimales Medium für die Kultivierung von Staphylokokken, um eine gleichmäßige Anzahl an nachweisbaren VOCs über bei Staphylokokken Spezies hinweg zu erzeugen. Umgekehrt sind die restlichen Medien (BHIB, MHB und TSB) für die Differenzierung der beiden Spezies durch das Vorhandensein und Fehlen von VOCs besser geeignet. Unter Anwendung der Diskriminanzanalyse lassen sich alle untersuchten Bakterienspezies in allen Medien ähnlich gut differenzieren.

Die bakteriellen Metabolite lassen sich in medienabhängige und medienunabhängige VOCs aufteilen. Rees *et al.* [198] zeigten, dass die medienunabhängigen VOCs 10 % der 365 VOCs spezifisch für *K. pneumoniae* ausmachen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit für *K. pneumoniae* (20 % medienunabhängige VOC-Peaks in drei Medien) gefunden werden. Über spezies-spezifische VOCs hinaus sind in der Arbeit von Jenkins und Bean [194] etwa 3 % von 337 Staphylokokken-spezifischen VOCs medienunabhängig.

Von allen Bakterienspezies generierten *K. pneumoniae* in der vorliegenden Arbeit am meisten signifikante medienunabhängige VOC-Peaks. Die Ursache hierfür ist unklar. Dennoch wurde auch für die anderen Spezies mindestens ein medienunabhängiger VOC-Peak gefunden. Das Ergebnis der Diskriminanzanalyse legt nahe, dass alle untersuchten fünf Bakterienspezies unter Verwendung der medienunabhängigen VOCs mit einer hohen Sensitivität und Spezifität von über 90 % differenziert werden können.

Von den im Headspace der *P. aeruginosa*- sowie *S. aureus*-Kulturen identifizierten VOCs konnte nur ein Bruchteil bei einer *in-vivo* Infektion in der Atemluft von Mäusen nachgewiesen werden [185]. Es kann argumentiert werden, dass die volatilen, bakteriellen Kernbestandteile, die über alle Medien hinweg präsent waren, als Marker für die Infektion in einem *in-vivo* Modell eingesetzt werden können [194]. Zu bedenken ist hierbei, dass die Kultur-nährmedien für eine optimale Anzucht von Mikroorganismen unter Laborumgebungen konzipiert wurden und nicht der realen Nährumgebung des Körpers entsprechen. An

dieser Stelle wäre eine weiterführende Untersuchung von Bakterien in Sputum oder ähnlichen biologischen Sekreten interessant.

Im Gegensatz zu den Studien von Rees [198] sowie von Jenkins und Bean [194] wurden in dieser Arbeit weniger VOC-Peaks spezifisch für die jeweiligen Bakterienspezies identifiziert. Die Erklärung für die Resultate könnte vor allem in der methodischen und statistischen Durchführung, aber auch in der verwendeten Analyseverfahren liegen.

5.1.3 VOC-Marker zur Bakteriendifferenzierung

Auf die Nutzung der von MCC-IMS analysierten VOCs als Biomarker zur Speziesidentifikation sowie Differenzierung verschiedener Bakterienspezies einschließlich Antibiotika-resistenter Stämme wurde in TSB näher eingegangen.

5.1.3.1 Differenzierung

Im Verlauf des Bakterienwachstums in Kulturen können volatile Metabolite entweder durch Verstoffwechslung der Nährmediensubstanzen neu auftreten, in der Konzentration zunehmen, oder durch Substratkonsum abnehmen. Da das zukünftige Ziel der Arbeit der Nachweis von Bakterien im Organismus ist, lag der Fokus nur auf VOCs, deren Konzentration höher als von nicht-inokulierten Nährmedien ist.

Alle fünf verschiedenen Bakterienspezies, einschließlich resistenter Stämme, lassen sich durch die Anwendung der MCC-IMS in Flüssigkulturen bereits nach 90 Minuten Kultivierung unterscheiden. Die 63 für Bakterien signifikanten spezifischen VOC-Peaks ermöglichten mittels linearer Diskriminanzanalyse eine Klassifizierung der Bakterien mit einer 100 % korrekten Zuordnung.

2012 beschrieben Jünger *et al.* [108] bereits die Möglichkeit der Differenzierung von 15 humanpathogenen Bakterienspezies mittels MCC-IMS. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden Bakterien auf Schafblutagarplatten nach einer 24-stündigen Inkubation gemessen. Ähnlich unserem Ansatz bewiesen Kunze *et al.* [109] und Drees *et al.* [107], dass eine Differenzierung von mehr als zwei Bakterienspezies auch in flüssigen Medien möglich ist.

Mit der IMS können entweder positive oder negative Ionen detektiert werden. Für die Bakteriendifferenzierung benötigten Jünger *et al.* [108] beide Ionisationsmodi. Die Einschränkung dieser Arbeit auf positive Ionen ist in Übereinstimmung mit der Studie von Drees *et al.* [107], die aufzeigte, dass positive Ionenspektren einen größeren Informationsgehalt liefern. Während der 8-stündigen Inkubation wurde in Drees' Arbeit nur eine bakterielle VOC im

negativen Ionenmodus identifiziert. Möglicherweise führte eine Inkubation von 24 Stunden zu einer Reduktion der relevanten VOCs, weshalb negative Ionen in Jüngers Arbeit zusätzlich erforderlich waren.

Im Gegensatz zu den bereits zitierten Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit Stämme mit erworbenen Antibiotika-Resistenzen (MRSA und ESBL produzierender *K. pneumoniae*), die in Bezug auf Antibiotikatherapie besorgniserregend sind, eingeschlossen.

5.1.3.2 Antibiotika-resistente Bakterien

Nicht nur die Bakteriendifferenzierung, sondern auch die Antibiotikaresistenzbestimmung spielt in der Behandlung bakterieller Infektionen eine essenzielle Rolle. Es existieren nur vereinzelte Studien, die hierzu VOCs für eine Differenzierung von resistenten von sensiblen Stämmen einer Bakterienspezies berücksichtigten [54, 199]; insbesondere für die Anwendung von MCC-IMS wurden Untersuchungen nur als Konferenz-Abstracts veröffentlicht [200, 201].

In früheren Studien mit MCC-IMS konnten in klinischen Isolaten unterschiedliche VOCs bei resistenten und sensiblen Stämmen nachgewiesen werden [200, 201]. Insgesamt bleibt unklar, ob die Unterschiede der VOC-Profile auf den vom Resistenzmechanismus induzierten Stoffwechseländerungen oder auf zwei verschiedenen Stämmen mit unterschiedlichen metabolischen Eigenschaften beruhen.

Es kann argumentiert werden, dass verschiedene Resistenzmechanismen, wie die Spaltung von Antibiotika, zu unterschiedlichen volatilen Metaboliten führen [202]. Um die Frage abschließend beantworten zu können, sollten Studien mit Stämmen vor und nach Transfektionen mit Resistenzgenen durchgeführt werden. Dazu könnte der VOC-Mustererkennungsansatz ohne Substanzidentifizierung ausreichen. Nichtsdestotrotz könnte eine Substanzidentifizierung Hintergrundinformationen zu Resistenzmechanismen liefern.

5.1.3.3 VOC-Profile

Wie in früheren Studien berichtet [54, 72, 108], produzierten alle in dieser Arbeit untersuchten Bakterien eine Vielzahl von flüchtigen Metaboliten, die zum Teil überlappen. Für die Bakterienidentifizierung werden deshalb VOC-Muster anstelle eines einzelnen VOC-Biomarkers bevorzugt [49, 54]. Die für die Unterscheidung relevanten Peaks der Muster können chemisch charakterisiert werden. Gegenüber Arbeiten von Drees *et al.* [107] und

Jünger *et al.* [108] hat in dieser Arbeit keine Substanzidentifizierung der MCC-IMS-Signale stattgefunden. Dies könnte hilfreich sein, um die metabolischen Prozesse zu identifizieren.

Mit der IMS kann eine Zuordnung von Signalen zu VOC-Substanzen nur durch vorherige Kalibrierung mit bekannten Referenzsubstanzen erreicht werden, siehe z. B. Drees' Arbeit [107]. Eine weitere Strategie ist die Validierung unbekannter IMS-Signale mit Hilfe zusätzlicher GC-MS, die mit einem aufwendigen Prozess verbunden ist [108]. Selbst unter der Anwendung der Massenspektrometrie können nicht alle beteiligten volatilen Verbindungen, die das VOC-Spektrum ausmachen, durch Abgleich mit Substanzbibliotheken eindeutig chemisch identifiziert werden [57].

Es ist wissenschaftlich belegt, dass Tiere durch ihren ausgeprägteren Geruchssinn Infektionen, u. a. resistente Bakterien und Tuberkulose, erkennen können [203, 204]. Dies deutet darauf hin, dass eine Geruchserkennung über spezifische VOC-Muster oder eine Reihe spezifischer VOC-Verbindungen ohne Substanzidentifizierung möglich ist. Eine eindeutige chemische Zuordnung der gemessenen VOCs ist nicht notwendigerweise erforderlich, auch wenn diese Informationen über zugrunde liegende metabolische Prozesse, die von erheblichem Interesse sind, liefern würde [205]. Aber selbst bei Kenntnis der Substanz ist die Herkunft der VOCs schwierig zu verfolgen, denn diese können als Zwischen- oder Endprodukte diverser komplexer, metabolischer Reaktionen gebildet werden [198].

Um chemisch unbekannte, aber regelmäßig auftretende VOC-Peaks zu erhalten, wurde in der Arbeit der jeweilige Referenzstamm mehrmals am Tag an drei verschiedenen Tagen gemessen. Hierdurch konnten die markantesten VOC-Peaks mit Hilfe der multivariaten statistischen Analyse für die Bakteriendifferenzierung identifiziert werden.

In modernen Laboren werden Bakterien mit Hilfe von MALDI-TOF-MS über Vergleich der Peptidmassenfingerprints mit einer Datenbank identifiziert [8]. Analog könnten charakteristische VOC-Profile zur Bakteriencharakterisierung ausreichend sein, wenn die VOC-Analysemethode standardisiert und eine Datenbank hinterlegt ist.

5.1.3.4 Klassifikation der Bakterienspezies

Im Rahmen der Analyse zur Bakteriendifferenzierung wurde nachgewiesen, dass insbesondere *E. coli* und die sensiblen und resistenten Stämme von *K. pneumoniae* einige gemeinsame VOC-Peaks emittieren, die im Headspace anderer Bakterienspezies sowie des Nährmediums nicht auffindbar waren. Dies kann als Indiz für familienspezifische VOC-Marker interpretiert werden, da *E. coli* und *K. pneumoniae* zu der Familie *Enterobacteriaceae*

gehören. Innerhalb der Stämme emittierten *S. aureus* und seine resistente Version MRSA zum größten Teil die gleichen flüchtigen Metabolite. Auch Jenkins und Bean [194] konnten zeigen, dass die Spezies der Gattung Staphylokokken gemeinsame volatile Metabolite aufweisen.

Taxonomisch werden die Bakterien primär basierend auf ihren Ähnlichkeiten in morphologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften kategorisiert [206]. Nachdem die volatilen Metabolite die phänotypischen Eigenschaften der Bakterien widerspiegeln, kann argumentiert werden, dass Bakterien basierend auf VOCs ähnlich der Reihenfolge der Taxonomie (Subspezies → Spezies → Gattung → Familie → höhere Ordnung) aufgeteilt werden können.

Auch, wenn in der vorliegenden Arbeit die VOCs nicht chemisch definiert werden konnten, konnte ein Klassifikationsbaum ähnlich den biochemischen Tests wie z. B. API (Analytischer-Profil-Index) aufgestellt werden [207]. Die Biochemische Testreihe nutzt das komplexe Muster der StoffwechsellLeistungen als Fingerabdruck zur Bakterienidentifikation [208]. Abhängig von der Zuckerfermentation und/oder dem Vorhandensein von Oxidase lassen sich beispielsweise *Enterobacteriaceae* von anderen gramnegativen Bakterien unterscheiden [207]. Analog traten in der vorliegenden Arbeit mehrere VOC-Peaks auf, die Fermenter von Nicht-Fermentern differenzieren können.

Im Vergleich zu anderen Bakterienspezies produzierten Nicht-Fermenter (*P. aeruginosa* und *A. baumannii*) wenige spezifische Metabolite, wodurch sie sich im Plot der Diskriminanzanalyse räumlich in der Nähe von Kontrollproben befinden. Es kann argumentiert werden, dass Fermenter im Vergleich zu Nicht-Fermentern mehr Endprodukte aufgrund der unvollständigen Oxidation der organischen Substrate im Zuge der Fermentation bilden [209].

Der erstellte Klassifikationsbaum mit sieben VOC-Peaks ermöglichte die korrekte Klassifizierung der untersuchten Bakterien mit einer AUC von 1,0 (ROC-Kurvenanalyse). Obwohl dieses Modell die Zuordnung verständlich veranschaulicht, ist dieses Modell für eine Überanpassung anfällig, da nur ein Referenzstamm der jeweiligen Bakterienspezies in einem kleinen Strichprobenumfang untersucht wurde. Hierdurch besteht ein Bedarf an Validierung der Ergebnisse mit Stämmen verschiedener Bakterienspezies, Familien sowie Gattungen in einem größeren Umfang, um die Hypothese der VOC-Klassifizierung der Bakterienspezies nach biochemischen Eigenschaften zu überprüfen.

5.1.4 Mischkultur

In der Praxis liegen häufig Infektionen mit mehreren Spezies vor. Dementsprechend wurde geprüft, ob die MCC-IMS auch in der Lage ist, derartige Co-Infektionen zu detektieren. Hierzu wurden Mischkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von *S. aureus* und *K. pneumoniae* angelegt.

Die Ergebnisse zeigen erneut, dass die für *S. aureus* und *K. pneumoniae* im Rahmen der Bakteriendifferenzierung identifizierten VOC-Marker auch in Mischkulturen, und zwar in entsprechenden Mischverhältnissen reproduzierbar waren. Obendrein korrelierte die Konzentration dieser VOC-Marker mit der Bakterienmenge. Dies ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Zhu *et al.* [72] unter Verwendung von SESI-MS.

Es zeigt sich, dass die verwendete IMS-Methode auch zur Identifizierung von Infektionen mit mehreren Keimen geeignet zu sein scheint.

5.1.5 Bakterienkonzentration

Wie erwartet nahm die Konzentration der VOC-Marker für *K. pneumoniae* mit zunehmender Bakterienkonzentration proportional zu. In anderen Studien zu Mykobakterien wurde weiterhin beobachtet, dass ein Teil der VOCs, z. B. Furane, mit höherer Bakteriendichte in der Konzentration abnimmt [113, 210]. Die hohen Konzentrationen von Furanen bei niedriger Bakterienkonzentration könnte auf Signalmoleküle in der Zellkommunikation zurückzuführen sein [210]. Dagegen korrelieren die VOC-Substanzen, die im Rahmen der Biosynthese entstehen, in der Signalintensität mit der Bakteriendichte [210]. Somit könnten die identifizierten VOC-Marker für *K. pneumoniae* auf Metabolite der Biosynthese zurückzuführen sein.

Neben den Effekten der Bakterienkonzentration auf bakterielle VOCs wurde die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der IMS-Methode zur Bakterienidentifikation evaluiert. Die Resultate zeigten, dass sowohl Bakterienkonzentration als auch die Art der bakterienspezifischen VOC-Marker die Detektion von Bakterien beeinflusst. Je nach VOC-Marker lag die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze für die Identifikation von *K. pneumoniae* bei 0,001 – 0,007 OD₆₀₀ (~7,72 x 10⁵ – 5,41 x 10⁶ KBE/ml) bzw. 0,004 – 0,013 OD₆₀₀ (~3,09 x 10⁶ – 1,0 x 10⁷ KBE/ml). Nachdem keine Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt wurde, wurde der KBE-Wert (1,59 x 10⁹ KBE/ml) für *E. coli* vom Vorversuch (siehe Tabelle 28 im Anhang 3) als Referenzwert für die Bewertung der Ergebnisse herangezogen.

Die Mindestmenge an Bakterien für einen Nachweis einer Infektion hängt von der Infektionsstelle ab. Die Diagnostikschwelle für eine Harnwegsinfektion in Urin bzw. Lungenentzündung in der bronchoalveolären Lavage (BAL) liegt bei $\geq 10^4$ bis 10^5 KBE/ml [211, 212]. Hingegen liegen Sepsis-Erreger im Blut in einer wesentlich niedrigeren Konzentration (1 bis 10 KBE/ml) vor [213]. Kritisch zu betrachten ist hierbei, dass der KBE-Wert dem Kulturergebnis und nicht der realen Bakterienkonzentration in Körperflüssigkeiten entspricht [213, 214].

Die analysierte Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die MCC-IMS-Methode zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Inokulation liegt somit um den Faktor 10- bis 100-fach höher als die Diagnostikschwelle für Urin- und BAL-Kulturen.

Zu diesem Zeitpunkt repräsentierte die Arbeit ein Proof-of-Concept, weshalb zunächst eine definierte Bakterienkonzentration von 0,1 OD₆₀₀ herangezogen wurde, um eine Einheitlichkeit der zusammenhängenden Ergebnisse zu gewährleisten. Die Konzentration der VOC-Peaks wird durch die Bakteriendichte, die aus der Inokulatmenge und der Inkubationsdauer hervorgeht, bestimmt. Zur Evaluierung der MCC-IMS als schnelle *in-vitro* Diagnostikmethode ist eine weitere Untersuchung der Bakterien in der Konzentration, die auch in entsprechenden Körperproben zu erwarten ist, in Kombination mit der Inkubationsdauer erforderlich. Zudem zählt die Bakteriendichte vermutlich zu dem bedeutendsten Einflussfaktor auf das VOC-Profil [215].

5.1.6 Verschiedene Stämme einer Bakterienspezies

Mit Blick auf die *in-vitro* Diagnostik sind spezies-spezifische VOCs, die bei allen Stämmen einer Bakterienspezies auftreten, gefragt. In der Untersuchung zur Bakteriendifferenzierung wurde nur ein Referenzstamm der jeweiligen Bakterienspezies in Betracht gezogen.

In der vorliegenden Untersuchung teilen sich die zwei untersuchten *E. coli*-Stämme DSM 1576 und DSM 1103 zu ca. 80 % die gleichen für *E. coli* DSM 1576 identifizierten VOC-Peaks. In ca. 60 % dieser Peaks finden sich signifikante Unterschiede der Signallintensität.

Die Variabilität zwischen den beiden Stämmen könnte auf verschiedenen Quellen beruhen. Zum einen kann die genotypische Variabilität zwischen Stämmen einer Bakterienspezies volatile Metabolite sowohl in Typ als auch in der Konzentration stark beeinflussen [216]. Zum anderen war die Isolationsquelle (z. B. Rind, Schaf) der Stämme in der Studie von Küntzel *et al.* [113] für die Konzentrationsunterschiede der VOCs verantwortlich. Ein

weiterer Faktor könnten unterschiedliche Wachstumsraten beider Stämme sein, die zu unterschiedlicher Bakteriendichte zum Zeitpunkt der Analyse führten. Dahingegen zeigten Kunze *et al.* [109], dass die untersuchten klinischen Isolate der gleichen Spezies untereinander gleiches Wachstumsverhalten aufweisen.

Nachdem die klinische Relevanz der Referenzstämme begrenzt ist, könnte argumentiert werden, dass die Unterschiede in VOC-Profilen im Rahmen der Bakteriendifferenzierung auf Stämme statt Bakterienspezies zurückführen sind. Weiterführende Untersuchungen an klinischen Isolaten sind erforderlich, um die Fähigkeit der IMS-Methode zur Bakterienidentifikation anhand von VOC-Profilen zu bewerten.

5.1.7 *In-vitro in-vivo* Translation

Die Diagnose bakterieller Infektionen in der Atemluft stellt einen vielversprechenden diagnostischen Ansatz für die Zukunft dar. Zur Translation von bakteriellen *in-vitro* VOC-Profilen in die klinische Praxis gibt es ein paar weitere kritische Punkte zu berücksichtigen.

Zum einen befinden sich Bakterien bezüglich der Nährstoffverhältnisse im menschlichen Körper in einer anderen Umgebung als unter *in-vitro* Bedingungen [217]. Zum anderen werden VOCs auch durch Interaktionen zwischen Bakterien und dem Wirt sowie immunologischen Wirtsreaktionen gebildet, die zu einem anderen VOC-Profil in der Atemluft als in Kulturen führen können [49, 217]. Diese Tatsache konnte in der Arbeit von Zhu *et al.* [185] unter kontrollierten Bedingungen aufgezeigt werden, da in der Atemluft der infizierten Mäuse nur ein Drittel der *in-vitro* identifizierten bakteriellen VOCs präsent waren.

Bei Menschen bietet sich die Pneumonie als Modellerkrankung an, da die Infektion der Lunge sich direkt in die Atemluft überträgt. Ein praktisches Problem ist die eindeutige Zuordnung der Krankheit zum jeweiligen verursachenden Pathogen. In nur circa 40 % aller Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie konnten pathogene Erreger, darunter 27 % Viren und 14 % Bakterien, mit derzeitigen mikrobiologischen Methoden in klinischen Proben nachgewiesen werden [218].

Mit DMS konnten Purkhart *et al.* [116] am Beispiel von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Ziegen nachweisen, dass Infizierte von Nichtinfizierten anhand von gleichen VOC-Profilen sowohl in der Atemluft als auch in Fäzes unterschieden werden konnten. Zudem konnte in einem Mausmodell aufgezeigt werden, dass sieben verschiedene bakterielle Infektionen anhand der VOC-Profile der Atemluft unterschieden werden können [53].

Eine IMS-Analyse der menschlichen Atemluft in Kombination mit nativen Proben, mikrobiologischen Diagnostikverfahren und *in-vitro* Studien wäre als Vorstudie interessant, um die Machbarkeit der Atemluftanalyse zur Detektion von Pneumonie-verursachenden Erregern zu untersuchen. Hierdurch könnte sich die Atemluftanalyse als Lösung zur Detektion der Pneumonie-verursachenden Erreger anbieten.

5.2 *In-vitro* Untersuchung der Zellkulturen mit und ohne RS-Viren

Mycobacterium tuberculosis wurde seitens des European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) 2009 als Infektionserreger mit hoher Risikopriorität für eine potenzielle Ausbreitung im Flugverkehr eingestuft, danach folgten SARS- und Influenza-Viren [219]. In den letzten Jahrzehnten wurde häufig über eine Verbreitung von Viren im Flugverkehr berichtet. Diese waren insbesondere die Influenza H1N1 (bekannt als Schweinegrippe) und Coronaviren (SARS und MERS), aktuell SARS-CoV-2 [2, 3, 220]. Daher stellen Viruserkrankungen heute das vordringlichste Problem dar.

Wie im Teil Bakterien beschrieben lassen sich Infektionen über VOCs nachweisen. Diese reflektieren den physiologischen und metabolischen Zustand eines Organismus. Die Herausforderung bei Viren ist, dass diese keinen Metabolismus besitzen und somit keine eigenständigen Metabolite generieren. Viren infizieren Wirtszellen und bedienen sich des Metabolismusapparats des Wirts zur Replikation. Im Folgenden wurde *in-vitro* unter kontrollierten Bedingungen untersucht, ob durch den Virus-bedingten Eingriff in den Metabolismus der Wirtszellen ein verändertes VOC-Profil generiert wird, das mit der IMS nachweisbar ist.

In dieser Arbeit wurden Epithelzellen (HEp-2) infiziert mit humanen Respiratorische Synzytial-Viren *in-vitro* auf metabolische VOCs untersucht. Das RSV gehört neben Influenzaviren zu den weltweit bedeutendsten Erregern, die auf der Nordhalbkugel in den Wintermonaten saisonal zirkulieren und insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern schwere Infektionen der oberen und unteren Atemwege verursachen [221–223]. In dieser Altersgruppe sind RSV-Infektionen weltweit eine der Hauptursachen für Hospitalisierung und Todesfälle [224]. Auch ältere und immungeschwächte Personen besitzen ein erhöhtes Risiko, an einer RSV-Infektion schwer zu erkranken [225].

5.2.1 Probennahme

Anders als bei Bakterien lassen sich Viren nicht ohne weiteres in einer Kulturflasche kultivieren, sondern sind auf spezifische Zellen zur Replikation angewiesen. Nachdem RSV

primär die Epithelzellen der oberen Atemwege infizieren [226], eignen sich Epithelzellen hierfür am besten. HEp-2-Zellen werden als meist verwendetes, zelluläres Modell zur Infektion und Vermehrung von RSV-Viren eingesetzt [227].

Wie alle epithelialen Zellen sind HEp-2-Zellen adhärent, weshalb diese nur in Zellkulturflaschen mit spezieller Beschichtung, die eine ideale Haftung der Zellen ermöglichen, kultiviert werden können. Problematisch sind undichte Gasaustauschfilterkappen der Zellkulturflaschen, die zu einem Verlust von VOCs führen.

Um die Kultivierung der adhärennten Zellen zu berücksichtigen, wurden zwei verschiedene Probennahme-Ansätze evaluiert: Probennahme von VOCs aus Kulturflaschen mit Zellen und von HS-Vials mit den Überständen der Zellkulturen. Um die VOCs im Headspace anzureichern, wurde eine Stunde vor der IMS-Analyse ein Septum in die Kappe der Kulturflaschen eingesetzt. Um den Zellstress zu reduzieren, wurde keine längere Anreicherungszeit verwendet.

Unterschiedliche Materialien der Kulturflaschen können Unterschiede in VOC-Profilen hervorrufen. Wie im Ergebnisteil beschrieben generierten die HEp-2-Zellen in den Kulturflaschen wesentlich mehr VOC-Peaks als im Überstand der Zellen in HS-Vials. Nachdem diese Peaks auch in den Kontrollproben nachweisbar waren, zeigen diese, dass Standardzellkulturflaschen VOCs freisetzen, vermutlich durch Weichmacher, die zusätzliche Peaks zum VOC-Profil ergänzen [228, 229]. Nachteilig an der Verwendung von Zellkulturflaschen sind die störenden Kunststoff-Peaks, die mit anderen bedeutsamen metabolischen VOCs interferieren und damit zu einer falschen Schlussfolgerung führen können [228, 230]. Dagegen emittieren Glasmaterialien weniger eigene VOCs, weshalb Glasflaschen, u. a. HS-Vials, in VOC-Studien bevorzugt werden sollen [94, 230].

Der Einfluss verschiedener Probennahme-Ansätze auf VOC-Profile wurde bereits mit GC-MS untersucht. Ähnlich wie in dieser Arbeit, verglichen Schallschmidt *et al.* [229] drei verschiedene Ansätze zur Probennahme von VOCs: Kulturflaschen mit Zellkultur, HS-Vials mit Gasprobe stammend aus der Zellkultur und HS-Vials mit Überständen aus Zellkulturen. Die Kulturflaschen wurden ebenfalls eine Stunde vor der Analyse mit einer Septumkappe gasdicht verschlossen. Die meisten VOCs, die eine signifikant höhere Konzentration gegenüber der Kontrollprobe aufwiesen, wurden in Gasproben (20), gefolgt von Zellkulturen (14) und von Überständen aus Zellkulturen (6), gefunden. Fünf dieser VOCs in Überständen tauchten auch in anderen Proben auf. Dieses Phänomen konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden.

Nach Subtraktion der Peaks der Kontrollproben wiesen die Überstände der Zellkulturen weniger Peaks als die Zellkulturen auf. Beide Kulturtypen wiesen hierbei ähnliche Peaks auf. Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Metabolismus der virusinfizierten Zellen. Deshalb wurden die Zellkulturen näher analysiert, da diese Proben das gesamte VOC-Profil der Zellen und des Mediums repräsentieren. In den Zellkulturen wurden im Vergleich zu zellfreien Kontrollen vier signifikante leichtflüchtige VOC-Peaks für Hep-2-Zellen, die auch mit niedrigeren Konzentrationen im Überstand nachweisbar waren, gefunden. Anders als in der Arbeit von Schallschmidt *et al.* [229] wurden die Proben an verschiedenen Tagen vorbereitet und analysiert. Diese Herangehensweise diente dem Ausschluss zufälliger Einflüsse und um reproduzierbare Peaks für HEp-2-Zellen zu finden. Möglicherweise führte dieses Vorgehen zu einer Verminderung diskriminatorischer VOC-Marker für HEp-2-Zellen.

Im Gegensatz zu Schallschmidt *et al.* [229] wurde weder eine Analyse von leeren Zellkulturflaschen noch eine chemische Identifizierung der VOC-Peaks in dieser Arbeit implementiert. Zum Nachweis, dass die genannten vier Peaks als Marker für die HEp-2-Zellen und nicht für die Kulturflaschen oder Medien spezifisch sind, wurden Kulturen mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Signale für diese Peaks mit höheren Zellkonzentrationen positiv korrelieren. Dagegen blieb das Signal in den Kontrollproben unabhängig vom Kontrollmedium und der Flasche konstant. Dies zeigt, dass die vier genannten VOC-Peaks aus dem Zellstoffwechsel stammen und somit als Biomarker für HEp-2-Zellen angesehen werden können.

5.2.2 RSV-Kulturen

Die VOC-Unterschiede zwischen nicht-infizierten und infizierten Kulturen können auf zwei Arten entstehen: Konzentrationsänderung in zellspezifischen VOCs oder neue VOCs infolge der Infektion [93].

Die bereits erwähnten vier für HEp-2-Zellen spezifischen Peaks wurden herangezogen, um den Effekt der Virusinfektion auf die Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in nicht-infizierten Zellen die Konzentrationen der zellspezifischen Peaks gegenüber infizierten Zellen über den Infektionszeitraum zunahmen. Dagegen nahmen zwei dieser Peaks in infizierten Kulturen bereits nach 24 Stunden der Infektion in ihrer Signalintensität ab. Diese Konzentrationsveränderungen deuten darauf hin, dass die Virusinfektion den Zellstoffwechsel verändert. Das Ausmaß der Beeinträchtigung der metabolischen Prozesse der Wirtszelle scheint einen Zusammenhang mit der Viruskonzentration zu haben.

Interessanterweise liefert die beobachtete Entwicklung der zellulären VOC-Peaks ein Spiegelbild der Verhältnisse in Zellkulturen. Über die Modifikation des Zellstoffwechsels hinaus können RS-Viren morphologische Veränderungen in Zellen verursachen, die unter dem Phasenkontrastmikroskop sichtbar sind. Ein Teil der infizierten Zellen fusionierte bereits nach 24 Stunden zu mehrkernigen Riesenzellen (Synzytien). Im weiteren Verlauf der Infektion lösten sich die Synzytien von der Oberfläche und die Mehrheit der Zellen war nekrotisch. Dagegen änderten die nicht-infizierten Zellen die Morphologie nicht und nahmen über den Infektionszeitraum in der Zellzahl zu. Aufgrund des fehlenden Platzes an der Oberfläche zur Adhäsion kam es zur Überwucherung und somit zum Absterben dieser Zellen [231]. Sowohl anhand der VOCs als auch in der Zellmorphologie lassen sich die infizierten Zellen von nicht-infizierten Zellen bereits nach 24 Stunden unterscheiden. Zusammengefasst spiegeln die zellspezifischen VOC-Peaks den Zellstatus wider und ändern sich bei Vorliegen einer Virusinfektion in der Konzentration.

Das Verhalten der RS-Viren, in Atemwegen und Lungenparenchym Riesensynzytien zu bilden, führt auch zur Benennung des Virus [226].

In beiden unabhängigen Untersuchungen zur Viruskonzentration und Infektionsdauer wurden keine exklusiven VOC-Peaks für infizierte Zellen identifiziert. Nur wenige VOC-Peaks weisen eine höhere Signalintensität als bei den nicht-infizierten Zellen auf. Im Headspace der virusinfizierten Zellkulturen wurde nur ein VOC-Peak gefunden, der im Infektionsverlauf einen zunehmenden Trend im Vergleich zu nicht-infizierten Kulturen zeigt. Dieser Peak wurde in der unabhängigen Untersuchung zur Viruskonzentration nicht beobachtet. Umgekehrt wurden Peaks in der Untersuchung zur Viruskonzentration, die als spezifisch für virusinfizierte Zellen angenommen wurden, in der Untersuchung zum Infektionsverlauf nicht als signifikant eingestuft. Alle genannten VOC-Peaks wiesen die gleichen relativen Driftzeiten (rel. td von 1,93 oder 2,13) bei unterschiedlichen Retentionszeiten auf.

Ein Grund für diese Unstimmigkeiten könnte sein, dass in beiden unabhängigen Untersuchungen die Proben nacheinander mit MCC-IMS gemessen wurden. Dabei könnte es zu einer Verschleppung der intensiven Peaks von einer Messung zur anderen gekommen sein. Im Nachgang wurden auch die leeren Kulturflaschen mit MCC-IMS gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Materialien der Kulturflaschen für die intensiven Peaks verantwortlich waren (Abbildung 37 im Anhang 3). Somit könnten die Kunststoffpeaks die metabolischen VOC-Peaks verschleiern und eine Identifikation erschweren.

Über zelluläre Veränderungen assoziiert mit viralen Infektionen *in-vitro* wurde bereits berichtet [93, 118, 232]. Sowohl die verwendete Zelllinie als auch die eingesetzte Virusmenge

(MOI) spielt eine entscheidende Rolle in der Produktion von Metaboliten und damit für VOC Unterschiede [93, 118].

Mit GC-MS wurden VOCs verschiedener Zelllinien infiziert mit verschiedenen respiratorischen Viren untersucht. B-lymphoblastoide Zellen infiziert mit drei verschiedenen Influenza-Stämmen emittierten eine Reihe verschiedener signifikanter VOCs (>24 VOCs) sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach Infektion [93]. Ein Teil dieser VOCs wurde ausschließlich bei Virus-infizierten Zellen beobachtet, während andere in unterschiedlichen Konzentrationen bei nicht-infizierten und infizierten Zellen und bei verschiedenen Virusstämmen nachgewiesen wurden [94]. Umgekehrt wurde in der Studie von Schivo *et al.* [118] festgestellt, dass primäre tracheobronchiale Epithelzellen nur wenige VOCs produzieren, mit denen sich Rhinovirus-infizierte von nicht-infizierten Zellen unterscheiden lassen. Diese signifikanten VOCs variierten im Verlauf der Infektion in der Anzahl und im Substanztyp (nach 12 Stunden: 5 VOCs, 24 Stunden: 2 VOCs, 48 Stunden: 9 VOCs), die meisten wurden nach 48 Stunden identifiziert.

Im Gegensatz hierzu konzentriert sich diese Arbeit nur auf die VOC-Peaks, die zu allen Messzeitpunkten vorlagen und deren Signal im Infektionszeitraum anstieg. Dies beruht auf der Annahme, dass diese VOCs auf metabolischen Vorgängen beruhen, die während des gesamten Infektionsprozesses verändert sind.

Martín-Vicente *et al.* [233] konnten mittels LC-MS zeigen, dass HEp-2-Zellen mit demselben Virusstamm 18 Stunden nach Infektion eine signifikante Änderung des Zellstoffwechsels mit Hochregulierung des Kohlenhydrat- und Herunterregulierung des Lipid-Metabolismus aufwiesen.

Die beobachtete geringe Ausbeute an VOCs der Epithelzellen könnte auf zwei Gründen beruhen. Eine niedrige Durchlässigkeit der Zellmembran könnte eine Hürde für die Beförderung von VOCs nach außen darstellen [118]. Eine andere Erklärung könnte auf die Wachstumseigenschaften der Zellen zurückgeführt werden. Als adhärente Zellen können sich primäre tracheobronchiale Epithelzellen und HEp-2-Zellen nur an der Oberfläche der Kulturflasche vermehren, dagegen können die B-lymphoblastoiden Zellen in [93] in der Suspension ohne Anheftung kultiviert werden. Des Weiteren emittieren Immunzellen zahlreiche Zytokine und könnten deshalb auch mehr VOCs generieren.

In der Arbeit von Hillyer *et al.* [234] wurde aufgezeigt, dass Epithelzellen, die aus verschiedenen Kompartimenten der Atemwege stammen, unterschiedlich auf eine RSV-Infektion reagieren. Alveoläre Zellen exprimierten höhere Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, während Bronchialzellen Komponenten mit antiviralen

Funktionen freisetzen. Im Zusammenhang mit unterschiedlichen Virusmengen zeigten die Zellen eine unterschiedliche Affinität zu RS-Viren, die mit der angeborenen Immunantwort korreliert. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Virusmenge eine Rolle in der Sekretion bestimmter Komponenten spielt [234, 235].

Im Gegensatz zu dieser Arbeit verwendeten Aksenov *et al.* [93] und Schivo *et al.* [118] zehnfach höhere Konzentrationen ($MOI = 1$) von Viren für die Untersuchung von VOCs. MOI entspricht dem Verhältnis von Viruspartikeln zu Zellen. Dies bedeutet, durch eine höhere MOI wird eine höhere Infektionsrate der Zellen erreicht und damit könnten höhere Konzentrationen an VOCs gebildet werden. Andererseits besitzen RS-Viren eine toxische Wirkung auf die HEp-2-Zellen (siehe mikroskopische Ergebnisse in dieser Arbeit), weshalb niedrige MOIs von 0,05 und 0,1 für die VOC-Untersuchung in dieser Arbeit verwendet wurden. 70 Stunden nach Infektion zeigte eine MOI von 0,1 einen größeren Effekt auf die Zellen als eine MOI von 0,05. Deshalb wurde eine MOI von 0,1 für die Untersuchung zur Infektionsdauer verwendet.

Eine Limitierung stellen die verwendeten HEp-2-Zellen dar. Hierbei handelt es sich nicht um eine reine Epithelzelllinie, sondern um immortalisierte Tumorzellen aus einem Larynxkarzinom kreuzkontaminiert mit HeLa-, und damit Ovarialkarzinomzellen [236]. Es ist fraglich, ob die Reaktion dieser Zellen auf eine RSV-Infektion der Reaktion des Atemwegepithels auf eine RSV-Infektion entspricht.

Die *in-vitro* Ergebnisse sind auch nur teilweise für eine tatsächliche Infektion repräsentativ, da bei der Bekämpfung von Virusinfektionen im menschlichen Körper verschiedene Zelltypen wie Immun- und Epithel-Zellen an der Zusammenarbeit beteiligt sind [237]. Des Weiteren kann ein komplexes zelluläres immunologisches System nicht unter *in-vitro* Bedingungen untersucht werden.

Dennoch zeigen diese *in-vitro* Untersuchungen, dass eine Virusinfektion durch Änderung zellspezifischer VOCs mit der IMS nachweisbar ist. Zudem könnten VOCs nicht nur für die Diagnose einer Infektion, sondern auch für den Zeitverlauf der Infektion zur Anwendung kommen.

5.3 *In-vivo* Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen

Im Gegensatz zu *in-vitro* Bedingungen spielt *in-vivo* nicht nur die Virus-Wirtszellen-Interaktion eine Rolle, sondern auch noch die Aktivierung des Immunsystems, die ebenfalls zu einer Produktion neuer VOCs oder Änderung des VOC-Profiles führen kann.

In einer ersten nicht-veröffentlichten Pilotstudie (Steppert C., persönliche Kommunikation) an wenigen Patienten fanden sich Signale, die darauf hindeuteten, dass die Detektion einer Influenza-A-Infektion in der nasalen Ausatemluft über MCC-IMS möglich ist. Durch den epidemischen Charakter der Influenza-A-Viren wurde eine „Proof-of-Concept“-Studie im Rahmen der Grippezeit 2020 zur Überprüfung der obengenannten Hypothese aufgesetzt. Im Februar und März 2020 erfolgten im Klinikum Bayreuth IMS-Messungen an Patienten, die mit influenzaähnlichen Symptomen aufgenommen wurden. Parallel zur Atemluftanalyse unterzogen sich alle Patienten einem RT-PCR-Test von Nasopharynx-Abstrichen.

Zur gleichen Zeit kam es zu einem weltweiten Ausbruch des Coronavirus SARS-CoV-2. Zur Ausbreitungsreduktion wurden entsprechende Allgemeinmaßnahmen u. a. Maskentragen, Handhygiene sowie Kontaktreduzierung erlassen, die zu einem raschen Rückgang der Influenzafälle weltweit führten [238]. Damit waren ab Anfang März nur noch wenige Influenza-Infizierte für die Untersuchung zugänglich.

Da sich SARS-CoV-2-Viren im Anfangsstadium einer Infektion ähnlich wie bei Influenza-Infektionen im Nasopharynx manifestieren [170, 171], konnte die Analysemethodik mit MCC-IMS bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion mit SARS-CoV-2 unverändert angewandt werden. Zwischen Mitte März und Anfang Mai erfolgten dementsprechend IMS-Untersuchungen bei Patienten in der nasalen Atemluft parallel zu PCR-Tests auf SARS-CoV-2. Dieses Vorgehen hatte den Vorteil, mit der gleichen Messmethodik nicht nur eine Differenzierung zwischen virusinfizierten und nicht-infizierten Patienten zu untersuchen, sondern auch zu überprüfen, ob die beiden Virusinfektionen (Influenza-A und SARS-CoV-2) zu unterschiedlichen Atemluft-VOC-Profilen führen.

Bezüglich Atemluftuntersuchungen am Menschen wurde bereits berichtet, dass Lungenkrebs oder auch neurodegenerative Erkrankungen durch Bestimmung von VOC-Profilen der Atemluft mittels Ionenmobilitätsspektrometrie nachgewiesen werden können [51, 239]. Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung an Influenza-infizierten Patienten existierten keine Studien zur Detektion viraler Infektionen in der Atemluft, sei es mit IMS, MS oder Elektronischer Nase.

Im Zuge der Corona-Pandemie erfolgten weitere Untersuchungen, die nachweisen konnten, dass SARS-CoV-2-Viren unterschiedliche VOC Muster in der Atemluft im Vergleich zu einer Kontrollgruppe induzieren [240, 241]. Mit Hilfe der GC-IMS-Analyse zeigten Ruszkiewicz *et al.* [240], dass in der Atemluft von Patienten mit SARS-CoV-2-Infektion eine erhöhte Konzentration an Aldehyden und Ketonen gegenüber Patienten ohne diese Infektion nachgewiesen werden konnte. Durch eine Kalibrierung des GC-IMS konnten in der Ruszkiewicz' Arbeit [240] im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit VOC-Marker chemisch zugeordnet werden.

Darüber hinaus kann bei der Untersuchung von Ruszkiewicz *et al.* [240] nicht sichergestellt werden, ob die gemessenen VOCs spezifisch für eine SARS-CoV-2-Infektion oder Zeichen einer generellen Virusinfektion sind. Eine Differenzierung verschiedener Virusinfektionen anhand von VOC-Profilen in der Atemluft wurde bisher nicht berichtet. Somit liefert die vorliegende Arbeit die ersten Resultate, dass nicht nur SARS-CoV-2-Infektionen von Kontrollgruppen, sondern auch von Influenza-A-Infektionen durch VOC-Atemluftprofile unterschieden werden können. Selbst ein vermuteter, aber nicht eindeutig PCR-bestätigter Patient konnte in dieser Untersuchung der SARS-CoV-2-Gruppe zugeordnet werden. Eine signifikante Differenzierung zwischen drei Viren, darunter Influenza-A und SARS-CoV-2, konnte mit MCC-IMS in Zellkulturen aufgezeigt werden [242].

Während VOC-Unterschiede bei Bakterien auf dem unterschiedlichen Metabolismus der Spezies beruhen, wird davon ausgegangen, dass verschiedene Virusspezies und -subspezies unterschiedliche Signalkaskaden in Wirtszellen bedingt durch Virusadaption und Bindung an spezifische Rezeptoren aktivieren [93]. So binden Coronaviren an Angiotensin-2-Rezeptoren [171], während Influenza-Viren auf sialylierte Glykanrezeptoren der Epithelzellen abzielen [243]. Zudem können verschiedene Viren bis zu einem gewissen Grad unterschiedliche Wirtsreaktionen induzieren, die zu unterschiedlichen IMS-Spektren mit beitragen können.

Im Gegensatz zu Feuerherd *et al.* [242] und Ruszkiewicz *et al.* [240] wurden in der vorliegenden Untersuchung nur Muster der volatilen Bestandteile bestimmt, ohne die Peaks chemisch zu beschreiben. Dies ist kein Nachteil, da sowohl Hunde [244, 245] als auch die elektronische Nase [246] SARS-CoV-2 positive Proben ohne chemische Charakterisierung detektieren können.

Medikamente, Ernährung, Rauchen sowie Umgebungsluft beeinflussen die ausgeatmeten VOCs und damit gegebenenfalls die Peaks, die zur Identifizierung viraler Infektionen verwendet werden. Entsprechend der avisierten Anwendung als Screeningverfahren wurde in

dieser Studie kein Fasten vor der Atemluftanalyse vorausgesetzt. An Schweinen konnten Traxler *et al.* [247] zeigen, dass es spezifische VOCs für eine Influenzainfektion gibt, die unabhängig von der Fütterung sind.

Atemluft kann auf verschiedenen Wegen entnommen werden, indirekt oder direkt. Mit Hinblick auf ein Vor-Ort-Screening wurde in dieser Arbeit eine direkte Atemluftanalyse angewendet, in der die volatilen Bestandteile durch eine automatische Pumpe direkt in das MCC-IMS eingesaugt wurden. Dagegen mussten Patienten in der Untersuchung von Ruszkiewicz *et al.* [240] in ein konisch geformtes Mundstück ausatmen. Parallel wurde der Atem von Hand mit einer 5 ml Spritze entnommen und anschließend offline dem GC-IMS-Gerät zugeführt. Hierzu ist ein definiertes Atemmanöver des Patienten und geschultes Personal zur Probengewinnung notwendig.

Im Gegensatz zu der aktiven Expiration durch ein Mundstück wurde hier in dieser Arbeit die Nasenluft während einer tiefen spontanen Atmung über eine Schaumstoff-Nasensonde gewonnen. Das IMS-Gerät aspiriert die Atemluftproben automatisch. Deshalb besteht die einzige Aufgabe des Bedienpersonals darin, die Schaumstoff-Nasensonde in ein Nasenloch eines Patienten einzuführen und den Knopf zum Starten der Messung zu drücken. Die Atemluftgewinnungsmethode über die Nase könnte theoretisch auch am nicht kooperativen Patienten angewandt werden. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass bei der Ausatmung über die Nase bei der anfänglichen Infektion im Nasopharynx, wenn noch kein Befall der tieferen Atemwege vorliegt, infektionsspezifische VOCs möglicherweise gezielt aus dem infizierten Bereich gewonnen werden können.

Darüber hinaus kann argumentiert werden, dass bei der aktiven Aspiration der Nasenluft möglicherweise eine Verdünnung der infektionsspezifischen VOCs durch Umgebungsluft aufgetreten sein könnte. Durch die Abdichtung des einen Nasengangs mit der Schaumstoff-Nasensonde kann über den Nasopharynx nur durch den anderen Nasengang Umgebungsluft angesaugt werden. Hier ist davon auszugehen, dass auch VOCs des anderen Nasengangs und Nasopharynx entnommen wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von Patienten mit Verdacht auf eine respiratorische Infektion unmittelbar bei der Klinikaufnahme entnommen und mikrobiologisch untersucht. Demzufolge erfolgte die Atemluftanalyse in der vorliegenden Untersuchung innerhalb der ersten 24 Stunden nach der stationären Aufnahme, während in der Ruszkiewicz' Arbeit [240] die Atemluftproben der Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektionserkrankung entnommen wurden.

Die Standardverfahren zum Nachweis von Atemwegserregern beruhen derzeit auf Abstrichen aus dem Nasopharynx, die im Anschluss mit RT-PCR auf Viren getestet werden. Bei diesem Testregime muss mit bis zu circa 30 % falsch-negativen Ergebnissen gerechnet werden [11, 248]. Die hohe falsch-negative Rate kann unter anderem auf eine unzureichende Probennahme, einer zu geringen Viruslast oder einer Probensammlung in einem zu frühen oder späten Stadium der Infektion zurückzuführen sein [249–251]. Später im Infektionsverlauf können SARS-CoV-2-Viren zur Replikation in die unteren Atemwege gelangen [170, 252], wo sie mit dem Nasopharyngealabstrich nicht mehr erreichbar sind. Bei der Atemluftanalyse können dagegen alle Kompartimente des respiratorischen Trakts durch eine tiefe Ausatmung erfasst werden. Zudem ist die Atemluftanalyse gegenüber den Abstrichtupfern nichtinvasiv.

Eine Atemluftanalyse ist zudem günstig und schnell. Mit einer gesamten Analysezeit inklusive Probennahme von circa vier Minuten können Infektionen mit MCC-IMS detektiert werden, wohingegen schnelle POC-PCR-Geräte für ihre Analyse 30 bis 40 Minuten benötigen [253]. Darüber hinaus ist eine derartige PCR mit 60 € bis zu 200 € pro Untersuchung kostspielig [254]. Antigenschnelltestergebnisse sind zwar in circa 15 Minuten verfügbar, dennoch ist die Sensitivität und Spezifität von der korrekten Anwendung abhängig. Wie die COVID-19 Pandemie im Jahre 2020 zeigte, kann in Pandemiesituationen auch der Nachschub an Abstrichtupfern und Reagenzien ein Problem sein [255, 256]. In unterentwickelten Ländern stehen weder ausgebildetes Personal noch finanzielle Mittel zur Verfügung, um sich RT-PCR für das Massenscreening leisten zu können [257]. Daher könnte das MCC-IMS eine alternative Testperspektive für diese Länder bieten.

Eine große Stärke von MCC-IMS ist, dass diese Methode von Personal mit wenig Expertise durchgeführt werden kann. Die unkomplizierte Anwendung von IMS-Technologien hat sich an Flughäfen bewährt, wo dieses Tool bereits zur Erkennung von Sprengstoffen durch Sicherheitspersonal eingesetzt wird [103]. Das in der Arbeit verwendete IMS-Gerät benötigt zudem keine synthetischen Gase für die Analyse, was wiederum die Verbrauchsmaterialien reduziert und somit eine Vor-Ort-Analyse erleichtert.

Die vorliegende Studie wurde nur an einer begrenzten Anzahl von erwachsenen Patienten der kaukasischen Ethnie durchgeführt. Eine Überlappung der VOCs mit anderen Coronavirusinfektionen ist denkbar. Folglich sind größere Studien einschließlich verschiedener Ethnien, Kinder sowie verschiedener Virentypen und deren Subtypen erforderlich, um die Eignung der IMS als Vor-Ort-Screeningmethode zu überprüfen.

In Singapur wurden bereits zwei Massenspektrometrie-basierte Atemluftanalyseverfahren zur Detektion von COVID-19 an den Flughäfen zugelassen [258–260].

Zusammenfassend zeigen diese „Proof-of-Concept“-Studien, dass die Atemluftanalyse mit IMS eine vielversprechende Screeningmethode ist. Diese IMS-basierte Methode könnte als Ergänzung zu teuren PCR-Tests Infektionen im Sinne eines Massenscreenings schnell und nichtinvasiv identifizieren und die Infektionsverbreitung dadurch eindämmen.

6 Ausblick

Zum Unterbrechen von Infektionsketten sind schnelle, nicht-invasive und kostengünstige Screeningtests für eine breite Anwendung gefragt. In dieser „Proof-of-Concept“-Untersuchung ermöglichte die MCC-IMS eine schnelle Detektion von sieben bakteriellen Infektionserregern *in-vitro* und von SARS-CoV-2 sowie Influenza in der menschlichen Atemluft ohne eine Substanzcharakterisierung der volatilen Bestandteile.

In-vitro Untersuchung der Bakterienkulturen

Mit MCC-IMS ist eine schnelle *in-vitro* Differenzierung von sieben verschiedenen Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme basierend auf spezifischen VOC-Profilen in 90 Minuten Kultivierung möglich.

Unter Verwendung der spezies-spezifischen VOC-Marker ist eine Identifikation der Bakterienspezies auch in Mischkulturen realisierbar. Abhängig von den phänotypischen Eigenschaften könnten Bakterien durch VOC-Peaks analog zur biochemischen Testreihe entlang des Entscheidungsbaums klassifiziert werden. Die VOC-Profile der Bakterienspezies sind teilweise medienabhängig; somit spielt die Medienwahl eine erhebliche Rolle in der *in-vitro* Bakteriendifferenzierung von Kulturen. Die Signalintensität der spezies-spezifischen VOC-Peaks korreliert mit der Bakteriendichte. Die Nachweisgrenze des Verfahrens hängt dabei von den bakterienspezifischen VOCs ab. Verschiedene Referenzstämme einer Bakterienspezies generieren zum großen Teil identische spezies-spezifische VOC-Typen, aber sie können in der Signalintensität signifikant variieren.

Unter Berücksichtigung der methodologischen Faktoren ist ein standardisiertes Protokoll zur *in-vitro* Bakterienidentifikation in Kulturen notwendig. Vorrangig sollten die Nährmedien standardisiert werden sowie eine Untersuchung der VOC-Peaks in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Bakterienkonzentration erfolgen. Andererseits ist ein direkter, kulturunabhängiger *in-vitro* Nachweis von Bakterien in klinischen Proben wünschenswert. Hierbei wäre die Untersuchung in Blutproben, Sputum oder ähnliches der nächste Schritt.

Insgesamt verfügt das IMS-Verfahren über ein großes Zukunftspotenzial, um als *in-vitro* Diagnostikmethode für Bakterien vergleichsweise mit MALDI-TOF-MS etabliert zu werden. Um diese Möglichkeit zu realisieren, ist – wie bei der MALDI-TOF-MS – der Aufbau einer umfangreichen Datenbank von Nöten. Hierzu sind weitere Untersuchungen von klinischen Isolaten verschiedener Bakterienspezies, Genera sowie Familien in großem Umfang

erforderlich. Ebenso sollte ausführlich untersucht werden, ob Resistenzmechanismen zu einer Veränderung in VOC-Profilen führen können.

Dann könnte die MCC-IMS im Gegensatz zu MALDI-TOF-MS, das auf Vorkulturen angewiesen ist, in deutlich kürzerer Zeit bakterielle Erreger differenzieren und im Gegensatz zu MALDI-TOF-MS sogar Resistenzmechanismen nachweisen.

Von Interesse ist die Überprüfung, ob *in-vitro* bakterienspezifische VOCs auch in der Atemluft bestimmbar sind. Die Herausforderung ist hierbei, dass bei weniger als der Hälfte der Pneumonien der auslösende Erreger mit den verfügbaren Diagnostikmethoden nicht identifizierbar sind. Hierzu müssten bei einer entsprechend großen Anzahl von Patienten mit Pneumonien gesicherter Erreger VOC-Profile bestimmt und mit den *in-vitro* Daten abgeglichen werden. Gerade im Bereich der Intensivmedizin könnte die schnelle Erregerbestimmung in der Atemluft über eine rasche zielgerichtete Antibiotikatherapie eine deutliche Prognoseverbesserung erbringen.

In-vitro Untersuchung der Virus-infizierten Zellkulturen

Die Ergebnisse der IMS-Messungen zeigten, dass RSV-infizierte HEp-2-Zellkulturen sich von nicht-infizierten Zellkulturen durch die volatilen Bestandteile unterscheiden lassen. Die VOC-Veränderungen im Infektionsverlauf stehen in Übereinstimmung mit beobachteten morphologischen Veränderungen in Zellkulturen.

Im Organismus ist nicht nur ein, sondern verschiedene Zelltypen sowie das Immunsystem bei der Wirtsreaktion auf eine Virusinfektion beteiligt. Dementsprechend sind *in-vitro* Daten nicht eins-zu-eins auf *in-vivo* Bedingungen übertragbar.

Nichtsdestotrotz liefern die *in-vitro* Erkenntnisse Grundlagen, dass mit der MCC-IMS virusinduzierte metabolische Veränderungen in einer Zelllinie nachweisbar sind.

In-vivo Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen

MCC-IMS erwies sich als vielversprechende, schnelle Screeningmethode zum Nachweis viraler Infektionen in der menschlichen Atemluft. Innerhalb von wenigen Minuten konnten SARS-CoV-2- von Influenza-A-Infektionen und Vergleichsgruppen mit Hilfe der VOC-Profile in der Nasenluft differenziert werden. Die *in-vitro* Studie von Feuerherd *et al.* [242] fand diese Unterscheidung auch in Zellkulturen.

Für die Praxis sind groß angelegte Studien an heterogenen Gruppen unterschiedlicher Ethnien sowie allen Altersgruppen erforderlich, um die Eignung der MCC-IMS-Analyse als

generelles Screeningverfahren bei verschiedensten Störfaktoren zu überprüfen. Wenn sich die Ergebnisse dieser Arbeit auch in derartigen Gruppen reproduzieren lassen, könnte dies ein Durchbruch für ein preiswertes Massenscreening sowohl im öffentlichen Bereich als auch für eine Eingangskontrolle in Kliniken sein. Über VOCs könnten auch Probanden mit asymptomatischen Infektionen erkannt werden [247]. Auch die VOC-Atemluftanalyse von bakteriellen gegenüber viralen Infektionen wäre interessant, um unnötige, Resistenzentwicklung-treibende Einsätze von Antibiotika bei Virusinfektionen zu vermeiden.

Um die IMS-Technologie zu einem Point-of-Care-Screeningverfahren weiterzuentwickeln, ist eine Standardisierung der Gerätetechnologie und der Auswertungsalgorithmen erforderlich, die nur durch eine enge Kooperation von Geräteherstellern, Biologen, Medizinern und Bioinformatikern bewerkstelligt werden kann.

Zusammenfassend ist MCC-IMS mit einer kurzen Analysezeit von wenigen Minuten attraktiv für ein schnelles Screening auf Infektionen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*. Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit zum Fortschritt der VOC-Analyse im biomedizinischen Bereich bei.

Literaturverzeichnis

1. Pavia AT (2007) Germs on a plane: aircraft, international travel, and the global spread of disease. *J Infect Dis* 195(5):621–622. doi: 10.1086/511439
2. Olsen SJ, Chang H-L, Cheung TY-Y et al. (2003) Transmission of the severe acute respiratory syndrome on aircraft. *N Engl J Med* 349(25):2416–2422. doi: 10.1056/NEJMoa031349
3. Khan K, Arino J, Hu W et al. (2009) Spread of a novel influenza A (H1N1) virus via global airline transportation. *N Engl J Med* 361(2):212–214. doi: 10.1056/NEJMc0904559
4. Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP et al. (2013) The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clin Infect Dis* 56(9):1310–1318. doi: 10.1093/cid/cit020
5. Gunnink LB, Arouri DJ, Jolink FEJ et al. (2021) Compliance to Screening Protocols for Multidrug-Resistant Microorganisms at the Emergency Departments of Two Academic Hospitals in the Dutch-German Cross-Border Region. *Tropical medicine and infectious disease* 6(1):15. doi: 10.3390/tropicalmed6010015
6. Selvey LA, Antão C, Hall R (2015) Entry screening for infectious diseases in humans. *Emerg Infect Dis* 21(2):197–201. doi: 10.3201/eid2102.131610
7. Gostic KM, Kucharski AJ, Lloyd-Smith JO (2015) Effectiveness of traveller screening for emerging pathogens is shaped by epidemiology and natural history of infection. *eLife* 4:e05564. doi: 10.7554/eLife.05564
8. Váradi L, Luo JL, Hibbs DE et al. (2017) Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chem Soc Rev* 46(16):4818–4832. doi: 10.1039/c6cs00693k
9. Reta DH, Tessema TS, Ashenef AS et al. (2020) Molecular and Immunological Diagnostic Techniques of Medical Viruses. *Int J Microbiol* 2020:8832728. doi: 10.1155/2020/8832728
10. Weißgerber P (2017) Mikrobiologische Diagnostik und Infektiologie. In: Schulz-Stübner S (ed) *Repetitorium Krankenhaushygiene, hygienebeauftragter Arzt und ABS-beauftragter Arzt*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 159–195
11. Weissleder R, Lee H, Ko J et al. (2020) COVID-19 diagnostics in context. *Sci Transl Med* 12(546):eabc1931. doi: 10.1126/scitranslmed.abc1931
12. Scheiblauer H, Filomena A, Nitsche A et al. (2021) Comparative sensitivity evaluation for 122 CE-marked rapid diagnostic tests for SARS-CoV-2 antigen, Germany, September 2020 to April 2021. *Euro Surveill* 26(44):2100441. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.44.2100441
13. Wagenhäuser I, Knies K, Rauschenberger V et al. (2021) Clinical performance evaluation of SARS-CoV-2 rapid antigen testing in point of care usage in comparison to RT-qPCR. *EBioMedicine* 69:103455. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103455
14. Lee J, Song J-U, Shim SR (2021) Comparing the diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests to real time polymerase chain reaction in the diagnosis of SARS-CoV-

- 2 infection: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol* 144:104985. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104985
15. Shirasu M, Touhara K (2011) The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *Journal of biochemistry* 150(3):257–266. doi: 10.1093/jb/mvr090
 16. John A. Washington (1996) Principles of Diagnosis. In: Baron S (ed) *Medical Microbiology*, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas
 17. van Belkum A, Durand G, Peyret M et al. (2013) Rapid clinical bacteriology and its future impact. *Ann Lab Med* 33(1):14–27. doi: 10.3343/alm.2013.33.1.14
 18. AlMasoud N, Muhamadali H, Chisanga M et al. (2021) Discrimination of bacteria using whole organism fingerprinting: the utility of modern physicochemical techniques for bacterial typing. *Analyst* 146(3):770–788. doi: 10.1039/d0an01482f
 19. Idelevich EA, Reischl U, Becker K (2018) New Microbiological Techniques in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *Dtsch Arztebl Int* 115(49):822–832. doi: 10.3238/arztebl.2018.0822
 20. Anjum MF, Zankari E, Hasman H (2017) Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiol Spectr* 5(6). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0011-2017
 21. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G et al. (2018) MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med* 6(12):240. doi: 10.21037/atm.2018.06.28
 22. Florio W, Baldeschi L, Rizzato C et al. (2020) Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. *Front Cell Infect Microbiol* 10:572909. doi: 10.3389/fcimb.2020.572909
 23. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC et al. (2013) Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 57 Suppl 3:S139-70. doi: 10.1093/cid/cit578
 24. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R et al. (2013) Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 68(12):2710–2717. doi: 10.1093/jac/dkt253
 25. Mezger A, Gullberg E, Göransson J et al. (2015) A general method for rapid determination of antibiotic susceptibility and species in bacterial infections. *J Clin Microbiol* 53(2):425–432. doi: 10.1128/JCM.02434-14
 26. Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA (2017) Laboratory Diagnosis of Virus Diseases. *Fenner and White's Medical Virology*:135–154. doi: 10.1016/B978-0-12-375156-0.00010-2
 27. Cella LN, Blackstock D, Yates MA et al. (2013) Detection of RNA viruses: current technologies and future perspectives. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 23(2):125–137. doi: 10.1615/critreveukaryotgeneexpr.2013006974
 28. Cassedy A, Parle-McDermott A, O'Kennedy R (2021) Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods. *Front Mol Biosci* 8:637559. doi: 10.3389/fmolb.2021.637559
 29. Mahony JB (2008) Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin*

Microbiol Rev 21(4):716–747. doi: 10.1128/CMR.00037-07

30. Brendish NJ, Schiff HF, Clark TW (2015) Point-of-care testing for respiratory viruses in adults: The current landscape and future potential. *J Infect* 71(5):501–510. doi: 10.1016/j.jinf.2015.07.008
31. Schubert S, Wieser A (2013) Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik. *Biospektrum* 19(7):743–747. doi: 10.1007/s12268-013-0386-x
32. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19(1):165–256. doi: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
33. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ et al. (2000) Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13(4):559–570. doi: 10.1128/CMR.13.4.559
34. Alcoba-Florez J, González-Montelongo R, Íñigo-Campos A et al. (2020) Fast SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR in preheated nasopharyngeal swab samples. *Int J Infect Dis* 97:66–68. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.099
35. Premraj A, Aleyas AG, Nautiyal B et al. (2020) Nucleic Acid and Immunological Diagnostics for SARS-CoV-2: Processes, Platforms and Pitfalls. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 10(11):866. doi: 10.3390/diagnostics10110866
36. Wolters F, van de Bovenkamp J, van den Bosch B et al. (2020) Multi-center evaluation of cepheid xpert® xpress SARS-CoV-2 point-of-care test during the SARS-CoV-2 pandemic. *J Clin Virol* 128:104426. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104426
37. Gibani MM, Toumazou C, Sohbaty M et al. (2020) Assessing a novel, lab-free, point-of-care test for SARS-CoV-2 (CovidNudge): a diagnostic accuracy study. *The Lancet Microbe* 1(7):e300-e307. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30121-X
38. Mardian Y, Kosasih H, Karyana M et al. (2021) Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. *Frontiers in medicine* 8:615099. doi: 10.3389/fmed.2021.615099
39. Mak GC, Cheng PK, Lau SS et al. (2020) Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol* 129:104500. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500
40. Chartrand C, Tremblay N, Renaud C et al. (2015) Diagnostic Accuracy of Rapid Antigen Detection Tests for Respiratory Syncytial Virus Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol* 53(12):3738–3749. doi: 10.1128/JCM.01816-15
41. Biggs C, Walsh P, Overmyer CL et al. (2010) Performance of influenza rapid antigen testing in influenza in emergency department patients. *Emergency Medicine Journal* 27(1):5–7. doi: 10.1136/emj.2009.078683
42. Bijland LR, Bomers MK, Smulders YM (2013) Smelling the diagnosis: a review on the use of scent in diagnosing disease. *Neth J Med* 71(6):300–307
43. Cox CD, Parker J (1979) Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 9(4):479–484. doi: 10.1128/jcm.9.4.479-484.1979
44. Arasaradnam RP, Covington JA, Harmston C et al. (2014) Review article: next generation diagnostic modalities in gastroenterology--gas phase volatile compound biomarker detection. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 39(8):780–789. doi:

10.1111/apt.12657

45. Menezes HC, Amorim LCA, Cardeal ZL (2013) Sampling and Analytical Methods for Determining VOC in Air by Biomonitoring Human Exposure. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43(1):1–39. doi: 10.1080/10643389.2011.604239
46. Vautz W, Hariharan C, Weigend M (2018) Smell the change: On the potential of gas-chromatographic ion mobility spectrometry in ecosystem monitoring. *Ecol Evol* 8(9):4370–4377. doi: 10.1002/ece3.3990
47. Hernández-Mesa M, Ropartz D, García-Campaña AM et al. (2019) Ion Mobility Spectrometry in Food Analysis: Principles, Current Applications and Future Trends. *Molecules* 24(15):2706. doi: 10.3390/molecules24152706
48. Sethi S, Nanda R, Chakraborty T (2013) Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 26(3):462–475. doi: 10.1128/CMR.00020-13
49. Hong-Geller E, Adikari S (2018) Volatile Organic Compound and Metabolite Signatures as Pathogen Identifiers and Biomarkers of Infectious Disease. In: Rincken T, Kivirand K (eds) *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis*. IntechOpen, Rijeka
50. Haick H, Cohen-Kaminsky S (2015) Detecting lung infections in breathprints: empty promise or next generation diagnosis of infections. *Eur Respir J* 45(1):21–24. doi: 10.1183/09031936.00183714
51. Bach J-P, Gold M, Mengel D et al. (2015) Measuring Compounds in Exhaled Air to Detect Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *PLoS One* 10(7):e0132227. doi: 10.1371/journal.pone.0132227
52. Sahota AS, Gowda R, Arasaradnam RP et al. (2016) A simple breath test for tuberculosis using ion mobility: A pilot study. *Tuberculosis (Edinb)* 99:143–146. doi: 10.1016/j.tube.2016.05.005
53. Zhu J, Bean HD, Jiménez-Díaz J et al. (2013) Secondary electrospray ionization-mass spectrometry (SESI-MS) breathprinting of multiple bacterial lung pathogens, a mouse model study. *J Appl Physiol* (1985) 114(11):1544–1549. doi: 10.1152/jappphysiol.00099.2013
54. Boots AW, Smolinska A, van Berkel JJBN et al. (2014) Identification of microorganisms based on headspace analysis of volatile organic compounds by gas chromatography-mass spectrometry. *J Breath Res* 8(2):27106. doi: 10.1088/1752-7155/8/2/027106
55. Gasparri R, Santonico M, Valentini C et al. (2016) Volatile signature for the early diagnosis of lung cancer. *J Breath Res* 10(1):16007. doi: 10.1088/1752-7155/10/1/016007
56. Altomare DF, Picciariello A, Rotelli MT et al. (2020) Chemical signature of colorectal cancer: case-control study for profiling the breath print. *BJS Open* 4(6):1189–1199. doi: 10.1002/bjs5.50354
57. de Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H et al. (2014) A review of the volatiles from the healthy human body. *J Breath Res* 8(1):14001. doi: 10.1088/1752-7155/8/1/014001
58. Beale DJ, Jones OAH, Karpe AV et al. (2016) A Review of Analytical Techniques and Their Application in Disease Diagnosis in Breathomics and Salivaomics Research. *Int J Mol Sci* 18(1):24. doi: 10.3390/ijms18010024

59. Das S, Pal S, Mitra M (2016) Significance of Exhaled Breath Test in Clinical Diagnosis: A Special Focus on the Detection of Diabetes Mellitus. *J Med Biol Eng* 36(5):605–624. doi: 10.1007/s40846-016-0164-6
60. Smith D, Spanel P (2007) The challenge of breath analysis for clinical diagnosis and therapeutic monitoring. *Analyst* 132(5):390–396. doi: 10.1039/b700542n
61. Mathew TL, Pownraj P, Abdulla S et al. (2015) Technologies for Clinical Diagnosis Using Expired Human Breath Analysis. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 5(1):27–60. doi: 10.3390/diagnostics5010027
62. van der Schee MP, Paff T, Brinkman P et al. (2015) Breathomics in lung disease. *Chest* 147(1):224–231. doi: 10.1378/chest.14-0781
63. Horváth I, Lázár Z, Gyulai N et al. (2009) Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur Respir J* 34(1):261–275. doi: 10.1183/09031936.00142508
64. Lamote K, Nackaerts K, van Meerbeeck JP (2014) Strengths, weaknesses, and opportunities of diagnostic breathomics in pleural mesothelioma—a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23(6):898–908. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0737
65. Fenske JD, Paulson SE (1999) Human breath emissions of VOCs. *J Air Waste Manag Assoc* 49(5):594–598. doi: 10.1080/10473289.1999.10463831
66. Phillips M, Herrera J, Krishnan S et al. (1999) Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 729(1-2):75–88. doi: 10.1016/s0378-4347(99)00127-9
67. Lourenço C, Turner C (2014) Breath analysis in disease diagnosis: methodological considerations and applications. *Metabolites* 4(2):465–498. doi: 10.3390/metabo4020465
68. Amann A, de Lacy Costello B, Miekisch W et al. (2014) The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res* 8(3):34001. doi: 10.1088/1752-7155/8/3/034001
69. Schulz S, Dickschat JS (2007) Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24(4):814–842. doi: 10.1039/b507392h
70. Elmassry MM, Piechulla B (2020) Volatilomes of Bacterial Infections in Humans. *Front Neurosci* 14:257. doi: 10.3389/fnins.2020.00257
71. Thorn RMS, Greenman J (2012) Microbial volatile compounds in health and disease conditions. *J Breath Res* 6(2):24001. doi: 10.1088/1752-7155/6/2/024001.
72. Zhu J, Bean HD, Kuo Y-M et al. (2010) Fast detection of volatile organic compounds from bacterial cultures by secondary electrospray ionization-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48(12):4426–4431. doi: 10.1128/JCM.00392-10
73. Thorn RMS, Reynolds DM, Greenman J (2011) Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains in vitro. *J Microbiol Methods* 84(2):258–264. doi: 10.1016/j.mimet.2010.12.001
74. Scott-Thomas AJ, Syhre M, Pattermore PK et al. (2010) 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm Med* 10:56. doi: 10.1186/1471-2466-10-56
75. Sanchez EL, Lagunoff M (2015) Viral activation of cellular metabolism. *Virology* 479-

480:609–618. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.038

76. Thaker SK, Ch'ng J, Christofk HR (2019) Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol* 17(1):59. doi: 10.1186/s12915-019-0678-9
77. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ (2016) The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol* 38(4):471–482. doi: 10.1007/s00281-016-0558-0
78. Schwarz KB (1996) Oxidative stress during viral infection: A review. *Free radical biology & medicine* 21(5):641–649. doi: 10.1016/0891-5849(96)00131-1
79. Cambau E, Poljak M (2020) Sniffing animals as a diagnostic tool in infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 26(4):431–435. doi: 10.1016/j.cmi.2019.10.036
80. McCulloch M, Jezierski T, Broffman M et al. (2006) Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integrative cancer therapies* 5(1):30–39. doi: 10.1177/1534735405285096
81. Horvath G, Järverud GAK, Järverud S et al. (2008) Human ovarian carcinomas detected by specific odor. *Integrative cancer therapies* 7(2):76–80. doi: 10.1177/1534735408319058
82. Sonoda H, Kohnoe S, Yamazato T et al. (2011) Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. *Gut* 60(6):814–819. doi: 10.1136/gut.2010.218305
83. Weetjens BJC, Mgode GF, Machang'u RS et al. (2009) African pouched rats for the detection of pulmonary tuberculosis in sputum samples. *Int J Tuberc Lung Dis* 13(6):737–743
84. Kanaan R, Farkas N, Hegyi P et al. (2021) Rats sniff out pulmonary tuberculosis from sputum: a diagnostic accuracy meta-analysis. *Sci Rep* 11(1):1877. doi: 10.1038/s41598-021-81086-x
85. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R et al. (1971) Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(10):2374–2376. doi: 10.1073/pnas.68.10.2374
86. Wilson HK (1986) Breath analysis. Physiological basis and sampling techniques. *Scandinavian journal of work, environment & health* 12(3):174–192. doi: 10.5271/sjweh.2159
87. Pleil JD, Lindstrom AB (1995) Collection of a single alveolar exhaled breath for volatile organic compounds analysis. *Am J Ind Med* 28(1):109–121. doi: 10.1002/ajim.4700280110
88. Amann A, Miekisch W, Pleil J et al. (2010) Methodological issues of sample collection and analysis of exhaled breath. In: Horvath I, Jongste JC de (eds) *Exhaled biomarkers*. European Respiratory Society, Sheffield, pp 96–114
89. Pereira J, Porto-Figueira P, Cavaco C et al. (2015) Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: an overview. *Metabolites* 5(1):3–55. doi: 10.3390/metabo5010003
90. Mills GA, Walker V (2000) Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J Chromatogr A* 902(1):267–287. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00767-6

91. Schmidt K, Podmore I (2015) Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer. *J Mol Biomark Diagn* 6(6):253. doi: 10.4172/2155-9929.1000253
92. Lawal O, Ahmed WM, Nijsen TME et al. (2017) Exhaled breath analysis: a review of 'breath-taking' methods for off-line analysis. *Metabolomics* 13(10):110. doi: 10.1007/s11306-017-1241-8
93. Aksenov AA, Sandrock CE, Zhao W et al. (2014) Cellular scent of influenza virus infection. *Chembiochem* 15(7):1040–1048. doi: 10.1002/cbic.201300695
94. Schmidt K, Podmore I (2015) Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *J Biomark* 2015:981458. doi: 10.1155/2015/981458
95. Daulton E, Wicaksono A, Bechar J et al. (2020) The Detection of Wound Infection by Ion Mobility Chemical Analysis. *Biosensors (Basel)* 10(3):19. doi: 10.3390/bios10030019
96. Sithersingh MJ, Snow NH (2012) Chapter 9 - Headspace-Gas Chromatography. In: Poole CF (ed) *Gas chromatography*, First edition. Elsevier, Oxford, Amsterdam, Waltham, MA, pp 221–233
97. Stein S (2012) Mass spectral reference libraries: an ever-expanding resource for chemical identification. *Anal Chem* 84(17):7274–7282. doi: 10.1021/ac301205z
98. Belizário JE, Faintuch J, Malpartida MG (2020) Breath Biopsy and Discovery of Exclusive Volatile Organic Compounds for Diagnosis of Infectious Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 10:564194. doi: 10.3389/fcimb.2020.564194
99. Covington JA, van der Schee MP, Edge ASL et al. (2015) The application of FAIMS gas analysis in medical diagnostics. *Analyst* 140(20):6775–6781. doi: 10.1039/c5an00868a
100. Kunze-Szikszay N, Euler M, Perl T (2021) Identification of volatile compounds from bacteria by spectrometric methods in medicine diagnostic and other areas: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 105(16-17):6245–6255. doi: 10.1007/s00253-021-11469-7
101. Wilson AD, Baietto M (2009) Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors (Basel)* 9(7):5099–5148. doi: 10.3390/s90705099
102. Gardner JW, Bartlett, Philip N. (1994) A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B: Chemical* 18(1-3):210–211. doi: 10.1016/0925-4005(94)87085-3
103. Westhoff M, Litterst P, Freitag L et al. (2007) Ion mobility spectrometry in the diagnosis of sarcoidosis: results of a feasibility study. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 5(Pt 2):739–751
104. Cumeras R, Figueras E, Davis CE et al. (2015) Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation. *Analyst* 140(5):1376–1390. doi: 10.1039/c4an01100g
105. Cumeras R, Figueras E, Davis CE et al. (2015) Review on ion mobility spectrometry. Part 2: hyphenated methods and effects of experimental parameters. *Analyst* 140(5):1391–1410. doi: 10.1039/c4an01101e
106. Vautz W, Baumbach JI (2008) Exemplar application of multi-capillary column ion mobility spectrometry for biological and medical purpose. *International Journal for Ion*

Mobility Spectrometry 11(1-4):35–41. doi: 10.1007/s12127-008-0007-4

107. Drees C, Vautz W, Liedtke S et al. (2019) GC-IMS headspace analyses allow early recognition of bacterial growth and rapid pathogen differentiation in standard blood cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(21-22):9091–9101. doi: 10.1007/s00253-019-10181-x
108. Jünger M, Vautz W, Kuhns M et al. (2012) Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(6):2603–2614. doi: 10.1007/s00253-012-3924-4
109. Kunze N, Göpel J, Kuhns M et al. (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(8):3665–3676. doi: 10.1007/s00253-013-4762-8
110. Pfyffer GE, Wittwer F (2012) Incubation time of mycobacterial cultures: how long is long enough to issue a final negative report to the clinician? *J Clin Microbiol* 50(12):4188–4189. doi: 10.1128/JCM.02283-12
111. Purkhart R, Becher G, Reinhold P et al. (2017) Detection of mycobacteria by volatile organic compound analysis of invitro cultures using differential ion mobility spectrometry. *J Med Microbiol* 66(3):276–285. doi: 10.1099/jmm.0.000410
112. Oeding V, v. Eicke H, Schulz S (2009) 1.1 Wirtschaftliches Labormanagement. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW et al. (eds) *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
113. Küntzel A, Fischer S, Bergmann A et al. (2016) Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J Breath Res* 10(3):37103. doi: 10.1088/1752-7155/10/3/037103
114. Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 40(4):277–283
115. Idelevich EA, Becker K (2019) How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 25(11):1347–1355. doi: 10.1016/j.cmi.2019.04.025
116. Purkhart R, Köhler H, Liebler-Tenorio E et al. (2011) Chronic intestinal *Mycobacteria* infection: discrimination via VOC analysis in exhaled breath and headspace of feces using differential ion mobility spectrometry. *J Breath Res* 5(2):27103. doi: 10.1088/1752-7155/5/2/027103
117. Abd El Qader A, Lieberman D, Shemer Avni Y et al. (2015) Volatile organic compounds generated by cultures of bacteria and viruses associated with respiratory infections. *Biomedical chromatography : BMC* 29(12):1783–1790. doi: 10.1002/bmc.3494
118. Schivo M, Aksenov AA, Linderholm AL et al. (2014) Volatile emanations from in vitro airway cells infected with human rhinovirus. *J Breath Res* 8(3):37110. doi: 10.1088/1752-7155/8/3/037110
119. Rochford K, Chen F, Waguespack Y et al. (2016) Volatile Organic Compound Gamma-Butyrolactone Released upon Herpes Simplex Virus Type -1 Acute Infection Modulated Membrane Potential and Repressed Viral Infection in Human Neuron-Like Cells. *PLoS One* 11(8):e0161119. doi: 10.1371/journal.pone.0161119
120. Phillips M, Cataneo RN, Chaturvedi A et al. (2010) Effect of influenza vaccination on

- oxidative stress products in breath. *J Breath Res* 4(2):26001. doi: 10.1088/1752-7155/4/2/026001
121. Eiceman GA, Karpas Z (2005) *Ion Mobility Spectrometry*, 2nd ed. Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, FL
122. Stach J, Baumbach JI (2002) *Ion Mobility Spectrometry - Basic Elements and Applications*. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 5(1):1–21
123. Revercomb HE, Mason EA (1975) Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis. *Review. Anal Chem* 47(7):970–983. doi: 10.1021/ac60357a043
124. Gunzer F, Ulrich A, Baether W (2010) A novel non-radioactive electron source for ion mobility spectrometry. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 13(1):9–16. doi: 10.1007/s12127-009-0034-9
125. Sielemann S, Baumbach JI, Schmidt H et al. (2000) Quantitative analysis of benzene, toluene, and m-xylene with the use of a UV-ion mobility spectrometer. *Field Analytical Chem & Tech* 4(4):157–169. doi: 10.1002/1520-6521(2000)4:4<157:AID-FACT2>3.0.CO;2-%23
126. Illenseer C, Löhmannsröben H-G (2001) Investigation of ion–molecule collisions with laser-based ion mobility spectrometry. *Phys Chem Chem Phys* 3(12):2388–2393. doi: 10.1039/b009880i
127. Hill CA, Thomas CLP (2003) A pulsed corona discharge switchable high resolution ion mobility spectrometer-mass spectrometer. *Analyst* 128(1):55–60. doi: 10.1039/B207558J
128. Borsdorf H, Eiceman GA (2006) *Ion Mobility Spectrometry: Principles and Applications*. *Applied Spectroscopy Reviews* 41(4):323–375. doi: 10.1080/05704920600663469
129. Kirk AT, Zimmermann S (2016) Ionenmobilitätsspektrometrie. *Chemie in unserer Zeit* 50(5):310–315. doi: 10.1002/ciuz.201600714
130. Baumbach JI, Eiceman GA (1999) Ion mobility spectrometry: arriving on site and moving beyond a low profile. *Appl Spectrosc* 53(9):338A-355A. doi: 10.1366/0003702991947847
131. Gey MH (2015) *Chromatographie-3: LC/HPTLC – GC*. In: Gey MH (ed) *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, 3. Aufl. 2015. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 179–202
132. Vautz W, Sielemann S, Baumbach JI (2004) Determination of terpenes in humid ambient air using ultraviolet ion mobility spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 513(2):393–399. doi: 10.1016/j.aca.2004.03.016
133. Allers M, Langejuergen J, Gaida A et al. (2016) Measurement of exhaled volatile organic compounds from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) using closed gas loop GC-IMS and GC-APCI-MS. *J Breath Res* 10(2):26004. doi: 10.1088/1752-7155/10/2/026004
134. Restek (2013) *Brochure: Guide to GC Column Selection and Optimizing Separations*
135. Sielemann S (1999) *Detektion flüchtiger organischer Verbindungen mittels Ionenmobilitätsspektrometrie und deren Kopplung mit Multi-Kapillar-Gas-Chromatographie*. Dissertation, Universität Dortmund

136. Baumbach JI (2009) Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath. *J Breath Res* 3(3):34001. doi: 10.1088/1752-7155/3/3/034001
137. Sidelnikov VN, Patrushev YV, Nikolaeva OA (2010) Express gas chromatography on multicapillary columns and its potential. *Catal Ind* 2(3):206–216. doi: 10.1134/S2070050410030025
138. Szymańska E, Davies AN, Buydens LMC (2016) Chemometrics for ion mobility spectrometry data: recent advances and future prospects. *Analyst* 141(20):5689–5708. doi: 10.1039/c6an01008c
139. Langejürgen J (2015) Entwicklung und Realisierung kompakter Messsysteme zur quantitativen Detektion von organischen Spurengasen in Luft. Dissertation, Leibniz Universität Hannover
140. Carneiro G, Radcenco AL, Evaristo J et al. (2019) Novel strategies for clinical investigation and biomarker discovery: a guide to applied metabolomics. *Horm Mol Biol Clin Investig* 38(3):20180045. doi: 10.1515/hmbci-2018-0045
141. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD et al. (2016) Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom* 27(12):1897–1905. doi: 10.1007/s13361-016-1469-y
142. Hauschild A-C, Kopczynski D, D'Addario M et al. (2013) Peak detection method evaluation for ion mobility spectrometry by using machine learning approaches. *Metabolites* 3(2):277–293. doi: 10.3390/metabo3020277
143. Purkhart R, Hillmann A, Graupner R et al. (2012) Detection of characteristic clusters in IMS-Spectrograms of exhaled air polluted with environmental contaminants. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 15(2):63–68. doi: 10.1007/s12127-012-0090-4
144. Bödeker B, Vautz W, Baumbach JI (2008) Peak finding and referencing in MCC/IMS-data. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 11(1-4):83–87. doi: 10.1007/s12127-008-0012-7
145. Bader S, Urfer W, Baumbach JI (2006) Reduction of ion mobility spectrometry data by clustering characteristic peak structures. *J Chemometrics* 20(3-4):128–135. doi: 10.1002/cem.998
146. Bunkowski A (2012) MCC-IMS data analysis using automated spectra processing and explorative visualisation methods. Dissertation, Universität Bielefeld
147. Kopczynski D, Rahmann S (2015) An online peak extraction algorithm for ion mobility spectrometry data. *Algorithms Mol Biol* 10:17. doi: 10.1186/s13015-015-0045-5
148. Strimbu K, Tavel JA (2010) What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5(6):463–466. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177
149. Jansen JJ, Szymańska E, Hoefsloot HCJ et al. (2012) Between Metabolite Relationships: an essential aspect of metabolic change. *Metabolomics* 8(3):422–432. doi: 10.1007/s11306-011-0316-1
150. Malley JD, Dasgupta A, Moore JH (2013) The limits of p-values for biological data mining. *BioData Min* 6(1):10. doi: 10.1186/1756-0381-6-10
151. Herzog MH, Francis G, Clarke A (2019) The Multiple Testing Problem. In: Herzog MH,

- Francis G, Clarke A (eds) *Understanding Statistics and Experimental Design: How to Not Lie with Statistics*. Springer Nature, Cham, pp 63–66
152. Saccenti E, Hoefsloot HCJ, Smilde AK et al. (2014) Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics* 10(3):361–374. doi: 10.1007/s11306-013-0598-6
 153. Danzer K, Fischbacher C, Hobert H et al. (2013) Multivariate Datenanalyse. In: Danzer K, Fischbacher C, Hobert H et al. (eds) *Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen*. Springer Berlin, Berlin, pp 81–132
 154. Backhaus K, Erichson B, Plinke W et al. (2018) Clusteranalyse. In: Backhaus K, Erichson B, Plinke W et al. (eds) *Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung*, 15. Aufl. 2018. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 435–496
 155. Smolinska A, Hauschild A-C, Fijten RRR et al. (2014) Current breathomics--a review on data pre-processing techniques and machine learning in metabolomics breath analysis. *J Breath Res* 8(2):27105. doi: 10.1088/1752-7155/8/2/027105
 156. Backhaus K, Erichson B, Plinke W et al. (2018) Diskriminanzanalyse. In: Backhaus K, Erichson B, Plinke W et al. (eds) *Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung*, 15. Aufl. 2018. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 203–266
 157. Miekisch W, Herbig J, Schubert JK (2012) Data interpretation in breath biomarker research: pitfalls and directions. *J Breath Res* 6(3):36007. doi: 10.1088/1752-7155/6/3/036007
 158. Hauschild A-C (2016) *Computational Methods for Breath Metabolomics in Clinical Diagnostics*. Dissertation, Universität des Saarlandes
 159. Szymańska E, Gerretzen, Jan, Engel, Jasper et al. (2015) Chemometrics and qualitative analysis have a vibrant relationship. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 69:34–51. doi: 10.1016/j.trac.2015.02.015
 160. Wollschläger D (2020) Vorhersagegüte prädiktiver Modelle. In: Wollschläger D (ed) *Grundlagen der Datenanalyse mit R: Eine anwendungsorientierte Einführung*, 5. Aufl. 2020. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 579–586
 161. Hillmann A (2013) *Untersuchungen zur Optimierung von GC-IMS- und DMS-Messungen mit verschiedenen Geräten zur medizinischen Diagnostik*. Masterarbeit, Hochschule Mittweida
 162. WHO (2017) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed 09 Apr 2021
 163. CLSI (2020) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th Edition: CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
 164. Peacock SJ, Paterson GK (2015) Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem* 84:577–601. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034516
 165. Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H et al. (2000) Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother* 44(9):2382–

2388. doi: 10.1128/AAC.44.9.2382-2388.2000

166. Steppert C, Steppert I, Bollinger T et al. (2020) Rapid non-invasive detection of Influenza-A-infection by multicapillary column coupled ion mobility spectrometry. *J Breath Res* 15(1):11001. doi: 10.1088/1752-7163/abb762
167. Steppert C, Steppert I, Sterlacci W et al. (2021) Rapid detection of SARS-CoV-2 infection by multicapillary column coupled ion mobility spectrometry (MCC-IMS) of breath. A proof of concept study. *J Breath Res* 15(2):27105. doi: 10.1088/1752-7163/abe5ca
168. Ngaosuwankul N, Noisumdaeng P, Komolsiri P et al. (2010) Influenza A viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Virol J* 7:75. doi: 10.1186/1743-422X-7-75
169. Lee RA, Herigon JC, Benedetti A et al. (2021) Performance of Saliva, Oropharyngeal Swabs, and Nasal Swabs for SARS-CoV-2 Molecular Detection: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol* 59(5):e02881-20. doi: 10.1128/JCM.02881-20
170. Martinez RM (2020) Clinical Samples for SARS-CoV-2 Detection: Review of the Early Literature. *Clin Microbiol Newsl* 42(15):121–127. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2020.07.001
171. Gallo O, Locatello LG, Mazzoni A et al. (2021) The central role of the nasal microenvironment in the transmission, modulation, and clinical progression of SARS-CoV-2 infection. *Mucosal Immunol* 14(2):305–316. doi: 10.1038/s41385-020-00359-2
172. STEP (2015) User Manual: STEP Ion Mobility Spectrometer, Version August 2015
173. Purkhart R (2010) Klassifikation von Ausatemluft anhand ihrer differentiellen Ionenbeweglichkeitsspektrogramme. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin
174. IBM (2019) Manual: IBM SPSS Statistics Base 26
175. Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L (2007) Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation* 115(5):654–657. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.594929
176. Fawcett T (2006) An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 27(8):861–874. doi: 10.1016/j.patrec.2005.10.010
177. Vogtland D, Baumbach JI (2009) Breit-Wigner-Function and IMS-signals. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 12(3):109–114. doi: 10.1007/s12127-009-0027-8
178. EMA (2019) Draft ICH guideline M10 on bioanalytical method validation - Step 2b
179. Bliesner DM (2006) Appendix VI: Template for An Example Methods Validation Protocol. In: Bliesner DM (ed) *Validating Chromatographic Methods*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 169–217
180. EMA (1995) ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Step 5
181. Xu Y, Goodacre R (2018) On Splitting Training and Validation Set: A Comparative Study of Cross-Validation, Bootstrap and Systematic Sampling for Estimating the Generalization Performance of Supervised Learning. *J Anal Test* 2(3):249–262. doi: 10.1007/s41664-018-0068-2
182. Steppert I, Schönfelder J, Schultz C et al. (2021) Rapid in vitro differentiation of bacteria

- by ion mobility spectrometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 105(10):4297–4307. doi: 10.1007/s00253-021-11315-w
183. Rahman M, Schellhorn H, Jithesh PV et al. (2022) Editorial: Metabolomics in Infectious Diseases. *Front Genet* 13:875835. doi: 10.3389/fgene.2022.875835
184. Cumeras R, Correig X (eds) (2019) Volatile organic compound analysis in biomedical diagnosis applications. APPLE ACADEMIC PRESS, Toronto, New Jersey
185. Zhu J, Bean HD, Wargo MJ et al. (2013) Detecting bacterial lung infections: in vivo evaluation of in vitro volatile fingerprints. *J Breath Res* 7(1):16003. doi: 10.1088/1752-7155/7/1/016003
186. Tsalik EL, Bonomo RA, Fowler VG (2018) New Molecular Diagnostic Approaches to Bacterial Infections and Antibacterial Resistance. *Annu Rev Med* 69:379–394. doi: 10.1146/annurev-med-052716-030320
187. Filipiak W, Ager C, Troppmair J (2017) Predicting the future from the past: volatile markers for respiratory infections. *Eur Respir J* 49(5). doi: 10.1183/13993003.00264-2017
188. Bunge M, Araghipour N, Mikoviny T et al. (2008) On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74(7):2179–2186. doi: 10.1128/AEM.02069-07
189. Tait E, Perry JD, Stanforth SP et al. (2014) Identification of volatile organic compounds produced by bacteria using HS-SPME-GC-MS. *J Chromatogr Sci* 52(4):363–373. doi: 10.1093/chromsci/bmt042
190. Filipiak W, Sponring A, Baur MM et al. (2012) Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 12:113. doi: 10.1186/1471-2180-12-113
191. Gibson B, Wilson DJ, Feil E et al. (2018) The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proc Biol Sci* 285(1880):20180789. doi: 10.1098/rspb.2018.0789
192. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T (2015) *Pseudomonas*. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Pfaller MA (eds) *Manual of clinical microbiology*, 11th edition. ASM Press, Washington, DC, pp 773–790
193. Pommerville JC (2022) Chapter 7 Microbial Growth and Nutrition. In: Pommerville JC (ed) *Fundamentals of microbiology*, Twelfth edition. Jones & Bartlett Learning, Burlington, MA, pp 169–198
194. Jenkins CL, Bean HD (2019) Influence of media on the differentiation of *Staphylococcus* spp. by volatile compounds. *J Breath Res* 14(1):16007. doi: 10.1088/1752-7163/ab3e9d
195. Ratiu I-A, Ligor T, Bocos-Bintintan V et al. (2017) The effect of growth medium on an *Escherichia coli* pathway mirrored into GC/MS profiles. *J Breath Res* 11(3):36012. doi: 10.1088/1752-7163/aa7ba2
196. Åhman J, Matuschek E, Kahlmeter G (2020) EUCAST evaluation of 21 brands of Mueller-Hinton dehydrated media for disc diffusion testing. *Clin Microbiol Infect* 26(10):1412.e1-1412.e5. doi: 10.1016/j.cmi.2020.01.018
197. Atlas R, Snyder J (2015) Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Pfaller MA (eds) *Manual of clinical microbiology*, 11th edition. ASM Press,

Washington, DC, pp 316–349

198. Rees CA, Nordick KV, Franchina FA et al. (2017) Volatile metabolic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in nutrient-replete conditions. *Metabolomics* 13(2):18. doi: 10.1007/s11306-016-1161-z
199. Rees CA, Nasir M, Smolinska A et al. (2018) Detection of high-risk carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolates using volatile molecular profiles. *Sci Rep* 8(1):13297. doi: 10.1038/s41598-018-31543-x
200. Steppert C, Dick T, Steppert I et al. (2018) Rapid in vitro detection of resistant strains by MCC-IMS. *European Respiratory Journal* 52:PA2655. doi: 10.1183/13993003.congress-2018.PA2655
201. Becher G, Purkhart R, Raessler T et al. (2016) An alternative method to the infection detection for differentiation of 3 and 4 MRGN germs by use of GC IMS. *European Respiratory Journal* 48:OA4993. doi: 10.1183/13993003.congress-2016.OA4993
202. Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 34(5):S3-10. doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.219
203. Koivusalo M, Vermeiren C, Yuen J et al. (2017) Canine scent detection as a tool to distinguish methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 96(1):93–95. doi: 10.1016/j.jhin.2017.03.005
204. Fiebig L, Beyene N, Burny R et al. (2020) From pests to tests: training rats to diagnose tuberculosis. *Eur Respir J* 55(3):1902243. doi: 10.1183/13993003.02243-2019
205. 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(2):27001. doi: 10.1088/1752-7155/3/2/027001
206. Baron EJ (1996) Classification. In: Baron S (ed) *Medical Microbiology*, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas
207. Fritsche O (2016) Mikrobiologische Arbeitsmethoden. In: Lay M, Fritsche O (eds) *Mikrobiologie*, 1. Aufl. 2016. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 311–333
208. Regnath T (2009) 8.2 Manuelle Identifizierungsverfahren. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW et al. (eds) *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
209. Jurtshuk (Jr.) P (1996) Bacterial Metabolism. In: Baron S (ed) *Medical Microbiology*, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas
210. Trefz P, Koehler H, Klepik K et al. (2013) Volatile emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mirror bacterial growth and enable distinction of different strains. *PLoS One* 8(10):e76868. doi: 10.1371/journal.pone.0076868
211. Miller PR, Meredith JW, Chang MC (2003) Optimal threshold for diagnosis of ventilator-associated pneumonia using bronchoalveolar lavage. *J Trauma* 55(2):263-268. doi: 10.1097/01.TA.0000075786.19301.91
212. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K et al. (2010) The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Dtsch Arztebl Int* 107(21):361–367. doi: 10.3238/arztebl.2010.0361

213. Opota O, Jatón K, Greub G (2015) Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect* 21(4):323–331. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.005
214. Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA et al. (2014) Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *J Clin Microbiol* 52(9):3164–3174. doi: 10.1128/JCM.00801-14
215. Küntzel A (2019) Flüchtige organische Substanzen als Biomarker von Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Dissertation, Freien Universität Berlin
216. Shestivska V, Spaněl P, Dryahina K et al. (2012) Variability in the concentrations of volatile metabolites emitted by genotypically different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* 113(3):701–713. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05370.x
217. Bos LDJ, Sterk PJ, Schultz MJ (2013) Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog* 9(5):e1003311. doi: 10.1371/journal.ppat.1003311
218. Jain S, Self WH, Wunderink RG et al. (2015) Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med* 373(5):415–427. doi: 10.1056/NEJMoa1500245
219. European Centre for Disease Prevention and Control (2009) ECDC Technical Report: Risk assessment guidelines for infectious diseases transmitted on aircraft
220. Gardner LM, Chughtai AA, MacIntyre CR (2016) Risk of global spread of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) via the air transport network. *J Travel Med* 23(6):taw063. doi: 10.1093/jtm/taw063
221. Obando-Pacheco P, Justicia-Grande AJ, Rivero-Calle I et al. (2018) Respiratory Syncytial Virus Seasonality: A Global Overview. *J Infect Dis* 217(9):1356–1364. doi: 10.1093/infdis/jiy056
222. Piedimonte G, Perez MK (2014) Respiratory syncytial virus infection and bronchiolitis. *Pediatr Rev* 35(12):519–530. doi: 10.1542/pir.35-12-519
223. Barr R, Green CA, Sande CJ et al. (2019) Respiratory syncytial virus: diagnosis, prevention and management. *Ther Adv Infect Dis* 6:2049936119865798. doi: 10.1177/2049936119865798
224. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL et al. (2017) Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet* 390(10098):946–958. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8
225. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA et al. (2005) Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 352(17):1749–1759. doi: 10.1056/NEJMoa043951
226. Chidgey SM, Broadley KJ (2005) Respiratory syncytial virus infections: characteristics and treatment. *J Pharm Pharmacol* 57(11):1371–1381. doi: 10.1211/jpp.57.11.0001
227. Kimpen JLL (1996) Experimental models for respiratory syncytial virus infections. *Reviews in Medical Microbiology* 2(7):115–122
228. Zimmermann D, Hartmann M, Moyer MP et al. (2007) Determination of volatile products of human colon cell line metabolism by GC/MS analysis. *Metabolomics* 3(1):13–

17. doi: 10.1007/s11306-006-0038-y
229. Schallschmidt K, Becker R, Jung C et al. (2015) Investigation of cell culture volatiles using solid phase micro extraction: Options and pitfalls exemplified with adenocarcinoma cell lines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1006:158–166. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.10.004
230. Jia Z, Patra A, Kutty VK et al. (2019) Critical Review of Volatile Organic Compound Analysis in Breath and In Vitro Cell Culture for Detection of Lung Cancer. *Metabolites* 9(3). doi: 10.3390/metabo9030052
231. Merck (2022) Cell Death Troubleshooting in Cell Culture. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-culture-troubleshooting-cell-death>. Accessed 21 Feb 2022
232. Purcaro G, Rees CA, Wieland-Alter WF et al. (2018) Volatile fingerprinting of human respiratory viruses from cell culture. *J Breath Res* 12(2):26015. doi: 10.1088/1752-7163/aa9eef
233. Martín-Vicente M, González-Riaño C, Barbas C et al. (2020) Metabolic changes during respiratory syncytial virus infection of epithelial cells. *PLoS One* 15(3):e0230844. doi: 10.1371/journal.pone.0230844
234. Hillyer P, Shepard R, Uehling M et al. (2018) Differential Responses by Human Respiratory Epithelial Cell Lines to Respiratory Syncytial Virus Reflect Distinct Patterns of Infection Control. *J Virol* 92(15):e02202-17. doi: 10.1128/JVI.02202-17
235. Zaritsky LA, Bedsaul JR, Zoon KC (2015) Virus Multiplicity of Infection Affects Type I Interferon Subtype Induction Profiles and Interferon-Stimulated Genes. *J Virol* 89(22):11534–11548. doi: 10.1128/JVI.01727-15
236. ATCC (2021) Product sheet: HEP-2, CCL-23TM
237. Mueller SN, Rouse BT (2008) Immune responses to viruses. *Clinical Immunology*:421–431. doi: 10.1016/B978-0-323-04404-2.10027-2
238. Olsen SJ, Azziz-Baumgartner E, Budd AP et al. (2020) Decreased Influenza Activity During the COVID-19 Pandemic - United States, Australia, Chile, and South Africa, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 69(37):1305–1309. doi: 10.15585/mmwr.mm6937a6
239. Westhoff M, Litterst P, Freitag L et al. (2009) Ion mobility spectrometry for the detection of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: results of a pilot study. *Thorax* 64(9):744–748. doi: 10.1136/thx.2008.099465
240. Ruskiewicz DM, Sanders D, O'Brien R et al. (2020) Diagnosis of COVID-19 by analysis of breath with gas chromatography-ion mobility spectrometry - a feasibility study. *EClinicalMedicine* 29:100609. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100609
241. Berna AZ, Akaho EH, Harris RM et al. (2021) Reproducible Breath Metabolite Changes in Children with SARS-CoV-2 Infection. *ACS Infect Dis* 7(9):2596–2603. doi: 10.1021/acsinfecdis.1c00248
242. Feuerherd M, Sippel A-K, Erber J et al. (2021) A proof of concept study for the differentiation of SARS-CoV-2, hCoV-NL63, and IAV-H1N1 in vitro cultures using ion mobility spectrometry. *Sci Rep* 11(1):20143. doi: 10.1038/s41598-021-99742-7

243. Viswanathan K, Chandrasekaran A, Srinivasan A et al. (2010) Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconj J* 27(6):561–570. doi: 10.1007/s10719-010-9303-4
244. Eskandari E, Ahmadi Marzaleh M, Roudgari H et al. (2021) Sniffer dogs as a screening/diagnostic tool for COVID-19: a proof of concept study. *BMC Infect Dis* 21(1):243. doi: 10.1186/s12879-021-05939-6
245. Jendry P, Schulz C, Twele F et al. (2020) Scent dog identification of samples from COVID-19 patients - a pilot study. *BMC Infect Dis* 20(1):536. doi: 10.1186/s12879-020-05281-3
246. Wintjens AGWE, Hintzen KFH, Engelen SME et al. (2021) Applying the electronic nose for pre-operative SARS-CoV-2 screening. *Surg Endosc* 35(12):6671–6678. doi: 10.1007/s00464-020-08169-0
247. Traxler S, Bischoff A-C, Saß R et al. (2018) VOC breath profile in spontaneously breathing awake swine during Influenza A infection. *Sci Rep* 8(1):14857. doi: 10.1038/s41598-018-33061-2
248. Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D et al. (2020) False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS One* 15(12):e0242958. doi: 10.1371/journal.pone.0242958
249. Higgins TS, Wu AW, Ting JY (2020) SARS-CoV-2 Nasopharyngeal Swab Testing-False-Negative Results From a Pervasive Anatomical Misconception. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 146(11):993–994. doi: 10.1001/jamaoto.2020.2946
250. Jarvis KF, Kelley JB (2021) Temporal dynamics of viral load and false negative rate influence the levels of testing necessary to combat COVID-19 spread. *Sci Rep* 11(1):9221. doi: 10.1038/s41598-021-88498-9
251. Kinloch NN, Ritchie G, Brumme CJ et al. (2020) Suboptimal Biological Sampling as a Probable Cause of False-Negative COVID-19 Diagnostic Test Results. *J Infect Dis* 222(6):899–902. doi: 10.1093/infdis/jiaa370
252. Hoque MN, Akter S, Mishu ID et al. (2021) Microbial co-infections in COVID-19: Associated microbiota and underlying mechanisms of pathogenesis. *Microb Pathog* 156:104941. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104941
253. Cepheid (2022) Cepheid | Xpert-Xpress-CoV-2-Flu-RSV-Plus. <https://www.cephheid.com/en/tests/Critical-Infectious-Diseases/Xpert-Xpress-CoV-2-Flu-RSV-plus>. Accessed 03 Mar 2022
254. Bundesministerium für Gesundheit (2022) Corona Labor/PCR-Test | Zusammen gegen Corona. <https://www.zusammengegencorona.de/testen/labortest-pcr-test/>. Accessed 03 Mar 2022
255. Barra GB, Santa Rita TH, Mesquita PG et al. (2021) Overcoming Supply Shortage for SARS-CoV-2 Detection by RT-qPCR. *Genes (Basel)* 12(1):90. doi: 10.3390/genes12010090
256. Fomsgaard AS, Rosenstjerne MW (2020) An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 - escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. *Euro Surveill* 25(14):2000398. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398
257. Giri AK, Rana DR (2020) Charting the challenges behind the testing of COVID-19 in

developing countries: Nepal as a case study. *Biosafety and Health* 2(2):53–56. doi: 10.1016/j.bsheat.2020.05.002

258. Ganapathy K (2021) COVID-19 breath test gets provisional authorisation in Singapore, to undergo trial at land checkpoint. CNA
259. HSA (2021) HSA grants provisional authorisation for 'BreFence Go COVID-19 Test System' and 'TracieX Breathalyser' for detection of COVID-19 infection. <https://www.hsa.gov.sg/announcements/regulatory-updates/hsa-grants-provisional-authorisation-for-brefence-go-covid-19-breath-test-system-and-traciex-breathalyser-for-detection-of-covid-19-infection>. Accessed 22 Feb 2022
260. Chong C (2021) Second Covid-19 breathalyser system approved in Singapore. *The Straits Times*

Danksagung

Am Fraunhofer-Institut IZI geht mein erstes Dankeschön an Dr. Dirk Kuhlmeier für die Möglichkeit, unter seiner Betreuung die IMS-Technologie in seiner Abteilung zu etablieren sowie interessante Projektfragestellungen und meine Doktorarbeit mit einem großen Freiraum zu bearbeiten. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Einsicht in die interdisziplinäre, wissenschaftliche Projektarbeit mit Partnern. Zu guter Letzt möchte ich mich bei ihm für seinen fachlichen Input und das Thema dieser Arbeit danken.

Besonders großen Dank möchte ich Dr. Jessy Schönfelder für Ihre unermüdliche, allzeit motivierende und tatkräftige Unterstützung auf dem Gebiet der experimentellen Ionenmobilitätsspektrometrie aussprechen. Außerdem möchte ich ihr für die konstruktive und offene Diskussion der IMS-Arbeiten, die mich sehr vorangebracht hat, herzlich bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe MicroDiagnostics gilt mein großer Dank für die angenehme Zusammenarbeit im Labor und die Unterstützung mit ihrem umfangreichen Laborwissen bei der Umsetzung der Experimente. Insbesondere danke ich Lisa-Marie Bangen und Elisabeth Wenzel, dass sie hilfreiche Ansprechpartner für die mikrobiologische Arbeit und zu methodologischen Fragen für mich waren. Carolyn Schulz danke ich für die Unterstützung in der Datenanalyse und vor allem im mathematischen Verständnis.

Weiterhin möchte ich Dr. Thomas Grunwald und Leila Issmail dafür danken, dass sie ihr Wissen in Zellkulturarbeiten mit Viren mit mir geteilt haben und auch, dass sie die Proben für die IMS-Messungen viraler Kulturen vorbereitet und bereitgestellt haben sowie eine Zusammenarbeit mit Ihrem Viruslabor ermöglicht haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Bier bedanken, dass er die Betreuung meiner Doktorarbeit als Doktorvater übernommen hat und wir gemeinsam den Fortschritt meiner Doktorarbeit besprechen konnten.

Dem Klinikum Bayreuth, vor allem Dr. Claus Steppert und Dr. Thomas Bollinger, danke ich für die Realisierung der Atemluftanalysen von Patienten sowie die Bereitstellung der Daten hierzu für meine Doktorarbeit.

Bei Dr. Gunther Becher sowie Dr. Schüler und Dr. Bellmann von STEP Sensortechnik und Elektronik Pockau GmbH bedanke ich mich für die Tipps und fachliche Expertise rund um die Ionenmobilitätsspektrometrie.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund und meinen Eltern für die mentale Motivation und Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst, und in der Bearbeitung und Abfassung keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation noch nicht anderweitig zur Erlangung eines Doktorgrades vorgelegt wurde.“

Potsdam, den

Isabel Steppert

Publikationsliste

Originalarbeiten

1. **Steppert I**, Schönfelder J, Schultz C, Kuhlmeier D (2021) Rapid in vitro differentiation of bacteria by ion mobility spectrometry. *Appl Microbiol Biotechnol* 105(10):4297–4307. doi: 10.1007/s00253-021-11315-w
2. Steppert C, **Steppert I**, Sterlacci W, Bollinger T. (2021) Rapid detection of SARS-CoV-2 infection by multicapillary column coupled ion mobility spectrometry (MCC-IMS) of breath. A proof of concept study. *J Breath Res* 15(2):27105. doi: 10.1088/1752-7163/abe5ca
3. Steppert C, **Steppert I**, Bollinger T, Sterlacci W (2020) Rapid non-invasive detection of Influenza-A-infection by multicapillary column coupled ion mobility spectrometry. *J Breath Res* 15(1):11001. doi: 10.1088/1752-7163/abb762

Vorträge auf Konferenzen

1. Schönfelder J, **Steppert I**, Gjurova B, Schultz C, Bangen LM, Kuhlmeier D. (2021) In Vitro differentiation of bacterial species and several antibiotic resistant E. coli strains by MCC-IMS. ISIMS 2021 Virtual Conference, 26. – 30. July 2021, online
2. **Steppert I**, Schönfelder J, Kuhlmeier D. (2021) MCC-IMS als schnelles Screening-Verfahren für Infektionserreger. 8. IMS-Anwendertreffen, 17. – 19. March 2021, Potsdam, online
3. Steppert C, **Steppert I**, Sterlacci W et al. (2021) Multicapillarsäulen gekoppelte Ionemobilitätsspektrometrie (MCC-IMS) von Atemluft als Screening Tool für Virusinfektionen. 8. IMS-Anwendertreffen, 17. – 19. March 2021, Potsdam, online
4. **Steppert I**, Bangen LM, Schönfelder J et al. (2020) Development of an IMS-based method for passenger control at airports: A proof-of-concept study. IABR – Breath Summit 2019, 08. – 11. September 2019, Loughborough, UK

Posterpräsentationen

1. **Steppert I**, Wenzel E, Kuhlmeier D. (2017) Conception of a non-invasive diagnostic system for the identification of infectious pathogens. Strategiekonferenz InfectControl 2020, 14. – 16. June 2017, Jena, Deutschland
2. Steppert C, Dick T, **Steppert I**, Bollinger T, Becher G (2018) Rapid in vitro detection of resistant strains by MCC-IMS. *European Respiratory Journal* 52: Suppl. 62, PA2655. doi: 10.1183/13993003.congress-2018.PA2655
3. Steppert C, Dick T, **Steppert I**, Becher G, Bollinger T (2018) Rapid In Vitro Diagnostic Of Bacterial Species by MCC-IMS. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 197: A2616.
4. Steppert C, Dick T, **Steppert I**, Schimanski S, Bollinger T, Purkart R, Becher G (2017) Multicapillary ion mobility spectrometry (MCC-IMS) for early identification of bacteria in

vitro. European Respiratory Journal 50: Suppl. 61, PA3326; doi: 10.1183/1393003.congress-2017.PA3326

5. Becher G, Purkhart R; Steppert C; **Steppert I**; Schimanski S; Schüler W; Graupner R (2017) MCC-IMS Spectral Analyses of Headspace from Bacterial Cultures for Rapid Identification of Bacterial Infections. European Respiratory Journal 50: Suppl. 61, PA3325. doi: 10.1183/1393003.congress-2017.PA3325
6. Becher G; Purkhart R; Steppert C; **Steppert I**; Schimanski S; Graupner R; Schüler W (2017) Schnelle und sichere Identifizierung einer bakteriellen Infektion aus Headspace von frischen Proben, Bakterienkulturen und Ausatemluft. Pneumologie 71(S 01):S1-S125. doi: 10.1055/s-0037-1598434
7. Steppert C, **Steppert I**, Schimanski S, Becher G (2014) Differential ion mobility spectrometry for the discrimination of bacteria in vitro. European Respiratory Journal 44: Suppl. 58, P253.

Anhang

Anhang 1	Materialien und Methode	XL
Anhang 1.1	MCC-IMS Spezifikation	XL
Anhang 1.2	PCR-Analyse der Virusinfektionen	XL
Anhang 2	Ergebnisse.....	XLI
Anhang 2.1	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Bakterienkulturen	XLI
Anhang 2.2	<i>In-vitro</i> Untersuchung der Zellkulturen mit oder ohne RS-Viren.....	LV
Anhang 2.3	<i>In-vivo</i> Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen ...	LVI
Anhang 3	Diskussion.....	LVII

Anhang 1 Materialien und Methode

Anhang 1.1 MCC-IMS Spezifikation

Tabelle 21 Spezifikation des verwendeten MCC-IMS

Drift- und Trägergas	Geräteintern generierte gefilterte Umgebungsluft
Driftgasfluss	400 ml/min
Trägergasfluss	20 ml/min
Driftröhre	Länge: 5 cm, Durchmesser: 10 mm
Druck	Umgebungsdruck
Betriebstemperatur	Umgebungstemperatur
Elektrische Feldstärke	400 V/cm
Gitterimpuls	30 ms
Gitteröffnungszeit	100 µs
Ionisationsquelle	Beta-Strahler, Tritium (H ³), ≤ 100 MBq Aktivität
Polarität	Positiv oder negativ
Probeschleife	0,7 ml
Multikapillare GC-Säule	OV-5 (95 % Dimethylpolysiloxan mit 5 % Diphenyl), schwach polar

Anhang 1.2 PCR-Analyse der Virusinfektionen

Für das PCR-Testen von Influenza-A- sowie SARS-CoV-2-Viren wurden Nasenabstriche von Patienten mittels *Xpert® Nasopharyngeal Sample Collection Kit for Viruses* (Cepheid, Maurens-Scopont, Frankreich) gesammelt. Influenza A-Viren wurden mit dem *Xpert® Xpress Flu/RSV Assay* (Cepheid) auf dem GeneXpert® Infinity-System (Cepheid) detektiert. Für den Nachweis von SARS-CoV-2-Viren wurde *Allplex 2019-nCov Assay* (Seegene, Seoul, Südkorea) auf das *CFX 96 Real-Time System* (BioRad, Feldkirchen, Deutschland) angewendet. Dies erfolgte nach RNA-Extraktion mit dem *StarMag 96 UniTube Kit* (Seegene) auf dem *SGPrep32™* Extraktionssystem (Seegene).

Anhang 2 Ergebnisse

Anhang 2.1 *In-vitro* Untersuchung der Bakterienkulturen

Tabelle 22 Liste der 66 VOC-Peaks emittiert von *E. coli* DSM 1576, *S. aureus* DSM 346, *P. aeruginosa* DSM 1117 zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation

Cluster	tr [s]	rel. td	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
c_2	6	1,07		X	X						
c_3	9	1,12								X	
c_4	9	1,20								X	
c_5	11	1,28								X	
c_9	15	1,24									
c_11	17	1,51	X							X	
c_12	17	1,64							X	X	X
c_13	18	1,44				X	X	X			
c_14	18	1,67	X	X	X						
c_15	20	1,09			X					X	
c_17	20	1,34	X	X	X						
c_19	26	1,30								X	
c_20	27	1,24						X			
c_21	27	1,64								X	
c_22	27	1,84								X	
c_23	31	1,07			X						
c_24	33	1,50				X	X	X			
c_25	34	1,13			X					X	
c_26	35	1,73					X	X			
c_30	40	1,43		X	X						
c_32	43	1,55								X	
c_34	43	1,75								X	
c_35	43	1,89								X	
c_36	44	1,36								X	X
c_38	46	1,24						X			
c_40	49	1,07			X						
c_42	57	1,59				X	X	X			
c_43	58	1,19								X	
c_46	60	1,71								X	
c_48	61	1,60							X		
c_49	62	1,42		X				X	X		
c_50	63	1,87		X	X			X	X	X	
c_51	64	1,07			X						
c_54	68	1,32			X						
c_58	74	1,19								X	
c_59	79	1,07			X						
c_62	83	1,33		X	X						
c_63	89	1,41							X		
c_66	92	1,66			X						
c_67	92	1,94							X	X	
c_68	93	1,49		X					X		
c_70	96	1,33		X	X						
c_71	97	1,71								X	
c_72	99	1,19	X			X					
c_74	105	1,33		X							
c_75	111	1,94								X	
c_77	116	1,19								X	

Tabelle 22 (Fortsetzung)

Cluster	tr [s]	rel. td	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
c_79	116	1,47								X	
c_85	135	1,55						X	X	X	
c_86	135	1,66						X			
c_88	142	1,65		X							
c_98	181	1,25						X			
c_101	190	1,25					X				
c_103	193	1,57								X	
c_104	195	1,19								X	
c_106	202	1,24				X	X				
c_107	208	1,63			X						
c_109	211	1,33								X	
c_111	213	1,25					X				
c_113	219	1,33								X	
c_117	224	1,56							X	X	X
c_119	226	1,33								X	
c_120	231	1,32		X							
c_121	232	1,25				X	X				
c_128	242	1,32			X						
c_129	244	1,19								X	

Die aufgelisteten Cluster wurden mittels ROC-Analyse ($AUC \geq 0,8$) identifiziert und sind nach der Retentionszeit (tr), relativen Driftzeit (rel. td) und ihrem Auftreten (X) in verschiedenen Bakterienspezies kategorisiert. Hervorgehobene Cluster = Inkubationszeit-unabhängige Cluster. n = 3.

Tabelle 23 Liste der 60 VOC-Peaks emittiert von Nährmedien (Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Müller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB))

Cluster	tr [s]	rel. td	BHIB	MHB	TSB	Cluster	tr [s]	rel. td	BHIB	MHB	TSB
c_1	2	1,26	X	X		c_56	69	1,40	X	X	
c_3	9	1,12	X	X	X	c_57	69	1,67	X	X	X
c_4	9	1,20		X	X	c_58	74	1,19			X
c_5	11	1,28		X	X	c_63	89	1,41		X	
c_6	12	1,37	X	X	X	c_66	92	1,66	X		X
c_7	14	1,47	X	X	X	c_68	93	1,49	X	X	X
c_8	14	1,57	X	X	X	c_69	95	1,41	X		
c_9	15	1,24	X	X	X	c_71	97	1,71			X
c_11	17	1,51			X	c_73	101	1,55	X	X	X
c_15	20	1,09	X	X	X	c_75	111	1,94	X	X	X
c_17	20	1,34			X	c_78	116	1,40		X	
c_18	23	1,15	X	X		c_80	117	1,21	X	X	
c_20	27	1,24			X	c_84	135	1,34	X		X
c_21	27	1,64	X	X	X	c_85	135	1,55	X	X	X
c_25	34	1,13	X		X	c_88	142	1,65	X	X	X
c_26	35	1,73			X	c_92	152	1,24	X		
c_27	37	1,31		X		c_95	165	1,24	X	X	
c_28	38	1,48		X		c_99	185	1,24		X	
c_29	39	1,24		X	X	c_102	191	1,19			X
c_32	43	1,55			X	c_106	202	1,24	X	X	
c_34	43	1,75	X		X	c_108	209	1,24	X	X	
c_36	44	1,36	X		X	c_109	211	1,33			X
c_37	45	1,45	X	X	X	c_112	215	1,18			X
c_39	48	1,14	X	X	X	c_114	220	1,24	X	X	
c_46	60	1,71			X	c_115	223	1,33			X
c_47	61	1,19			X	c_121	232	1,25	X	X	
c_50	63	1,87	X	X	X	c_122	235	1,55	X	X	X
c_52	64	1,57	X			c_126	238	1,65	X	X	X
c_53	66	1,47			X	c_129	244	1,19			X
c_55	69	1,22	X	X	X	c_130	244	1,25	X	X	

Die Cluster sind nach der Retentionszeit (tr) und der relativen Driftzeit (rel. td) gemäß der Position im IMS-Chromatogramm kategorisiert. X = mindestens 80 % der Replikate pro Nährmedium generieren den Peak. n = 11.

Tabelle 24 Zusammenfassung der 77 detektierten VOC-Peaks im Headspace der Bakterienkulturen in drei verschiedenen Nährmedien (Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Mueller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB))

Cluster	tr [s]	rel. td	BHIB					MHB					TSB				
			EC	SA	PA	KP	AB	EC	SA	PA	KP	AB	EC	SA	PA	KP	AB
c_2	6	1,07				X					X						
c_3	9	1,12			X			X						X			
c_4	9	1,20	X			X				X		X			X		
c_5	11	1,28	X			X				X							
c_6	12	1,37								X					X		
c_7	14	1,47				X											
c_8	14	1,57						X									
c_10	16	2,11	X			X											
c_11	17	1,51	X				X			X	X	X			X	X	
c_12	17	1,64			X		X			X	X			X		X	
c_13	18	1,44		X						X			X				
c_14	18	1,67	X			X	X			X		X			X		
c_15	20	1,09		X								X		X	X		
c_16	20	1,23					X										
c_17	20	1,34	X			X	X			X	X	X			X	X	
c_18	23	1,15			X	X											
c_20	27	1,24						X									
c_21	27	1,64														X	
c_23	31	1,07				X											
c_24	33	1,50											X				
c_25	34	1,13				X		X	X				X	X			
c_27	37	1,31					X										
c_28	38	1,48						X	X								
c_29	39	1,24	X			X											
c_30	40	1,43	X									X					
c_31	43	1,50			X									X			
c_32	43	1,55				X										X	
c_33	43	1,64														X	
c_34	43	1,75				X		X		X						X	
c_35	43	1,89				X				X						X	
c_36	44	1,36				X	X			X						X	
c_38	46	1,24					X						X				
c_40	49	1,07										X				X	
c_42	57	1,59						X					X	X			
c_44	58	1,22		X													
c_49	62	1,42	X	X		X				X	X					X	
c_50	63	1,87					X										
c_52	64	1,57			X			X	X								
c_54	68	1,32								X		X					
c_55	69	1,22						X			X						
c_56	69	1,40						X									
c_60	79	1,41	X														
c_62	83	1,33	X							X		X			X		
c_64	90	1,59											X				
c_66	92	1,66					X		X								
c_68	93	1,49	X			X	X	X		X	X					X	
c_70	96	1,33	X							X		X			X		
c_74	105	1,33										X					
c_75	111	1,94						X								X	
c_76	112	2,03						X									
c_81	117	1,33								X							
c_82	126	1,21	X			X	X	X	X	X							
c_83	133	1,24				X	X	X	X	X							
c_84	135	1,34		X				X					X				

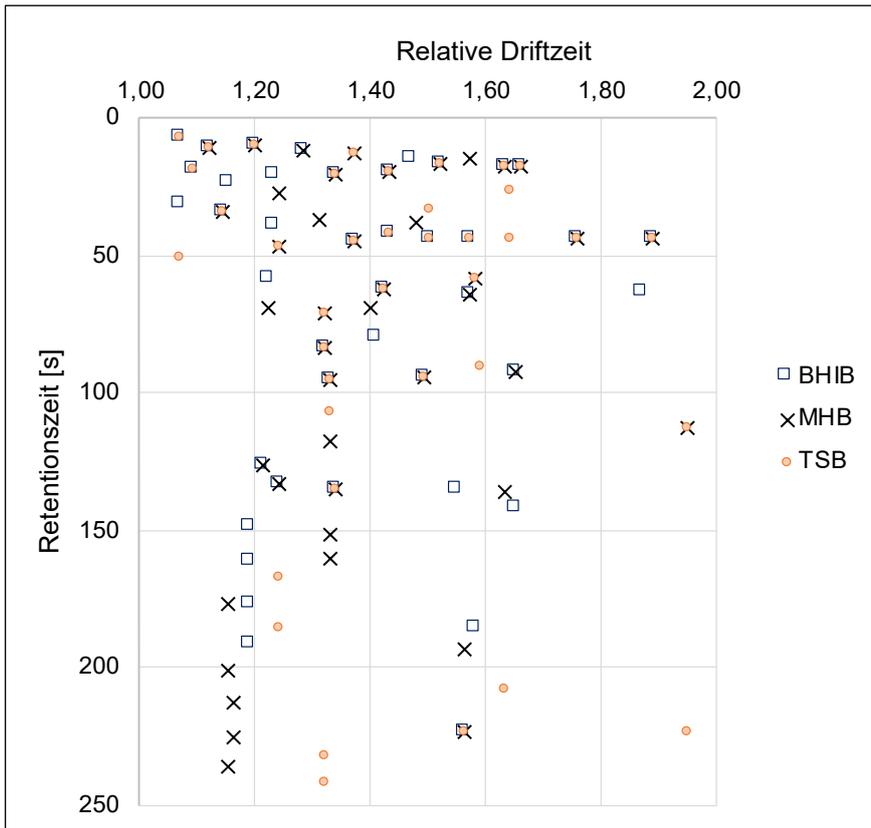


Abbildung 30 Position der von Bakterien emittierten signifikanten VOC-Cluster in jedem der drei Nährmedien (Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Müller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB)) in Abhängigkeit der Retentionszeit und der relativen Driftzeit

BHIB	Gruppe	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit						Gesamt
		Ctrl.	EC	SA	PA	KP	AB	
Original	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	11
	SA	0	0	11	0	0	0	11
	PA	0	0	0	11	0	0	11
	KP	0	0	0	0	11	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	11
Kreuzvalidiert	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	11
	SA	0	0	11	0	0	0	11
	PA	0	0	0	9	0	2	11
	KP	0	0	0	0	11	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	11
100,0% der ursprünglich gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.								
97,0% der kreuzvalidierten gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.								

MHB	Gruppe	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit						Gesamt
		Ctrl.	EC	SA	PA	KP	AB	
Original	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	11
	SA	0	0	11	0	0	0	11
	PA	0	0	0	11	0	0	11
	KP	0	0	0	0	11	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	11
Kreuzvalidiert	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	11
	SA	1	0	10	0	0	0	11
	PA	0	0	0	9	0	2	11
	KP	0	0	0	0	11	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	11
100,0% der ursprünglich gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.								
95,5% der kreuzvalidierten gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.								

TSB	Gruppe	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit						Gesamt
		Ctrl.	EC	SA	PA	KP	AB	
Original	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	11
	SA	0	0	11	0	0	0	11
	PA	0	0	0	11	0	0	11
	KP	0	0	0	0	11	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	11
Kreuzvalidiert	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	11
	SA	0	0	11	0	0	0	11
	PA	1	0	0	10	0	0	11
	KP	0	0	0	0	11	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	11
100,0% der ursprünglich gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.								
98,5% der kreuzvalidierten gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.								

Abbildung 31 Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse für die Differenzierung verschiedener Bakterien in dem jeweiligen Nährmedium: Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Müller Hinton Broth (MHB) und Tryptic Soy Broth (TSB)

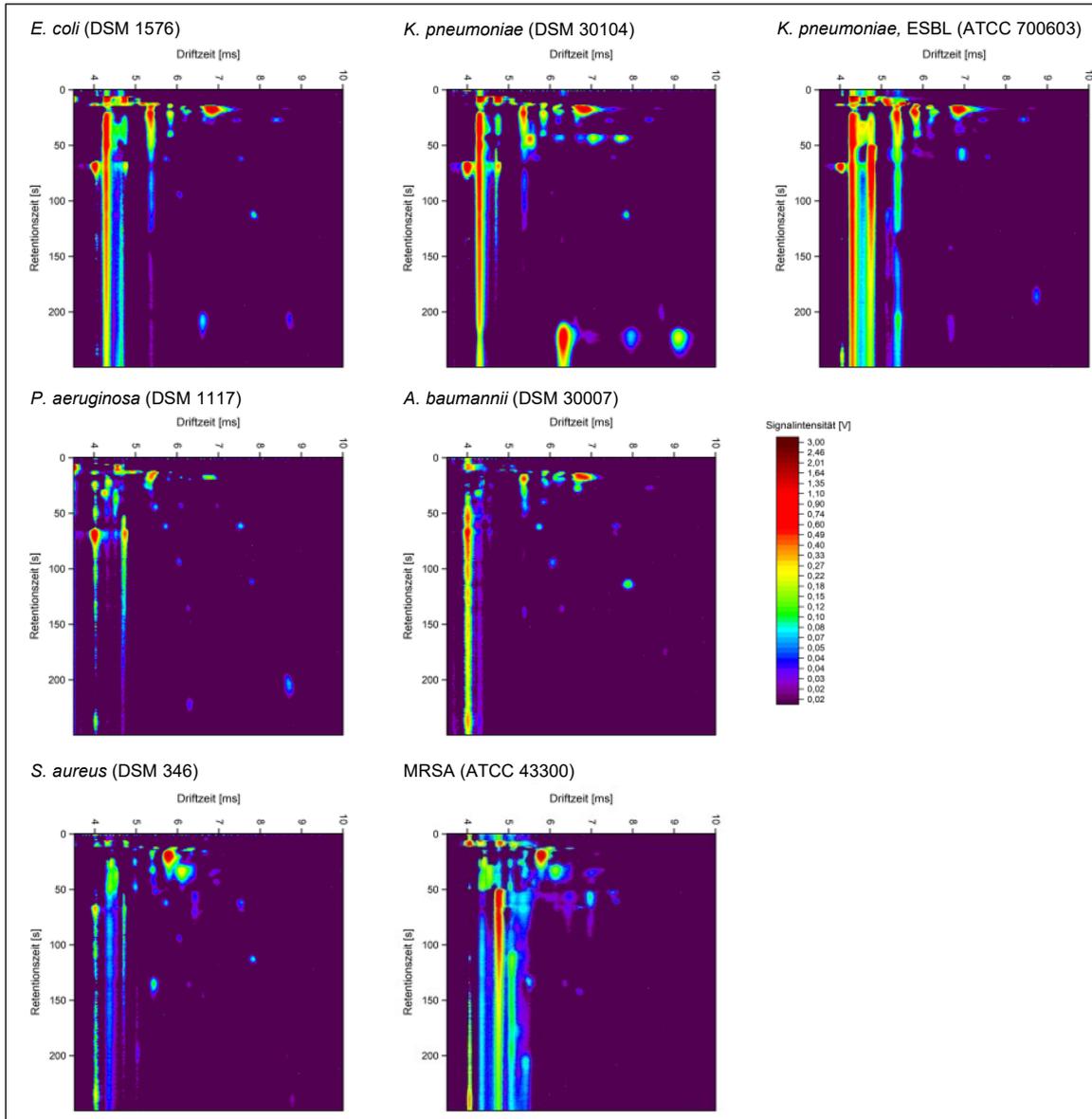


Abbildung 32 MCC-IMS-Heatmaps der Kulturen verschiedener Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme (gemittelte Differenzspektren nach Subtraktion des gemittelten Spektrums des Nährmediums (Kontrolle)). Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.

Tabelle 25 Liste der 63 VOC-Peaks emittiert von verschiedenen Bakterienspezies einschließlich resistenter Stämme

Cluster	tr [s]	rel. td	Nicht-resistent					Resistent		
			EC	SA	PA	KP	AB	MRSA	KP	ESBL
c_1	2	1,26							X	
c_2	6	1,07	X				X			X
c_3	9	1,12			X					
c_4	9	1,20	X				X		X	X
c_5	11	1,28							X	X
c_6	12	1,37					X			X
c_7	14	1,47							X	
c_11	17	1,51	X				X	X		X
c_12	17	1,64			X			X		
c_13	18	1,44	X	X					X	X
c_14	18	1,67	X				X			X
c_15	20	1,09	X		X		X			X
c_17	20	1,34	X				X	X		X
c_20	27	1,24							X	
c_21	27	1,64						X		
c_24	33	1,50		X						
c_25	34	1,13		X	X				X	X
c_29	39	1,24							X	
c_30	40	1,43	X							X
c_31	43	1,50			X					
c_32	43	1,55					X			X
c_33	43	1,64					X			
c_34	43	1,75					X			
c_35	43	1,89					X			
c_36	44	1,36					X		X	
c_38	46	1,24		X						
c_40	49	1,07	X				X			X
c_41	53	1,83							X	
c_42	57	1,59		X					X	
c_43	58	1,19							X	X
c_45	60	1,61								X
c_46	60	1,71							X	X
c_49	62	1,42						X		
c_54	68	1,32	X							
c_58	74	1,19							X	
c_61	79	1,70								X
c_62	83	1,33	X				X			X
c_63	89	1,41								X
c_64	90	1,59		X						
c_65	91	1,70							X	
c_68	93	1,49						X		
c_70	96	1,33	X				X			X
c_71	97	1,71							X	
c_74	105	1,33	X							X
c_75	111	1,94						X		
c_77	116	1,19							X	
c_84	135	1,34		X					X	
c_86	135	1,66							X	
c_89	145	1,32								X
c_95	165	1,24		X					X	
c_101	190	1,25							X	
c_107	208	1,63	X							
c_109	211	1,33							X	X
c_115	223	1,33	X							X

Tabelle 25 (Fortsetzung)

Cluster	tr [s]	rel. td	Nicht-resistent					Resistent		
			EC	SA	PA	KP	AB	MRSA	KP	ESBL
c_116	223	1,95				X				
c_117	224	1,56			X	X				
c_120	231	1,32	X			X				X
c_124	236	1,32	X							X
c_125	238	1,19						X		X
c_127	239	1,25						X		
c_128	242	1,32	X							X
c_129	244	1,19						X		X
c_130	244	1,25						X		

Die Cluster sind nach der Retentionszeit (tr) und der relativen Driftzeit (rel. td) sortiert. x = signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Bakterienspezies und dem Nährmedium (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$) und mind. 80 % der Replikate jeweiliger Bakterienspezies generieren den Peak. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.

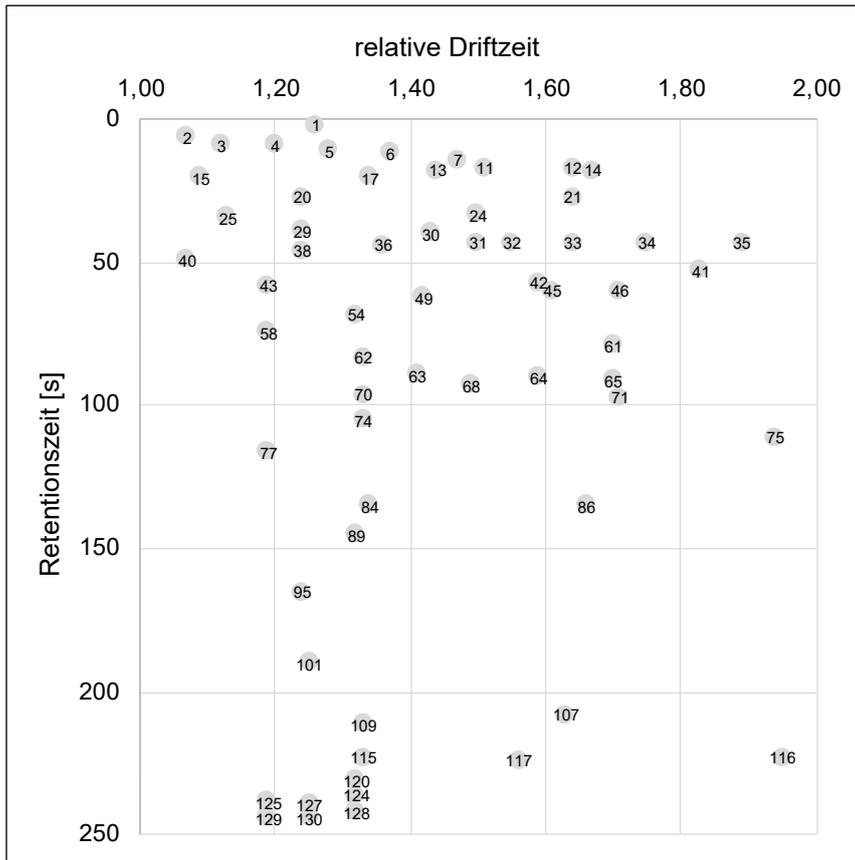


Abbildung 33 2D-Plot mit Position der 63 selektierten VOC-Peaks im IMS-Chromatogramm

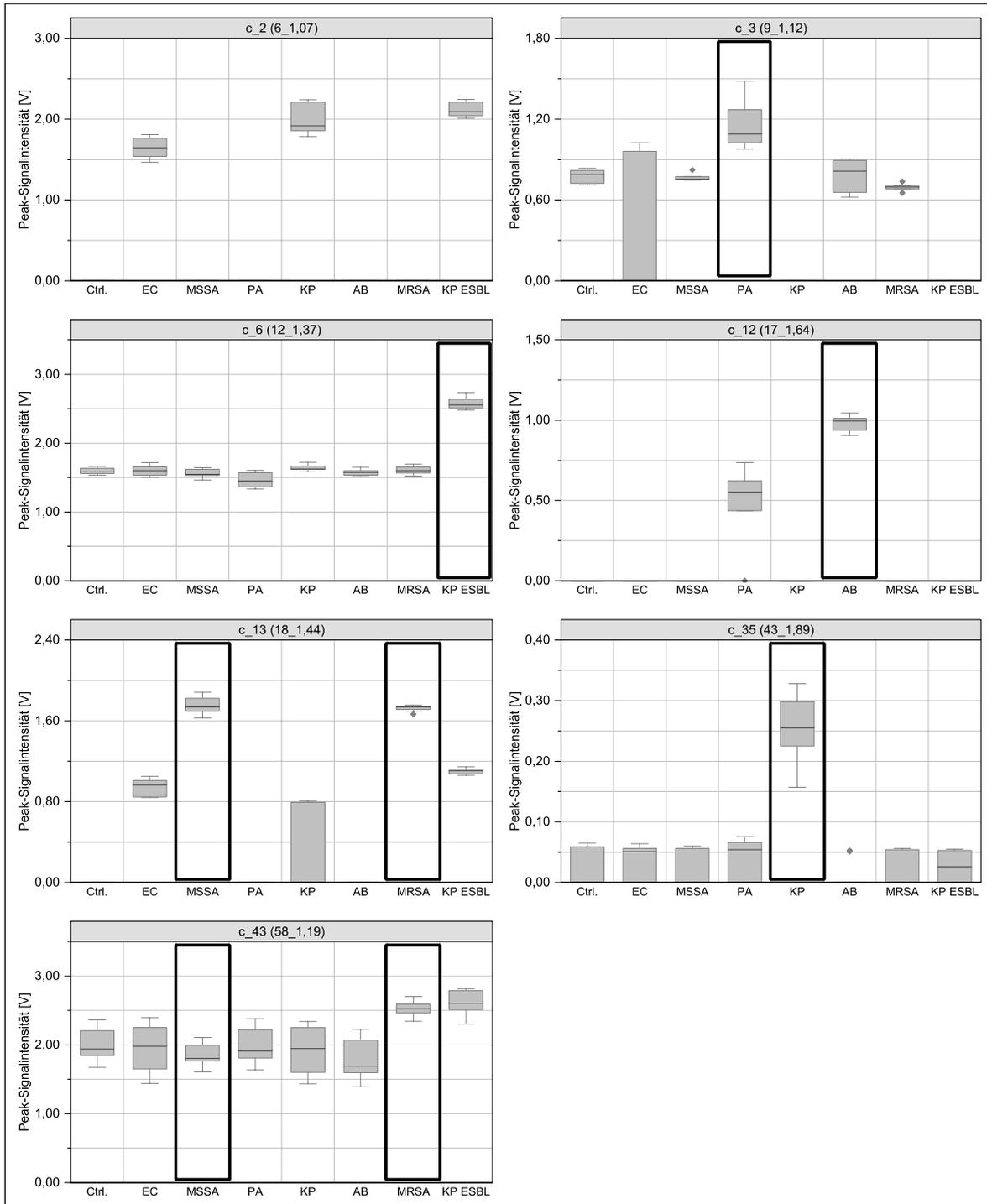


Abbildung 34 Boxplots der sieben VOC-Peaks, die eine Klassifizierung der verschiedenen Bakterienspezies einschließlich resistenter Bakterienspezies unter Verwendung des Klassifizierungsbaums erlauben. Nicht-resistente Bakterien: n = 11, resistente Bakterien: n = 10.

Tabelle 26 Klassifizierungsergebnisse der Diskriminanzanalyse mit sieben VOC-Cluster selektiert durch ROC-Analyse zur Unterscheidung der Bakterien einschließlich resistenter Stämme

	Gruppe	Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit								Gesamt
		Ctrl.	EC	SA	PA	KP	AB	MRSA	KP ESBL	
Original	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	0	0	11
	SA	0	0	11	0	0	0	0	0	11
	PA	2	0	0	9	0	0	0	0	11
	KP	0	0	0	0	11	0	0	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	0	0	11
	MRSA	0	0	0	0	0	0	10	0	10
	KP ESBL	0	0	0	0	0	0	0	10	10
Kreuzvalidiert	Ctrl.	11	0	0	0	0	0	0	0	11
	EC	0	11	0	0	0	0	0	0	11
	SA	0	0	11	0	0	0	0	0	11
	PA	2	0	0	8	0	1	0	0	11
	KP	0	0	0	0	11	0	0	0	11
	AB	0	0	0	0	0	11	0	0	11
	MRSA	0	0	0	0	0	0	10	0	10
	KP ESBL	0	0	0	0	0	0	0	10	10

97,7 % der ursprünglich gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.

96,5 % der kreuzvalidierten gruppierten Fälle wurden korrekt klassifiziert.

Tabelle 27 Die drei diskriminatorischen VOC-Cluster mit den höchsten AUC-Werten für die jeweilige Bakterienspezies als Variablen für die targeted Datenanalyse

Bakterienspezies	Cluster	AUC	95 % Konfidenzintervall
EC	c_107	1,00	[0,99 ; 1,00]
	c_14	0,99	[0,97 ; 1,00]
	c_17	0,93	[0,88 ; 0,99]
MSSA	c_24	0,97	[0,94 ; 1,00]
	c_13	0,94	[0,90 ; 0,99]
	c_38	0,94	[0,89 ; 0,99]
PA	c_3	1,00	[0,99 ; 1,00]
	c_31	0,90	[0,77 ; 1,00]
	c_117	0,78	[0,68 ; 0,88]
KP	c_117	1,00	[1,00 ; 1,00]
	c_35	1,00	[1,00 ; 1,00]
	c_36	1,00	[1,00 ; 1,00]
AB	c_12	1,00	[1,00 ; 1,00]
	c_21	0,83	[0,72 ; 0,95]
	c_75	0,83	[0,72 ; 0,94]
MRSA	c_7	0,98	[0,95 ; 1,00]
	c_41	0,97	[0,94 ; 1,00]
	c_58	0,96	[0,93 ; 1,00]
KP ESBL	c_5	1,00	[1,00 ; 1,00]
	c_6	1,00	[1,00 ; 1,00]
	c_40	0,97	[0,93 ; 1,00]

AUC = Fläche unter der Kurve; nicht-resistente Bakterien: n = 11;
resistente Bakterien: n = 10

Anhang 2.2 *In-vitro* Untersuchung der Zellkulturen mit oder ohne RS-Viren

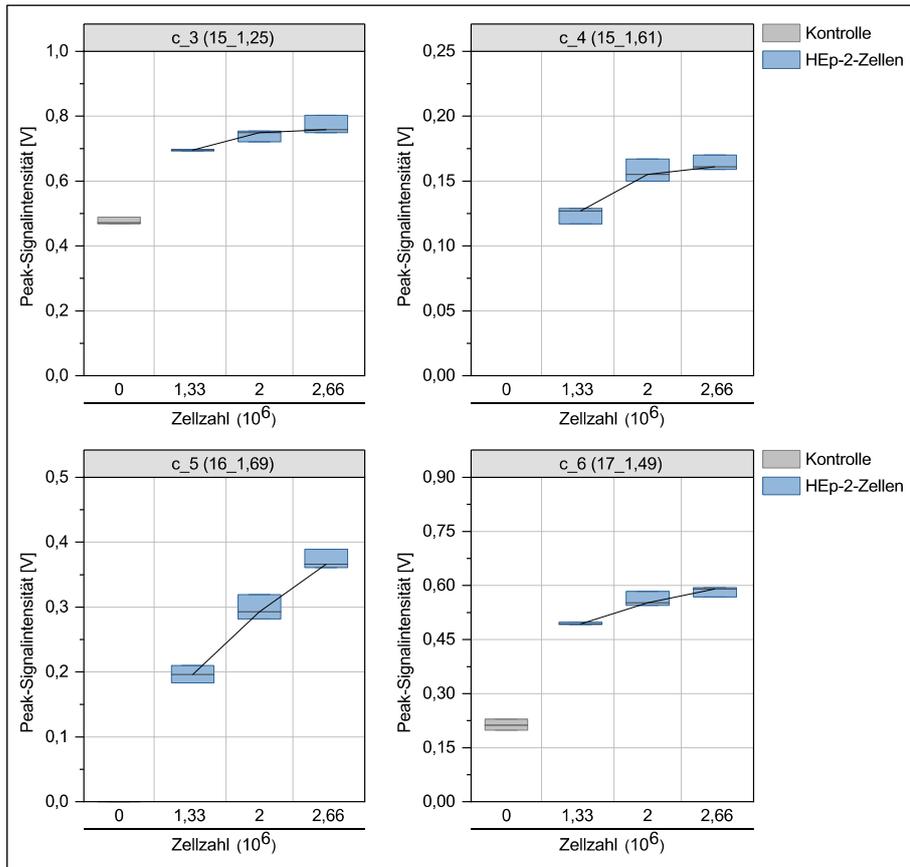


Abbildung 35 Zusammenhang zwischen Zellzahl und Signalintensität für vier HEP-2 zellspezifische VOC-Peaks (Cluster) in Form von Boxplots. n = 3.

Anhang 2.3 *In-vivo* Untersuchung der menschlichen Atemluft auf virale Infektionen

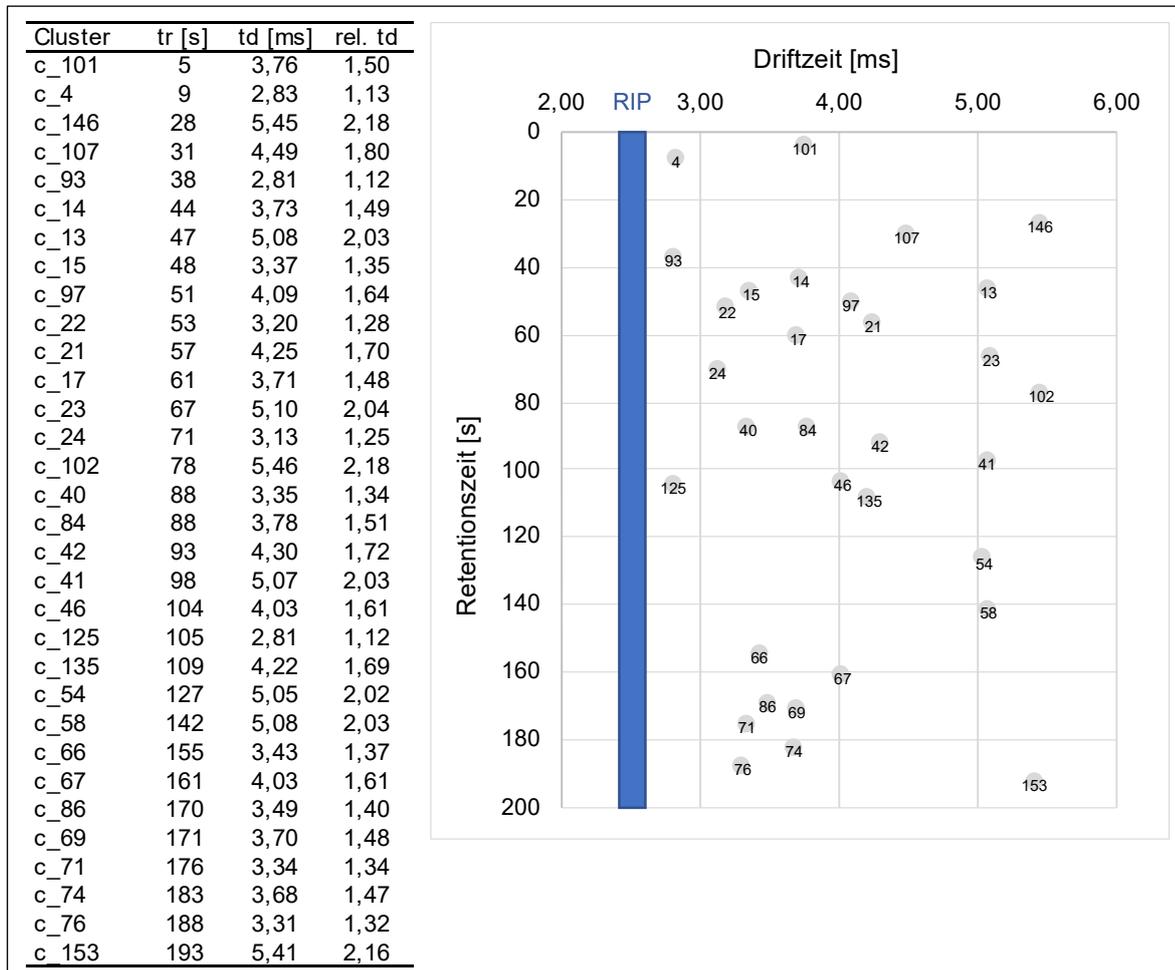


Abbildung 36 Position der selektierten 32 Cluster im IMS-Chromatogramm. td (RIP) = 2,5 ms.

Anhang 3 Diskussion

Tabelle 28 Lebendzellzahlbestimmung für die OD₆₀₀ von 0,1. Referenzstamm: *E. coli* DSM 1103, Nährmedium: Tryptic Soy Broth.

Versuch:		1. (n = 3)	2. (n = 3)	1. und 2.
OD ₆₀₀	MW	0,092	0,110	0,101
	SD	0,005	0,006	0,011
KBE/ml	MW	6,43E+07	9,17E+07	7,80E+07
	SD	5,03E+06	6,66E+06	1,59E+07

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

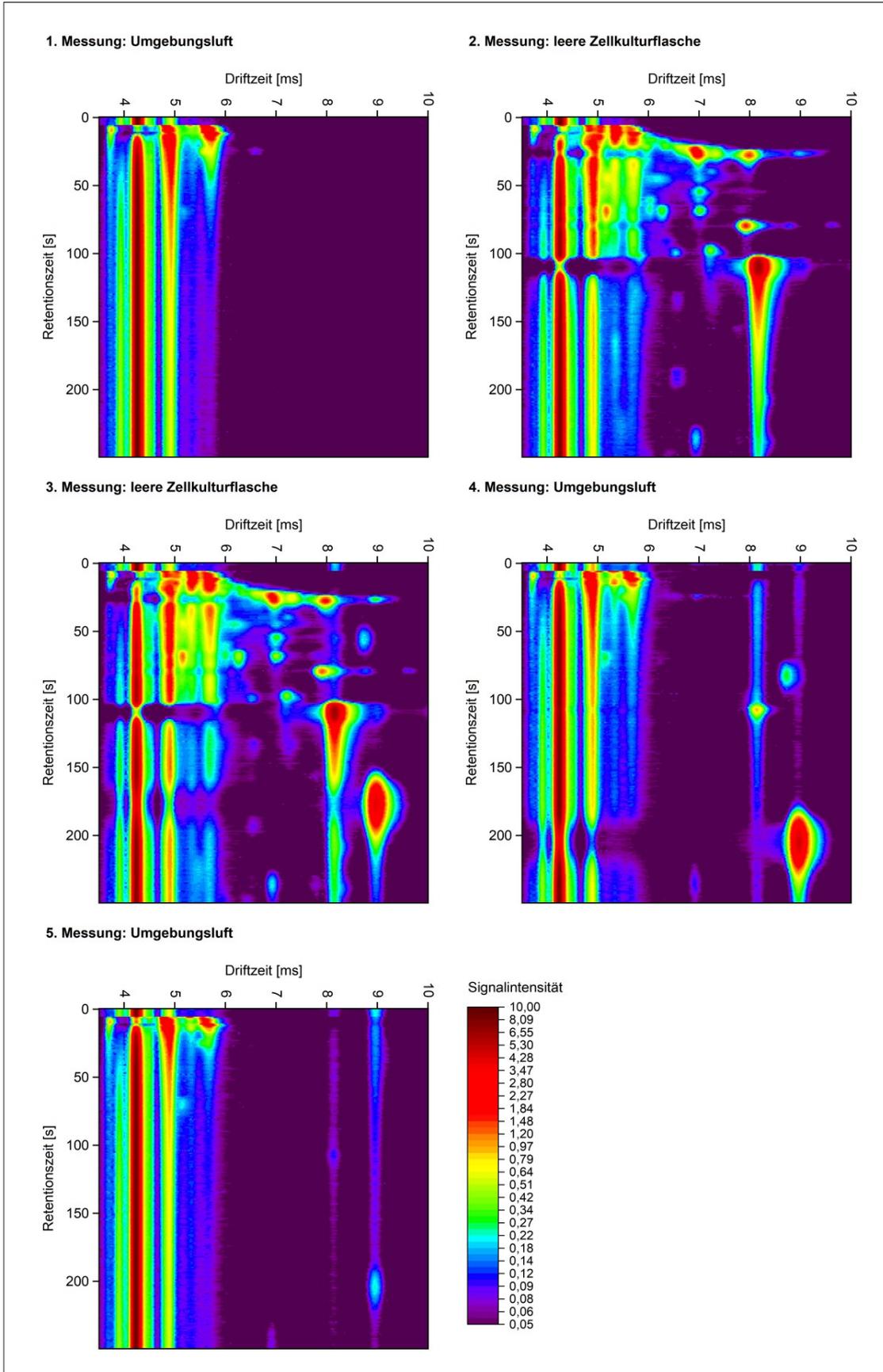


Abbildung 37 MCC-IMS-Messungen der leeren Zellkulturflaschen und Umgebungsluft