

Rubin – SniPoCC - VP2

**Entwicklung eines fluoreszenzbasierten Schnelltest-Komplettsystems
zur quantitativen und digitalisierten Analyse von POC-Tests
(qDigiPOC)**

Schlussbericht
Teil I und Teil II

Förderkennzeichen: 03RU1U092G

Erstellt von:

Universitätsmedizin Göttingen
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
Robert-Koch-Str. 40, 30075 Göttingen

PD Dr. med. Thorsten Perl

tperl@gwdg.de

Isabell Eickel

isabell.eickel@med.uni-goettingen.de

Maja Wagemann-Süss

maja.wagemann@stud.uni-goettingen.de

David Wichmann

david.wichmann@med.uni-goettingen.de

<i>Zuwendungsempfänger:</i> Georg-August-Universität Göttingen Universitätsmedizin Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie	<i>Förderkennzeichen:</i> 03RU1U092G
<i>Vorhabensbezeichnung:</i> Rubin – SniPoCC - VP2: Entwicklung eines fluoreszenzbasierten Schnelltest-Komplettsystems zur quantitativen und digitalisierten Analyse von POC-Tests (qDigiPOC)	
<i>Laufzeit des Vorhabens:</i> 01.04.2022 – 31.08.2025	

Inhaltsverzeichnis

I Kurze Darstellung	3
I.1 Aufgabenstellung und Motivation.....	3
I.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde.....	4
I.3 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	4
I.4 Planung und Ablauf des Vorhabens	4
I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	4
II Eingehendere Darstellung	5
II.1 Erzielte Ergebnisse des Verbundprojektes	5
II.1.1 AP 2.7.1: Definition der Zielparame-ter für die Realisierung der Fluoreszenzreader	5
II.1.2 AP 2.7.2: Erstellen eines Ethikantrags POC-beta-Laktam-Antibiotika	6
II.1.3 AP 2.7.3: Ethikantrag POC-Zytokin-Test	7
II.1.4 AP 2.7.4: Erstellen der Schnittstellendefinition Patientendatenmanagementsystem (PDMS) .	7
II.1.5 AP 2.7.5: Entwicklung Algorithmus Therapieempfehlung beta-Laktam-Antibiotika	8
Ergebnisse Multiple Regression	8
Statistische Analyse – Erweiterte Modellprüfung.....	9
Modell-Diagnostik und Nichtlinearitätsanalyse	10
II.1.6 AP 2.7.6: Durchführung der Observationsstudie POC beta-Laktam-Antibiotika	12
Material und Methoden goldbasierter LFT	13
Ergebnisse goldbasierter LFT.....	14
II.1.7 AP 2.7.7: Durchführung der Observationsstudie POC beta-Laktam-Antibiotika	18
Kalibration	18
Testevaluation an einem Realproben	20
II.1.8 AP 2.7.8: Durchführung der Observationsstudie POC Zytokine	21
II.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	22
II.2.1 Investitionsmittel.....	22
II.2.2 Sachmittel.....	22
II.2.3 Reisekosten	22
II.2.4 Personalkosten	22
II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	22
II.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	22
II.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	22
II.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen	22
II.6.1 Erfolgte Tagungspublikationen.....	22
II.6.2 Erfolgte Journalpublikationen	23

II.6.3 Eingereichte Arbeiten (under review)	23
III Literaturverzeichnis	24

I Kurze Darstellung

I.1 Aufgabenstellung und Motivation

Eine grundlegende Motivation hinter dem Gesamtvorhaben zur Entwicklung von Schnelltestsystemen ist die technische Entwicklung von Lösungen zur zeitnahen, bettseitigen Verfügbarkeit von Informationen über den Gesundheitszustand (Zytokin-Tests) und die Therapiesteuerung (beta-Laktam-Tests) bei kritisch kranken Patienten.

Die Ziele, die mit der Teilvorhabenbeschreibung der UMG verfolgt wurden, bestanden in der Definition der Anforderungen an die angestrebten Schnelltestsysteme aus klinischer Sicht, die Entwicklung von Algorithmen zur Therapiesteuerung anhand der ermittelten beta-Laktam-Konzentrationen, die Einbindung der Messwerte in klinisch gebräuchliche Krankenhausinformationssysteme und mit dem Vorliegen von Funktionsmustern der Schnelltestsystemen die klinische Evaluation der im Gesamtprojekt angestrebten beta-Laktam und Zytokin Schnelltests als Prototypen in der Anwendung an humanen Blutproben unter klinischen Bedingungen.

Ein wesentlicher Bestandteil dieses Teilvorhabens bestand in der Evaluierung der Schnelltestsysteme (POC) in Untersuchungen an Realproben von Patienten, die unter einer Therapie einer Infektionserkrankung mit beta-Laktam-Antibiotika standen. Die Evaluation erfolgt im Vergleich mit einer HPLC-MS/MS-Referenzmethode als Goldstandard.

Nach positivem Ethik-Votum wurden an der UMG Patienten in Observationsstudien rekrutiert. Neben der Erfassung von klinische Verlaufsparametern und anthropometrischen Daten erfolgte insbesondere der Bestimmung der Piperacillin-Blutkonzentration mittels HPLC-MS/MS.

Im ersten Schritt wurde ein Gold-basierter Lateral Flow Test (nal von Minden, Göttingen) für die Bestimmung von Piperacillin kalibriert. Die Quantifizierung des LFT-Signals für Piperacillin erfolgte mit einem kommerziellen Reader (Colibri, Fa. nal von Minden, Göttingen). Die Kalibration erfolgte in einem mehrstufigen Verfahren, zunächst mit einer Kalibration anhand von definierten Kalibrationslösungen und im zweiten Schritt mit einer Adaptation an Patientenproben im definierten Konzentrationsbereich.

Funktionsmuster A wurde hinsichtlich der Erfüllung der Anforderungen an die Messgenauigkeit überprüft. Die Ergebnisse gehen mit in die Optimierung des Funktionsmusters B ein, dass in einer weiteren Observation überprüft werden wird. Das zum Projektende angestrebte Funktionsmuster C wird nicht in der Projektlaufzeit untersucht, die Evaluation kann aber basierend auf dem bestehenden Ethikvotum nach Projektende erfolgen.

Das Teilprojekt beinhaltet Arbeitspakete in denen ein rationaler Algorithmus zur Therapieanpassung der beta-Laktam-Therapie basierend auf den erhobenen Messwerten erstellt werden sollte. Eine deskriptive Analyse mit linearer Regression zeigt einen starken Zusammenhang zwischen Nierenfunktion und erzielten Piperacillin-Spiegeln, aber auch das Körpergewicht oder der Body-Mass-Index zeigt einen Einfluss auf die erzielten Antibiotika-Spiegel.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Aufgrund fehlender neu entwickelter Antibiotikaklassen und einer zunehmenden Resistenzlage der zu behandelnden bakteriellen Erreger besteht ein Fokus in der Antibiotikatherapie auf eine möglichst optimale Anwendung der Substanzen. Für beta-Laktam-Antibiotika beziehen sich Dosisoptimierungsregime nach pharmakokinetisch/pharmakodynamischen (PK/PD) Konzepten auf eine Überschreitung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der zu behandelnden Mikroorganismen am Wirkort für ein möglichst langes Zeitintervall (> 60%) [1] [2]. Diese zeitabhängige Wirkungsbeziehung der beta-Laktam-Antibiotika erfordert insbesondere bei kritisch kranken Patienten eine mitunter deutliche Abweichung von Standarddosierungen. Die Bestimmung der erforderlichen Dosis erfolgt durch Anpassung anhand von Konzentrationsbestimmungen der Antibiotika (therapeutisches Drugmonitoring – TDM) unter Berücksichtigung der MHK [3].

Für beta-Laktam-Antibiotika wird das TDM in der Regel mittels Chromatographie in Kombination mit einem UV- oder massenspektrometrischen Detektors realisiert. Die Verfügbarkeit dieser Techniken ist auf Großlabore beschränkt und erfordert weiterhin gut ausgebildete Anwender [4]. Automatisierungen mit einer erhofften Zeitersparnis sind derzeit nicht etabliert. Aus der eingeschränkten Verfügbarkeit und dem Aufwand der Methodik resultiert eine erhebliche Zeitspanne zwischen Probennahme und dem Vorliegen eines Untersuchungsergebnisses.

1.3 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Diese Ziele werden in enger Kooperation mit den Projektpartnern nal von Minden (Schnelltests), IFNANO / FiSens (Reader) und Castalytics (digitalisierte Auswertung und Datenmanagement) angestrebt.

1.4 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilvorhaben wurde in folgende acht Arbeitspakete unterteilt:

- AP 2.7.1: Definition der Zielparameter für die Realisierung der Fluoreszenzreader
- AP 2.7.2: Erstellen eines Ethikantrags POC-beta-Laktam-Antibiotika
- AP 2.7.3: Ethikantrag POC-Zytokin-Test
- AP 2.7.4: Erstellen der Schnittstellendefinition Patientendatenmanagementsystem (PDMS)
- AP 2.7.5: Entwicklung Algorithmus Therapieempfehlung beta-Laktam-Antibiotika
- AP 2.7.6: Durchführung der Observationsstudie POC beta-Laktam-Antibiotika (Muster A)
- AP 2.7.7: Durchführung der Observationsstudie POC beta-Laktam-Antibiotika (Muster B)
- AP 2.7.8: Durchführung der Observationsstudie POC Zytokine

Es wurden zwei Meilensteine definiert:

Meilenstein 1: Die Studien zur Evaluation der Schnelltestsysteme sind geplant, die Studienprotokolle erstellt und das Ethikvotum der lokalen Ethikkommission liegt vor.

Meilenstein 2: Ein rationaler Algorithmus zur Therapieanpassung einer beta-Laktam-Therapie basierend auf retrospektiven Daten liegt vor, eine Datenbank als Grundlage für eine KI-Plattform ist definiert.

Die Meilensteine stellten kein Abbruchkriterium für das Vorhaben dar.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Seitens der UMG fand bis auf eine enge Zusammenarbeit mit den genannten Verbundpartnern keine weitere Zusammenarbeit mit externen Stellen statt.

II Eingehendere Darstellung

II.1 Erzielte Ergebnisse des Verbundprojektes

In den folgenden Unterpunkten werden die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete des Teilvorhabens kurz erläutert.

II.1.1 AP 2.7.1: Definition der Zielparameter für die Realisierung der Fluoreszenzreader

Die Grundlage für die Entwicklung eines Schnelltests für beta-Laktam-Antibiotika im humanen Blut ist die Definition des Antibiotikapanels. Angestrebt wird eine möglichst umfassende Abdeckung häufig verwendeter beta-Laktam-Antibiotika. Hierzu wurde zunächst in einer retrospektiven Analyse erfasst, welche beta-Laktam-Antibiotika in der Intensivmedizin anteilig zur Anwendung kamen und mit welchen Substanzen eine 90%ige Abdeckung der Verordnungsregime erreicht werden könnte.

Als Zielsubstanzen wurden die folgenden 6 beta-Laktam-Antibiotika genannt: Meropenem, Piperacillin, Flucloxacillin, Cefiderocol, Ampicillin und Ceftazidim.

Die Herausforderung für die angestrebte Analytik ist eine hohe Selektivität (90%) und Spezifität (80%) [5]. Das Signal des unteren Messgrenzwertes sollte 5 mal stärker sein als das einer leeren Probe [5]. Als Messgenauigkeit wurde basierend auf der EMA Leitlinie für Bioanalytische Methodenvalidierung [5] max. 20% (15%) Abweichung vom nominalen Wert der Qualitätsproben definiert. Ausnahmen sind der untere Messgrenzwert, hier ist eine max. Abweichung von 25% (20%) vom Nominalwert bei wenigsten 80% der Messungen definiert. Weiterhin sollte der absolute Fehler 30% im oberen Messbereich und 40% am unteren Ende des Messbereiches nicht übersteigen [5].

Beta-Laktam-Antibiotika entfalten eine effektive Wirkung, wenn möglichst dauerhaft während der Wachstumsphase der Zellwand die MHK der Erreger überschritten wird. Initial nimmt die bakterizide Wirkung mit steigenden Konzentrationen des Antibiotikums bis zum 4- bis 5-fachen der MHK zu, höhere Wirkspiegel können jedoch das Therapieergebnis nicht verbessern. Dieser pharmakokinetisch-pharmakodynamische Zusammenhang wird als zeitabhängige (nicht-konzentrationsabhängige) Bakterizidie beschrieben. Bei beta-Laktam-Antibiotika sollte die Konzentration des ungebundenen Antibiotikums innerhalb eines Dosierungsintervalls für mindestens 40–60% dieser Zeit die MHK der Erreger am Infektionsort überschreiten [6], wobei die Konzentration am Wirkort etwa 40% für Carbapeneme beträgt und höhere Werte für Cephalosporine; Penicilline liegen dazwischen. Diese Daten leiten sich aus tierexperimentellen Untersuchungen ab. Ergebnisse klinischer Studien bei Intensivpatienten sprechen dafür, dass 100% der Zeit oberhalb der MHK das Outcome verbessern können [7], [8], [9], [10]. Da gerade bei Intensivpatienten mit schweren Infektionen in tiefen Kompartimenten die im Rahmen des TDM gemessenen Plasmakonzentrationen nicht den Wirkortkonzentrationen entsprechen, empfehlen einige Experten als PK/PD-Ziel den Plasmaspiegel 100% des Dosierungsintervalls oberhalb des 4- bis 5-fachen der MHK zu halten [11], [12], [13].

Tabelle 1: Charakteristika von Betalaktam-Antibiotika und daraus abgeleitete Messbereichsgrenzen

Betalaktam-Antibiotikum / Betalaktamase-Inhibitor	Minimale Hemmkonzentration (MHK) [mg/l]	Ungebundene Fraktion [%]	Messbereichs-Untergrenze [mg/l]	Messbereichs-Obergrenze [mg/l]	Toxizitätsgrenzen Plasmakonzentration [mg/l] ^(a,b,c,d)	Minimale Plasmakonzentration [mg/l]	Maximale Plasmakonzentration [mg/l]
Cefiderocol	2 [14]	40 [15]	0,5	60	-	10 [17,28]	20 [13,16]
Flucloxacillin	2 [17] [18]	5 bis 20 [18]	0,5	375	125 ^a [19] [20]	50 [18,21]	125 [19] [20]
Meropenem	8 [14]	90 [15]	2	120	44,5 ^b [9] / 64,2 ^a [20]	32 [4,22]	40 [20]
Piperacillin	16 [14]	70 [15]	4	480	157 ^{a,d} / 360 ^{a,c} / 452,7 ^{b,c} [20]	96 [4,22,23]	240 [19] [20]
Ampicillin	8 [14]	80 [24] [25]	2	240		40 [26] [27]	80 [26] [27]
Ceftazidim	8 [14]	90 [15]	2	240		40 [28]	80 [28]

a = Neurotoxizität, b = Nephrotoxizität, c = Piperacillin ohne Tazobactam, d = Piperacillin mit Tazobactam

Die in der Tabelle 1 festgelegten Plasmakonzentrationen tragen den oben beschriebenen Erkenntnissen Rechnung. Zuerst wurden die entsprechenden oberen Grenzwerte der MHK nach Studienlage [29], [18], [17] bzw. aus der EUCAST-Datenbank [14] entnommen. Anschließend wurde die ungebundene Fraktion [18], [15], [24], [25] der einzelnen Antibiotika bzw. deren Permeabilität in die einzelnen Gewebearten ermittelt. Wobei sich in Bezug auf die Permeabilität und Gewebegängigkeit eine sehr heterogene und inkonsistente Datenlage zeigt [30]. Wie oben jedoch erwähnt zeigen die pharmakokinetischen Daten der beta-Laktam-Antibiotika untereinander keine große Variabilität. Für Piperacillin wird die MHK mit einem Sicherheitsfaktor für die Gewebepерmeabilität von 1,5 versehen und davon ausgehend die vierfache MHK als minimale Plasmakonzentration definiert [22], [23], [4].

Als maximale Plasmakonzentration wird für die Antibiotika Cefiderocol [16], [21], Ampicillin [26] und Ceftazidim [28] das jeweils zehnfache der MHK festgelegt. Für Flucloxacillin [19], [20] und Meropenem [20] wird die Toxizitätsgrenze als maximale Plasmakonzentration verwendet. Für Piperacillin [31], [21] wird das jeweils zehnfache der MHK mit dem Faktor von 1,5 für die Gewebepерmeabilität versehen und als maximale Plasmakonzentration verwendet

Die Messbereiche wurden demnach wie folgt festgelegt. Für den unteren Messbereich wird ein Viertel der MHK definiert. Für den oberen Messbereich wird die dreifache Konzentration der maximalen Plasmakonzentration definiert.

II.1.2 AP 2.7.2: Erstellen eines Ethikantrags POC-beta-Laktam-Antibiotika

Der Antrag „Klinische Evaluation eines fluoreszenz-basierten Beta-Laktam-Antibiotika Schnelltests zur Point-of-Care Diagnostik für Humanes Blut“ wurde mit der Antragsnummer 13/7/23 von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen bewilligt.

II.1.3 AP 2.7.3: Ethikantrag POC-Zytokin-Test

Der Antrag „Klinische Evaluation eines fluoreszenz-basierten Zytokin Schnelltests zur Point-of-Care Diagnostik für Humanes Blut“ wurde mit der Antragsnummer 6/1/24 von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen bewilligt.

II.1.4 AP 2.7.4: Erstellen der Schnittstellendefinition

Patientendatenmanagementsystem (PDMS)

POCT-Geräte nutzen standardisierte Schnittstellen und Protokolle. Heutzutage werden im Gesundheitswesen im stationären Bereich die Protokolle Health Level 7 (HL7) oder ASTM genutzt. Hier geben die Herstellerfirmen der einzelnen POCT-Geräte Schnittstellen-Beschreibungen heraus. Daraus kann der Hersteller des Empfängersystems (hier also das Patientendatenmanagementsystem (PDMS)) einen entsprechenden Treiber programmieren.

Die aktuelle HL7-Syntax wäre am Beispiel eines Piperacillin-Spiegels von einem Reader (LFT) wie folgt (Abbildung 1):

```
MSH|^~\&|LFT_TDM_READER|ICU-
POCT|LIS|HOSPITAL|20260215143000+0100||ORU^R01^ORU_R01|LFT20260215-
00042|P|2.5.1||AL|NE|DEU|UNICODE UTF-8
PID|1||12345678^^^HOSPITAL^MR||MUSTER^MAX^^^MR||19800101|M
PV1|1||ICU^01^01^HOSPITAL|||1234^ARZT^ANNA^^^DR||INTENSIV|||||123456^FALLNUMMER
ORC|RE|ORD20260215-20007^LFT_TDM_READER|LIS20260215-88801^LIS||CM|||20260215141500+0100||1234^ARZT^ANNA^^^DR
OBR|1|ORD20260215-20007^LFT_TDM_READER|LIS20260215-88801^LIS|PIP_TDM^Piperacillin level^99TDM||20260215135500+0100|20260215141000+0100|||||1234^ARZT^ANNA^^^DR||20260215141500+0100||F|||||PLAS^Plasma^HL70487
SPM|1|SPM20260215-LFT9911^LFT_TDM_READER|^Venous blood^SCT|119361006^Plasma specimen^SCT||HEP^Heparin^HL70371||||20260215135000+0100|20260215135500+0100
OBX|1|NM|PIP^Piperacillin [Mass/volume] in Plasma^99TDM||32500|ug/L^microgram per liter^UCUM|20000-80000|N||F||20260215141000+0100||LFT^Lateral flow test^99METHOD
OBX|2|CE|TDM_SAMP^TDM sample timing^99TDM||RANDOM^Random (non-trough)^99TDM||||F||20260215141000+0100
OBX|3|ST|KITLOT^Test kit lot number^99POCT||LOT-7K3A21||||F||20260215141000+0100
OBX|4|ST|DEVICE^Device identifier^99POCT||LFT-READER-ICU01-SN004812||||F||20260215141000+0100
NTE|1|L|Quantitative LFT result in ug/L. Confirm units and therapeutic targets per local TDM guideline.
```

Abbildung 1: Beispiel HL7-Protokoll für einen Piperacillin-Spiegel aus einem LFT

II.1.5 AP 2.7.5: Entwicklung Algorithmus Therapieempfehlung beta-Laktam-Antibiotika

Das Ziel dieses Arbeitspaketes ist die Erstellung eines rationalen Algorithmus zur Therapieanpassung einer beta-Laktam-Therapie anhand klinischer Messgrößen. Im ersten Schritt erfolgte die Erstellung einer Datenbank von Patienten unter einer Therapie mit Piperacillin. Erfasste Variablen waren neben dem mittels HPLC-MS/MS gemessenen Piperacillin-Spiegeln [$\mu\text{g/l}$] folgende Parameter: BMI [kg/m^2], S-Kreatinin [mg/dl], CRP [mg/l], Hb [g/dl], Bilanz 24h [ml], Katecholamintherapie [ja/nein] und Therapietag.

Tabelle 2: Charakteristika der 49 eingeschlossenen Patienten

	Alter [a]	Größe [cm]	Gewicht [kg]
Median (MIN-MAX)	72 (35 – 90)	175 (154 – 191)	80 (49 – 108,7)
Mittelwert (+/- SD)	69 (+/- 11)	173,7 (+/- 8,95)	79,1 (+/- 13,56)

Tabelle 3: Ausprägung der erfassten Variablen für das lineare Mixed-Effects-Modell (LMM)

Variable	Mittelwert (+/- SD)	Median (MIN-MAX)
Piperacillin_{HPLC-MS/MS} [mg/l]	87,6 (+/- 56,9) mg/l	69,3 (1,6 – 319) mg/l
BMI [kg/m²]	26,2 (+/- 3,9) kg/m ²	26 (18,3 – 33) kg/m ²
S-Kreatinin [mg/dl]	1,4 (1,2) mg/dl	0,98 (0,36 – 7,82) mg/dl
CRP [mg/dl]	124,7 (+/- 80,3) mg/dl	106,6 (10,6 – 382,1) mg/dl
Hb [g/dl]	8,6 (+/- 1,8) g/dl	8,1 (6,1 – 15,6) g/dl
Bilanz über 24h [ml]	330,3 (+/- 1610,5) ml	167 (-2723 – 7386) ml
Katecholamintherapie [ja/nein]	Ja: 23/ Nein: 138	
Therapietag	5 (+/- 4,9)	4 (0 – 31)

Ergebnisse Multiple Regression

In die Analyse wurden 161 Messungen von 49 Patienten eingeschlossen. Zur Berücksichtigung wiederholter Messungen wurde ein lineares Mixed-Effects-Modell mit patientenspezifischem Random Intercept verwendet. Im PK-optimierten Modell erwiesen sich Serumkreatinin und Katecholamintherapie als unabhängige Prädiktoren erhöhter Piperacillin-Plasmaspiegel (Abbildung 2). Ein Anstieg des Kreatinins war mit höheren Piperacillin-Konzentrationen assoziiert ($\beta = 29,4$; $p < 0,001$), wobei Kreatinin auch im standardisierten Modell den größten Effekt zeigte (standardisiertes $\beta \approx 34,04$). Ebenso war eine laufende Katecholamintherapie mit signifikant erhöhten Spiegeln verbunden ($\beta = 32,66$; $p < 0,008$; standardisiertes $\beta \approx 11,02$) (Tabelle 4). Der Plot (Abbildung 4) zeigt modelladjustierte Vorhersagen der Piperacillin-Konzentration über den beobachteten Kreatininbereich bei konstant gehaltenen Kovariaten (Mittelwerte). Die Kurven sind getrennt nach Vorliegen einer Katecholamintherapie dargestellt. Kreatinin zeigt einen linearen positiven Zusammenhang mit den vorhergesagten Piperacillin-Spiegeln.

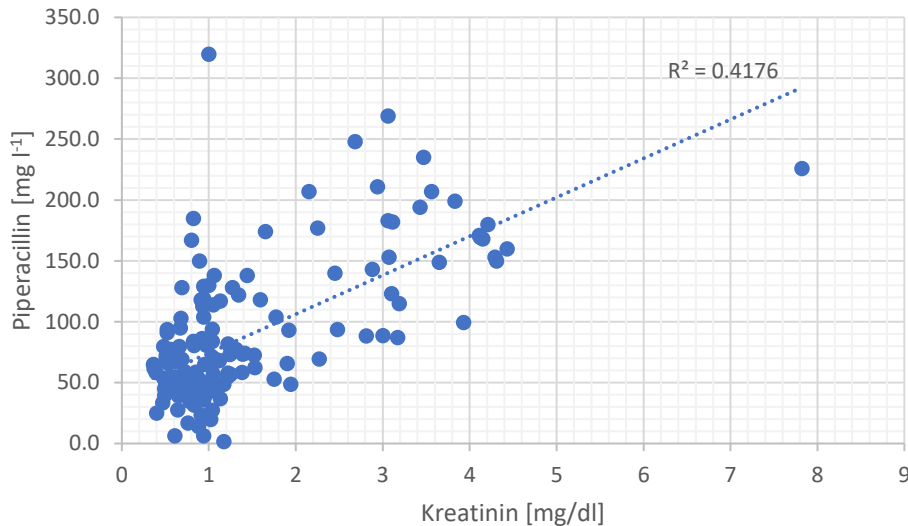


Abbildung 2: Lineare Regression von Piperacillin_{HPLC-MS/MS} [mg/l] gegen S-Kreatinin [mg/dl], R^2 0,4176

Weitere Kovariaten, einschließlich CRP, Hämoglobin, 24-h-Flüssigkeitsbilanz, Größe, Gewicht und BMI zeigten nach Adjustierung keinen unabhängigen signifikanten Zusammenhang mit den Piperacillin-Konzentrationen.

Tabelle 4: Effektgrößen-Ranking aus PK-optimiertem Mixed model

Variable	Beta	Beta_std	CI_lower	CI_upper	p_value
S- Kreatinin [mg/dl]	29,39796	34,54577	21,49958	37,29634	< 0,0001
Katecholamintherapie	32,66215	11,02145	8,842676	56,48162	0,007197
CRP [mg/l]	0,077116	6,206487	-0,02567	0,179903	0,141435
Hb_Wert [g/dl]	-4,26238	-7,64733	-10,5748	2,050052	0,18569
Bilanz_24h [ml]	0,001888	3,093116	-0,00252	0,006301	0,401667
Größe [cm]	-2,87	-25,8977	-10,1247	4,384719	0,43812
Gewicht [kg]	2,783015	42,74586	-5,37571	10,94174	0,503775
BMI [kg/m ²]	-7,88631	-30,6135	-32,0299	16,25725	0,522038

Statistische Analyse – Erweiterte Modellprüfung

Zur Bewertung der Modellannahmen wurden Residualdiagnostiken anhand von Residual-gegen-Fit-Plots durchgeführt, um Linearität und Homoskedastizität zu prüfen. Die interindividuelle Variabilität wurde durch Darstellung der patientenspezifischen Random-Intercept-Schätzer (BLUPs) in einem Caterpillar-Plot visualisiert.

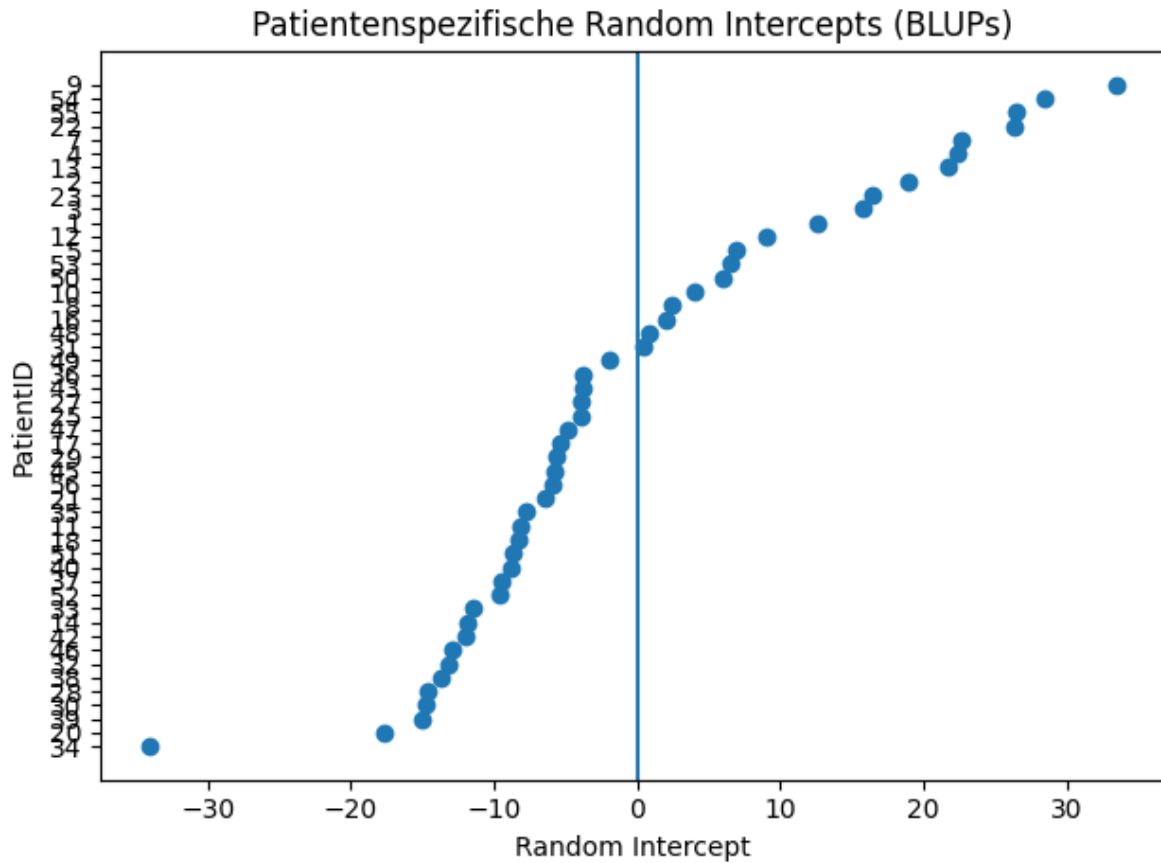


Abbildung 3: Patientenspezifische Random Intercepts des Mixed Models. Dargestellt sind die geschätzten patientenspezifischen Random-Intercept-Effekte (BLUPs) des linearen Mixed Models, sortiert nach Effektgröße. Positive Werte entsprechen höheren patientenspezifischen Basis-Piperacillinspiegeln im Vergleich zum Populationsmittel.

Modell-Diagnostik und Nichtlinearitätsanalyse

Die Residualdiagnostik zeigte keine ausgeprägten Hinweise auf Verletzungen der Linearitätsannahme oder relevante Heteroskedastizität. Der Caterpillar-Plot der patientenspezifischen Random Intercepts verdeutlichte eine relevante interindividuelle Variabilität der Piperacillin-Basispiegel.

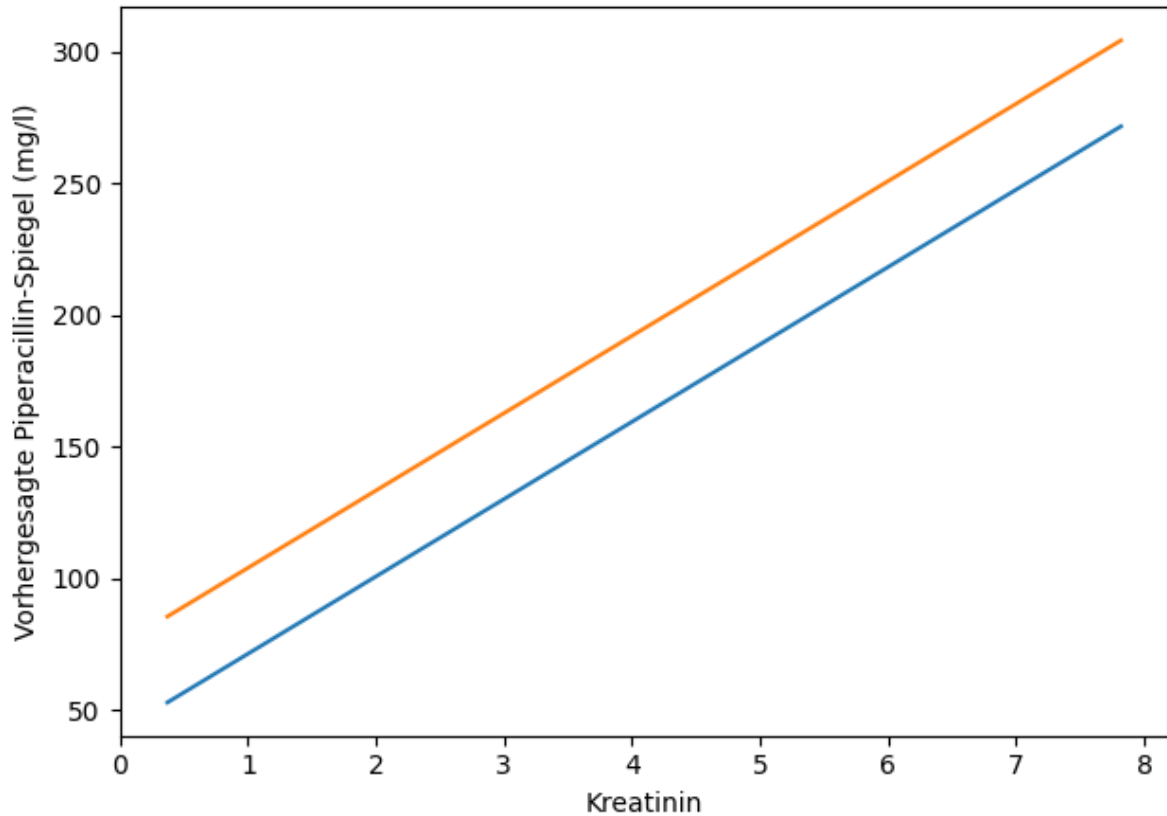


Abbildung 4: Adjustierter Zusammenhang zwischen Serumkreatinin und Piperacillin-Plasmaspiegeln

Aus der multivariaten Analyse lässt sich mittels Mixed-Effect-Model folgender Algorithmus erstellen:

$$\hat{y}_{ij} = \beta_0 + \sum_{k=1}^8 \beta_k X_{k,ij} + \hat{b}_{0j}$$

Formel (1): Kalkulation der Piperacillin-Konzentration_{CALC} basierend auf den gewählten β -gewichteten Prädiktoren.

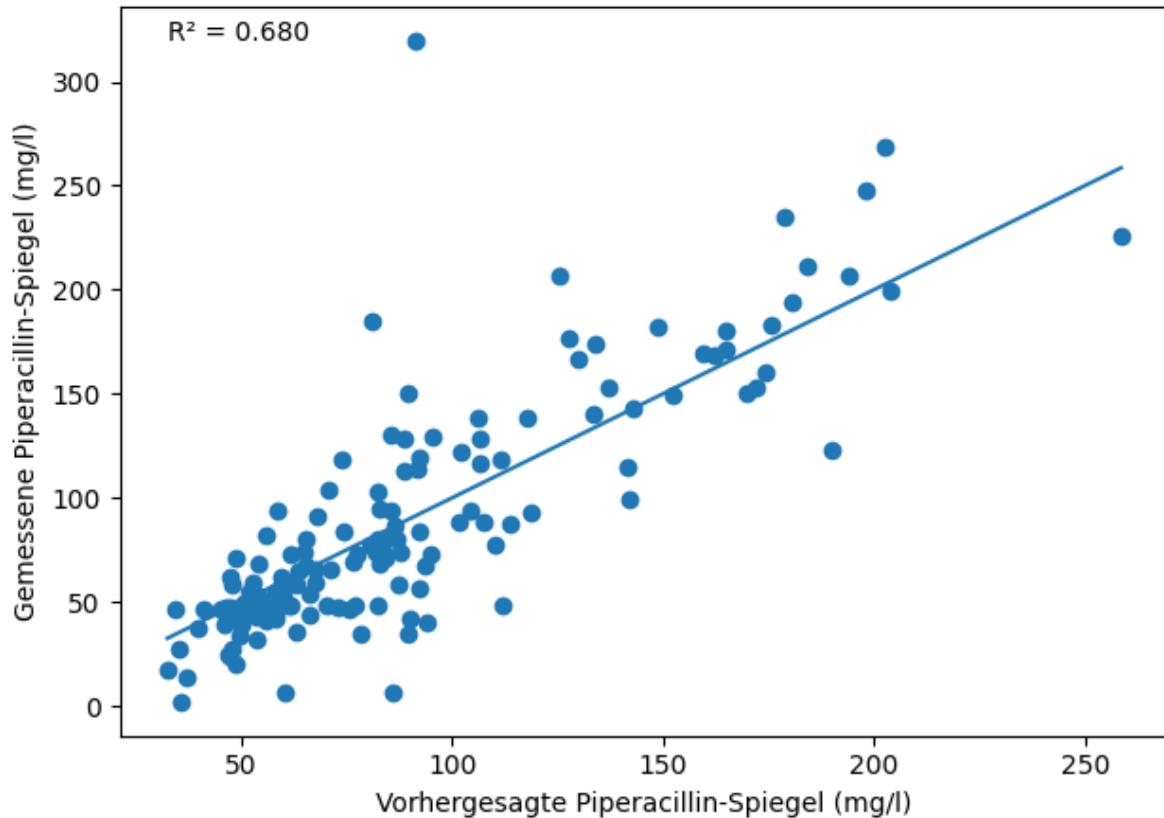


Abbildung 5: Beobachtete Piperacillinspiegel HPLC-MS/MS [mg/l] vs. vorhergesagte Piperacillinspiegel [mg/l], $R^2 = 0,68$ (nach Formel (1))

Aus den erhobenen Daten lässt sich ableiten, dass die Nierenfunktion gemessen am S-Kreatinin den stärksten Effekt auf die erzielte Piperacillin-Konzentration hat. Kreatinin zeigt einen klaren, starken positiven Anstieg der vorhergesagten Piperacillin-Spiegel. Eine Katecholamintherapie verschiebt die Kurve nach oben (additiver Effekt), konsistent mit dem Modellkoeffizienten (Abbildung 4). Auch wenn sich ein Vorhersage-Modell anhand der gewichteten Prädiktoren erstellen lässt, bleibt gerade im intensivmedizinischen Patientenkollektiv aufgrund darstellbarer interindividueller Unterschiede eine Unsicherheit (Abbildung 3).

II.1.6 AP 2.7.6: Durchführung der Observationsstudie POC beta-Laktam-Antibiotika

Zunächst wurde ein goldbasierter, kompetitiver Lateral-Flow Test (LFT) auf Piperacillin mit einer photometrischen Messung der optischen Dichte auf den Testlinien (Colibri Reader, Fa. Nal von Minden, Göttingen) hinsichtlich seiner Leistungsfähigkeit untersucht. Das System wurde mit gepooltem humanem Serum kalibriert, das mit Piperacillin-Tazobactam (0–500 mg/L) versetzt wurde. Die Signalintensitäten (mit C normalisiert, y-Achse) wurden gegen die Analytkonzentrationen (x-Achse) geplottet und mit einer 4-Parameter-Logistik gefittet. Die 4 berechneten Parameter (min, max, EC50, Hillslope) wurden dann für die Berechnung der Konzentration in unbekanntem Proben eingesetzt ($x = EC50 * ((max - min) / (y - min) - 1)^{1 / Hillslope}$).

In einem weiteren Schritt wurde die Kalibration mit Patientenproben weiter angepasst. Das kalibrierte System wurde dann an Patientenproben evaluiert. Die Leistungsfähigkeit des Testsystems wurde anhand eines Bland-Altman Test mit Beschreibung der Abweichung von Goldstandard und Streubreite

sowie einer Error-Grid Analyse charakterisiert, die eine Messwertabweichung und daraus folgende therapeutische Entscheidung beschreibt.

Für den kompetitiven Test wurde die Nitrocellulose-(NC)-Membran an der Testlinie mit Piperacillin-Antigen und an der Kontrolllinie mit Ziege-Anti-Maus-Antikörpern funktionalisiert. In diesem Format konkurriert der Analyt mit dem immobilisierten Antigen um die Bindungsstellen der Au-markierten Antikörper, wodurch eine Signalintensität entsteht, die umgekehrt proportional zur Piperacillin-Konzentration ist.

Material und Methoden goldbasierter LFT

Patienten mit vermuteter oder gesicherter Infektion sowie einer Indikation zur Behandlung mit Piperacillin/Tazobactam wurden für die Studie rekrutiert. Die Medikation erfolgte nach Abteilungsstandard als Kurzinfusion gefolgt von einer an dem therapeutischen Drugmonitoring (TDM) angepassten Applikation per continuitatem. Einschlusskriterien in die Studie waren eine Therapie mit Piperacillin, ein Alter > 18 Jahre sowie eine informierte oder nachträgliche Einwilligung (gemäß Votum der lokalen Ethikkommission vom 13.07.23).

Tabelle 5: Charakteristika des Patientenkollektivs für Kalibration und Evaluation (n=48).

Variable	Mittelwert (+/- SD)	Median (MIN-MAX)
Alter [Jahre]	69,5 (+/- 11,1) Jahre	72 (35 – 89) Jahre
Gewicht [kg]	79,8 (+/- 15,4) kg	78,4 (49 – 108,7) kg
Größe [cm]	174,1 (+/- 9,1) cm	175 (154 – 191) cm
BMI [kg/m ²]	26,2 (+/- 3,9) kg/m ²	26 (18,3 – 33) kg/m ²
S-Kreatinin [mg/dl]	1,4 (+/- 1,2) mg/dl	0,98 (0,36 – 7,82) mg/dl
CRP [mg/dl]	124,7 (+/- 80,5) mg/dl	106,8 (10,6 – 382) mg/l
Piperacillin _{HPLC} [mg/l]	87,5 (+/- 57,1) mg/l	69,1 (1,6 – 319,8) mg/l

Als Goldstandard für das therapeutische Drugmonitoring wurde eine HPLC-MS/MS Analytik durchgeführt. Blutproben für einen LFT und die Referenzanalytik wurden einmal täglich zeitgleich entnommen. Die Referenzanalytik der Wirkstoffspiegel erfolgte täglich routinemäßig aus Heparin-Monovetten (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland). Die HPLC-MS/MS Methodik erfolgte mit automatisiertem Probenvorbereitungsmodul (CLAM-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) gekoppelt an ein Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) Modul (NexeraX2-LC-MS-8050, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) unter Verwendung der LabSolutions Software [32].

Für den LFT wurde Restblut aus einer Blutgasanalyse (Sanguin Counting GmbH, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die präanalytischen Schritte zielten auf eine Hydroxylierung des in der Probe enthaltenen Piperacillins ab. Die Blutproben wurden bei 3800 rpm für 10–15 Minuten zentrifugiert. Der Serumanteil wurde in 200 µL-Gefäße überführt. Zur künstlichen Hydroxylierung von Piperacillin wurden 200 µL einer 1 mM Natriumhydroxid-Lösung (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) versetzt. Die Mischung wurde mittels Vortex homogenisiert und für etwa 10 Sekunden bei 6000 rpm erneut zentrifugiert. Nach einem Intervall von fünf Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL 1 M Essigsäure (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) gestoppt. Anschließend wurde die Mischung erneut homogenisiert. Der LFT wurde mit jeder vorbereiteten Probe in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Jeweils 100 µL der Probe wurden auf das Probenpad der Testkassette appliziert. Nach 10 Minuten erfolgte die Auswertung mit dem entsprechenden Reader (Colibri Reader, nal von Minden, Göttingen, Deutschland).

Zur Visualisierung der Übereinstimmung zwischen der HPLC-MS/MS Analytik auf Piperacillin als Goldstandard und dem Messergebnis aus dem entwickelten LFT wurde neben einer linearen Regression eine Bland-Altman-Analyse durchgeführt [33]. Die Differenz zweier zusammengehöriger Datenpunkte wurde gegen den Mittelwert der mittels HPLC-MS/MS und LFA bestimmten Wirkstoffspiegel aufgetragen, um die Übereinstimmung der Werte zu beschreiben. Die mittlere Abweichung (Bias) aller Datenpunkte wird dargestellt, weiterhin die Streuung der Messergebnisse mit der 1,96fachen Standardabweichung der mittleren Abweichung.

Zur weiterführenden Bewertung klinischer Entscheidungsprozesse wurde eine Error-Grid-Analyse angewendet, um zu untersuchen, ob die mittels LFA bestimmten Wirkstoffspiegel zu anderen Dosisanpassungen geführt hätten als die mittels HPLC-MS/MS erhobenen Werte. Die Error-Grid-Analyse ist ein statistisches Werkzeug zur Visualisierung der Genauigkeit eines alternativen Testsystems im Vergleich zu einer Referenzmessung und wurde ursprünglich zur Bewertung neuer Blutzucker-Assays entwickelt [34] [35]. Hierbei werden drei Zonen (A bis C) der Messwertabweichung definiert. Das therapeutische Fenster, also der als sicher und wirksam betrachtete Konzentrationsbereich für Piperacillin, wurde auf 96 mg/l bis 240 mg/l festgelegt.

In Zone A wichen die Messungen nicht mehr als 20 % von der Referenzmessung ab. Zusätzlich lagen die Messwerte in Zone A nicht gleichzeitig unterhalb der unteren oder oberhalb der oberen Grenzwerte im Vergleich zum Referenzwert. In Bezug auf die Bestimmung von Blutglucose gilt eine Abweichung von 20 % als akzeptabel [36]. Trotz der Abweichung hätten die Messwerte in Zone A dieselbe klinische Konsequenz wie der Referenzwert gehabt. Die Messwerte in Zone B wichen um mehr als 20 % ab und führten aber zu keiner abweichenden therapeutischen Entscheidung. Bei einer hohen therapeutischen Breite für Piperacillin (Zielwert 96 bis 240 mg/l) ist zu beobachten, dass diese Abweichungen nicht zwangsläufig zu einer gegensätzlichen Dosisanpassungen führen. Dieser Ansatz sollte mögliche negative Folgen einer unveränderten Therapie minimieren und gegenläufige Anpassungen – etwa eine Dosiserhöhung bei bereits erhöhten Spiegeln – verhindern. Messungen in Zone C hätten hingegen zwangsläufig zu solchen Entscheidungen geführt und möglicherweise größeren Schaden für Patienten verursacht.

Zur Untersuchung der Testqualität wurden Sensitivität, Spezifität sowie positiver und negativer prädiktiver Wert mittels Vierfeldertafel für die Erkennung von Über- und Unterdosierungen durch den LFT gegen die HPLC-MS/MS bestimmte Piperacillin-Konzentration berechnet.

Ergebnisse goldbasierter LFT

Insgesamt wurden im Zeitraum zwischen November 2023 und September 2025 54 Patienten eingeschlossen. Die gesammelten Proben von 48 Patienten konnten verwendet werden und wurden auf die Kollektive zur Kalibration und zur Evaluation aufgeteilt. Die Proben von 9 Patienten wurden nicht geschlossen einem Kollektiv zugeordnet, sondern aufgeteilt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Referenzkonzentrationen zu erreichen. Insgesamt wurden 78 Proben von 30 Patienten zur Kalibration während der Entwicklung des LFA verwendet. Weitere 81 Proben von 27 Patienten wurden für Evaluation des LFT genutzt.

Für den entwickelten LFT ergaben sich eine Nachweisgrenze (Limit of Detection - LOD) von 2,0 mg/L und eine Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification - LOQ) von 10,2 mg/L.

In die Kalibration gingen 30 Patienten ein, 66,67 % (n = 20) der Patienten waren männlich und 33,33 % (n = 10) weiblich.

Mit der nach Bland und Altman [33] beschriebenen Methodik betrug der Bias zwischen der mit dem LFT gemessenen Konzentration ($\text{Piperacillin}_{\text{LFT}}$) und der mit dem Goldstandard HPLC-MS/MS gemessenen Konzentration ($\text{Piperacillin}_{\text{HPLC-MS/MS}}$) betrug $-0,5 \text{ mg/L}$. Die Standardabweichung lag bei $19,94 \text{ mg/L}$, woraus sich beim 1,96-fachen der Standardabweichung eine obere Übereinstimmungsgrenze von $38,53 \text{ mg/L}$ und eine untere Grenze von $-39,6 \text{ mg/L}$ ergab (Abbildung 7).

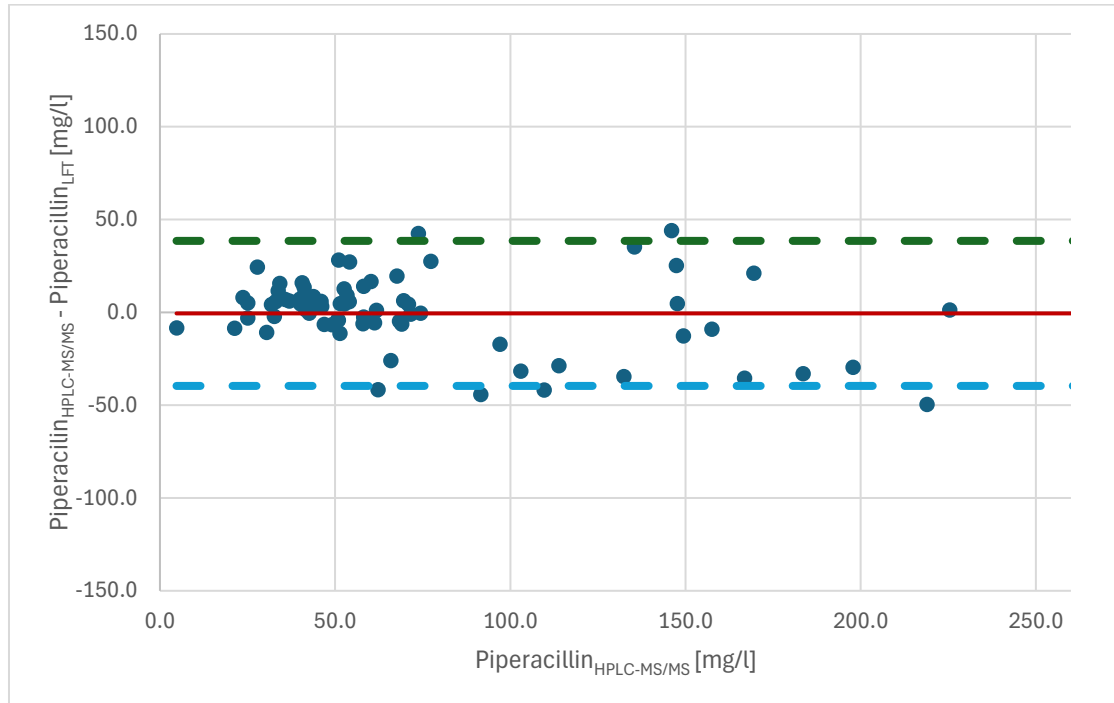


Abbildung 6: Bland-Altman Plot Piperacillin HPLC-MS/MS gegen LFT. Bias als (-) $-0,5 \text{ mg/l}$; SD $19,94 \text{ mg/l}$, damit $1,96 \times \text{SD}$ obere Übereinstimmungsgrenze (-) $38,53 \text{ mg/l}$ und untere Übereinstimmungsgrenze (-) $-39,6 \text{ mg/l}$.

In die Evaluation gingen 27 Patienten ein, 59,25 % ($n = 16$) der Patienten waren männlich und 40,75 % ($n = 11$) weiblich. Das Alter der Patienten war mit einem Durchschnittsalter von 71,25 Jahren zwischen 50 und 89 Jahre.

Die mittels HPLC-MS/MS bestimmten Piperacillinkonzentrationen der 81 untersuchten Proben betrug im Mittel $99,9 \text{ mg/l}$ ($\pm 61,1 \text{ mg/l}$). 46 der 81 Proben (56,8 %) zeigten dabei eine Piperacillinkonzentration unter 96 mg/dl (Unterdosierung), 3 der 81 Proben (3,7%) eine Piperacillinkonzentration über 240 mg/l (Überdosierung).

Mit der nach Bland und Altman [33] beschriebenen Methodik betrug der Bias zwischen der mit dem LFT gemessenen Konzentration ($\text{Piperacillin}_{\text{LFT}}$) und der mit dem Goldstandard HPLC-MS/MS gemessenen Konzentration ($\text{Piperacillin}_{\text{HPLC-MS/MS}}$) betrug $5,11 \text{ mg/L}$. Die Standardabweichung lag bei $42,47 \text{ mg/L}$, woraus sich beim 1,96-fachen der Standardabweichung eine obere Übereinstimmungsgrenze von $88,36 \text{ mg/L}$ und eine untere Grenze von $-78,14 \text{ mg/L}$ ergab (Abbildung 8).

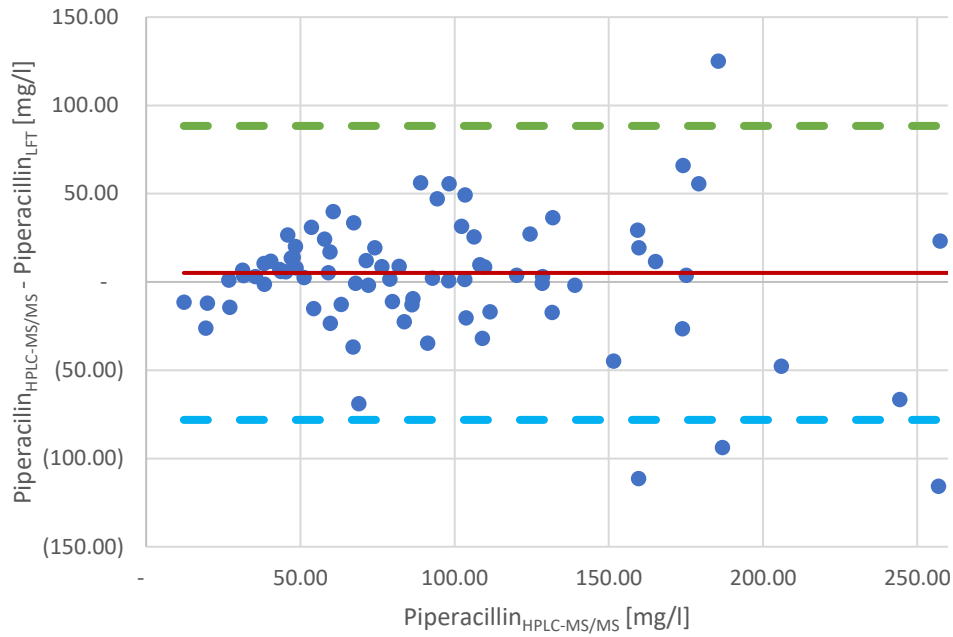


Abbildung 7: Bland-Altman Plot Piperacillin HPLC-MS/MS gegen LFT. Bias als (+) $+ 5,11$ mg/l; SD $42,47$ mg/l, damit $1,96 \times SD$ obere Übereinstimmungsgrenze (-) $88,36$ mg/l und untere Übereinstimmungsgrenze (-) $-78,14$ mg/l.

Keine der LFT-Messungen hätte zu einer entgegengesetzten falschen klinischen Entscheidung geführt. 72,8 % (n=59) der LFT-Messungen wichen nicht mehr als 20 % von den HPLC-MS/MS-Messungen ab. 27,2 % (n=22) wichen um mehr als 20 % ab, hätten jedoch nicht zu einer gegensätzlichen falschen Therapieentscheidung geführt (Abbildung 9).

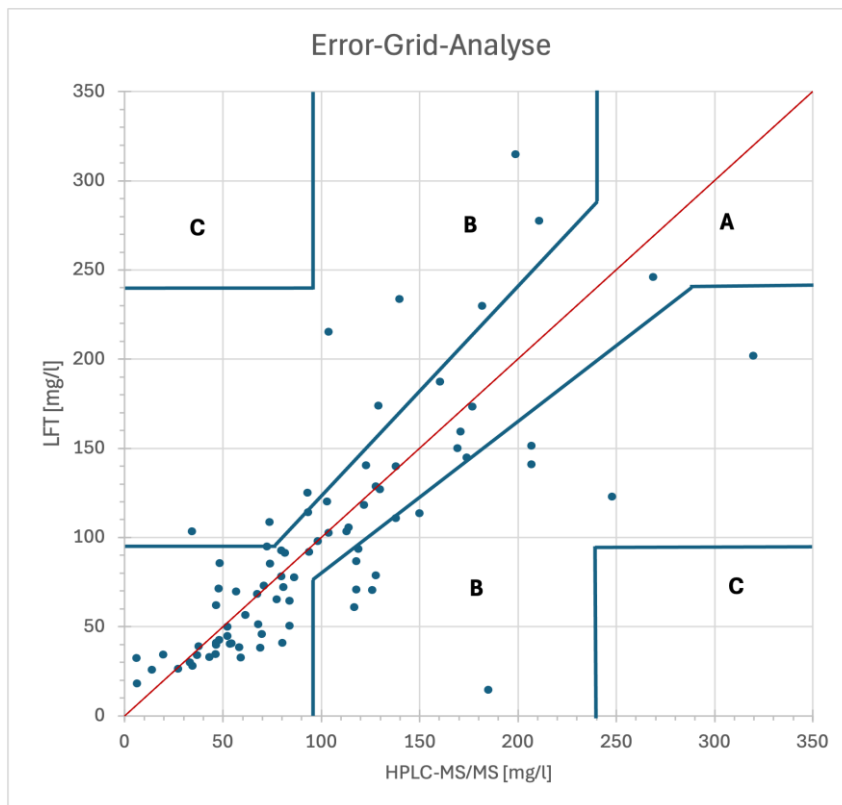


Abbildung 8: Error-Grid-Analyse [34]: Zone A: Abweichung $< 20\%$; Zone B: Abweichung $> 20\%$, aber keine therapeutische Fehlentscheidung; Zone C: therapeutische Fehlentscheidung.

Die Vierfeldertafeln zur Klassifikation der Proben nach unterdosierten (UD), normal dosierten (ND) und überdosierten (OD) Werten sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 dargestellt. Sensitivität, Spezifität sowie negativer und positiver prädiktiver Wert für die Detektion von Unter- und Überdosierungen wurden daraus berechnet und sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 6: Vierfeldertafel zur Detektion einer Unterdosierung (UD); UD = unterdosiert (< 96 mg/l), OD = überdosiert (> 240 mg/l), ND = normal dosiert

	UD_{LFT}	$ND_{LFT} + OD_{LFT}$	n
$UD_{HPLC-MS/MS}$	42	4	46
$ND_{HPLC-MS/MS} + OD_{HPLC-MS/MS}$	7	28	35

Tabelle 7: Vierfeldertafel zur Detektion einer Überdosierung (OD) UD = unterdosiert (< 96 mg/l), OD = überdosiert (> 240 mg/l), ND = normal dosiert

	OD_{LFT}	$ND_{LFT} + UD_{LFT}$	n
$OD_{HPLC-MS/MS}$	1	2	3
$ND_{HPLC-MS/MS} + UD_{HPLC-MS/MS}$	2	76	78

Tabelle 8: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert für die Detektion von Unter- und Überdosierung mit dem LFA basierend auf den Daten aus Tabelle 6 und Tabelle 7. PPV = positiver prädiktiver Wert, NPV = negativer prädiktiver Wert

	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	PPV [%]	NPV [%]
Detektion von Unterdosierung	91,3	80,0	85,7	87,5
Detektion von Überdosierung	33,3	97,4	33,3	97,4

Im Arbeitspaket 2.7.6 wurde der goldbasierte LFT an einem Patientenkollektiv zunächst kalibriert und an einem weiteren Patientenkollektiv hinsichtlich seiner Performance evaluiert. Der LFT selbst hat zusammen mit dem optischen Reader (Colibri, Nal von Minden, Göttingen) einen Aufbau, der in der Anwendung von Probenaufgabe zum Testergebnis grundsätzlich wenig aufwendig ist. Es bleibt zu beachten, dass die präanalytischen Schritte zur Hydroxylierung des Piperacillin erforderlich sind und die Testdurchführung aufwendiger machen. Verglichen mit dem Goldstandard der Piperacillin-Konzentrationsbestimmung mittels HPLC-MS/MS ist der apparative Aufbau, die Kosten der Methodik und der Personalaufwand eher geringer eingeschätzt.

Der Test wurde in einer prospektiven Observation an Patienten unter einer Piperacillin-Therapie auf einer Intensivstation evaluiert. Die beobachteten Werte zeigten für Piperacillin, dass die häufig eine Unterdosierung beschrieben wird (56,8%), einhergehend mit der Gefahr einer Resistenzinduktion bei den zu behandelnden Bakterien [1,11]. Dagegen stellt aufgrund der guten Verträglichkeit der Substanz und der damit einhergehenden hohen therapeutischen Breite eine Überdosierung ein geringeres Problem dar, nur 3,7% der beobachteten Konzentrationen lagen über dem Grenzwert von 240 mg/l.

Die Evaluation des LFT verglichen mit dem Goldstandard HPLC-MS/MS zeige im Bland-Altman-Plot einen geringen Bias von 5,11 mg/l aber eine Streuung der Messwerte (SD +/- 42,47 mg/l) mit einem oberen / unteren Übereinstimmungsbereich von 88,36 mg/l / -78,14 mg/l.

Die Ergebnisse der Error-Grid-Analyse deuten darauf hin, dass klinisch relevante Dosisanpassungen in die falsche Richtung bei Anwendung des LFA unwahrscheinlich sind. Dennoch zeigte ein erheblicher Anteil der Messungen (22 von 81, 27,2%) eine Abweichung von mehr als 20 % vom Goldstandard. Limitierend muss beachtet werden, dass die Error-Grid-Analyse ein Instrument zur Beurteilung von Blut-Glukose-Tests ist [37]. Die genutzten Grenzwerte vom max 20% Abweichung erscheinen dennoch rational. Selbst ein semi-quantitativer Piperacillin-Test zur Detektion von kritischen Unterdosierungen erscheint letztlich sinnvoll. In den untersuchten Proben lag nach HPLC-MS/MS Messungen in 46 von 81 Proben (56,8%) eine Konzentration < 96 mg/l vor. Diese Unterdosierung wurde mit dem LFT in 49 von 81 Proben (60,5%) detektiert, damit lag die Fehlerrate bei 3 von 46 Proben (6,5%) (Tabelle). Die klassische Zoneneinteilung der Error-Grid-Analyse [35] ermöglicht einerseits die Darstellung falscher klinischer Entscheidungen wie einer Dosisreduktion bei zu niedrigen Spiegeln oder umgekehrt; andererseits lassen sich Fehlentscheidungen im Sinne einer Fortführung einer falschen Dosierung bei Unter- oder Überdosierung nicht eindeutig identifizieren. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Proben (n = 3) mit erhöhten Wirkstoffspiegeln müssen die statistischen Kennzahlen zur Detektion von Überdosierungen mit Vorsicht interpretiert werden.

Zusammenfassend stellt der untersuchte gold-basierte LFT eine potenziell breit einsetzbare Methodik zur Erfassung von Piperacillin-Blutkonzentrationen mit eingeschränkter, aber nutzbarer Genauigkeit dar.

II.1.7 AP 2.7.7: Durchführung der Observationsstudie POC beta-Laktam-Antibiotika

Das Funktionsmuster B des Piperacillin Lateral Flow Test arbeitete mit einem Europium markierten Fluorophor im kompetitiven Lateral Flow Test. Die mit Europium (Eu) markierten Nanopartikel wurden unter einer Anregungswellenlänge von 368 nm angeregt. Für den kompetitiven Test wurde die Nitrocellulose-(NC)-Membran an der Testlinie mit Piperacillin-Antigen und an der Kontrolllinie mit Ziege-Anti-Maus-Antikörpern funktionalisiert. In diesem Format konkurriert der Analyt mit dem immobilisierten Antigen um die Bindungsstellen der Eu-markierten Antikörper, wodurch eine Signalintensität entsteht, die umgekehrt proportional zur Piperacillin-Konzentration ist. Das System wurde mit gepooltem humanem Serum validiert, das mit Piperacillin-Tazobactam (0–500 mg/L) versetzt war.

Kalibration

Zur Kalibrierung des Reader-LFT-Systems wurden Spektren des von Test- und Kontrolllinien gestreuten Lichts bei sechs Piperacillin-Konzentrationen (0, 10, 50, 100, 200 und 500 mg/L) aufgezeichnet, wobei pro Konzentration N = 10 Messungen durchgeführt wurden. Repräsentative Spektren für drei ausgewählte Konzentrationen sind in Abbildung 10 dargestellt. Jedes Spektrum weist zwei deutliche Peaks auf. Der erste Peak im Bereich von 600–630 nm stammt von der Fluoreszenzemission der Test- oder Kontrolllinie. Mit steigender Piperacillin-Konzentration nimmt die Fluoreszenz der Testlinie ab,

während der Kontrolllinien-Peak annähernd konstant bleibt, was mit dem kompetitiven Bindungsmechanismus des LFT übereinstimmt. Der zweite Peak im Bereich von 700–800 nm entsteht durch das Anregungslicht (Zentralwellenlänge 365 nm), das über Beugung zweiter Ordnung im zweiten Reader-Kanal detektiert wird. Variationen der Anregungspeak-Intensität an der Testlinie werden auf erhöhte Absorption von Anregungsphotonen zurückgeführt, sodass weniger Photonen zum Detektor reflektiert oder gestreut werden.

Die Nachweisgrenze (Limit of detection - LOD), definiert als Konzentration entsprechend dem Mittelwert des Leerwertsignals minus drei Standardabweichungen des Leerwerts, betrug 12,9 mg/L. Der Test zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten unter 5 % für Konzentrationen bis 100 mg/L und unter 1 % für Konzentrationen über 100 mg/L. Die erhöhte Variation bei niedrigen Konzentrationen entspricht den inhärenten Empfindlichkeitsgrenzen des LFT-Formats in diesem Bereich. Messungen nahe der Nachweisgrenze sind stärker anfällig für Hintergrundinterferenzen und stochastische Bindungsschwankungen, was zu höherer Variabilität führt [38]. Mehrere Ausreißer sind vermutlich auf Aufbaufehler zurückzuführen; insbesondere können die Auflösung der Translationsachse des Messkopfs und die Toleranzen des LFT-Kassettenhalters die gemessene Signalintensität beeinflussen.

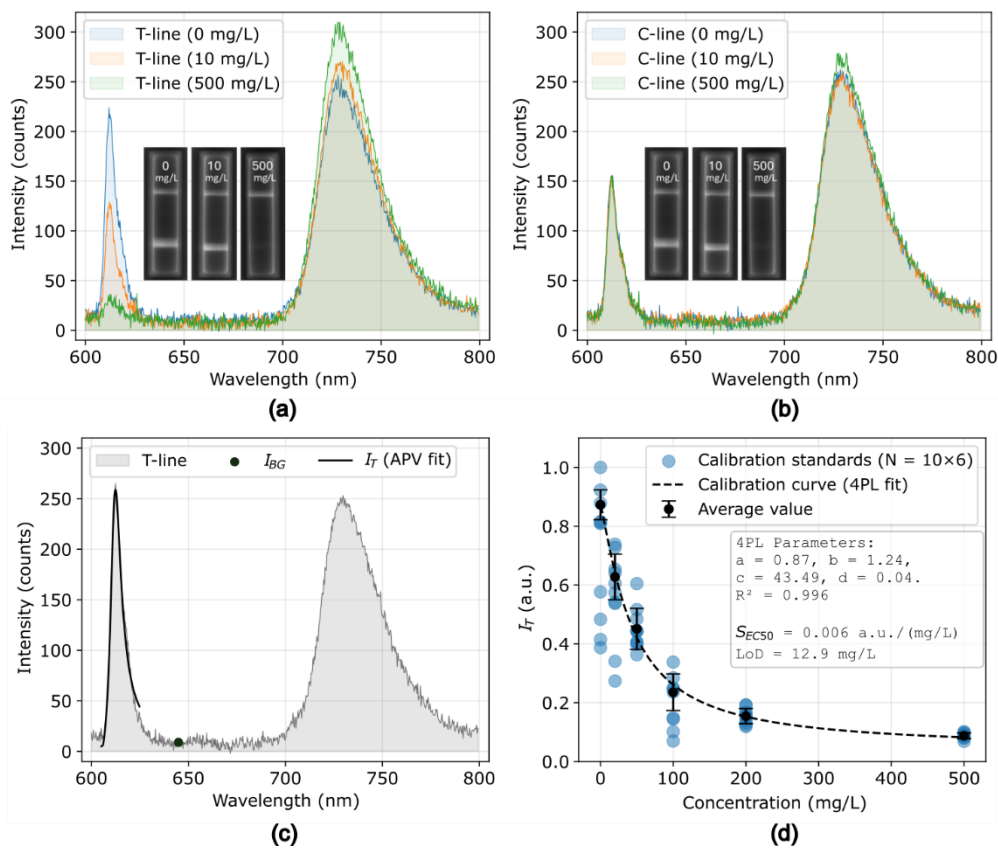


Abbildung 9: Kalibration des Fluoreszenzreaders mittels spektraler Messungen des von Test- und Kontrolllinien gestreuten Lichts bei sechs Piperacillin-Konzentrationen (0, 10, 50, 100, 200 und 500 mg/L, $N = 10$). (a, b) Repräsentative Spektren von Test- und Kontrolllinien bei drei ausgewählten Konzentrationen mit zwei Peaks: Fluoreszenzpeak (600–630 nm) und Anregungspeak (700–800 nm). (c) Gefittete Testlinien-Signalintensität mittels APV-Modell (Gl. (2)). (d) Einzelne Kalibrationsstandards (blaue Punkte), deren gemittelte Signalintensitäten (schwarze Punkte) sowie die resultierende Kalibrationskurve (Gl. (4)) mit 4PL-Beziehung ($R^2 = 0,996$). Die LOD betrug 12,9 mg/L.

Testevaluation an einem Realproben

Humane Serumproben (n = 10) wurden von sieben Patienten nach Einwilligung unter einem genehmigten institutionellen Protokoll gemäß dem Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Göttingen (13/7/23) gewonnen. Alle eingeschlossenen Patienten waren auf der Intensivstation der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Göttingen aufgenommen.

Für den LFT wurde Restblut aus einer Blutgasanalyse (Sanguin Counting GmbH, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die präanalytischen Schritte zielten auf eine Hydroxylierung des in der Probe enthaltenen Piperacillins ab. Die Blutproben wurden bei 3800 rpm für 10–15 Minuten zentrifugiert. Der Serumanteil wurde in 200 µL-Gefäße überführt. Zur künstlichen Hydroxylierung von Piperacillin wurden 200 µL einer 1 mM Natriumhydroxid-Lösung (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) versetzt. Die Mischung wurde mittels Vortex homogenisiert und für etwa 10 Sekunden bei 6000 rpm erneut zentrifugiert. Nach einem Intervall von fünf Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µL 1 M Essigsäure (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) gestoppt. Anschließend wurde die Mischung erneut homogenisiert. Der LFT wurde mit jeder vorbereiteten Probe in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Jeweils 100 µL der Probe wurden auf das Probenpad der Testkassette appliziert. Nach 10 Minuten erfolgte die Auswertung mit dem entsprechenden Fluoreszenz-Reader (FiSens GmbH, Braunschweig, Deutschland).

Die analytische Leistung des Reader-LFA-Systems wurde mit der Ultra-High-Performance-Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC-MS/MS, NexeraX2-LC-MS-8050, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) gekoppelt mit einem automatisierten Probenvorbereitungsmodul (CLAM-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) und LabSolutions-Software zur Analyse von Piperacillin-Spiegeln im humanen Serum nach Khromov et al. [32] verglichen. Insgesamt wurden zehn klinische Proben von sieben Patienten mit beiden Methoden analysiert. Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen, um die statistische Zuverlässigkeit zu erhöhen und die Variabilität zwischen LFAs zu bewerten. Ein Patient stellte zwei Proben (54.1 und 54.2), ein anderer drei Proben (34.2, 34.7 und 34.8), die an unterschiedlichen Tagen entnommen wurden. Die Proben wurden so ausgewählt, dass ein breites Konzentrationsspektrum abgedeckt wurde; mehrere Proben desselben Patienten waren daher zufällig und nicht geplant.

Die Messergebnisse sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Die gestrichelte Linie zeigt die Kalibrationskurve (Abschnitt 3.1), und grüne Quadrate mit Fehlerbalken geben die gemessenen Konzentrationen und Standardabweichungen (SD) der Triplikate an. Im Vergleich zur Labormethode zeigte das Reader-LFT-System eine hohe Pearson-Korrelation ($r = 0,95$) und einen mittleren absoluten Fehler von 22,9 mg/L (Abbildung 11b). Neun von zehn Proben ergaben eine positive Detektion, entsprechend einer analytischen und diagnostischen Sensitivität von 90 %. Eine Probe zeigte ein Signal von 1,054 a.u., oberhalb der oberen Asymptote der Kalibrationskurve; die inverse Berechnung lieferte daher eine ungültige Konzentration, was darauf hinweist, dass die Probe außerhalb des kalibrierten Bereichs lag. Die Referenzkonzentration dieser Probe betrug 0,5 mg/L und lag damit unterhalb der aus der Kalibration abgeleiteten LOD. Wie in Abbildung 11a gezeigt, nimmt die SD mit steigender Analytkonzentration ab, was eine höhere Assay-Sensitivität und geringere Messvariabilität bei höheren Konzentrationen widerspiegelt. Für Konzentrationen unter 100 mg/L war die SD der

Triplikatmessungen bis zu zehnfach höher als bei Konzentrationen über 100 mg/L, im Einklang mit den Kalibrationsdaten (Abbildung 10d).

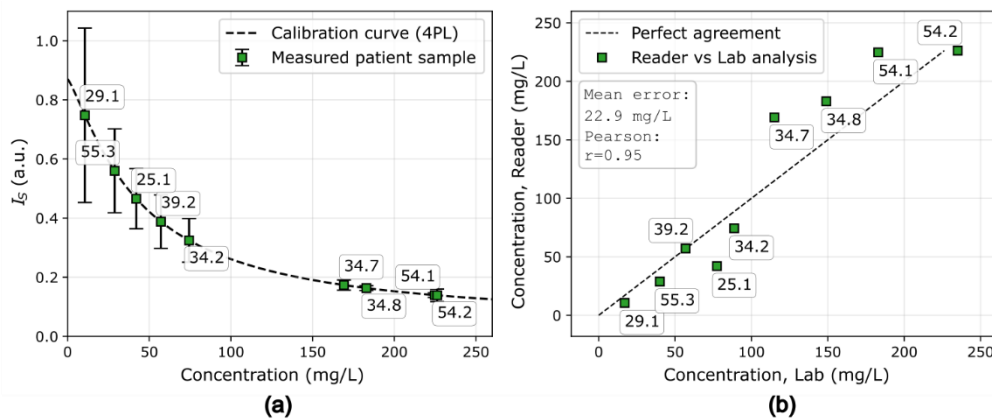


Abbildung 10: Analytischer Vergleich des Reader-LFT-Systems mit HPLC-MS/MS Referenzmethode für den Nachweis von Piperacillin in humanem Serum. (a) Kalibrationskurve und gemessene Konzentrationen (grüne Quadrate: Triplikate mit SD). (b) Korrelationsanalyse zwischen Reader-LFT- und HPLC-MS/MS Ergebnissen (Pearson- $r = 0,95$; mittlerer Fehler = 22,9 mg/L).

Zusammenfassend wurde mit dem Europium-basierten LFT mit Fluoreszenz-Reader ein portabler, kostengünstiger faseroptischer Fluoreszenz-Reader untersucht, der eine quantitative und multiplexfähige Analyse von Lateral-Flow-Tests am Point of Care ermöglicht. Mithilfe eines auf Europium-Nanopartikeln basierenden LFT erlaubte das System eine präzise Quantifizierung von Piperacillin in humanem Serum mit einer LOD von 12,9 mg/L und in dem untersuchten exemplarischen Patientenkollektiv mit 10 Proben eine starke Übereinstimmung mit etablierten Labormethoden. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial der faseroptischen Spektrometrie für schnelle, kosteneffiziente Diagnostik in klinischen und dezentralen Umgebungen. Weitere Arbeiten zur technischen Optimierung mit einer Reduktion der Nachweisgrenzen sind sinnvoll. Außerdem sollten sie sich auf die Erweiterung des Spektrums detektierbarer Analyte konzentrieren.

II.1.8 AP 2.7.8: Durchführung der Observationsstudie POC Zytokine

Ein zur Zytokinmessung geeigneter LFT lag zum Projektende nicht vor, so dass das vorliegende Probenmaterial nicht untersucht wurde.

II.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

II.2.1 Investitionsmittel

Die Summe der Investitionsmittel in dem Teilprojekt belief sich auf insgesamt 295.477,00 €. Die Aufwendungen erfolgten für die Anschaffung eines UHPLC-MS/MS Systems (Fa. Shimadzu, LC-Triple-Quadrupol-MS/MS LCMS-8060).

II.2.2 Sachmittel

Sachmittel wurden nicht verbucht.

II.2.3 Reisekosten

Aufgrund der regionalen Projektausrichtung wurden keine Reisekosten in Anspruch genommen.

II.2.4 Personalkosten

Die Personalkosten in dem Teilvorhaben belaufen sich auf insgesamt 282.981,53 € für die Projektlaufzeit.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das Ziel des Verbundprojektes, die Entwicklung eines Lateral Flow Test zur Bestimmung von Blutkonzentrationen von beta-Laktam-Antibiotika (therapeutisches Drugmonitoring) und Inflammationsparametern zur individualisierten Therapieanpassung bei Infektionserkrankungen hat eine hohe medizinische Relevanz. Die Reduktion des Zeitintervalls zwischen bettseitiger Probennahme und vorliegendem Messergebnis einer Bestimmung von beta-Laktam-Antibiotikakonzentrationen sowie die Reduktion von Prozesskosten haben das Potential für das Outcome relevante Therapieoptimierungen bei kritisch kranken Patienten zu ermöglichen.

Im Kern des Verbundprojektes stand der Aufbau eines multiplex-fähigen Lateral Flow Test Systems zur Untersuchung von Vollblutproben.

II.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Es ist in aus dem Teilprojekt keine direkte wirtschaftliche Verwertung durch UMG geplant gewesen.

Für die UMG ist durch das Teilprojekt aber ein erheblicher wissenschaftlicher Erkenntnisgewinn im Bereich therapeutisches Drugmonitoring von beta-Laktam-Antibiotika eingetreten. Die Ergebnisse werden gemeinsam mit Projektpartnern publiziert (under Review). Der daraus gewachsene wissenschaftliche Nutzen ist für zukünftige Projekte von hohem Potential.

II.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während des Projektzeitraums sind durch fortwährende Literaturrecherche und Austausch mit anderen Forschergruppen keine Erkenntnisse über relevante Fortschritte anderer auf diesem Gebiet bekannt geworden.

II.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

II.6.1 Erfolgte Tagungspublikationen

- -

II.6.2 Erfolgte Journalpublikationen

- -

II.6.3 Eingereichte Arbeiten (under review)

- Reimer, V, Ctistis G, Federov K, Guehlke P, Waltermann C, Al-Bar H, Theodoridis D, S Schröder P, Wackerbarth H, Perl T, Eickel I, Wagemann-Süss M, Streit F, Schippers W, Mehren A, Koch J. Fiber Optic Fluorescence Reader for Multiplex Point of Care Monitoring. Biomedical Optics Express (under review)

III Literaturverzeichnis

1. Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med* 2009; **37**: 840-51; quiz 59.
2. Brinkmann A, Rohr AC, Koberer A, et al. [Therapeutic drug monitoring and individual dosing of antibiotics during sepsis : Modern or just "trendy"?]. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 2016.
3. Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, et al. [Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Adult Patients with Nosocomial Pneumonia - Update 2017 - S3 Guideline of the German Society for Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, the German Society for Infectious Diseases, the German Society for Hygiene and Microbiology, the German Respiratory Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Radiological Society and the Society for Virology]. *Pneumologie* 2018; **72**: 15-63.
4. Streit F, Perl T, Schulze MH, Binder L. Personalised beta-lactam therapy: basic principles and practical approach. *Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine* 2016; **40**: 385-97.
5. Agency EM. Guideline on bioanalytical method validation, 2011.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed 18.10.2022/2022).
6. Nicolau DP. Pharmacodynamic optimization of beta-lactams in the patient care setting. *Crit Care* 2008; **12 Suppl 4**: S2.
7. Li C, Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Population pharmacokinetic analysis and dosing regimen optimization of meropenem in adult patients. *J Clin Pharmacol* 2006; **46**: 1171-8.
8. Li C, Du X, Kuti JL, Nicolau DP. Clinical pharmacodynamics of meropenem in patients with lower respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1725-30.
9. McKinnon PS, Paladino JA, Schentag JJ. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **31**: 345-51.
10. Tam VH, Nikolaou M. A novel approach to pharmacodynamic assessment of antimicrobial agents: new insights to dosing regimen design. *PLoS Comput Biol* 2011; **7**: e1001043.
11. Abdul-Aziz MH, Lipman J, Mouton JW, Hope WW, Roberts JA. Applying pharmacokinetic/pharmacodynamic principles in critically ill patients: optimizing efficacy and reducing resistance development. *Semin Respir Crit Care Med* 2015; **36**: 136-53.
12. Roberts JA, Abdul-Aziz MH, Lipman J, et al. Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions. *Lancet Infect Dis* 2014; **14**: 498-509.
13. Wong G, Brinkman A, Benefield RJ, et al. An international, multicentre survey of beta-lactam antibiotic therapeutic drug monitoring practice in intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1416-23.
14. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters., 2022.
<https://www.eucast.org/bacteria/clinical-breakpoints-and-interpretation/clinical-breakpoint-tables/> (accessed 18.01.2023/2023).
15. Roberts JA, Bellomo R, Cotta MO, et al. Machines that help machines to help patients: optimising antimicrobial dosing in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation and renal replacement therapy using dosing software. *Intensive Care Medicine* 2022; **48**: 1338-51.
16. Guilhaumou R, Benaboud S, Bennis Y, et al. Optimization of the treatment with beta-lactam antibiotics in critically ill patients-guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (Societe Francaise de Pharmacologie et Therapeutique-SFPT) and the French

- Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (Societe Francaise d'Anesthesie et Reanimation-SFAR). *Crit Care* 2019; **23**: 104.
17. Bendtsen MAF, Bue M, Hanberg P, et al. Flucloxacillin bone and soft tissue concentrations assessed by microdialysis in pigs after intravenous and oral administration. *Bone Joint Res* 2021; **10**: 60-7.
 18. Wallenburg E, Brüggemann RJM, Roberts JA, et al. A meta-analysis of protein binding of flucloxacillin in healthy volunteers and hospitalized patients. *Clinical Microbiology and Infection* 2022; **28**: 446.e1-.e7.
 19. Roger C, Louart B. Beta-Lactams Toxicity in the Intensive Care Unit: An Underestimated Collateral Damage? *Microorganisms* 2021; **9**.
 20. Imani S, Buscher H, Marriott D, Gentili S, Sandaradura I. Too much of a good thing: a retrospective study of beta-lactam concentration-toxicity relationships. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 2891-7.
 21. Derendorf H, Heinrichs T, Reimers T, Lebert C, Brinkmann A. Calculated initial parenteral treatment of bacterial infections: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *GMS Infect Dis* 2020; **8**: Doc17.
 22. Taccone FS, Laterre PF, Dugernier T, et al. Insufficient beta-lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Crit Care* 2010; **14**: R126.
 23. Pinder M, Bellomo R, Lipman J. Pharmacological principles of antibiotic prescription in the critically ill. *Anaesth Intensive Care* 2002; **30**: 134-44.
 24. Barza M, Weinstein L. Pharmacokinetics of the penicillins in man. *Clin Pharmacokinet* 1976; **1**: 297-308.
 25. Gatti M, Tedeschi S, Trapani F, et al. A Proof of Concept of the Usefulness of a TDM-Guided Strategy for Optimizing Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Target of Continuous Infusion Ampicillin-Based Regimens in a Case Series of Patients with Enterococcal Bloodstream Infections and/or Endocarditis. *Antibiotics (Basel)* 2022; **11**.
 26. Lovering AM, Pycock CJ, Harvey JE, Reeves DS. The pharmacokinetics and sputum penetration of ampicillin and amoxycillin following simultaneous i.v. administration. *J Antimicrob Chemother* 1990; **25**: 385-92.
 27. Tattevin P, Tribut O, Arvieux C, et al. Use of high-performance liquid chromatography (HPLC) to monitor beta-lactam plasma concentrations during the treatment of endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 76-9.
 28. Aubert G, Carricajo A, Coudrot M, Guyomarc'h S, Auboyer C, Zeni F. Prospective determination of serum ceftazidime concentrations in intensive care units. *Ther Drug Monit* 2010; **32**: 517-9.
 29. Abdul-Aziz MH, Alffenaar J-WC, Bassetti M, et al. Antimicrobial therapeutic drug monitoring in critically ill adult patients: a Position Paper#. *Intensive Care Medicine* 2020; **46**: 1127-53.
 30. Goncalves-Pereira J, Pova P. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of beta-lactams. *Crit Care* 2011; **15**: R206.
 31. Quinton MC, Bodeau S, Kontar L, et al. Neurotoxic Concentration of Piperacillin during Continuous Infusion in Critically Ill Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**.
 32. Khromov T, Dihazi GH, Brockmeyer P, Fischer A, Streit F. 24/7 Therapeutic Drug Monitoring of Beta-Lactam Antibiotics with CLAM-2000. *Antibiotics (Basel)* 2023; **12**.
 33. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; **1**: 307-10.
 34. Gough DA, Botvinick EL. Reservations on the use of error grid analysis for the validation of blood glucose assays. *Diabetes Care* 1997; **20**: 1034-6.
 35. Clarke WL. The original Clarke Error Grid Analysis (EGA). *Diabetes Technol Ther* 2005; **7**: 776-9.
 36. Cox DJ, Gonder-Frederick LA, Kovatchev BP, Julian DM, Clarke WL. Understanding error grid analysis. *Diabetes Care* 1997; **20**: 911-2.

37. Clarke WL, Anderson S, Farhy L, et al. Evaluating the clinical accuracy of two continuous glucose sensors using continuous glucose-error grid analysis. *Diabetes Care* 2005; **28**: 2412-7.
38. Quesada-Gonzalez D, Merkoci A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens Bioelectron* 2015; **73**: 47-63.