

## Schlussbericht zum DZIF-Vorhaben

Vorabennummer: TTU 08.825  
Vorhabentitel: Development and integration of advanced  
diagnostics into routine clinical care (Integrate)

Verbundvorhaben

### **Beteiligte Einrichtung/en sowie Vorhabenlaufzeit/en**

| Projektkoordination           | Laufzeitbeginn |   | Laufzeitende |
|-------------------------------|----------------|---|--------------|
| Universität zu Köln           | 01.03.2021     | - | 28.02.2025   |
| Verbundpartner                | Laufzeitbeginn |   | Laufzeitende |
| Universitätsklinikum Freiburg | 01.07.2022     | - | 28.02.2025   |

## Kapitel 1: Kurzbericht (wird veröffentlicht)

### a) Ursprüngliche Aufgabenstellung und wissenschaftlicher/technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das allgemeine Ziel des Projekts ist die Entwicklung einer antikörperbasierten, schnellen VRE-Nachweismethode, vorzugsweise eines Lateral Flow Assays (LFA), und die Untersuchung des Einflusses frühzeitiger diagnostischer Tests, integriert in die Patientenvoruntersuchung, um das klinische Management, die Antibiotikaverschreibung und die Patientenergebnisse zu verbessern.

Unsere teamspezifischen Ziele sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Expression und Reinigung von rekombinantem VanA<sub>His6</sub> und VanB<sub>His6</sub>. (UKK)
2. Immunisierung von Mäusen und Erzeugung von Hybridomzellklonen, die Antikörper gegen VanA und VanB produzieren. (UKK)
3. Schrittweiser Selektionsprozess zur Gewinnung spezifischer Anti-VanA- und -VanB-Antikörper. (UKK)
4. Bereitstellung gereinigter, vorselektionierter anti-VanA- und -VanB-Antikörper für LFA-produzierende Unternehmen für die Entwicklung eines Prototyps zum Nachweis von rekombinantem VanA<sub>His6</sub> und VanB<sub>His6</sub>. (UKK)
5. Die Evaluierung des Prototyps an VRE aus *in-vitro*-Darmsystemen, klinischen Isolaten und Patientenproben konnte unter anderem aufgrund des Ausscheidens vom Kooperationspartners in Bonn nicht mehr im Rahmen des Projektes durchgeführt werden. (UKK, Uni BN)
6. Integration fortschrittlicher Diagnostik (Mikrobiom- und Resistomanalyse, Wirts-Transkriptom-Profiling, Schnelltests, neuartige Vorhersagemodelle usw.) in diagnostische und therapeutische Prozesse zur Stärkung eines personalisierten medizinischen Ansatzes. (UK FR, UKK)
7. Bewertung der potenziellen Auswirkungen der Integration fortschrittlicher Diagnostik auf Patientenebene, d. h. auf diagnostisches Management und Behandlungsentscheidungen. (UK FR)
8. Bewertung der potenziellen Auswirkungen der Integration fortschrittlicher Diagnostik auf die Gesundheitsversorgung, d. h. auf die Antibiotikaverschreibung (Gesamtrate, Breitband- vs. Schmalbandantibiotika), Entwicklung von Antibiotikaresistenzen. (UK FR)
9. Als Pilotstudie zur Bewertung der Durchführbarkeit einer prospektiven TTU HAARBI-Interventionsstudie, die die Auswirkungen der Integration fortschrittlicher Diagnostik (in Kombination mit der Bewertung/Interpretation durch einen Spezialisten für Infektionskrankheiten) auf die Patientenversorgung und das Ergebnis untersuchen soll (UK FR) – Dieser Punkt wurde gemäß bewilligtem Änderungsantrag nicht erreicht. Im Rahmen der Änderung erfolgte die Erstellung einer klinischen Patientenkohorte mit V.a. Sepsis/Blutstrominfektion mit begleitender Transkriptom-Analyse zur Charakterisierung von wirtsspezifischen Reaktionen und Erstellung eines Prädiktionsmodells für schlechtes Patienten-Outcome.

## b) Ablauf des Vorhabens

### **AP 1) Klonierung, Expression und Reinigung von GRE-Resistenz-Biomarkern (UKK, M1–M4)**

- Klonierung, Expression und Reinigung von VanA<sub>His6</sub> und VanB<sub>His6</sub> als Zielantigene.
- Gesamt-DNA des dominantesten Klons ST-117 in Deutschland, identifiziert durch eine DZIF-Studie im Jahr 2020 (3), wird als Vorlage verwendet.

### **AP 2) Generierung und Selektion von monoklonalen Antikörpern (moAbs) gegen GRE-Resistenz-Biomarker (UKK, M3–M9)**

- Immunisierung von Mäusen mit den beiden rekombinanten Zielantigenen VanA<sub>His6</sub> und VanB<sub>His6</sub>.
- Generierung und Selektion von Hybridomen, die monoklonale Anti-VanA/B-Antikörper produzieren.

### **AP 3) Reinigung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper (UKK, M8–M14)**

- Reinigung von moAbs (max. 24 moAbs)
- Zuordnung der moAbs zu verschiedenen Bindungsclustern

### **AP 4) Evaluierung von LFAs an rekombinanten Proteinen (UKK, M11–M18)**

- Kombinationen aller Antikörper (die an verschiedene Bindungscluster binden) werden im LFA-Prototypformat an rekombinanten Antigenen getestet, um geeignete Antikörperpaare zu identifizieren.

### **AP 5) Evaluierung von ICTs an klinischen Isolaten (UKK, M17–19)**

- LFA-Prototypen, die mit rekombinantem Protein am besten funktionierten (max. 5 LFAs), werden an klinischen Isolaten validiert und in Zusammenarbeit mit der AG Higgins (UKK) hinsichtlich ihrer Spezifität modifiziert.

### **AP 6) Evaluierung des Detektionskits an Patientenproben (UKK, M18–M22)**

- Ausgewählte LFAs (max. 2 LFAs) werden für das Vorscreening von Patientenproben aus der TIARA-Kohorte komplexer chirurgischer Patienten evaluiert.
- Es werden doppelte Rektalabstrichproben entnommen und auf VanA- und VanB-produzierende Isolate untersucht. Hierzu wird Stuhlmaterial aus dem ersten Abstrich vor der Evaluierung des Detektionskits auf selektive CHROMagar-Platten inokuliert. Der zweite Rektalabstrich wird direkt analysiert.

### **AP 7) Evaluierung der Sensitivität von Point-of-Care-Detektionskits (UKK und Uni BN, M19–M24)**

- Ein ausgewählter LFA-Prototyp wird hinsichtlich seiner Sensitivität an gespiktem menschlichem *in-vitro*-Darmsystem (Uni BN) und Blutkulturen (AG Higgins UKK) für die Entwicklung eines Point-of-Care-Detektionskits evaluiert und modifiziert.

### **AP 8) VanA-/VanB-ICT-Manuskript (UKK, Uni BN und UK FR, M21–M24)**

- Einreichung der Daten bei einer peer-reviewten Zeitschrift.

**Die folgenden Arbeitspakete AP 9 bis AP 12 wurden im Rahmen der VHB-Änderung vom April 2023 zu den AP 13 bis AP 15 geändert:**

### **AP 9) Entwicklung eines klinischen Datenblatts/CRF (UK FR, M17-19)**

- Entwicklung eines klinischen Datenblattes/CRF, das zu bestimmten Zeitpunkten des Krankenhausaufenthaltes (präklinisch, Aufnahme/präoperativ, postoperativ, klinischer

Infektionsverdacht, vor Beginn der Antibiotikabehandlung (oder -prophylaxe), Antibiotikabehandlungsphase) die Dokumentation der bisher verfügbaren klinischen Daten sowie der Ergebnisse mikrobiologischer, radiologischer etc. routinemäßiger Untersuchungen ermöglicht, auf deren Grundlage Entscheidungen zur Behandlung (oder Prophylaxe) getroffen werden. ***Dieses Arbeitspaket wurde in Absprache mit den Projektpartnern übersprungen (siehe Änderungsantrag UK FR, TTU 08.825, 15.09.2022).***

#### **AP 10) Entwicklung eines fortgeschrittenen HAARBI-Diagnoseberichts (UK FR, M20-22)**

- Entwicklung eines fortgeschrittenen HAARBI-Diagnoseberichts, der Daten enthält, die von den HAARBI-Diagnoseplattformen/-gruppen der TTU (AG Fabian Grein, AG Maria Vehreschild, AG Andreas Peschel, AG Jan Rupp und AG Can Imirzalioglu) generiert wurden, wie z. B. die Zusammensetzung der Mikrobiota von Darm, Haut und Urogenitaltrakt, Resistomanalyse, Schnelldiagnostiktests, Wirtsantwortprofilierung, NGS-Daten des verursachenden Erregers und neuartige Vorhersagemodelle. ***Dieses Arbeitspaket wurde im Einvernehmen mit den Projektpartnern übersprungen (siehe Empfehlung des Änderungsantrags UK FR, TTU 08.825, 15.09.2022).***

#### **AP 11) Rekrutierung von TIARA- oder Blutstrominfektionspatienten und retrospektive Auswertung durch ein verblindetes Expertengremium (UK FR, M35-43)**

- Fälle der TIARA-Kohorte (postoperative/chirurgische Infektionen) oder Patienten mit Blutstrominfektionen (identifiziert und gescreent über R-Net 2.0; angestrebte Stichprobengröße n=100) werden retrospektiv von einem verblindeten Expertenkomitee von Spezialisten für Infektionskrankheiten ausgewertet, das dann entscheidet, ob und wie die zusätzlichen Informationen des HAARBI-Berichts zur erweiterten Diagnostik das Gesamtmanagement (Antibiotikum, Behandlungsdauer, Fokuskontrolle, Interventionen) verändert hätten. ***Dieses Arbeitspaket wurde im Einvernehmen mit den Projektpartnern übersprungen (siehe Empfehlung des Änderungsantrags UK FR, TTU 08.825, 15.09.2022).***

#### **AP 12) Entwicklung, Design und Entwurf einer prospektiven Interventionsstudie TTU HAARBI (INTEGRATE 2) (UK FR, M44-46)**

- Entwicklung und Entwurf einer prospektiven Interventionsstudie TTU HAARBI (INTEGRATE 2), die darauf abzielt, die Auswirkungen der Integration fortgeschrittener Diagnostik in Kombination mit der Bewertung durch Spezialisten für Infektionskrankheiten auf die Patientenversorgung und die Ergebnisse zu untersuchen. ***Dieses Arbeitspaket wurde im Einvernehmen mit den Projektpartnern ausgelassen (siehe Empfehlung des Änderungsantrags UK FR, TTU 08.825, 15.09.2022).***

#### **WP 13) Entnahme von Blutproben von Patienten mit wahrscheinlicher Blutstrominfektion oder Sepsis. Sammlung epidemiologischer und klinischer Daten über Diagnostik, Behandlung und Ergebnisse dieser Patienten (UK FR, M1-18)**

- Patienten in der universitären Notaufnahme und hospitalisierte Patienten mit klinischen Anzeichen einer Blutstrominfektion oder Sepsis werden untersucht und Blutproben entnommen. Die Blutproben werden am Tag des Screenings und nach drei Tagen antimikrobieller Behandlung entnommen. Am Tag des Screenings und nach drei Tagen der antimikrobiellen Behandlung wird eine molekulare Diagnostik der Blutproben mit Hilfe von PCR-Techniken durchgeführt, um die verursachenden Erreger und die Erregerlast wahrscheinlich frühzeitig zu identifizieren. Detaillierte Informationen über Komorbiditäten, Infektionsherde, ursächliche Erreger, empirische und gezielte Therapien sowie den Verlauf und das Ergebnis im Krankenhaus werden erfasst. Klinische Tests wie SOFA, APACHE-II, NEWS-2 und Bloomy werden zur Bewertung des klinischen Verlaufs durchgeführt. Die endgültige Diagnose einer Blutstrominfektion oder Sepsis wird von einem ID-Spezialisten gestellt.

#### **WP 14) Erstellung von Host-Response-Profilen von Patienten mit wahrscheinlicher Blutstrominfektion oder Sepsis durch Transcriptomics (UK FR, M16-21)**

- Blutproben von Patienten, die in WP 13 gesammelt wurden, werden mittels Transkriptom-Analysen auf spezifische Wirtsreaktionen untersucht. Die Proben werden am Tag des Screenings und nach drei Tagen antimikrobieller Therapie entnommen (n=200). Die Analyse wird von dem Kooperationspartner Inflammatrix (Inflammatrix Inc. Burlingame, CA, USA) durchgeführt.

#### **WP 15) Biostatistische Analyse und Integration der Ergebnisse zur Erstellung von Prognosemodellen für ungünstige Ergebnisse bei Blutstrominfektionen und Sepsis (UK FR, M22-24)**

- Die Ergebnisse der Arbeitspakete 13 und 14 werden ausgewertet und analysiert, um Risikofaktoren zu identifizieren und Modelle zur frühzeitigen Vorhersage von Komplikationen oder ungünstigen Ergebnissen im Zusammenhang mit Blutstrominfektionen/Sepsis zu erstellen. Die biostatistische Analyse wird am Universitätsklinikum Freiburg durchgeführt.

### c) Wesentliche Ergebnisse und ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

#### **Universität zu Köln**

Insgesamt wurden 41 anti-VanA und anti-VanB Antikörper-produzierende Hybridom-Zelllinien generiert und bezüglich Stabilität, Produktivität und Spezifität durch ELISA, Western blotting und Durchflusszytometrie-Analysen näher charakterisiert. Dabei wurde auch die Bindung an den endogenen VanA/B Ligasen in entsprechend exprimierenden *E. faecium*-Lysaten untersucht. Daraus resultierten sieben anti-VanA-, vier anti-VanB und vier kreuzreaktive anti-VanA/B Antikörper, die aufgereinigt werden konnten (AP3). Für die Entwicklung eigener LFA-Prototypen mit den von uns generierten Antikörpern (AP4) wurden Materialien der Firma BioTeZ z.B. zur Goldpartikel-Konjugation verwendet. Es zeigte sich allerdings, dass die entsprechenden Protokolle der Firma nicht adäquat funktionierten. Aufgrund den Einschränkungen bedingt durch die COVID-19-Pandemie kam es zu erheblichen Verzögerungen im Versuchsablauf und das Personal-Budget des Teilprojektes war im Februar 2023 aufgebraucht. Aufgrund dessen konnte die Entwicklung von LFA-Prototypen mit den von uns generierten Antikörpern und die anderen Arbeitspakete nicht weiter bearbeitet werden (AP5-8). Die bisher erzielten Ergebnisse zum Teilprojekt wurden auf der 6ten internationalen Enterokokken-Konferenz in Porto, Portugal und der DGHM-Konferenz 2024 in Würzburg vorgestellt. Im Mai 2023 wurde am IMMIH mit der Firma Coris BioConcept die Kooperation zum VRE-Schnelltest erstmalig besprochen. Ein CDA zum vertraulichen Austausch von Forschungsergebnissen zwischen IMMIH und Coris BioConcept existiert. Aufgrund der Problematik bei der Detektion des VanB als Vancomycin-Resistenz Determinante wurden zwei neue Zielproteine näher charakterisiert auch im Hinblick auf eine mögliche Patentierung. Ein entsprechender FlexFund Antrag zur weiteren Finanzierung der VRE-Schnelltest-Entwicklung wurde nach Einarbeitung von Ergänzungen des HAARBI-Vorstandes und des DZIF-TPMO und ersten Vorversuchen zu den neuen Zielantigenen im Sept. 2024 eingereicht.

#### **Universitätsklinikum Freiburg**

Prof. Siegbert Rieg hat im September 2022 einen Antrag auf Änderung des Arbeitsplans gestellt, in dem eine Studie mit BSI Patienten und Transkriptom-Analysen durch einen industriellen Partner erfolgt. Gemäß angepasster VHB vom März 2023 handelt es sich bei der Transkriptom-Analyse um eine Dienstleistung im Sinne einer Auftragsvergabe. Der Rekrutierungsstart für die Erhebung der klinischen Kohorte (AP 13) war im Januar 2023. Im Rahmen dessen erfolgte bereits die Sammlung der Proben für AP 14. Die in den Meilensteinen erforderliche Probandenzahl für AP 13 wurde erreicht. Eine

Transkriptom-Analyse für mehr als 300 mRNA Targets, die in der Literatur mit Sepsis assoziiert wurden, liegt gegenwärtig für 63 Patient\*innen vor. Die Ergebnisse für weitere 60 Probanden sind derzeit im Zulauf. Aufgrund einer krankheitsbedingten temporären Einschränkung der Rekrutierungskapazität und einer krankheitsbedingten Verzögerung der Analysen durch den externen Partner wurde die angestrebte Zahl von 100 Host-response-Profil-Analysen für Tag 1 und weiteren 100 Analysen für Tag 3 verzögert erreicht. Die biostatistische Analyse steht daher gegenwärtig noch aus.

## Kapitel 2: Eingehende Darstellung (wird veröffentlicht)

### a) Ausführliche Darstellung der erzielten Ergebnisse im Einzelnen

Das allgemeine Ziel des Projekts war die Entwicklung eines Antikörper-basierten, schnellen VRE-Nachweisverfahrens, vorzugsweise eines LFA, und die Untersuchung der Auswirkungen früher diagnostischer Tests, die in das Patienten-Vorscreening integriert sind, um das klinische Management, die Verschreibung von Antibiotika und die Patientengesundheit zu verbessern. Die Verbundpartner (UKK Köln und UKK Freiburg) haben einen Kooperationsvertrag über die im Rahmen dieses Verbundprojektes erzielten Ergebnisse geschlossen.

#### **Uniklinik Köln**

Nach eingehenden bioinformatischen Analysen konnten die Zielproteine (rekombinante VanA- und VanB-Ligasen), die die Vancomycin-Resistenz in *E. faecium* vermitteln in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt werden (AP1). Die so erhaltenen rekombinanten Ligasen VanA / VanB jeweils mit und ohne S-/His-tag wurden zur Immunisierung von jeweils zwei Balb/c Mäusen nach unserem etablierten Immunisierungsprotokoll verwendet. Nach Generierung von insgesamt 3600 Hybridomaklonen aus den VanA- bzw. VanB-immunisierten Mäusen konnten zunächst 41 anti-VanA und anti-VanB Antikörper-produzierende Hybridom-Zelllinien bezüglich Stabilität, Produktivität und Spezifität durch ELISA, Western blotting und Durchflusszytometrie-Analysen näher charakterisiert werden. Dabei wurde auch die Bindung an den endogenen VanA/B Ligasen in entsprechend exprimierenden *E. faecium*-Lysaten untersucht (AP2). Daraus resultierten schließlich sieben anti-VanA-, vier anti-VanB und vier kreuzreaktive anti-VanA/B Antikörper, die aufgereinigt werden konnten (AP3). In ersten Versuchen zur Determinierung der Bindungscluster der anti-VanA und anti-VanB Antikörper an ihren korrespondierenden Antigenen durch sog. Kompetitions-Bindungsanalysen im ELISA zeigten sich Probleme bei der dafür notwendigen Biotinylierung einiger Antikörper (Verlust der Bindungsfähigkeit, Stabilität, Präzipitation der Antikörper). Aus diesem Grund wurde ein sog. Half-strip-LFA entwickelt, bei dem die Antikörper mit Gold konjugiert werden und ihre Bindung am Antigen auf Nitrocellulose durch nicht-konjugierten Antikörper kompetiert wird. Allerdings konnten diese Versuche aufgrund der hohen Kosten im Rahmen des Projektes nicht für alle Antikörper durchgeführt werden.

Im Verlauf des Projektes zeigte sich, dass im Gegensatz zur konstitutiven Expression des vanA-Gens in VanA-vermitteltem Vancomycin-resistentem *E. faecium* die VanB-vermittelte Vancomycin-Resistenz in *E. faecium* für einen VRE-LFA durch Vancomycin-Exposition für mindestens 3,5 Stunden induziert werden muss. Dies macht das Konzept eines Schnelltests zunichte, da ein zusätzlicher zeit- und materialaufwändiger Inkubationsschritt zum Nachweis von VanB erforderlich ist. Unseren vorläufigen Daten zufolge ist die VanA-Expression einiger klinischer VRE-Isolate sehr niedrig und möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze unseres prospektiven VRE-LFA. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir andere potentielle Zielantigene. Unsere Daten zeigten, dass diese Zielantigene konstitutiv

exprimiert werden und damit als alternative Zielproteine für VanA/B im VRE-Schnelltest dienen können, weil 1) sie ohne Vancomycin-Vorinkubation exprimiert werden und 2) bzgl. VanA- und VanB-induzierter Resistenz-Vermittlung voneinander unterscheidbar sind. Deshalb ist die Generierung von spezifischen Antikörpern gegen diese neuen Zielantigenen Bestandteil unseres VRE-FlexFund Antrages und eine Patentierung dieser Zielstrukturen in Kombination mit den Zielproteinen VanA und VanB für den VRE-LFA wird geprüft. Die Zielproteine VanA und VanB selbst unterliegen keinem Patentschutz mehr.

Die angestrebte Etablierung einer eigenen LFA-Prototypen-Entwicklung, um sich von den notwendigen Kooperationspartnern in dieser Phase unabhängig zu machen, wurden in 2024 nicht weiter verfolgt, wurden aber als Arbeitspakete im VRE-FlexFund Antrag definiert. Die angestrebte VRE-LFA-Prototypbewertung an klinischen Isolaten (AP5), die Evaluierung eines Prototypen an VRE im In-vitro-Darmsystem (in Kooperation mit AG Grein, Uni Bonn), und Patientenproben (AP6 & 7) konnten demzufolge nicht mehr im Projektzeitraum durchgeführt werden.

Aufgrund krankheitsbedingter Ausfälle 2021/22 und den Einschränkungen bedingt durch die COVID-19-Pandemie, insbesondere in der Maus-Tierhaltung kam es zu erheblichen Verzögerungen im Versuchsablauf und das Personal-Budget des Teilprojektes war im Februar 2023 aufgebraucht. Aufgrund eines Umzuges der Firma CorisBioConcept in neue Räumlichkeiten konnten Kooperationsgespräche mit der Firma bzgl. VRE- LFA-Prototypentwicklung erst im Mai 2023 aufgenommen werden. Aufgrund von Qualitätsproblemen bei der Herstellung von Antikörpern zum RESIST ACINETO (TTU 08.917) bei der von uns unterbeauftragten Firma Davids Biotechnologie GmbH mussten erhebliche zeitliche und finanzielle Ressourcen der Forschungsgruppe aufgewendet werden, um diese Probleme aufzuklären und dauerhaft zu lösen. Aus diesem Grund wurden weitere Kooperationsgespräche bzgl. VRE-LFA erst Ende 2023 wieder aufgenommen. Ein Umzug der Forschungsgruppe in ein neues Gebäude im April 2024 hat ebenfalls erhebliche Ressourcen gebunden.

### **Uniklinik Freiburg**

Im ursprünglich vorgesehenen Projektverlauf war die Durchführung einer Pilotstudie (Arbeitspakete 9 bis 12) geplant. In enger Abstimmung mit den Projektpartnern wurde jedoch – basierend auf dem genehmigten Änderungsantrag – aufgrund der nicht-Erreichbarkeit von vorherigen Arbeitspaketen auf diese verzichtet. Stattdessen wurde eine nicht-interventionelle Studie konzipiert, in deren Rahmen insgesamt 100 Patient\*innen mit Verdacht auf eine neu aufgetretene Sepsis oder Blutstrominfektion prospektiv untersucht wurden. Ziel dieser Studie war es, epidemiologische und klinische Routinedaten (z. B. diagnostische Befunde, therapeutische Maßnahmen und das klinische Management) systematisch zu erfassen. Diese Datenerhebung erfolgte bei Patient\*innen, die sich mit Sepsisverdacht in der Notaufnahme vorstellten, und wurde in einem eigens entwickelten elektronischen Case Report Form (eCRF) dokumentiert (Arbeitspaket 13).

Ergänzend zur Datenerhebung wurden bei den eingeschlossenen Personen zusätzliche Blutproben am Tag des Einschlusses sowie drei Tage später entnommen. Ziel war es, mittels Transkriptom-Analysen sogenannte Host-response-Profile zu erstellen, welche die wirtspezifische Immunreaktionen anhand der Expression von mehr als 300 spezifischen mRNA-Targets, die in der Literatur mit Sepsis assoziiert wurden, abbilden (Arbeitspaket 14). Durch diesen Ansatz konnten sowohl Frühphasenreaktionen zu Beginn der antiinfektiven Therapie als auch deren Veränderungen im weiteren Verlauf untersucht werden. Insgesamt sollten 200 Proben (jeweils 100 an Tag 1 und Tag 3) analysiert werden. Die Durchführung der Transkriptom-Analysen wurde als Auftragsleistung an einen externen Kooperationspartner (Inflammatix Inc.) vergeben.

Die aus den Transkriptomdaten gewonnenen Host-response-Profile werden derzeit mit den klinischen Verlaufsdaten korreliert, um Risikofaktoren für einen komplikativen Krankheitsverlauf oder ungünstige Behandlungsergebnisse – wie etwa eine sepsisassoziierte Mortalität – zu identifizieren. Auf Basis dieser

Erkenntnisse sollen prädiktive Modelle entwickelt werden, die eine frühzeitige Risikoabschätzung ermöglichen (Arbeitspaket 15). Die Auswertung erfolgt unter Einbeziehung biostatistischer Methoden.

Obwohl die angestrebte Zahl von 100 Patientinnen für Arbeitspaket 13 fristgerecht rekrutiert werden konnte, war es nicht möglich, bei allen Teilnehmenden Blutproben sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 für das Arbeitspaket 14 zu entnehmen. Gründe hierfür lagen vor allem in klinischen Verlegungen in andere Krankenhäuser, wodurch eine Nachverfolgung nicht mehr möglich war, sowie in der individuellen Ablehnung einer weiteren Blutentnahme durch einige Patient\*innen. Um dennoch die angestrebte Zahl vollständiger Datensätze zu erreichen, wurde die Rekrutierung über den ursprünglich geplanten Zeitraum hinaus fortgeführt. Da die Durchführung der Transkriptom-Analysen durch den externen Partner ebenfalls verzögert wurde, konnte die finale Auswertung des Arbeitspakets 15 bis zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen werden. Die Gesamtauswertung befindet sich derzeit in Bearbeitung und eine Veröffentlichung der Ergebnisse wird bis Ende Herbst 2025 angestrebt.

## b) Meilensteine und Liefergegenstände

### Meilensteine

| Nr. | Titel   | Arbeitspaket | Einrichtung         | Datum lt. Vorhabenbeschreibung | Korrigiertes Datum | Status           | Kommentar  |
|-----|---|--------------|---------------------|--------------------------------|--------------------|------------------|--|
| 1   | Hybridoma anti-VanAHis6 /- VanBHis6   | 2            | Universität zu Köln | 31.12.2021                     | 30.04.2022         | Erfüllt          |  |
| 2   | Prototype evaluation on recombinant VanAHis6 /- VanBHis6  | 4            | Universität zu Köln | 31.08.2022                     | 30.08.2024         | Nicht erreichbar | Die Entwicklung von Prototyp-LFAs in Kooperation mit Coris BioConcept ist im Rahmen unseres VRE-FlexFund Projektes geplant, indem unsere aufgereinigten anti-VanA/B Antikörper an die Firma gesendet werden. |
| 3   | Entwicklung eines Clinical data sheet/Case report files (UK FR, M17-19)   | 9            | Uniklinik Freiburg  |                                |                    | Nicht erreichbar | Siehe Änderungsantrag  |
| 4   | Entwicklung eines HAARBI advanced diagnostics report (UK FR, M20-22)  | 10           | Uniklinik Freiburg  |                                |                    | Nicht erreichbar | Siehe Änderungsantrag  |
| 5   | Rekrutierung von Patienten aus der TIARA Kohorte oder einer Blutstrominfektionskohorte und retrospektive Evaluation durch | 11           | Uniklinik Freiburg  |                                |                    | Nicht erreichbar | Siehe Änderungsantrag  |

|   |  |    |                    |            |            |                  |  |
|---|--|----|--------------------|------------|------------|------------------|--|
|   | ein ‚Blinded expert committee‘ (UK FR, M35-43)   |    |                    |            |            |                  |  |
| 6 | Entwicklung, Design und Erstellung Studienprotokoll für eine TTU HAARBI prospektive Interventionsstudie (INTEGRATE 2) (UK FR, M44-46)  | 12 | Uniklinik Freiburg |            |            | Nicht erreichbar | Siehe Änderungsantrag  |
| 7 | Collection of blood samples and epidemiological and clinical data of patients with early signs of bloodstream infection/sepsis         | 13 | Uniklinik Freiburg | 30.06.2024 | 14.05.2024 | erreicht         |  |
| 8 | Host response profiling of patients with probable bloodstream infection or sepsis by transcriptomics                                   | 14 | Uniklinik Freiburg | 30.09.2024 | 31.05.2025 | verzögert        | Durch Verzögerung der Rekrutierung und eine Verzögerung der Analyse durch die externe Firma wird der Meilenstein verzögert erreicht. |
| 9 | Biostatistical analysis and integration of results in prediction models for unfavourable outcomes in bloodstream infections and sepsis | 15 | Uniklinik Freiburg | 31.12.2024 | 30.10.2025 | verzögert        | Durch Verzögerung der Rekrutierung und eine Verzögerung der Analyse durch die externe Firma wird der Meilenstein verzögert erreicht. |

## Liefergegenstände

| Nr. | Titel   | Arbeitspaket | Einrichtung         | Datum lt. Vorhabenbeschreibung | Korrigiertes Datum | Status           | Kommentar   |
|-----|---|--------------|---------------------|--------------------------------|--------------------|------------------|---|
| 1   | Rec. VanAHis6 /-VanBHis6                              | 1            | Universität zu Köln | 30.06.2021                     |                    | Erfüllt          |   |
| 2   | Monoclonal Antibody purification and characterisation | 3            | Universität zu Köln | 30.04.2022                     | 30.06.2023         | Erfüllt          |   |
| 3   | Prototype evaluation on clinical isolates             | 5            | Universität zu Köln | 30.09.2022                     | 31.11.2024         | Nicht erreichbar | Die Entwicklung von Prototyp-LFAs ist im Rahmen unseres VRE-FlexFund Projektes geplant  |
| 4   | Prototype evaluation on patient samples               | 6            | Universität zu Köln | 31.12.2022                     | 30.06.2024         | Nicht erreichbar | Die Evaluierung von Prototyp-LFAs an Patienten Material wird in dieser Förderperiode nicht mehr erreichbar sein, ist aber Bestandteil unseres VRE-FlexFund Antrages |
| 5   | Point-of-care detection kit                           | 7            | Universität zu Köln | 28.02.2023                     | 31.10.2024         | Nicht erreichbar | Die Entwicklung eines POC wird in dieser Förderperiode nicht mehr erreichbar sein, ist aber Bestandteil   |

|    |  |      |                     |            |            |                  |  |
|----|--|------|---------------------|------------|------------|------------------|--|
|    |  |      |                     |            |            |                  | unseres VRE-FlexFund Antrages  |
| 6  | VanA /-VanB ICT manuscript   | 8    | Universität zu Köln | 28.02.2023 | 30.12.2024 | Nicht erreichbar | Aufgrund der Änderung bzw. Ergänzung der Zielantigene könnte sich eine Patentierbarkeit der Antigenkombination im VRE-LFA ergeben, die eine vorherige Publikation ausschließt. |
| 7  | Clinical data sheet/CRF developed  | 9    | Uniklinik Freiburg  | 30.09.2022 | 30.12.2024 | Nicht erreichbar | Siehe Änderungsantrag  |
| 8  | HAARBI advanced diagnostics report developed   | 10   | Uniklinik Freiburg  | 31.12.2022 | 30.12.2024 | Nicht erreichbar | Siehe Änderungsantrag  |
| 9  | First draft of a TTU HAARBI prospective interventional trial (INTEGRATE 2) completed | 11   | Uniklinik Freiburg  | 31.12.2024 | 30.12.2024 | Nicht erreichbar | Siehe Änderungsantrag  |
| 10 | Generating prediction models for unfavourable outcomes                               | WP15 | Uniklinik Freiburg  | 01.06.2025 | 31.10.2025 | verzögert        | Durch Verzögerung der Rekrutierung und eine Verzögerung der Analyse durch die externe Firma wird der Liefergegenstand verzögert erreicht.                                      |

## c) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

### Personalmittel

#### Uniklinik Köln

**Einsatz:** Personalmittel wurden antragsgemäß für 2 Jahre (03/2021-02/2023) für wiss. Mitarbeiterin (E9, 100 %) für die Bearbeitung der Arbeitspakete 1-8 verausgabt.

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

#### Uniklinik Freiburg

**Einsatz:** Personalmittel wurden gemäß Änderungsantrag für die AP 13-15 wie folgt verausgabt:

- **Studienarzt/-ärztin:** TV Ä1, St. 2, 25% über 24 Monate
- **Study Nurse:** E9a, St. 3, 20%, über 21 Monate
- **Biostatistiker:** E13, St. 3, 50% über 3 Monate
- **Wiss. Hilfskraft:** UKF-Tarif WiHi über insgesamt 7 Monate

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

### Sachmittel (auch Aufträge)

#### Uniklinik Köln

**Einsatz:** Verbrauchsmaterialien für die Aufreinigung von Antikörpern und rekombinanten Proteinen, für die ersten Etablierungsschritte eines laboreigenen LFA sowie für die Kultivierung und Charakterisierung der Hybridoma-Zellklone und produzierten Antikörper und die Tierkosten wurden sachgemäß verausgabt.

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

#### Uniklinik Freiburg

**Einsatz:** Verbrauchsmaterialien für die Probengewinnung (Blutproben) sowie Gelder für Probenversand und Auftragsleistung der externen Firma wurden sachgemäß verausgabt

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

### Investitionsmittel

#### Uniklinik Köln

**Einsatz:** nicht zutreffend

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

#### Uniklinik Freiburg

**Einsatz:** nicht zutreffend

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

## Reisekosten

### **Uniklinik Köln**

**Einsatz:** nicht zutreffend

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

### **Uniklinik Freiburg**

**Einsatz:** nicht zutreffend

**Sachverhalt:** nicht zutreffend

## d) Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

### **Uniklinik Köln**

Die Herstellung monoklonaler Antikörper mit hoher Spezifität, Affinität und Produktivität, um die Anforderungen an ein kommerzielles, antikörperbasiertes Detektionskit zu erfüllen, ist sehr aufwendig, zeitintensiv, teuer und erfordert viel Erfahrung im Selektionsprozess. Aufgrund der Auswirkungen der COVID-Pandemie konnten die gesteckten Ziele mit der auf zwei Jahre begrenzten Finanzierung nicht in Gänze erreicht werden. Eine Fortführung des Projekts und damit die Entwicklung eines VRE-LFA ist von der Finanzierung über den nachgeschalteten FlexFund Antrag abhängig.

### **Uniklinik Freiburg**

Die Analyse von Host-Response-Profilen im Kontext von Sepsis und/oder Blutstrominfektion ist ein Ressourcen- und Kostenintensiver Prozess. Da die für die Transkriptom-Analysen notwendigen Geräte (z.B. Nanostring nCounter) sowohl in Anschaffung als auch Unterhalt sehr teuer sind, inklusive hohe Kosten für die laufenden Analysen, wurde dies als Auftragarbeit an eine externe Firma vergeben. Ohne die notwendige Zuwendung wäre dies nicht möglich gewesen.

## e) Voraussichtlicher Nutzen des Vorhabens, insb. die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

### **Uniklinik Köln**

Trotz des verzögerten Projektablaufs wurden die anti-VanA/B monoklonalen Antikörper im Rahmen des Projektes generiert und konnten charakterisiert werden. Die Entwicklung und Prä-Validierung eines anti-VRE LFA-Prototypen wird ebenfalls angestrebt. Nach den bisherigen Gesprächen und mündlichen Vereinbarungen mit Beteiligung des Industriepartners Coris BioConcept (CDA & Letter-of-interest liegen vor) und unter der Prämisse, dass eine weitere Finanzierung über einen FlexFund Antrag bewilligt wird, kann die Entwicklung zu einem kommerziellen VRE-Schnelltest erfolgen. Technische Schwierigkeiten, wie beispielsweise die Expression der Ligase VanB durch eine notwendige Kultivierung in Vancomycin-haltigem Medium (sog. Transiente Antimikrobielle Resistenz), um den Antikörper-basierten Nachweis überhaupt zu ermöglichen (Sensitivität), werden durch die Ergänzung

der Zielantigene wie in Kapitel 2a ausgeführt gelöst werden können. Dies ist Bestandteil des bereits erwähnten VRE-FlexFund Antrages.

#### **Uniklinik Freiburg**

Die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse und des Prädiktionsmodells anhand der wirtsspezifischen Reaktionen wird neue Erkenntnisse im Bereich Sepsisdiagnostik und Management generieren mit dem Ziel Patient\*innen mit Sepsis früher zu identifizieren und das Management an das jeweilige prognostizierte Outcome anzupassen. Grundsätzlich sind die Ergebnisse somit auch von kommerziellem Interesse.

- f) Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

#### **Uniklinik Köln**

Mikrobiologie-Spezialisten des HAARBI-Koordinationsgremiums kontaktierten im Zuge der Begutachtung des VRE-FlexFund Antrages das konkurrierende LFA-Produktionsunternehmen NG Biotech (Frankreich), um Informationen darüber einzuholen, ob ein verbesserter VRE-Diagnostik-LFA angestrebt wird, als der, der zur Zeit als Prototyp auf der ECCMID 2022 von NG Biotech propagiert wurde. Sie erhielten jedoch keine klare Antwort, was vermuten lässt, dass das Problem mit der Vancomycin-Vorinkubation bei der angestrebten Detektion von *E. faecium* mit VanB-cluster von der Firma bisher nicht gelöst wurde.

#### **Uniklinik Freiburg**

Nicht zutreffend

- g) Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse nach Nr. 5 der Nebenbestimmungen für Zuwendungen (NABF/NKBF 2017)

#### **Uniklinik Köln**

Entgegen der ursprünglichen Aussage die Ergebnisse so bald wie möglich zu veröffentlichen, um Patentierungen durch andere Forschungsgruppen oder internationale Unternehmen zu verhindern, wird eine Patentanmeldung nun doch erwogen. Das werden wir im Rahmen des VRE-FlexFund Projektes weiter untersuchen und deshalb zunächst unsere Ergebnisse nicht in einer Fachzeitschrift publizieren. Die Uniklinik erteilte uns eine Freigabe für unsere Erfindungsmeldung.

#### **Uniklinik Freiburg**

Aufgrund des krankheitsbedingten temporären Einbruchs der Rekrutierungskapazität und der Verzögerung der Transkriptom-Analysen durch den externen Partner konnte eine abschließende

Auswertung der Daten bisher noch nicht erfolgen. Diese ist jedoch aktuell in Vorbereitung. Ein Abschluss der Auswertung mit Veröffentlichung der Ergebnisse wird für Ende Herbst 2025 erwartet.