

# Sachbericht zum Verwendungsnachweis

## Teil I als Kurzbericht

Universität Witten/Herdecke mit dem Lehrstuhl für Mikrobiologie  
und Laboratoriumsmedizin

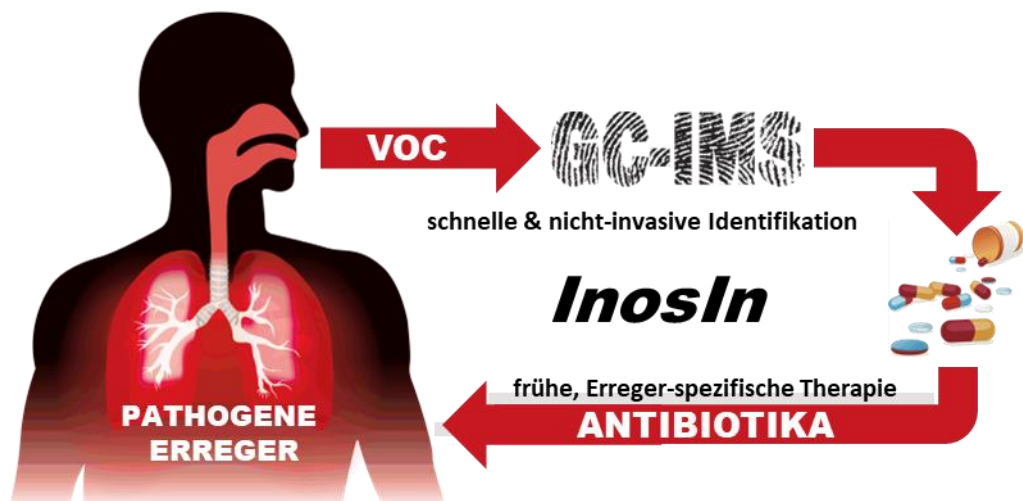
*Schnelle, nicht-invasive Identifikation nosokomialer Infektionen (InosIn)*

Verbundprojekt im Rahmen der Förderrichtlinie: *Innovative medizintechnische Lösungen zur Prävention und Versorgung nosokomialer Infektionen*



Lehrstuhl für Mikrobiologie und Laboratoriumsmedizin

Universität Witten/Herdecke  
Helios Universitätsklinikum Wuppertal - IML  
Heusnerstr. 40, 42283 Wuppertal  
Prof. Dr. med. Parviz Ahmad-Nejad  
Tel: 0202 896 2525



Förderkennzeichen: 13GW0428A

Berichtszeitraum: 01.03.2021 – 30.06.2024

## Projektziel und Ausgangslage

Das Forschungsprojekt **InosIn** (Innovative schnelle, nicht-invasive Identifikation nosokomialer Infektionen) hatte das Ziel, ein Verfahren zur schnellen und nicht-invasiven Erkennung von nosokomialen Erregern zu entwickeln, die Krankenhausinfektionen auslösen können. Grundlage hierfür war die Analyse mikrobiell erzeugter flüchtiger organischer Verbindungen (mVOCs) aus Bakterienkulturen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollten spezifische Nachweismethoden und Algorithmen entwickelt werden, die anschließend auf ihre Anwendbarkeit in der menschlichen Atemluft untersucht wurden. Ziel war es, eine zuverlässige und zeitnahe Diagnostik von nosokomialen Erregern zu ermöglichen.

Im Vergleich zu klassischen mikrobiologischen Methoden, die mehrere Tage beanspruchen, bietet der entwickelte Ansatz die Möglichkeit, Infektionen bereits in einem früheren Stadium zu erkennen. Dies ermöglicht eine gezielte, keimspezifische Therapie mit Antibiotika, verkürzt Krankenhausaufenthalte und entlastet das Gesundheitssystem signifikant.

## Analytische Methoden

Zur Umsetzung des Projektziels wurden zwei leistungsfähige analytische Systeme verwendet: die **Gaschromatographie-Ionenmobilitätsspektrometrie (GC-IMS)** und die **Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Ionenmobilitätsspektrometrie (TD-GC-MS-IMS)**. Die GC-IMS bietet ein mobiles und hochempfindliches Verfahren, um mVOCs in gasförmigen Proben zu detektieren. Dabei werden die Proben ionisiert, im elektrischen Feld beschleunigt und anhand ihrer spezifischen Wechselwirkungen mit einem Driftgas analysiert.

Ergänzend dazu wurde die TD-GC-MS-IMS-Technik eingesetzt, die eine Identifikation von Substanzen durch Kombination von thermischer Desorption, gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer/ionenmobilitätsspektrometrischer Detektion ermöglicht. Dieses stationäre System dient insbesondere der Validierung unbekannter Verbindungen, die in mobilen GC-IMS-Messungen detektiert werden. Dazu wurde ein mobiler Probenahmewagen aufgebaut, der eine fluss- und temperaturkontrollierte Entnahme gasförmiger Proben – etwa aus dem Kopfraum von Bakterienkulturen oder der Atemluft von PatientInnen – auf Thermodesorptionsröhrchen (TD-Tubes) ermöglicht. Der Probenahmewagen wurde modular gestaltet und ist vielseitig einsetzbar, sowohl für Laboruntersuchungen als auch für klinische Anwendungen im Krankenhaus.

## Untersuchungsdesign und Ablauf

Nach einer eingehenden Analyse wurden sechs nosokomiale Erreger für das Projekt ausgewählt: *Acinetobacter baumannii complex*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli*. Auf dieser Grundlage wurden Studienprotokolle für die Untersuchung von Bakterienkulturen und der Atemluft von PatientInnen entwickelt. Die Durchführung der PatientInnenstudien erfolgte nach Einholung eines Ethikvotums. Das Projekt war in zwei zentrale Phasen unterteilt: die Analyse der mVOCs aus Bakterienkulturen und die Untersuchung von Atemgasproben auf der Station.

## Analyse von Bakterienkulturen

Die Untersuchung der mVOCs aus Bakterienkulturen erfolgte durch Probenentnahme aus dem Kopfraum der Kulturplatten mit festem Agar. Hierfür kam ein speziell entwickelter Inkubator zum Einsatz, der die automatisierte Probenahme mit der mobilen GC-IMS-Technologie in regelmäßigen Zeitabständen ermöglichte. Die Wachstumskurven der sechs Zielerreger wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden bzw. 72 (*L. pneumophila*) Stunden in Mehrfachbestimmung aufgenommen. Ergänzend wurden mVOCs mit einem mobilen Probenahmewagen auf TD-Tubes gesammelt, um sie mittels TD-GC-MS-IMS an der Hochschule Hamm-Lippstadt detailliert zu analysieren. Hierfür wurde ein zweimal wöchentlicher Versand von TD-Tubes per Post zwischen Wuppertal und Hamm eingerichtet.

## **Atemluftanalysen**

Für die Atemluftanalysen wurden verschiedene Szenarien der Probenahme und geeignete Materialien evaluiert. Aufgrund organisatorischer Veränderungen auf der Pneumologie-Station des Helios Klinikums Wuppertal lag der Fokus schließlich überwiegend auf nicht-beatmeten PatientInnen, während einige wenige Proben von beatmeten PatientInnen genommen wurden. Die Atemluft wurde mithilfe von Probengasbeuteln entnommen, die aufgrund ihrer Flexibilität praktikabel, jedoch nicht beheizbar sind. Dies bringt das Risiko von Kondensationsverlusten mit sich, erwies sich jedoch unter den gegebenen Bedingungen vor Ort als die praktikabelste Lösung.

Die Proben wurden sowohl direkt mit dem mobilen GC-IMS als auch nachfolgend mittels TD-GC-MS-IMS analysiert. Von den zehn untersuchten PatientInnen wiesen zwei die Zielkeime auf, die auch erfolgreich mittels mVOC-Muster in der Atemluft nachgewiesen werden konnten. Eine Erweiterung der Studie auf eine größere PatientInnengruppe ist erforderlich, um die Zuverlässigkeit und Validität der Methode weiter zu bestätigen.

Im Helios Klinikum Wuppertal werden mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Probenentnahme je nach Verdacht und Erkrankung variiert, beispielsweise durch bronchoalveoläre Lavage oder Rachenabstriche bei Pneumonieverdacht. Die Proben werden im akkreditierten Institut für Medizinische Labordiagnostik (IML) nach standardisierten Verfahren bearbeitet, um pathogene Keime zu identifizieren und Resistenzen zu bestimmen. Im Projekt werden die anonymisierten Keimbefunde mit Atemluftanalysen verknüpft, um Zusammenhänge zwischen mikrobiologischen Ergebnissen und spezifischen Atemluftmarkern zu erforschen. Sämtliche Arbeiten erfolgen unter Einhaltung der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiliBÄK) und der DIN ISO 15189. Neben der Identifikation des Patientenkeims wurden auch die als Referenz genutzten Bakterienkulturen vorab auf das Vorhandensein des jeweiligen Keims überprüft und validiert.

## **Ergebnisse und Ausblick**

Zusammenfassend konnte eine umfangreiche mVOC-Datenbank mit potenzieller Relevanz für nosokomiale Infektionen, sowohl für das mobile GC-IMS, als auch für das Benchtop-System aus TD-GC-MS-IMS aufgebaut werden. Neben pathogen-spezifischen Verbindungen wurden auch Substanzen aufgenommen, die durch externe Einflüsse wie Ernährung, Umwelt-VOCs oder Materialausgasungen beeinflusst sein können.

Das Projekt konnte zeigen, dass die sechs untersuchten Keime charakteristische Stoffwechsellmuster aufweisen, die bereits nach wenigen Stunden in Bakterienkulturen eindeutig nachweisbar sind. Diese Muster wurden in einer Pilotstudie erfolgreich in der Atemluft zweier PatientInnen detektiert. Für eine abschließende Validierung sind jedoch umfangreichere Studien mit größeren PatientInnengruppen erforderlich.

Die im Projekt entwickelten Systeme – darunter der automatisierte Inkubator und die Probenahmeeinheiten – haben sich als zentrale Werkzeuge für reproduzierbare Analysen von Bakterienmetaboliten bewährt. Erste Ergebnisse weisen zudem darauf hin, dass das Verfahren das Potential bietet, schnell und nicht-invasiv nosokomialer Infektionen zu diagnostizieren.

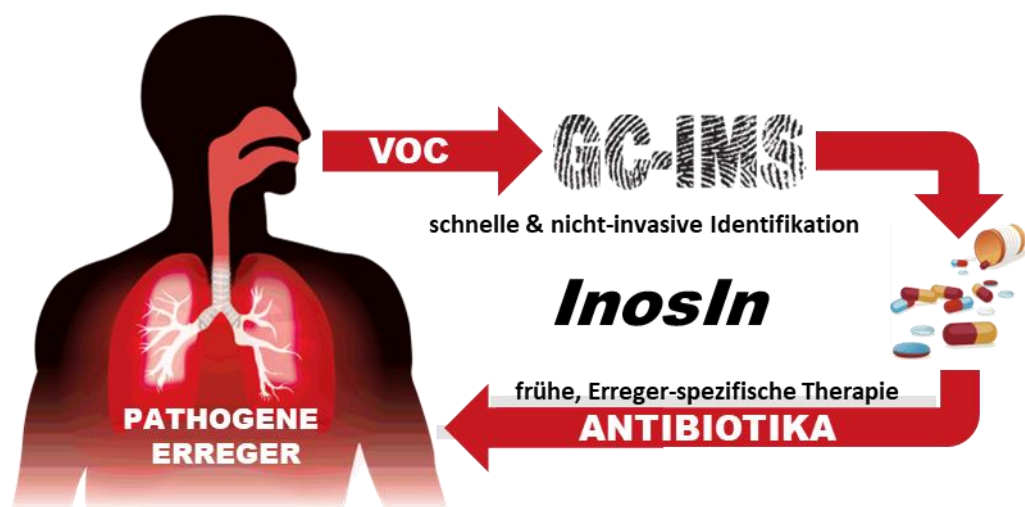
# Sachbericht zum Verwendungsnachweis Teil II als eingehende Darstellung

Universität Witten/Herdecke mit dem Lehrstuhl für  
Mikrobiologie und Laboratoriumsmedizin

Schnelle, nicht-invasive Identifikation nosokomialer Infektionen (InosIn)

Verbundprojekt im Rahmen der Förderrichtlinie: *Innovative medizintechnische Lösungen zur Prävention und Versorgung nosokomialer Infektionen*

  
Lehrstuhl für Mikrobiologie und Laboratoriumsmedizin  
Universität Witten/Herdecke  
Helios Universitätsklinikum Wuppertal - IML  
Heusnerstr. 40, 42283 Wuppertal  
Prof. Dr. Parviz Ahmad-Nejad  
Tel: 0202 896 2525



Förderkennzeichen:

13GW0428A

Berichtszeitraum:

01.03.2021 – 30.06.2024

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
2. Ergebnisse der Arbeitspakete .....	7
AP 1 Konzeption der Versuche und Studien .....	7
AP 1.1 Definition des Erregerpanels .....	7
AP 1.2 Literaturstudie zu Metaboliten und Autoinducern.....	7
AP 1.3 Studiendesign und Beantragung eines Ethik-Votums .....	8
AP 2 Entwicklung des Gesamtsystem für Kulturmessungen .....	9
AP 2.1 Definition der technischen Anforderungen an das Gesamtsystem .....	9
AP 2.2 Konfiguration des GC-IMS Demonstrators .....	9
AP 2.3 Entwicklung der Probenahme über Bakterienkulturen für GC-MS.....	10
AP 2.4 Aufbau einer GC-MS Substanzdatenbank.....	10
AP 3 Messung und Auswertung von Keimkulturen .....	12
AP 3.1 Aufnahme von Wachstumskurven.....	12
AP 3.2 Referenzanalytik mittels GC-MS.....	14
AP 3.3 Bestimmung der charakteristischen Muster .....	14
AP 3.4 Implementierung einer Datenbank .....	14
AP 3.5 Entwicklung der Auswertalgorithmen.....	15
AP 4 Entwicklung des Demonstrators für die Atemluftanalyse .....	16
AP 4.1 Konfiguration des GC-IMS Demonstrators .....	16
AP 4.2 Integration der Anreicherungseinheit .....	16
AP 4.3 Entwicklung der Atemluft-Probenahme für GC-MS .....	16
AP 5 Atemluftanalysen und Auswertung .....	17
AP 5.1 Atemluftanalysen mit GC-IMS.....	17
AP 5.2 Mikrobiologische Untersuchungen .....	17
AP 5.3 Analyse der Referenzproben mittels GC-MS.....	17
AP 5.4 Adaption der Auswertalgorithmen.....	18
AP 6 Validierung des Demonstrators im klinischen Alltag.....	18
AP 6.1 Atemluftanalysen mit GC-IMS.....	18
AP 6.2 Mikrobiologische Untersuchungen .....	18
AP 6.3 Validierung des Demonstrators .....	18
3. Zusätzlich durchgeführte Untersuchungen .....	19
4. Ausblick.....	21
Anhang .....	22
Anhang A - Studienprotokoll .....	22
Anhang B – Aufklärungsbogen.....	28
Anhang C – Einwilligungserklärung .....	32
Anhang D – Ethikantrag und -votum .....	33

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Arbeitspaket
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CAP	Community-acquired pneumonia - ambulant erworbene Pneumonie
DT	Drift-time - Driftzeit
GC	Gaschromatographie
HAP	Hospital-acquired pneumonia - nosokomiale Pneumonie
HSHL	Hochschule Hamm-Lippstadt
IML	Institut für medizinische Labordiagnostik
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
KbE	Koloniebildenden Einheiten
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Massenspektrometrie
mVOC	microbial Volatile Organic Compounds – mikrobiell flüchtige organische Verbindungen
MFC	Mass flow controller
MS	Massenspektrometrie
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis - Partielle Kleinste-Quadrate-Diskriminanzanalyse
qMS	Quadrupol-Massenspektrometer
RiliBÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen
T	Zeit in Stunden
TD	Thermodesorption
VAP	Ventilator-associated pneumonia - beatmungs-assoziierten Pneumonie

# 1. Einleitung

Krankenhauserworbene Infektionen, auch nosokomiale Infektionen genannt, stellen im stationären Sektor eine erhebliche Problematik dar, indem sie die Sterblichkeitsrate erhöhen, die Aufenthaltsdauer der Patienten verlängern und die Behandlungskosten deutlich ansteigen lassen. Diese Problematik übt einen erheblichen sozioökonomischen Druck aus. Diese Infektionen, die erst während oder nach einem Krankenhausaufenthalt auftreten und zum Zeitpunkt der Einlieferung noch nicht vorhanden oder im Inkubationsstadium waren, betreffen sowohl die PatientInnenschaft als auch das medizinische Personal.

Insbesondere nosokomiale Pneumonien stehen als führende Todesursache im Zusammenhang mit Krankenhausinfektionen im Fokus, charakterisiert durch Infektionen der unteren Atemwege bzw. Lungenentzündungen und untergliedert in drei Hauptkategorien:

- ❖ Community-acquired pneumonia (CAP), entspricht der ambulant erworbenen Pneumonie: Ambulant erworbene Pneumonien, die außerhalb des Krankenhausumfelds auftreten und insbesondere immungeschwächte Personen oder Personen mit Vorerkrankungen betreffen.
- ❖ Hospital-acquired pneumonia (HAP), entspricht der nosokomialen Pneumonie: Krankenhauserworbene Pneumonien, die erst nach mindestens 72 Stunden im Krankenhaus manifest werden und meist mit einer längeren Verweildauer und schlechteren Prognose verbunden sind.
- ❖ Ventilator-associated pneumonia (VAP), entspricht der beatmungs-assoziierten Pneumonie: eine spezielle Art der krankenhauserworbenen Pneumonie, die bei PatientInnen auftritt, die über einen längeren Zeitraum künstlicher Beatmung unterzogen wurden. Diese Pneumonieform ist besonders kritisch, da sie nicht nur eine hohe Sterblichkeitsrate aufweist (13 %), sondern auch die Krankenhausverweildauer signifikant verlängert (um 6 bis 9 Tage).

Das zentrale Hindernis in der Behandlung dieser Pneumonien ist die verzögerte Erkennung des verantwortlichen Pathogens, was ohne den Einsatz mikrobiologischer Diagnoseverfahren oder der Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ungemein erschwert wird. Das Forschungsprojekt InosIn zielt darauf ab, durch Analyse mikrobieller flüchtiger organischer Verbindungen (mVOCs) aus der menschlichen Atemluft, eine frühzeitige und erregerspezifische Behandlung zu ermöglichen (s. Abb. 1).

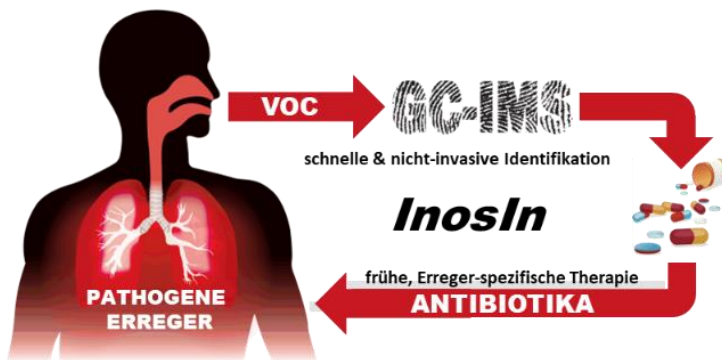


Abbildung 1: Logo des Forschungsprojektes InosIn (schnelle, nicht-invasive Identifikation nosokomialer Infektionen).

Der Einsatz eines Ionenmobilitätsspektrometers in Kombination mit einer gaschromatographischen Vortrennung (GC-IMS) wurde für diese spezifische Anwendung entwickelt und optimiert. Parallel wurde ein System der Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TD-GC-MS) etabliert, das durch die Installation eines IMS als sekundären Detektor über einen Flow Splitter in derselben Flusslinie verstärkt wird (TD-GC-MS-IMS). Diese Kopplung wurde in der Fachliteratur bisher noch nicht beschrieben und stellt eine Innovation im Bereich der Diagnostik nosokomialer Infektionen dar.

Das Projektziel war die Entwicklung einer Diagnosemethode, ergänzend zur klassischen mikrobiologischen Diagnostik, die sowohl in der bakteriellen Kultur als auch direkt in der Atemluft von PatientInnen anwendbar ist, um Infektionen frühzeitig erkennen und eine gezielte Behandlung ermöglichen zu können. Die Methodenkombination aus

empfindlichen und schnellen mobilen GC-IMS und TD-GC-MS-IMS, welches bei der Identifizierung unbekannter mVOCs unterstützt, bietet einen innovativen Ansatz zur Lösung des beschriebenen medizinischen Problems.

### **Technologischer Ansatz**

Die GC-IMS stellt ein effizientes und hochsensitives Analyseinstrument zur Detektion von mVOCs dar. Ein signifikanter Vorzug dieses Verfahrens ist neben der hohen Mobilität des Systems, insbesondere die geringe erforderliche Analysezeit im Minutenbereich sowie dessen Empfindlichkeit bis in den Bereich von Parts per Trillion (pptV). Im Rahmen dieses Prozesses erfolgt die Ionisierung der gasförmigen Probensubstanzen, welche anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Die Trennung und Detektion der Moleküle basieren auf deren Interaktionen mit einem Driftgas, wobei die spezifische Form und Größe der Moleküle ausschlaggebend sind.

Als komplementäres Verfahren kam die TD-GC-MS-IMS zum Einsatz, welche die Untersuchung gasförmiger Proben nach deren thermischer Desorption und gaschromatographischer Separation durch massenspektrometrische Identifizierung ermöglicht. Diese Methode zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, unbekannte chemische Verbindungen auf Basis charakteristischer Massenspektren zu identifizieren. Die parallel laufenden IMS-Messungen bieten außerdem den Vorteil, die Ergebnisse mittels einer ketonbasierten Korrelation mit den Ergebnissen des mobilen GC-IMS zu vergleichen. Aufgrund der stationären Beschaffenheit und damit einhergehenden mangelnden Mobilität, erfolgte die Entwicklung eines modularen und flexibel einsetzbaren Probenahmewagens. Dieser ermöglicht eine kontrollierte Probenahme gasförmiger Substanzen unter definierten Temperatur- und Flussbedingungen direkt auf Thermodesorptionsröhrchen (TD-Tubes), beispielsweise aus dem Headspace über Bakterienkulturen oder aus der Atemluft von PatientInnen. Durch sein modulares Design lässt sich der Probenahmewagen sowohl in labortechnischen als auch in klinischen Settings innerhalb des Krankenhausumfeldes einsetzen.

### **Projektablauf und Methodik**

Das primäre Ziel des vorliegenden Projekts war die Entwicklung und Implementierung einer innovativen Methode, die eine frühzeitige Identifikation von nosokomialen Pathogenen durch die Detektion charakteristischer Metaboliten (mVOCs) gewährleistet. Zu diesem Zweck erfolgte die Konstruktion eines spezialisierten GC-IMS-Demonstrators, der gezielt für die Erfassung bakterieller Metaboliten optimiert wurde. Diese Vorgehensweise umfasste die Optimierung der Gaschromatographie-Säule sowie die Konzeption eines flexibel anwendbaren Probenentnahmesystems, das speziell für die Untersuchung von mikrobiellen Kulturen ebenso wie für die von menschlicher Atemluft ausgelegt wurde.

In einer initialen Phase wurden spezifische Metabolite von sechs ausgewählten Erregern, die nosokomiale Pneumonien verursachen, in bakteriellen Kulturen genauer betrachtet. Dabei wurden mittels systematischer Erfassung der mVOC-Emissionen im Headspace der Kulturmedien die Wachstumskurven dieser Metaboliten dokumentiert. Die Auswertung dieser Daten ermöglichte es, spezifische Muster zu ermitteln, die eine gezielte Identifikation der entsprechenden Erreger zulassen. Zudem wurden parallel TD-GC-MS-IMS-Analysen durchgeführt, um unbekannte mVOCs zu charakterisieren und dadurch die Datenbasis für das GC-IMS zu erweitern. In der darauffolgenden Phase lag der Fokus darauf, die etablierte Methodik erfolgreich auf die Analyse menschlicher Atemluft zu übertragen. Hierzu wurden Anpassungen sowohl am GC-IMS- als auch am TD-GC-MS-Probenahmesystem vorgenommen, um eine effiziente Beprobung von Atemluftproben sicherzustellen. Das angestrebte Ziel bestand darin, die Erkenntnis zu verifizieren, dass die zuvor in Bakterienkulturen identifizierten Metabolitmuster ebenfalls in der menschlichen Atemluft zu detektieren sind und somit Rückschlüsse auf das Vorhandensein spezifischer Pathogene ermöglichen. Eine graphische Übersicht des projektbezogenen Untersuchungsprozesses ist in Abbildung 2 dargestellt.

### **Herausforderungen und Zusammenarbeit**

Trotz konfrontierter Herausforderungen, darunter signifikante Verzögerungen im Prozess der Personalakquisition, der Verlust einer essenziellen Schlüsselperson des Projekts sowie die durch die COVID-19-Pandemie bedingten Einschränkungen, wurde die erfolgreiche Realisierung der Projektziele erreicht. Die Implementierung wöchentlicher Treffen innerhalb des Konsortiums erwies sich als entscheidend für die Ermöglichung eines kontinuierlichen wissenschaftlichen Dialogs und trug maßgeblich zur effektiven Lösung emergenter Problemstellungen bei. Diese

intensive kollaborative Interaktion zwischen den Partnerinstitutionen führte nicht nur zur Vollendung der definierten Zielvorgaben, sondern auch zu Ergebnissen, die über die ursprünglichen Erwartungen hinausgingen.

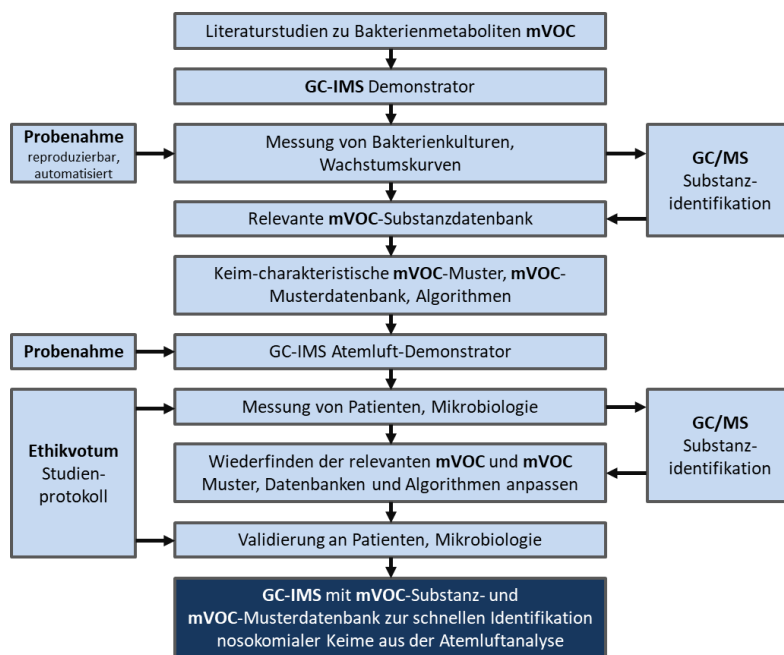


Abbildung 2: Das Ablaufschema der im InosIn-Projekt durchgeführten Arbeiten.

In Abbildung 3 wird der ursprüngliche Plan der Arbeitspakete mittels eines Gantt-Diagramms veranschaulicht. Der festgesetzte Zeitplan wurde im Großen und Ganzen beibehalten, was die Durchführung des Projekts nach einer kostenneutral genehmigten Verlängerung um vier Monate zu einem erfolgreichen Abschluss brachte. In den folgenden Abschnitten erfolgt eine detaillierte Darlegung der Ergebnisse, die innerhalb der einzelnen Arbeitspakete erzielt wurden.

		2021												2022												2023												2024	
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2		
AP	Task	Titel																																					
1	<b>Konzeption der Versuche und Studien</b>																																						
	1	Definition des Erregerpanels																																					
	2	Literaturstudie zu Metaboliten und Autoinducern																																					
	3	Studiendesign und Beantragung eines Ethik-Volums																																					
2	<b>Entwicklung des Gesamtsystems für Kulturmessungen</b>																																						
	1	Definition der technischen Anforderungen an das Gesamtsystem																																					
	2	Konfiguration des GC-IMS Demonstrators																																					
	3	Entwicklung der Probenahme über Bakterienkulturen für GC/MS.																																					
	4	Aufbau einer GC/MS Substanzdatenbank																																					
3	<b>Messung und Auswertung von Keimkulturen</b>																																						
	1	Aufnahme von Wachstumskurven																																					
	2	Referenzanalytik mittels GC/MS																																					
	3	Bestimmung der charakteristischen Muster																																					
	4	Implementierung einer Datenbank																																					
	5	Entwicklung der Auswertalgorithmen																																					
M	<b>1</b>	<b>Metabolitmuster und Auswertalgorithmus zur Keimidentifikation an Kulturen</b>																																					
4	<b>Entwicklung des Demonstrators for die Atemluftanalyse</b>																																						
	1	Konfiguration des GC-IMS Demonstrators																																					
	2	Integration der Anreicherungs einheit																																					
	3	Entwicklung der Atemluft-Probenahmen für GC/MS																																					
5	<b>Atemluftanalysen und Auswertung</b>																																						
	1	Atemluftanalysen mit GC-IMS																																					
	2	Mikrobiologische Untersuchungen																																					
	3	Analyse der Referenzproben mittels GC/MS																																					
	4	Adaption der Auswertalgorithmen																																					
6	<b>Validierung des Demonstrators im klinischen Alltag</b>																																						
	1	Atemluftanalysen mit GC-IMS																																					
	2	Mikrobiologische Untersuchungen																																					
	3	Validierung des Demonstrators																																					
M	<b>2</b>	<b>Demonstrator mit Metabolitmuster und Auswertalgorithmus zur Keimidentifikation aus der Atemluft.</b>																																					

Abbildung 3: Ursprünglich vorgesehene Ablauf der Arbeitspakete des InosIn-Projektes in Form eines Gantt-Charts

## 2. Ergebnisse der Arbeitspakete

### AP 1 Konzeption der Versuche und Studien

#### AP 1.1 Definition des Erregerpanels

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: HSHL und die ION-GAS

Zu Beginn des Vorhabens wurde ein Erregerpanel bestehend aus sechs Pathogenen definiert, das *Acinetobacter baumannii complex*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila* und *Serratia marcescens* umfasste. Im Zuge der Projektentwicklung und in Abstimmung mit der neuen Projektleitung am Institut für Mikrobiologie und Labormedizin (IML), vertreten durch Fr. Dr. Petersdorf, erfolgte eine Revision dieses Panels. Das finale Panel setzt sich nun wie folgt zusammen:

- ❖ *Acinetobacter baumannii complex* (HAP)
- ❖ *Escherichia coli* (HAP)
- ❖ *Legionella pneumophila* (HAP & CAP)
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa* (HAP)
- ❖ *Staphylococcus aureus* (HAP) und
- ❖ *Streptococcus pneumoniae* (HAP)

Die Ursprungserreger *Bordetella pertussis* und *Serratia marcescens* wurden aus dem Panel entfernt, da deren kultureller Nachweis am IML nicht etabliert ist und diese in der Routine nicht herangezogen werden. *Haemophilus influenzae* wurde ausgeschlossen, da der Fokus des Projekts nicht auf CAP-Erregern lag.

#### AP 1.2 Literaturstudie zu Metaboliten und Autoinducern

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: HSHL und die ION-GAS

In diesem Forschungsvorhaben wurde eine umfassende Literaturrecherche bezüglich Metaboliten und Autoinducern durchgeführt, um eine spezifische Datenbank zu generieren, die eine zentrale Ressource für die Erreichung der Projektziele darstellt. Diese systematische Recherche erfolgte in Zusammenarbeit zwischen der Hochschule Hamm-Lippstadt (HSHL) und der ION-GAS GmbH, wobei ein breites Spektrum sowohl frei zugänglicher als auch abonnementbasierter Datenbanken und Literatursuchdienste genutzt wurde. Hierzu zählten Plattformen wie ChemSpider, PubMed, Google Scholar, mVOC 2.0 und SciFinder.

Die Recherche erfolgte unter Verwendung spezifischer Suchbegriffe, die auf die Projektziele abgestimmt wurden. Dazu zählten Begriffe wie „Ionenmobilitätsspektrometrie“, „Gaschromatographie“, „Thermodesorption“, „Massenspektrometrie“, „mikrobiell flüchtige organische Verbindungen (mVOC)“, „VOC“, „Metabolite“ und „Autoinducer“. Zusätzlich wurden die im Erregerpanel definierten Keime in die Suchanfragen einbezogen (siehe AP 1.1). Die Begriffe wurden in deutscher und englischer Sprache sowie in verschiedenen Kombinationen eingesetzt, um ein möglichst breites Spektrum an relevanter Fachliteratur zu erfassen.

Ausgehend von den gefundenen Literaturstellen wurden die darin zitierten Publikationen auf ihre Relevanz überprüft und gegebenenfalls in die Analyse aufgenommen. Ziel war es, ein möglichst vollständiges Bild der Metaboliten und Autoinducer zu erhalten, die für die Zielkeime des Projekts von Bedeutung sind. Die identifizierten Substanzen wurden in einer eigens erstellten Datenbank systematisiert, die durch drei übergeordnete Kategorien strukturiert ist:

- ❖ Mikrobiologische Informationen: Erreger, mVOC/Autoinducer, Stamm, Kulturmedium, Kulturbedingungen
- ❖ Substanzinformationen: CAS-Nummer, Protonenaffinität, Ionisierungsenergie, Molmasse, Siedetemperatur
- ❖ Analytik: Messsystem, Probenahme und -bedingungen

Insgesamt konnten 214 potenziell relevante Substanzen identifiziert werden, die in der Literatur als Metaboliten oder

Autoinducer der untersuchten Keime beschrieben sind. Von diesen Substanzen spielen insbesondere die folgenden chemischen Klassen eine zentrale Rolle: Aldehyde, Ketone, Alkohole, und gesättigte und ungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe.

Von den 214 identifizierten Substanzen sind 38 bereits als Referenzstandards im Labor der HSHL verfügbar. Dies ermöglicht eine gezielte Validierung der Substanzen und erleichtert die Erweiterung der GC-IMS-Datenbank. Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt der aufgebauten Datenbank.

Mikrobiologische Information				Substanzinformation				
mVOC/Autoinducer	Stamm	Kulturmedium	Kulturbedingungen	CAS	PA <sup>a</sup>	IE <sup>b</sup>	M <sup>c</sup>	Sdp <sup>d</sup>
1,2-Butadien	ATCC 19606	Mueller Hinton broth (MH) and tryptic soy broth (TSB), liquid	37°C für 2/4/24 h	590-19-2	778,9	9,23	54,09	10,7±3,0

Analytik								
Messsystem	Probenahme	Probenahmebed.	Probenaufgabe	Säule	T.-programm	Trägergas	Detektion	Quelle
GC-MS	SPME-HS	HS 70°C, divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 30 min	Each bottle was placed on a stirring heater at 70°C, and a SPME syringe containing a DVB/CAR/ PDMS coated fiber was suspended at the top of the bottle for 30 min	DB-5 column (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	50 °C, 10 °C/min to 250 °C	Helium, 1.1 ml/min	Quadrupole ion trap, IE 70 eV.	Karami et al 2017( <a href="https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.2.18">https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.2.18</a> )

Abbildung 4: Ausschnitt der etablierten Datenbank aus der Literaturrecherche. Beispielhaft wurde 1,2-Butadien ausgewählt und anhand der drei Kriterien Mikrobiologische Information, Substanzinformation und Analytik beschrieben.

### AP 1.3 Studiendesign und Beantragung eines Ethik-Votums

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: HSHL und die ION-GAS

Das Studiendesign, der Patientenaufklärungsbogen und der Ethikantrag mit -votum (s. Anhang A-D), wurden durch personelle Veränderungen beim Partner IML verzögert. Nach dem plötzlichen Versterben von B. Ghebremedhin im Dezember 2021 übernahm Frau Dr. Petersdorf die Weiterentwicklung des Studiendesigns und die Beantragung des Ethikvotums. Trotz der Verzögerungen lag das Ethikvotum rechtzeitig vor, sodass die Patientmessungen planmäßig ab April 2023 gegen Ende der Projektlaufzeit starten konnten.

## AP 2 Entwicklung des Gesamtsystem für Kulturmessungen

### AP 2.1 Definition der technischen Anforderungen an das Gesamtsystem

s. AP 2.2

### AP 2.2 Konfiguration des GC-IMS Demonstrators

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML, HSHL

In der Planungsphase des Projekts wurden umfassende Anforderungen für das Gesamtsystem des mobilen GC-IMS festgelegt, die sowohl für die Durchführung von Kulturmessungen als auch für Atemluftanalysen in der späten Projektphase relevant sind. Diese Anforderungen wurden durch technische Machbarkeitsstudien ermittelt und in Gesprächen mit Experten sowie interdisziplinären Teams präzisiert. Zu den essenziellen Spezifikationen zählte die Verwendung von Tritium für die Ionisation, das aufgrund einer Aktivität von 100 MBq unter der gesetzlich festgelegten Freigrenze liegt und somit den Verzicht auf eine spezielle Umgangsgenehmigung ermöglicht. Des Weiteren wurde Wert daraufgelegt, dass alle prozessrelevanten Komponenten, einschließlich der Probenahmeinheit mit ihrer beheizbaren Probenschleife und des Detektors, auf bis zu 100°C beheizt werden können, um Memoryeffekte zu vermeiden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Integration einer spezifisch abgestimmten und beheizbaren GC-Säule, die bis zu einer Temperatur von 80°C betrieben werden kann, um die Selektivität des Systems zu steigern. Gleichzeitig sollte das System durch die Implementierung einer Stoffdatenbank erweitert werden können, was die Einmessung zusätzlicher Substanzen und somit eine fortlaufende Erweiterung der Datenbank ermöglicht. Luft als intern gefiltertes Trägergas ermöglicht den Verzicht auf externe Gasversorgung und fördert die Mobilität des Systems. Die Fähigkeit, im positiven und negativen Hochspannungsmodus zu operieren, ermöglicht die Erfassung sowohl positiver als auch negativer Ionen, was die analytische Flexibilität des Geräts erheblich verbessert. Für den mobilen Einsatz wurde ein Akkubetrieb umgesetzt, der den kurzfristigen ortsunabhängigen Betrieb des Geräts ermöglicht.

Die Konzeption eines Triggermodus zur externen Steuerung und Automatisierung der Messabläufe, sowie die Option für die Integration eines In-line-Anreicherungschips, wurden ebenfalls als grundlegende Anforderungen definiert. Alle diese Spezifikationen wurden in enger Zusammenarbeit mit der STEP GmbH (Pockau) bei der Gerätekonfiguration berücksichtigt und durch zusätzliche interne Anpassungen bei der ION-GAS GmbH ergänzt. Das Ergebnis war die Entwicklung eines mobilen GC-IMS-Systems, das den Anforderungen an Kulturmessungen und den vorgesehenen Atemluftanalysen gerecht wird.

Zusätzlich wurden im Zuge der Systementwicklung spezielle Überlegungen zu Sicherheitsaspekten und Materialauswahl getroffen. In Kooperation mit der Forschungsgruppe des Instituts für Atemgasanalyse in Innsbruck, geleitet von Dr. Ruzsanyi, wurden geeignete Aerosolfilter für Bakterien und Viren ausgewählt. Zudem wurden die Protokolle für die Desinfektion des Gesamtsystems, insbesondere für den Umgang mit pathogenen Erregern, in Abstimmung mit dem IML und der HSHL entwickelt. Diskussionen mit der mechanischen Großwerkstatt der HSHL führten zur Auswahl der passenden Materialien für die Probenahmeinheit, welche mittels CAD-Technologie konstruiert und gefertigt wurde. Diese umfangreichen und detailorientierten Vorarbeiten spielten eine wesentliche Rolle in der erfolgreichen Entwicklung des Demonstrators und legten den Grundstein für die Anwendung in den späteren Phasen des Projekts (s. Abb. 5). Die durchgeführten Arbeiten in den Arbeitspaketen 2.1 und 2.2 flossen direkt in die erfolgreiche Entwicklung des Demonstrators ein und bildeten eine zentrale Grundlage für die geplanten Anwendungen in späteren Projektphasen.



Abbildung 5: Mobiles GC-IMS nach den Anforderungen aus AP 2.1

## AP 2.3 Entwicklung der Probenahme über Bakterienkulturen für GC-MS

Verantwortlicher: HSHL, Kollaborator: IML, ION-GAS

Das Ziel des betreffenden Arbeitspakets war die Entwicklung und Optimierung einer Probenahme- und Analysenmethode zur Identifizierung flüchtiger Metaboliten aus Bakterienkulturen unter Einsatz der Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Ein initialer Schritt in diesem Prozess bestand in der Implementierung eines TD-GC-MS Systems an der HSHL. Der Einsatz der Thermodesorptionstechnik war insbesondere aufgrund der Notwendigkeit gegeben, Proben vom Standort Wuppertal zum Analyseort Hamm zu transportieren. Um die analytische Aussagekraft des Systems weiter zu steigern, wurde neben dem massenspektrometrischen Detektor ein zusätzlicher Detektor, ein IMS, in die bestehende Systemkonfiguration integriert. Diese Integration erfolgte durch den Einsatz eines 4-Port-Splitters, der es erlaubt, dass beide Detektoren (MS und IMS) in derselben Flusslinie operieren. Ein besonderer Vorteil dieser methodischen Konfiguration liegt in der Fähigkeit, aus einer einzelnen Bakterien- oder Atemluftprobe simultan zwei Datensätze zu generieren, die direkt miteinander korreliert werden können. Dieses Vorgehen erlaubt es, Unbekannte in den TD-GC-IMS-Daten durch den Abgleich mit bestehenden massenspektrometrischen Datenbanken zu identifizieren. Ferner bietet diese Konfiguration die Möglichkeit, Messergebnisse eines mobilen GC-IMS-Systems direkt mit denen des TD-GC-IMS-Systems zu korrelieren und somit eine umfassende Datenanalyse zu gewährleisten. Nach erfolgreicher Etablierung dieser Kopplung wurde eine geeignete Probenahmeeinheit für TD-Tubes aufgebaut. Diese ist mobil, fluss- und temperaturkontrolliert und ist in der Lage, gasförmige Proben, wie den Headspace über Bakterienkulturen, zu beproben. Dazu musste parallel auch eine Möglichkeit geschaffen werden, diesen Kopfraum der Bakterienkulturen zu vermessen. Eine schematische Darstellung des Probenahmegeräts (links) und die Darstellung der Umsetzung (rechts) für Bakterienkulturen mit festem Agar ist in Abb. 6 dargestellt.

Detailliertere Informationen können aus dem Abschlussbericht der HSHL und ION-GAS GmbH entnommen werden.

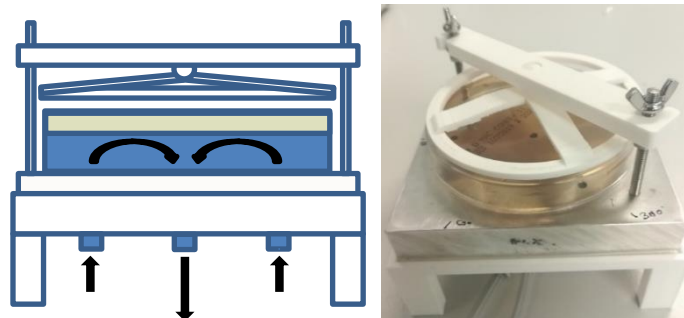


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kulturschalenhalterung (links) und die Umsetzung der Kulturschalenhalterung im Labor (rechts).

## AP 2.4 Aufbau einer GC-MS Substanzdatenbank

Verantwortlicher: HSHL, Kollaborator: IML, ION-GAS

Für den Aufbau einer TD-GC-MS-IMS Substanzdatenbank wurden flüssige Referenzstandards, die in Methanol gelöst waren, auf TD-Tubes aufgebracht. Für reproduzierbare Ergebnisse erfolgte dies fluss- und temperaturkontrolliert. Ein beispielhafter Ausschnitt dieser Datenbank ist in Abbildung 8 zu finden. Die Datenbankeinträge beinhalten wesentliche Informationen wie die Substanzklasse, den IUPAC-Namen, die CAS-Nummer, Retentionszeiten für MS/IMS-Analysen sowie Driftzeiten für IMS-Monomer, -Dimer und mögliche Addukte.

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurden insgesamt 128 Substanzen, die eine direkte Relevanz für die untersuchte Thematik aufweisen, erfolgreich mittels der Kombination aus TD-GC-MS-IMS analysiert und in die Substanzdatenbank aufgenommen. Die ausgewählten Verbindungen umfassen nicht nur solche, die eine direkte Verbindung zu den Krankheitserregern und ihren metabolischen Produkten haben, sondern auch Substanzen, die externe Einflussfaktoren repräsentieren. Zu diesen externen Faktoren gehören beispielsweise die Ernährungsgewohnheiten der PatientInnen, umweltbedingte VOCs sowie Ausgasungen aus verschiedenen Materialien, die sich im klinischen Umfeld befinden.

Substanzklasse	IUPAC-Name	CAS	Retentionszeit MS in Min	Retentionszeit IMS in Min	Driftzeit Monomer in ms	Driftzeit Dimer in ms	Driftzeit Addukt 1 in ms
Alkane	Propan	74-98-6	1.7	1.76	4.96	-	4.76
	iso-Butan	75-28-5	1.88	1.93	4.97	-	4.22 (Vor dem RIP)
	n-Butan	106-97-8	2.03	2.08	5.71	-	6.28
	...						
Aldehyde, einfach	Propanal	123-38-6	3.46	3.51	4.82	5.43	-
	Butanal	123-72-8	6.32	6.38	5.16	6.12	-
	Pentanal	110-62-3	10.88	10.95	5.51	6.82	-
	...						

Abbildung 7: Ausschnitt der TD-GC-MS-IMS Substanzdatenbank.

## AP 3 Messung und Auswertung von Keimkulturen

### AP 3.1 Aufnahme von Wachstumskurven

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: HSHL & ION-GAS

Im Zuge des AP 2 wurden Probenahmemethoden für die Analyse des Headspace über Bakterienkulturen entwickelt: Direkte Messungen mit mobilem GC-IMS sowie Probenahmen mit TD-Tubes, gefolgt von Analysen mittels TD-GC-MS-IMS. Die GC-IMS-Analytik wurde unmittelbar vor Ort ausgeführt, während die mit Proben beladenen TD-Tubes für die anschließende Messung gekühlt bei 6 bis 9 °C zur HSHL transportiert wurden. Zur Untersuchung mikrobieller Wachstumskurven wurden Reinkulturen aus der Stammdatenbank des IML aufgetaut, 24 Stunden in einer Nährlösung kultiviert und anschließend in Kochsalzlösung auf eine Trübung von 0,25 McFarland eingestellt. Dies entspricht einer Keimzahl von etwa  $7,5 \cdot 10^5$  Koloniebildenden Einheiten (KbE) pro 10 µL Lösung. Die verdünnte Lösung wurde auf frische Agarplatten (Columbia Sheep Blood Agar) ausgestrichen und in das Probenahmegerät im Inkubator platziert.

Während der 24-stündigen Inkubation der Messkulturen bei 37 °C wurden in der Probenahmeeinheit des Inkubators wiederholte Headspace-Analysen durchgeführt, wobei alle 31 Minuten automatisierte Messungen mit dem GC-IMS stattfanden. Jede dieser Analysen dauerte 10 Minuten, mit Blindwerten vor und nach jeder Messung, um eine Anreicherung von Substanzen im Analysegerät zu vermeiden. Mit Hilfe der Software IONyos wurden die Intensitäten, Retentions- und Driftzeiten von insgesamt 95 Peaks analysiert, die über einen 24-Stunden-Zeitraum unterschiedliche Verlaufsmuster zeigten.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Spektren für 0, 4 und 20 Stunden nach Beimpfung der Agarplatte mit *P. aeruginosa* und ein Spektrum des Agars selbst, kurz nach Einlegen der Kulturschale (0 Stunden). Im Verlauf von 24 Stunden weisen verschiedene Substanzen unterschiedliche Konzentrationsverläufe auf. Beispielsweise ist Peak 62 bereits im Agar vorhanden, steigt anfangs weiter an und fällt anschließend wieder ab, wohingegen Peak 5 im Agar nicht vorhanden ist, und erst im Laufe der Zeit entsteht, also ein wirkliches Stoffwechselprodukt der Keime darstellt. Nach der Messung zahlreicher Wachstumskurven der verschiedenen Keime konnten spezifische Signale identifiziert werden, die eine Zuordnung des Keims nach einer bestimmten Inkubationszeit ermöglichen. Es zeigt sich zudem, dass die charakteristischen Muster der einzelnen Keime je nach Wachstumsdauer unterschiedlich ausgeprägt sind. Tabelle 1 gibt die jeweiligen Zeiten an, wobei beispielsweise bei *Legionella pneumophila* die Musterbildung erst nach mindestens 18 Stunden erkennbar ist. Daher könnte die Methode in diesem Fall nicht schneller zu einer Diagnose führen als herkömmliche mikrobiologische Verfahren. Weitere Untersuchungen an Kulturen sowie entsprechende Atemluftanalysen sind erforderlich, um diese Limitationen genauer zu bewerten.

*Tabelle 1: Wachstumsdauer der verschiedenen Keime bis das charakteristische Signalmuster zu detektieren ist.*

Keim	Wachstumsdauer in h
<i>Escherichia coli</i>	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6,5
<i>Legionella pneumophila</i>	18-53

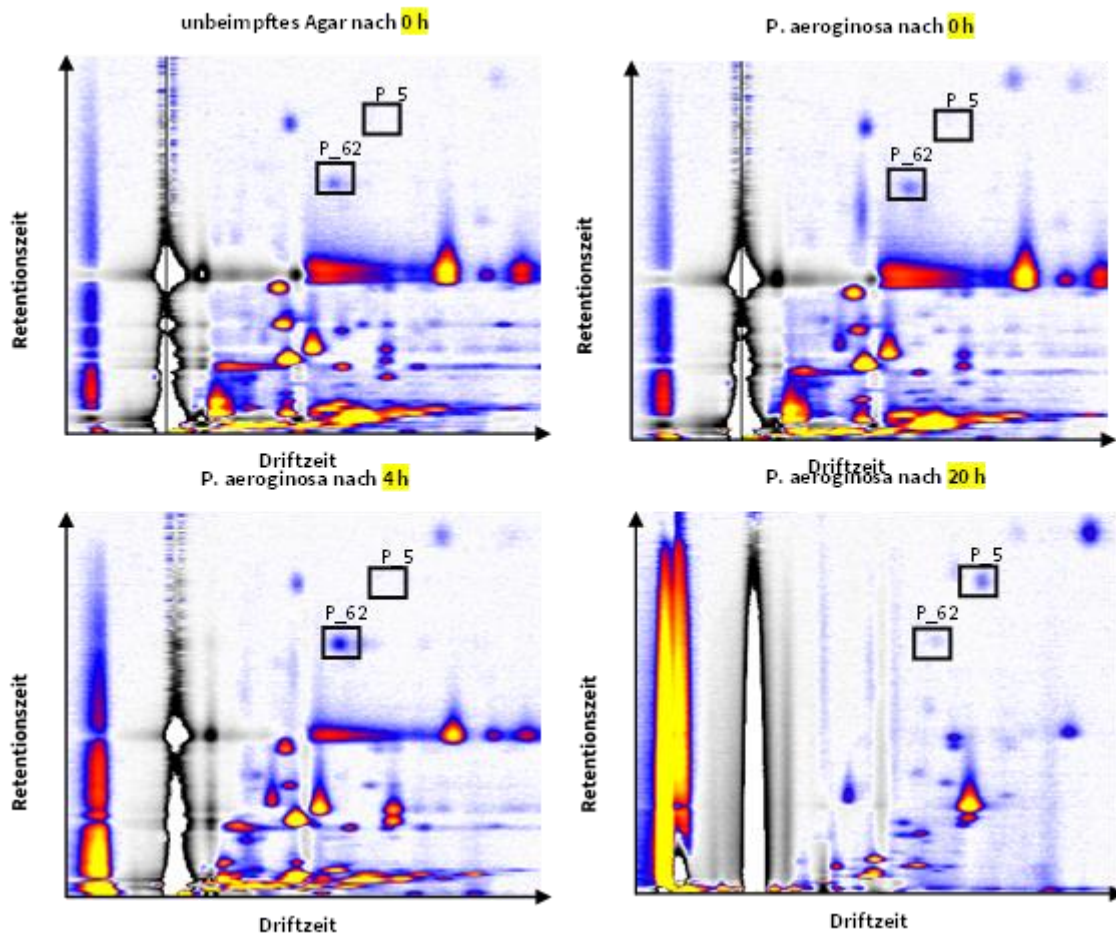


Abbildung 8: Spektren für 0h, 4h, 20h nach Beimpfung der Agarplatte mit *P. aeruginosa* und ein Spektrum des Agars selbst, kurz nach einlegen der Kulturschale (0h).

Abbildung 9 zeigt die charakteristischen Muster der sechs untersuchten Keime, dargestellt anhand ihrer Retentionszeiten und inversen Mobilitäten. Dabei sind ausschließlich die für die Differenzierung relevanten Signale berücksichtigt und nicht alle keimspezifischen Signale aus den Wachstumskurven. Die Abbildung verdeutlicht, dass die Muster hinreichend unterschiedlich sind, um die Keime eindeutig zu unterscheiden. Diese Muster bildeten die Grundlage für die Entwicklung der automatisierten Auswertalgorithmen.

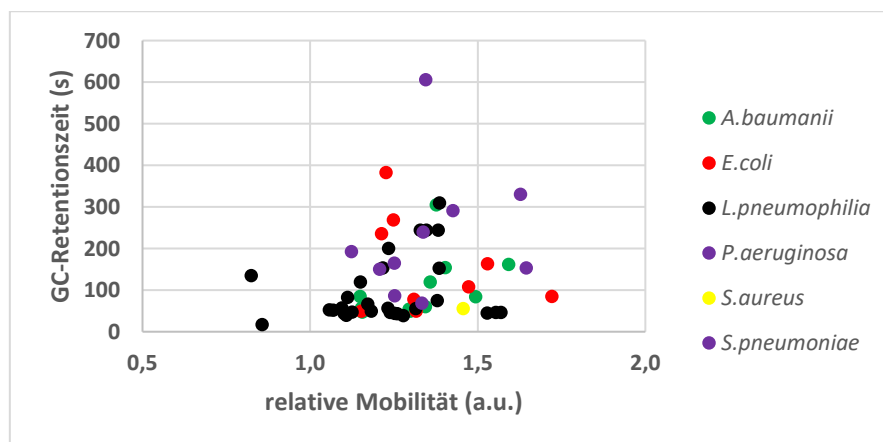


Abbildung 9: Inverse Mobilität und Retentionszeit der für die verschiedenen Keime identifizierten charakteristischen VOC-Muster

Für die TD-GC-MS-IMS-Analysen wurde ein beheizter Schlauch an die Bakterienkammer angeschlossen, um den feuchten, warmen Headpace direkt in beheizte TD-Tubes zu leiten. Für die Probenahme wurde 5 Minuten lang bei einem Probengasfluss von 60 mL/min der Headpace der Kultur beprobt. Innerhalb eines Zeitfensters von 6 Stunden

(T) wurden insgesamt sieben Proben gezogen (Beispielnomenklatur: T0 bis T6). Da die Probenahme mittels TD-Tubes ein rein manueller Vorgang ist, konnten keine 24 h Wachstumskurven ohne Unterbrechung aufgenommen werden. Der Einsatz des TD-GC-MS-IMS diente im Projekt zwar zur Identifizierung von Unbekannten in den GC-IMS Messungen, wurde aber trotzdem so oft wie möglich, auch für Messungen von Wachstumskurven, eingesetzt.

Die Wachstumskurven ausgewählter Substanzen der Headspace-Bakterienmessungen des TD-GC-MS-IMS zeigten, wie die des mobilen GC-IMS, ebenfalls unterschiedliche Muster, die zur Identifikation spezifischer mikrobieller Metabolite herangezogen werden können. Diese Substanzen zeigen innerhalb der Inkubationszeit von 24 bzw. 72 Stunden (*L. pneumophila*) alle einen Anstieg der Intensitäten, je nach Substanz einen Anstieg bereits nach 6 Stunden oder später. Die Details werden zukünftig in einem wissenschaftlichen Journal veröffentlicht.

### **AP 3.2 Referenzanalytik mittels GC-MS**

Verantwortlicher: HSHL, Kollaborator: IML & ION-GAS

Das Arbeitspaket 3.2 wurde vorwiegend an der Hochschule Hamm-Lippstadt bearbeitet und fachlicher von der ION-GAS GmbH und dem IML begleitet. Die detaillierten Ergebnisse sind im Bericht der HSHL dokumentiert. Durch den Abgleich der GC-IMS-Daten mit massenspektrometrischen Referenzsubstanzen und den TD-GC-IMS-Messungen der Bakterienkulturen konnten bislang unbekannte Peaks mittels Retentionszeitindizes in den Messungen des mobilen GC-IMS identifiziert werden. Insgesamt konnten dort 326 verschiedene VOCs im Headspace der Kulturen nachgewiesen werden, wobei bis zum Ende des Projekts 21 für die Keimidentifikation relevante charakteristische Signale identifiziert werden konnten.

### **AP 3.3 Bestimmung der charakteristischen Muster**

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: HSHL & ION-GAS

s. AP 3.4

### **AP 3.4 Implementierung einer Datenbank**

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML & HSHL

Die Analysen mit dem TD-GC-MS-IMS ermöglichen nicht nur die Identifikation charakteristischer Muster, sondern auch einzelner Markersubstanzen. Diese können über Retentionsindizes mit den Daten des mobilen GC-IMS korreliert werden. Daher beziehen sich die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse sowohl auf das AP 3.2 als auch auf AP 3.3. Insgesamt wurden **447** Einzelmessungen der Bakterienkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Wachstumskurven mittels TD-GC-MS-IMS durchgeführt. Die Verteilung dieser Messungen gestaltet sich wie folgt:

- ❖ *Escherichia coli*: 87 (9 Stämme)
- ❖ *Staphylococcus aureus*: 119 (15 Stämme)
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa*: 57 (6 Stämme)
- ❖ *Acinetobacter baumannii*: 20 (9 Stämme)
- ❖ *Streptococcus pneumoniae*: 113 (6 Stämme)
- ❖ *Legionella pneumophila*: 51 (3 Stämme)

Zusätzlich wurden Blank-Messungen (Leer-Messungen) durchgeführt, die sowohl die beiden verwendeten Agar-Typen als auch die Umgebung und das Messgerät selbst berücksichtigten. Mittels des mobilen GC-IMS wurden weitaus mehr Messungen/Daten entlang der Wachstumskurve der Bakterien aufgenommen, da diese keine manuelle Probenahme benötigten. Die Messungen der Bakterienkulturen an beiden Systemen wurden in einem ersten Schritt getrennt ausgewertet, um sie im Nachgang zu vergleichen und zu korrelieren. Im Folgenden wird sich auf die Ergebnisse des mobilen GC-IMS bezogen, da dieses später Einsatz in der klinischen Routine finden könnte und das TD-GC-MS-IMS zu Validierungszwecken eingesetzt wurde. Die Auswertung zu den TD-GC-MS-IMS Messungen kann im Bericht der HSHL nachgelesen werden.

Für die Auswertung der GC-IMS-Messungen wurden in einem ersten Schritt alle Signale im GC-IMS Chromatogramm markiert und die Signalintensität bestimmt. Die Messungen wurden dann nach Bakterienart aufgeteilt und es konnten so nicht nur Vorhandensein/Nicht-Vorhandensein von Signalen verglichen, sondern auch Intensitätsunterschiede beobachtet werden. Der Großteil der detektierten Signale wurde bei allen untersuchten Keimkulturen gefunden. Diese Signale stammen hauptsächlich aus dem Nährmedium (Columbia Agar, Legionellen-Agar) oder stellen gemeinsame Stoffwechselprodukte dar. Nur wenige Verbindungen konnten als spezifisch identifiziert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsdynamiken der Keime boten die erfassten Zeitreihen dennoch die Möglichkeit, Signale zu extrahieren, die zur Differenzierung der Keime genutzt werden können. Insgesamt wurden 106 Signale ausgewertet, wobei 37 keine Unterscheidung ermöglichten, da sie bei allen Keimen ähnliche Verläufe zeigten. Von den restlichen 69 Signalen wiesen 37 deutliche Unterschiede auf. Für jeden Keim konnten somit mehrere charakteristische Substanzen identifiziert werden, die sich zwischen den Keimen unterscheiden lassen: 11 Signale wurden für *Acinetobacter baumannii complex* (HAP) identifiziert, während 16 Signale auf *Escherichia coli* (HAP) hinwiesen. Für *Legionella pneumophila*, das sowohl mit HAP als auch CAP assoziiert ist, konnten ebenfalls 16 charakteristische Marker festgestellt werden. Zudem wurden 7 Signale für *Pseudomonas aeruginosa* (HAP) und 7 Substanzen für *Staphylococcus aureus* (HAP) identifiziert. Die identifizierten Signale bzw. Substanzen wurden abschließend als charakteristische Muster für die jeweiligen Keime in einer speziell dafür erstellten Datenbank hinterlegt.

### **AP 3.5 Entwicklung der Auswertalgorithmen**

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML & HSHL

Zur Klassifikation der erfassten Signale wurden unterschiedliche statistische Verfahren getestet, um ihre Eignung für den Datensatz zu bewerten. Dabei kamen die lineare Diskriminanzanalyse (LDA) sowie die Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) zum Einsatz. Beide Ansätze zielen darauf ab, die Datenkomplexität zu reduzieren und gleichzeitig eine präzise Klassifikation zu ermöglichen. Während die LDA die Dimensionen auf  $n-1$  Klassen begrenzt, zeichnet sich die PLS-DA durch eine größere Flexibilität in der Wahl der Dimensionen aus und ist besser geeignet, mit kollinearen Variablen umzugehen, wie sie häufig bei der IMS-Analyse auftreten. Trotz dieser Vorteile führten beide Verfahren aufgrund der geringen Stichprobengröße (30–300 Messungen pro Keim) zu Übertrainingsproblemen und waren für den vorliegenden Datensatz nicht praktikabel.

Ein alternativer Ansatz basierte auf einem manuellen Vergleich der Signalintensitäten. Hierbei wurden Schwellenwerte definiert, um spezifische „mVOC-Barcodes“ für die einzelnen Keime zu erstellen. Diese Barcodes können in Entscheidungsbäume überführt werden, um die Klassifikation zu automatisieren. Allerdings zeigte sich auch hier das Risiko einer Überanpassung, sodass eine Validierung mit einem umfangreicheren Datensatz notwendig ist. Eine robustere Methode stellte die Verwendung von Random-Forest-Modellen dar. Diese nutzen eine Vielzahl von Entscheidungsbäumen, die auf zufällig ausgewählten Datenteilmengen basieren, um Übertrainingsprobleme zu minimieren. Mit allen verfügbaren Signalen erzielten diese Modelle eine Vorhersagegenauigkeit von 96 %. Auch bei einer Einschränkung auf die signifikantesten Signale blieb die Genauigkeit mit 92 % hoch. Zudem lieferte die Analyse der Signalbedeutung innerhalb des Random-Forest-Modells wertvolle Erkenntnisse zur Relevanz einzelner Variablen. Um Unterschiede und die Signifikanz der charakteristischen Signale zu bewerten, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Dieses nichtparametrische Verfahren eignet sich besonders für den Vergleich unabhängiger Gruppen. Eine detaillierte Aufbereitung der Ergebnisse sowie ergänzende Analysen sind im Abschlussbericht von der ION-GAS GmbH dokumentiert.

## **AP 4 Entwicklung des Demonstrators für die Atemluftanalyse**

### **AP 4.1 Konfiguration des GC-IMS Demonstrators**

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML, HSHL

Für AP 4 wurde entgegen der ursprünglichen Planung ein zweites mobiles GC-IMS-System eingesetzt, das es ermöglicht, die Headspace-Messungen der Bakterienkulturen parallel fortzusetzen. Das hierfür verwendete Gerät ist technisch vergleichbar mit dem mobilen GC-IMS-System für Bakterienkulturen und verfügt über identische, für die Analyse entscheidende Komponenten wie die GC-Säule, die Ionenquelle und das IMS. Ergänzend wurde das System mit einer mikrocontroller-gesteuerten Sensoreinheit ausgestattet, die mithilfe eines Differentialdrucksensors sicherstellt, dass ausschließlich ausgeatmete Luft der PatientInnen gesammelt wird. Aufgrund von strukturellen Anpassungen auf der Pneumologie-Station während der Projektlaufzeit musste die Strategie zur Probenahme der Atemluft mehrmals angepasst werden.

Detaillierte Informationen zur Probenahme mit dem mobilen GC-IMS sind im Abschlussbericht der ION-GAS GmbH beschrieben. Die spezifische Vorgehensweise zur Atemluftentnahme mittels TD-Tubes wird hingegen im Bericht der HSHL näher erläutert.

### **AP 4.2 Integration der Anreicherungseinheit**

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML, HSHL

Das eingesetzte mobile GC-IMS erwies sich bei den Messungen von Bakterienkulturen als ausreichend empfindlich, sodass auf die Integration einer zusätzlichen Anreicherungseinheit verzichtet werden konnte. Ein weiterer Faktor für diese Entscheidung war die Eigenschaft der verfügbaren Adsorptionsmaterialien, schwer flüchtige Substanzen – potenziell wichtige Marker – stark zu binden. Dies hätte deren Nachweis verhindert und das Adsorptionsmaterial langfristig unbrauchbar gemacht.

### **AP 4.3 Entwicklung der Atemluft-Probenahme für GC-MS**

Verantwortlicher: HSHL, Kollaborator: IML, ION-GAS

Das Konzept und die Implementierung der Atemluftprobenahme für die TD-GC-MS-IMS Analysen wurde im Wesentlichen an der Hochschule Hamm-Lippstadt durchgeführt und von ION-GAS GmbH und dem IML begleitet und unterstützt. Analog zur Probenahme für das mobile GC-IMS wurde eine Methode zur Atemluftentnahme für die Referenzanalytik mittels TD-GC-MS-IMS entwickelt. Der Fokus lag darauf, über den Großteil des Projekts hinweg ausschließlich beatmete PatientInnen mit nosokomialer Pneumonie zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein komplexes mobiles Probenahmesystem konzipiert, das die Atemluftproben auf TD-Tubes sammelt. Das bestehende, beheizte und flusskontrollierte System für die Beprobung von Bakterienkulturen wurde dafür um eine zusätzliche Heizeinheit erweitert, die eine 250-mL gasdichte Glasspritze aufnehmen kann. Diese Spritze, ausgestattet mit einem Luer-Lock-Anschluss, wurde speziell ausgewählt, da Glas aufgrund seiner geringen Ausgasungseigenschaften ideal für die Probenahme geeignet ist. Durch die Möglichkeit, die Spritze auf 45 °C vorzuheizen, wurde sichergestellt, dass die Atemluftproben ohne VOC-Verluste durch Kondensation entnommen werden konnten. Für detailliertere Informationen wird an dieser Stelle auf den Abschlussbericht der HSHL verwiesen.

## AP 5 Atemluftanalysen und Auswertung

### AP 5.1 Atemluftanalysen mit GC-IMS

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: ION-GAS, HSHL

Für die Erhebung reproduzierbarer Daten wurde ein einheitlicher Prozess für die Atemluftmessungen bei PatientInnen mit nosokomialen Infektionen etabliert. Zunächst wurde eine Nullluftmessung mit dem mobilen GC-IMS durchgeführt, um die Funktionalität des Geräts zu prüfen. Danach wurde eine Atemluftprobe von etwa 2 Litern in einem Beutel gesammelt, wobei die Fallnummer zur späteren Verknüpfung mit mikrobiologischen Ergebnissen notiert wurde. Eine Teilmenge von 300 Millilitern der Probe wurde innerhalb von 60 Sekunden mit dem GC-IMS analysiert. Parallel dazu wurde ein Liter Atemluft auf Adsorptionsröhrchen gezogen, die gekühlt in einer Styroporbox zur Hochschule Hamm-Lippstadt transportiert wurden. Dort erfolgte die Analyse der TD-Tubes sowie die Auswertung der Messdaten. Beispielmessungen sind im Abschlussbericht der ION-GAS GmbH dokumentiert.

### AP 5.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: ION-GAS, HSHL

Im Helios Klinikum Wuppertal werden bei allen Patienten mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt, wobei die Art der Probenentnahme je nach Verdacht und Erkrankung variiert. Bei Verdacht auf Pneumonie werden Proben wie bronchoalveoläre Lavage (BAL), Trachealsekret, Sputum, Tracheal- und Rachenabstriche entnommen. Diese dienen der Identifizierung von Krankheitserregern sowie einer Resistenzbestimmung.

Die Proben werden im Institut für Medizinische Labordiagnostik (IML) bearbeitet, wobei folgende Schritte durchgeführt werden:

- **Präanalytik:** Proben werden bei Ankunft registriert, etikettiert und entsprechend vorbereitet. Sicherheitswerkbenke stehen für die Verarbeitung zur Verfügung, und ein Grampräparat wird für jede Probe erstellt.
- **Kultivierung und Identifizierung:** Erreger werden auf verschiedenen selektiven und nicht-selektiven Nährböden kultiviert und mittels Verfahren wie MALDI-TOF und Phoenix identifiziert. Zudem erfolgt eine mikroskopische Beurteilung durch Gramfärbung.
- **Resistenzbestimmung:** Antibiotikaresistenzen werden durch Methoden wie Phoenix und Agardiffusionstest untersucht.
- **Biochemische Tests:** Oxidase-, Katalase- und Koagulasetests ergänzen die mikrobiologische Analyse.

Die Verarbeitung der Proben umfasst die Beimpfung auf spezifische Nährmedien, darunter Columbia Agar, Kochblut Agar, MacConkey Agar und Sabouraud Agar. Diese Platten werden entsprechend der Probenart vorbereitet und beimpft, um eine differenzierte Analyse der Keime zu ermöglichen. Die Ablesung der angelegten Kulturen erfolgt in mehreren Schritten. Es erfolgt eine Erstablesung frühestens nach 18 h, danach folgt eine Zweitablesung nach 48 h.

Die Keime werden nach **normale Mund- und Rachenflora und pathogenen Keimen** kategorisiert. Im Rahmen des Projekts werden die Ergebnisse der Keimbestimmung anonymisiert mit den Atemluftanalysen verknüpft, um spezifische Zusammenhänge zwischen mikrobiologischen Befunden und Atemluftmarkern zu untersuchen. Außerdem unterliegen alle Untersuchungen der RiliBÄK (Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen). Das IML ist ein akkreditiertes Labor nach DIN ISO 15189 mit standardisierten Prozeduren beim Umgang mit biologischem Material.

### AP 5.3 Analyse der Referenzproben mittels GC-MS

Verantwortlicher: HSHL, Kollaborator: IML, ION-GAS

Nach der Probenahme und Übertragung der Atemluftproben auf TD-Tubes werden diese gekühlt an die Hochschule Hamm-Lippstadt versandt. Dort werden die Proben mit derselben Methode analysiert, die auch für die Headspace-

Proben der Bakterienkulturen eingesetzt wird. Die erhaltenen VOC-Profile werden anschließend mit den Ergebnissen der Bakterienkulturen und den identifizierten Markern durch die entwickelten Algorithmen abgeglichen. Ergänzend werden die Ergebnisse durch mikrobiologische Untersuchungen am Institut für Medizinische Labordiagnostik validiert.

#### **AP 5.4 Adaption der Auswertalgorithmen**

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML, HSHL

Die Analysen der Atemluftproben mittels mobilem GC-IMS wurden mit den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen verglichen. Insgesamt wurden 10 Patienten in die Studie eingeschlossen, von denen zwei die im Projekt charakterisierten Keime aufwiesen. Bei diesen beiden Patienten konnten die Keime auch in der Atemluftanalyse nachgewiesen werden. In diesen Spektren der Atemluft wurde der Hintergrund abgezogen, um die spezifischen Muster der nachgewiesenen Keime deutlicher darzustellen. Die Ergebnisse der Patientenmessungen erforderten keine grundlegende Anpassung oder Modifikation der Auswertalgorithmen.

### **AP 6 Validierung des Demonstrators im klinischen Alltag**

#### **AP 6.1 Atemluftanalysen mit GC-IMS**

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML, HSHL

#### **AP 6.2 Mikrobiologische Untersuchungen**

Verantwortlicher: IML, Kollaborator: ION-GAS, HSHL

Sofern Patienten Ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben haben und in die Studie eingeschlossen wurden, wurden entsprechend zeitgleich Proben zur etablierten mikrobiologischen Untersuchung abgenommen und unter Routinebedingungen analysiert. Das Prozedere hierfür wurde unter AP 5.2. bereits beschrieben. Es wurden hierfür respiratorisches Material der Patienten verwendet, welche sich klinisch verschlechterten und bei denen die Verdachtsdiagnose einer nosokomialen Pneumonie existierte. Die Probenahme sollte immer vor der Gabe oder Umstellung einer bestehenden Antibiotikatherapie stattfinden. Die Proben wurden unmittelbar zur Analytik ins IML versendet.

#### **AP 6.3 Validierung des Demonstrators**

Verantwortlicher: ION-GAS, Kollaborator: IML, HSHL

Im Rahmen dieses Arbeitspakets sollten weitere Atemluftmessungen durchgeführt werden, um die in AP 5 gewonnenen Erkenntnisse zum Nachweis keim-charakteristischer Metabolite direkt aus der Atemluft zu validieren. Der Zugang zu geeigneten Patienten erwies sich jedoch als schwierig, da ihr Einschluss von medizinischen Voraussetzungen abhängig war: Es mussten unbehandelte nosokomiale Infektionen vorliegen, und die Einwilligung der Patienten war häufig nur über rechtliche Betreuer möglich, die zum Zeitpunkt der Probenahme oft nicht verfügbar waren. Letztlich konnten nur 10 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, von denen lediglich zwei die betrachteten Keime aufwiesen.

Die wichtigsten Erkenntnisse, die aus diesem Arbeitspaket differenziert werden können sind, dass Keim-charakteristische Metabolite auch in der Atemluft nachgewiesen werden konnten. Außerdem ist eine deutlich höhere Anzahl an Studienteilnehmern erforderlich, um die Ergebnisse zu validieren und die aus den Kulturmessungen entwickelten Algorithmen weiter zu optimieren.

#### **Feedback zur Probenahme und Analyse**

Der Ablauf der Probenahme und Analyse, wie in AP 5.1 festgelegt, wurde als sinnvoll und praktikabel bewertet. Die Mitarbeitenden der Station lobten die Flexibilität der Probenahme mit Atembeuteln und schlugen vor, die Adapter für unterschiedliche Beatmungsgeräte und Mundstücke farblich zu kennzeichnen, was leicht umzusetzen ist.

Zu den GC-IMS-Systemen selbst wurde angemerkt, dass der Touchscreen etwas klein sei – ein Punkt, der bei neueren Geräten von ION-GAS bereits verbessert wurde. Zudem wurde vorgeschlagen, die Nullmessung automatisch zu starten, was ebenfalls technisch einfach realisierbar ist. Die Analysenzeit von insgesamt 30 Minuten (15 Minuten Messung + 15 Minuten Nullmessung) wurde als akzeptabel, aber für die Abläufe auf einer Intensivstation potenziell zu lang eingestuft. ION-GAS plant daher, durch den Einsatz von  $\mu$ GC-Säulen mit Temperaturprogrammen die Analysenzeiten deutlich zu verkürzen, ohne dabei die Auflösung zu beeinträchtigen.

### 3. Zusätzlich durchgeführte Untersuchungen

In diesem Abschnitt werden zusätzliche, ergänzende Arbeiten, die im Rahmen des InosIn-Projektes durchgeführt wurden, dargestellt.

#### Metabolitmuster in Mischkulturen

Im Projekt wurden die Keime zunächst einzeln kultiviert, um die von ihnen während des Wachstums abgegebenen Metaboliten zu identifizieren, um eine charakteristische Zuordnung zu gewährleisten. Da jedoch in der Realität häufig mehrere pathogene und vor allem nicht pathogene Keime gleichzeitig vorhanden sind, wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt. Dazu wurden Mischkulturen von zwei bis drei der Erreger des Panels angesetzt, um zu schauen, ob diese sich beeinflussen und ob sich das abgegebene Metabolit-Muster verändert.

Zu diesem Zweck wurden zehn Mischkulturen mit unterschiedlichen Kombinationen der sechs Erreger des Panels angesetzt und gemäß den in AP 3 beschriebenen Methoden analysiert. Abbildung 10 zeigt exemplarisch den Verlauf einer charakteristischen Substanz für *E. coli* in einer Mischkultur bestehend aus *E. coli* E78 und *S. aureus* S79 (jeweils mit 0,25 McF). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass *E. coli* auch in dieser Mischkultur anhand seines charakteristischen Metaboliten eindeutig nachgewiesen werden kann.

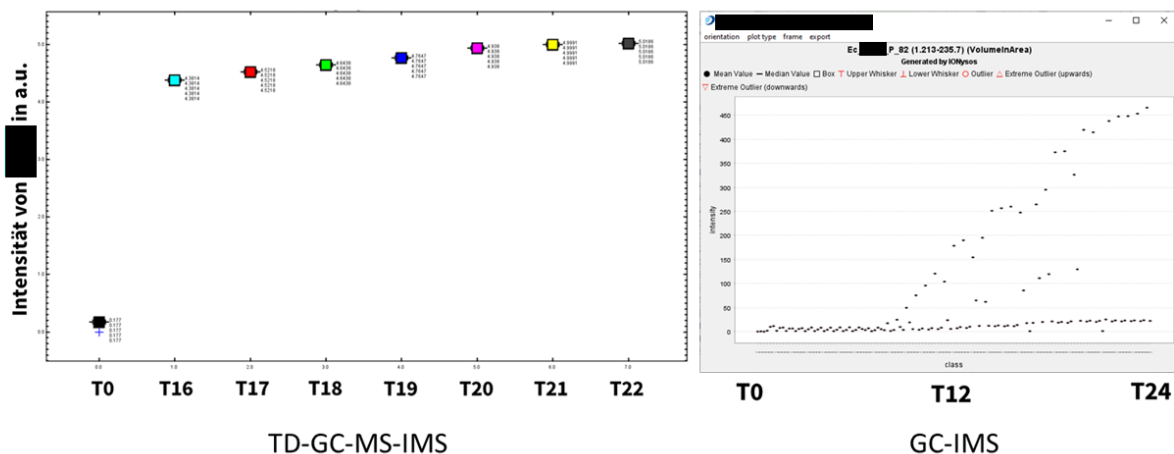


Abbildung 10: Intensitätsverlauf (Wachstumskurve) einer charakteristischen Substanz in einer Mischkultur bestehend aus *E. coli* E78 und *S. aureus* S79, jeweils mit 0,25 McF. Diese Substanz wurde als charakteristisch für *E. coli* bewertet.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für weitere Mischkulturen mit zwei oder drei unterschiedlichen Keimen beobachtet: Die zuvor identifizierten charakteristischen Marker konnten in jedem Fall detektiert werden. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Marker der einzelnen Keime auch in Mischkulturen zuverlässig nachgewiesen werden können. Allerdings bleibt offen, ob dies für alle möglichen Kombinationen von Keimen, insbesondere unter Einbeziehung weiterer, im Projekt nicht berücksichtigter Mikroorganismen, ebenfalls gilt. Zukünftige Studien sind notwendig, um dies umfassender zu prüfen.

#### Resistenzen bei Bakterien anhand des VOC-Profiles unterscheiden

Die zunehmende Verbreitung resistenter Keime stellt eine erhebliche Herausforderung für die moderne Medizin dar, da sie nicht nur die Behandlungsmöglichkeiten einschränkt, sondern auch spezielle Maßnahmen wie die Isolation der betroffenen PatientInnen erfordert. Eine frühzeitige und zuverlässige Identifikation von Resistenzen ist daher entscheidend. Im Projekt wurde der Headspace resistenter und nicht-resistenter Bakterienstämme (z.B. MRSA und MSSA) analysiert, um spezifische Marker und Unterschiede in den Substanzmustern zu identifizieren, die eine Differenzierung ermöglichen. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den resistenten und nicht-resistenten Stämmen, die mithilfe statistischer Methoden erfolgreich ausgewertet wurden. Im Abschlussbericht der ION-GAS GmbH ist die statistische Auswertung durch eine PLS-DA und entsprechende ROC-Kurve gezeigt. Mit nur zwei falsch-negativen Ergebnissen weisen die Analysen ein hohes Potenzial auf, das in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte.

## 4. Ausblick

Um die bisherigen Ergebnisse weiter zu validieren, plant das Konsortium die PatientInnenmessungen mit dem mobilen GC-IMS-System der ION-GAS GmbH fortsetzen. Zusätzlich ist eine Erweiterung der Untersuchungen geplant, die durch neue klinische und instrumentelle Partnerschaften unterstützt werden soll. Im technischen Bereich liegt der Fokus auf der Optimierung der Selektivität, unter anderem durch die Integration von  $\mu$ GC-Säulen. Diese ermöglichen die Nutzung eines Temperaturprogramms, was sowohl die Auflösung in der Retentionszeitachse verbessert als auch die Analysenzeit reduziert. Die geplanten Arbeiten umfassen außerdem die Untersuchung weiterer medizinisch relevanter Keime sowie die Vertiefung der Studien zu Metabolit-Mustern in Mischkulturen. Ein Schwerpunkt liegt auf der Analyse des Einflusses von Resistenzen auf die Metabolit-Muster, um neben der Keimidentifikation auch einen schnellen Nachweis von Antibiotikaresistenzen zu ermöglichen. Erste Hinweise auf diesen Zusammenhang wurden bereits im Projekt identifiziert. Darüber hinaus bietet die an der HSHL etablierte Methodik, bestehend aus der Atemgas-Probenahmeinheit und der TD-GC-MS-IMS-Technologie, zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten. Gemeinsam mit klinischen Partnern sind aktuell Messungen an Atemgasproben von PatientInnen mit Lungenkrebs geplant, um spezifische Markersubstanzen für die Früherkennung und Verlaufskontrolle dieser Erkrankung zu identifizieren. Zusätzlich ermöglicht der Einsatz von Adsorbentubes auch Anwendungen außerhalb der Medizin, wie beispielsweise in der Prozess- und Qualitätskontrolle in der Lebensmittelindustrie.

# Anhang

## Anhang A - Studienprotokoll

### Studienprotokoll: Etablierung der GC-IMS als Nachweismethode von klinisch relevanten Bakterienspezies anhand der Bestimmung ihrer volatilen organischen Substanzen

#### Kooperationspartner

##### Universität Witten/Herdecke / Helios Universitätsklinikum Wuppertal

Vertreten durch

Prof. Dr. med. Parviz Ahmad-Nejad

Institut für Med. Labordiagnostik (IML) der Helios Universitätsklinik Wuppertal

Heusnerstraße 40

42283 Wuppertal

##### ION-GAS GmbH Dortmund

Vertreten durch

Dr. Wolfgang Vautz

Konrad-Adenauer-Allee 11

44263 Dortmund

##### Hochschule Hamm-Lippstadt

Vertreten durch

Prof. Stefanie Sielemann

Hochschule Hamm-Lippstadt

Department Hamm 2

Marker Allee 76-78

59063 Hamm

## 1. Hintergrund

Diese Studie wird im Rahmen eines BMBF-geförderten Projektes (FKZ: 13GW0428A) in Kooperation mit der Firma ION-GAS GmbH Dortmund und der Hochschule Hamm-Lippstadt durchgeführt. Das Forschungsprojekt „InosIn“ beschäftigt sich mit der schnellen, nicht-invasiven Identifikation **nosokomialer Infektionen**. Das Ziel ist die Entwicklung und Validierung eines neuartigen Analysesystems, ein GC-IMS (Gaschromatograph mit Kopplung eines Ionenmobilitätsspektrometers), das über die Ausatemluft von Patienten nicht invasiv und innerhalb kürzester Zeit das Bakterium identifiziert, das die Infektion verursacht. Die Erregeridentifizierung geschieht dabei über die Messung flüchtiger organischer Verbindungen (VOC, volatile organic compounds) in der Ausatemluft. Die Validierung und Substanzidentifikation erfolgt mit einer etablierten Standardmethode auf Basis eines Thermodesorptions-Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer und Ionenmobilitätsspektrometer (TD-GC-MSxIMS). Detaillierte Beschreibungen zur technischen Durchführung finden Sie im Anhang. Durch die schnelle Identifizierung kann frühzeitig eine effektive erregerspezifische antibiotische Therapie gestartet werden.

Das Gesamtprojekt umfasst mehrere Schritte:

- Entwicklung eines tragbaren GC-IMS Gerätes
- Erstellen einer Datenbank durch Messung von Bakterienkulturen im Labor
- Erstellen eines Auswertungsalgorithmus
  - Messung der Ausatemluft von Patienten mit nosokomialen Pneumonien und Überprüfung, ob die Pneumonie Erreger mit dem neu entwickelten Gerät detektiert werden können (proof of principle)

#### Nosokomiale Pneumonie

In Deutschland erkranken schätzungsweise jedes Jahr ca. 100.000 Menschen an einer nosokomialen, d.h. im Krankenhaus erworbenen Lungenentzündung (Pneumonie). Insbesondere Patienten, die über einen längeren Zeitraum beatmet werden müssen, haben durch den in der Luftröhre liegenden Kunststoffschlauch („Tubus“) ein hohes Risiko eine sog. beatmungsassoziierte Pneumonie zu entwickeln. Die Erkrankung führt häufig zu einer Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes und ist mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden.

## Diagnostik bakterieller Infektionen

Der aktuelle Goldstandard besteht in der kulturellen Anzucht der Erreger und einer anschließenden biochemischen oder massenspektrometrischen Identifizierung. Die setzt i.d.R. mindestens eine Inkubation von 18-24 Stunden voraus.

### Analyse von Atemluft

Es gibt in der Ausatemluft verschiedene Substanzen, die aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften nachgewiesen und analysiert werden können, die Messung volatiler organischer Substanzen bieten hier großes Potenzial. Solche Messungen sind bisher nicht etabliert, obwohl sie sowohl bei spontan atmenden als auch bei intubierten Patienten schnell und unkompliziert durchführbar sind und beliebig oft wiederholt werden können. Erste experimentelle Ansätze mit der IMS-Technologie in unserem Institut (IML) haben gezeigt, dass eine Identifizierung von Bakterien und Pilzen aus Kulturmedien wahrscheinlich möglich sind. Zudem ist eine Messung der VOCs bereits nach einer Inkubationszeit von ca. 6-8 Stunden möglich. Zu dem Zeitpunkt zeigt sich erstes Wachstum auf den Kulturplatten, das aber für die konventionellen Methoden bei weitem noch nicht ausreicht.

## 2. Arbeitshypothese

Durch die Messung volatiler organischer Substanzen (VOCs) mittels GC-IMS Dampfraum-Analysen (im Headspace der Bakterienstämme) können erregerspezifische VOC-Muster erstellt und Erreger aus klinischen Proben eindeutig identifiziert werden. Anschließend können mit den so gewonnenen VOC Mustern und deren Zuordnung zu bestimmten Keimen diese mittels GC-IMS Analysen auch direkt in der Ausatemluft von Patienten identifiziert werden. VOCs, die eindeutig mittels GC-IMS einem Keim zugeordnet werden können, werden zusätzlich mithilfe eines TD-GC-MSxIMS identifiziert bzw. validiert. Eine Substanzidentifikation erlaubt die eindeutige Zuordnung zu den metabolischen Vorgängen eines Keims.

### Erwartete Ergebnisse

Es wird erwartet, dass der Erregernachweis aus Ausatemluft mittels GC-IMS einen deutlichen zeitlichen Vorteil gegenüber den konventionellen, kulturbasierten Nachweisverfahren bringt. Daraus resultiert eine Verkürzung der Zeitspanne (das Ergebnis der Atemluftmessung liegt nach wenigen Minuten vor, das konventionelle kulturbasierte Ergebnis erst nach 1-2 Tagen) von der Untersuchung bis zur Therapieeinleitung mit gezieltem Antibiotikum.

## 3. Durchführung

### 3.1. Entwicklung eines tragbaren GC-IMS Gerätes

Ein Prototyp des Gerätes wurde durch die Firma ION-GAS GmbH gebaut und von der Universität Witten/Herdecke gekauft. Das Gerät befindet sich aktuell im IML der Helios Universitätsklinik Wuppertal.

### 3. 2. Erstellung einer Referenzdatenbank

#### Herstellung der Referenzkulturen

- Auftauen und Anzucht der zu testenden Erreger aus Erregerbank: Ein Cryo-Kügelchen mit steriler Öse auf eine zur Anzucht geeignete Agarplatte geben für 24 Stunden bei 36°C inkubieren
- Überführung einer Kolonie in eine Suspension und Verdünnung auf eine definierte Konzentration (nach McFarland)
- Beimpfen einer Agarplatte mit einer definierten Menge der Bakteriensuspension
- Inkubation für 24h bei 36°C

#### Messung der Referenzkulturen aus dem Headspace der Bakterienkultur mit mobilem GC-IMS

- Agarplatte ohne Deckel auf die Probenahmeinheit legen und arretieren
- Probenahmeinheit im System-eigenen Brutschrank an die Gasversorgung anschließen und Brutschranktür schließen
- Start einer Spül- und Messsequenz in der Steuersoftware („IonsIn Sample Control“)
- Das System spült nun automatisch die Raumluft aus der Agarplatte und vermisst parallel zwei Blindwerte mit trockenem bzw. angefeuchtetem Nullgas zur Kontrolle des Messsystems
- Anschließend wird automatisch eine Probe aus dem Gasraum über dem Kulturmedium der Agarplatte in das GC-IMS gesaugt und analysiert

- Optional kann vor der Probenahme auch kurz der Spülgasfluss vom System unterbrochen werden, sodass sich VOC im Gasraum über dem Kulturmedium anreichern können
- Die Analysedaten werden automatisch nach Datum und Uhrzeit benannt abgespeichert
- Je nach Messsequenz können diese Schritte auch automatisch mehrfach wiederholt werden, sodass z.B. für Kinetikmessungen eine Agarplatte über mehrere Stunden regelmäßig beprobt werden kann. (Bei Kinetikmessungen wird mit einer frisch beimpfte Agarplatte gestartet)
- Nach einer Messreihe wird die Probenahmeinheit wieder aus dem Brutschrank genommen
- Die Agarplatte wird verworfen
- Die Probenahmeinheit wird desinfiziert, mit heißem Wasser abgespült und getrocknet bevor sie für die nächste Agarplatte wiederverwendet wird
- Die Auswertung der Messdaten erfolgt manuell mit der Software „IONyos“ (ION-GAS GmbH, Dortmund)
- Ziel der Auswertung ist es Keim-spezifische VOC-Muster, sowie Wachstumskurven zu ermitteln

### **Messung der Referenzkulturen aus dem Headspace der Bakterienkultur mit TD-GC-MSxIMS**

Ein beheizter Schlauch wird an die oben genannte Bakterienkammer angeschlossen. Dieser Schlauch ist mit einem beheizten Thermodesorptionsröhrchen (TD-Tube) verbunden, worüber der Dampfraum der Bakterien mit einer Pumpe gerichtet gezogen werden kann. Eine Probe wird für 1 bis 5 Minuten bei einem Fluss von 20 mL/Min bis 60 mL/Min genommen. Die TD-Tubes werden dann anschließend an der HSHL mit dem TD-GC-MSxIMS vermessen.

### **3.3. Erstellen eines Auswertungsalgorithmus**

#### **Mobiles GC-IMS**

Während der Methodenentwicklung erfolgt die Auswertung mit der IONyos Software der ION-GAS GmbH. Mit dieser Software ist es möglich, nach einer entsprechenden Aufbereitung der Daten (Glättung, Alignment usw.), die einzelnen erfassten Signale zu bestimmen, über Vergleiche mit einer Substanzdatenbank zu identifizieren und nach einer Kalibration auch zu quantifizieren. Auch können viele Datensätze beispielsweise zu zeitlichen Verläufen ausgewertet und dargestellt werden.

Ziel ist es, nach der Erstellung und Validierung der Datenbank einen automatisierten Betrieb zu ermöglichen, in dem nach der Messung der Atemluft direkt eine Auswertung im Gerät stattfindet und ein Erregernamen angezeigt wird.

#### **Benchtopsystem TD-GC-MSxIMS**

Pro Messung werden zwei Ergebnisse erhalten, da parallel mit zwei Detektoren gemessen wird: ein massenspektrometrisches und ein Ionenmobilitätsspektrometrisches Ergebnis. Durch die Parallelität der MS- und IMS-Messungen können Substanzen, die im IMS gefunden werden, sofort im MS gesucht und mittels NIST (*National Institute of Standards and Technology*)-Datenbank identifiziert werden. Die IMS-Messungen können dann mit den Messungen des mobilen GC-IMS korreliert werden, sodass über diesen Weg eine Identifikation unbekannter Substanzen auch am mobilen System möglich ist.

Die Auswertung erfolgt auf MS-Seite mit der Shimadzu GCMS Postrun Analysis Software. Hier können die Messungen angeschaut, Kenndaten (Intensität, Retentionszeit, Massenspektrum) zu den Substanzen ausgelesen und unbekannte Substanzen mittels hinterlegter Datenbank identifiziert werden. Die IMS-Messungen können mit der G.A.S. Software VOCal 0.1.4 visualisiert und statistisch ausgewertet werden.

### **3.4 Messung von VOCs aus der Ausatemluft von Patienten mittels mobilem GC-IMS und TD- GC-IMS/MS**

Das Ziel ist die Messung von Ausatemluft von 10 Patienten mit nosokomialen Infektionen mittels GC-IMS und TD-GC-MSxIMS. Hierfür werden Patienten aus der Klinik für Pneumologie unter Leitung von Prof. Kurt Rasche eingeschlossen. Die Patienten werden ausführlich über den Inhalt und Verlauf der Studie informiert und es werden nur Patienten eingeschlossen, für die eine unterschriebene Einverständniserklärung vorliegt. Bei beatmeten Patienten wird die Zustimmung der Angehörigen bzw. gesetzlichen Betreuer eingeholt.

Die Vorgehensweise der Probenahme ist abhängig davon, ob ein Patient intubiert oder spontan atmend ist. In beiden Fällen ist die Probenahme nicht-invasiv, es werden keine besonderen Atemmanöver vom Patienten verlangt und die Atmung der Patienten wird in keiner Weise beeinflusst.

#### **Probennahme bei spontan atmenden Patienten**

Bei spontan atmenden Patienten atmen diese über ein medizinisches Einweg-Mundstück in ein T-Stück aus, von dem

aus über einen Schlauch die Probe im Bypass aus dem Hauptatemgasstrom vom GC-IMS angesaugt wird. Der Probenfluss in das Gerät mit max. 0,1 L/Min ist gegenüber dem Ausatemfluss (mehrere L/Min) vernachlässigbar und wird die Atmung nicht beeinflussen.

Die Probenahme für das TD-GC-MSxIMS läuft vergleichbar wie die für das mobile GC-IMS ab. Der einzige Unterschied ist, dass im Bypass des Hauptstroms der Ausatemluft nicht das mobile GC-IMS angeschlossen ist, sondern eine Glasspritze, in der die Ausatemluft gesammelt wird. Insgesamt werden 2 bis 3 Atemzüge (ca. 0,2 L) benötigt. Die gesammelte Atemluft wird dann anschließend auf das TD-Tube gegeben und vermessen.

### **Probennahme bei intubierten Patienten**

Die Probenahme der Ausatemluft erfolgt für beide Systeme nicht-invasiv über ein medizinisches T-Stück aus dem Beatmungsschlauch und dauert maximal zehn Minuten. Zur Steuerung der Probenahme wird der Atemluftfluss mit einem Differenzdruckmesser erfasst (beispielsweise mit einem medizinischen Hamilton-Sensor), so dass die Probenahme ausschließlich während des Ausatmens erfolgt. Der Probenfluss wird direkt aus dem medizinischen T-Stück mit maximal 0,1 L/Min in das GC-IMS gesaugt, ist gegenüber dem Ausatemfluss vernachlässigbar und es kommt zu keiner Beeinträchtigung der Beatmung des Patienten. Mit einer gasdichten Spritze werden ca. 0,2 L Atemluft am T-Stück befindlichen Schlauch entnommen und auf das TD-Tube gegeben. Es fallen keine weiteren zusätzlichen Untersuchungen oder Interventionen am Patienten an. Die Probennahme erfolgt durch geschultes medizinisches Personal der Klinik für Pneumologie.

## **4. Auswertung**

Die Ergebnisse der Atemgasanalyse werden pseudonymisiert erfasst und mit den Ergebnissen aus Routineuntersuchungen verglichen.

## **5. Datenschutz**

### **Erstellen einer Datenbank durch Messung von Bakterienkulturen im Labor**

Für die Messungen werden Bakterienkulturen aus vorhandenen Stammsammlungen verwendet. Es werden keinerlei Patientendaten erfasst.

### **5.2. Messung der Ausatemluft von Patienten mit nosokomialen Pneumonien**

Die Daten zu den Analysen der Ausatemluft von Patienten werden pseudonymisiert erfasst. Den Prüfarzten im IML (Dr. Petersdorf / Prof. Ahmad-Nejad) sind die Patientendaten im Rahmen ihres Behandlungsauftrags und Durchführung der Routinediagnostik bekannt. Alle anderen Kooperationspartner erhalten ausschließlich pseudonymisierte Daten. Die Pseudonymisierungsliste liegt auf einem zugangsgeschützten Laufwerk des IML und wird nach Abschluss der Studie gelöscht.

## **6. Literatur**

1. Buzzini P, Martini A, Cappelli F, Pagnoni UM, Davoli P. A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts.
2. Antonie Van Leeuwenhoek 2003, 84(4):301–11. S. Schulz and J. S. Dickschat. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports* 2007, 24(4):814–842.
3. Kai M, Haustein M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, 81(6):1001–1012.
4. Perl T, Bödeker B, Jünger M, Nolte J, Vautz W. Alignment of retention time obtained from multicapillary column gas chromatography used for VOC analysis with ion mobility spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397(6):2385-94.
5. Harris, D. C. Gaschromatographie. In *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, 8., vollst. überarb. erw. Aufl. 2014; Harris, D. C., Werner, G., Werner, T., Eds.; Springer Spektrum: Berlin, 2014; 639–670.
6. Eiceman, G. A. *Ion Mobility*; Springer Berlin Heidelberg, 2011.
7. Ringné, M. What is principal component analysis? *Nature biotechnology* 2008, 26 (3), 303–304.
8. Backhaus, K.; Erichson, B.; Plinke, W.; Weiber, R. *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*, 14., überarbeitete und aktualisierte Auflage; Springer Gabler: Berlin, Heidelberg, 2016.
9. Gey M. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 3rd ed. Berlin: Springer Spektrum; 2015.
10. Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie: 102 Tabellen*. 7th ed. Stuttgart: Thieme; 2005.

11. Kunze, N., Weigel, C., Vautz, W. et al. Multi-capillary column-ion mobility spectrometry (MCC-IMS) as a new method for the quantification of occupational exposure to sevoflurane in anaesthesia workplaces: an observational feasibility study. *J Occup Med Toxicol* 10, 12 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12995-015-0056-7>
12. Vautz, W., et al., Breath analysis-performance and potential of ion mobility spectrometry. *Journal of Breath Research*, 2009. 3(3).
13. Vautz, W., et al., Analyses of mouse breath with ion mobility spectrometry: a feasibility study. *Journal of Applied Physiology*, 2010.
14. Drees, C., Vautz, W., Liedtke, S. et al. GC-IMS headspace analyses allow early recognition of bacterial growth and rapid pathogen differentiation in standard blood cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 9091–9101 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10181-x>
15. Euler, M.; Perl, T.; Eickel, I.; Dudakova, A.; Maguilla Rosado, E.; Drees, C.; Vautz, W.; Wieditz, J.; Meissner, K.; Kunze-Szikszay, N. Blood Culture Headspace Gas Analysis Enables Early Detection of *Escherichia coli* Bacteremia in an Animal Model of Sepsis. *Antibiotics* 2022, 11, 992. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080992>

## **Anhang: Die Technologie hinter der Methode**

### **Gaschromatographie und Ionenmobilitätsspektrometrie (GC-IMS)**

Gaschromatographie: Die Gaschromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren. Zur Trennung wird ein bestimmtes Probenvolumen des zu untersuchenden Gasgemisches zusammen mit der mobilen Phase durch eine Kapillare, auch als GC-Säule bezeichnet, geleitet, in der sich die stationäre Phase befindet. Siloxanverbindungen werden oft als stationäre Phase verwendet, die einen dünnen Film auf der Innenseite der Kapillare bilden. Die Zusammensetzung der stationären Phase bestimmt die Verweilzeit der gasförmigen Analyten in der Kapillare, die mit steigendem Siedepunkt oder steigender Polarität des Analyten größer wird. Durch die Betriebsparameter Temperatur, Probenmenge, Trägergas, Strömungsgeschwindigkeit und stationäre Phase kann ein zeitlich voneinander getrenntes Verlassen der Analyten von der Kapillare erreicht werden. Da die GC nur die zeitliche Trennung beeinflusst, muss ein zusätzliches Detektionsverfahren verwendet werden. Diese sind in diesem Fall das Ionenmobilitätsspektrometer und Massenspektrometer.

Ionenmobilitätsspektrometrie: Das Prinzip der IMS beruht darauf, dass unter Normaldruck erzeugte Ionen in einem elektrischen Feld gegen die Strömungsrichtung eines Gases driften. Ionen unterschiedlicher Masse und /oder Struktur erreichen unterschiedliche Driftgeschwindigkeiten und werden voneinander getrennt, bis sie zeitlich nacheinander auf einen Detektor auftreffen. Das Verhältnis der Ionengeschwindigkeiten zur Stärke des elektrischen Feldes wird als Ionenmobilität und die Trennung dieser Ionen auf einer bestimmten Wegstrecke auf der Basis der unterschiedlichen Driftgeschwindigkeiten als IMS bezeichnet.

In der Kombination als GC-IMS steht damit ein schnelles und nachweisstarkes analytisches Verfahren zur Verfügung das mit mobilen Geräten aus sehr kleinen Luftproben (wenige mL) in kurzen Analysenzeiten (wenige Minuten) die Zusammensetzung der Probe quantitativ bestimmen kann. Die Auswertung erfolgt automatisiert, so dass bei bekanntem Substanzmuster bestimmter Bakterien direkt nach der Analyse ein Hinweis auf die Anwesenheit eines Keimes gegeben werden kann.

### **Thermodesorptions-Gaschromatographie mit Massenspektrometrie und Ionenmobilitäts-spektrometrie (TD-GC-MSxIMS)**

Thermodesorption: Die Thermodesorption ist eine Probenaufgabetechnik für die GC zur Bestimmung von organischen Verbindungen in geringen Konzentrationen aus gasförmigen Proben. Für die Analyse von gasförmigen Proben werden die zu messenden Verbindungen zunächst auf einem Adsorbens (Tenax TA) gesammelt. Dazu wird ein vorgegebenes Probenvolumen durch das Adsorbens gesaugt, wobei die organischen Verbindungen auf dem Tenax hängen bleiben. Die Adsorberröhrchen werden mit Septen gasdicht verschlossen. Bei der Analyse wird die Probe im Thermodesorber definiert aufgeheizt. Dabei werden flüchtige Verbindungen wieder freigesetzt und anschließend in einer Kühlfalle kryofokussiert. Anschließend wird die Kühlfalle rapide aufgeheizt und die Analyten auf die GC-Säule desorbiert

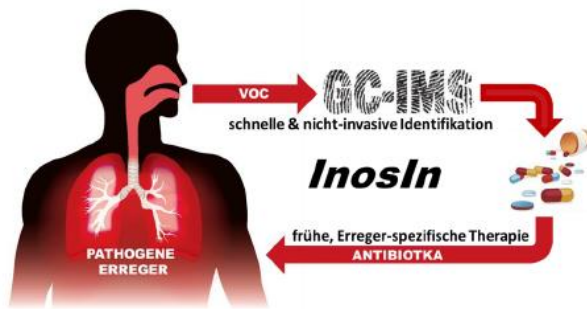
Gaschromatographie: s. oben

Massenspektrometrie: Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Bestimmung von geladenen Molekülen und Molekülfragmenten. Die Analyten werden in ionisierte Teilchen überführt und anhand des Verhältnisses von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) getrennt.

Ionenmobilitätsspektrometrie: s. oben

## Anhang B – Aufklärungsbogen

### Schnelle, nicht-invasive Identifikation nosokomialer Infektionen (InosIn)



#### Verbundpartner



#### Verbundkoordinator

ION-GAS GmbH  
Dr. Wolfgang Vautz  
Konrad-Adenauerallee 11  
44263 Dortmund  
Mail: w.vautz@ion-gas.de  
Tel: 01575-8767712  
www.ion-gas.de

#### Patienten-/Probandeninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Die Untersuchung von menschlichen Bioproben und die Analyse der daraus gewonnenen oder zu gewinnenden Daten sind zu einem wichtigen Instrument medizinischer Forschung geworden. Um Krankheiten zu verstehen, ist es wichtig, mehr über die zugrundeliegenden biologischen Abläufe zu erfahren. Auch in der Ausatemluft gibt es verschiedene Substanzen, die aufgrund von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften nachgewiesen und analysiert werden können. Die Messung volatiler organischer Substanzen (VOC = volatile organic compounds) bieten hier großes Potenzial. Solche Messungen sind bisher nicht etabliert, obwohl sie schnell und unkompliziert durchführbar sind und beliebig oft wiederholt werden können.

**Ihre Einwilligung in eine Verwendung Ihrer Atemprobe und zugehörigen Daten ist freiwillig. Soweit Sie sich nicht beteiligen möchten oder Ihre Zustimmung später widerrufen möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.**

Im Folgenden informieren wir Sie über die Ziele der Studie InosIn, die Verfahrensweisen und die Maßnahmen zum Schutz Ihrer personenbezogenen Daten, damit Sie sich auf dieser Grundlage Ihre eigene Meinung bilden und eine Entscheidung treffen können.

#### 1. Welche Ziele verfolgt die Studie InosIn?

Diese Studie InosIn wird im Rahmen eines BMBF-geförderten Projektes in Kooperation mit der Firma ION-GAS GmbH Dortmund und der Hochschule Hamm-Lippstadt durchgeführt. Sie beschäftigt sich mit der schnellen, nicht-invasiven Identifikation nosokomialer (= im Krankenhaus erworbener) Infektionen. Das Ziel ist die Entwicklung und Validierung eines neuartigen Analysesystems, ein GC-IMS (Gaschromatograph mit Kopplung eines Ionenmobilitätsspektrometers), das über die Ausatemluft von Patienten nicht invasiv und innerhalb kürzester Zeit den Erreger identifiziert, der die Infektion verursacht. Die Erregeridentifizierung geschieht dabei über die Messung flüchtiger organischer Verbindungen (VOC) in der Ausatemluft. Durch die schnellen Identifizierung kann frühzeitig eine effektive erregerspezifische antibiotische Therapie gestartet werden.

**Das Ziel dieser Forschung ist nicht, bei Ihnen oder anderen einzelnen Personen eine Diagnose zu erstellen.** Vielmehr sollen bei der vergleichenden Untersuchung zwischen Ihren Laborproben und dem neuen Gerät GC-IMS festgestellt werden, ob das Gerät in der Lage ist die krankheitsauslösenden Erreger zu identifizieren.

## 2. Um welche Art von Proben und Daten handelt es sich?

Im Rahmen der Studie wird Ihre Ausatemluft untersucht. Dafür sind keinerlei Atemmanöver notwendig, es wird lediglich die Atemluft aufgefangen, die Sie bei normaler Atmung ausatmen.

### a. Probennahme bei spontan atmenden Patienten

Bei spontan atmenden Patienten atmen diese über ein medizinisches Einweg-Mundstück in ein T-Stück aus, von dem aus über einen Schlauch die Probe im Bypass aus dem Hauptatemgasstrom vom GC-IMS angesaugt wird. Der Probenfluss in das Gerät mit max. 0,1 L/Min ist gegenüber dem Ausatemungsfluss (mehrere L/Min) vernachlässigbar und wird die Atmung nicht beeinflussen.

Die Probennahme für das TD-GC-MSxIMS läuft vergleichbar wie die für das mobile GC-IMS ab. Der einzige Unterschied ist, dass im Bypass des Hauptstroms der Ausatemluft nicht das mobile GC-IMS angeschlossen ist, sondern eine Glasspritze, in der die Ausatemluft gesammelt wird. Insgesamt werden 2 bis 3 Atemzüge (ca. 0,2 L) benötigt. Die gesammelte Atemluft wird dann anschließend auf das TD-Tube gegeben und vermessen.

### b. Probennahme bei intubierten Patienten

Die Probennahme der Ausatemluft erfolgt für beide Systeme nicht-invasiv über ein medizinisches T-Stück aus dem Beatmungsschlauch und dauert maximal zehn Minuten. Zur Steuerung der Probennahme wird der Atemluftfluss mit einem Differenzdruckmesser erfasst (beispielsweise mit einem medizinischen Hamilton-Sensor), so dass die Probennahme ausschließlich während des Ausatmens erfolgt. Der Probenfluss wird direkt aus dem medizinischen T-Stück mit maximal 0,1 L/Min in das GC-IMS gesaugt, ist gegenüber dem Ausatemungsfluss vernachlässigbar und es kommt zu keiner Beeinträchtigung der Beatmung des Patienten. Mit einer gasdichten Spritze werden ca. 0,2 L Atemluft am T-Stück befindlichen Schlauch entnommen und auf das TD-Tube gegeben. Es fallen keine weiteren zusätzlichen Untersuchungen oder Interventionen am Patienten an. Die Probennahme erfolgt durch geschultes medizinisches Personal der Klinik für Pneumologie.

## 3. Wie werden die Proben und Daten verwendet?

Die von Ihnen zur Verfügung gestellte Ausatemluft und Daten werden ausschließlich für die Studie InosIn verwendet und **nach der Studie Abschluss werden die personenbezogenen Daten gelöscht**.

## 4. Welche Risiken sind mit der Untersuchung der Atemluft verbunden?

Es bestehen keinerlei Risiken für Sie. Für die Probennahme atmen Sie für einfach für eine kurze Zeit in einen über einem Mundstück verbundenen Schlauch aus, die Ausatemluft wird aufgefangen und daraus die VOCs gemessen. Es sind keine speziellen Atemmanöver oder Pusten erforderlich, es wird lediglich die ganz normale Ausatemluft eingefangen. Die Untersuchung erfolgt durch geschultes Personal.

## 5. Welcher Nutzen ergibt sich für Sie persönlich?

**Persönlich können Sie für Ihre Gesundheit keinen unmittelbaren Vorteil oder Nutzen aus der Teilnahme an der Studie erwarten. Deren Auswertung dient ausschließlich Forschungszwecken und nicht dazu, Rückschlüsse auf Ihre Gesundheit zu ziehen.**

## 6. Welcher Nutzen ergibt sich für die Allgemeinheit?

Der erhoffte Nutzen besteht in dem schnellen Nachweis von Krankheitserregern (innerhalb von Minuten) bei Patienten mit Lungenentzündung (Pneumonie) aus der Ausatemluft. Wenn dies gelingt, könnte Patienten zukünftig der Prozess der Probennahme (Gewinnung von Sputum, ggf. bei beatmeten Patienten auch Absaugen oder Lungenspiegelung) deutlich schneller und leichter werden. Auch könnte bei einem Erregernachweis innerhalb von Minuten direkt die passende antibiotische Therapie gestartet werden.

## 7. Wer hat Zugang zu Ihren Daten und wie werden sie geschützt?

### a. Kodierung Ihrer Daten

Alle Daten, die Ihre Person unmittelbar identifizieren (Name, Geburtsdatum, Anschrift etc.), werden durch einen Code ersetzt (pseudonymisiert). Danach wird der Datensatz nochmals neu kodiert und gespeichert. Erst in dieser Form werden die Daten den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

Die Sie unmittelbar identifizierenden Daten bleiben beim Helios Universitätsklinikum Wuppertal bei den Ärzten, die Sie behandeln.

### b. Die Weitergabe von Bioproben und Daten

**Eine Weitergabe der Ihre Person identifizierenden Daten an andere Forscher oder andere unberechtigte**

**Dritte, etwa Versicherungsunternehmen oder Arbeitgeber, erfolgt nicht.**

#### **c. Bewertung durch eine Ethik-Kommission**

Die Ethikkommission der Universität Witten/Herdecke hat die Unterlagen zur Studie InosIn geprüft und hat keine Bedenken.

#### **d. Veröffentlichungen**

Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Ergebnissen erfolgen ausschließlich anonymisiert, also in einer Form, die keine Rückschlüsse auf Ihre Person zulässt. Dafür wird der Identifizierungscode gelöscht wird, über den ermittelt werden kann, von welcher Person die Probe stammt.

### **8. Erlangen Sie oder die Kooperationspartner der Studie einen finanziellen Vorteil aus der Nutzung Ihrer Daten?**

Für die Überlassung Ihrer Bioproben und Daten erhalten Sie kein Entgelt. Sollte aus der Forschung ein kommerzieller Nutzen erzielt werden, werden Sie daran nicht beteiligt.

Die Kooperationspartner der Studie verwenden Ihre Daten ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke. Die Daten werden nicht verkauft.

### **9. Was beinhaltet Ihr Widerrufsrecht?**

**Sie können Ihre Einwilligung zur Verwendung Ihrer Daten jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für Sie widerrufen.** Die Rechtmäßigkeit der bis zum Widerruf erfolgten Nutzung der Daten bleibt davon jedoch unberührt.

Im Falle des Widerrufs werden die Daten gelöscht. Zudem können Daten aus bereits durchgeführten Analysen nicht mehr entfernt werden.

Statt der Löschung können Sie auch zustimmen, dass die Daten in anonymisierter Form für wissenschaftliche Zwecke weiterverwendet werden dürfen. Anonymisierung bedeutet, dass der Identifizierungscode gelöscht wird, über den ermittelt werden kann, von welcher Person die Probe stammt.

Wenden Sie sich für einen Widerruf bitte an einen der Kooperationspartner (Kontaktdaten s. Punkt 11).

### **10. Welche weiteren Datenschutzrechte haben Sie?**

Rechtsgrundlage für die Datenverarbeitung ist Ihre Einwilligung gemäß Art. 6 Abs. 1 Buchst. a und Art. 9 Abs. 2 Buchst. a der Datenschutz-Grundverordnung.

Verantwortlicher im Sinne der Datenschutz-Grundverordnung sind die Prüfarzte im IML (Dr. S. Petersdorf, Prof. P. Ahmad-Nejad) sowie der Datenschutzbeauftragte der Helios Universitätsklinik Wuppertal.

Sie können vom Helios Universitätsklinikum Wuppertal im Rahmen der gesetzlichen Vorgaben Auskunft über die von Ihnen gespeicherten Daten verlangen. Ebenso können Sie eine Berichtigung falscher Daten, eine Übertragung der von Ihnen zur Verfügung gestellten Daten sowie eine Löschung der Daten oder Einschränkung ihrer Verarbeitung verlangen. Für die Ausübung dieser Rechte können Sie sich an die Prüfarzte im IML (Dr. S. Petersdorf, Prof. P. Ahmad-Nejad) wenden.

Bei Anliegen zur Datenverarbeitung und zur Einhaltung des Datenschutzes können Sie sich auch an den Datenschutzbeauftragten wenden: Hans-Joachim Wagener (Hans-Joachim.Wagener@helios-gesundheit.de)

Sie haben außerdem ein Beschwerderecht bei jeder Datenschutzaufsichtsbehörde. Eine Liste der Aufsichtsbehörden in Deutschland finden Sie unter

[https://www.bfdi.bund.de/DE/Infothek/Anschriften\\_Links/anschriften\\_links-node.html](https://www.bfdi.bund.de/DE/Infothek/Anschriften_Links/anschriften_links-node.html).

### **11. Wo kann ich weitere Informationen erhalten?**

Sollte Ihnen etwas unklar sein, fragen Sie bitte Ihren behandelnden Arzt bzw. Ihren Studienarzt, bevor Sie Ihre Einwilligung erteilen. Sie können sich wegen Rückfragen auch zu einem späteren Zeitpunkt an die Prüfarzte des IML Wuppertal sowie an die Kooperationspartner wenden.

Prüfarzte Helios Universitätsklinikum Wuppertal

Dr. med. Sabine Petersdorf

Institut für Med. Labordiagnostik (IML) der Helios Universitätsklinik Wuppertal

Heusnerstraße 40, 42283 Wuppertal  
Sabine.Petersdorf@helios-gesundheit.de

Prof. Dr. Parviz Ahmad-Nejad  
Institut für Med. Labordiagnostik (IML) der Helios Universitätsklinik Wuppertal  
Heusnerstraße 40, 42283 Wuppertal  
Parviz.Ahmad-Nejad@helios-gesundheit.de

Verbundkoordinator und Kooperationspartner von ION-GAS GmbH Dortmund  
Dr. Wolfgang Vautz  
Konrad-Adenauer-Allee 11, 44263 Dortmund  
w.vautz@ion-gas.de

Kooperationspartner Hochschule Hamm-Lippstadt  
Prof. Stefanie Sielemann  
Hochschule Hamm-Lippstadt  
Department Hamm 2  
Marker Allee 76-78, 59063 Hamm  
Stefanie.Sielemann@hshl.de

## Anhang C – Einwilligungserklärung

Bitte lesen Sie die folgende Einwilligungserklärung aufmerksam durch, kreuzen Sie Zutreffendes an und unterschreiben Sie anschließend am Ende dieser Einwilligungserklärung, sofern Sie einverstanden sind.

### Einwilligungserklärung

Patient/Proband (Name, Vorname): \_\_\_\_\_

Geb.-Datum: \_\_\_\_\_

Ich habe die Informationsschrift gelesen und hatte die Gelegenheit, Fragen zu stellen. Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Ich willige ein, dass meine Daten, wie in der Informationsschrift beschrieben, für die Studie InosIn verwendet werden. Insbesondere **willige ich ein, dass, wie in der Informationsschrift beschrieben, die Prüfarzte der Helios Universitätsklinik Wuppertal personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, von mir erheben, gegebenenfalls weitere personenbezogene Daten aus meinen Krankenunterlagen entnommen und die Daten pseudonymisiert (d.h. kodiert) für die Dauer der Studie speichert.**

Name und Anschrift des Arztes: .....

Eine Kopie der Patienten-/Probandeninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim Helios Universitätsklinikum Wuppertal.

\_\_\_\_\_  
Name des Patienten in Druckbuchstaben

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum (vom Patienten einzutragen), Unterschrift des Patienten

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Patienten eingeholt.

\_\_\_\_\_  
Name der aufklärenden Person in Druckbuchstaben

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der aufklärenden Person

## Anhang D – Ethikantrag und -votum

Antragsteller:  
Dr. med. Sabine Petersdorf  
Helios Universitätsklinik Wuppertal  
Institut für Med. Labordiagnostik  
Heusner Straße 40  
42238 Wuppertal

Ethik-Kommission  
der Universität Witten/Herdecke e.V.  
z. Hd. Herrn RA Prof. Dr. med. P. Gaidzik  
Alfred-Herrhausen-Straße 50  
58448 Witten

### Antragsformular

Der Antrag ist sorgfältig in deutscher Sprache auszufüllen. Er soll in kurzer, auch für die medizinischen Laien verständlicher Form das Vorhaben beschreiben und die Fragen durchgängig beantworten.

Für detaillierte Ausführungen muss im Antragsformular auf die Fundstellen in den Anlagen hingewiesen werden. Es muss sichergestellt sein, dass alle im Antragsformular gemachten Angaben auch in den Anlagen enthalten sind und den an der Prüfung beteiligten Ärzten und Wissenschaftlern zur Verfügung stehen. Das sind in der Regel:

- Prüfplan (datiert, mit Seitennummerierung und vom Prüfleiter unterschrieben)  
*- bitte in der Fußzeile ggf. die Versionsnummer des Prüfplans angeben -*
- Curriculum vitae des Leiters der klinischen Prüfung sowie des lokalen Prüfleiters, aus welchem ihre Erfahrungen mit klinischen Prüfungen hervorgehen
- Bei Promotionsvorhaben: CV des Promovenden
- Prüfbögen (CRF), gegebenenfalls als Entwurf
- Patienten-/Probandenaufklärung und -einwilligung
- Andere (z.B. Fachinformationen, Prüferinformationen, Monographien, Voten anderer Ethik-Kommissionen)
- Vergleiche auch die Geschäftsordnung der Kommission
- Bei Antrag auf Zweitvotum: Erstvotum der für den LKP zuständigen Ethikkommission

Die Unterlagen sind bei monozentrischen und für beantragte **Erstvoten** bei multizentrischen Studien in **siebenfacher** Ausfertigung, d. h. 1 Exemplar mit Originalunterschriften (bitte kennzeichnen!) und 6 weitere identische Exemplare, jeweils geheftet, einzureichen.

Bei einem beantragten **Zweitvotum** sind die Unterlagen in **dreifacher** Ausfertigung - unter Beifügung des Erstvotums für den LKP - einzureichen.

**(Die Unterlagen sind geheftet und unter Verzicht auf Büro- bzw. Heftklammern einzureichen!)**

Die Stellungnahme der Ethik-Kommission gilt nur für das Prüfvorhaben, wie es sich für die Kommission aus der ihr vorliegenden Fassung des Prüfplanes ergibt.

Die Prüfunterlagen werden vertraulich behandelt. Die Mitglieder der Ethik-Kommission sind kraft Gesetzes zur Verschwiegenheit verpflichtet.

A. Formales

**A1. Titel der klinischen Prüfung:**

- ▶ schnelle, nicht-invasive Identifikation nosokomialer Infektionen (InosIn)

**A2. Lokal verantwortlicher Leiter der klinischen Prüfung:**

Name, Vorname, Titel: Petersdorf, Sabine, Dr. med.

Jetzige Tätigkeit: Oberärztin am Institut für Med. Labordiagnostik (IML) der Helios  
Universitätsklinik Wuppertal

Adresse: Heusner Straße 40  
42238 Wuppertal

Tel.-Nr.: 0202 896-2897

Email: sabine.petersdorf@helios-gesundheit.de

**A3. Prüfstellen:**

Die Prüfung wird durchgeführt:

- ambulant
- stationär

Zahl der Prüfstellen bei Antragstellung, bitte Adresse(n) angeben: 1  
Helios Universitätsklinik Wuppertal

Weitere Prüfer unter der lokal verantwortlichen Leitung:

**(Bei Promotionsvorhaben bitte hier auch Promovenden benennen und kennzeichnen)**

Name, Vorname, Titel: Ahmad-Nejad, Parviz, Prof. Dr. med.  
Jetzige Tätigkeit: Direktor des Institut für Med. Labordiagnostik (IML) der Helios  
Universitätsklinik Wuppertal  
Adresse: Heusner Straße 40  
42238 Wuppertal

Name, Vorname, Titel: Vautz, Wolfgang, Dr.  
Jetzige Tätigkeit: Geschäftsführer ION-GAS GmbH  
Adresse: Konrad-Adenauer-Allee 11  
44263 Dortmund

Name, Vorname, Titel: Sielemann, Stefanie, Prof.  
Jetzige Tätigkeit: Professorin der Hochschule Hamm-Lippstadt, Lehrgebiet  
Instrumentelle und analytische Sensortechnik  
Adresse: Marker Allee 76-78  
59063 Hamm

Name, Vorname, Titel: Rasche, Kurt, Prof. Dr. med.  
Jetzige Tätigkeit: Direktor der Klinik für Pneumologie, Allergologie, Schlaf- und  
Beatmungsmedizin, Helios Universitätsklinik Wuppertal  
Adresse: Heusner Straße 40  
42238 Wuppertal

Name, Vorname, Titel: Pähler, Marvin  
Jetzige Tätigkeit: Promovend ION-GAS GmbH  
Adresse: Konrad-Adenauer-Allee 11  
44263 Dortmund

Detering, Julian  
Promovend Institut für Med. Labordiagnostik (IML) Helios  
Wuppertal  
Heusner Straße 40  
42238 Wuppertal

Schanzmann, Hannah  
Promovendin Hochschule Hamm-Lippstadt  
Marker Allee 76-78  
59063 Hamm

**Nur bei Zweitvotierung:** Weitere verantwortliche Prüfleiter an anderen Prüfstellen: Anlage Nr.

**A4. Kostenträger (Sponsor, Rechnungsanschrift für die Gebühr der Ethik-Kommission):**

Name: Institut für Med. Labordiagnostik  
Helios Universitätsklinik Wuppertal  
Anschrift: Heusner Straße 40  
42238 Wuppertal

Gibt es einen Monitor?

nein   
ja

#### **A5. Weitere Anträge**

Wurde nach Ihrem Wissen ein Antrag in der gleichen Sache bei einer anderen Ethik-Kommission gestellt?

nein   
ja

Falls ja, bitte Votum ggf. beifügen (Anlage Nr. )

### **B. Untersuchungsbeschreibung**

#### **B1. Prüfplan**

- Liegt der vom lokalen Leiter der klinischen Prüfung unterschriebene Prüfplan bei?

nein   
ja

Falls ja, Anlage Nr. 1

## **B2. Wissenschaftliche Kurzbeschreibung des Vorhabens mit Angabe der Prüfphase**

- Prüfgerät / Prüfmethode / o.ä.:  
Ziel der Studie ist die Entwicklung und Validierung eines neuen Gerätes zum schnellen Nachweis von Erregern nosokomialer (= im Krankenhaus erworbener) Pneumonien.  
Das Projekt umfasst mehrere Schritte:
  - \* Entwicklung des Gerätes
  - \* Erstellen einer Datenbank durch Messung von Bakterienkulturen im Labor
  - \* Erstellen eines Auswertungsalgorithmus
  - \* Messung der Ausatemluft von Patienten mit nosokomialen Pneumonien und Überprüfung, ob die Erreger der Pneumonie mit dem neu entwickelten Gerät detektiert werden können (proof of principle)Der Nachweis basiert auf der Messung von flüchtigen organischen Substanzen (VOCs = volatile organic compounds)
- Neuentwicklung – bekannt – bekannt und zugelassen für die vorgesehene Indikation und Anwendungsform:  
Es wurde ein neues Gerät entwickelt (Kombination aus Gaschromatographie und Ionenmobilitätsspektrometrie (GC-IMS))
- Studiendesign (offen – blind – doppelblind; vergleichend – randomisiert; monozentrisch – multizentrisch; prospektiv – retrospektiv; etc.):  
offen, vergleichend (Erregernachweis neues Gerät gegen Standard Mikrobiologie), monozentrisch, prospektiv
- Biometrische Methode und spezielle statistische Auswertung (Gehen Sie bitte darauf ein, inwiefern die von Ihnen geplante Prüfung nach Art und Anlage eine wissenschaftlich und biometrisch begründete Aussage erlaubt und welche Hypothesen Sie prüfen wollen):  
Es handelt sich um erste Messungen mit dem neuen Gerät bei 10 Patienten, im Sinne eines "proof of principle" ob eine Erregernachweis aus Atemluft durch Messung von flüchtigen organischen Substanzen möglich ist  
ggf. siehe Prüfplan S.

## **B3. Vorgesehene Dauer der Prüfung**

- Beginn der Studie: April 2023  
Ende der Studie: März 2024
- Dauer pro Proband / Patient: 10 Minuten

## **B4. Probanden- / Patientenauswahl**

- Einschlusskriterien:  
Patienten mit nosokomialen Pneumonien  
ggf. siehe Prüfplan S.
- Ausschlusskriterien:  
(mit Angaben über Ausschlussbedingende Krankheiten und deren Stadien, verbotene Begleitmedikamente, Sperrfristen, Einwilligungsunfähigkeit, etc.)

Patienten, von denen keine schriftliche Einwilligung vorliegt  
ggf. siehe Prüfplan S.

- Stichprobenumfang: 10 Patienten

#### B5. Art der Prüfung

- diagnostisch
- therapeutisch
- epidemiologisch
- Prävention
- Sonstige:

#### B6. Angewendete Bestimmungen

- Medizinproduktegesetz
- Deklaration von Helsinki in der jeweils aktuellen, revidierten Fassung
- Transfusionsgesetz
- Strahlenschutzverordnung
- Röntgenverordnung
- Datenschutzgesetze
- Sonstige:

#### B7. Welche Vorprüfungen wurden am Menschen durchgeführt und mit welchem Ergebnis?

- Bitte mit Quellenangabe und Beifügung wesentlicher Veröffentlichungen:

siehe auch Anlage Nr.

#### B8. Bei Arzneimittelstudien:

- ▶ **Separates Antragsformular gemäß AMG und GCP-Verordnung in der derzeit gültigen Fassung verwenden!**

#### B9. Bei Medizinproduktstudien gemäß § 23 b MPG (<http://norm.bverwg.de/jur.php?mpg,23b>):

- Sicherheitstechnischer Untersuchungsbericht und biologisch-toxikologische Prüfung bei bereits zugelassenen Medizinprodukten:
- Nachweis des CE-Kennzeichens bzw. der Übereinstimmung mit der ISO 9000 durch einen „notified body“:

#### **Für MPG-Studien außerhalb des § 23 b MPG und für In-vitro-Diagnostika:**

*Die Durchführung klinischer Prüfungen von Medizinprodukten und Leistungsbewertungsprüfungen von In-vitro-Diagnostika bedarf der Genehmigung der zuständigen Bundesoberbehörde und der zustimmenden Bewertung der zuständigen Ethik-Kommission.*

*Zur Einreichung von Anträgen auf Genehmigung der klinischen Prüfung gemäß § 22a MPG steht das zentrale Erfassungssystem des DIMDI zur Verfügung.*

**B10. Mögliche Komplikationen, Risiken und/oder Belastungen durch die geplante klinische Prüfung und ggf. vorgesehene Maßnahmen:**

- Kurzbeschreibung:  
Es bestehen keinerlei Risiken für teilnehmenden Patienten. Für die Probenahme atmen die Patienten für 5-10 Minuten einfach in einen über einen Mundstück verbundenen Schlauch aus, die Ausatemluft wird aufgefangen und daraus die VOCs gemessen. Es sind keine speziellen Atemmanöver oder Pusten erforderlich, es wird lediglich die ganz normale Ausatemluft eingefangen.  
ggf. siehe Prüfplan S.

**B11. Nutzen-Risiko-Abwägung**

- Gegenüberstellung von erhofftem Nutzen für den Probanden / Patienten und/oder die Heilkunde und möglichen Risiken in Kurzbeschreibung:  
Der erhoffte Nutzen besteht in der schnellen Erregeridentifikation (innerhalb von Minuten) von Pneumonieerregern bei nicht-invasiver Probenahme (Nachweis aus Ausatemluft des Patienten. Dadurch würden dem Patienten der Prozess der Probenahme (Gewinnung von Sputum, ggf. bei beatmeten Patienten auch endotracheales Absaugen oder Bronchoskopie) deutlich schneller und leichter und bei fast sofortigem Erregernachweis könnte direkt die passende antibiotische Therapie gestartet werden.  
  
ggf. siehe Prüfplan S.

**B12. Zwischenauswertung / Abbruchkriterien**

- Ist eine Zwischenauswertung vorgesehen und welche Konsequenzen ergeben sich für den weiteren Versuchsablauf?  
nein, proof of principle Studie
- Welches sind Abbruchkriterien?
  - für den Einzelfall
  - für die Prüfung insgesamt

**B13. Aufklärung und Einwilligung**

Siehe dazu die bei der Ethik-Kommission erhältlichen "Hinweise zum erforderlichen Inhalt von Aufklärung und Einwilligung"

- Ist für die Aufklärung des Probanden / Patienten die Übergabe eines Schriftstückes vorgesehen?
  - nein
  - jaFalls nein, warum nicht:  
  
Falls ja, Anlage Nr. 2
- Ist für die Einwilligung des Probanden / Patienten ein Schriftstück vorgesehen?

nein   
ja   
Falls nein, warum nicht:

Falls ja, Anlage Nr. 2

**B14. Ist ein Informationsaustausch mit dem Hausarzt vorgesehen?**

nein   
ja   
Falls nein, warum nicht:  
Die Ergebnisse der Studie haben keinen Einfluss auf die Therapie der Patienten

**B15. Erhält der Proband / Patient eine Aufwandsentschädigung?**

nein   
ja   
Falls ja, welche:

**B16. Angaben zum Versicherungsschutz des Versuchsteilnehmers gem. § 20 (3) MPG**

► Die Studie hat keinen Einfluss auf die Behandlung der Patienten

**B17. Besondere Bemerkungen**

- *Ich bin verpflichtet, die Ethik-Kommission über alle nachträglichen Änderungen des Prüfplanes und über alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten und die die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten, zu informieren. Ich werde dementsprechenden Mitteilungen meine eigene Bewertung der jeweiligen Ereignisse hinsichtlich Schwere und Kausalzusammenhang sowie eventuell eingeleitete oder geplante Maßnahmen oder Schlussfolgerungen hinzufügen.*
- *Ich erkläre, mit meiner Unterschrift, die Geschäftsordnung der Ethik-Kommission zur Kenntnis genommen zu haben und damit, insbesondere mit den Regelungen zur Erhebung der Bearbeitungsgebühren, einverstanden zu sein.*
- Ich bin bereit, nach Abschluss des Vorhabens die veröffentlichten Ergebnisse der Ethik-Kommission zur Verfügung zu stellen.

Datum \_\_\_\_\_

Unterschrift des lokalen Prüfleiters \_\_\_\_\_

## Ethik-Kommission der Universität Witten / Herdecke

Universität Witten/Herdecke · Ethik-Kommission · Alfred-Herrhausen-Str. 50 · D · 58448 Witten

Frau  
Dr. med. Sabine Petersdorf  
**persönlich / vertraulich**  
Helios Universitätsklinikum Wuppertal  
Institut für Medizinische Labordiagnostik  
Heusner Straße 40  
42238 Wuppertal

Ethik-Kommission  
Alfred-Herrhausen-Str. 50  
D-58448 Witten

Sekretariat:  
Frau Andrea Pleger  
**Mo-Fr 8.00-12.00 Uhr**

Telefon 02302/926-740  
Telefax 02302/926-739

e-mail: [sekretariat-ethik@uni-wh.de](mailto:sekretariat-ethik@uni-wh.de)  
Internet: [www.ethik-kommission-uwh.de](http://www.ethik-kommission-uwh.de)

22.12.2022

Ga/pl

**Antrag Nr. 240/2022 (bitte stets angeben):**

Schnelle, nicht invasive Identifikation nosokomialer Infektionen (InsoIn)

Sehr geehrte Frau Dr. Petersdorf,

Ihre vorgenannte Studie lag der Ethik-Kommission der Universität Witten / Herdecke anlässlich ihrer Sitzung vom 14.12.2022 zur Beratung vor. Die Vorgaben von § 36 Strahlenschutzgesetz fanden Beachtung.

Grundsätzliche ethische oder berufsrechtliche Bedenken werden nicht erhoben, die Kommission bittet jedoch um Beachtung folgender Hinweise (bedingt positives Votum):

Aufgrund der Verwendung des alten Antragsformulars (das neue finden Sie auf der Homepage der Ethik-Kommission) bleibt unklar, ob es sich um ein Promotionsprojekt an der UW/H handelt und welcher der aufgeführten Promovenden innerhalb des Projektes welche Fragestellung bearbeitet. Für die notwendige Zuweisung von Verantwortlichkeiten bittet die Kommission ferner um Mitteilung, wer als akademischer Betreuer dieser Projekte auftritt.

Des Weiteren bittet die Kommission um Mitteilung, auf welches der beiden eingesetzten Geräte (GC-IMS bzw. TD-GC-MSxIMS) sich das vorgelegte CE-Zertifikat sowie die Produktinformationen beziehen.

Der Hinweis auf Seite 1 der Informationsschrift a. E. erscheint in diesem textlichen Zusammenhang missverständlich und sollte eher in die Einwilligungserklärung aufgenommen werden. In diesem Zusammenhang ist auch deutlich zu machen, dass für den Fall des nachträglichen Widerrufs das Recht auf Datenlöschung eingeräumt wird.

Die Ansprechpartner für weitere Informationen sind im Interesse des möglichst leichten Zugangs auch mit einer Telefonnummer auszuweisen.

Aus demselben Grund erscheint der Kommission die bloße E-Mail-Anschrift beim Datenschutzbeauftragten bzw. eine nur über das Internet zugängliche Sammelliste der Aufsichtsbehörden unzureichend. Es wird empfohlen, die kompletten Kontaktdaten einzufügen.

Ethik-Kommission der Universität Witten-Herdecke e. V.  
Vorstand: Prof. Dr. med. Petra Thürmann (Vorsitzende), Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Heinrich, RA Prof. Dr. med. Peter W. Gaidzik  
Sitz des Vereins: Witten, Amtsgericht Witten VR 779; Bank: Stadtparkasse Witten (BLZ 452 500 35) Konto-Nr. 0050534  
IBAN: DE 41 4525 0035 0000 0505 34 Swift-BIC: WELADED1WTN