

***Entwicklung einer  
proteomischen Anwendung für  
die Analyse multiresistenter  
bakterieller Isolate in der  
mikrobiologischen Diagnostik***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin  
vorgelegt von

Christian Blumenscheit  
2023



Diese Arbeit wurde am Robert Koch-Institut in der Abteilung ZBS: Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene im Fachbereich ZBS 6: Proteomik und Spektroskopie im Zeitraum Dezember 2018 bis Januar 2023 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Lothar H. Wieler

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag

Disputation am 28.04.2023

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Lothar H. Wieler und Herrn Prof. Dr. Rainer Haag für die fachlichen Anmerkungen und zielführenden Hinweise bei der Anfertigung des Manuskripts sowie für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Döllinger und Herrn Dr. Lasch, die es mir ermöglichten, mich in dieses spannende Projekt einzuarbeiten. Die vielen Tipps und Tricks waren bei meinen Arbeiten sehr hilfreich. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir sehr viel Freude gemacht.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ZBS 6 für die freundschaftliche Aufnahme bedanken. Vor allem möchte ich Frau Charlyn John danken, die mir oft im Labor beigestanden hat und mich hier unterstützte. Ich bin sehr dankbar für diese Zeit am Robert Koch Institut (RKI) und den Kolleginnen und Kollegen, die ich dabei kennenlernen durfte. Vor allem Herr Prof. Dr. Werner und Frau Dr. Pfeifer aus dem Fachgebiet 13 danke ich, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Freundin und meiner Familie möchte ich besonders danken, da sie mir in den schwierigen Phasen dieser Arbeit einfach nur beistanden, mich beim Korrekturlesen unterstützten oder darin bestärkten, an etwas Größerem mitzuarbeiten.

Ich danke auch allen, die mich auf diesem Weg durch andere Projekte oder Kooperationen begleitet haben, die hier nicht namentlich genannt sind und freue mich schon jetzt auf die weitere gemeinsame Zusammenarbeit.

## Selbständigkeitserklärung zur Abschlussarbeit

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir eingereichten schriftlichen Arbeit um eine von mir selbst und ohne unerlaubte Beihilfe verfasste Originalarbeit handelt. Ich bestätige überdies, dass die Arbeit als Ganze oder in Teilen nicht zur Abgeltung anderer Studienleistungen eingereicht worden ist. Die Dissertation ist in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche enthaltenen Bezüge auf fremde Quellen (einschließlich Tabellen, Grafiken u. Ä.) als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich nach bestem Wissen sowohl bei wörtlich übernommenen Aussagen (Zitaten) als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen anderer Autorinnen oder Autoren (Paraphrasen) die Urheberschaft angegeben habe.

Ich nehme zur Kenntnis, dass Arbeiten, welche die Grundsätze der Selbständigkeitserklärung verletzen – insbesondere solche, die Zitate oder Paraphrasen ohne Herkunftsangaben enthalten –, als Plagiat betrachtet werden können.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	4
Selbständigkeitserklärung zur Abschlussarbeit.....	5
Inhaltsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
Abkürzungen.....	12
Zusammenfassung.....	13
Abstract.....	14
Einleitung .....	15
Kenne deinen Feind: Die Entdeckung der Infektionskrankheiten .....	15
Wie werden bakterielle Infektionserreger bekämpft: Die Entwicklung von Antibiotika.....	16
Wie sich Bakterien gegen Antibiotika wehren .....	18
Werden multiresistente Erreger zur nächsten Pandemie? .....	19
Die klinisch mikrobiologische Diagnostik.....	21
Massenspektrometrie Systeme in der Klinik.....	24
MALDI-TOF MS.....	24
Flüssigchromatographie mit Tandem Elektrospray-Ionisierung Massenspektrometrie- Kopplung (LC-ESI-MS/MS) .....	25
Proteomik der Klinik.....	27
Zielstellung der Arbeit.....	29
Materialien und Methoden .....	30
Bakterielle Kultivierung .....	30
Metadaten der Isolate.....	31
Antimikrobielle Empfindlichkeitstests (AST) .....	39
PCR-basierter Nachweis von Resistenzgenen.....	39
NGS-basierter Nachweis von Resistenzgenen.....	39
Probenvorbereitung für die Proteomik.....	40
Herstellung der Lysate.....	40

Proteinverdauung .....	40
Probenentsalzung .....	42
Optimierter SPEED Workflow für klinische Proben .....	42
Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie .....	43
160 min Gradient mit micropillar C18 Säulen auf QE Plus .....	43
30 min Gradient mit gepackten C18 Säulen auf QE HF .....	44
Speziesbestimmung anhand von LC-MS <sup>1</sup> Daten.....	45
Identifizierung von Peptiden.....	45
Bestimmung von Antibiotikaresistenzen.....	46
Ergebnisse .....	48
Vergleich der Probenpräparation für die Proteomik.....	48
Tandem-Massenspektrometrie Messmethoden für die Klinik .....	54
Der erste Hinweis auf AMR-Nachweis mit LC-MS/MS-Daten .....	54
Datenanalyse .....	55
Carry-Over Problematik von LC Systemen .....	56
AMR-Erkennung innerhalb von 4 h mit DIA-Daten .....	58
MS <sup>1</sup> versus MS <sup>2</sup> basierte bakterielle Speziesbestimmung.....	66
<i>rawDIAtect</i> ein neuer Workflow für die bakterielle Proteomik .....	68
Bakterielle Diagnostik in unter 1 h.....	70
Citrobacter-Panel .....	72
Enterobacter-Panel .....	73
Escherichia-Panel .....	74
Klebsiella-Panel.....	75
Acinetobacter-Panel .....	76
Pseudomonas-Panel .....	77
Shigella-Panel .....	78
Morganellaceae-Panel.....	79
Enterococcus-Panel .....	80
Staphylococcus-Panel.....	81
Diskussion.....	82

Evaluation der Probenpräparation.....	82
Fazit zur Probenpräparation .....	85
Proteomik in der Klinisch-mikrobiologischen Diagnostik.....	86
Resistenzbestimmung .....	88
Speziesbestimmung .....	91
Ausblick .....	95
Wissenschaftliche Publikationen .....	97
Anhang.....	98
Referenzen.....	125

## Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> ZEITLEISTE DER ENTWICKLUNG VON ANTIBIOTIKA UND DER ENTSTEHUNG KLINISCH RELEVANTER AMR .....	18
<b>ABBILDUNG 2:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER ZELLE MIT ANTIBIOTIKA ZIEL UND RESISTENZ MECHANISMUS (MODIFIZIERT NACH ULUSEKER <i>ET AL.</i> 2021 [4]) .....	19
<b>ABBILDUNG 3:</b> ÜBERSICHT DER ESKAPE BAKTERIEN .....	20
<b>ABBILDUNG 4:</b> SCHEMATISCHE ABBILDUNG EINES MALDI-TOF SYSTEMS [1] .....	24
<b>ABBILDUNG 5:</b> DARSTELLUNG DER FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE AUF MS <sup>1</sup> EBENE (MODIFIZIERT NACH DANIEL <i>ET AL.</i> 2017 [2]) .....	25
<b>ABBILDUNG 6:</b> SCHEMATISCHER AUFBAU EINES ORBITRAPSYSTEMS .....	25
<b>ABBILDUNG 7:</b> BEISPIEL EINES MS <sup>2</sup> SPEKTRUMS .....	26
<b>ABBILDUNG 8:</b> AUFBAU OPENTRONS OT-2 FÜR DAS BEAST PROTOKOLL .....	41
<b>ABBILDUNG 9:</b> VERGLEICH VON SPEED BASIERTEN PROBENPRÄPARATIONEN UND DEREN CHARAKTERISTIKA .....	48
<b>ABBILDUNG 10:</b> VERGLEICH DER DURCHSCHNITTlichen AUSBEUTEN IN PROZENT VON REFERENZMETHODEN GEGEN DIE BEAD BASIERTE METHODE BEAST BEI EINEM INPUT VON 20 µG .....	50
<b>ABBILDUNG 11:</b> NANODROP ERGEBNISSE DER BASIC-SPEED PROBE <i>S. AUREUS</i> 3 NACH PIERCE ENTSALZUNG VOR UND NACH ZENTRIFUGATION BEI 20K X G FÜR 5 MIN .....	51
<b>ABBILDUNG 12:</b> VENN DIAGRAMM DER IDENTIFIZIERTEN PROTEINGRUPPEN MIT MINDESTENS 2 PRECURSOR ( <i>E. COLI</i> ) .....	52
<b>ABBILDUNG 13:</b> VENN DIAGRAMM DER IDENTIFIZIERTEN PROTEINGRUPPEN MIT MINDESTENS 2 PRECURSOR ( <i>S. AUREUS</i> ) .....	52
<b>ABBILDUNG 14:</b> VERTEILUNG DER ZELLULÄREN KOMPARTIMENTE VON GEFUNDENEN PROTEINEN IM VERGLEICH ZWISCHEN DEN PROTEOMISCHEN PRÄPARATIONSMETHODEN .....	53
<b>ABBILDUNG 15:</b> NACHGEWIESENE <i>E. COLI</i> PROTEINE IM <i>S. AUREUS</i> MS LAUF IN ABHÄNGIGKEIT ZU DEN WASCHLÄUFEN ZWISCHEN DIESEN .....	56
<b>ABBILDUNG 16:</b> MITTLERE INTENSITÄT DER GEMESSENEN <i>E. COLI</i> PROTEINE MIT MINDESTENS 2 PEPTIDEN IM <i>S. AUREUS</i> MS LAUF IN PROZENT IM VERGLEICH ZUM <i>E. COLI</i> MS LAUF IN ABHÄNGIGKEIT ZU DEN WASCHLÄUFEN ZWISCHEN DIESEN .....	57
<b>ABBILDUNG 17:</b> EMPFINDLICHKEIT / SPEZIFITÄT DES AMR-NACHWEISES DURCH PROTEOMIK AUF DER EBENE DER PROBE, DER ARZNEIMITTELKLASSE UND DER AMR-GENE .....	60
<b>ABBILDUNG 18:</b> VERGLEICH DER AMR-PROTEINFAMILIEN, DIE DURCH PROTEOMIK MIT HILFE DER VOLLSTÄNDIGEN CARD-SUCHE ENTDECKT WURDEN GEGEN PCR/SANGER-SEQUENZIERUNG .....	63
<b>ABBILDUNG 19:</b> VERGLEICH DER AMR-PROTEINFAMILIEN, DIE DURCH PROTEOMIK MITTELN WHITELISTED CARD-SUCHE GEFUNDEN WURDEN GEGEN PCR/SANGER-SEQUENZIERUNG UND NGS .....	65
<b>ABBILDUNG 20:</b> ANALYSESCHEMA VON RAWDIATECT .....	69
<b>ABBILDUNG 21:</b> SENSITIVITÄT/SPEZIFITÄT DES AMR-NACHWEISES DURCH DIE PROTEOMIK .....	71
<b>ABBILDUNG 22:</b> RAWDIATECT SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES CITROBACTER-PANELS .....	72
<b>ABBILDUNG 23:</b> RAWDIATECT SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES ENTEROBACTER-PANELS .....	73
<b>ABBILDUNG 24:</b> RAWDIATECT SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES ESCHERICHIA-PANELS .....	74
<b>ABBILDUNG 25:</b> RAWDIATECT SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES KLEBSIELLA-PANELS .....	75
<b>ABBILDUNG 26:</b> RAWDIATECT SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES ACINETOBACTER-PANELS .....	76
<b>ABBILDUNG 27:</b> RAWDIATECT SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES PSEUDOMONAS-PANEL .....	77
<b>ABBILDUNG 28:</b> RAWDIATECT SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES SHIGELLA-PANELS .....	78

<b>ABBILDUNG 29:</b> <i>RAWDIATECT</i> SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES MORGANELLACEAE-PANELS .....	79
<b>ABBILDUNG 30:</b> <i>RAWDIATECT</i> SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES ENTEROCOCCUS-PANELS.....	80
<b>ABBILDUNG 31:</b> <i>RAWDIATECT</i> SOWIE MS <sup>1</sup> SPEZIES-IDENTIFIKATION ERGEBNISSE DES STAPHYLOCOCCUS-PANELS.....	81
<b>ABBILDUNG 32:</b> ÜBERSICHT DES ZEITAUFWANDES VON PROTEOMISCHEN PROBENPRÄPARATIONSPROTOKOLLEN (OHNE VERDAU) ...	83
<b>ABBILDUNG 33:</b> ZEITAUFWAND VERSCHIEDENER METHODEN IN DER KLINISCHEN DIAGNOSTIK.....	86
<b>ABBILDUNG 34:</b> VERBESSERUNG DES <i>RAWDIATECT</i> WORKFLOWS DURCH OPTIMIERUNG DER EINZELNEN ARBEITSSCHRITTE.....	87
<b>ABBILDUNG 35:</b> ÜBERBLICK ÜBER DIE DETEKTIONSGENAUIGKEIT DES 1 H <i>RAWDIATECT</i> WORKFLOW NACH AMR DETERMINANTEN SORTIERT .....	89

## Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b> VERGLEICH VON RESISTENZBESTIMMUNGSMETHODEN IM KLINISCHEN EINSATZ .....	23
<b>TABELLE 2:</b> ÜBERSICHT ÜBER DIE IN DIESER ARBEIT BETRACHTETEN ISOLATE .....	30
<b>TABELLE 3:</b> METADATEN ACINETOBACTER PANEL.....	31
<b>TABELLE 4:</b> METADATEN ESCHERICHIA PANEL .....	32
<b>TABELLE 5:</b> METADATEN PSEUDOMONAS PANEL.....	33
<b>TABELLE 6:</b> METADATEN KLEBSIELLA PANEL.....	34
<b>TABELLE 7:</b> METADATEN CITROBACTER PANEL.....	35
<b>TABELLE 8:</b> METADATEN ENTEROBACTER PANEL.....	35
<b>TABELLE 9:</b> METADATEN SHIGELLA PANEL .....	35
<b>TABELLE 10:</b> METADATEN MORGANELLACEAE PANEL .....	36
<b>TABELLE 11:</b> METADATEN STAPHYLOCOCCUS PANEL .....	37
<b>TABELLE 12:</b> METADATEN ENTEROCOCCUS PANEL .....	38
<b>TABELLE 13:</b> ÜBERSICHT UND ERGEBNISSE VERSCHIEDENER PROTEOMISCHER PROBENVORBEREITUNGEN .....	49
<b>TABELLE 14:</b> AMR PROTEINE IN REDUZIERTER PRÄFERENZ CARD DATENBANK OHNE ISOFORMEN (AUSSCHNITT) .....	55
<b>TABELLE 15:</b> VERTEILUNG VON <i>E. COLI</i> <i>PRECURSOR</i> PRO PROTEIN MIT MINDESTENS 2 <i>PRECURSOR</i> UND DEREN DURCHSCHNITT ( $\emptyset$ ) IN ABHÄNGIGKEIT DER ANZAHL VON WASCHLÄUFEN.....	57
<b>TABELLE 16:</b> PROBENLISTE DER BAKTERIELLEN ISOLATE (KLINISCHE ISOLATE UND TRANSKONJUGANTEN) MIT METADATEN.....	59
<b>TABELLE 17:</b> VALIDIERUNG DER DURCH PROTEOMIK NACHGEWIESENEN ARZNEIMITTELKLASSEN MIT PHÄNOTYPISCHEM RESISTENZNACHWEIS .....	61
<b>TABELLE 18:</b> SPEZIESBESTIMMUNG MITTELS LC-MS/MS .....	67
<b>TABELLE 19:</b> AMR ESKAPE PANEL .....	70
<b>TABELLE 20:</b> VERDAUZEITEN SPEED BASIERTER PROTOKOLLE .....	83

## Abkürzungen

AGC	<i>Automatic gain control</i>
ACN	Acetonitril
AMR	Antimikrobielle Resistenz
ARO	<i>Antibiotic resistance ontology</i>
AST	<i>Antimicrobial susceptibility testing</i>
BeaST	<i>Bead-assisted SPEED treatment</i>
BLDB	<i>Beta-lactamase database</i>
BMD	<i>Broth microdilution</i>
CAA	2-chloroacetamide
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
DB	Datenbank
DDA	<i>Data dependent acquisition</i>
DIA	<i>Data independent acquisition</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ESBL	<i>Extended spectrum beta-lactamases</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.</i>
FA	Ameisensäure
fa-SPEED	<i>Filter-aided Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion</i>
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
GO-Terms	<i>Gene ontology terms</i>
HAI	<i>Healthcare acquired infections</i>
LC-ESI-	Flüssigchromatographie mit Tandem Elektrospray-Ionisierung
MS/MS	Massenspektrometrie-Kopplung
LC-MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie gekoppelt an eine Flüssigchromatographie
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight</i>
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
MDRO	<i>Multidrug resistant organisms</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRGN	<i>Multidrug resistant gram-negative bacteria</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MSA	Multipler Sequenz Alignment
NCE	<i>Normalized collision energy</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OT-2	<i>Opentrons 2</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRM	<i>Parallel reaction monitoring</i>
PTFE	Polytetrafluoroethylene
RKI	Robert Koch Institut
RT	Retentionszeit
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPSE	<i>Reverse phase solid extraction</i>
SPEED	<i>Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl) phosphine
TFA	Trifluoressigsäure
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Zusammenfassung

Multiresistente Erreger stellen laut WHO (*World Health Organization*) eine der 10 größten gesundheitlichen Bedrohungen der Menschheit dar [5-7]. Die effiziente Bekämpfung dieser Erreger ist von höchster Wichtigkeit für den Erhalt der modernen Medizin [8]. Dies kann durch eine genaue Erregeridentifizierung in Kombination mit rationaler Nutzung von Antibiotika erreicht werden. Um eine effiziente antimikrobielle Behandlung zu gewährleisten, ist neben der Resistenzbestimmung auch die Speziesbestimmung erforderlich. Momentan gibt es keine Methode in der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik, die beides vereint.

In der letzten Dekade kam es in der molekularen klinischen Diagnostik zu einigen revolutionären Entwicklungen. Darunter die Etablierung der „*Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight-Massenspektrometrie*“, kurz MALDI-TOF MS, welche eine schnelle, genaue und kostengünstige Speziesbestimmung in Kombination mit hohem Probendurchsatz ermöglicht [9, 10]. Diese wird mit molekularen Methoden wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erweitert, z.B. um antimikrobielle Resistenzen (AMR) zu detektieren. In der Regel werden jedoch weiterhin phänotypische Tests, wie die Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung (AST) zur Resistenzbestimmung durchgeführt, welche zeitaufwendig sind. Molekulare Detektionen sind schon länger Kandidaten in der klinischen-mikrobiologischen Diagnostik, vor allem um Protokolle zu ersetzen welche zusätzliche Schritte wie eine Anreicherung durch Anzucht oder sekundäre Inkubationen mit Antibiotika benötigen. Proteomik mittels Tandem-Massenspektrometrie gekoppelt an eine Flüssigchromatographie (LC-MS/MS) ist eine solche Technologie. Es wurde bereits gezeigt, dass die Detektion von Resistenzen durch die Analyse des Proteoms mittels LC-MS/MS möglich ist [11-15].

Der in dieser Arbeit entwickelte LC-MS/MS Workflow (*rawDIAtect*) ist in der Lage, die beiden wichtigsten Fragen der klinischen Mikrobiologie, nämlich Spezies- und Resistenzbestimmung, mittels Nutzung einer Methode zu beantworten und hat zudem das Potential auch weitere Fragestellungen, wie die Quantifizierung von Virulenzfaktoren, etwa von Toxinen, zu beantworten [16]. Der Workflow kann in weniger als einer 1 Stunde einen vollständigen Bericht über die Spezies sowie das Resistenzspektrum eines Isolates liefern. Die Kombination von LC-MS<sup>1</sup>-Daten zur Speziesbestimmung und der Einsatz von DIA-Auswertemethoden zur Resistenzbestimmung ist momentan einzigartig für die klinische MS-basierte Diagnostik. Anders als bei bisherigen Protokollen werden bei *rawDIAtect* nicht nur einzelne Antibiotikaresistenzen detektiert, sondern das gesamte Proteom aufgenommen. Der 1h-*rawDIAtect*-Workflow weist für ein Panel von 147 Bakterienisolaten bestehend aus 10 Gram-negativen sowie 2 Gram-positiven bakteriellen Spezies mit 30 AMR-Determinanten eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 99,3 % auf. Damit ist *rawDIAtect* ein vielsprechender Kandidat, die bakterielle Diagnostik Einzug zu finden.

## Abstract

According to the WHO (World Health Organization), multidrug-resistant pathogens are one of the 10 greatest threats to humanity [5-7]. The concrete and efficient control of these pathogens is of paramount importance for the preservation of modern medicine [8]. This can be achieved through accurate pathogen identification combined with rational use of antibiotics. To ensure efficient antimicrobial treatment, species identification is required in addition to resistance determination. Currently, there is no method in routine diagnostics that combines both.

The last decade has seen some revolutionary developments in molecular clinical diagnostics. These include the establishment of "matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry", or MALDI-TOF MS for short, which enables rapid, accurate and cost-effective species determination in combination with high sample throughput [9, 10]. This is extended with molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) to detect antimicrobial resistance (AMR). However, phenotypic tests such as antibiotic susceptibility testing (AST) are usually carried out further to determine resistance, which are time-consuming. Molecular detection has long been a candidate in clinical diagnostics, especially to replace protocols that require additional steps such as enrichment by culturing or secondary incubations with antibiotics. Proteomics using tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC-MS/MS) is one such technology. It has already been shown that the detection of resistance is possible by analysing the proteome using LC-MS/MS [11-15].

The LC-MS/MS workflow (rawDIAtect) developed in this work is able to answer the two most important questions in clinical microbiology, namely species and resistance determination, using one method and also has the potential to answer further questions, such as the quantification of virulence factors, for example of toxins [16]. The workflow can provide a complete report on the species as well as the resistance spectrum of an isolate in under 1 h. The combination of LC-MS<sup>1</sup> data for species identification and the use of state-of-the-art DIA evaluation methods for resistance determination is currently unique for clinical MS-based diagnostics. Unlike previous protocols, rawDIAtect not only detects individual antibiotic resistances, but also the entire proteome. The 1h-rawDIAtect workflow has a sensitivity of 93 % and a specificity of 99.3 % for 30 AMR determinants for a panel of 147 bacterial isolates across 10 Gram-negative and 2 Gram-positive bacterial species. This makes rawDIAtect a promising candidate to enter the field of bacterial diagnostics.

## Einleitung

### **Kenne deinen Feind: Die Entdeckung der Infektionskrankheiten**

Infektionskrankheiten waren schon früh in der Geschichte der Menschheit ein großes Problem. Viele Menschen starben an Krankheiten wie Schwindsucht (Tuberkulose), Cholera, Pocken oder Diphtherie. Es gab keine Heilung, und niemand wusste, was die Ursache der jeweiligen Krankheiten war. Erst Mitte des 19. Jahrhunderts hatten Wissenschaftler die Möglichkeit, Körperflüssigkeiten mit Hilfe von Mikroskopen oder Wachstumskulturen zu untersuchen [17].

Ignaz Semmelweis (1818-1865) stellte um 1847 fest, dass viele Frauen nach der Entbindung an Kindbettfieber verstarben. Ein großer Teil der behandelnden Ärzte führte direkt nach Autopsien Entbindungen durch, und Semmelweis schloss daraus, dass durch die Ärzte etwas übertragen werden musste. Als Konsequenz sollten sich die Ärzte vor der Entbindung die Hände desinfizieren. Diese Maßnahme verringerte die Sterblichkeit drastisch [18].

30 Jahre später entdeckte Louis Pasteur (1822-1895) im Blut kranker Frauen, die an Wochenbettfieber erkrankten, sogenannte pyogene Vibrionen [19]. Er postulierte, dass diese Mikroorganismen die Krankheit verursachten. In seinen Gärungsexperimenten konnte er zudem nachweisen, dass das Wachstum von Mikroorganismen kein spontanes Phänomen ist, sondern von äußeren Einflüssen abhängt [20]. Er erhitzte sterilisierte Kolben mit Nährmedium und verschloss sie luftdicht. Der Kolben hatte einen sehr langen Hals, der nicht erhitzt wurde. Wenn der Kolben ruhig stand, wuchsen keine Organismen, aber sobald der Kolben geöffnet wurde oder Flüssigkeit in den nicht sterilen Bereich gelangte, konnte Wachstum nachgewiesen werden.

Im gleichen Zeitraum bestätigte Robert Koch (1843-1910) die Keimtheorie mit seinen 4 Koch'schen Postulaten [21]. Er konnte Mikroorganismen von Menschen, welche an Milzbrand, verursacht durch *Bacillus anthracis*, erkrankt waren, kultivieren [22]. Wie Pasteur kam er zu dem Schluss, dass diese Keime für die Krankheit verantwortlich sein mussten. Die Koch'schen Postulate lauten:

1. Der Mikroorganismus muss in allen Organismen, die an der Krankheit leiden, reichlich vorhanden sein, sollte aber in gesunden Organismen nicht vorkommen.
2. Der Mikroorganismus muss aus einem erkrankten Organismus isoliert und in Reinkultur gezüchtet werden.
3. Der gezüchtete Mikroorganismus sollte eine Krankheit verursachen, wenn er in einen gesunden Organismus eingeführt wird.
4. Der Mikroorganismus muss von dem geimpften, erkrankten Versuchswirt reisoliert und als identisch mit dem ursprünglichen spezifischen Erreger identifiziert werden.

## Einleitung

Koch löste sich schnell von dem ersten Postulat, weil er asymptomatische Infektionen feststellte, bevor die Krankheit ausbrach. Heute wissen wir, dass dies bei vielen Infektionskrankheiten der Fall ist, zum Beispiel bei Bakteriurie [23]. Außerdem muss der Erreger nicht in großer Zahl im Körper vorhanden sein und kann daher nur schwer nachzuweisen sein.

Auch das zweite Postulat ist nicht auf alle Infektionen anwendbar, da Prionen beispielsweise nicht in Reinkulturen vermehrt werden können [24].

Auch beim dritten Postulat musste Robert Koch Verbesserungen vornehmen. Er änderte das "muss" in ein "sollte". Bei Tuberkulose- und Cholera-Infektionen stellte er fest, dass nicht alle Personen, die den Erregern ausgesetzt waren, erkrankten.

Die vier Postulate wurden unter dem Gesichtspunkt der bakteriellen Infektionen entwickelt und gelten für viele von ihnen noch immer. Sie ebneten den Weg zur Bekämpfung von durch Mikroorganismen hervorgerufenen Krankheiten und zum Verständnis dessen, was uns krank macht.

## Wie werden bakterielle Infektionserreger bekämpft: Die Entwicklung von Antibiotika

Lange Zeit war die Ursache von heute bekannten Infektionskrankheiten unbekannt, nun gab es den Beweis das Mikroorganismen, oft Bakterien, dafür verantwortlich sind. Aber wie können diese wirksam bekämpft werden?

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts verwendeten Rudolf Emmerich (1856-1914) und Oscar Löw (1844-1941) Pyocyanase aus dem Überstand von *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen, weil sie feststellten, dass diese das Wachstum anderer Bakterien hemmten. Die Behandlung mit dem Überstand war aufgrund der Toxizität von Pyocyanin für den Menschen nicht sehr erfolgreich. Streng genommen handelte es sich um ein Toxin und nicht um ein Antibiotikum [25].

Später entdeckte Paul Ehrlich (1854-1915) beim Anfärben von Gewebe an Tuberkulose Erkrankter, dass einige Färbemittel für Bakterien giftig waren, und machte sich auf die Suche nach der sogenannten "Wunderwaffe". Sein bester Wirkstoff war Salvarsan, eine Chemikalie auf Arsenbasis. Er und sein Team konnten 1909 dessen Wirksamkeit gegen Syphilis nachweisen [26]. Später verbesserte er zusammen mit Robert Koch und Emil von Behring (1854-1917) das Diphtherie-Antitoxin. Die Antitoxin-Therapie wurde von William Osler (1849-1919) beschrieben, sein "Antistreptokokken-Serum" wurde aus Pferden gewonnen, denen Bakterien aus septischen Blutkulturen injiziert wurden [27].

## Einleitung

Alexander Fleming (1881-1955) entdeckte 1928 das erste Betalaktam-Antibiotikum Penicillin und reinigte es auf. Interessant ist, dass andere Forscher bereits vorher Hinweise auf deren antibakterielle Wirkung fanden [28]. Sir John Scott Burdon-Sanderson (1828-1905) beschrieb 1870 die Wachstumshemmung von Schimmelpilzen auf Bakterien und Joseph Lister (1827-1912) fand heraus, dass *Penicillium glaucium* (sic) eine antibakterielle Wirkung auf infiziertes menschliches Gewebe hatte und die Entzündung zurück ging [29].

Zur gleichen Zeit erforschte Paul Ehrlich in Deutschland die antibakterielle Wirkung von Farbstoffen und synthetisierte 1908 Sulfanilamid in Kombination mit einem Farbstoff [30]. 1931 wurde Prontosil hergestellt, dass sich bei der Behandlung von Streptokokken-Infektionen bei Mäusen als wirksam erwies [31]. Schnell entdeckten die Wissenschaftler, dass der Sulfanilamid-Anteil von Prontosil der antibakterielle Wirkstoff war, nicht der Farbstoff. Prontosil wird in Sulfanilamid umgewandelt und ist der aktive Wirkstoff im menschlichen Körper [32]. Dies war das Ende der "prä-antibiotischen-Ära", in der es keine Behandlung gegen bakterielle Infektionen gab [33].

Es wurden viele verschiedenen Stoffe entdeckt oder entwickelt, die das Wachstum von Bakterien unterbinden sollten (**Abbildung 1**). Dies wurde durch 5 Hauptmechanismen erreicht, die hier mit wichtigen Vertretern jeder der relevanten Gruppen vorgestellt werden [34]:

- Störung der Zellwand-Synthese
  - Penicillin
- Zerstörung der Zellmembran
  - Colistin
- Störung der DNA-Replikation
  - Ciprofloxacin
- Unterbrechung der Protein-Synthese
  - Tetracyclin
- Metabolit-Blockierung
  - Sulfonamid

Diese Antibiotika werden weiterhin anhand ihres Wirkspektrums und ihrer Anwendung unterteilt [35]:

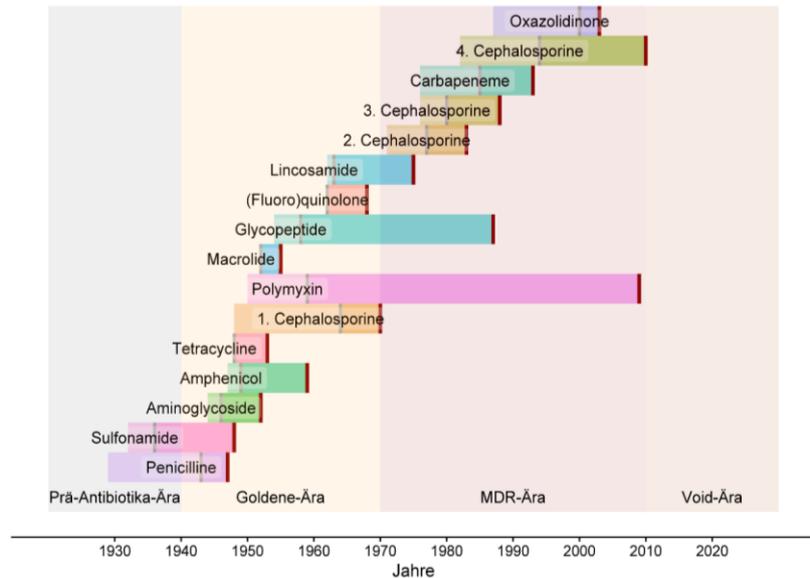
- enges Spektrum → meist Erreger-spezifisch und einfache Infektionen
- breites Spektrum → gegen mehrere Erreger und stärkere Resistenzen
- Reserve-Antibiotika → hoch resistente Erreger mit Virulenzen  
(vorbehalten für medizinische Notfälle [3])

## Einleitung

Durch diese Einteilung sollte verhindert werden, dass die effektivsten Antibiotika bei einfachen Infektionen verschrieben werden. Dieses Ziel wurde verfehlt. Reserve-Antibiotika werden in der Tierhaltung gegeben und bei Menschen werden Breitbandantibiotika bei viralen Infektionen eingesetzt [5-7]. Dadurch wurde die Entstehung von Resistenzen gegen diese Stoffe beschleunigt [36].

## Wie sich Bakterien gegen Antibiotika wehren

Von 1920 bis 1950 waren nicht viele antimikrobielle Mittel verfügbar. Unmittelbar nach dem Zweiten Weltkrieg begann die sogenannte "Goldene Ära", und es wurden viele weitere antimikrobielle Substanzen entdeckt. Doch so schnell, wie wir sie entdeckten, traten auch Resistenzen auf. Antimikrobielle Resistenzen, kurz AMR, sind ein großes Problem der modernen Medizin (Abbildung 1) [37].



**Abbildung 1:** Zeitleiste der Entwicklung von Antibiotika und der Entstehung klinisch relevanter AMR

Die farbigen Rechtecke zeigen die Entwicklung von antimikrobiellen Substanzen, beginnend mit deren Entdeckung bis hin zur klinischen Feststellung der ersten Resistenzen. Die grauen Balken markieren das Datum der Zulassung eines Medikaments dieser Substanz.

Bereits in den 1970er Jahren mehrten sich Berichte, wonach gängige Antibiotika ihre Wirkung bereits vollständig verloren hatten und oftmals zu Reserve-Antibiotika gegriffen wurde (MDR-Ära, **M**ulti **D**rug **R**esistance). Dazu zählen Carbapeneme und Cephalosporine gegen welche binnen weniger Jahre Resistenzen auftraten.

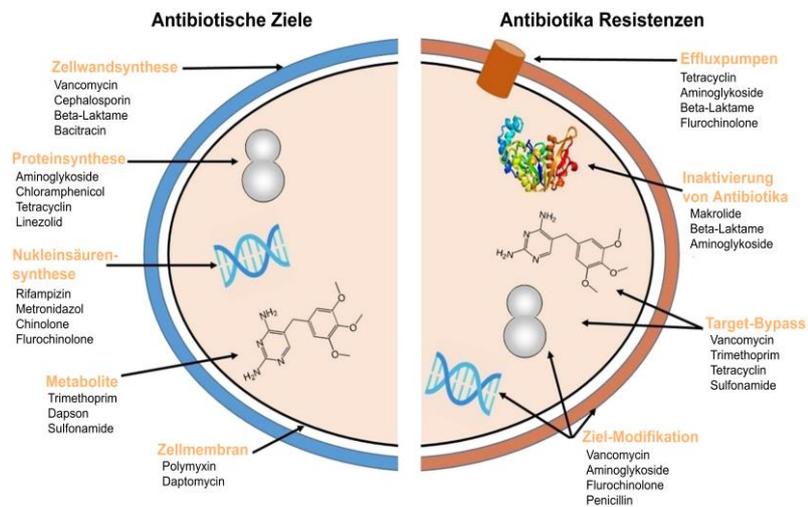
Bakterien haben dabei viele Möglichkeiten entwickelt antimikrobielle Stoffe abzuwehren (Abbildung 2). Ein Weg ist, es zu verhindern, dass die Stoffe überhaupt in die Zelle kommen, dabei können Schleimkapseln wie bei Klebsiellen oder Biofilme bei Pseudomonaden als Beispiel herangezogen werden [38, 39]. Diese Kapselgene sind hoch variabel, weswegen sie nicht regelmäßig getestet werden. Für die Detektion per PCR muss die genaue Sequenz bekannt sein und diese kann durch zufällige Punktmutationen verfälscht werden.

Efflux-Systeme sorgen für eine schnelle Ausfuhr von aktiven Stoffen aus der Zelle, diese Systeme sind meist nicht sehr spezifisch für einzelne Stoffe [40]. Da es nicht nur Efflux

## Einleitung

Systeme für Antibiotika gibt, sondern oft andere essentielle Systeme diese Aufgabe übernehmen, ist die Identifikation des richtigen System schwierig, weswegen selten gegen diese getestet wird [35].

Spezifischere Resistenzen sind vor allem die Inaktivierung von Stoffen oder die Modifikation des Ziels. Besonders sind die Beta-Laktame zu nennen, die meist noch im Periplasma von den Laktamasen zerstört werden, bevor sie wirken können [41]. Bei Aminoglykosid Resistenzen wird dabei die 16s RNA modifiziert, um dabei das Binden des Antibiotikums zu verhindern [42].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung einer Zelle mit Antibiotika Ziel und Resistenz Mechanismus (Modifiziert nach Uluseker *et al.* 2021 [4])

**Links:** Ziele von Antibiotika und deren Stoffe

**Rechts:** Resistenz Mechanismen und deren Stoffe

Bakterien zeichnen sich durch ihre hohe Reproduktion aus. Damit verbunden ist die Möglichkeit sich anzupassen. Punktmutationen oder die Aufnahme von Resistenzgenen von nicht infektiösen Bakterien sind dabei zu nennen. Ein großes Problem stellen dabei multiresistente Erreger dar. Diese können im schlimmsten Fall gegen alle möglichen Stoffklassen resistent sein. Aber wie konnte diese Wunderwaffe der Medizin innerhalb dieser kurzen Zeit ihre Wirkung verlieren?

### Werden multiresistente Erreger zur nächsten Pandemie?

Ein Grund ist der fehlerhafte Einsatz von Antibiotika in der Klinik, es werden entweder die falschen oder generell zu oft Antibiotika verschrieben [43]. Aber auch die Überbenutzung in der Tierhaltung als billige wachstumsfördernde Substanz ist ein Problem, wenn auch dieser Einsatz in Europa verboten ist, gilt dies nicht für Länder wie Thailand oder Indien [44]. Darüber hinaus herrscht auf mikrobieller Ebene seit Millionen von Jahren ein evolutionäres Rennen zwischen Pilzen und Bakterien. Bis auf wenige Antibiotika sind alle unsere Medikamente Analoge von natürlich vorkommenden Stoffen, weswegen evolutionär schon Resistenzen dagegen in der Umwelt existieren können [45]. Das Einspeisen von ungeklärten Abwässern in die Umwelt beschleunigt diese Entwicklung, vor allem da es noch keine Klärtechnik gibt,

## Einleitung

welche Antibiotika filtern könnte [46, 47]. All dies hat die Anzahl von Fällen nur gesteigert und zu der Schätzung geführt, dass wir im Jahr 2050 mehr Tode durch Infektionen zu erwarten haben als durch Krebs, eine beängstigende Prognose [48, 49]. Dieses Problem wird darüber hinaus dadurch verstärkt, dass immer weniger Antibiotika entwickelt werden (**Abbildung 1**, Void-Ära) [50].

Die WHO (*World Health Organization*) hat AMRs in die Top 10 der dringendsten Bedrohungen für Gesundheit der Menschen aufgenommen [6]. Um diese Infektionen wirksam zu behandeln, wird ein präziser und rationaler Einsatz von Antibiotika benötigt. Dies hängt jedoch von der genauen Erkennung klinisch relevanter Resistenzen ab [7, 8]. Der Schlüssel zu einer optimalen antimikrobiellen Therapie liegt in der korrekten Identifizierung der Spezies und einer zuverlässigen antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung (AST).

Insgesamt wurden 6 Bakteriengruppen als besonders zu beobachten erklärt, die **ESKAPE** Bakterien (**Abbildung 3**) [51]. Diese Bakterien ragen vor allem deswegen heraus, weil sie fast vollständig in der gesunden Flora des Menschen vorkommen [52]. Sie erhalten ihre Resistenzen meist über horizontalen Gentransfer oder besitzen bereits intrinsisch die Möglichkeit zu jedem Zeitpunkt gegen bestimmte Antibiotika resistent zu werden (*Escape-Mechanismus*) [53]. Damit stellen sie besondere Herausforderungen beim Nachweis. Darüber hinaus haben sie ein großes Potential gegen alle Antibiotikaklassen resistent (panresistent) und damit zu einer kaum bekämpfbaren Pandemie zu werden [54, 55].



**Abbildung 3:** Übersicht der ESKAPE Bakterien. In Blau sind die natürliche Besiedlungsorte der Bakterien, in Gelb die häufigsten Infektionsorte dargestellt.

Es gibt bereits Studien, vor allem aus Altenheimen, welche eine vollständige Durchseuchung von 3 MRGN (*multidrug resistant gram-negative bacteria*) zeigen [56-58]. Aber auch in Kindern wurden generell vermehrt MDRO (*multidrug resistant organisms*) gefunden [59]. Damit verbunden ist eine nicht zu unterschätzende Mehrbelastung des Krankensystems [60]. Durch die Corona-Krise kam es vermehrt zu einem hohen Austausch von Lebenserhaltungssystemen zwischen Patienten auf Intensivstationen, es konnte aber kein Anstieg von HAI (healthcare acquired infections) in Deutschland festgestellt werden [61]. Dennoch sind solche nosokomialen Infektionen ein großes Problem, vor allem für chronisch Kranke oder immunsupprimierte Patienten [62, 63]. Infektionen von MDRO wie Methicillin-

resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) können zu einer chronischen Infektion werden, welche schlechter heilt und zu einer höheren Belastung des Patienten führen kann [64]. Auch kann es zu höheren Infektionsraten bei Operationen kommen, da meist präventiv Antibiotika gegeben werden [65]. Damit stellen AMRs ein generelles Problem für unser universelles Gesundheitssystem dar und könnten dieses zum Erliegen bringen [66, 67].

Trotz vieler Versuche MDRO zu bekämpfen steigen die Zahlen solcher Fälle in Europa weiter [3, 55, 68]. Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien werden daher auch als eine „stille Pandemie“ bezeichnet, weshalb die konsequente Überwachung von Antibiotikaresistenzen einen klaren Blick auf das Problem bringen kann, welches uns in den kommenden Jahren erwarten wird [69]. Dazu ist eine klinisch-mikrobiologische Diagnostik nötig, welche sich an den Gegebenheiten und Möglichkeiten der Zeit orientiert [70].

### Die klinisch mikrobiologische Diagnostik

Um einen Patienten adäquat behandeln zu können, muss bekannt sein, welcher Organismus mit welchen Eigenschaften diesen befallen hat.

Die Erregerklassifizierung wurde, vor der Einführung der molekularen Detektionsmethoden, über die sogenannte Bunte Reihe durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein chemisches Verfahren, welches auf den Eigenschaften der Erreger beruht, bestimmte Substrate zu verstoffwechseln. Dieses Verfahren ist zwar bis heute ein Gold-Standard auf der Ebene der Erregerfamilie, ihm fehlt aber die nötige Tiefe, wie beispielsweise eine genauere Speziesbestimmung. Zusätzlich dazu werden auch Gram-Färbung und generelle mikroskopische Analysen durchgeführt, um Differenzialdiagnosen zu stellen [71]. Bei diesen Verfahren sind Zeit und viel Erfahrung gefragt.

Um diese Probleme zu lösen, werden größtenteils molekulare Detektionsmethoden verwendet, wie zum Beispiel die Massenspektrometrie, kurz MS. Dazu wird vor allem das „**Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight**-Massenspektrometrie“, kurz MALDI-TOF MS eingesetzt [72]. Diese Methode erlaubt es in kürzester Zeit ein bakterielles Pellet zu untersuchen. Mit den in der Klinik bereits etablierten Geräten können recht genau, und vor allem schnell, viele Proben am Tag gemessen werden [73]. Dies ist möglich, da die Probenvorbereitung sehr simpel ist. Es wird direkt mit dem Pellet gearbeitet und es muss keine primäre Extraktion durchgeführt werden [74]. Dadurch konnte sich die MALDI-TOF basierte Speziesbestimmungsmethode als Gold Standard durchsetzen und an ihr wird weiterhin viel geforscht vor allem die Integration von KI Technologien [75].

Um zu erkennen, welche Resistenzen der Erreger hat, wird ein Antibiogramm (AST) erstellt. Dazu werden die Erreger unter Antibiotikastress kultiviert und eine phänotypische Detektion

auf einer Agarplatte führt zum Ergebnis. Diese Hemmhöfe werden von Hand ausgelesen und können schwankende oder grenzwertige Aussagen liefern. Je nach Organismus kann ein solcher Versuch 24-48 h dauern [76].

Neue Methoden finden im *Broth-Micro-Dilution* (BMD) Format in 96er oder sogar 284er Mikrotiterplatten statt, aber auch diese können bis zu einem Tag dauern [77]. Sie beschleunigen dennoch die Analyse durch die extreme Parallelisierung des Versuches, da in einer Mikrotiterplatte mehrere Antibiotika mit unterschiedlichen Konzentration getestet werden können. Momentan gibt es nur *proof-of-concept* Studien, die von der Kultivierung unter Antibiotikastress abweichen.

Vermeintlich finden andere molekulare Ansätze in der Klinik ihre Anwendung. Dazu werden PCRs von bestimmten Leitresistenzen durchgeführt, um die Kultivierung zu unterstützen und die Isoform des Resistenzgens näher zu bestimmen. PCRs sind sensitiv und können an die Zielsequenz angepasst werden, darin liegt aber auch ihr Nachteil. Durch Mutationen oder Modifikationen könnten Primer nicht mehr binden oder die Funktion des Gens sich ändern, diese können Standard PCRs nicht entdecken [68]. Um dies abzudecken, werden solche PCR-Produkte vermehrt sequenziert, vor allem durch Sanger aber auch mit modernen NGS Methoden wie Nanopore [78]. Erweiterte NGS Ansätze wie *whole genome sequencing* (WGS) werden vor allem bei Ausbruchsanalysen durchgeführt, diese sind aber noch eine Ausnahme in der Routinediagnostik [79].

Es gibt auch recht neu entwickelte Resistenzbestimmungsmethoden, die auf bereits alten Technologien beruhen. Dazu gehören spektroskopische Verfahren wie FTIR (Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer) [80]. Spektroskope stellen höhere Anforderungen an das Personal weswegen sich IR-Geräte noch nicht weit verbreitet haben. Es gibt von Seiten der Industrie Bemühungen die IR Technik ähnlich der des MALDI-ToF Biotyper System als Gerät anzubieten [81].

In den letzten Jahren hat sich aber die Massenspektrometrie hervorgetan, eine Vielzahl von Protokollen und Geräten sind erschienen [11, 12, 75, 82-86]. Auch die Technik und Analysemethoden werden stetig verbessert [87-91]. In der Analyse von biologischen Proben sind MS Geräte universell anwendbar, zum Beispiel bei der Analyse von Blutplasma oder Biopsien [92-94]. Es wurden bereits Studien zur Resistenzbestimmung mittels MS publiziert, welche einzelne Resistenzen gezielt nachweisen können [11, 85, 95]. Bislang sind solche Methoden aber noch nicht für die Diagnostik angepasst. Die Geräte sind teuer, die Analysen komplex und Probenpräparationsprotokolle nicht optimal.

## Einleitung

Momentan besteht die bakterielle Diagnostik aus einer Vielzahl von Analysemöglichkeiten und Technologien (**Tabelle 1**) [70]. Das kann wertvolle Zeit für den Patienten kosten. Daher wird zur Beschleunigung der Analyse an neuen Methoden geforscht

Die ersten drei Methoden im oberen Teil der **Tabelle 1** sind die Referenzmethoden wie sie innerhalb großer Labore vorhanden sind und in Kombination verwendet werden. Die nachfolgenden Technologien im unteren Teil der **Tabelle 1** sind *proof-of-concept* Studien oder Erweiterungen der Referenzmethoden.

### **Tabelle 1:** Vergleich von Resistenzbestimmungsmethoden im klinischen Einsatz

Die oberen drei Methoden sind als Referenzmethoden in allen großen Laboren vorhanden und werden miteinander kombiniert angewendet. Bei den anderen Methoden handelt es sich um *proof-of-concept* Studien oder vereinzelt als Erweiterung der Referenzmethoden dazu gezogene Protokolle. Mit primärer Anzucht ist gemeint, wenn für das jeweilige Protokoll das Vermehren von Zellen benötigt wird und nicht aus Patientenmaterial gearbeitet wird. Eine sekundäre Anzucht ist die Inkubation mit Antibiotika. + Durch direkte Zugabe von Antibiotika während der Messung wird die Reaktion der Probe gemessen. \* Protokollbedingt ist die Messung von nativen Probenmaterial möglich.

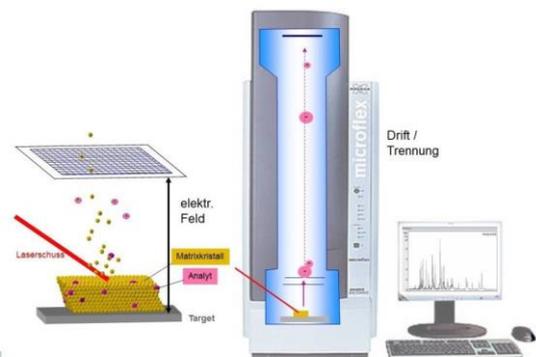
Technologie	Detektion Ebene	Primäre Anzucht	Sekundäre Anzucht	Methode	Vorteile	Nachteile	Referenz
<b>Antibiotika Plättchen oder Streifen Assay (AST)</b>	Phänotyp	X	X	Ausmessen von Hemmhöfen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Referenzmethode</li> <li>einfache Durchführung</li> <li>relativ schnell (24 h)</li> <li>MHK-Werte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ablesen ungenau</li> <li>mehrfache Anzucht, kaum zu parallelisieren</li> <li>Reinkulturen benötigt</li> </ul>	[96]
<b>Broth-Micro-Dilution (BMD)</b>	Phänotyp	X	X	Im Mikrotiterplatten Format, Nachweis von gehindertem Wachstum	<ul style="list-style-type: none"> <li>Referenzmethode</li> <li>schnell und genaue Angaben</li> <li>MHK-Werte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>limitiert durch Probenanzahl und Antibiotika, die auf Platte passen</li> <li>Reinkulturen benötigt</li> </ul>	[97]
<b>PCR</b>	Molekular	X		Amplifikation von Zielgenen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Referenzmethode</li> <li>schnell und günstig</li> <li>einfache Durchführung</li> <li>hoher Durchsatz</li> <li>automatisiert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ziele müssen ggf. neu angepasst werden,</li> <li>Isoformbestimmung meist nur über sek. Sequenzierung möglich (Sanger)</li> <li>Keine MHK-Werte</li> </ul>	[68, 98]
<b>NGS</b>	Molekular	X		Native Sequenzierung (Nanopore), Amplicon Sequenzierung (Illumina)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vollgenomanalyse</li> <li>leicht anpassbar</li> <li>bedingt MHK-Werte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA-Isolation</li> <li>teuer und relativ langsam</li> <li>anspruchsvollere Analyse</li> </ul>	[99]
<b>FTIR</b>	Molekular	X	(X) <sup>+</sup>	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie, Optische Mikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> <li>schnelle und genaue Angaben</li> <li>hoher Durchsatz</li> <li>geringer Probenpreis</li> <li>automatisiert</li> <li>bedingt MHK-Werte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>teure und spezialisierte Geräte</li> <li>anspruchsvollere Analyse</li> <li>Reinkulturen benötigt</li> </ul>	[68, 100, 101]
<b>MALDI-ToF MS</b>	Molekular	X	(X) <sup>+</sup>	Matrix-unterstützte Laser-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie	<ul style="list-style-type: none"> <li>schnelle Messung (~5 min)</li> <li>hoher Durchsatz</li> <li>geringer Probenpreis</li> <li>automatisierte Messung</li> <li>bedingt MHK-Werte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>teure und spezialisierte Geräte</li> <li>Daten oft verrauscht</li> <li>anspruchsvollere Analyse für MIC sek. Anzucht benötigt</li> </ul>	[83, 102-105]
<b>Target LC-MS/MS</b>	Molekular	(X) <sup>+</sup>		Flüssigchromatographie mit Tandem Massenspektrometrie-Kopplung	<ul style="list-style-type: none"> <li>schnelle Messung für MS (15-30 min)</li> <li>genaue Angaben</li> <li>hoher Durchsatz</li> <li>geringer Probenpreis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>teure und spezialisierte Geräte</li> <li>Protein-Isolation</li> <li>vordefinierte Ziele</li> <li>geringe Datentiefe</li> </ul>	[85, 95]
<b>DIA/DDA LC-MS/MS</b>	Molekular	(X) <sup>+</sup>		Flüssigchromatographie mit Tandem Massenspektrometrie-Kopplung	<ul style="list-style-type: none"> <li>genaue Angaben</li> <li>bedingt hoher Durchsatz</li> <li>geringer Probenpreis</li> <li>Vollproteomanalyse</li> <li>bedingt MHK-Werte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>teure und spezialisierte Geräte</li> <li>Protein-Isolation</li> <li>Messzeit Langsam für MS (1-6h)</li> <li>anspruchsvollere Analyse</li> <li>Datenbank abhängig</li> </ul>	[11, 16, 83, 85, 89]

### Massenspektrometrie Systeme in der Klinik

Die Massenspektrometrie (MS) hat bereits eine lange Geschichte. Vor 100 Jahren wurde von dem Deutschen Physiker Wilhelm Wien gezeigt, dass geladene Teile in einem Magnetfeld unterschiedlich stark abgelenkt werden. Der Britische Physiker J.J Thomson entwickelt daraufhin die ersten Massenspektrometer [106]. Darauf folgte eine stetige Verbesserung der Technik. MS Systeme werden heute in alle großen Industrien verwendet. Dazu gehören zum Beispiel Werkstofftechnik, Chemie, Pharmazie und Medizin. Letztere konzentrierte sich auf die Entdeckung neuer Wirkstoffe für Medikamente, vor allem durch Gaschromatographen Systeme (GC-MS). Aber auch in der Klinik wurden MS Systeme zum Teil schon vor der WGS verwendet und etabliert. Für die Detektion von Spezies im klinischen Umfeld hat sich insbesondere das „*Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight*“ Massenspektrometrie“, kurz MALDI-TOF MS durchgesetzt [72]. Aber auch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, kurz **LC-MS**, wird als sensitive Methode verwendet [107]. Besonders entscheidend für den klinischen Einsatz von MS Geräten ist die schnelle Datenaufnahme sowie robuste Probenpräparation, nachteilig bleibt der hohe Anschaffungspreis [89, 93, 107, 108].

#### MALDI-TOF MS

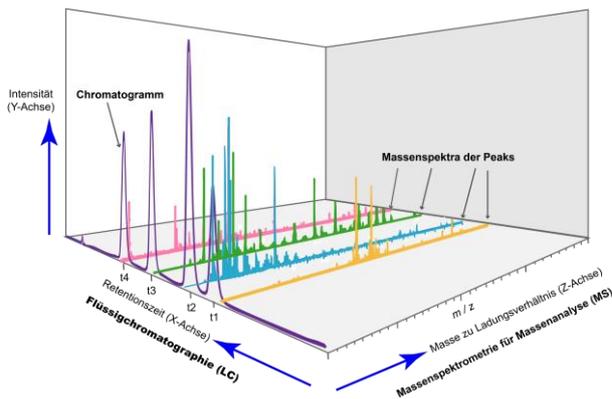
Das MALDI-TOF System baut auf der Ionisierung des zu detektierenden Materials durch einen Laser auf (**Abbildung 4**). Wodurch es robust ist und im Aufbau simpel bleibt. Dazu wird die Probe auf einen Stahlträger gebracht und mit einer Matrix, meist Säuren, gemischt. Die Säuren absorbieren die Lichtenergie und werden damit desorbiert. Die Protonen der Säure ionisieren die Analyten. Eine angelegte Spannung beschleunigt diese geladenen Teilchen, welche dann in Abhängigkeit ihrer Masse und Ladung durch ein Vakuum fliegen und auf einen Detektor prallen. Gemessen wird dabei die Flugzeit des geladenen Teilchens und in ein Masse zu Ladung ( $m/z$ ) Verhältnis umgerechnet, welches ein Spektrum ergibt. Die meisten MALDI-TOF Systeme, welche für die Bestimmung von Bakterien verwendet, werden haben keinerlei Separation der Probe vor der Ionisierung. Um eine bessere Auftrennung der zu messenden Moleküle zu erhalten, kann zum Beispiel eine Flüssigchromatographie (LC) durchgeführt werden.



**Abbildung 4:** Schematische Abbildung eines MALDI-TOF Systems [1]

## Flüssigchromatographie mit Tandem Elektrospray-Ionisierung Massenspektrometrie-Kopplung (LC-ESI-MS/MS)

In LC-MS/MS System werden sogenannte MS Spektren aufgenommen, welche in zeitlicher Abfolge, der Retentionszeit gemessen werden (**Abbildung 5**). Dazu wird die Probe mittels einer stationären Phase aufgetrennt. Die zu trennenden Stoffe können Proteine, Peptide, Metabolite und viele Weitere sein.



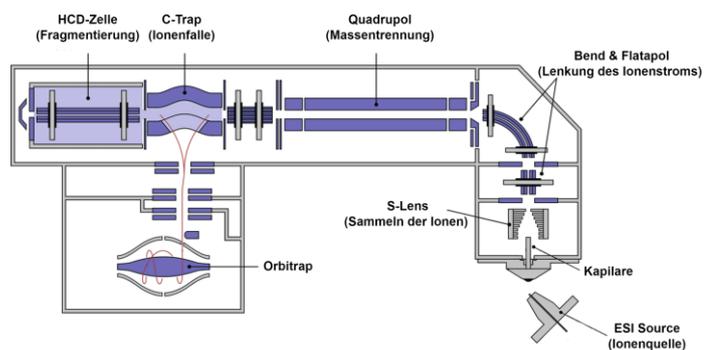
**Abbildung 5:**

Darstellung der Flüssigchromatographie auf MS<sup>1</sup> Ebene (modifiziert nach Daniel *et al.* 2017 [2])

Links (X-Achse) ist die Flüssigchromatographie (Chromatogramm) über die Zeit dargestellt. Jeder Peak im Chromatogramm ist ein MS<sup>1</sup> Spektrum mit Masse zur Ladung (Z-Achse), welche eine Intensität aufweist (Y-Achse).

Beispiel die TOF Methode oder das Orbitrapssystem, welches in dieser Arbeit verwendet wurde.

Das Orbitrap-Massenspektrometer (MS) ist ein hochauflösendes, massentaugliches Instrument, das den Bereich der analytischen Chemie revolutioniert hat (**Abbildung 6**). Es wird in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt, darunter Proteomik, Metabolomik und Umweltanalyse. Die einzigartigen Fähigkeiten der Orbitrap MS, einschließlich ihrer hohen Empfindlichkeit, Auflösung und Massengenauigkeit, haben sie zu einem Werkzeug für Forscher und Analytiker gemacht, die die chemische Zusammensetzung



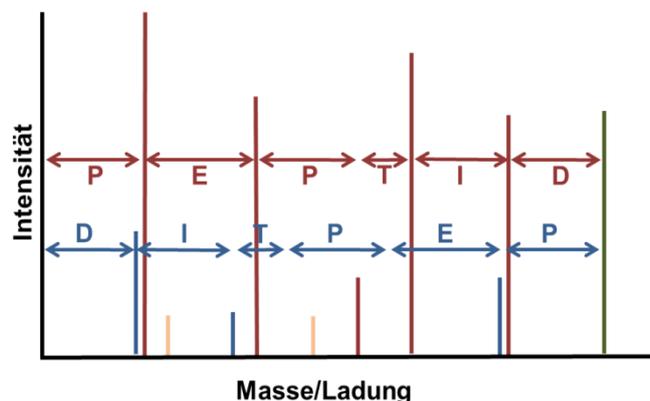
**Abbildung 6:** Schematischer Aufbau eines Orbitrap-Systems

## Einleitung

komplexer Proben verstehen wollen. Das Orbitrap-MS-System besteht aus mehreren Hauptkomponenten, einer Ionisierungsquelle, einem Massenanalysator und der Fragmentationszelle. Die Ionisierungsquelle ionisiert die Probenmoleküle in der Regel mit Methoden wie der Elektrospray-Ionisierung (ESI) oder der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisierung (MALDI). Die Ionen werden durch eine Linse zu einem Ionenstrahl gebündelt, welcher durch das Gerät gelenkt wird. Der Massenanalysator, der aus einer zylindrischen Elektrode, der sogenannten Orbitrap, besteht, trennt die Ionen auf der Grundlage ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses. Die Fragmentationszelle fragmentiert einzelne Moleküle durch ein Gas, damit diese später genauer analysiert werden können. Diese einzelnen Moleküle wurden durch den Quadrupol selektiert. Die C-Trap kann dann zu jedem Zeitpunkt Ionen oder Fragmente sammeln, bevor diese dann in die Orbitrap geleitet und gemessen werden.

Bei der Tandem Massenspektrometrie ist es möglich mehr Informationen über das messbare Molekül zu erhalten. Über ein Molekül mit einer bestimmten Masse zu Ladung im MS<sup>1</sup> Spektrum ist nur seine Masse sowie Retentionszeit bekannt, aber nicht seine genauere Zusammensetzung. Dies kann mit der Fragmentierung erreicht werden. Anhand der Bruchstücke kann die Zusammensetzung des Moleküls errechnet werden (**Abbildung 7**).

Im Fall von Peptiden brechen diese meist an der Peptidbindung in Fragmente, wobei je nach Bedingungen auch andere Bruchstellen möglich sind. Diese Ionen können an unterschiedlichen Stellen geladen und/ oder erneut gebrochen sein. Dies hat auch zur Folge das jedes Peptid je nach Abhängigkeit der Sequenzfolge, aber auch der Kollisionsenergie, unterschiedlich zerbricht. Zwei dieser Ionen Arten werden b-Ionen und y-Ionen genannt. Die b-Ionen werden vom N-Terminus und die y-Ionen vom C-Terminus bestimmt. Die



**Abbildung 7:** Beispiel eines MS<sup>2</sup> Spektrums

Dargestellt ist ein fragmentiertes Molekül (grün). Es handelt sich dabei um eine Peptide mit der Aminosäuresequenz (PEPTID). Durch die Fragmentierung zerfällt das Molekül in b-Ionen (braun) und y-Ionen (blau).

Ionen werden dabei nacheinander analysiert. Dazu wird an die ermittelte Masse zur Ladung des ersten Fragments (P), die des Zweiten (E) hinzugefügt. Gibt es nun ein Fragment, welches die Masse zur Ladung von (PE) aufweist, kann diese Kombination bestätigt werden.

Durch diese Bruchstellen-Kombinationen, die besondere Moleküle mit spezifischen Massenunterschieden erzeugen, ist es der LC-ESI-MS/MS möglich nicht nur die Massen zu

ermitteln, sondern auch die genaue Sequenz des Moleküls. Dadurch kann im Gegensatz zur *next-generation-sequencing* (NGS) nicht nur das potenzielle Proteom aus den Gendatenbanken errechnet, sondern auch das exprimierte Proteom direkt gemessen werden.

### Proteomik der Klinik

Unter Proteomik versteht man die Untersuchung der Gesamtheit der Proteine, ihrer Strukturen und ihrer Funktionen in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus [109]. Es handelt sich dabei um ein sich rasch entwickelndes Gebiet, das in den letzten Jahren dank technologischer Fortschritte in der Massenspektrometrie und anderen Analysetechniken erhebliche Fortschritte gemacht hat [110].

Ein zentrales Forschungsgebiet der Proteomik ist die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen und deren Wechselwirkungen, die für viele biologische Prozesse wesentlich sind. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Proteomik ist die Untersuchung posttranslationaler Modifikationen, d. h. chemischer Modifikationen, die an Proteinen vorgenommen werden, nachdem sie synthetisiert worden sind [111]. Diese Modifikationen können einen erheblichen Einfluss auf die Funktion von Proteinen haben und sind häufig an der Entstehung und dem Fortschreiten von Krankheiten beteiligt [112].

Die Proteomik hat auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der personalisierten Medizin gespielt, da sie die Identifizierung von Protein-Biomarkern ermöglicht, die zur Diagnose und Überwachung von Krankheiten sowie zur Ermittlung potenzieller therapeutischer Ziele verwendet werden können [113]. Insgesamt ist die Proteomik ein wichtiges Instrument für das Verständnis der Komplexität des Proteoms und seiner Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen und Krankheiten.

Die genaue Identifizierung der mikrobiellen Spezies und die korrekte Bestimmung des antimikrobiellen Resistenzmusters sind die entscheidende Grundlage dafür, eine angemessene Behandlung von Patienten, die an einer bakteriellen Infektion leiden, zu gewährleisten. Derzeit ist die Genomik die einzige "Omics"-Technologie, die systematisch für diesen Zweck untersucht wurde, obwohl die Analyse von Proteinen einige Vorteile bieten könnte, da sie eng mit dem Phänotyp verbunden ist. Im letzten Jahrzehnt hat eine Revolution in der klinischen mikrobiellen Routinediagnostik stattgefunden. Die MALDI-TOF MS ermöglicht heute eine schnelle, genaue und kostengünstige Biotypisierung bei hohem Probendurchsatz [9, 10].

Die Bestimmung von Antibiotikaresistenzen beruht immer noch hauptsächlich auf der Analyse von bakteriellem Wachstum in Gegenwart von Antibiotika. Dieser phänotypische Ansatz wird häufig durch den molekularen Nachweis von Zielgenen mittels Polymerase-Kettenreaktion

(PCR) ergänzt. Wegen der hohen Relevanz des Nachweises von Antibiotikaresistenzen werden derzeit viele verschiedene Methoden mit dem Ziel entwickelt, die Zeit bis zu einem Ergebnis zu verkürzen sowie die Genauigkeit zu verbessern [114, 115]. Diese Methoden lassen sich in zwei Hauptkategorien aufteilen.

Der erste Ansatz zielt auf die Verbesserung phänotypischer Methoden, indem die Empfindlichkeit des Nachweises des Bakterienwachstums unter verschiedenen Bedingungen und dadurch die Zeit bis zu einem Ergebnis verkürzt wird [116]. Der zweite Ansatz verwendet molekulare Analysen zur Vorhersage der Antibiotikaresistenz aus molekularen Signaturen und wird derzeit für NGS-Ansätze entwickelt [117].

Molekulare Analysen, bieten das Potenzial für eine genaue Vorhersage jedes bekannten Resistenzphänotyps ohne die Notwendigkeit einer parallelen Kultivierung in Gegenwart verschiedener Antibiotika. Theoretisch sollte die Analyse von Proteinen der Sequenzierung von Genen oder Transkripten überlegen sein, wenn es um die Vorhersage des Phänotyps geht, denn Resistenzen werden fast ausschließlich durch Proteine vermittelt [118]. Daher ist die Massenspektrometrie basierte Proteomik ein vielversprechender Kandidat für eine "One-for-all"-Lösung für die oben genannten Anforderungen in der klinischen Mikrobiologie [119].

Allerdings haben mehrere Einschränkungen den Durchbruch dieser Technologie bisher behindert. Der direkte Nachweis der Proteine, die Resistenzen verleihen, durch die *whole-cell-mass* Massenspektrometrie unter Verwendung der MALDI-TOF MS ist in Zukunft kaum vorstellbar [119]. Daher wird die MALDI-TOF MS derzeit für die phänotypischen antimikrobiellen Empfindlichkeitstests (AST) evaluiert [86, 104, 120, 121].

Die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bietet das Potenzial für den molekularen Nachweis aller bekannten AMR-Determinanten in Kombination mit der Identifizierung von bakteriellen Spezies. Bisher gibt es jedoch keinen solchen unvoreingenommener LC-MS/MS-Workflows. Stattdessen sind die Mehrheit der AMR-bezogenen Proteomik Studien auf die gezielte Analyse ausgewählter Peptide, die AMR-Determinanten darstellen, spezialisiert [11-15]. Darüber hinaus wurde die Durchführbarkeit der Shotgun-Proteomik für den AMR-Nachweis nur für bestimmte vordefinierte AMR Determinanten in Proben mit bekannten Speziesinformationen bewiesen [95, 122-124]. Die Ergebnisse dieser Studien sind sehr vielversprechend, da sie einige der AMR-Phänotypen anhand von Proteinen empfindlich nachweisen konnten und die Bestimmung von AMR-Phänotypen auf Grundlage von Proteomik basierter Diagnostik bestätigt haben. Andererseits wurde die ungezielte Proteomik noch nicht systematisch für eine unvoreingenommene AMR-Vorhersage angewandt, wahrscheinlich aufgrund erheblicher technischer Einschränkungen [125].

### Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Workflows, um die Proteomik als Methode in der klinischen Mikrobiologie zu evaluieren. Dazu wurde ein proteomischer Workflows etabliert, der die Identifizierung von Bakterienspezies und gleichzeitig die Erkennung von Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen ermöglicht. Momentan gibt es keine vergleichbare Diagnostik in der Klinik.

In folgenden Punkten sind die in dieser Arbeit gesetzten Ziele für die Konzipierung eines solchen Protokolls dargestellt.

1. Welche Probenpräparation sollte gewählt werden ? (Seite 48)
2. Kann die Datenunabhängige Messung mittels Flüssigchromatographischen Tandem-Massenspektrometrie antimikrobielle Resistenzen detektieren? (Seite 54)
3. Können AMR und Speziesbestimmung vereint werden? (Seite 56)
4. Wie müssen DIA-Daten ausgewertet werden? (Seite 55)

## Materialien und Methoden

### Bakterielle Kultivierung

Die Bakterien wurden aerob auf Blutagar bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden per Impföse in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Spezies befindet sich in **Tabelle 2**. Auf den kommenden Seiten sind die Metadaten der Isolate pro untersuchtes Panel zusammengefasst. Diese umfassen AMR-Determinanten, welche per PCR detektiert wurden sowie phänotypische Resistenzen mittels AST.

**Tabelle 2:** Übersicht über die in dieser Arbeit betrachteten Isolate

AMR-Panel	Spezies	Seite
<b>Acinetobacter</b>	<i>A. baumannii</i> , <i>A. radioresistens</i>	31
<b>Escherichia</b>	<i>E. coli</i>	32
<b>Pseudomonas</b>	<i>P. aeruginosa</i>	33
<b>Klebsiella</b>	<i>K. grimmontii</i> , <i>K. michigansis</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i>	34
<b>Citrobacter</b>	<i>C. freundii</i>	35
<b>Enterobacter</b>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>E. roggenkampii</i>	35
<b>Shigella</b>	<i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i>	35
<b>Morganellaceae</b>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia rettgeri</i>	36
<b>Enterococcus</b>	<i>E. faecium</i>	37
<b>Staphylococcus</b>	<i>S. aureus</i>	38

Die Gram-negativen Isolate enthielten verschiedene  $\beta$ -Laktamasen, darunter Carbapenemasen und *extended-spectrum-beta-lactamases* (ESBL). Einige Isolate trugen zusätzlich Aminoglykosid-Acetyltransferasen (AAC(6)-Ib-like) und Plasmid-vermittelte Colistin-Resistenz (Mcr-1). Die Enterokokken enthielten verschiedene Vancomycin-Resistenzgencluster (*vanA-Typ*, *vanB-Typ*) einschließlich Genen, die für eine VanA- bzw. eine VanB-Ligase kodieren. Die Staphylokokken enthalten entweder das Methicillin-vermittelnde Gen *mecA* oder *mecC*. Darüber hinaus verfügen einzelne Isolate das Virulenzgen *lukPV*.

### Metadaten der Isolate

Auf den nachfolgenden Seiten sind die Metadaten, der in dieser Arbeit nach Genus sortierten verwendeten Isolate, aufgetragen. Die Metadaten sind Resistenzdeterminanten und phänotypische Resistenzen sowie die dazugehörigen Studien.

Legende zum Phänotyp (Broth microdilution gemäß EUCAST v10.0 und VITEK 2 Karte AST N248):

AMP, Ampicillin; PIP, Piperacillin; PTZ, Piperacillin/Tazobactam; CTX, Cefotaxim, CAZ, Ceftazidim; CEF, Cefepim; FOX, Cefoxitin; MEM, Meropenem; IPM, Imipenem; ETP, Ertapenem; GEN, Gentamicin; TOB, Tobramycin; AMK, Amikacin; NAL, Nalidixinsäure; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol; CST, Colistin; FOS, Fosfomycin; TEI, Teicoplanin; TGC, Tigecyclin

(I) empfindlich, erhöhte Exposition/Dosierung; n.t. nicht getestet

**Tabelle 3: Metadaten Acinetobacter Panel**

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
<b>3/15</b>	<i>A. baumannii</i>	ST350	OXA-23, AAC(6)-Ib-cr	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, AMK,NAL,CIP,SXT, CMP, OTE, MEM		Pfeifer et al. MDR 2017 [ <a href="#">126</a> ]
<b>4/15</b>	<i>A. baumannii</i>	ST231	OXA-23	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, AMK,NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Pfeifer et al. MDR 2017 [ <a href="#">126</a> ]
<b>16/15</b>	<i>A. baumannii</i>	ST208	OXA-72	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK,NAL, STR, CIP, CMP, OTE, SXT, MEM		Pfeifer et al. MDR 2017 [ <a href="#">126</a> ]
<b>24/15</b>	<i>A. baumannii</i>	ST350	OXA-72, OXA-23, AAC(6)-Ib-cr			Pfeifer et al. MDR 2017 [ <a href="#">126</a> ]
<b>26/15</b>	<i>A. baumannii</i>	ST449	OXA-23, TEM			Pfeifer et al. MDR 2017 [ <a href="#">126</a> ]
<b>27/15</b>	<i>A. baumannii</i>	ST208	OXA-72			Pfeifer et al. MDR 2017 [ <a href="#">126</a> ]
<b>45/15</b>	<i>A. baumannii</i>	ST437	OXA-23, PER, AAC(6)-Ib-cr			Pfeifer et al. MDR 2017 [ <a href="#">126</a> ]
<b>149/12</b>	<i>A. baumannii</i>	ST437	OXA-23, AAC(6)-Ib-cr			Rieber et al. MDR 2017 [ <a href="#">127</a> ]
<b>155/12</b>	<i>A. baumannii</i>	ST208	ISAbal, OXA-80			Rieber et al. MDR 2017 [ <a href="#">127</a> ]
<b>180/12</b>	<i>A. baumannii</i>		OXA-23, PER-7-like			Rieber et al. MDR 2017 [ <a href="#">127</a> ]
<b>181/12</b>	<i>A. baumannii</i>	ST556	OXA-23, PER-1-like			Rieber et al. MDR 2017 [ <a href="#">127</a> ]
<b>188/12</b>	<i>A. baumannii</i>	ST208	ISabal, OXA-82, TEM-1			Rieber et al. MDR 2017 [ <a href="#">127</a> ]
<b>212/19-1</b>	<i>A. baumannii</i>		OXA-23, PER-1-like, AAC(6)-Ib-cr	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT		Einzelisolat Routine
<b>383/19</b>	<i>A. baumannii</i>		GES-11,OXA-66	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
<b>745/18</b>	<i>A. baumannii</i>		OXA-72, GES-11	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
<b>542/13</b>	<i>A. baumannii</i>	ST78pt/ST944ox	OXA-72, CTX-M-115, TEM-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Pfeifer et al. JAC 2016 [ <a href="#">128</a> ]
<b>5/15</b>	<i>A. radioresistens</i>		OXA-23	FOX		Savov et al JGAR 2016 [ <a href="#">129</a> ]

## Material und Methoden

**Tabelle 4: Metadaten Escherichia Panel**

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
607-16	<i>E. coli</i>	ST369	KPC-2, TEM-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , OXA-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	SRA Accession No. SRP153806	Schweizer et al. Front Mic 2019 [130]
212-17	<i>E. coli</i>	ST131	KPC-2, TEM-1	AMP, CTX, CAZ, NAL, CIP, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
128-16	<i>E. coli</i>	ST405	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
24-16	<i>E. coli</i>	ST744	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1, OXA-9, <i>aac(6')-Ib-cr</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
23-16	<i>E. coli</i>	ST6332	NDM-1, AAC(6), OXA-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
70-15	<i>E. coli</i>	ST101	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, CMY-4, OXA-2, <i>rmtB</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, SXT, MEM		Pfeifer et al. MDR 2017 [126]
700-18	<i>E. coli</i>		NDM-5, TEM, CTX-M	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, OTE, SXT, MEM	WGS (RKI/Regensburg)	RKI/Regensburg
2-10	<i>E. coli</i>	ST101	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1, OXA-2, <i>rmtC</i> , AAC(6)	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, OTE, SXT, MEM	WGS (RKI/Regensburg)	Pfeifer et al. AAC 2011 [132]
20-20	<i>E. coli</i>	ST38	OXA-244, CTX-M-14	AMP, CTX, CAZ, STR, SXT		Einzelisolat Routine
338-18	<i>E. coli</i>		TEM, <i>mcr-1</i> , <i>qnrS</i>	AMP, STR, NAL, CMP, OTE, CIP, SXT, COL	WGS GÜCCI 2019	GÜCCI Studie 2019
865-18	<i>E. coli</i>		TEM, <i>mcr-1</i>	AMP, COL	WGS GÜCCI 2019	GÜCCI Studie 2019
607-16	<i>E. coli</i>	ST369	KPC-2, TEM-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , OXA-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	SRA Accession No. SRP153806	Schweizer et al. Front Mic 2019 [130]
212-17	<i>E. coli</i>	ST131	KPC-2, TEM-1	AMP, CTX, CAZ, NAL, CIP, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
128-16	<i>E. coli</i>	ST405	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
24-16	<i>E. coli</i>	ST744	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1, OXA-9, <i>aac(6')-Ib-cr</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
23-16	<i>E. coli</i>	ST6332	NDM-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
70-15	<i>E. coli</i>	ST101	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, CMY-4, OXA-2, <i>rmtB</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, SXT, MEM		Pfeifer et al. MDR 2017 [126]

**Tabelle 5: Metadaten Pseudomonas Panel**

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
64-15-2	<i>P. aeruginosa</i>		VIM-2,OXA-1			Pfeifer et al. MDR 2017 [126]
24-11	<i>P. aeruginosa</i>		GIM-1, OXA-2	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, AMK,NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Rieber et al. JAC 2012 [133]
613-16	<i>P. aeruginosa</i>		VIM-2	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM	WGS (RKI/Regensburg)	RKI/Regensburg
230-10	<i>P. aeruginosa</i>		VIM-2, VEB-1-like, OXA-10	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
1005-14	<i>P. aeruginosa</i>		VIM-2, PER-1, OXA-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		SARI Studie
47-09	<i>P. aeruginosa</i>		VIM-28	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
369-11	<i>P. aeruginosa</i>		VIM-6, aacA4, OXA-10	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
163-21	<i>P. aeruginosa</i>		VIM-2	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Ausbruchsisolat
434-17	<i>P. aeruginosa</i>		IMP-15, aacA4	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
81-10	<i>P. aeruginosa</i>		IMP-13	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
82-10	<i>P. aeruginosa</i>		IMP-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
48-09	<i>P. aeruginosa</i>		IMP-16, AAC(6)	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN,NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
21-12	<i>P. aeruginosa</i>		VEB-1, OXA-10	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
40-14	<i>P. aeruginosa</i>		IMP-7, AAC(6). OXA-2	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, NAL, STR, CIP,CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine

**Tabelle 6: Metadaten Klebsiella Panel**

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
543-13	<i>K. grimmoniti</i>	ST172	VIM-1, OXY-6-2, LAP, OXA-10, ACC-1, <i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Ib-like</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, NAL, STR, CIP, CMP, SXT, MEM	WGS GÜCCI 2020	GÜCCI Studie 2020
98-08	<i>K. michiganensis</i>	ST202	VIM-1, OXY1-1, <i>qnrS1</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, STR	WGS GÜCCI 2020	GÜCCI Studie 2020
52-07	<i>K. oxytoca</i>	ST2	VIM-1, OXY2-8, <i>qnrS1</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, NAL, CIP, CMP, OTE, STR, MEM, SXT	WGS GÜCCI 2020	GÜCCI Studie 2020
675-15	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	CTX-M-15, SHV-28, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , OXA-1, <i>mgrB-STOP</i> , TEM-1	AMP, CTX, CAZ, KAN, STR, NAL, CIP, SXT, COL	LIB 1308; TNR218121	Becker et al .Front Mic 2018 [134]
670-15	<i>K. pneumoniae</i>	ST48	CTX-M-15, CTX-M-27, SHV-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , OXA-1, TEM-1		LIB1324; TNR216611	Becker et al .Front Mic 2018 [134]
653-15	<i>K. pneumoniae</i>	ST101	CTX-M-15, TEM-1, SHV-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , OXA-1, OXA-9, <i>ompK35-STOP</i>		LIB 1332; TNR210967	Becker et al .Front Mic 2018 [134]
656/15	<i>K. pneumoniae</i>	ST37	CTX-M-14, SHV-11		LIB1299; TNR211465	Becker et al .Front Mic 2018 [134]
652-15	<i>K. pneumoniae</i>	ST15	CTX-M-15, SHV-28, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , OXA-1, <i>mgrB-STOP</i> , TEM-1	AMP, CTX, CAZ, KAN, STR, NAL, CIP, SXT	LIB 1295; TNR210935	Becker et al .Front Mic 2018 [134]
55-16	<i>K. pneumoniae</i>	ST405	CTX-M-15, SHV-76, <i>ompK35-STOP</i> , TEM-1		LIB 1650; TNR222237	Becker et al .Front Mic 2018 [134]
1080-16	<i>K. pneumoniae</i>	ST39	KPC-2, NDM-1, SHV-1, CMY-4	AMP, FOX, CTX, CAZ, AMK, GEN, KAN, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [134]
62-07	<i>K. pneumoniae</i>	ST333	VIM-1, CTX-M-14, SHV-1, CMY-4	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, OTE, SXT, MEM	WGS GÜCCI 2020	GÜCCI Studie 2020
404-08	<i>K. pneumoniae</i>		VIM-4, TEM-1, SHV-1, CTX-M-15, AAC(6), CMY-4, OXA-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, NAL, STR, CIP, CMP, OTE, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
154-19	<i>K. pneumoniae</i>		SHV, CTX-M, OXA-232, OXA-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrS</i> , TEM-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
132-21	<i>K. pneumoniae</i>		SHV, <i>mcrB</i> -Insertion	COL		Colistin-Studie
291-21	<i>K. pneumoniae</i>		SHV, <i>qnrS</i> , CTX-M-1-group, <i>mgrB</i> -Insertion	COL, AMP, CTX, CAZ, CMP, NAL, SXT		Colistin-Studie
49-11	<i>K. pneumoniae</i>	ST2292	VIM-1, SHV-5	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, AMK, NAL, CMP, CIP, MEM, SXT	WGS GÜCCI 2020	GÜCCI Studie 2020
164-10-1	<i>K. pneumoniae</i>	ST101	VIM-4, TEM, CTX-M-15, OXA-1, SHV-28, AAC(6)	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, CMP, OTE, CIP, MEM, SXT	WGS GÜCCI 2020	GÜCCI Studie 2020
716-18	<i>K. pneumoniae</i>	ST340	TEM, SHV, <i>mcr-8.1</i>	COL, AMP, FOX, STR, NAL, CMP, CIP, SXT	WGS GÜCCI 2019	GÜCCI Studie 2019
674-15	<i>K. quasipneumoniae</i>	ST414	CTX-M-15, <i>qnrS1</i> , OKP-A-5	AMP, CTX, CAZ, NAL, STR, CIP, SXT	LIB 1307; TNR37980	Becker et al .Front Mic 2018 [134]
156-09	<i>K. quasipneumoniae</i>	ST1647-1LV	VIM-1, SHV-12, OKP-A-5	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, STR, MEM	WGS GÜCCI 2020	GÜCCI Studie 2020

**Tabelle 7: Metadaten Citrobacter Panel**

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
608-16	<i>C. freundii</i>	ST29	KPC-2, TEM-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , OXA-1, <i>qnrB2</i> , OXY, CMY	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	SRA Accession No. SRP153806	Schweizer et al. Front Mic 2019 [130]
20-16	<i>C. freundii</i>	ST104	NDM-1, TEM-1, CTX-M-15, OXA-1, OXA-9, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , CMY	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	PRJEB34353	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
231-20	<i>C. freundii</i>		VIM-2, TEM, SHV-12, GES-11	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, NAL, STR, CIP, CMP, OTE, SXT	no WGS done	Einzelisolat Routine

**Tabelle 8: Metadaten Enterobacter Panel**

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
629-16	<i>E. cloacae</i>	ST231	NDM-1, CTX-M-15, TEM-1, OXA-1, OXA-9, ACT-7, AAC(6)	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, STR, NAL, CIP, SXT, MEM	SRA Accession No. SRP153806	Weber et al. Front Mic 2019 [131]
733-14	<i>E. cloacae complex</i>		TEM, CTX-M-14-like, OXA-9, <i>aacA4</i> , <i>qnrA</i> , VIM-4, OXA-4, ACT	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, OTE, SXT	PRJEB34353	Einzelisolat Routine
92-09	<i>E. hormaechei</i>	ST104	VIM-1, SHV-12, <i>qnrA</i> , TEM, ACT	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, NAL, CIP, CMP, STR, MEM, SXT	Keine WGS-Daten	GÜCCI Studie 2020
506-15	<i>E. hormaechei</i>	ST65	VIM-1, OXA-1, <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrA7</i> , ACT	AMP, FOX, CTX, CAZ, KAN, NAL, CMP, OTE, STR, MEM, SXT		GÜCCI Studie 2020
485-17	<i>E. roggenkampii</i>		VIM-1, <i>qnrS</i>	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, NAL, CIP, CMP, OTE, STR, SXT		GÜCCI Studie 2020

**Tabelle 9: Metadaten Shigella Panel**

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
457/19-1	<i>S. sonnei</i>		CTX-M-14			
667/17	<i>S. sonnei</i>		CTX-M-3			
701/18	<i>S. sonnei</i>		CTX-M-15			
796/15	<i>S. sonnei</i>		TEM-1, CTX-M-15			
547/13	<i>S. boydii type 2</i>		TEM-135, CTX-M-15			

**Tabelle 10:** Metadaten *Morganellaceae* Panel

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
57-15	<i>Proteus mirabilis</i>		NDM-1, DHA-1, CTX-M-15, OXA-1, <i>aacA4</i> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , TEM-1			Pfeifer et al. MDR 2017 [126]
52-15	<i>Proteus mirabilis</i>		VIM-1, TEM-1, SHV-12, CMY-99, OXA-9nf, <i>accA4</i> , <i>armA</i>		WGS (RKI/Regensburg)	Pfeifer et al. MDR 2017 [126]
695-17	<i>Proteus mirabilis</i>		KPC-2, TEM-1, <i>qnrB</i> , <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , OXA-1, ACC-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, NAL, STR, CIP, CMP, SXT, MEM		Einzelisolat Routine
175-09	<i>Proteus mirabilis</i>		VEB-5, DHA, <i>qnrD</i> , <i>aac(6′)-Ib-like</i> , OXA-1	AMP, FOX, CTX, CAZ, GEN, KAN, AMK, STR, OTE, SXT		Einzelisolat Routine
71-15	<i>Providencia rettgeri</i>		NDM-1, VEB-1-like, CMY-6, OXA-1, <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>aacA4</i> , <i>armA</i>			Pfeifer et al. MDR 2017 [126]

**Tabelle 11:** Metadaten Staphylococcus Panel

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
21-00140	<i>S. aureus</i>	CC398		BEN, ERY		
21-00185	<i>S. aureus</i>	CC30		BEN		
21-00208	<i>S. aureus</i>	ST15		BEN		
21-00227	<i>S. aureus</i>	CC30		ERY, FUS		
21-00288	<i>S. aureus</i>	CC121		BEN, FUS		
21-00292	<i>S. aureus</i>	ST97				
21-00332	<i>S. aureus</i>	CC8		BEN, ERY		
21-00354	<i>S. aureus</i>	CC22		BEN, CIP, FUS, MOX		
21-00363	<i>S. aureus</i>			BEN, TET, DAP		
21-00444	<i>S. aureus</i>	ST152		BEN		
21-00047	<i>S. aureus</i>	CC5, ST225	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-00053	<i>S. aureus</i>	CC5, ST225	<i>mecA</i>	BEN, OXA, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-00090	<i>S. aureus</i>	CC22	<i>mecA</i>	BEN, OXA, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-00194	<i>S. aureus</i>	CC22	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, CLI, CIP, FOS, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-00352	<i>S. aureus</i>	CC22	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MOX, DAP, CXI, OXA, SUL		
21-00033	<i>S. aureus</i>	CC30	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, TET, CXI, OXA, SUL		
21-00102	<i>S. aureus</i>	CC5	<i>mecA</i>	BEN, OXA, CXI, OXA, SUL		
21-00130	<i>S. aureus</i>	CC8	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-00155-2	<i>S. aureus</i>	ST772, CC1	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, TET, CIP, TRS i, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-00158	<i>S. aureus</i>	CC398	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, CLI, TET, CXI, OXA, SUL		
21-00529	<i>S. aureus</i>	CC398	<i>mecA</i>	BEN, OXA, GEN, TET, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-01371	<i>S. aureus</i>	CC398	<i>mecA</i>	BEN, OXA, TET, CXI, OXA, SUL		
21-01557	<i>S. aureus</i>	CC398	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, CLI, TET, CXI, OXA, SUL		
21-00593	<i>S. aureus</i>	CC398	<i>mecA</i>	BEN, OXA, CLI, TET, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-01484	<i>S. aureus</i>	CC398	<i>mecA</i>	BEN, OXA, ERY, CLI, TET, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-00579	<i>S. aureus</i>	ST130	<i>mecC</i>	BEN, OXA, CXI, OXA, SUL		
21-01256	<i>S. aureus</i>		<i>mecC</i>	BEN, OXA, CXI, OXA, SUL		
21-01319	<i>S. aureus</i>	ST130	<i>mecC</i>	BEN, OXA, CIP, MOX, CXI, OXA, SUL		
21-01323	<i>S. aureus</i>	ST130	<i>mecC</i>	BEN, OXA, ERY, CXI, OXA, SUL		
21-01568	<i>S. aureus</i>	ST599	<i>mecC</i>	BEN, OXA, CXI, OXA, SUL		

**Tabelle 12:** Metadaten Enterococcus Panel

ID	Spezies	Stamm	Resistenzdeterminanten	Resistenzen	WGS	Studie
UW12913	<i>E. faecium</i>	CC398	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW13358	<i>E. faecium</i>	CC30	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW14004	<i>E. faecium</i>	ST15	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW14657	<i>E. faecium</i>	CC30	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW16158	<i>E. faecium</i>	CC121	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW16517	<i>E. faecium</i>	ST97	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW17459	<i>E. faecium</i>	CC8	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW18273	<i>E. faecium</i>	CC22	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW19185	<i>E. faecium</i>		<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW19484	<i>E. faecium</i>	ST152	<i>vanB</i> ; <i>vanRB</i> ; <i>vanSB</i>			
UW12673	<i>E. faecium</i>	CC5, ST225	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW12718	<i>E. faecium</i>	CC5, ST225	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW13072	<i>E. faecium</i>	CC22	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW13532	<i>E. faecium</i>	CC22	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW13991	<i>E. faecium</i>	CC22	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW14142	<i>E. faecium</i>	CC30	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW15094	<i>E. faecium</i>	CC5	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW16069	<i>E. faecium</i>	CC8	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW17739	<i>E. faecium</i>	ST772, CC1	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW19605	<i>E. faecium</i>	CC398	<i>vanA</i> ; <i>vanRA</i> ; <i>vanSA</i>			
UW12819	<i>E. faecium</i>	CC398				
UW13291	<i>E. faecium</i>	CC398				
UW13408	<i>E. faecium</i>	CC398				
UW14883	<i>E. faecium</i>	CC398				
UW15795	<i>E. faecium</i>	CC398				
UW16369	<i>E. faecium</i>	ST130				
UW17278	<i>E. faecium</i>					
UW18010	<i>E. faecium</i>	ST130				
UW19211	<i>E. faecium</i>	ST130				
UW19305	<i>E. faecium</i>	ST599				

### Antimikrobielle Empfindlichkeitstests (AST)

Die antimikrobielle Empfindlichkeit aller Isolate wurde mit Hilfe der Broth Microdilution (BMD) und der VITEK 2 Karte AST N248 gemäß DIN58940 und den EUCAST-Leitlinien v10.0 ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)) bestimmt. Insgesamt wurden 19 Antibiotika getestet: Ampicillin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefoxitin, Cefepim, Meropenem, Imipenem, Gentamicin, Amikacin, Tobramycin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Fosfomycin, Tigecyclin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Colistin. Zusätzlich wurde für ausgewählte Isolate ein ETEST® mit Imipenem und Ertapenem (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) durchgeführt. Die AST von Enterokokken und Staphylokokken Isolaten wurde mit BMD und gemäß den EUCAST-Standards und -Leitlinien bestimmt. Für Isolate, die keinen klinischen Breakpoint haben, wurden entsprechende ECOFF-Werte verwendet, um die Wildtyp-Population von der Nicht-Wildtyp-Population (= resistent) zu unterscheiden. Diese Daten wurden von der Fachgruppe 13 in Wernigerode erhoben.

### PCR-basierter Nachweis von Resistenzgenen

Das Vorhandensein verschiedener Beta-Laktamasegene wurde mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung unter Verwendung von Primern und Protokollen bereits publizierter Studien getestet [135-137]. Darüber hinaus wurde das PCR-Screening und die anschließende Sanger-Sequenzierung auf Gene, die zur Resistenz gegen Aminoglykoside (*aac(6)-Ib-like*) und Colistin (*mcr-1*) beitragen, wie in den folgenden Studien durchgeführt [138, 139]. Das Vorhandensein von Vancomycin-Resistenzgenclustern wurde durch den Nachweis der entsprechenden Ligase-Gene *vanA* und *vanB* mittels Multiplex-PCR nach einem akkreditierten internen Protokoll bestimmt [140]. Der Nachweis von Methicillin-Resistenz, vermittelt durch die Gene *mecA* und *mecC*, wurde mittels Multiplex-PCR nach einem internen Protokoll bestimmt [141]. Diese Daten wurden von der Fachgruppe 13 in Wernigerode erhoben.

### NGS-basierter Nachweis von Resistenzgenen

Zur Erstellung von Genomen wurden die öffentlich verfügbaren Illumina-Sequenzdaten verwendet. Diese Short-Reads wurden mit *fastp* (v0.23.1, <https://github.com/OpenGene/fastp>) gefiltert [142]. Die Genome wurde mit *unicycler* (v0.5.0, <https://github.com/rwick/Unicycler>) mit der *short-read-only* Methode mittels *spades* (v3.15.4) erstellt [143, 144]. Die Klebsiellengenome wurden mit *Kleborate* (v2.2.0, <https://github.com/katholt/Kleborate>) auf AMRs untersucht [145]. Für alle anderen Genome wurde *abricate* (v1.0.0, <https://github.com/tseemann/abricate>) mit der CARD Datenbank (v3.2.1) verwendet.

### Probenvorbereitung für die Proteomik

#### Herstellung der Lysate

Die Bakterien wurden für die Massenspektrometrie mittels *Probenvorbereitung durch einfache Extraktion und Verdauung* (SPEED), vorbereitet [89]. Die Bakterienzellen wurden mit einer Impföse entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und 5 min lang bei 5.000 x g pelletiert. Die Pellets wurden in Trifluoressigsäure (TFA) (Optima® LC/MS, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) resuspendiert (Probe/TFA 1:4 (v/v)) und 3 min lang bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 2M Tris-Base unter Verwendung des 10-fachen Volumens von TFA neutralisiert und nach Zugabe von Tris(2-Carboxyethyl)phosphine (TCEP) in einer Endkonzentration von 10 mM und 2-Chloracetamid (CAA) in einer Endkonzentration von 40 mM für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Trübungsmessungen bei 360 nm (1 AU = 0,67 µg/µL) mit dem NanoPhotometer® NP80 (Implen, Westlake Village, Kalifornien, Vereinigte Staaten) bestimmt. Zu beachten ist, dass die Trübungswerte geräteabhängig sind, für weitere Details siehe Döllinger *et al.* 2020 [89].

#### Proteinverdauung

Für eine proteomische *bottom-up* Untersuchung müssen die Proteine in Peptide verdaut werden, hierfür wurde in der Arbeit Trypsin verwendet. Die zwei Enzyme Trypsin Gold und Rapid Trypsin (Promega, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten) fanden Verwendung in dieser Arbeit.

#### Basic-SPEED

Proteine wurden in Suspension bei einem Gesamtvolumen von 200 µl schüttelnd bei 400 RPM im Thermomixer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) verdaut. Der Trypsin Gold Verdau wurde in der 1:10 TFA:2M-Tris Lösung im Protein/Enzym-Verhältnis (w/w) von 50:1 bei 37°C für 20 h verdaut. Für den Rapid Trypsin Verdau wurde die gewünschte Menge an Protein in 50 µl 1:10 TFA:2M-Tris gelöst und mit 100 µl Rapid Digestion Buffer verdünnt. Der Verdau fand im Protein/Enzym-Verhältnis (w/w) von 10:1 bei 70°C für 1 h statt. Beide Peptidlösungen wurden mit 10 µL 10 % TFA auf einen pH-Wert von ~2 angesäuert und die Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer® NP80 (Implen, Westlake Village, CA) gemessen (A280nm).

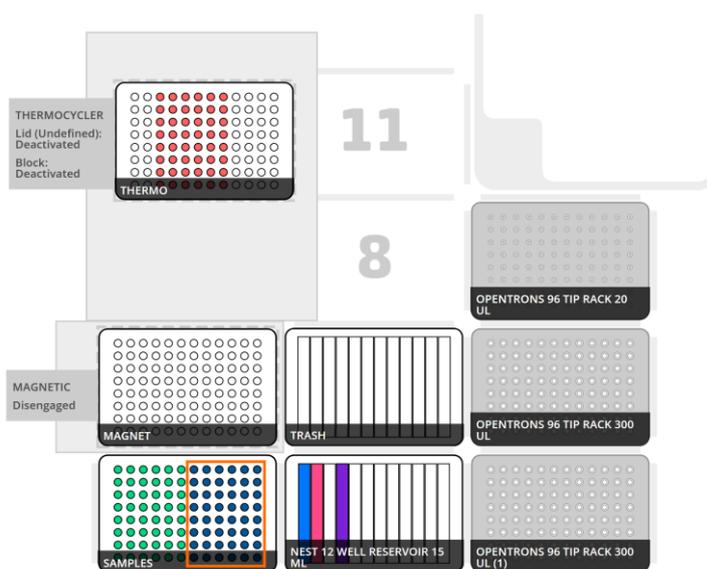
#### Filter aided SPEED (fa-SPEED)

Proteine wurden, um eine Endkonzentration von 80 % Aceton (v/v) zu erhalten, mit Aceton (Uvasol® für die Spektroskopie, Merck, Darmstadt, Deutschland) gemischt und anschließend auf einen Ultrafree-MC PTFE-Membranfilter 0,2 µm (Merck Millipore, Burlington, MA) pipettiert. Der Filter wurde 2 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min lang bei 5000 x g zentrifugiert. Die Proben wurden nacheinander mit 200 µL 80-%igem Aceton, 180 µL

Aceton und 180  $\mu\text{L}$  n-Pentan für jeweils 1 min bei 5000 x g gewaschen. Der Filter wurde danach, um alle Lösungsmittelreste zu entfernen, 2 min unter einem Abzug getrocknet. Anschließend wurden 40  $\mu\text{L}$  Verdauungspuffer (1:10 verdünnter Rapid Digest Puffer (Promega, Fitchburg, WI) in Wasser) mit Rapid Digestion Trypsin (Promega) in einem Protein/Enzym-Verhältnis (w/w) von 10:1 hinzugefügt. Der Filter wurde 15 min lang in einem Thermomixer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) bei 70 °C inkubiert, der von einem mit 70 °C heißem Wasser gefüllten Becherglas abgedeckt war. Nach dem Aufschluss wurden die Proben 1 min lang bei 5000 x g zentrifugiert. Die eluierte Peptidlösung wurde mit 10  $\mu\text{L}$  10 % TFA auf einen pH-Wert von ~2 angesäuert. Die Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer® NP80 (Implen, Westlake Village, CA) gemessen (A280 nm).

### ***Bead assisted SPEED treatment auf OT-2 (BeaST OT-2)***

Die Proteinlysate wurden mit einer Konzentration von 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und einem Minimalvolumen von 50  $\mu\text{l}$  in einer 96er Mikrotiterplatte vorgelegt. Der Pipettierroboter wurde wie in **Abbildung 8** dargestellt bestückt. Das Proteinlysate wurde mit 10  $\mu\text{l}$  einer 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  *bead* Lösung und 160  $\mu\text{l}$  100 % Acetonitril im Magnetmodul gemischt und 2 min ruhen gelassen. Danach wurde der Magnet angeschaltet und 1 min gewartet, bevor der Überstand abgenommen wurde. Das Pellet wurde erst mit 200  $\mu\text{l}$  80 % Acetonitril und danach mit 200  $\mu\text{l}$  100 % Acetonitril mit angeschaltetem Magneten gewaschen. Nach dem Waschen wurde so viel Überstand wie möglich abgenommen und das Pellet für 1 min getrocknet. Das Pellet wurde nun in 50  $\mu\text{l}$  1:10 TFA/ 2M Tris mit 4  $\mu\text{g}$  Trypsin Gold (Verdauverhältnis: 1:25) gelöst und in das Thermocycler Modul überführt und für 1 h bei 40°C verdaut. Nach dem Verdau wurde die Lösung erneut auf das Magnetmodul geladen und für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde dann mit unterschiedlichen Protokollen entsalzt.



**Abbildung 8:** Aufbau Opentrons OT-2 für das BeaST Protokoll

In den ersten 6 Spalten (in grün dargestellt) liegen 50  $\mu\text{l}$  Proteinlysate mit einer Konzentration von 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in einer 200  $\mu\text{l}$  PCR 96er Mikrotiterplatte in der Position 1. Es können maximal 48 Proben geladen werden. Auf Position 2 im OT-2 werden in einem 12-Kammern-Reservoir von links nach rechts die folgenden Lösungen vorgelegt: 100 % Acetonitril, 80 % Acetonitril, Leer, 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  *bead* Lösung. Das Reservoir kann maximal 15 ml fassen. Im Thermocycler wird in den ersten 6 Spalten 50  $\mu\text{l}$  Verdau-Mix vorgelegt (bei versetzter Installation des Thermocycler bleiben die ersten

beiden Spalten frei). Der Verdau-Mix besteht aus 2,5  $\mu\text{g}$  Trypsin Gold (Verdauverhältnis:1:25) in 50  $\mu\text{l}$  1:10 TFA/ 2M Tris als Puffer. Nach dem Protokoll werden die Peptidlösungen in der Mikrotiterplatte auf Position 1 in den Spalten 7 bis 12 abgelegt (orangefarbener Rahmen).

### Probenentsalzung

#### Festphasenextraktion

Die Entsalzung von Peptidlösungen wurde mit Pierce C18 Spin Columns (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als erstes wurden die Säulen bei 5000 x g für 1 min in 2 ml Eppendorf Gefäß zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 300 µl 100 % Acetonitril für 1 min bei 5000 x g equilibriert, danach mit 300 µl 0,1 % TFA gewaschen und ebenfalls bei 5000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Peptidlösung wurde auf die Säule gegeben, dabei kann maximal 300 µl auf einmal geladen werden und bei 3000 x g für 1 min zentrifugiert werden. Die Säule wurde zweimal mit 300 µl 0,1 % TFA bei 3000 x g für 1 min gewaschen. Zum Eluieren wurde ein neues 2 ml Eppendorf Gefäß verwendet. 300 µl 50 % Acetonitrile in 0,1 % TFA wurde auf die Säule gegeben und für 1 min 3000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Erneut wurde 300 µl 50 % Acetonitrile in 0,1 % TFA auf die Säule gegeben und für 1 min bei 3000 x g zentrifugiert. Beide Eluate wurden anschließend vereint. Die entsalzten Proben wurden in einer Speed-Vac eingetrocknet und wurden bei -80°C gelagert.

#### Bead SP2 Entsalzung

Das SP2-Protokoll [146] wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß durchgeführt. 5 µL *bead* Lösung mit einer Konzentration von 20 µg/µL wurden zu maximal 35 µL des Peptid Eluat gegeben. Peptide wurden mit 665 µl 100% Acetonitril bei einer Endkonzentration von 95 % Acetonitril gefällt und für 2 min ruhen gelassen. Die Proben wurden auf einem magnetischen Ständer für 1 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das *bead* Pellet wurde außerhalb der magnetischen Ständer mit 850 µl 100 % Acetonitril resuspendiert und erneut für 1 min auf dem Ständer pelletiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Zum Eluieren wurde die 200 µl einer 2%igen Acetonitrillösung auf das gewaschene *bead* Pellet gegeben und gevortext. Die Gefäße wurden kurz zentrifugiert und wieder auf dem magnetischen Ständer für 1 min inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, um sicherzustellen, dass sich keine Partikel mehr in der Lösung befinden. Das Eluat wurde mit 5 µL 10 % TFA angesäuert, um in der SpeedVac eingetrocknet zu werden. Die getrockneten Peptide wurden bei -80°C eingelagert.

#### Optimierter SPEED Workflow für klinische Proben

Die Bakterien wurden für die Massenspektrometrie mittels „*Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion*“ (SPEED), wie zuvor beschrieben, vorbereitet [89]. Die Bakterienzellen wurden mit einer Impfschlaufe entnommen. Die Zellen wurden direkt in Trifluoressigsäure (TFA) (Optima® LC/MS, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) resuspendiert (Probe/TFA 1:4 (v/v)) und 3 min lang bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 2M Tris-Base unter Verwendung des 10-fachen Volumens von TFA, in welchem 10 mM TCEP

und 40 mM CAA gelöst sind, neutralisiert, und für 3 min ebenfalls bei 70°C inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Trübungsmessungen bei 360 nm (1 AU = 0,67 µg/µL) mit dem NanoPhotometer® NP80 (Implen, Westlake Village, Kalifornien, Vereinigte Staaten) bestimmt. Zu beachten ist, dass die Trübungswerte geräteabhängig sind, für weitere Details siehe Döllinger *et al.* 2020 [89].

40 µg Proteine wurden in Suspension bei einem Volumen von 50 µl SDB gelöst. Der Rapid Trypsin Verdau 1:10 Protein/Enzym-Verhältnis (w/w) wurde schüttelnd bei 400 RPM 1 h bei 40°C im Thermomixer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) durch die Zugabe von 150 µl Rapid Digestion Buffer in insgesamt 200 µl durchgeführt. Die Peptidlösung wurde mit 10 µL 10 % TFA auf einen pH-Wert von ~2 angesäuert und die Konzentration wurde mit dem NanoPhotometer® NP80 (Implen, Westlake Village, CA) gemessen.

Die SPE Entsalzung von mit TFA angesäuerten Peptidlösungen wurde mit Pierce C18 Spin Columns (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Verändert wurde nur die Elution. Um das Elutionsgefäß nicht wechseln zu müssen, wurde diese statt zweimal mit 300 µl mit zweimal je 200 µl durchgeführt.

### Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie

Im Laufe der Arbeit wurde das Massenspektrometer Orbitrap Q Exactive™ Plus auf eine Orbitrap Q Exactive™ HF umgebaut. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Setups und Methoden verwendet. Die zwei Setups, zum einen ein 160 min Gradient mit *micropillar* C18 Säulen und zum anderen ein 30 min Gradient mit gepackten C18 Säulen, werden in diesem Kapitel dargestellt.

#### 160 min Gradient mit micropillar C18 Säulen auf QE Plus

Die Peptide wurden mit einem EASY-nanoLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) analysiert, der online mit einem Q Exactive™ Plus Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) gekoppelt war. 1,25 µg Peptide wurden auf eine µPAC™ Trap-Säule (5 µm Säulendurchmesser, 18 µm Säulenlänge, 100\*2 mm Bettkanalgröße, 100-200 Å C18, PharmaFluidics, Gent, Belgien) geladen und anschließend auf einer µPAC™ analytischen Säule (5 µm Säulendurchmesser, 18 µm Säulenlänge, 315 µm\*200 cm Bettkanalgröße, 100-200 Å C18, PharmaFluidics, Gent, Belgien) unter Verwendung eines gestuften 160-minütigen Gradienten von 80 % Acetonitril (Lösungsmittel B, Optima LC/MS, Fisher Chemical) in 0,1 % Ameisensäure (Lösungsmittel A, Optima LC/MS, Fisher Chemical) bei einer Flussrate von 300 nL/min laufen gelassen: 3-10 % B in 22 min, 10-33 % B in 95 min, 33-49 % B in 23 min, 49-80 % B in 10 min und 80 % B in 10 min. Die 200-cm-µPAC™-Säule wurde mit Hilfe einer Butterfly-Heizung (Phoenix S und T, Chester, PA) auf 50°C gehalten. Um die Peptidverschleppung zu reduzieren, wurde 1 µg *Candida albicans*-

Stamm SC5314-Verdau auf die Trap-Säule geladen und anschließend nach jeder Probe mit 15 µL Waschlösung (60 % Acetonitril, 30 % Isopropanol und 9,9 % Wasser und 0,1 % FA) gewaschen. Während des Equilibrierungsschrittes der nächsten Probe wurde die Waschlösung, die in der Trap-Säule verblieb, zum Waschen der analytischen Säule verwendet. Das Q Exactive™ Plus wurde datenunabhängig (DIA) im m/z-Bereich von 350 - 1.150 betrieben. *Full-scan* Spektren wurden mit einer Auflösung von 70.000 unter Verwendung eines AGC-Zielwerts von  $3 \times 10^6$  und einer maximalen Injektionszeit von 100 ms aufgenommen. Auf einen *full-scan* folgten 69 DIA-Scans mit dynamischen Fensterbreiten und einer Überlappung von 0,5 Th (**Tabelle S 1**). Die DIA-Spektren wurden mit einer Auflösung von 17.500 und einem AGC-Zielwert von  $3 \times 10^6$  bei einer maximalen Injektionszeit von 55 ms und einer ersten festen Masse von 200 Th aufgenommen. Die normalisierte Kollisionsenergie (NCE) wurde auf 25 % und der Standard-Ladungszustand auf 3 gesetzt. Die Peptide wurden mittels Elektrospray mit einem Edelstahl-Emitter, innerer Durchmesser 30 µm, (Proxeon, Odense, Dänemark) bei einer Sprühspannung von 2,1 kV und einer beheizten Kapillartemperatur von 275°C ionisiert.

### 30 min Gradient mit gepackten C18 Säulen auf QE HF

Die Peptide wurden mit einem EASY-nanoLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) analysiert, der online mit einem Q Exactive™ HF Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) gekoppelt war. 1,25 µg Peptide wurden auf eine gepackte 15 cm PepSep analytische Säule geladen (PepSep, Marslev, Dänemark) mit einem 30-minütigem Gradienten von 80 % ACN (B) / 0,1 % FA (A) bei einer Flussrate von 300 nl/min (4–9 % B in 2:17 min, 9–26 % B in 18:28 min, 26–31 % B in 3:04 min, 31–38 % B in 2:41 min, 39–95 % B in 0:10 min, 95 % B in 2:20 min, 95–0 % B in 0:10 min und 0 % B in 0:50 min) eluiert. Die Säule wird mit Hilfe einer Butterfly-Heizung (Phoenix S&T, Chester, PA) auf 50°C gehalten. Um die Peptidverschleppung zu reduzieren, wurde anschließend nach jeder Probe mit 15 µL Waschlösung (60 % Acetonitril, 30 % Isopropanol und 9,9 % Wasser und 0,1 % FA) gewaschen. Das ESI-Massenspektrometer wurde im datenunabhängigen Modus (DIA) im m/z-Bereich von 350 bis 1150 betrieben. *Full-scan* Spektren wurden mit einer Auflösung von 120.000 unter Verwendung eines AGC-Zielwerts von  $3 \times 10^6$  und einer maximalen Injektionszeit von 100 ms aufgenommen. Auf die *Full-scans* folgten 5x39 oder 1x39 DIA-Scans mit dynamischen Fensterbreiten und einer Überlappung von 0,5 Th (**Tabelle S 2** und **Tabelle S 3**). Die DIA-Spektren wurden mit einer Auflösung von 30.000 und einem AGC-Zielwert von  $3 \times 10^6$  bei einer maximalen Injektionszeit von 55 ms und einer ersten festen Masse von 200 Th aufgenommen. Die normalisierte Kollisionsenergie (NCE) wurde auf 27 % und der Standard-Ladungszustand auf 3 gesetzt. Die Peptide wurden mittels Elektrospray mit einem Edelstahl-Emitter, I.D. 30 µm, (Proxeon, Odense, Dänemark) bei einer Sprühspannung von 2,1 kV und einer beheizten Kapillartemperatur von 275°C ionisiert.

### Speziesbestimmung anhand von LC-MS<sup>1</sup> Daten

Die Identifizierung der mikrobiellen Spezies erfolgte mit leichten Modifikationen wie in Lasch *et al.* 2021 [84]. Zunächst wurden Peptid (MS<sup>1</sup>) *feature*-Listen aus DIA-Rohdaten mit dem Minora-Algorithmus der *Proteome Discoverer*<sup>™</sup> Software (v2.2.0388, Thermo-Fisher Scientific) extrahiert. Die *feature*-Listen wurden anschließend in ein Format exportiert, das mit *MicrobeMS* kompatibel ist, einer Matlab-Toolbox (Matlab: The Mathworks, Natick, MA), die in ZBS6 für die Identifizierung von Mikroorganismen durch Massenspektrometrie entwickelt wurde (<http://wiki.microbe-ms.com>). Mit *MicrobeMS* wurden MS *feature*-Listen mit einer Bibliothek stammspezifischer *in-silico* Massenprofile verglichen, die aus UniProtKB/Swiss-Prot- und UniProtKB/TrEMBL-Proteinsequenzdaten gewonnen wurden. Es wurden Ranglisten von Korrelations- oder interspektralen Distanzwerten (d. h. von Scores) erstellt, welche Auskunft über die taxonomische Identität des untersuchten Organismus geben (siehe Lasch *et al.* 2021 für weitere Einzelheiten). Die *in-silico* Datenbank (v2.0) bestand aus 8580 stammspezifischen *in-silico* Profilen, die jeweils Zehntausende von Peptidmasseneinträgen enthielten. Als Abstandswerte wurden varianzskalierte Pearson-Produkt-Impuls-Korrelationskoeffizienten (Pareto-Skalierung 0,25) gewählt, wobei Daten zwischen 2000 und 4500 Da als *input* dienten. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse wurden zwischen 0 (keine Korrelation) und 1000 (Identität) bewertet und in Ranglisten angeordnet, um die taxonomische Identität der untersuchten Proben zu bestimmen.

### Identifizierung von Peptiden

Die Referenz-Proteome mit der höchsten BUSCO-Werten [147] und mit einer vollständigen Genomdarstellung wurden von UniProtKB heruntergeladen. AMR-verwandte Proteine in diesen artspezifischen Datenbanken wurden dann mit dem in *DIAMOND* (v0.9.29, <https://github.com/bbuchfink/diamond>) implementierten BLASTp-Algorithmus [148] mit einer Sequenzidentitätsschwelle von 95 % in Bezug auf einen Eintrag in der *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD v3.0.5, September 2019) entfernt [118]. Dieses modifizierte Proteom wird dann als speziesspezifische Hintergrunddatenbank für die Erkennung von AMR-bezogenen Proteinen, nachdem die Datenbanken mit allen CARD-Einträgen zusammengeführt wurden, verwendet. Die Kopfzeilen der CARD-Einträge für die einzelnen Proteine wurden angepasst, womit sich folgendes Motiv ergab: "> CD|Proteinname|ARO:XXXXXXX GN=ARO:XXXXXXX". Alle LC-MS/MS-Rohdatendateien wurden unter Verwendung der speziesspezifischen Hintergrunddatenbanken, die entweder mit der gesamten ungefilterten CARD namens "Full CARD" (196.072 Einträge) oder einer "Whitelisted CARD"/"Präferenz Liste CARD" (**Tabelle 14**, 22 und 79 Einträge), die nur die ausgewählte Proteinisoformen enthält, analysiert. Diese Proteinisoformen wurden mit Geneious Prime® (v2020.0.5) aus der Full CARD extrahiert, und die Konsensussequenzen

## Material und Methoden

wurden durch multiples Sequenzalignment (MSA) mit *MAFFT* (v6.240, <https://mafft.cbrc.jp/>) erstellt [149, 150].

Peptide in den LC-MS/MS-Daten wurden mit DIA-NN (v1.76 und 1.80) identifiziert [91]. Die Proben wurden für jede Spezies getrennt und in Verbindung mit der Option für *unrelated runs* analysiert.

Spektralbibliotheken wurden mit dem in DIA-NN implementierten Deep-Learning-Algorithmus mit strikter Trypsin-Spezifität (KR nicht P) vorhergesagt. Die Peptide sollen in einem m/z-Bereich von 350 bis 1.150 liegen und maximal eine fehlende Spaltstelle (*missed cleavage*) aufweisen. Zudem wurden nur Peptide mit einer Länge von 7 bis 30 Aminosäuren verwendet, um die Spektralbibliotheken aus der probenspezifischen Hintergrunddatenbank und entweder der vollständigen oder reduzierten Version von CARD zu berechnen.

Es wurde angenommen, dass die Cysteinreste carbamidomethyliert sind. Zudem wurden die N-terminalen Methionine des Proteins entfernt. Die Massenspektren wurden mit einer festen Massentoleranz von 10 ppm für MS<sup>1</sup> und 20 ppm für MS<sup>2</sup>-Spektren analysiert. Die Option *RT-profiling* wurde deaktiviert. Die FDR wurde für die Identifizierung von *Precursor* auf 1 % festgelegt, und die Proteine wurden nach ihren jeweiligen Genen gruppiert.

### Bestimmung von Antibiotikaresistenzen

AMR-Proteinfamilien und -Isoformen sowie die zugehörigen Antibiotikaresistenzen wurden aus den DIA-NN-Outputs mit Hilfe des selbst entwickelten R-Skripts (v3.6.0) *rawDIAtect* (v0.3, <https://github.com/CptChiler/rawDIAtect>) ermittelt, welches aus zwei Modulen besteht: *rawSplit* und dem "*Clinical Resistance Identification Tool*" (CRIT). Das erste Modul, *rawSplit*, wurde verwendet, um die Peptid-Liste von DIA-NN in einzelne Dateien für jede Probe aufzuteilen. Diese Dateien wurden dann in das Modul *CRIT* geladen, das alle von CARD identifizierten Peptide extrahiert und diese Treffer mit antimikrobiellen Resistenzinformationen wie AMR-Proteinfamilie, Wirkstoffklasse und AMR-Proteinunterfamilie, die in der ARO-Indexdatei der CARD-Ontologie (v3.0.5, September 2019) hinterlegt sind, annotierte [118]. Die Peptidsequenzen wurden dann auf Einzigartigkeit in Bezug auf AMR-Proteinfamilien und auf Entfernung mehrerer Ladungszustände gefiltert, wobei nur der Ladungszustand mit der höchsten *Precursor*-Intensität beibehalten wurde. Aus den verbleibenden Peptiden wurden AMR-Proteinfamilien abgeleitet, die anschließend gefiltert wurden, wobei mindestens 3 Sequenzen pro Protein erforderlich waren. Danach wurde die Häufigkeit jeder AMR-Proteinfamilie anhand der 3 höchsten *Precursor*-Intensitäten berechnet [151, 152]. Die wahrscheinlichsten AMR-Proteinisoformen wurden aus der Rangfolge aller identifizierten Isoformen pro AMR-Proteinfamilie entsprechend ihrer Peptidzahl abgeleitet. Die Proteinisoformen einer AMR-Proteinfamilie wurden ihrer Unterfamilie gemäß der *beta*-

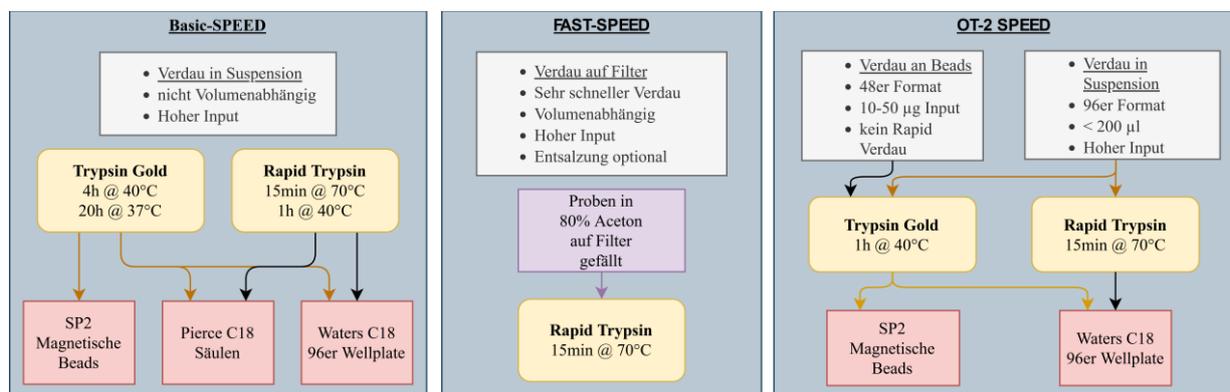
## Material und Methoden

*lactamase-database* (BLDB) zugeordnet [[153](#)] und mit dem neuen Tag "Subfamily" versehen, um Treffer mit mehreren Isoformen auszuschließen. Alle Ergebnisse wurden in einer Tabelle zusammengefasst und mit dem R-Paket *ggplot2* visualisiert. Die Diagramme wurden in einer pdf-Datei zusammengefasst und die verarbeiteten Peptidtabellen wurden für weitere Untersuchungen separat gespeichert.

## Ergebnisse

### Vergleich der Probenpräparation für die Proteomik

Das Ergebnis von Proteomik-Experimenten hängt stark von der korrekten Probenvorbereitung ab. In dieser Arbeit wurde die detergentenzfreie Probenvorbereitung durch einfache Extraktion und Verdauung, kurz (*Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion*) SPEED, verwendet [89]. SPEED ist momentan das einzige universelle Protokoll für die Präparation von Bakterien. Darüber hinaus kann der Verdau und die Peptidaufreinigung je nach Experiment variieren. Jedes Protokoll hat seine eigenen Charakteristika, welche in **Abbildung 9** dargestellt werden.



**Abbildung 9:** Vergleich von SPEED basierten Probenpräparationen und deren Charakteristika

**Basic-SPEED:** Verdau findet in 1,5 ml Eppendorf Gefäß statt und hat damit faktisch keine Limitation von Volumen oder Input. Auch der Verdau (gelbe Kästen) ist komplett variabel und ebenso die Entsalzung (rote Kästen). Nur die SP2 Entsalzung an *beads* kann nicht mit dem Rapid Verdau durchgeführt werden.

**fa-SPEED (FAST):** Proteine werden hier mit Hilfe von Aceton auf eine PTFE Membran gefällt. Es kann mehrmals hintereinander gefällt werden, aber nie mehr als 500 µl Volumen auf einmal. Der Verdau findet direkt auf dem Filter mit Rapid Trypsin statt. Da die Proteine gewaschen werden, kann bei Verwendung einer Vorsäule für die LC auf eine Entsalzung verzichtet werden.

**BeaST (OT-2):** Diese Probenpräparation wird am Opentrons 2 (OT-2) durchgeführt (**Abbildung 8**). Sie kann entweder mit *beads* im 48er Format oder in Suspension im 96er Format konfiguriert werden. Der *bead* Verdau wird mit Trypsin GOLD durchgeführt, da der Rapid Verdau puffer mit den *beads* interferiert. Im Roboter kann auch basic-SPEED mit beiden Enzyme durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Probenpräparationmethoden getestet, um ihren möglichen Einsatz für die klinisch-mikrobiologische Diagnostik zu evaluieren (**Tabelle 13**). Dazu wurden die 3 möglichen Kandidaten auf ihre Effektivität sowie Qualität geprüft. Jedes Protokoll zeichnete sich durch verschiedene Eigenschaften aus:

1. Basic-SPEED durch seine hohe Variabilität und Stabilität
2. fa-SPEED durch seine Geschwindigkeit
3. BeaST durch hohen Durchsatz und Automatisierung

## Ergebnisse

Des Weiteren wurde der Pipettierroboter Opentrons 2 (OT-2), für welchen das BeaST Protokoll entwickelt wurde, evaluiert und mit den im Labor bereits etablierten Protokollen getestet.

Dazu wurden je 20 µg *E. coli*- und *S. aureus*-Proteine in jedes Protokoll gegeben. Erfasst wurden Reinheit sowie Peptidkonzentration nach der Entsalzung. In die MS wurden dann je 1,5 µg Peptide geladen und mit der 30 min DIA Methode gemessen.

**Tabelle 13: Übersicht und Ergebnisse verschiedener proteomischer Probenvorbereitungen**

	Beschreibung	Ø Ausbeute (20 µg)	Ø Missed cleavages	Ø Identifizierte Precursor (Max/min)	Ø Identifizierte Proteine 1% FDR <i>E. coli</i> (Max/min)	Ø Identifizierte Proteine 1% FDR <i>S. aureus</i> (Max/min)
Basic-SPEED	Manueller Flüssigaufschluss	78,9 %	24 %	30910 (+4280/-8868)	2355 (2366/2344)	1740 (1762/1681)
fa-SPEED		69 %	28,6 %	32505 (+3220/-2479)	2313 (2329/2306)	1771 (1786/1763)
BeaST	<i>Bead</i> basierter Aufschluss mit dem OT2-Roboter	18 %	24 %	21224 (+8311/-3777)	2272 (2341/2196)	1482 (1501/1459)
	Manueller <i>Bead</i> basierter Aufschluss	38,4 %	27,6 %	24162 (+5288/-6661)	2209 (2224/2195)	1559 (1565/1553)
BeaST Effizienz	<i>Bead</i> basierter Aufschluss mit dem OT2-Roboter / Entsalzung mit Pierce	34,3 %	20,8 %	22056 (+6105/-7823)	2106 (2152/1996)	1500 (1555/1411)
	<i>Bead</i> basierte SP2 Entsalzung von Basic SPEED Peptiden	14,1 %	30,1 %	27852 (+3698/-3372)	2279 (2336/2175)	1718 (1741/1684)

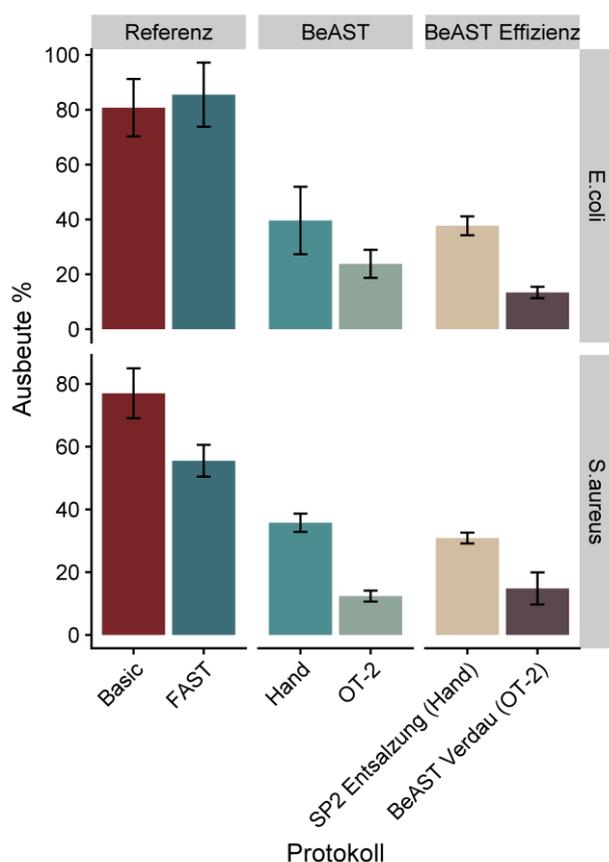
Tabelle 13 ist eine Übersicht über die verschiedene Probenaufbereitungsmethoden, die in dieser Arbeit verglichen werden. Darunter die beiden Referenzmethoden Basic- und fa-SPEED (je 4 Messungen pro Spezies), welche auf SPEED im Flüssigaufschlussverfahren basieren. Beide Methoden zeichnen sich durch hohe Ausbeuten sowie die höchsten Identifikationen aus. Die *bead* basierte Methode, kurz BeaST (***Bead assisted SPEED Treatment***), wurde entweder auf dem OT-2 Roboter oder per Hand durchgeführt (je 8 Messungen pro Spezies).

Der Roboter arbeitet dabei in 96er Mikrotiterplatten mit einem maximalen Volumen von 200 µl und wurde auf den Erkenntnissen des fa-SPEED Protokolls aufgebaut, da es ähnliche Volumina verwendet und ebenfalls auf einer Fällung basiert. Es musste zudem mit Trypsin GOLD verdaut werden, da der Rapid Verdaupuffer zusammen mit den Peptiden an den *beads* ausfällt und damit die Aufreinigung stört. Ohne diese Limitierung hätte der Verdau noch schneller sein können. Das Protokoll wurde für maximal 48 Proben designt. Dabei gibt es zeitlich keinen signifikanten Unterschied, ob 8 oder 48 Proben bearbeitet werden.

## Ergebnisse

Bei der manuellen Methode des BeAST Protokolls ist eine leichte Verbesserung zu erkennen. Dennoch ist im Vergleich zu den Referenzmethoden, die geringere Ausbeute und die geringere Anzahl an *Precursor*, auffallend. Darüber hinaus scheint die Bearbeitung von Gram-negativen Proben wie *E. coli* besser zu funktionieren als die einer Gram-positiven Probe wie *S. aureus*.

Um zu verstehen, weshalb im BeAST Protokoll 1/3 der *Precursor* und 50 % Ausbeute verloren wird, wurden die zwei Schritte des Protokolls einzeln angeschaut (8 Messungen pro Spezies, BeAST Effizienz Versuch **Abbildung 10**). Dabei handelt es sich um den Verdau im OT-2 Roboter und die Entsalzung im SP2 Verfahren, beide Schritte sind *bead* basiert. Dazu wurde der Verdau am Roboter vorgenommen, wie auch im vollständigen Protokoll, aber die Entsalzung wurde mit *Pierce C18 Peptide Desalting Columns* durchgeführt, da diese Säulen nahezu 100 % Ausbeute erreichen können. Um die SP2 Entsalzung zu evaluieren wurden 20 µg bereits entsalzte Peptide von jeweils *E. coli* und *S. aureus* aus einer Basic-SPEED Aufbereitung verwendet. Diese Peptide wurden in 40 µl SDB Puffer (1:10 TFA/2M Tris) und 2 µl Trypsin GOLD in Resuspensionspuffer gelöst, um die Peptidlösung zu simulieren, welche aus dem OT-2 Verdau stammt.



**Abbildung 10:** Vergleich der durchschnittlichen Ausbeuten in Prozent von Referenzmethoden gegen die *bead* basierte Methode BeAST bei einem Input von 20 µg

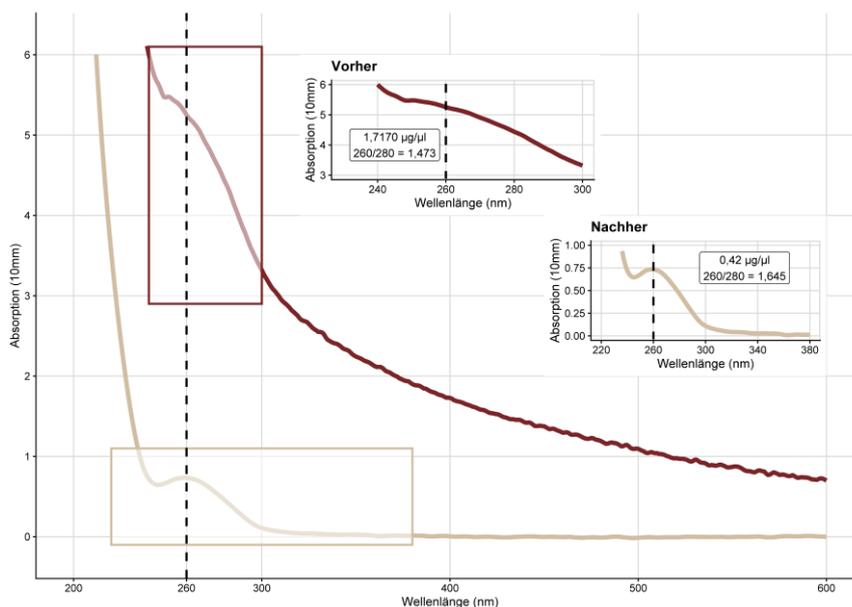
Alle Proben wurden in 0,1 % FA gelöst und im Nanodrop gemessen. Die Referenz Methoden FAST (fa-SPEED) und Basic (Basic-SPEED) wurden mit *Pierce C18 Peptides Desalting Columns* entsalzt. Für die beiden BeAST Proben (Mitte: Hand und OT-2) wurde die SP2 Entsalzung von Hand durchgeführt. Im BeAST Effizienzversuch wurde variiert. Für die SP2 Entsalzung (Hand) wurde eine Peptidlösung simuliert, welche 20 µg enthielt und mit SP2 entsalzt und beim BeAST Verdau (OT-2) wurden die Peptidlösung aus dem OT-2 mit *Pierce C18 Peptides Desalting Columns* aufgereinigt. Angezeigt sind die durchschnittlichen Ausbeuten sowie deren mittlere Abweichung.

Die Effizienz des *bead* basierten BeAST Protokolls scheint abhängig vom Verdau zu sein, dort konnte der größte Verlust festgestellt werden. Der geringe Input von 20 µg, welcher auf Grund von Volumenrestriktionen gewählt wurde, könnte dabei eine Rolle gespielt haben. Der von

## Ergebnisse

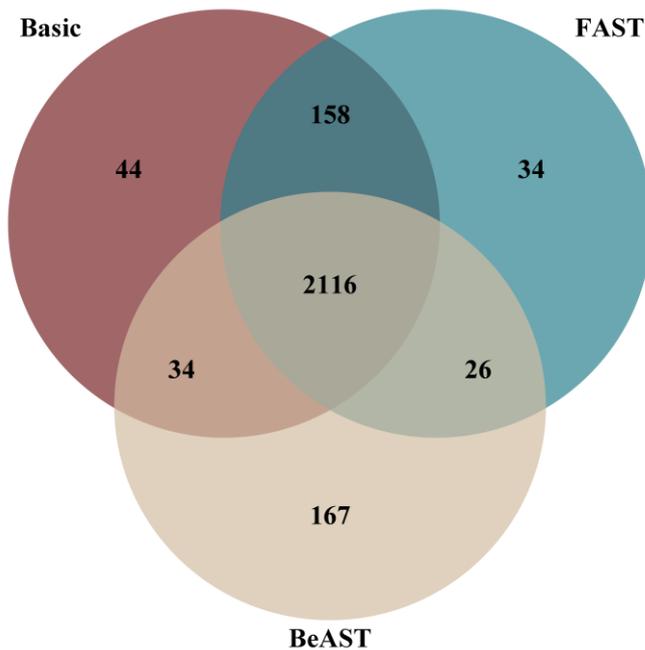
Hand durchgeführte Verdau sowie die Entsalzung führten im Vergleich zur Roboter basierten Methodik zu einer deutlichen Verbesserung der Ausbeute. Deswegen sind weitere Optimierungen am Protokollablauf des Roboters notwendig.

Das Basic- und fa-SPEED-Protokoll zeigten die höchsten Ausbeuten. Dennoch kam es bei der Bearbeitung der Basic-Proben zu Problemen mit den *S. aureus* Isolaten. Diese enthielten im Vergleich zu den *E. coli*-Isolaten viele Schwebstoffe, die im Nanodrop zu einer erhöhten Adsorptionskurve führten, welche im Bereich  $> 320$  nm nicht gegen die Nulllinie tendiert. Dieses Phänomen ist für die Probe Basic *S. aureus* 3 Pierce in **Abbildung 11** dargestellt. Die Proben konnten durch Zentrifugation bei  $20k \times g$  für 5 min aufgereinigt werden, in dem der Überstand überführt und erneut gemessen wurde. Diese Zentrifugation wurde bei allen Proben vor der Aliquotierung in die Glasgefäße für die LC-MS Messung durchgeführt.



**Abbildung 11:** [Nanodrop Ergebnisse der Basic-SPEED Probe \*S. aureus\* 3 nach Pierce Entsalzung vor und nach Zentrifugation bei  \$20k \times g\$  für 5 min](#)

Alle Proben wurden mit einem 30 min nLC-Gradienten gemessen, wobei immer  $1,5 \mu\text{g}$  Peptide geladen wurden. Die MS wurde dabei im DIA-Modus betrieben und die Daten wurden mit DIA-NN unabhängig analysiert. Dabei wurden, wie in **Tabelle 13** schon dargestellt, die identifizierten *Precursor* und Proteine ermittelt. Darüber hinaus wurde auch ermittelt, welche Proteingruppen mit mindestens 2 *Precursor* in welcher Präparationsmethode gefunden wurden und ob es Überschneidungen oder einzigartige Gruppen gibt. Dies wird für *E. coli* in **Abbildung 12** und für *S. aureus* in **Abbildung 13** dargestellt.

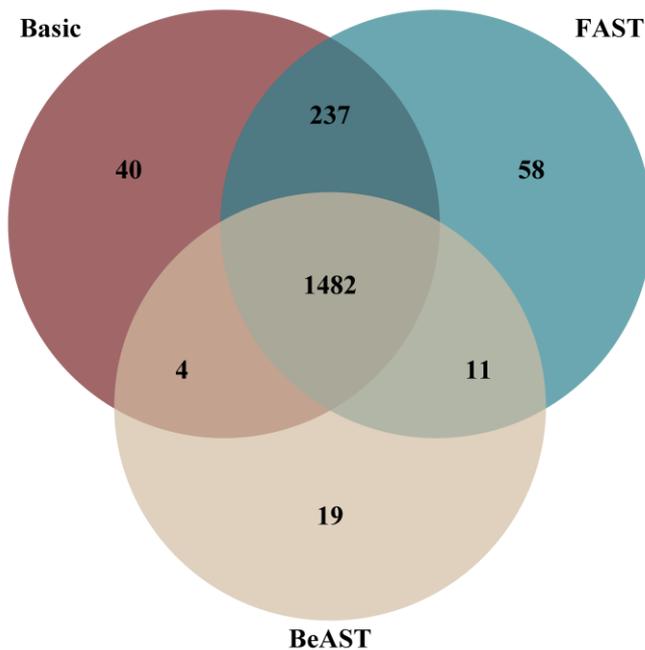


**Abbildung 12:** Venn Diagramm der identifizierten Proteingruppen mit mindestens 2 Precursor (*E. coli*)

Dargestellt sind die drei proteomischen Präparationsmethoden für alle *E. coli* Isolate.

In der *E. coli* Fasta, welche zur Analyse verwendet wurde, gibt es 4438 Einträge. Davon konnten in allen Methoden 2116 identifiziert werden. Maximal wurden 2366 Proteine in einer Basic Probe identifiziert, dies entspricht den Daten aus den Publikationen über die SPEED

Präparation [89, 154]. Auffällig ist, dass die BeAST Methode 167 Proteingruppen einzigartig identifiziert hat, dennoch haben die Basic und FAST Methode übereinstimmend 158 Proteine identifiziert, welche von BeAST nicht gefunden wurden. Bei genauerer Betrachtung der Proteineigenschaften lassen sich keine Systematik in Hinsicht auf Funktion, Zellkompartiment oder physikochemische Eigenschaften erkennen.



**Abbildung 13:** Venn Diagramm der identifizierten Proteingruppen mit mindestens 2 Precursor (*S. aureus*)

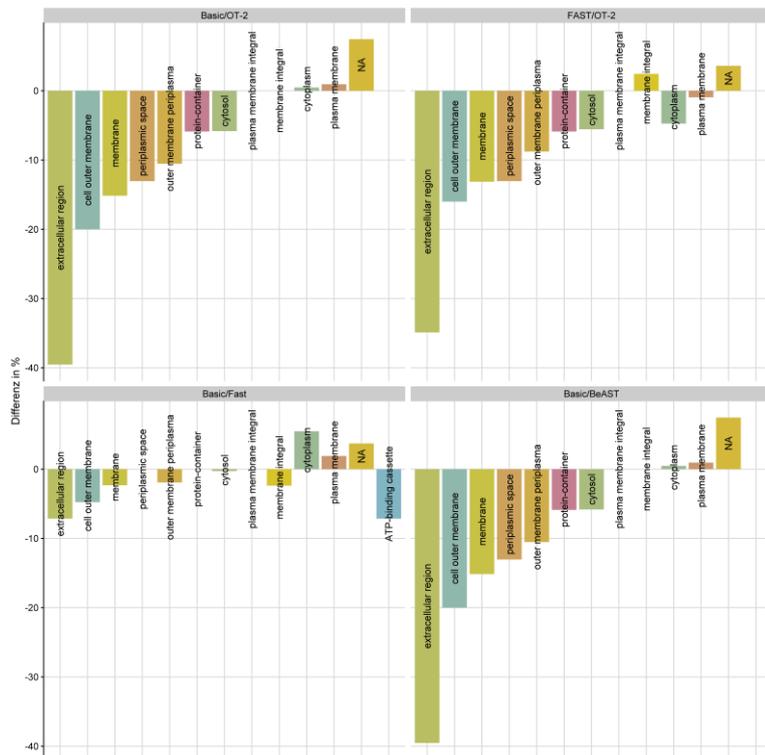
Dargestellt sind die drei proteomischen Präparationsmethoden für alle *S. aureus* Isolate.

Für die *S. aureus* Proben schwanken die einzigartigen Proteine im Vergleich zu *E. coli* nicht so stark je Methode. Von den insgesamt 2889 möglichen Proteinen in der Sequenzdatenbank, konnten übereinstimmend 1482 gefunden werden. Auch hier weist die

Basic Methode mit 1786 die meisten Identifikationen auf. Auffällig ist, dass die Basic sowie FAST Methode, 237 Proteine entdeckte, welche nicht in BeAST identifiziert wurden. Bei diesen Proteinen handelt es sich zum großen Teil um Membranproteine, aber auch um nicht-charakterisierte Proteine.

## Ergebnisse

Um die Unterschiede der Methoden im Bereich der Proteine noch genauer aufzuschlüsseln, wurde das Zellkompartiment, in welchem das Protein vorkommt, eine von drei GO Kategorien, bestimmt. Dazu wurde ermittelt wie viel Prozent der gefundenen Proteine aus dem fraglichen Zellkompartiment stammen. Die Differenz zwischen den Methoden wird in **Abbildung 14** dargestellt. Verglichen wurden nur die 13 höchsten Werte, welche in allen 4 Vergleichen vorhanden waren. Dabei ist das Fehlen der ATP-binding Cassette für alle *bead* basierten Protokolle zu vermerken, da diese nur bei Basic und FAST auf Platz 13 lag.



**Abbildung 14:** Verteilung der zellulären Kompartimente von gefundenen Proteinen im Vergleich zwischen den proteomischen Präparationsmethoden

Oben zu sehen ist der Vergleich der automatisierten BeAST Methode am OT-2 gegen die beiden Referenzmethoden Basic und FAST SPEED. Unten links ist der Vergleich zwischen Basic und FAST. Unten rechts ist der Vergleich zwischen Basic SPEED und dem manuellen BeAST Protokoll.

Zum Vergleich wurden nur Proteine gewählt, welche mindestens 2 *Precursor* aufwiesen. Dabei wurde für jede Methode die prozentuale Verteilung von GO Terms über alle gefundenen Proteine ermittelt und gegeneinander verglichen. (siehe **Tabelle S 4**). Die prozentuale Differenz der Kompartimente wurde nur für die 13 häufigsten GO Terms ermittelt.

Im Vergleich des BeAST Protokolls am OT-2 gegen Basic und FAST ist die geringere Anzahl von identifizierten extrazellulären oder Membran assoziierten Proteinen deutlich zu erkennen. Dies konnte auch mit dem von Hand durchgeführten BeAST Protokoll nicht verändert werden.

Basic und FAST unterscheiden sich kaum, aber auch hier scheint es zu einer Verringerung von gefundenen extrazellulären und Membran assoziierten Proteine zu kommen.

### Tandem-Massenspektrometrie Messmethoden für die Klinik

Um nun einen Workflow für den klinischen Gebrauch zu entwickeln, wurde die MS Technik betrachtet. Momentan werden in der klinischen Mikrobiologie MALDI-TOF MS Geräte verwendet, welche MS<sup>1</sup> Daten aufnehmen. Diese Spektren werden mit Spektrendatenbanken abgeglichen und die fragliche Spezies detektiert. Damit können nur Massen von in erster Linie ribosomalen Proteinen bestimmt werden. MS kann aber mehr, vor allem die LC-MS/MS Methode mit der Proteome gemessen werden. Durch die Natur der Tandem-Massenspektrometrie werden MS<sup>1</sup> und MS<sup>2</sup> Daten aufgenommen. Die MS<sup>1</sup> Daten können, ähnlich wie in der MALDI-TOF verwendet werden, um Speziesbestimmung durchzuführen. Die komplexeren MS<sup>2</sup> Daten können dabei zur Peptidsequenzierung verwendet werden.

Es gibt *proof-of-concept* Studien um DDA-MS in der Klinik, vor allem in der Plasma Proteomik, zu verwenden, [83, 93, 94]. DDA hat den Nachteil einen stochastischen Bias zu haben, da Ionen nach einem vorgegebenen Schema ausgewählt und fragmentiert werden. Aufgrund dessen wird in dieser Arbeit die DIA Messmethode genauer betrachtet.

DIA hat den klaren Vorteil zur DDA Methode, dass bei DIA die Gesamtheit der Probe gemessen wird und es keine Algorithmen gibt, welche die Fragmentierung bestimmen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DIA Messungen deutlich sensitiver und schneller sein können [154]. Diese Vorteile machen die DIA Methode zu einem glaubwürdigen Kandidaten für die klinische Diagnostik, dennoch stellen DIA Daten auf Grund ihrer hohen Komplexität, bedingt durch die Co-Fragmentierung von Peptiden, hohe Ansprüche an ihre Auswertung. Zur Auswertung der DIA Daten gibt es nur wenige *ready-to-use* Programme, insbesondere für Analysen basierend auf Sequenzdatenbanken. DIA-NN, ein auf neuronalen Netzen basierendes Auswertungsprogramm, konnte in Vorversuchen im ZBS6 als vielversprechendster Kandidat identifiziert werden und die gewünschten Anforderungen erfüllen. Es wurde deswegen in dieser Arbeit verwendet.

### Der erste Hinweis auf AMR-Nachweis mit LC-MS/MS-Daten

Die Annahme, dass AMR-vermittelnde Proteine mittels LC-MS/MS gemessen werden können, wurde bereits vereinzelt durch DDA Versuche bestätigt. Diese Studien beruhen auf der Suche nach ausgewählten Peptiden [11-15]. Darüber hinaus wurde die Durchführbarkeit der Shotgun-Proteomik für den AMR-Nachweis nur für bestimmte vordefinierte AMR Determinanten in Proben mit bekannten Speziesinformationen bewiesen [95, 122-124]. Das Ziel sollte sein, ungeachtet der Methode oder Probe, alle Determinanten gleichzeitig zu finden. Dies ist ein Vorteil den DIA gegenüber DDA hat. Durch die größere Anzahl *Precursor* und der unvoreingenommenen Art der Messung ist DIA ein Kandidat für die Resistenzbestimmung in der Klinik. Zu Beginn dieser Arbeit war die Auswertung von DIA Daten noch in einem frühen

Stadium der Entwicklung, mit dem Release von DIA-NN änderte sich dies schlagartig [91]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die neuen optimierten DIA Gradienten verwendet, da diese vor allem in hinsichtlich der Resistenzbestimmung einen unbeeinflussten Blick in das Proteom ermöglichten [154]. Dennoch gibt es bis dato kaum standardisierte oder kostenlose Software zu Datenanalyse.

### Datenanalyse

Um die DIA Daten aus der MS zu analysieren und heraus zu finden, welche Resistenzvermittelnden Proteine in der Probe vorhanden sind, wurde das R Programm *rawDIAtect* in dieser Arbeit geschrieben (<https://github.com/CptChiler/rawDIAtect>, [16]).

Für die Analyse von DIA Daten musste durch Verwendung des neuen Programm DIA-NN ein komplett neuer Workflow entwickelt werden. Es berechnet mittels *deep-learning in-silico* Spektren aus Proteomen Sequenzdatenbanken und identifiziert durch neuronale Netze *Precursor* aus den MS Daten.

Es gibt zwei Datenbanken, die für die Analyse von AMRs verwendet wurden. Zum einen eine vollständige Datenbank, welche alle nicht redundanten Einträge (169072) der CARD Datenbank enthält, die in 1600 AMR-Genfamilien unterteilt werden. Dabei wurde sichergestellt, dass es keine zwei identischen Sequenzen gibt. Dazu mussten die Sequenzen über *multiple-sequenz-alignment* (MSA) überprüft und nach Länge gefiltert werden. Zum anderen wurde eine reduzierte Datenbank (Präferenzliste CARD Datenbank, **Tabelle 14**) erstellt, die nur die Antibiotikaklassen enthält (79 Einträge), welche von der WHO zur Surveillance empfohlen werden und im PCR Panel getestet sind [6, 7].

**Tabelle 14:** AMR Proteine in reduzierter Präferenz CARD Datenbank ohne Isoformen (Ausschnitt)

AMR Klasse / target	AMR Gen Familien	Wichtige Antibiotika
Beta-Laktamase A	CTX-M, GES, KPC, OKP, OXY, PER, SCO, VEB	Penam, Cephalosporine, Carbapeneme
Beta-Laktamase B	GIM, IMP, NDM, SHV, TEM, VIM	Penam, Cephalosporine, Carbapeneme
Beta-Laktamase C	ACC, ACT, CMY, DHA	Penam, Cephalosporine
Beta-Laktamase D	OXA	Penam, Cephalosporine, Carbapeneme
Modifikation	AAC(6), MCR, <i>mgrB</i> -Stop, Qnr	Aminoglykoside, Colistin, Fluorchinolone
Transporter	ompk	
Zellwand	VanA, VanB, MecA, MecC	Vancomycin, Methicillin

Die *Precursor*-Listen im tsv Format werden in *rawDIAtect* geladen. Dabei können mehrere Dateien in einen Ordner geladen werden. Die gefundenen Peptide werden nach Einzigartigkeit pro AMR-Genfamilie innerhalb der gemessenen Proben geprüft und die Top 3 Proteinintensitäten bestimmt.

## Ergebnisse

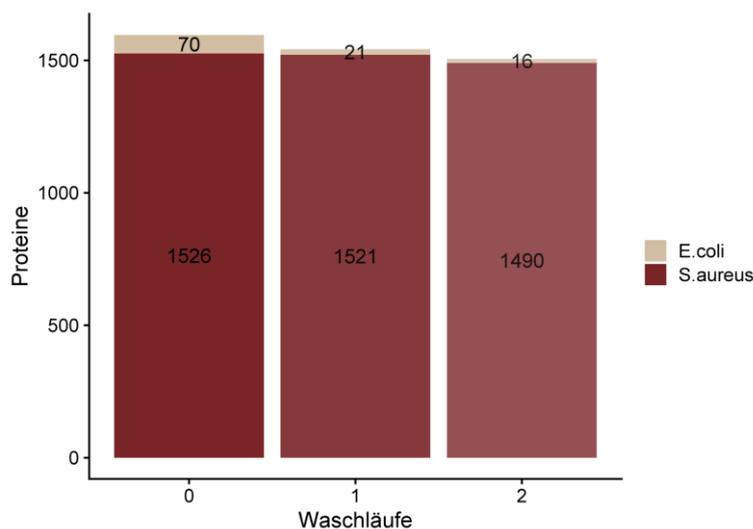
Um die Proteinisoformen der gefundenen AMR-Gen-Familie zu bestimmen, wurde ermittelt welcher Datenbankeintrag am häufigsten von DIA-NN zugordnet wurde. Darüber hinaus wurden für die Beta-Laktame die Molekularklasse aus der BLDB verglichen, um ähnliche Isoformen in ähnliche Cluster, zum Beispiel OXA-1-like oder OXA-48-like Proteine, zu fassen.

Diese Treffer wurden gegen die CARD Index Datei abgeglichen, um zusätzliche Informationen wie Antibiotika-Wirksamkeit sowie Resistenzmechanismus aufzuklären. Die Ergebnisse werden in einer PDF Datei zusammengefasst und die Tabellen dazu werden separat gespeichert.

### Carry-Over Problematik von LC Systemen

Bei der hoch sensitiven nanoLC-MS/MS Methode ist bekannt, dass es zu Carry Over Effekten kommen kann. Um zu ermitteln, wie stark dieser Effekt auf die Resistenzbestimmung ist, wurde dies für das nano-LC System mit gepackten PepSep Säulen analysiert. Dazu wurden 1,5 µg *E. coli* Peptide gemessen, gefolgt von einer Messung mit ebenfalls 1,5 µg *S. aureus* Peptiden. Variiert wurde die Anzahl an Waschläufen (0, 1, 2) zwischen diesen beiden Proben. Gewaschen wurde mit 3 µl Waschlösung (60 % ACN / 30 % Isopropanol / 10 % 0,1 % TFA) für 15 min mit einem steilen Gradienten bis 80% ACN Anteil. Anschließend wurde die Säule mit 0,1 % TFA mit absinkendem ACN Gradienten vom Acetonitril befreit.

Zuerst wurden die in der *S. aureus* Messung gefundenen Proteine betrachtet, die *E. coli* zugeordnet werden konnten (Abbildung 15). Mit geringer Schwankung wurden in allen drei Versuchen *S. aureus* um die 1500 Proteine gefunden. Dabei wurden nur Proteine gezählt, zu welchen mehr als zwei Peptide gefunden wurden. Mit zunehmenden Waschläufen sinkt der Anteil an *E. coli* Proteinen. Die größte Reduktion von 70% war nach einem Waschlaf zu verzeichnen. Ein zweiter Waschlaf reduzierte die gefundenen Proteine nur noch minimal um weitere 7 %. Um einen besseren Blick über die gefundenen *E. coli* Proteine zu erhalten, wurden die Peptide pro Protein und deren Intensitätsabnahme bestimmt.



**Abbildung 15:** Nachgewiesene *E. coli* Proteine im *S. aureus* MS Lauf in Abhängigkeit zu den Waschläufen zwischen diesen

Gemessen wurden je 1,5 µg Peptide von *E. coli*, gefolgt von ebenfalls 1,5 µg *S. aureus* mit je 0, 1 oder 2 Waschläufen zwischen diesen beiden Läufen. Alle Proben wurden mit der 30 min DIA Methode gemessen und unabhängig in DIA-NN analysiert. Analysiert wurden nur Proteine mit mindestens 2 Peptiden.

## Ergebnisse

Bei allen drei Versuchen wurden die höchst abundanten Proteine um mindestens 120 *Precursor* reduziert. Der Durchschnitt der Reduktion liegt zwischen 10 und 5 Peptiden, wobei es eine Verschiebung mit Erhöhung der Waschläufe gibt (Tabelle 15). Es wurden mit Erhöhung der Waschung weniger *E. coli Precursor* im *E. coli* Lauf gefunden. Es kam dabei zu einer deutlichen Verringerung der generell gefundenen *E. coli Precursor* im *S. aureus* Lauf.

**Tabelle 15:** Verteilung von *E. coli Precursor* pro Protein mit mindestens 2 *Precursor* und deren Durchschnitt ( $\bar{\varnothing}$ ) in Abhängigkeit der Anzahl von Waschläufen

**Spalte 1:** Maximale Anzahl (Max) von *E. coli Precursor* eines Proteins im *E. coli* MS Lauf und durchschnittliche *Precursor* Anzahl für alle *E. coli* Proteine im *E. coli* MS Lauf in Klammern.

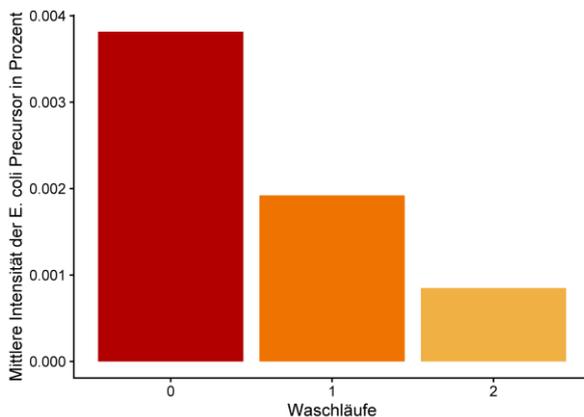
**Spalte 2:** Maximale Anzahl (Max) von *E. coli Precursor* eines Proteins im *S. aureus* MS Lauf und durchschnittliche *Precursor* Anzahl für alle *E. coli* Protein im *S. aureus* MS Lauf in Klammern.

**Spalte 3:** Gefundene *E. coli Precursor* gegen gefundene *S. aureus Precursor* im *S. aureus* MS Lauf.

Waschläufe	<i>Precursor</i> pro Protein <i>E. coli</i> Lauf (Max/ $\bar{\varnothing}$ )	<i>E. coli Precursor</i> pro Protein <i>S. aureus</i> Lauf (Max/ $\bar{\varnothing}$ )	<i>E. coli Precursor</i> / <i>S. aureus Precursor</i> <i>S. aureus</i> Lauf
0	127 / 14	26 / 5,8	408 / 25.916
1	126 / 10	13 / 5	105 / 26.033
2	124 / 7,5	9 / 4,6	74 / 25.278

In **Abbildung 16** werden die mittlere Intensität der gefundenen *E. coli* Proteinen im *S. aureus* Lauf dargestellt. Hier kann am deutlichsten der Effekt eines Waschlafes erkannt werden. Bereits ohne Waschen wurde die Carry Over Proteinintensität im Durchschnitt auf unter 0,005 % reduziert. Es konnte mit einer Waschung die mittlere Intensität um weitere 50 % reduziert werden. Ein zweiter Waschschrift reduzierte die mittlere Intensität noch einmal um weitere 25 %.

Die Möglichkeit Carry Over Proteine zu filtern verbessert deutlich die Aussage über die wirklich in der Probe vorhandenen Proteine. Dies kann durch die Berechnung der Verringerung der Intensität, aber auch durch das Filtern der Proteine nach mindestens 2 einzigartigen Peptiden geschehen.



**Abbildung 16:** Mittlere Intensität der gemessenen *E. coli* Proteine mit mindestens 2 Peptiden im *S. aureus* MS Lauf in Prozent im Vergleich zum *E. coli* MS Lauf in Abhängigkeit zu den Waschläufen zwischen diesen

Gemessen wurden je 1,5  $\mu\text{g}$  Peptide von *E. coli* gefolgt von ebenfalls 1,5  $\mu\text{g}$  *S. aureus* mit je 0,1 oder 2 Waschläufen zwischen diesen beiden Läufen. Alle Proben wurden mit der 30 min DIA Methode gemessen und unabhängig in DIA-NN analysiert.

### AMR-Erkennung innerhalb von 4 h mit DIA-Daten

Mit einem Panel von 29 Isolaten wurde eine *proof-of-concept* Studie mit einem insgesamt 4 h Workflow durchgeführt (**Tabelle 16**). Die Ergebnisse dieser Studie sind publiziert und werden hier zusammengefasst (Modifiziert mit Erlaubnis von Blumenschein et al. 2021 [16], Copyright 2022 American Chemical Society).

Das Panel besteht aus 20 klinischen Isolaten und 9 *E. coli*-Transkonjuganten, die ein breites Spektrum an Beta-Laktamasen (SHV-1/-11/-12, TEM-1/-52, CMY-2, CTX-M-15/-9, KPC-2/-3, NDM-7, OXA-48/-1, VIM-1), die Aminoglykosid-Acetyltransferasen AAC(6)-like, *vanA*- und *vanB*-vermittelte Vancomycin-Resistenz und Plasmid vermittelte Colistin-Resistenz (Mcr) enthalten.

Zum damaligen Zeitpunkt wurde dieses ausgewählte AMR-Panel mit der DIA 160 min Methode auf einem neu aufgerüsteten Orbitrap QE Plus System zusammen mit der optimierten DIA-Methode unter Verwendung von 69 Fenstern analysiert [154]. Dieser erste Ansatz war vielversprechend: In weniger als 4 h konnte eine breite Palette von AMR-Determinanten identifiziert werden und erreichte dabei eine Sensitivität von 98 % und eine Spezifität von 100 % (**Abbildung 17**)

Auf der ersten Ebene der AMR-Genfamilie konnten 51 von 52 möglichen Determinanten gefunden werden, für einen VanB-Treffer wurden nur die zugehörigen Regulatorproteine gefunden (**Abbildung 18**). In den 5 negativen Proben wurden keine der 65 möglichen Treffer gefunden, diese sind die 52 AMR-Determinanten und ihre möglichen Isoformen. Auf der Ebene der Antibiotikaklassen wurden die 91 gefundenen Peptide den respektiven Resistenzen zugeordnet. Dabei konnten alle 52 mögliche PCR basierten AMR-Determinanten den richtigen Antibiotikaklassen zugeordnet werden, welche auf 83 Peptiden beruhen.

## Ergebnisse

**Tabelle 16:** Probenliste der bakteriellen Isolate (klinische Isolate und Transkonjuganten) mit Metadaten (Modifiziert mit Erlaubnis von Blumenschein *et al.* 2021 [16], Copyright 2022 American Chemical Society)

<sup>1</sup> Transkonjugant mit dem Empfängerstamm *E. coli* J53 Azir

<sup>2</sup> Sequenztyp (ST) gemäß veröffentlichten Multilocus-Sequenztypisierungsverfahren (MLST) für *E. coli* ([https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele\\_st\\_search](https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search)); *K.pneumoniae* (<https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>), *C.freundii* (<https://pubmlst.org/cfreundii>), und *E.faecium* (<https://pubmlst.org/efaecium/>)

<sup>3</sup> OXA-9 ist aufgrund eines vorzeitigen STOP-Codons (L112STOP) nicht funktionsfähig

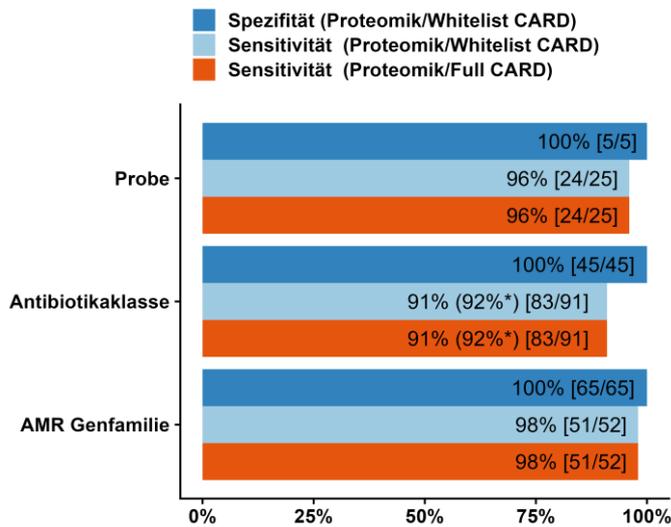
<sup>4</sup> AMR Genlokalisierung auf dem Plasmid

Legende zum Phänotyp (Broth microdilution gemäß EUCAST v10.0 und VITEK 2 Karte AST N248):

AMP, Ampicillin; PIP, Piperacillin; PTZ, Piperacillin/Tazobactam; CTX, Cefotaxim, CAZ, Ceftazidim; CEF, Cefepim; FOX, Cefoxitin; MEM, Meropenem; IPM, Imipenem; ETP, Ertapenem; GEN, Gentamicin; TOB, Tobramycin; AMK, Amikacin; NAL, Nalidixinsäure; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol; CST, Colistin; FOS, Fosfomycin; TEI, Teicoplanin; TGC, Tigecyclin; VAN, Vancomycin

(I) empfindlich, erhöhte Exposition/Dosierung; n.t. nicht getestet

ID	Spezies	ST <sup>2</sup>	AMR Determinanten (PCR und Sanger Sequenzierung)	Antibiotika Resistenzen	Probentyp	Referenz
604-16	<i>Citrobacter freundii</i>	ST98	KPC-2,TEM-1,OXA-1,aac(6')-Ib-cr	AMP,PIP,PTZ,ATM,CTX,CAZ,FOX,CEF,MEM,ETP,IPM,GEN,TOB,MOX,NAL,CIP,CMP,SXT	Klinisch	[155]
151-09	<i>Enterobacter hormaechei</i>	n.t.	VIM-1	AMP,PIP,PTZ,CTX,CAZ,FOX,CEF,MEM,ETP,IPM,TOB,AMK,MOX,NAL,CIP,CMP,SXT,CST,FOS,TGC	Klinisch	
UW12819	<i>Enterococcus faecium</i>	ST117	-	STR(HL), ERY	Klinisch	
UW14883	<i>Enterococcus faecium</i>	ST80	-	STR(HL), ERY	Klinisch	
UW16369	<i>Enterococcus faecium</i>	ST262	-	ERY, TET	Klinisch	
UW17739	<i>Enterococcus faecium</i>	ST612	VanA	AMP, VAN, TEI, GEN(HL), ERY, CIP, TET	Klinisch	
UW19605	<i>Enterococcus faecium</i>	ST80	VanA	AMP, VAN, TEI, GEN(HL), ERY, CIP, RAM	Klinisch	
UW14142	<i>Enterococcus faecium</i>	ST117	VanA	AMP, VAN, TEI, ERY, CIP, SXT	Klinisch	
UW16517	<i>Enterococcus faecium</i>	ST80	VanB	AMP, VAN, STR(HL), ERY, CIP	Klinisch	
UW18273	<i>Enterococcus faecium</i>	ST117	VanB	AMP, VAN, ERY, CIP	Klinisch	
UW12913	<i>Enterococcus faecium</i>	ST17	VanB	AMP, VAN, GEN(HL), STR(HL), ERY, CMP, CIP	Klinisch	
531-12_K4	<i>Escherichia coli</i>	ST10	CMY-2	AMP,PIP,CTX,CAZ,FOX	Transkonjugant <sup>1</sup>	[156]
330-16_K1	<i>Escherichia coli</i>	ST10	MCR-1	CST (I)	Transkonjugant <sup>1</sup>	
151-09_K1	<i>Escherichia coli</i>	ST10	VIM-1	AMP,PIP,PTZ,CTX,CAZ,FOX,CEF (I),MEM,ETP,IPM (I),TOB,AMK,SXT	Transkonjugant <sup>1</sup>	
16-10_K1	<i>Escherichia coli</i>	ST10	OXA-48	AMP,PIP,PTZ	Transkonjugant <sup>1</sup>	[157]
443-16_K1	<i>Escherichia coli</i>	ST10	CTX-M-9	AMP,PIP,ATM,CTX,CAZ,CEF (I)	Transkonjugant <sup>1</sup>	
58-07_K1	<i>Escherichia coli</i>	ST10	SHV-12	AMP,PIP,ATM CAZ	Transkonjugant <sup>1</sup>	[158]
17-11_K1	<i>Escherichia coli</i>	ST10	KPC-2	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ (I), FOX, MEM, ETP, IPM (I), GEN, TOB, AMK,CMP	Transkonjugant <sup>1</sup>	
371-12_K1	<i>Escherichia coli</i>	ST10	NDM-7	AMP PIP,PTZ,CTX,CAZ,FOX,CEF,MEM,ETP,IPM	Transkonjugant <sup>1</sup>	
<i>E.c._J53Azi<sup>r</sup></i>	<i>Escherichia coli</i>	ST10	-	-	Rezipient	[159]
281-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST258	KPC-2,SHV-11,TEM-1, OXA-9 <sup>3</sup> ,AAC(6)-Ib	AMP,PIP, PTZ,ATM,CTX,CAZ,CEF (I),MEM,ETP,IPM (I),GEN,TOB,AMK,MOX,NAL,CIP,CMP,SXT,TGC	Klinisch	[134]
292-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST258	KPC-3,SHV-11,TEM-1, OXA-9 <sup>3</sup> ,AAC(6)-Ib	AMP,PIP,PTZ,ATM,CTX,CAZ,CEF,MEM,ETP,IPM,GEN,TOB,AMK,MOX,NAL,CIP,CMP,SXT,FOS,TGC	Klinisch	[134]
302-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST629	OXA-48,SHV-11,CTX-M-15,TEM-1,aac(6')-Ib-cr	AMP,PIP,PTZ,ATM,CTX,CAZ,CEF,MEM (I),ETP,IPM (I),GEN,TOB,MOX,NAL,CIP,CMP,SXT,FOS,TGC	Klinisch	[134]
276-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST101	KPC-2,SHV-1,CTX-M-15,TEM-1,OXA-9 <sup>3</sup> ,AAC(6)-Ib	AMP,PIP,PTZ,ATM,CTX,CAZ,CEF,MEM,ETP,IPM,GEN,TOB,AMK,MOX,NAL,CIP,CMP,CST,FOS,TGC	Klinisch	[134]
229-09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST147	OXA-48,SHV-11,CTX-M-15,TEM-1,OXA-9 <sup>3</sup> ,AAC(6)-Ib	AMP,PIP,PTZ,ATM,CTX,CAZ,CEF, MEM,ETP,IPM,GEN,TOB,AMK,MOX,NAL,CIP,FOS	Klinisch	[134]
272-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST101	KPC-2,SHV-11,TEM-1,OXA-9 <sup>3</sup>	AMP,PIP,PTZ,ATM,CTX,CAZ,CEF,MEM,ETP,IPM,MOX,NAL,CIP,SXT,FOS	Klinisch	[134]
86-09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ST258	KPC-2,SHV-11,TEM-1, OXA-9 <sup>3</sup> ,AAC(6')-Ib	AMP,PIP,PTZ,ATM,CTX,CAZ,CEF,MEM,ETP,IPM (I),GEN,TOB,AMK,MOX,NAL,CIP,CMP,CST,TGC	Klinisch	[134]
50-07	<i>Salmonella infantis</i>	n.t.	TEM-52	AMP,PIP,ATM,CTX,CAZ,CEF (I)	Klinisch	[158]
58-07	<i>Salmonella typhimurium</i>	n.t.	SHV-12	AMP,PIP,ATM,CTX,CAZ,SXT	Klinisch	[158]



**Abbildung 17:** Empfindlichkeit / Spezifität des AMR-Nachweises durch Proteomik auf der Ebene der Probe, der Arzneimittelklasse und der AMR-Gene

(Modifiziert mit Erlaubnis von Blumenschein *et al.* 2021 [16], Copyright 2022 American Chemical Society)

Die Sensitivität wurde nach der Formel 
$$\text{Sensitivität} = \frac{TP}{(TP+FN)}$$
 berechnet, wobei die Ergebnisse der Full- und der Whitelist-CARD-Suche im Vergleich zur PCR/Sanger-Sequenzierung verwendet wurden. Die Spezifität wurde nach der Formel 
$$\text{Spezifität} = \frac{TN}{(TN+FP)}$$
 berechnet, wobei die

Ergebnisse der Whitelisted-CARD-Suche im Vergleich zur PCR/Sanger-Sequenzierung und zu den NGS-Tools *abricate* (<https://github.com/tseemann/abricate>, v1.0.1) und *Kleborate* (<https://github.com/katholt/Kleborate>, v1.0.0) verwendet wurden. Der Sensitivitätswert in der Klammer wird nach dem Rückschluss auf die Vancomycin-Resistenz durch das Vorhandensein des van-Ligase-Regulationssystems berechnet. TP/FN steht hier für eine richtig bzw. falsch positive Zuordnung; TN/FN steht für eine richtig bzw. falsch negative Zuordnung. Die Definitionen von TP und TN auf Probenebene lauten wie folgt: Eine Probe wurde nur dann als TP eingestuft, wenn alle AMR-Proteinfamilien (wie durch PCR/Sanger-Sequenzierung bestimmt) korrekt zugeordnet wurden (ansonsten FN). Umgekehrt wurde eine Probe auf Probenebene als TN definiert, wenn in den Kontrollproben keine AMR-Familien bestimmt wurden (ansonsten FP). Es wurde eine falsch negative (FN) Zuordnung dokumentiert (fehlender VanB-Nachweis, siehe Text für Details). TP und TN auf der Ebene der Arzneimittelklassen sind wie folgt definiert: Eine Drogenklasse wurde als TP gezählt, wenn sie mit dem Phänotyp der Probe in Verbindung gebracht werden konnte. Über alle Messungen hinweg wurden 91 Wirkstoffklassentreffer beobachtet. Vancomycin fehlte in einer Probe (FN) und 7 Vorhersagen konnten aufgrund einer Kombination von Mehrfachresistenzen nur potenziell zugeordnet werden. Eine TN wurde nur gezählt, wenn keine Wirkstoffklasse gefunden wurde. Insgesamt konnten 9 Wirkstoffklassen pro negative Messung gefunden werden. [Das Sternchen-Symbol (\*) zeigt die Vorhersage der Wirkstoffklasse unter Berücksichtigung aller möglichen Proteinisoform-Treffer einschließlich Vancomycin an.] TP/TN auf der Ebene der Genfamilie wird wie folgt beschrieben: Ein TP wurde für jeden durch PCR ermittelten korrekten Treffer in der AMR-Genfamilie gezählt und fehlende Treffer als FN. Es wurde ein fehlender VanB-Familientreffer dokumentiert. Insgesamt konnten 52 AMR-Genfamilientreffer über alle Messungen hinweg gefunden werden. TN wurde nur gezählt, wenn für keine der möglichen AMR-Determinanten (13) pro negative Messung ein Treffer gefunden werden konnte.

Die zweite Ebene ist die Übereinstimmung der gefundenen Wirkstoffklassen pro Probe. Insgesamt wurden 45 verschiedene Wirkstoffklassen gefunden, von denen keine in den Negativproben vorhanden war. Tabelle 17 fasst die Wirkstoffklassenzusammen.

Die letzte Stufe ist die Probe als Ganzes. Dabei mussten alle AMR-Determinanten pro Probe gefunden werden. Von den 30 Durchläufen waren 25 Proben positiv und 5 Proben negativ. Es wurden 24 von 25 Proben korrekt klassifiziert, nur ein VanB fehlte. Alle 5 negativen Proben waren korrekt negativ.

Da viele der zusätzlichen nachgewiesenen Resistenzdeterminanten nicht mit PCR validiert werden konnten, wurden die Läufe mit zwei verschiedenen AMR-

Zieldatenbanken analysiert. Eine Datenbank mit allen AMR-Determinanten aus CARD (Full CARD) und die andere Datenbank mit einer gefilterten Datenbank (Whitelisted CARD) für die im Panel vorkommenden Isoformen.

**Tabelle 17:** Validierung der durch Proteomik nachgewiesenen Arzneimittelklassen mit phänotypischem Resistenznachweis (Modifiziert mit Erlaubnis von Blumenschein *et al.* 2021 [16], Copyright 2022 American Chemical Society)

Liste der gegebenen Phänotypen und Liste der dazugehörigen Arzneimittelklassen. Für die Stämme *E. faecium* UW16517 und UW12913 konnte VanB nicht nachgewiesen werden, aber die Resistenz kann aus der Identifizierung ihrer beiden Komponentensysteme abgeleitet werden. Die in Klammern angegebenen Medikamentenklassen, die durch Proteomik gefunden wurden, sind Vorhersagen von CARD unter Berücksichtigung aller möglichen Proteinisoformen in dieser Probe mit Schwerpunkt auf  $\beta$ -Laktamen, Aminoglykosiden und Chinolonen.

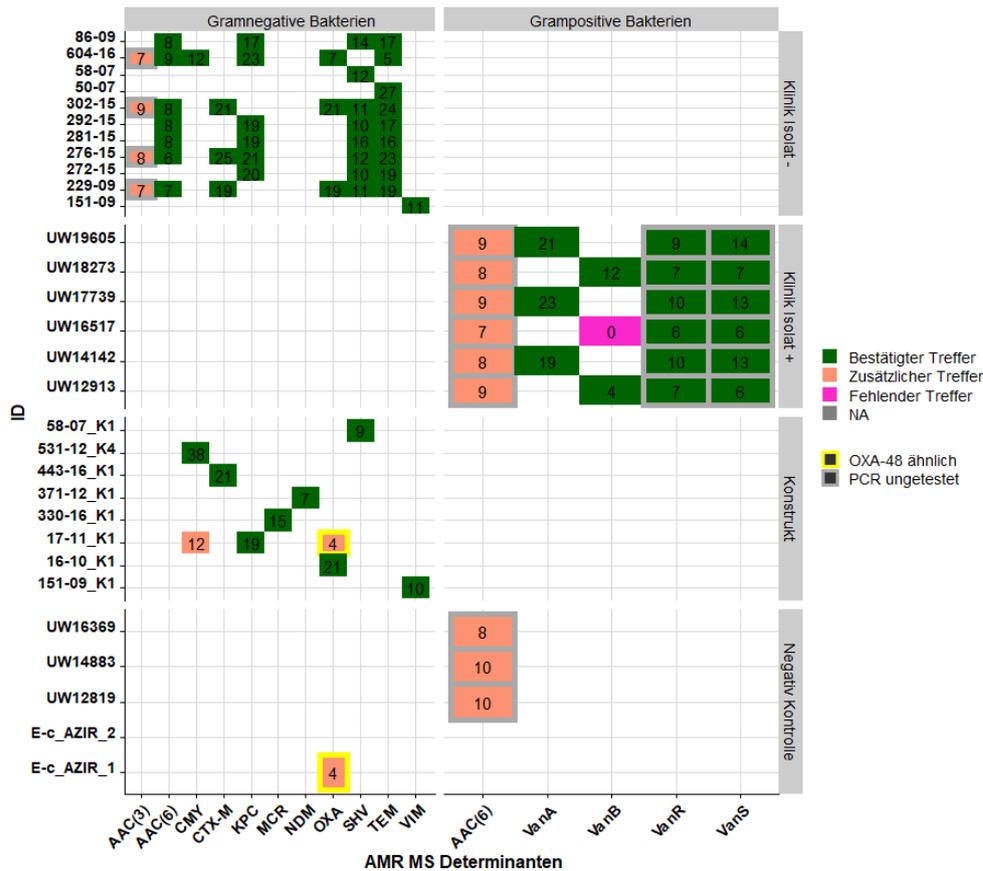
Legende der Phänotypen (Mikrodilutionsbouillon nach EUCAST v10.0 und VITEK 2 Karte AST N248): AMP, Ampicillin; PIP, Piperacillin; PTZ, Piperacillin/Tazobactam; CTX, Cefotaxim, CAZ, Ceftazidim; CEF, Cefepim; FOX, Cefoxitin; MEM, Meropenem; IPM, Imipenem; ETP, Ertapenem; GEN, Gentamicin; TOB, Tobramycin; AMK, Amikacin; NAL, Nalidixinsäure; CIP, Ciprofloxacin; MOX, Moxifloxacin; CMP, Chloramphenicol; CST, Colistin; TEI, Teicoplanin; VAN, Vancomycin; (I) empfindlich, erhöhte Exposition/Dosierung; (HL) hohes Niveau.

Muster-ID	Arten	Klinisch relevante Antibiotikaresistenzen	Wirkstoffklassen von CARD (gefunden durch Proteomik)	Medikamentenklassen entsprechen dem Phänotyp
604-16	<i>Citrobacter freundii</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, FOX, CEF, MEM, ETP, IPM, GEN, TOB, MOX, NAL, CIP, CMP	Aminoglykosid, Carbapenem, Cephalosporin, Cephamycin, Fluorchinolon, Monobactam, Penam	Ja
151-09	<i>Enterobacter hormaechei</i>	AMP, PIP, PTZ, CTX, CAZ, FOX, CEF, MEM, ETP, IPM, TOB, AMK, MOX, NAL, CIP, CMP	Carbapenem, Cephalosporin, Cephamycin, Penam	Ja
UW17739	<i>Enterokokkus faecium</i>	AMP, VAN, TEI, GEN(HL)	Penam, Aminoglykosid, Glykopeptid	Ja
UW19605	<i>Enterokokkus faecium</i>	AMP, VAN, TEI, GEN(HL)	Penam, Aminoglykosid, Glykopeptid	Ja
UW14142	<i>Enterokokkus faecium</i>	AMP, VAN, TEI	Penam, Aminoglykosid, Glykopeptid	Ja
UW16517	<i>Enterokokkus faecium</i>	AMP, VAN	Penam, (Glykopeptid)	Ja (aus dem Regulierungssystem abgeleitet)
UW18273	<i>Enterokokkus faecium</i>	AMP, VAN	Penam, Glykopeptid	Ja
UW12913	<i>Enterokokkus faecium</i>	AMP, VAN, GEN(HL)	Penam, Aminoglykosid, Glykopeptid	Ja
531-12_K4	<i>Escherichia coli</i>	AMP, PIP, CTX, CAZ, FOX	Carbapenem, Cephamycin	Ja
330-16_K1	<i>Escherichia coli</i>	CST (I)	Polypeptid	Ja
151-09_K1	<i>Escherichia coli</i>	AMP, PIP, PTZ, CTX, CAZ, FOX, CEF (I), MEM, ETP, IPM (I), TOB, AMK	Carbapenem, Cephalosporin, Cephamycin, Penam	Ja
16-10_K1	<i>Escherichia coli</i>	AMP, PIP, PTZ	(Carbapenem), Cephalosporin, Penam	Ja
443-16_K1	<i>Escherichia coli</i>	AMP, PIP, ATM, CTX, CAZ, CEF (I)	Cephalosporin	Ja
58-07_K1	<i>Escherichia coli</i>	AMP, PIP, ATM, CAZ	Cephalosporin, Penam	Ja
17-11_K1	<i>Escherichia coli</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ (I), FOX, MEM, ETP, IPM (I), GEN, TOB, AMK, CMP	Carbapenem, Cephalosporin, Cephamycin, Monobactam, Penam	Ja
371-12_K1	<i>Escherichia coli</i>	AMP, PIP, PTZ, CTX, CAZ, FOX, CEF, MEM, ETP, IPM	Carbapenem, Cephalosporin, Cephamycin, Penam	Ja
281-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, CEF (I), MEM, ETP, IPM (I), GEN, TOB, AMK, MOX, NAL, CIP, CMP	Aminoglykosid, Carbapenem, Cephalosporin, (Fluorchinolon), Monobactam, Penam	Ja
292-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, CEF, MEM, ETP, IPM, GEN, TOB, AMK, MOX, NAL, CIP, CMP	Carbapenem, Cephalosporin, (Fluorchinolon), Aminoglykosid, Monobactam, Penam	Ja
302-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, MEM (I), ETP, IPM (I), GEN, TOB, MOX, NAL, CIP, CMP, FOX	Aminoglykosid, Carbapenem, Cephalosporin, Fluorchinolon, Monobactam, Penam	Ja
276-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, CEF, MEM, ETP, IPM, GEN, TOB, AMK, MOX, NAL, CIP, CMP	Carbapenem, Cephalosporin, (Fluorchinolon), Aminoglykosid, Monobactam, Penam	Ja
229-09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, CEF, MEM, ETP, IPM, GEN, TOB, AMK, MOX, NAL, CIP	Aminoglykosid, Carbapenem, Cephalosporin, (Fluorchinolon), Monobactam, Penam	Ja
272-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, MEM, ETP, IPM, MOX, NAL, CIP	Aminoglykosid, Carbapenem, Cephamycin, (Fluorchinolon), Monobactam, Penam	Ja
86-09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, PIP, PTZ, ATM, CTX, CAZ, CEF, MEM, ETP, IPM (I), GEN, TOB, AMK, MOX, NAL, CIP, CMP	Aminoglykosid, Carbapenem, Cephalosporin, (Fluorchinolon), Monobactam, Penam	Ja
50-07	<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. <i>Infantis</i>	AMP, PIP, ATM, CTX, CAZ, CEF (I)	Cephalosporin, Monobactam, Penam	Ja
58-07	<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> ser. <i>Typhimurium</i>	AMP, PIP, ATM, CTX, CAZ	Carbapenem, Cephalosporin, Penam	Ja

Unter Verwendung der Full CARD-Datenbank mit 196.072 Einträgen wurde versucht, alle möglichen Determinanten zu ermitteln. In **Abbildung 18** ist das Ergebnis der Full CARD-Datenbank der 30 LC-MS-Läufe abgebildet. Dargestellt ist die Anzahl der einzigartigen Peptide für die vorgegebene AMR bestätigt durch PCR gegen die gefundene AMR des LC-MS/MS Workflows.

Für die Probe UW16517 konnte VanB nicht gefunden werden, aber die dazugehörigen Regulatorproteine (VanS/VanR). Diese wurden auch bei allen anderen positiven Vancomycin Isolaten gefunden. VanS und VanR wurden nicht direkt per PCR bestätigt, sind aber durch die Anwesenheit der Ligase abzuleiten.

Die meisten zusätzlichen Treffer stammten von Aminoglykosid-Transferase AAC(6)-ähnlichen und AAC(3)-ähnlichen Proteinen. AAC(6) falsch positive Treffer wurden in allen Gram-positiven Proben entdeckt. Diese Resistenz wird nicht für *E. faecium* Isolate standardmäßig getestet. Bei den Gram-negativen klinischen Isolaten wurde AAC(3) gehäuft als zusätzlicher Treffer detektiert, aber auch vereinzelte Beta-Laktam-assoziierten Proteine von CMY und OXA. In einer Gram-negativen Kontrolle wurden 4 falsch annotierte OXA Peptide gefunden, welche auf ungenaue Datenbankeinträge zurückzuführen ist, da diese Einträge nicht eindeutig einer OXA Beta-Laktamase zu zuordnen sind.



**Abbildung 18:** Vergleich der AMR-Proteinfamilien, die durch Proteomik mit Hilfe der vollständigen CARD-Suche entdeckt wurden gegen PCR/Sanger-Sequenzierung (Modifiziert mit Erlaubnis von Blumenschein *et al.* 2021 [16], Copyright 2022 American Chemical Society)

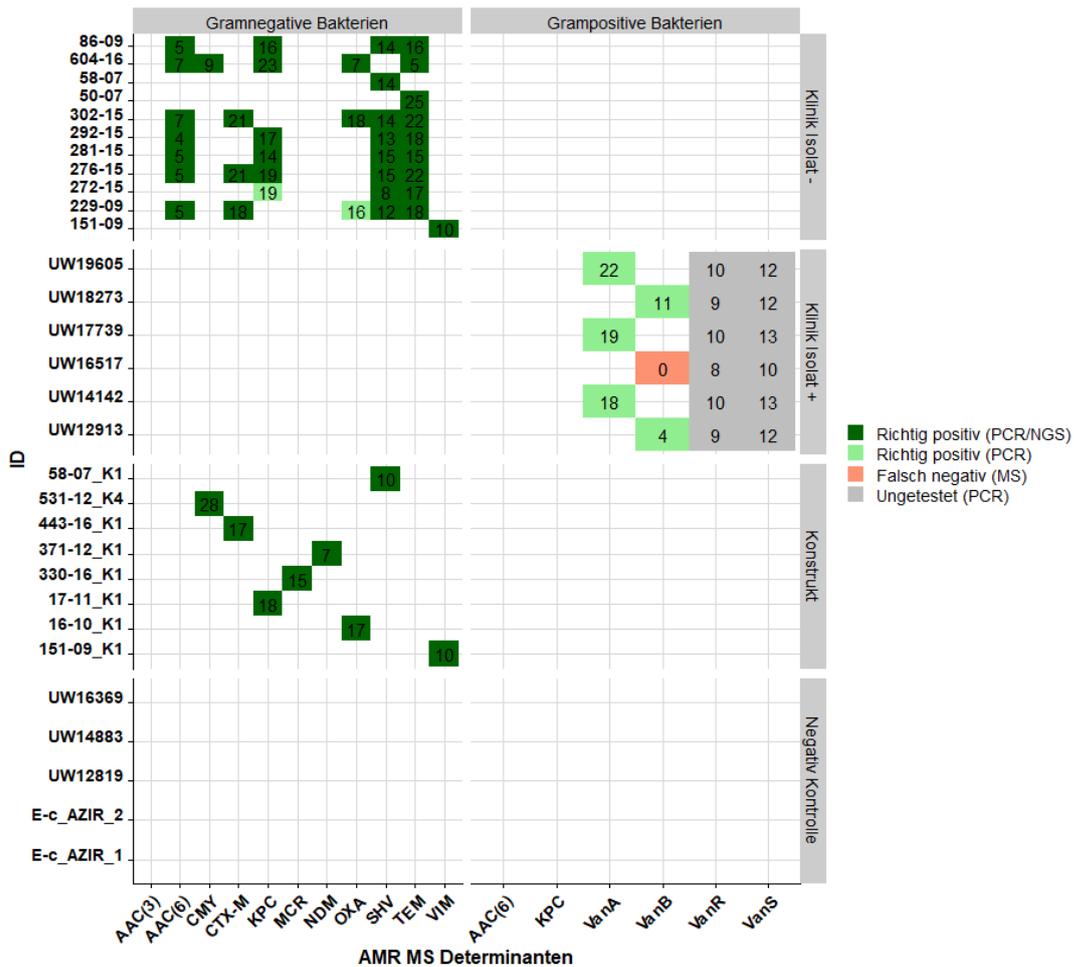
Proteomische AMR-Treffer, die durch PCR verifiziert wurden, sind in grün dargestellt. Zusätzliche Treffer der Proteomik sind in dunkelorange dargestellt und fehlende Treffer sind in rosa abgebildet. Die Zahlen geben die Anzahl der einzigartigen Peptide an, die durch MS nachgewiesen wurden. Ein fehlender Treffer war die Van-Ligase B; die Proteomik konnte jedoch die entsprechenden Komponenten des Regulationssystems VanRB und VanSB nachweisen, die nicht durch PCR analysiert wurden. Dieses Zwei-Komponenten-System wurde in allen VanB- und VanA-positiven *E. faecium* Proben nachgewiesen und bestätigt das Vorhandensein einer Van-Ligase.

Die Full CARD-Datenbank sorgte für einige nicht validierbare zusätzliche Treffer, weswegen die Datenbank, um die Methode besser zu evaluieren von ihren 196.072 Einträgen auf 22 Einträge reduziert wurde. In Abbildung 19 ist das Ergebnis mit der reduzierten sogenannten Whitelisted CARD dargestellt.

Wie im Full CARD Versuch konnte in einem Isolat (UW16517) das Protein VanB nicht direkt nachgewiesen werden. Es konnten für alle Vancomycin positiven Isolate die Regulator Proteine VanS und VanR nachgewiesen werden. Die zusätzlichen Treffer konnten durch die Reduktion der Datenbank entfernt werden.

Für die Gram-negativen klinischen Isolate konnten die zusätzlichen AAC(3) ähnlichen Treffer entfernt werden. Es stellte sich heraus, dass für zwei Proben die PCR Ergebnisse nicht mit NGS bestätigt werden konnten, dafür wurden sie mit der MS Methode gefunden. Dabei handelt es sich für 272-15 um KPC und für 229-09 um OXA. Bei den konstruierten Plasmidproben konnten ebenfalls die zwei zusätzlichen Treffer für die Probe 17-11\_K1 entfernt werden. Mit Hilfe der Whitelisted CARD waren nun auch die negativen Kontrollen frei von unspezifischen Treffern.

Die Studie zeigt das eine LC-MS basierte Resistenzbestimmung ohne Induktion mit Antibiotika innerhalb von 4 h möglich ist. Um eine vollständige klinische Diagnostik zu ermöglichen, muss neben dem Resistogramm auch die Spezies detektiert werden. Dazu wurden zwei MS basierte Methoden genauer angeschaut und verglichen.



**Abbildung 19:** Vergleich der AMR-Proteinfamilien, die durch Proteomik mittels Whitelisted CARD-Suche gefunden wurden gegen PCR/Sanger-Sequenzierung und NGS (Modifiziert mit Erlaubnis von Blumenschein *et al.* 2021 [16], Copyright 2022 American Chemical Society)

Proteomik-Treffer, die durch PCR und NGS verifiziert wurden, sind in dunkelgrüner Farbe dargestellt. Zusätzliche Treffer der Proteomik, die nur durch PCR verifiziert wurden, sind hellgrün dargestellt, fehlende Treffer sind rot dargestellt. Die Zahlen stehen für die Anzahl der einzigartigen Peptide, die durch MS nachgewiesen wurden. Ein fehlender Treffer war die Van-Ligase B; die Proteomik konnte jedoch die entsprechenden Komponenten des Regulierungssystems VanR und VanS nachweisen, die nicht durch PCR analysiert wurden (grau). Dieses Zweikomponentensystem wurde in allen VanB- und VanA-positiven *E. faecium* Proben nachgewiesen und bestätigt das Vorhandensein einer Van-Ligase durch die molekulare Funktion des Van-Genclusters. Es wurden keine zusätzlichen Proteomik-Treffer entdeckt, die weder durch PCR noch durch NGS bestätigt werden konnten (*abricate*, <https://github.com/tseemann/abricate>, v1.0.1 und *Kleborate*, <https://github.com/katholt/Kleborate>, v1.0.0).

### MS<sup>1</sup> versus MS<sup>2</sup> basierte bakterielle Speziesbestimmung

In der klinischen Diagnostik ist nicht nur die Resistenzbestimmung wichtig um gezielt handeln zu können, sondern auch die Speziesdiagnose des Erregers. Dazu wurden zwei grundlegend unterschiedliche Ansätze genauer untersucht.

Einmal einen MS<sup>1</sup> basierten Weg, der auf Peak Tabellen beruht und zum anderen einen MS<sup>2</sup> basierten Weg, der sich spezifische Peptidsequenzen zu Nutze macht.

In diesem Test wurden 13 Spezies in Duplikaten mittels LC/MS-MS DIA in einem 30 min (1x39 Fenster) Gradienten gemessen. Alle Proben wurden mit Basic SPEED aufbereitet und über Nacht mit Trypsin GOLD verdaut. Die Entsalzung fand mit Pierce C18 Peptide Desalting Columns statt. Pro Lauf wurden 1,5 µg Peptide geladen und es wurde einmal zwischen diesen gewaschen.

Der Vergleich beider Methoden ist in **Tabelle 18** zusammengefasst. Der MS<sup>1</sup> basierte Weg schneidet auf Genusebene bis auf Shigella gut ab. Für Enterobacter und Citrobacter konnte nur das Genus, aber keine Spezies ermittelt werden und bei den Salmonellen wurden *Paratyphi* mit *Typhimurium* fehlgemeldet. Für die Shigellen wurde fälschlicherweise *E. coli* bestimmt.

Der MS<sup>2</sup> basierte Weg hat zunächst nur in der Hälfte aller Läufe die Spezies richtig bestimmt. Die ungewöhnliche Art der Messmethode mit 39 variablen Messfenstern des 30 min DIA Gradienten ist noch nicht vollständig für die Software *Spectronaut* optimiert, weswegen zur Speziesbestimmung ein anderes Programm verwendet wird als für die Resistenzbestimmung (**Tabelle S 3**). Es konnten nur für Shigella und Salmonella die Identifikation nicht richtig getroffen werden. Bei Shigella wurde keine klare Spezies und für Salmonella nur der Subtyp Enterica bestimmt.

## Ergebnisse

**Tabelle 18: Speziesbestimmung mittels LC-MS/MS**

MS<sup>1</sup> basierte Speziesbestimmung mit MicrobeMS im Vergleich zur MS<sup>2</sup> basierten Speziesbestimmung mit bakteriellen Sequenzdatenbanken von allen BSL2 Erregern, analysiert mit Spectronaut. Die daraus entstehenden Peptidlisten wurden mittels UniPept ausgewertet. Es gibt 4 Peptidwerte: die Anzahl der Peptide, welche von Spectronaut ermittelt wurden, die Anzahl der bestimmenden Peptide, welche UniPept zuordnen konnte, die Anzahl der Taxapeptide, welche für die Gesamtzahl an Peptiden für diese Einteilung stehen, die im Lauf gefunden wurden und die Anzahl der Sub Taxa Peptide, welche für die spezifischen Peptide stehen.

ID	Genus	Spezies	MS <sup>1</sup> Identifikation	MS <sup>2</sup> Identifikation Sub taxa Peptide / Taxa Peptide	MS <sup>2</sup> Daten bestimmende Peptide / Spectronaut Peptide
Abaumannii_1	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> (361/361)	8163/8434
Abaumannii_2	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> (359/359)	8185/8452
Cfreundii_1	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	<i>Citrobacter sp</i>	<i>Citrobacter freundii</i> (19/19)	9912/10222
Cfreundii_2	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	<i>Citrobacter sp</i>	<i>Citrobacter freundii</i> (18/18)	9903/10215
Ecloacae_1	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (22/39)	9167/9451
Ecloacae_2	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (23/39)	9313/9602
Ecoli_1	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (27/30)	11447/11787
Ecoli_2	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (26/29)	11549/11899
Efaecalis_1	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (1719/1725)	7489/7665
Efaecalis_2	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (1672/1678)	7287/7460
Efaecium_1	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i> (221/221)	5626/5759
Efaecium_2	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i> (214/214)	5405/5529
Kpneumoniae_1	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (15/15)	10209/10498
Kpneumoniae_2	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (14/14)	10478/10782
Ngonorrhoea_1	<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (353/356)	6325/6482
Ngonorrhoea_2	<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (358/360)	6282/6441
Paeruginosa_1	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (207/207)	11216/11619
Paeruginosa_2	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (208/208)	11232/11636
Saureus_1	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (18/19)	4110/4236
Saureus_2	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (19/20)	4193/4323
Sflexneri_1	<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> (2/2)	10678/10994
Sflexneri_2	<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> (2/2)	10641/10951
Spneumoniae_1	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (151/151)	6655/6843
Spneumoniae_2	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (148/149)	6606/6789
Styphimurium_1	<i>Salmonella</i>	<i>typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> (1037/1047)	11464/11771
Styphimurium_2	<i>Salmonella</i>	<i>typhimurium</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Salmonella enterica</i> (1034/1045)	11304/11600

### ***rawDIA*tect ein neuer Workflow für die bakterielle Proteomik**

Die bakterielle Proteomik hat sich im Laufe der Jahre weiterentwickelt und bedarf einiger Anpassungen, um in der klinischen Anwendung effektiv zu sein. In dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte genauer untersucht.

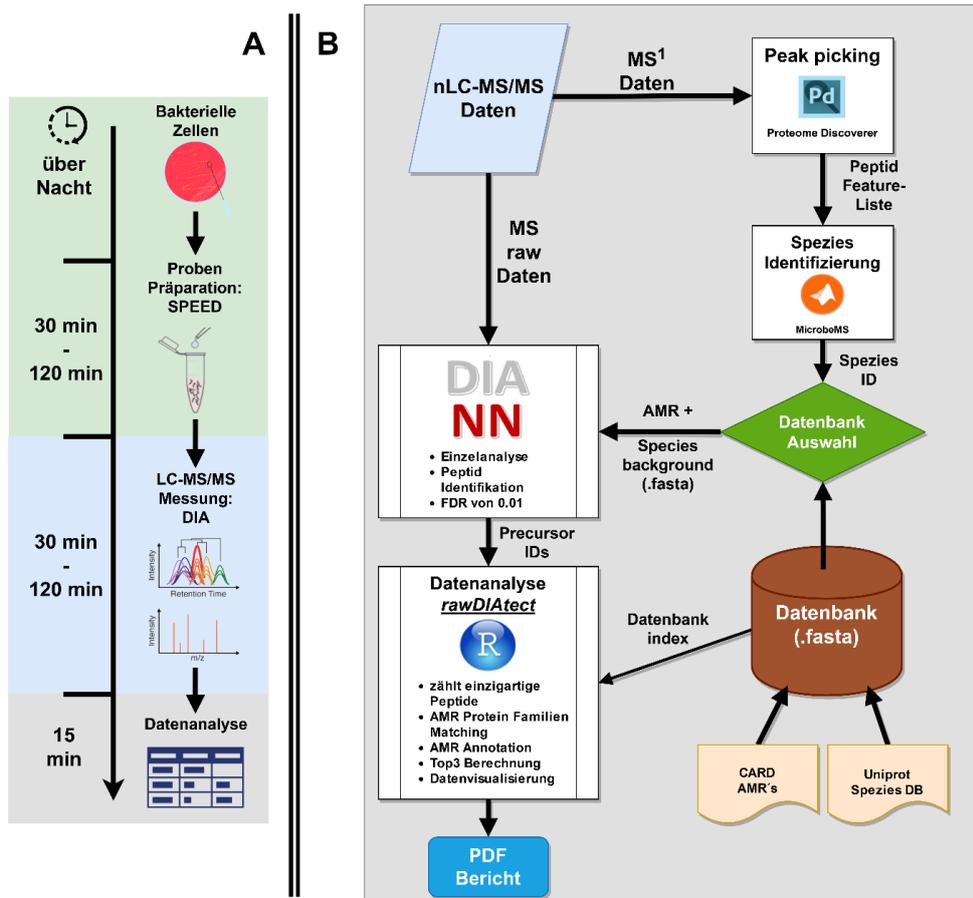
Die Methode umfasst die Vorbereitung von bakteriellen Isolaten, die in Abwesenheit von Antibiotika kultiviert wurden und unter Verwendung des SPEED-Protokolls (SPEED) für die Proteomik aufbereitet wurden [89]. Diese Methode ist schnell (~30 min), bequem, automatisierbar und vor allem, universell für alle Arten von Mikroorganismen, einschließlich sporenbildender Gram-positiver Bakterien.

Die LC-MS/MS-Messung beruht auf der datenunabhängigen Erfassung (DIA), die im Gegensatz zur datenabhängigen Erfassung (DDA) keine stochastische Natur der Proteinerkennung beinhaltet. Diese Strategie ermöglicht die Erfassung von deutlich umfangreicheren Proteomen stellt jedoch große Herausforderungen an die Datenauswertung [154].

Die Datenanalyse muss durch maßgeschneiderte Konzepte bewältigt werden. In diesem Workflows basiert die Peptididentifizierung auf *in silico* Vorhersage von Spektralbibliotheken, unterstützt von der Datenanalyse mit DIA-NN, welche neuronale Netze verwendet [91]. Dieser Ansatz ist jedoch nicht geeignet für die Identifizierung von Bakterien aus sehr großen Sequenzdatenbanken, wie z. B. alle bakteriellen Einträge in der UniprotKnowledgebase [160]. Daher wurde eine LC-MS<sup>1</sup>-basierte Methode zur mikrobiellen Spezies-Identifizierung evaluiert, die auf der MALDI-TOF MS-Biotypisierung beruht, welche ebenfalls auf LC-MS<sup>1</sup>-Musteranalysen aufbaut [84].

Das Proteom der identifizierten Spezies wird dann für die Vorhersage einer probenspezifischen Spektrenbibliothek verwendet, die wiederum als Hintergrund für die Peptididentifizierung aus der *comprehensive antibiotic resistance database* (CARD) dient [118]. Die Ergebnisse werden mit Hilfe eines hauseigenen R-Skripts namens *rawDIA*tect interpretiert, welches den AMR-Phänotyp meldet [16].

Der in dieser Arbeit entwickelte Workflow, *rawDIA*tect, ist ein neuer proteomischer Ansatz der in **Abbildung 20** zusammengefasst wird. Er besteht im Kern aus 3 Abschnitten: der Probenpräparation, der LC-MS/MS Messung und der Datenanalyse.



**Abbildung 20: Analyseschema von *rawDIAtect***

(A) Zeitleiste des gesamten Workflows mit Kultivierung über Nacht und Probenvorbereitung nach dem SPEED-Protokoll (grün). Peptide wurden mit einem nanoLC-Setup, das mit einem Orbitrap MS System gekoppelt ist (blau), getrennt und gemessen, gefolgt von der Datenanalyse (grau).

(B) Überblick über den Workflows der Datenanalyse. Die MS<sup>1</sup>-Daten wurden mit Hilfe von Peak Picking im Proteome Discoverer unter Verwendung des Minora-Algorithmus aus Orbitrap MS Daten generiert. Die sich daraus ergebende *feature*-Liste wird dann für die Speziesbestimmung mit MicrobeMS verwendet. Die Spezies-ID wird zur Auswahl einer Spezies Background Datenbank aus UniProt verwendet. Diese Spezies Background Datenbank wird kombiniert mit der *comprehensive antibiotic resistance database* (CARD) AMR-Datenbank. Die kombinierte Fasta wurde in DIA-NN verwendet, um die MS-Daten zu analysieren. Das Ergebnis ist eine Liste von Peptiden. Diese Peptidliste wird dann mit dem R-Skript *rawDIAtect* analysiert, um AMRs zu erkennen und einen PDF Bericht zu erstellen.

## Bakterielle Diagnostik in unter 1 h

Der *rawDIA* workflow wurde durch eine größere Anzahl an Isolaten und Resistenzen erweitert und mit diesem größeren Panel getestet. Dazu wurden insgesamt 147 Isolate untersucht und mit einem optimierten 30 min DIA Gradienten gemessen. Ziel war es, das Protokoll aus der *proof-of-concept* Phase zu bringen, indem ein repräsentatives ESKAPE Panel gemessen wird sowie dies mit einem erhöhten Durchsatz zu untermauern. Ebenfalls wurde die Probenpräparation optimiert, um möglichst viele Schritte zu vereinfachen oder zu vereinen (siehe Seite 42).

In diesem Panel befinden sich die wichtigsten Vertreter der Gram-negativen und Gram-positiven Erreger, welche eine große Varianz an Beta-Laktamasen und weiteren Leitresistenzen enthalten. Eine detaillierte Zusammenfassung der Proben ist unter dem Kapitel: *Bakterielle Kultivierung* aufgeführt. In **Tabelle 19** ist die Übersicht über Probenanzahl und den zu testenden Genus angegeben.

**Tabelle 19:** AMR ESKAPE Panel

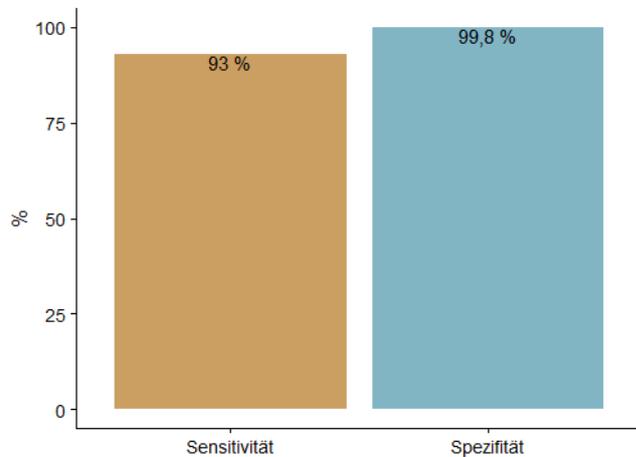
Genus	Seite	Anzahl
<i>Citrobacter</i>	72	3
<i>Enterobacter</i>	73	5
<i>Escherichia</i>	74	19
<i>Klebsiella</i>	75	20
<i>Acinetobacter</i>	76	17
<i>Pseudomonas</i>	77	13
<i>Shigella</i>	78	4
<i>Morganellaceae</i>	79	6
<i>Enterococcus</i>	80	30
<i>Staphylococcus</i>	81	30

Die Panels wurden gegen die per PCR identifizierten AMR Determinanten verglichen. Aus der Analyse der per MS identifizierten AMR Determinanten, ergeben sich zu den PCR Ergebnissen folgende Kategorien: richtig positiv, falsch positiv, richtig negativ, falsch negativ. Eine detaillierte Tabelle befindet sich im Anhang dieser Arbeit (**Tabelle S 5**).

Für falsche positive Treffer wurde zusätzlich überprüft, ob es sich dabei um einen *carry-over* handelt. Als ein *carry-over* wurden Treffer gezählt, welche Peptide enthalten, die in der Probe davor gemessen wurden und deren Proteinintensität auf min. 1/10 reduziert wurde. Diese Treffer wurden entfernt. Als richtig negativ wurde jeder fehlende AMR Gen Familien Treffer gezählt, welcher in der Datenbank vorliegen könnte (31 Gruppen) und nicht im MS Lauf nachgewiesen werden konnte. Im Panel gibt es auch initial falsch positive Treffer, welche als intrinsisch bekannt sind und daher mit der Referenzmethode nicht getestet wurden. Für *Citrobacter* ist dies zum Beispiel die CMY Beta-Laktamase. Diese Treffer wurden als richtig positiv gewertet, falls diese nicht per PCR bestätigt worden sind.

Als AMR Datenbank wurde eine reduzierte CARD Datenbank verwendet, welche die wichtigen von der WHO empfohlenen Leitresistenzen und repräsentative Isoformen

enthält, die in diesem Panel per PCR detektiert wurden (79 Einträge, 31 AMR-Gen-Familien, **Tabelle 14**).



**Abbildung 21:** Sensitivität/Spezifität des AMR-Nachweises durch die Proteomik

Die Sensitivität wurde nach der Formel  $\text{Sensitivität} = \frac{TP}{TP + FN}$  berechnet. Die Spezifität wurde nach der Formel  $\text{Spezifität} = \frac{TN}{TN + FP}$  berechnet. Verglichen wurden die LC-MS/MS Treffer gegen die PCR Ergebnisse.

Mit der neuen reduzierten CARD Datenbank konnte der Detektionsumfang von *rawDIAtect*, im Vergleich zur *proof-of-concept* Studie, erweitert werden. Es wurde eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 99,8 % erreicht (**Abbildung 21**). Es konnten alle Determinanten, bis auf *qnrS1*, im Panel mindestens einmal detektiert werden. Vereinzelt wurden einzelne Resistenzen nicht gefunden (fehlende Treffer). Bei *qnrS1* handelt es sich um eine Plasmid gebundene Resistenz, welche sich durch eine hohe Variabilität und niedrige Expressionsmengen auszeichnet. Zum Zeitpunkt der Analyse der Daten war zudem die genaue Isoform unklar, da diese in der PCR nicht genauer bestimmt wurde, weswegen diese Resistenz zunächst aus dem Panel entfernt wurde.

Für ein kleines Panel von Klebsiellen wurden zusätzlich NGS Ergebnisse analysiert, um etwaige Unterschiede erkennen zu können. Es zeigte sich, dass mit der PCR Methode Resistenzen wie TEM übersehen wurden, welche in der NGS gefunden wurden, diese wurden als richtig positiv gewertet. Es wurden aber auch fehlende MS Treffer von OXA im NGS Tool *Kleborate* als ungesicherte Treffer identifiziert, da die hinterlegten Sequenzen nicht klar einer Isoform zuzuordnen sind. Diese Treffer wurden weiterhin als falsch positiv gewertet.

Citrobacter-Panel

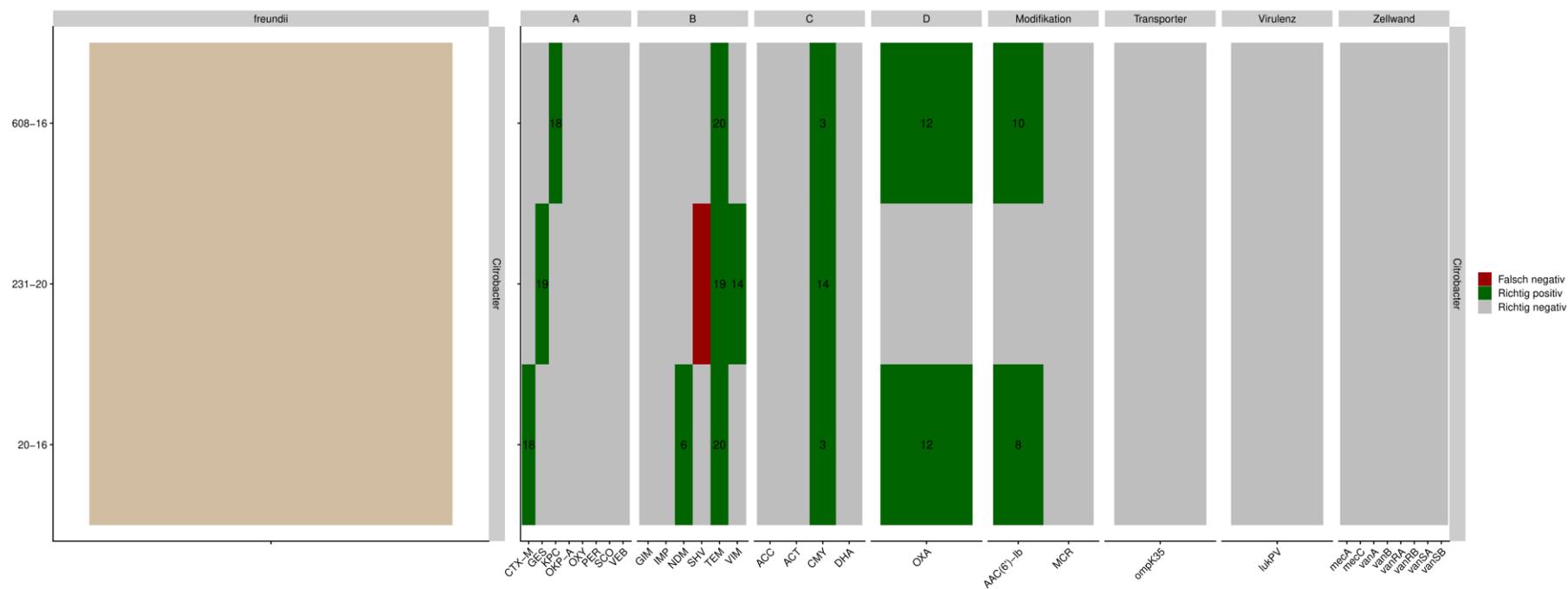


Abbildung 22: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Citrobacter-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

Enterobacter-Panel

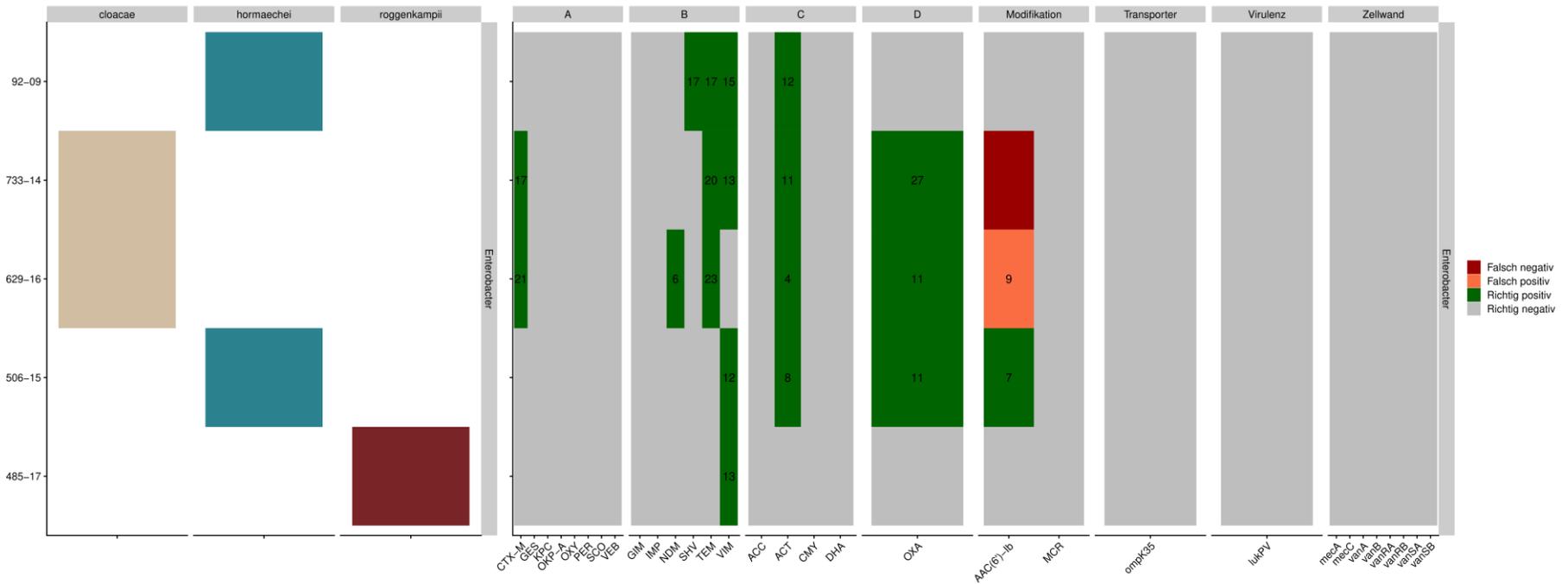


Abbildung 23: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Enterobacter-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

Escherichia-Panel

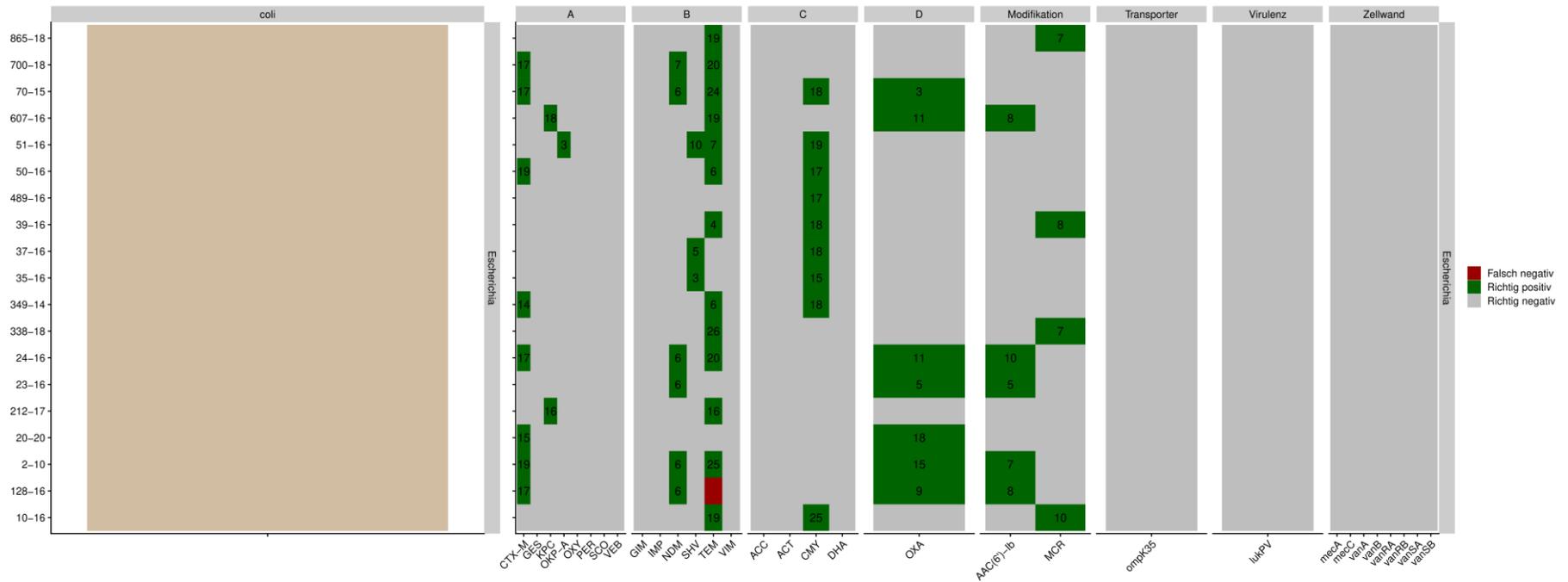


Abbildung 24: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Escherichia-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

Klebsiella-Panel

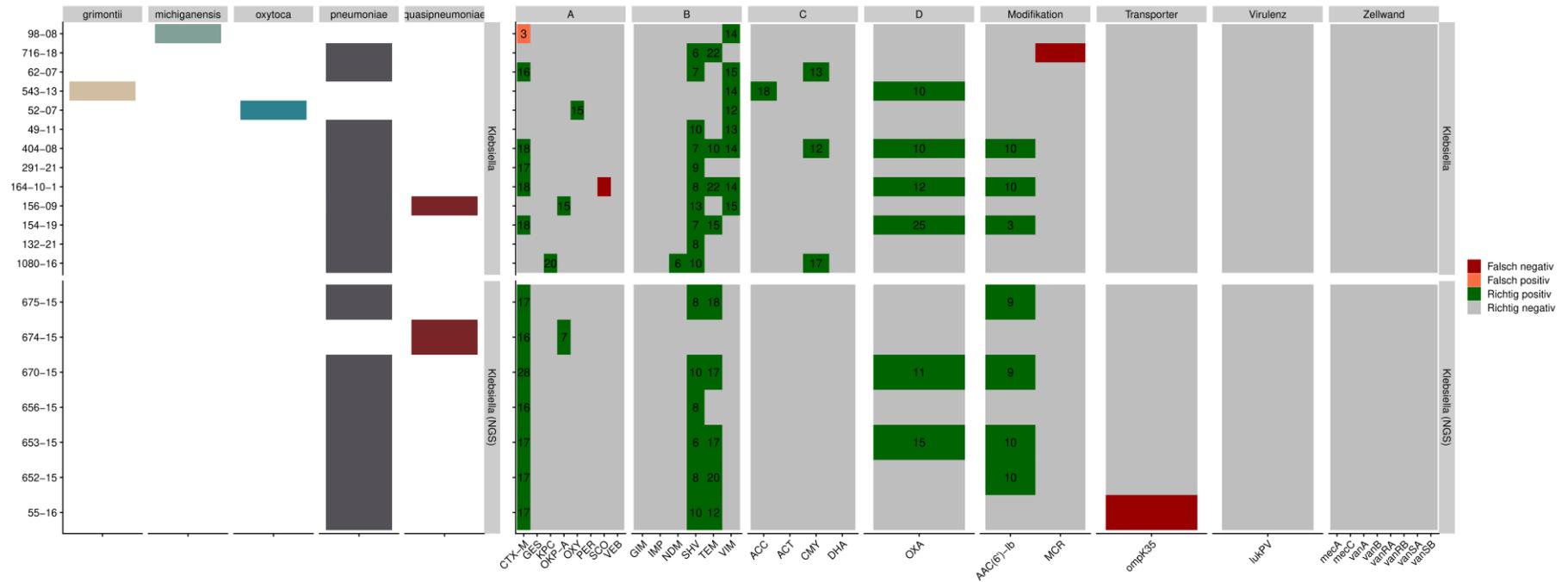


Abbildung 25: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Klebsiella-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse (Oben) und NGS Ergebnisse aus Kleborate (v2.2.0) (Unten) verglichen.

Acinetobacter-Panel

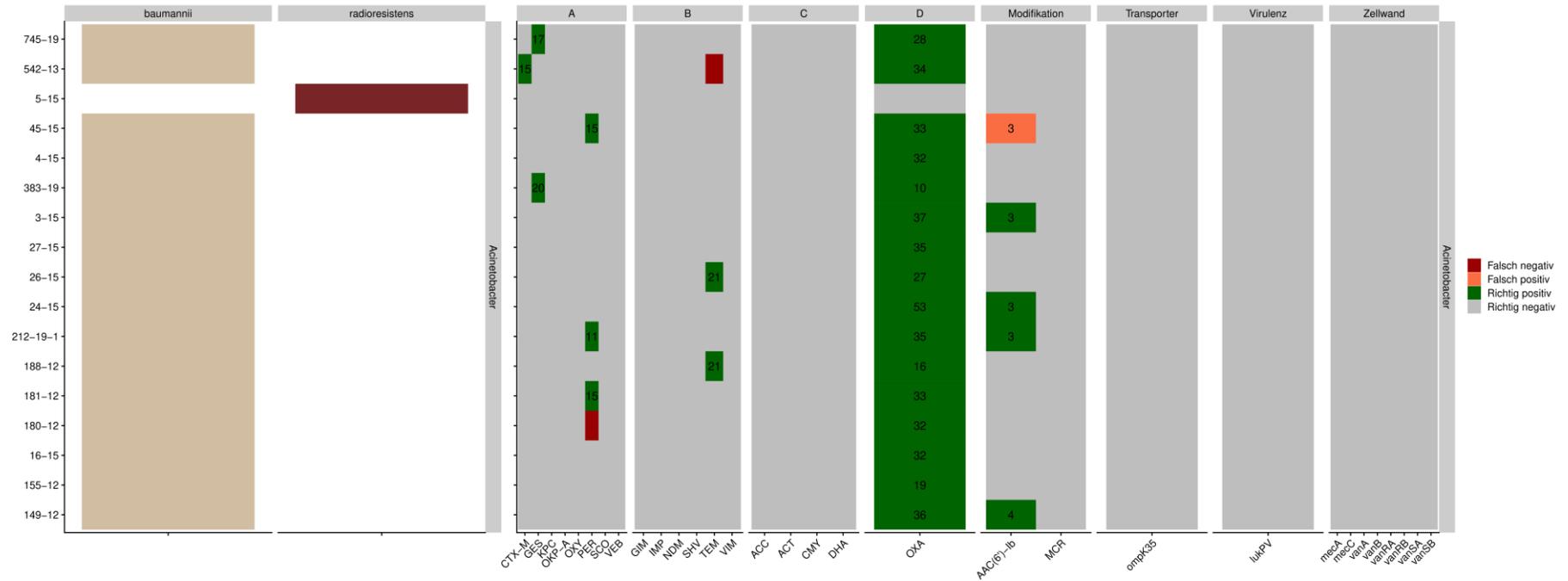


Abbildung 26: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Acinetobacter-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

Pseudomonas-Panel

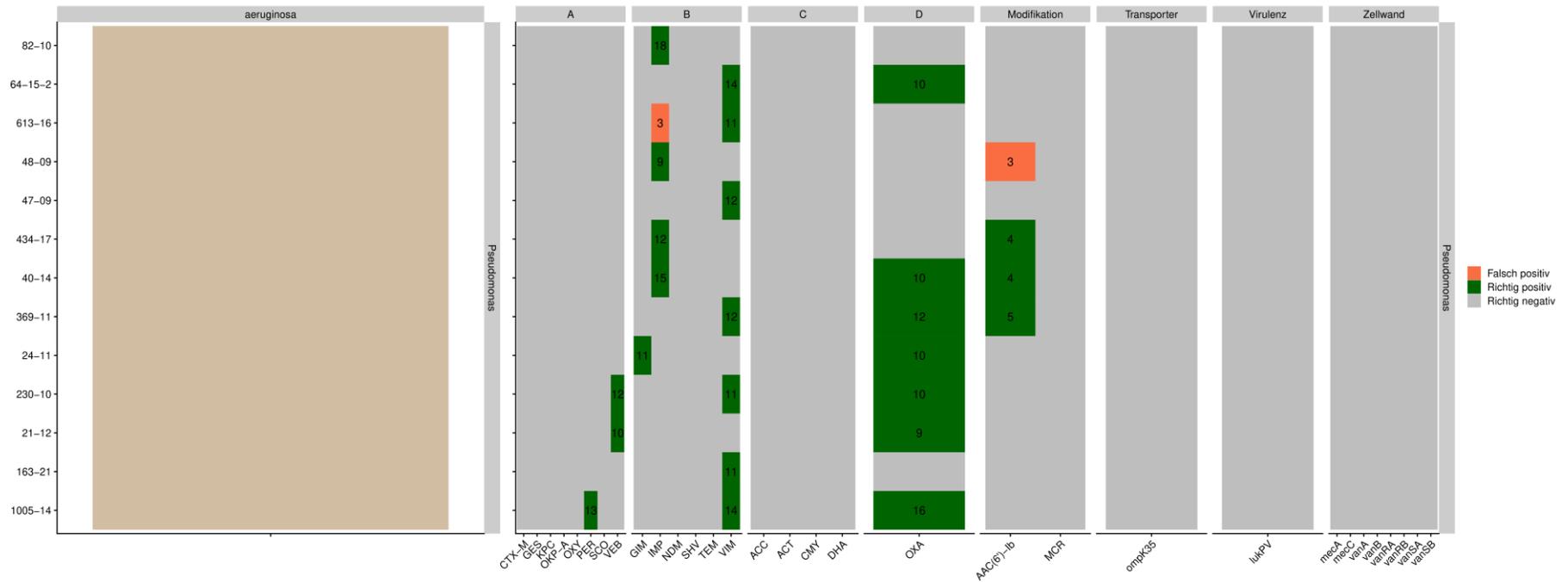
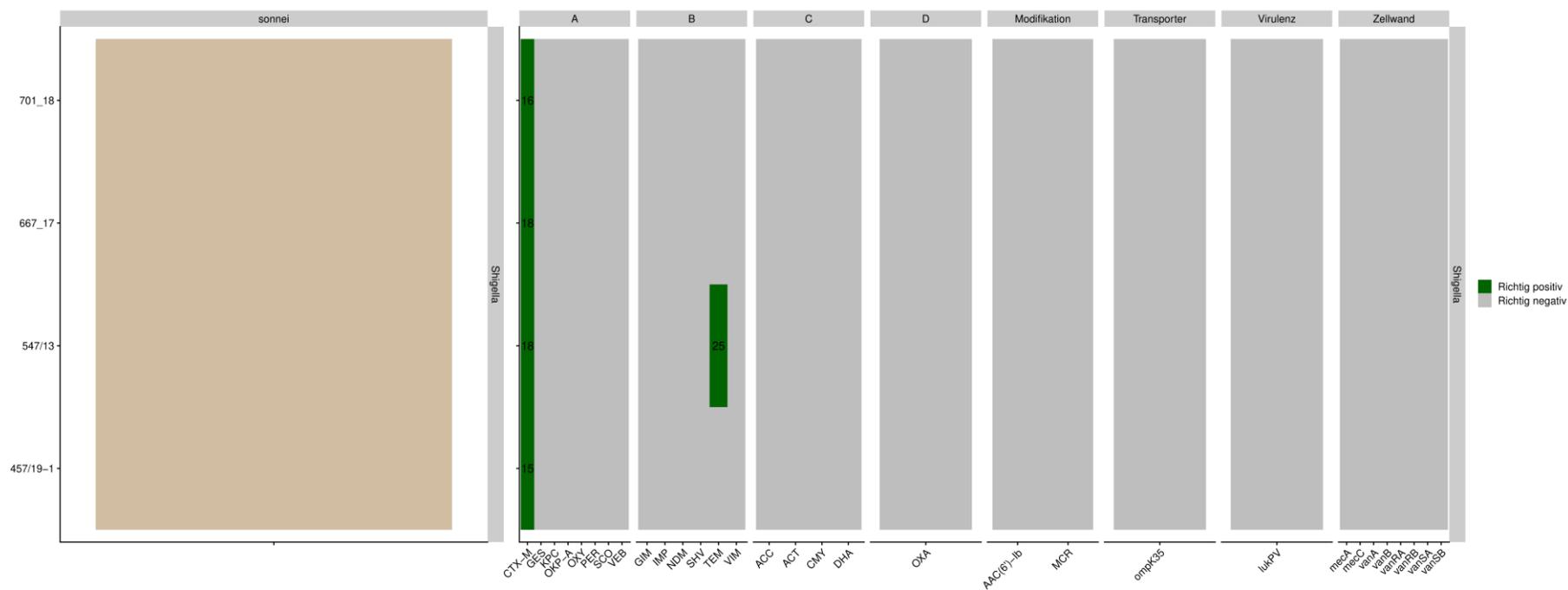


Abbildung 27: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Pseudomonas-Panel

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

### Shigella-Panel



**Abbildung 28:** *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Shigella-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

Morganellaceae-Panel

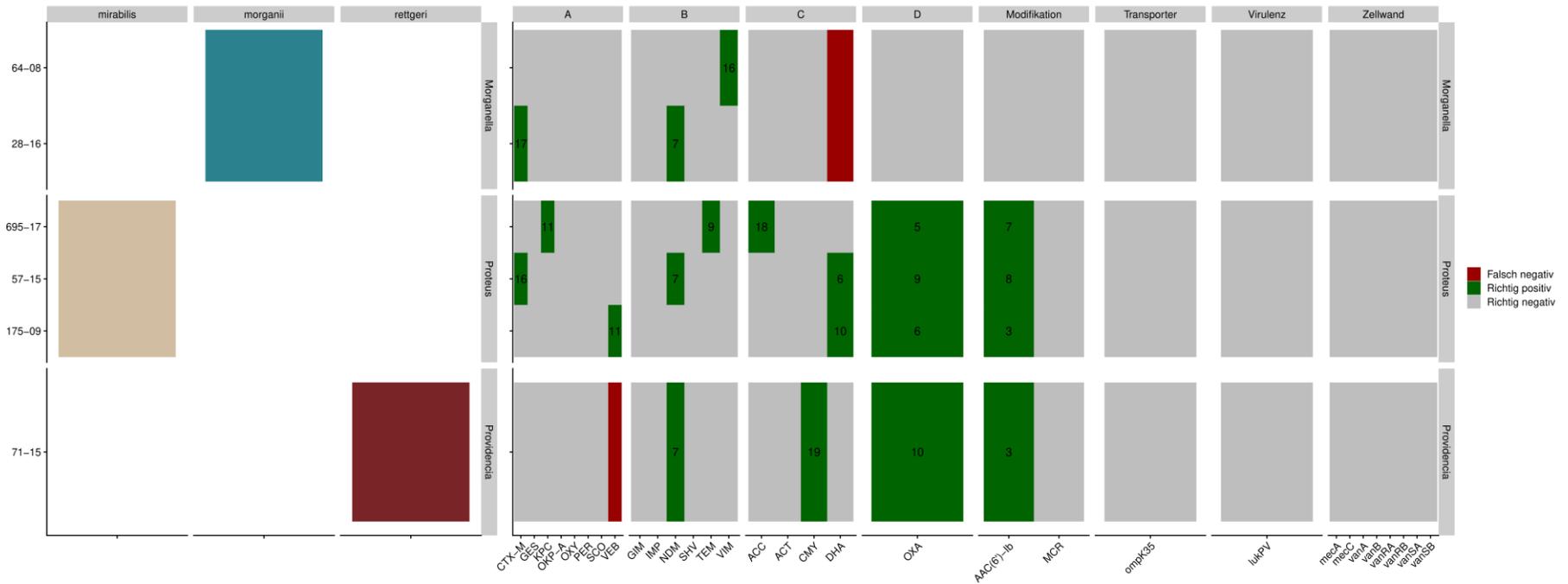


Abbildung 29: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Morganellaceae-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

Enterococcus-Panel

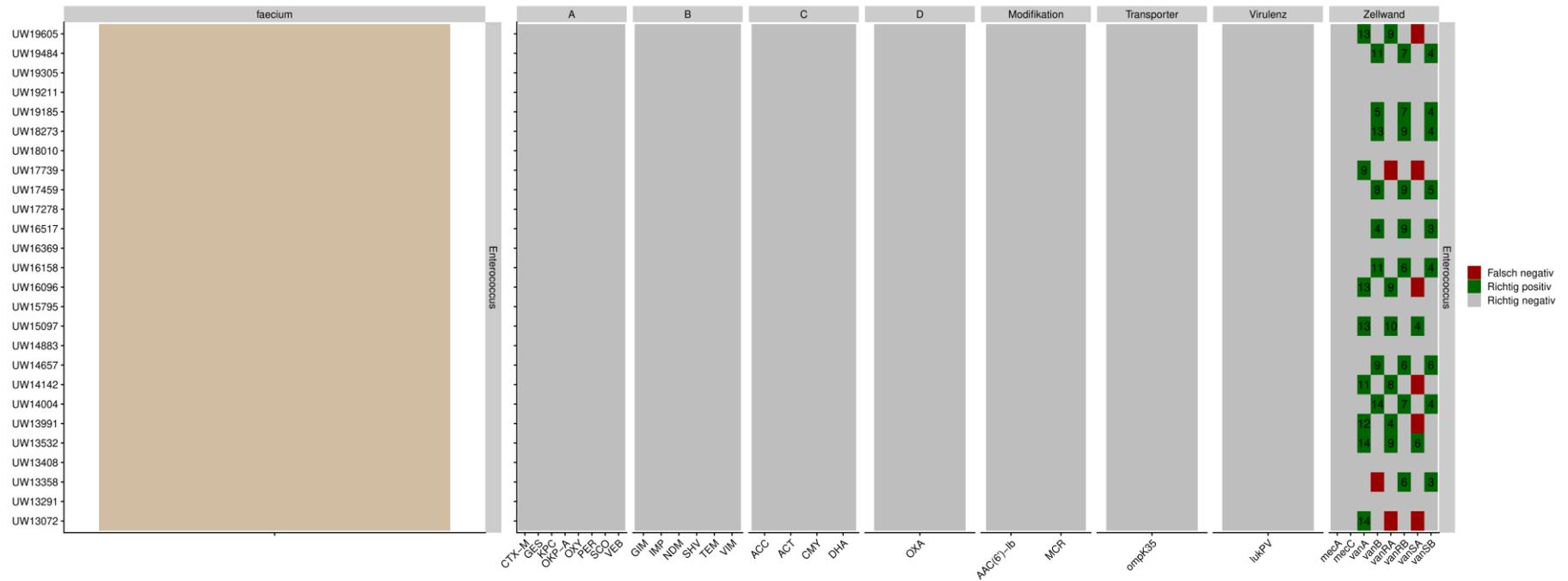
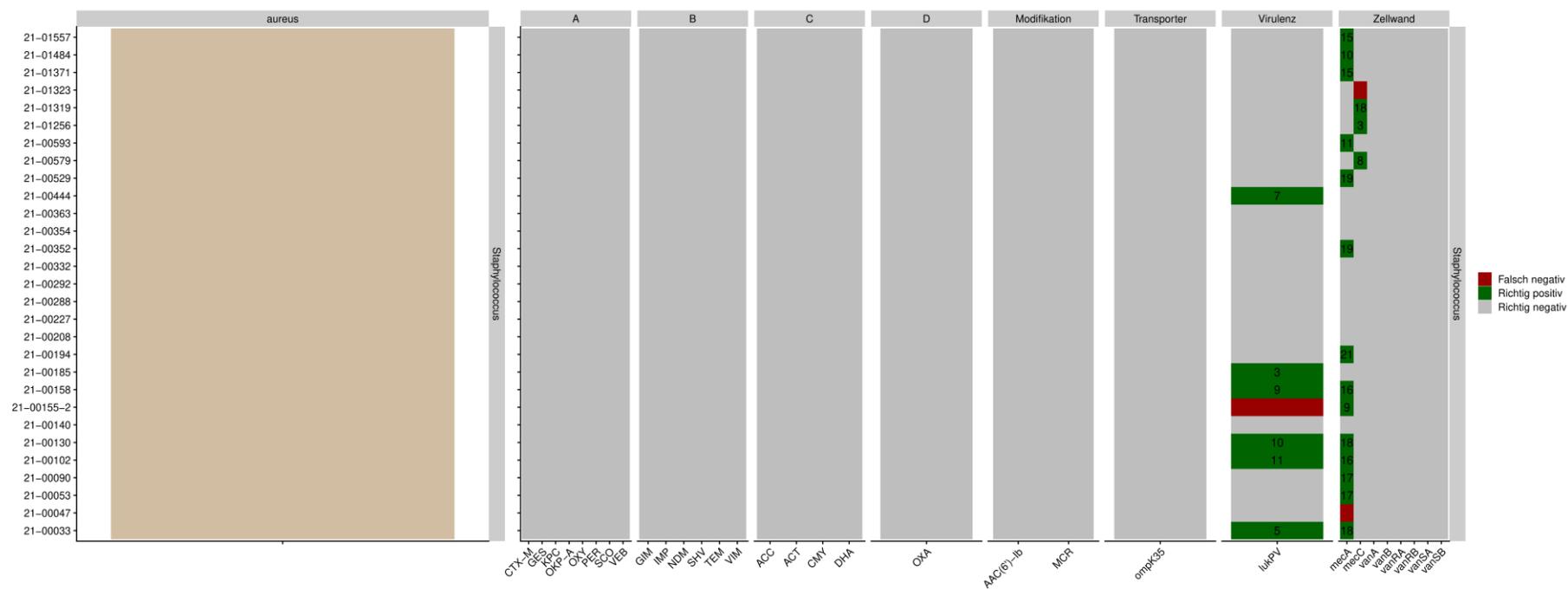


Abbildung 30: *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Enterococcus-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

## Staphylococcus-Panel



**Abbildung 31:** *rawDIAtect* sowie MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse des Staphylococcus-Panels

Links: MS<sup>1</sup> Spezies-Identifikation Ergebnisse

Rechts: Proteomische Treffer der DIA-Pipeline des 30 min Gradienten ausgewertet mit DIA-NN. Die Peptidliste wurde mit dem R Programm *rawDIAtect* analysiert und gegen PCR Ergebnisse verglichen.

## Diskussion

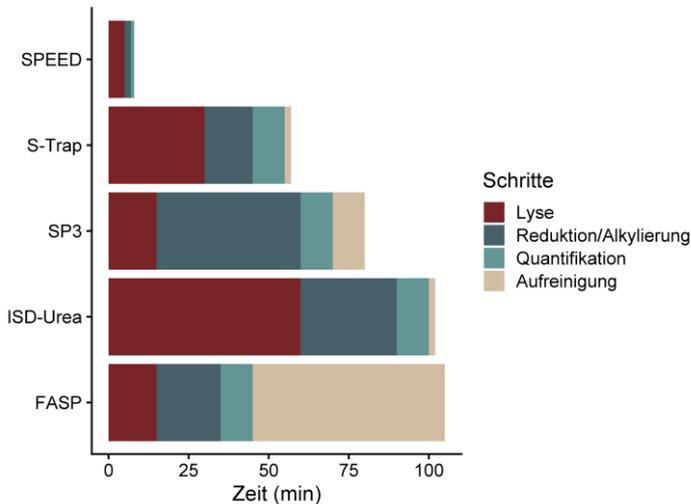
Eine Zielstellung der Arbeit ist die Entwicklung eines Workflows, um Proteomik als Methode für die klinisch-mikrobiologische Diagnostik zum Nachweis von bakteriellen Pathogenen zu etablieren. Dabei wurden nicht nur die Probenpräparation und deren Einfluss auf die Daten analysiert, sondern auch die zwei der drei Säulen der bakteriellen Diagnostik (Spezies und AMR-Detektion) genauer betrachtet. Darüber hinaus wurden auch zwei der vielen Möglichkeiten MS Daten (DDA vs. DIA) aufzunehmen verglichen. Nur wenn alle vier Aspekte optimiert und verstanden werden, kann eine solide Methode entwickelt werden

## Evaluation der Probenpräparation

Es gibt viele verschiedene Probenpräparationsprotokolle, wovon einige schon lange etabliert sind. Diese Protokolle verwenden Stoffe wie SDS, Urea oder andere chaotrope Stoffe beziehungsweise Detergenzien, welche den meist mechanischen Aufschluss unterstützen [161-163]. Der Nachteil ist, dass die Proben aufgereinigt werden müssen, da Stoffe wie SDS und Urea den tryptischen Verdau inhibieren, weswegen diese entfernt oder stark verdünnt werden müssen. Je nach Protokoll geschieht dies auf unterschiedlicher Weise. FASP macht dies über Filtration, S-Trap durch Fällung und SP3 über magnetische *beads* [164-167]. Ein ideales Protokoll verzichtet deshalb auf die Zugabe solcher Stoffe, um auf zusätzliche Arbeitsschritte zu verzichten. Das SPEED Protokoll entwickelt von Döllinger *et al.* 2020 hat genau dies erreicht [89].

Im SPEED Protokoll wird durch die vereinfachte Lyse durch Säure und Hitze die Zugabe von SDS unnötig. Dadurch kann direkt im Anschluss verdaut werden, dies spart enorm viel Zeit. Momentan gibt es zwei etablierte Versionen des SPEED Protokolls: Basic SPEED und fa-SPEED. Basic SPEED ist ein *one-pot* Flüssigaufschlussverfahren (ISD) und fa-SPEED eine Fällung auf einem Filter (**Abbildung 9**).

Beide Protokolle beginnen mit derselben Lyse durch Säure und Hitze (SPEED), in dem direkt auf das Zellpellet TFA gegeben wird. Diese Inkubation wird durchgeführt, um die Proteinstruktur, aber auch Zellwandstruktur zu schwächen, dies ist besonders bei Gram-positiven Proben notwendig. Es zeigte sich, dass eine verlängerte Inkubation zu Identifikationsverlusten führen kann. Dies ist auf Hydrolyse zurückzuführen. Eine zu kurze Inkubation wiederum (<3 min) oder das Weglassen von Hitze führten, vor allem bei Gram-positiven Proben, zu einem signifikanten Verlust von Identifikationen oder zum Fehlschlag des Protokolls.



**Abbildung 32:** [Übersicht des Zeitaufwandes von proteomischen Probenpräparationsprotokollen \(ohne Verdau\)](#)

verwendet. Die Inkubationstemperatur wurde auch geändert. Die Alkylierung und Reduktion wird wie die Lyse, bei 70°C durchgeführt, um das Überführen der Probe in einen zweiten Thermoblock zu verhindern. Dadurch kann die Zeit pro Probe auf ~7 min reduziert werden. Damit ist die SPEED Lyse momentan das schnellste und einfachste Protokoll im Proteomik Bereich (**Abbildung 32**).

Nach der Lyse und Neutralisation kommt der Verdau der Proteine zu Peptiden, hier kann jedes Protokoll auf verschiedene Enzyme zurückgreifen. Damit verbunden sind unterschiedliche Inkubationszeiten. Diese können von 20 h bis zu weniger als 15 min variieren (**Tabelle 20**).

**Tabelle 20:** [Verdauzeiten SPEED basierter Protokolle](#)

Protokoll	Enzym	Enzym/ Protein	Zeit (h)	Temperatur (°C)	Volumen (µl)
Basic-SPEED	Trypsin GOLD	1/50	20	37	400
BeaST	Trypsin GOLD	1/25	1	40	40
fa-SPEED	Rapid Trypsin	1/10	1/4	70	100

Der Verdau bei 37°C für 20 h sorgt für einen vollständigen Verdau der Probe und damit die höchste mögliche Menge an Peptiden. Durch Reduktion des Volumens und Erhöhung der Temperatur kann die Reaktionsgeschwindigkeit des Trypsins erhöht und damit die nötige Zeit zum Verdauen reduziert werden. Der Rapid Verdau ist schnell, aber teuer, da eine große Menge von dem teureren Enzym benötigt wird. Es zeigte sich, dass eine 1 h Verdau mit dem Trypsin GOLD und einem sehr kleinen Volumen (<50 µl)

möglich ist. Dies setzte aber eine Aufkonzentration und Reinigung der Probe voraus, welche über *magnetic beads* oder Fällung möglich ist.

Im Laufe dieser Arbeit wurde deswegen ein *bead* basiertes Protokoll entwickelt, welches auf dem Opentrons 2 Roboter durchgeführt wurde (BeaST). Ein weiteres Ziel war es, die Vorteile des SPEED Protokolls mit der Schnelligkeit und Konsistenz eines Roboters zu verbinden [168].

Bei allen 3 Protokollen (Basic, FA und BeaST) muss es zu einer Entsalzung der Peptide kommen, bevor diese in die LC geladen werden. Dies wird im Falle von Basic-SPEED über C18 RP SPE Säulen durchgeführt. Diese sind bereits etabliert und gelten als verlässlich. fa-Speed hat den Vorteil auf eine sogenannte Offline-Entsalzung verzichten zu können. Durch die Verdünnung des Verdaupuffers auf 1:10 kann die Entsalzung online, mit Hilfe einer Vorsäule direkt an der LC geschehen, dies reduziert die benötigte Zeit. Das BeaST Protokoll wurde für die Möglichkeit entwickelt entweder über Säulen oder mit *beads* entsalzt zu werden. Letzteres wurde auch dazu optimiert, mögliche Polymerverunreinigungen zu beseitigen, welche durch die offene Bauart des Opentrons auftreten können. Der Nachteil der *bead* basierten Entsalzung (SP2) ist der hohe Verlust an Peptiden, aber auch die großen Volumina [146]. Dadurch war es nicht möglich, die komplette Probe am Ende des BeaST Protokolls im Roboter zu verarbeiten. Deshalb wurde die SP2 Entsalzung von Hand durchgeführt (**Abbildung 10**). Eine Limitierung ist auch durch das Alter des LC-MS Systems gegeben. Durch ein sensitiveres Gerät wäre der Verlust an Peptiden verschmerzbar und die Entsalzung könnte am Roboter stattfinden. Was bedeutet dies nun aber für die MS Messung?

Basic- sowie fa-SPEED zeigen im Vergleich zum *bead* basierten Protokoll (BeaST) deutliche bessere Identifikationen (**Tabelle 13, Abbildung 12 und Abbildung 13**). Auch wenn BeaST dabei einen schlechteren Output als die beiden etablierten Referenz SPEED Protokolle hat, ist im Vergleich zu anderen publizierten Daten die Anzahl an gefundenen Proteinen ähnlich hoch [89, 146, 161].

Die gefundenen Proteingruppen unterscheiden sich dabei kaum in den drei Methoden. Es gibt dabei dennoch eine leichte Verringerung von Membran und extrazellulären Proteinen bei BeaST (**Abbildung 12 und Abbildung 13**). Durch die hohe Hydrophobizität von Membranproteinen könnten diese beim Waschen verloren gegangen sein. Da extrazelluläre Proteine in recht niedrigen Mengen vorliegen und im Gegensatz zu Basic und fa-SPEED nicht verlustfrei gearbeitet wird, könnten diese ebenfalls weggewaschen worden sein. Aber auch zwischen Basic und fa-SPEED gibt es

einen wichtigen Unterschied, denn das Filter-Protokoll ist deutlich sauberer und weniger anfällig für Proben mit vielen Zelltrümmern (**Abbildung 11**).

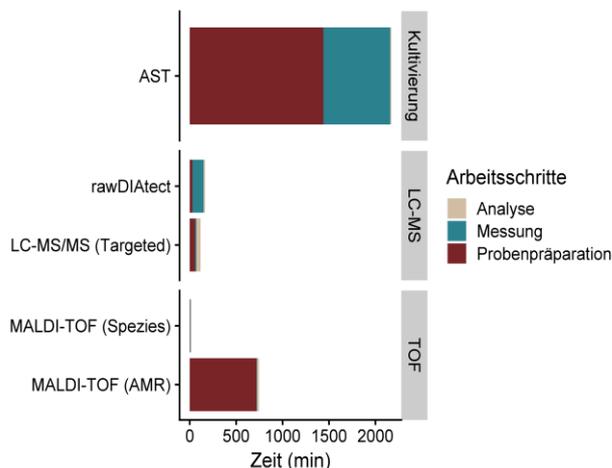
### Fazit zur Probenpräparation

Abschließend lässt sich sagen, dass die Wahl des richtigen Protokolls nach der Fragestellung sowie dem Zeitaufwand gewählt werden sollte. Für vollständige Proteome von bereits bekannten Proben sollte das Basic-SPEED Protokoll gewählt werden. Bei unbekanntem oder schwierigen Proben sollte das fa-SPEED Protokoll vor allem dann gewählt werden, wenn die Zeit ein wichtiger Faktor ist. Das BeaST Protokoll eignet sich vor allem bei der Bearbeitung von bis zu 48 Proben, da durch die Automatisierung Zeit für andere Aufgaben frei wird. Dadurch könnte BeaST mit seinem hohen Durchsatz und geringer *hands-on-time* vor allem für den Routineeinsatz attraktiv werden.

## Proteomik in der Klinisch-mikrobiologischen Diagnostik

Wie oben bereits erörtert ist für eine umfassende Diagnostik eine solide Probenpräparation nötig [169]. Sie richtet sich dabei nach den Möglichkeiten des Labors und der benötigten Aussagekraft. Aber nicht nur die Probenpräparation ist entscheidend. Auch die Messung und Analyse der Daten sind relevant, um eine allumfassende Lösung zu finden. Mit *rawDIA*tect kann eine solche Lösung angeboten werden [16].

Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll verbindet eine universale Probenpräparation mit einer unvoreingenommenen LC-MS Messung und der Vereinigung zweier Indikationen für die bakterielle Diagnostik: Spezies und AMR. Kein anderes Protokoll ist derzeitig dazu in der Lage. Die damit verbundene Zeitersparnis ist enorm, insbesondere im Vergleich zu auf Kultivierung basierten Methoden wie AST (**Abbildung 33**).



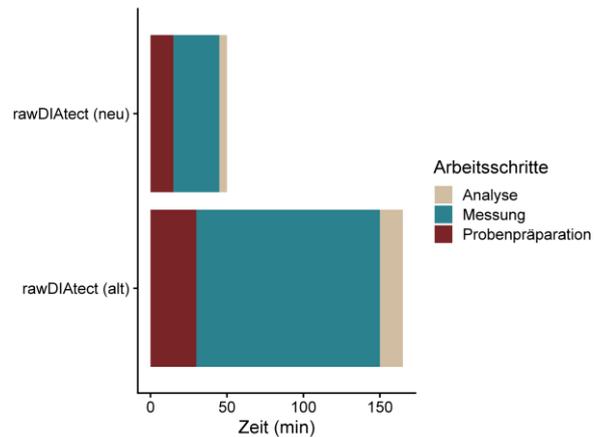
**Abbildung 33:** Zeitaufwand verschiedener Methoden in der klinischen Diagnostik

Die MALDI-TOF Methoden (Spezies und AMR) wurden getrennt, da zur Resistenzbestimmung eine Kultivierung mit Antibiotika nötig ist. Für die Speziesbestimmung im Schmierverfahren reicht die Primärkultur. Die AST Methode findet auf Agarplatten mit Antibiotika versetzten Teststreifen statt, welche nach 24 h abgelesen werden. *Targeted* LC/MS Methoden können sehr schnell gemessen werden, sind aber durch schlechte Protokolle oder durch langsame von-Hand-Analysen limitiert.

Bislang gibt es nur vereinzelte LC-MS basierte *targeted proof-of-concept* Methoden für die klinische bakterielle Diagnostik, die auf das Finden von vordefinierten Determinanten beruhen, welche sehr schnell gefunden werden können, da nicht das gesamte Spektrum gemessen wird [11, 12, 122, 123, 170]. *Targeted-assays* haben den Vorteil bei hochkomplexen Proben wie Blutplasma trotz der hohen Varianz der Probe die gewünschten Ziele zu finden. Da die Masse zu Ladung sowie Retentionszeit bekannt sind, ist es möglich diese Ziele zu isolieren. Damit gehen aber alle anderen messbaren Ionen verloren, da diese ignoriert werden. Auch müssen diese *targets* vorher bekannt sein. Dies wird vor allem bei komplexen Proben gemacht, da die Messung vollständiger Proteome bislang zu viel Zeit in Anspruch nahm. Durch technische Verbesserungen und Optimierungen, wie die Einführung der ungezielten DIA-Messmethode und schnelle MS

Geräte ist dieser Nachteil nicht mehr so stark [90, 171, 172]. Vor allem bei der Messung von wenige komplexen Proben wie Bakterien. *Targeted assay* bleiben dabei weiterhin schneller und sensitiver zum Nachteil der Datentiefe da nur vorbestimmte Moleküle gefunden werden können.

Die DIA-Messmethode ermöglicht die parallele Messung mehrerer unbestimmter Moleküle in einem MS<sup>2</sup> Spektrum. Mit der alten DDA-Messmethode wird ein einziges unbestimmtes Molekül *peak* abhängig fragmentiert, wobei ein Algorithmus entscheiden welche *peaks* ausgewählt werden. Während bei der



DIA Messung *m/z* Fenster angegeben werden, in dem alle Ionen fragmentiert werden. Dadurch kommt es zu einer

**Abbildung 34:** [Verbesserung des rawDIAtect Workflows durch Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte](#)

Erhöhung der Datenmenge sowie Durchsatz aber auch der Komplexität. Diese DIA Spektren sind nicht mehr von Hand zu analysieren und müssen mit Hilfe von Computer unterstützen Ansätzen, wie zum Beispiel KIs, verarbeitet werden. Bis vor kurzer Zeit war es zur Analyse der DIA MS Daten technisch notwendig Spektrenbibliotheken zu messen [173, 174]. Diese Spektrenbibliotheken werden oft mit DDA basierten Methoden gemessen und sind darüber hinaus stark versuchsabhängig [175-177]. Dies kostet viel Zeit und muss je nach Organismus sowie Gerät variiert werden. Kürzliche Fortschritte in der Analyse von Daten machten es möglich Spektrenbibliotheken *in-silico* aus Sequenzdatenbanken zu generieren [91, 154, 178]. Dies vereinfachte die Datenanalyse erheblich.

All diese Optimierungen in der Probenpräparation und des 30 min Gradienten sowie der Zugang zu stärkeren Rechnern haben sich im Protokoll bemerkbar gemacht (**Abbildung 34**). Die damit verbundene Zeitersparnis ist signifikant. Die *reporting-time* konnte von 4 h (160 min Datenerfassung) auf unter 1 h (40 min Datenerfassung) reduziert werden.

Damit ist es *rawDIAtect* möglich unvoreingenommen bakterielle Proteome zu messen und dabei die Vorteile einer offenen Datenaufnahme (z.B. WGS) mit einer gezielten Datenanalyse (z.B. PCR) zu verbinden [16, 89, 154]. Dadurch sind Analysen ohne

Informationsverlust möglich, um in Peptidlisten nach Resistenzen, Virulenzen oder spezies-spezifische Peptide zu suchen.

Ein vollständiger bakterieller Report baut auf zwei Säulen auf: der AMR-Detektion und der Spezies-Detektion. In den kommenden beiden Kapiteln wird dabei genauer auf die Besonderheiten ihrer Detektion sowie die Fortschritte eingegangen, die für die Entwicklung von *rawDIAtect* nötig waren. Diese weisen für die AMR Diagnostik eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 99,8 % auf.

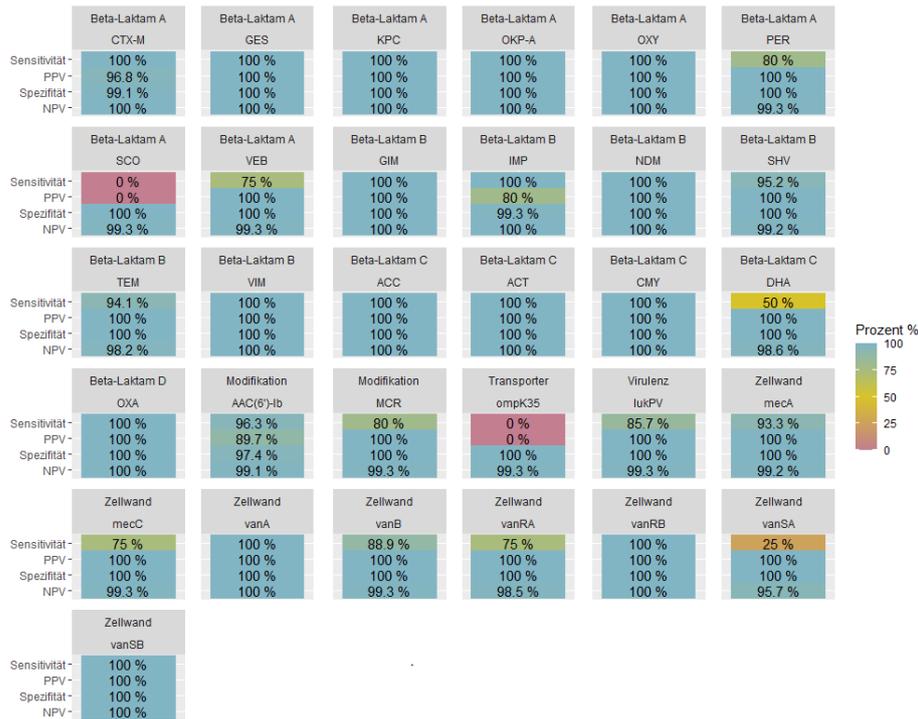
### Resistenzbestimmung

Am Anfang dieser Arbeit bestand die Frage, ob es möglich ist, Resistenzen mittels LC-MS messen zu können. Bereits andere Studien zeigten diese Möglichkeit mittels *targeted* LC-MS [[11](#), [12](#), [122](#), [123](#), [170](#)]. Im *proof-of-concept* Paper mit einem 160 min Gradienten konnten wir im Gegensatz zu den bereits publizierten Studien zeigen das wir auch ungezielt Resistenzen bestimmen können (Seite 58).

Dabei wurden 13 AMR Familien mit verschiedenen Isoformen bei 7 Spezies genauer betrachtet. Als Datenbank diente CARD, eine große und umfassende Resistenzdatenbank (>1600 AMR Familien). Dennoch sorgte dies für zu unspezifische Treffer (**Abbildung 18**). Bei solch großen Datenbanken kann es zu einer falschen Annotation von Genen kommen, dies spiegelt sich durch falsch positive Treffer in der Analyse wieder. Durch die hohe Heterogenität der Datenbank ist es aber nicht möglich eine allumfassende *Target* basierte Methode zu entwickeln. Auch die Limitierung, nur Treffer zu werten, welche drei einzigartige Peptide besaßen, ist sehr konservativ und nicht üblich in der Proteomik, war aber durch die Inkonsistenz der Datenbank notwendig, um falsch positive Treffer oder *carry-over* Peptide zu filtern. Daraufhin wurde die CARD Datenbank auf die im ersten Paper 22 möglichen Isoformen reduziert [[16](#)]. Durch die Reduktion konnten die falsch positiven Treffer verhindert werden. Anschließend wurde die reduzierte Datenbank auf den Großteil der von der WHO empfohlenen Resistenzfamilien, welche noch fehlten, erweitert (siehe **Tabelle 14**) [[6](#), [7](#)]. In der Erweiterung des 4 h *proof-of-concept* Papers (Seite 58), in der nun alle wichtigen ESKAPE Vertreter vorhanden sind, konnte *rawDIAtect* in dieser Arbeit so weit optimiert werden, dass dieselbe Diagnostik nicht in 4 h, sondern in 1 h möglich ist.

Dabei konnten ähnliche Ergebnisse wie in der *proof-of-concept* Studie erreicht werden (Seite 70). Das 1 h Protokoll erreichte eine Sensitivität von 93 % und die 4 h *proof-of-concept* Studie eine Sensitivität von 98 %. Das 1 h Protokoll weist jedoch deutlich mehr Proben und Determinanten auf. In beiden Studien liegt die Spezifität bei fast 100 %.

## Diskussion



**Abbildung 35:** Überblick über die Detektionsgenauigkeit des 1 h *rawDIAtect* Workflow nach AMR Determinanten sortiert

Neben Sensitivität =  $RP/(RP + FN)$  und Spezifität =  $RN/(RN + FP)$  wurden auch der Positiver prädiktiver Wert (PPV) =  $RP/(RP+FP)$  als auch der Negativer prädiktiver Wert (NPV) =  $RN/(RN+FN)$  angegeben. *qnrS1* und *MgrB* sind noch nicht vollständig im Workflow implementiert und wurden deswegen entfernt. Zudem ist über den Determinanten deren Resistenzklasse dargestellt.

In **Abbildung 35** ist eine Übersicht über die Detektionsgenauigkeit der 1 h *rawDIAtect* Methode dargestellt. Generell weißt das Protokoll hohe Positive und Negative prädiktive Werte auf, womit das Protokoll belastbar zu sein scheint. Dennoch fehlt dem 1 h Protokoll 5 % an Sensitivität im Vergleich zum 4 h Protokoll. Dies liegt vor allem an wenigen nicht gefundenen Determinanten.

Darunter die SCO Beta-Laktamase, welche nicht detektiert werden konnte. Dabei handelt es sich um eine seltene Resistenz mit geringer Prävalenz wofür es in der CARD Datenbank nur einen Eintrag gibt. Im Panel kommt diese Resistenz auch nur einmal vor. Ebenfalls nicht gefunden wurde das Porin Protein OmpK35. Dabei handelt es sich um eine modifizierte und induzierte Homologe von OmpF und OmpC [179]. Die fehlende Detektion konnte daher an fehlender Sensitivität oder Induktion liegen. Auch diese

Resistenz kommt im Panel nur einmal vor und gehört ebenfalls zu einer seltenen Resistenz.

Vor allem das Fehlen der Quinolon Resistenz *qnr* ist auffällig und zieht sich durch alle untersuchten Spezies. Dies könnte ebenfalls an fehlender Sensitivität liegen, da das Qnr Protein nur in sehr geringen Mengen gebildet wird und auch auf Plasmiden zu finden ist, welche die geringere Expression erklären könnte [180, 181].

Des Weiteren war es auch nicht möglich die Trunkierung des MgrB Proteins nachzuweisen, da dies im derzeitigen Workflow noch nicht implementiert ist. Es wurde bereits gezeigt, dass es bei resistenten Isolaten bis zu 12 Aminosäureveränderungen innerhalb des MgrB Proteins geben kann, welche die Resistenz ebenfalls beeinflussen [182].

Trotz der hohen Spezifität von 99,8 % wurden die 6 falsch positiven Treffer genauer betrachtet. Hier wurden die Erkenntnisse des *carry-over* Versuches genutzt. Vier Treffer konnten aufgrund ihrer geringen Peptidanzahl oder der geringen Anzahl an Identifikationen als *carry-over* klassifiziert werden. Dies erhöhte nochmals die Spezifität. Dennoch gab es einen Treffer für IMP, welcher nicht in der PCR getestet wurden und deshalb nicht gewertet werden kann.

Für einen kleinen Teil, für den es gut verfügbare NGS Daten gab, wurden die zusätzlichen Treffer genauer untersucht (**Abbildung 25**). In diesem Klebsiellen Panel wurde die durch die MS zusätzlich gefundene TEM Resistenz bestätigt. Darüber hinaus zeigte sich, dass die fehlende OXA Resistenz, laut *Kleborate* als eine nicht gesicherte Variante bezeichnet wird. Es bleibt fragwürdig, was dies nun für die wirkliche Resistenz des Isolats bedeutet, da weiterhin, ob mit oder ohne OXA, die phänotypische Resistenz dieselbe bleibt. In der ausführlichen Ergebnistabelle im Anhang (**Tabelle S 5**) wurden auch die Phänotypen bewertet, hier kam es zu keiner signifikanten Veränderung von erwarteten Phänotypen entweder durch Fehlen oder Änderung von Resistenzen. Durch die hohe Variabilität und Rekombinationsmöglichkeiten von Phänotypen bei Bakterien ist eine fehlerfreie Zuordnung nur bedingt möglich [183, 184]. Einzig bei vier TEM Resistenzen konnte nicht zwischen TEM-1 und TEM-52 entschieden werden. Diese Unterscheidung ist wichtig da TEM-1 eine nicht ESBL Resistenz ist im Gegensatz zu TEM-52.

Das in dieser Arbeit analysierte Panel weist alle von der WHO angegebenen Leitresistenzen für die wichtigen zu beobachtenden bakteriellen Spezies auf [5]. Dabei

konnte nachgewiesen werden, dass es mittels LC-MS möglich ist, diese ohne zusätzliche Kultivierung mit Antibiotika in unter 1 h nachzuweisen. Die noch geringere Sensitivität des großen Panels im Vergleich zur Studie des kleineren Panels (93 % gegen 98 %) ist zum Teil dadurch zu erklären, dass *rawDIAtect* noch nicht für alle möglichen AMRs optimiert ist. Da aber in der Klinik nur wichtige anzeigende Resistenzen relevant für die Behandlung sind, werden PCR Analysen daran orientiert [185]. Das zum Teil nicht immer alle Resistenzen bestätigt werden konnten, sollte auch dahingehend bewertet werden, ob sich dadurch auch die Behandlung verändert (siehe Phänotyp Wertung, **Tabelle S 5**). Nur für vier Proben konnte nicht zwischen ESBL und nicht ESBL TEM unterschieden werden. Dies kann durch eine ungenaue Isoformidentifizierung und fehlerhafte Datenbankeinträge erklärt werden. Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit nie alle möglichen Peptide zu messen, da diese zum Beispiel *in-vivo* nicht tryptisch entstehen oder nicht chromatographisch aufgetrennt werden können.

Durch die Erweiterung der Datenbank ist es zu zusätzlichen Treffern gekommen. Diese Treffer kommen vor allem durch die hohe Homogenität der AMR Determinanten innerhalb einer Protein Familie zustande. Da in *rawDIAtect* die Anzahl von gefundenen Peptiden pro Protein Familie gewertet wird, kann es, wenn nicht mehr als 2 einzigartige Peptide zwischen den Isoformen existieren, zu falschen Identifikationen kommen. Momentan werden alle Sequenzen gleichbehandelt, nur auf Probenebene werden diese Peptide gefiltert. Dadurch ist es möglich das für jede Probe andere Peptide die Isoform definieren können.

Dies kann in Zukunft durch eine Peptiddatenbank, welche nur spezifische Peptide enthält, gelöst werden. Mit dieser spezifischen Datenbank können Treffer auf ihre Glaubwürdigkeit geprüft sowie die Abdeckung der Proteine bestimmt werden, um zum Beispiel trunkierte Proteine wie MgrB zu erkennen. Dies könnte durch das Fehlen von Peptiden erkannt werden.

### Speziesbestimmung

Es gibt mehrere Möglichkeiten bakterielle Spezies zu ermitteln. Dazu gehören Wachstums-basierte Methoden wie die bunte Reihe oder direktere molekulare Methoden wie PCR oder NGS. In der Klinik hat sich aber schnell die Identifikation mit MALDI-TOF Systemen durchgesetzt [9, 10]. Diese MS<sup>1</sup> basierte Methode (Biotyping) ist schnell und universal einsetzbar, hat jedoch ihre Limitationen [108]. Meist wird die Schmiermethode verwendet, in der bakterielle Zellen im Ganzen auf den Metallträger gegeben werden und direkt darauf lysiert werden. Dies ist besonders schnell und simpel, dennoch wird

dadurch keine vollständige Lyse durchgeführt. Größtenteils werden in diesem Verfahren nur kleine abundante Proteine mit guten Flugeigenschaften gemessen. Dazu gehören ribosomale Proteine, da diese gut zu ionisieren sind und mengenmäßig häufig vorkommen. Eine externe Lyse verbessert die Anzahl an fliegenden Teilen, dies führt zu einer besserer Identifikation [186]. PCR und NGS haben dort den Vorteil deutlich mehr Informationen aus der Probe zu holen können, wie zum Beispiel Punktmutationen in wichtigen Zielgenen. Wobei die PCR Methode meist zur Subtypisierung nach phänotypischer Charakterisierung angewandt wird und dabei als Erweiterung der Diagnostik verwendet wird. Für Beide genomischen Methoden müssen aber zusätzliche Präparationsschritte und Messungen, angepasst an PCR (Primer) oder NGS (Partiell-, Voll-genom), durchgeführt werden. Eine mögliche Verbesserung des Biotyper MALDI-TOF MS für die Identifikation von bakteriellen Spezies bietet die LC-MS. Es gibt momentan zwei Möglichkeiten solche Daten zu analysieren: 1. über Mustererkennung und 2. über Peptidsequenzen. Beide Möglichkeiten fanden Verwendung in dieser Arbeit.

Die erste Methode ist abgeleitet vom Biotyper MALDI-TOF MS Workflow, welcher auf Spektrenabgleich basiert und Intensitäten verwendet. Der LC-MS<sup>1</sup> Ansatz hingegen macht dies über eine Mustererkennung gegen eine *in-silico* generierte Datenbank [84]. Dazu werden aus den gemessenen Spektren ein Barcode der Peptidmassen generiert und gegen *in-silico* Daten verglichen. Diese Methode ist ähnlich schnell und einfach wie das Biotyping. Ein Vorteil der Verwendung von LC-MS/MS Daten ist die deutliche größere Informationsdichte von 100 gegen 100.000 Peaks sowie die Möglichkeit vollständige Proteome zumessen. Da bei Tandem MS Messung MS<sup>1</sup> und MS<sup>2</sup> Daten aufgenommen werden können beide Datenebenen verwendet werden. MS<sup>1</sup> Daten werden dabei für die Speziesbestimmung und die MS<sup>2</sup> Daten für die Detektion der Peptide genutzt. Dies könnte die Schwäche des MALDI-TOF Biotyping stark ähnliche Proben, wie *Escherichia* und *Shigella* unterscheiden zu können lösen [102, 187, 188].

Die Identifikation über Peptidlisten ist ebenfalls ein vielsprechender Ansatz. Dabei werden Taxa spezifische Peptide gesucht und zugeordnet [82]. Das Tool UniPept hilft dabei diese Peptide zuzuordnen welcher zu vor mit Hilfe von öffentlich verfügbaren Sequenzdatenbanken durch *Spectronaut* (v14, BIOGNOSYS) analysiert wurden [87]. Der Vorteil dieses MS<sup>2</sup> Ansatzes gegenüber dem MS<sup>1</sup> Ansatz ist die deutlich tiefere Datenstruktur, da hier spezifische Sequenzen identifiziert werden. Der Nachteil dieser Methode sind aber die großen Datenbanken, welche alle möglichen Proteine der zu identifizierenden Spezies enthalten müssen. Im Falle der RKI BSL 2 Erregerdatenbank wären dies über 1200 Spezies und im Durchschnitt 4000 Proteine pro Eintrag. Diese

Analysen dauern entsprechend lange, da aus den DIA Spektren Pseudo MS<sup>2</sup> Daten berechnet werden müssen. Eine solche Analyse war nur über den Spektrum zentrischen Ansatzes von *Spectronaut* möglich. Dabei wird zuerst in den gemessenen Daten nach repräsentativen MS<sup>2</sup> Spektren gesucht welche dann mit entweder gemessenen Bibliotheken oder *in-silico* generierten Daten verglichen werden. Dies ist zwar sehr sensitiv, aber langsam. Im Gegensatz zu *DIA-NN* wo in den gemessenen Spektren nach Peptiden gesucht wird und diese mit der gegebenen Datenbank mit Sequenzen verglichen wird. Dieser Ansatz wird als Peptide Zentrische Analyse bezeichnet und kann vor allem bei wenigen Sequenzen und oder gezielten Analysen einen Vorteil bringen.

Beide Methoden, der LC-MS<sup>1</sup> oder der MS<sup>2</sup> Peptid Ansatz, können nach einer Optimierung mögliche Kandidaten für eine LC-MS basierte Erregeridentifikation in der Routinediagnostik darstellen. Deswegen wurde ihre Performance an einem Panel von 13 Spezies in Duplikaten geprüft (**Tabelle 18**).

Die MS<sup>1</sup> Methode konnte nicht alle Proben richtig identifizieren. Das Bekannte Problem *Shigella* und *Escherichia* mittels MS<sup>1</sup> zu unterscheiden ist hier ebenfalls aufgetreten. Darüber hinaus war es auch nicht möglich, die Spezies von *Enterobacter* und *Citrobacter* genauer zu bestimmen. Bei den *Enterobacter* Proben befand sich auf Platz 2 der Identifikationen die Spezies *Hormaechei* welche leider falsch ist. Bei den *Salmonellen* kam es bei einer Probe zur Verwechslung von *Paratyphi* mit *Typhimurium* und diese Serovare sind auch im konventionellen Biotyping schwer zu unterscheiden [189].

Der Peptid basierte MS<sup>2</sup> Ansatz konnte zuverlässig für alle Proben den Genus richtig identifizieren. Es konnte nur für *Shigella* nicht die richtige Spezies identifiziert werden, wobei die MS<sup>1</sup> Methode einen falschen Genus ermitteln hat. Bei den *Salmonellen* wurde auch die richtige Spezies *Enterica* ermittelt, nur konnte der Serovar nicht aufgeschlüsselt werden. Hier waren für *Paratyphi* und *Typhimurium* gleich viele bestimmende Peptide gefunden worden.

Diese Speziesproben wurden im Gegensatz zu den AMR Proben nicht mit der 5x39 Fenster Methoden gemessen, sondern mit der 1x39 Fenster Methode. Der *Spectronaut* Algorithmus ist nicht für die verschobenen Retentionszeit (RT) DIA Fenster der 5x39 Methode optimiert und kann diese Art von Daten nicht auswerten.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit scheint der MS<sup>2</sup> basierte Ansatz momentan die besseren Daten zu liefern. Vorteil des MS<sup>1</sup> basierten Weges gegenüber dem MS<sup>2</sup> basierten Weges ist aber seine Geschwindigkeit und Benutzerfreundlichkeit. Während

bei der MS<sup>1</sup> Analyse die raw-Dateien direkt in MicrobeMS geladen werden und ein Report binnen weniger Minuten entsteht, müssen bei der MS<sup>2</sup> Analyse die Daten von Hand in *Spectronaut* geladen werden. Danach sind die Peptidlisten zu extrahieren und zu filtern um sie dann in *UniPept* zu laden. Auch der Report muss einzeln erstellt und aus den Ergebnissen von *UniPept* herausgelesen werden.

Um Chancen zur Etablierung in der Klinik zu haben, muss der MS<sup>2</sup> basierte Ansatz in einem Programm zusammengeführt und schneller werden. Dort bietet der MS<sup>1</sup> Ansatz vor allem durch die schnelle Analyse und auch die starke Integration in die AMR MS<sup>2</sup> Analyse bessere Chancen. Darüber hinaus ist das Prinzip bereits etabliert und der Output ähnlich zu denen von Biotyper und Co. Dennoch kann bei komplizierten Proben der MS<sup>2</sup> basierte Ansatz nachgeführt werden. Die grundlegende Spezies oder Genus wird mittels des MS<sup>1</sup> basierte Ansatzes bestimmt, welche dann verwendet werden kann, um eine deutlich bessere Peptidliste zu erhalten als bei einer großen Datenbanksuche. Diese Peptidliste kann dann in *UniPept* geladen werden und sollte einen guten Überblick über die Phylogenie der Probe geben. Da beide Methoden dieselbe Datei aus derselben Messung verwenden, kostet diese zusätzliche Identifikationsmöglichkeit keine Messzeit.

## Ausblick

Mit *rawDIAtect* ist es möglich AMR Determinanten in klinischen bakteriellen Isolaten mittels LC-MS schnell und umfassend zu detektieren. Die Weiterentwicklung sollte hinsichtlich Durchsatz, Robustheit und Detektionsumfang erfolgen.

Die Entwicklung von neuen MS Geräten ist in den letzten Jahren deutlich vorangeschritten. Durch die Einführung des timsTOF Pro und der PASEF Technologie konnten LC-MS Proben schneller gemessen und gleichzeitig eine solide Separation von Ionen ermöglicht werden [88, 172, 190]. Es konnten fast 9000 Hela Proteine in knapp über einer Stunde gemessen werden [191-193]. Die weniger komplexen Proteome von Bakterien und der geringe *dynamic-range* der Probe, könnten Messungen von unter 5 min möglich machen. Kurze Gradienten stellen eine große Herausforderung an LC Geräte dar. Mit dem EvoSep One System sind solche Gradienten möglich [90, 194]. Gezeigt wurde dies bislang nur mit Teilen des Hela Proteoms aber noch nicht mit vollständiger bakterieller Proteomik. Eine weitere Innovationsmöglichkeit besteht darin, bedingt durch den höheren Durchsatz und die Sensitivität, die Automatisierung voranzutreiben. Durch die simple Lyse von SPEED, der einfachen Handhabung der EvoSep Pipettenspitzen und der Möglichkeit den EvoSep durch einen Roboter zu beladen, könnte die LC-MS Resistenzbestimmung in einem kombinierten Gerät stattfinden.

Es gibt nicht nur auf der Ebene der Datenerhebung noch Spielraum für Verbesserungen, sondern auch in der Analyse der Daten. Durch die Implementierung von GPUs in der NGS Datenauswertung konnte viel Analysezeit gespart werden [195-197]. GPU basierte Ansätze werden auch für die Proteomik erprobt (Brucker *PaSER*). Ein Vorteil von diesen Ansätzen ist, dass noch während der Messung die Daten analysiert werden und gegebenenfalls, wenn alle möglichen *targets* gefunden wurden, die Messung gestoppt wird.

In der Klinik ist das Wissen über die Stärke einer phänotypischen Resistenz wichtig, da auch das Vorhandensein des Gens nicht immer die Resistenz erklärt. Deswegen werden AST Messungen unter Antibiotikastress durchgeführt. Es gibt bereits eine Vielzahl von Studien die zeigen, dass MHK Werte auch über mRNA oder WGS Daten vorherzusagen sind [124, 198-200]. Darunter auch Studien, die zeigen, dass es eine hohe Korrelation zwischen Effekt und Proteinmenge gibt [11, 12, 15]. Der nächste logische Schritt wäre eine großangelegte Studie, welche MHK Werte mittels Proteomik korreliert. Eine solche Studie wurde bislang noch nicht durchgeführt. Hinderlich daran waren lange Gradienten

und aufwendige Protokolle, zusätzlich zu den vielen verschiedenen Induktionen und Zeitpunkten, um die Reaktion des Isolates zu messen. Beide Probleme können zukünftig durch *rawDIAtect* und ein EvoSep System, gekoppelt an ein timsTOF MS Gerät, sowie Automatisierung in Mikrotiterplatten gelöst werden.

Es bleibt noch offen wie *rawDIAtect* und die SPEED Methode die Proteomik beeinflussen, da diese Methoden sich weiter wandeln werden. Aber mit den Daten dieser Arbeit und den Möglichkeiten, die sich gerade ergeben, könnte dies ein Durchbruch in der MS basierten bakteriellen klinischen Diagnostik sein.

## Wissenschaftliche Publikationen

*Optimizing data points per protein increases protein identifications while maintaining quantitative precision in short gradient data-independent acquisition proteomics*

Joerg Doellinger, **Christian Blumenschein**, Andy Schneider, and Peter Lasch

bioRxiv 2022-10 | Journal article | DOI: [10.1101/2022.09.12.507556](https://doi.org/10.1101/2022.09.12.507556)

*Genome sequence data of Bacillus velezensis BP1.2A and BT2.4*

**Christian Blumenschein**, Jennifer Jähne, Andy Schneider, Jochen Blomb, Thomas Schweder, Peter Lasch, Rainer Borriss

Data in Brief 2022-04 | Journal article | DOI: [10.1016/j.dib.2022.107978](https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.107978)

*Unbiased Antimicrobial Resistance Detection from Clinical Bacterial Isolates Using Proteomics*

Invited talk: St Nicholas MS Symposium Berlin 12/2022

Poster talk: EUPA 04/2022

**Christian Blumenschein**, Yvonne Pfeifer, Guido Werner, Charlyn John, Andy Schneider, Peter Lasch, and Joerg Doellinger

Analytical Chemistry 2021-10-26 | journal-article | DOI: [10.1021/acs.analchem.1c00594](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00594)

*Context-aware genomic surveillance reveals hidden transmission of a carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae*

Adrian Viehweger, **Christian Blumenschein**, Norman Lippmann, Kelly L. Wyres, Christian Brandt, Jörg B. Hans, Martin Hölzer, Luiz Irber, Sören Gatermann, Christoph Lübbert, Mathias W. Pletz, Kathryn E. Holt, Brigitte König

Microbial Genomics 2021-12-16 | journal-article | DOI: [10.1099/mgen.0.000741](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000741)

*Draft Genome Sequences of 59 Endospore-Forming Gram-Positive Bacteria Associated with Crop Plants Grown in Vietnam*

Le Thi Thanh Tam, Jennifer Jähne, Pham Thi Luong, Le Thi Phuong Thao, Le Thi Kim Chung, Andy Schneider, **Christian Blumenschein**, Peter Lasch, Thomas Schweder, Rainer Borriss

Microbiology Resource Announcements 2020-11-19 | journal-article | DOI: [10.1128/mra.01154-20](https://doi.org/10.1128/mra.01154-20)

*Identification of Microorganisms by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS1) and in silico Peptide Mass Libraries*

Peter Lasch, Andy Schneider, **Christian Blumenschein**, Joerg Doellinger

Molecular & Cellular Proteomics 2020-09-30 | journal-article | DOI: [10.1074/mcp.tir120.002061](https://doi.org/10.1074/mcp.tir120.002061)

*Isolation Window Optimization of Data-Independent Acquisition Using Predicted Libraries for Deep and Accurate Proteome Profiling*

Joerg Doellinger, **Christian Blumenschein**, Andy Schneider, and Peter Lasch

Analytical Chemistry 2020-09-15 | journal-article | DOI: [10.1021/acs.analchem.0c00994](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00994)

*The N-terminal domains of the paralogous HycE and Nuo CD govern assembly of the respective formate hydrogenlyase and NADH dehydrogenase complexes*

Philipp Skorupa, Ute Lindenstrauß, Sabrina Burschel, **Christian Blumenschein**, Thorsten Friedrich, Constanze Pinske

FEBS Open Bio 2020-03-04 | journal-article | DOI: [10.1002/2211-5463.12787](https://doi.org/10.1002/2211-5463.12787)

## Anhang

<b>TABELLE S 1:</b> ISOLATION FENSTER, DIE 1,5 DATENPUNKTEN PRO PEAK ENTSPRECHEN (160-MIN-GRADIENT) .....	98
<b>TABELLE S 2:</b> 5X39 ISOLATION FENSTER, DIE 1,25 DATENPUNKTEN PRO PEAK ENTSPRECHEN (30-MIN-GRADIENT) .....	99
<b>TABELLE S 3:</b> 39 ISOLATIONSFENSTER, DIE 1,25 DATENPUNKTEN PRO PEAK ENTSPRECHEN (30-MIN-GRADIENT) .....	102
<b>TABELLE S 4:</b> GENE ONTOLOGY (CELLULAR COMPONENT) PROZENTANTEIL ALLER GEFUNDENER PROTEINE INNERHALB EINER METHODE.....	103
<b>TABELLE S 5:</b> ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DIESER ARBEIT.....	104

**Tabelle S 1: Isolation Fenster, die 1,5 Datenpunkten pro Peak entsprechen (160-min-Gradient)**

Start	Ende	Breite	Mitte
349,5	376,5	27	363
375,5	396,5	21	386
395,5	410,5	15	403
409,5	424,5	15	417
423,5	435,5	12	429,5
434,5	445,5	11	440
444,5	454,5	10	449,5
453,5	461,5	8	457,5
460,5	468,5	8	464,5
467,5	475,5	8	471,5
474,5	482,5	8	478,5
481,5	489,5	8	485,5
488,5	495,5	7	492
494,5	502,5	8	498,5
501,5	509,5	8	505,5
508,5	516,5	8	512,5
515,5	522,5	7	519
521,5	529,5	8	525,5
528,5	536,5	8	532,5
535,5	543,5	8	539,5
542,5	549,5	7	546
548,5	555,5	7	552
554,5	561,5	7	558
560,5	567,5	7	564
566,5	573,5	7	570
572,5	580,5	8	576,5
579,5	587,5	8	583,5
586,5	594,5	8	590,5
593,5	602,5	9	598
601,5	609,5	8	605,5
608,5	615,5	7	612
614,5	622,5	8	618,5
621,5	629,5	8	625,5
628,5	636,5	8	632,5
635,5	643,5	8	639,5
642,5	650,5	8	646,5
649,5	657,5	8	653,5
656,5	664,5	8	660,5
663,5	671,5	8	667,5
670,5	678,5	8	674,5
677,5	685,5	8	681,5
684,5	692,5	8	688,5
691,5	700,5	9	696
699,5	709,5	10	704,5
708,5	718,5	10	713,5
717,5	726,5	9	722
725,5	734,5	9	730
733,5	743,5	10	738,5
742,5	752,5	10	747,5
751,5	760,5	9	756
759,5	770,5	11	765
769,5	780,5	11	775
779,5	790,5	11	785
789,5	801,5	12	795,5
800,5	812,5	12	806,5
811,5	826,5	15	819
825,5	839,5	14	832,5
838,5	852,5	14	845,5

Start	Ende	Breite	Mitte
851,5	866,5	15	859
865,5	880,5	15	873
879,5	896,5	17	888
895,5	916,5	21	906
915,5	936,5	21	926
935,5	958,5	23	947
957,5	980,5	23	969
979,5	1010,5	31	995
1009,5	1042,5	33	1026
1041,5	1085,5	44	1063,5
1084,5	1150,5	66	1117,5

**Tabelle S 2:** 5x39 Isolation Fenster, die 1,25 Datenpunkten pro Peak entsprechen (30-min-Gradient)

Start	Ende	Breite	Mitte	Gradient Start	Gradient Ende
349,5	387,5	38	368,5	3	8,79
386,5	406,5	20	396,5	3	8,79
405,5	422,5	17	414	3	8,79
421,5	435,5	14	428,5	3	8,79
434,5	444,5	10	439,5	3	8,79
443,5	450,5	7	447	3	8,79
449,5	455,5	6	452,5	3	8,79
454,5	461,5	7	458	3	8,79
460,5	467,5	7	464	3	8,79
466,5	474,5	8	470,5	3	8,79
473,5	480,5	7	477	3	8,79
479,5	486,5	7	483	3	8,79
485,5	492,5	7	489	3	8,79
491,5	498,5	7	495	3	8,79
497,5	505,5	8	501,5	3	8,79
504,5	510,5	6	507,5	3	8,79
509,5	517,5	8	513,5	3	8,79
516,5	522,5	6	519,5	3	8,79
521,5	530,5	9	526	3	8,79
529,5	538,5	9	534	3	8,79
537,5	546,5	9	542	3	8,79
545,5	551,5	6	548,5	3	8,79
550,5	559,5	9	555	3	8,79
558,5	566,5	8	562,5	3	8,79
565,5	575,5	10	570,5	3	8,79
574,5	584,5	10	579,5	3	8,79
583,5	594,5	11	589	3	8,79
593,5	605,5	12	599,5	3	8,79
604,5	618,5	14	611,5	3	8,79
617,5	633,5	16	625,5	3	8,79
632,5	646,5	14	639,5	3	8,79
645,5	659,5	14	652,5	3	8,79
658,5	675,5	17	667	3	8,79
674,5	694,5	20	684,5	3	8,79
693,5	717,5	24	705,5	3	8,79
716,5	743,5	27	730	3	8,79
742,5	780,5	38	761,5	3	8,79
779,5	840,5	61	810	3	8,79
839,5	1150,5	311	995	3	8,79
349,5	400,5	51	375	8,8	14,09
399,5	426,5	27	413	8,8	14,09
425,5	442,5	17	434	8,8	14,09
441,5	450,5	9	446	8,8	14,09
449,5	462,5	13	456	8,8	14,09
461,5	472,5	11	467	8,8	14,09
471,5	481,5	10	476,5	8,8	14,09
480,5	490,5	10	485,5	8,8	14,09
489,5	499,5	10	494,5	8,8	14,09
498,5	508,5	10	503,5	8,8	14,09
507,5	516,5	9	512	8,8	14,09
515,5	525,5	10	520,5	8,8	14,09
524,5	535,5	11	530	8,8	14,09
534,5	544,5	10	539,5	8,8	14,09
543,5	551,5	8	547,5	8,8	14,09
550,5	560,5	10	555,5	8,8	14,09
559,5	568,5	9	564	8,8	14,09
567,5	577,5	10	572,5	8,8	14,09
576,5	586,5	10	581,5	8,8	14,09
585,5	597,5	12	591,5	8,8	14,09

Start	Ende	Breite	Mitte	Gradient Start	Gradient Ende
596,5	605,5	9	601	8,8	14,09
604,5	616,5	12	610,5	8,8	14,09
615,5	626,5	11	621	8,8	14,09
625,5	637,5	12	631,5	8,8	14,09
636,5	648,5	12	642,5	8,8	14,09
647,5	658,5	11	653	8,8	14,09
657,5	670,5	13	664	8,8	14,09
669,5	684,5	15	677	8,8	14,09
683,5	697,5	14	690,5	8,8	14,09
696,5	709,5	13	703	8,8	14,09
708,5	725,5	17	717	8,8	14,09
724,5	744,5	20	734,5	8,8	14,09
743,5	758,5	15	751	8,8	14,09
757,5	782,5	25	770	8,8	14,09
781,5	808,5	27	795	8,8	14,09
807,5	835,5	28	821,5	8,8	14,09
834,5	874,5	40	854,5	8,8	14,09
873,5	925,5	52	899,5	8,8	14,09
924,5	1150,5	226	1037,5	8,8	14,09
349,5	430,5	81	390	14,1	19,39
429,5	452,5	23	441	14,1	19,39
451,5	472,5	21	462	14,1	19,39
471,5	488,5	17	480	14,1	19,39
487,5	505,5	18	496,5	14,1	19,39
504,5	518,5	14	511,5	14,1	19,39
517,5	532,5	15	525	14,1	19,39
531,5	544,5	13	538	14,1	19,39
543,5	552,5	9	548	14,1	19,39
551,5	562,5	11	557	14,1	19,39
561,5	574,5	13	568	14,1	19,39
573,5	586,5	13	580	14,1	19,39
585,5	598,5	13	592	14,1	19,39
597,5	609,5	12	603,5	14,1	19,39
608,5	620,5	12	614,5	14,1	19,39
619,5	630,5	11	625	14,1	19,39
629,5	642,5	13	636	14,1	19,39
641,5	651,5	10	646,5	14,1	19,39
650,5	662,5	12	656,5	14,1	19,39
661,5	672,5	11	667	14,1	19,39
671,5	683,5	12	677,5	14,1	19,39
682,5	695,5	13	689	14,1	19,39
694,5	706,5	12	700,5	14,1	19,39
705,5	717,5	12	711,5	14,1	19,39
716,5	729,5	13	723	14,1	19,39
728,5	741,5	13	735	14,1	19,39
740,5	752,5	12	746,5	14,1	19,39
751,5	765,5	14	758,5	14,1	19,39
764,5	780,5	16	772,5	14,1	19,39
779,5	795,5	16	787,5	14,1	19,39
794,5	810,5	16	802,5	14,1	19,39
809,5	826,5	17	818	14,1	19,39
825,5	845,5	20	835,5	14,1	19,39
844,5	862,5	18	853,5	14,1	19,39
861,5	882,5	21	872	14,1	19,39
881,5	910,5	29	896	14,1	19,39
909,5	940,5	31	925	14,1	19,39
939,5	990,5	51	965	14,1	19,39
989,5	1150,5	161	1070	14,1	19,39
349,5	465,5	116	407,5	19,4	24,69
464,5	500,5	36	482,5	19,4	24,69
499,5	524,5	25	512	19,4	24,69
523,5	544,5	21	534	19,4	24,69
543,5	559,5	16	551,5	19,4	24,69
558,5	575,5	17	567	19,4	24,69
574,5	591,5	17	583	19,4	24,69
590,5	605,5	15	598	19,4	24,69
604,5	620,5	16	612,5	19,4	24,69
619,5	634,5	15	627	19,4	24,69
633,5	646,5	13	640	19,4	24,69
645,5	654,5	9	650	19,4	24,69
653,5	668,5	15	661	19,4	24,69
667,5	679,5	12	673,5	19,4	24,69
678,5	690,5	12	684,5	19,4	24,69
689,5	700,5	11	695	19,4	24,69
699,5	711,5	12	705,5	19,4	24,69
710,5	723,5	13	717	19,4	24,69
722,5	733,5	11	728	19,4	24,69
732,5	744,5	12	738,5	19,4	24,69
743,5	754,5	11	749	19,4	24,69

Start	Ende	Breite	Mitte	Gradient Start	Gradient Ende
753,5	765,5	12	759,5	19,4	24,69
764,5	775,5	11	770	19,4	24,69
774,5	787,5	13	781	19,4	24,69
786,5	798,5	12	792,5	19,4	24,69
797,5	809,5	12	803,5	19,4	24,69
808,5	819,5	11	814	19,4	24,69
818,5	832,5	14	825,5	19,4	24,69
831,5	846,5	15	839	19,4	24,69
845,5	855,5	10	850,5	19,4	24,69
854,5	870,5	16	862,5	19,4	24,69
869,5	883,5	14	876,5	19,4	24,69
882,5	898,5	16	890,5	19,4	24,69
897,5	915,5	18	906,5	19,4	24,69
914,5	932,5	18	923,5	19,4	24,69
931,5	950,5	19	941	19,4	24,69
949,5	980,5	31	965	19,4	24,69
979,5	1050,5	71	1015	19,4	24,69
1049,5	1150,5	101	1100	19,4	24,69
349,5	540,5	191	445	24,7	30
539,5	574,5	35	557	24,7	30
573,5	597,5	24	585,5	24,7	30
596,5	616,5	20	606,5	24,7	30
615,5	634,5	19	625	24,7	30
633,5	648,5	15	641	24,7	30
647,5	662,5	15	655	24,7	30
661,5	676,5	15	669	24,7	30
675,5	687,5	12	681,5	24,7	30
686,5	700,5	14	693,5	24,7	30
699,5	712,5	13	706	24,7	30
711,5	724,5	13	718	24,7	30
723,5	736,5	13	730	24,7	30
735,5	747,5	12	741,5	24,7	30
746,5	758,5	12	752,5	24,7	30
757,5	768,5	11	763	24,7	30
767,5	777,5	10	772,5	24,7	30
776,5	787,5	11	782	24,7	30
786,5	796,5	10	791,5	24,7	30
795,5	808,5	13	802	24,7	30
807,5	816,5	9	812	24,7	30
815,5	825,5	10	820,5	24,7	30
824,5	836,5	12	830,5	24,7	30
835,5	845,5	10	840,5	24,7	30
844,5	855,5	11	850	24,7	30
854,5	866,5	12	860,5	24,7	30
865,5	874,5	9	870	24,7	30
873,5	885,5	12	879,5	24,7	30
884,5	897,5	13	891	24,7	30
896,5	908,5	12	902,5	24,7	30
907,5	921,5	14	914,5	24,7	30
920,5	934,5	14	927,5	24,7	30
933,5	946,5	13	940	24,7	30
945,5	955,5	10	950,5	24,7	30
954,5	977,5	23	966	24,7	30
976,5	1007,5	31	992	24,7	30
1006,5	1045,5	39	1026	24,7	30
1044,5	1105,5	61	1075	24,7	30
1104,5	1150,5	46	1127,5	24,7	30

**Tabelle S 3:** 39 Isolationsfenster, die 1,25 Datenpunkten pro Peak entsprechen (30-min-Gradient)

Start	Ende	Breite	Mitte
349,5	390,5	41	370
389,5	414,5	25	402
413,5	432,5	19	423
431,5	447,5	16	439,5
446,5	462,5	16	454,5
461,5	475,5	14	468,5
474,5	488,5	14	481,5
487,5	501,5	14	494,5
500,5	513,5	13	507
512,5	525,5	13	519
524,5	537,5	13	531
536,5	548,5	12	542,5
547,5	560,5	13	554
559,5	572,5	13	566
571,5	584,5	13	578
583,5	596,5	13	590
595,5	609,5	14	602,5
608,5	622,5	14	615,5
621,5	635,5	14	628,5
634,5	648,5	14	641,5
647,5	661,5	14	654,5
660,5	675,5	15	668
674,5	689,5	15	682
688,5	704,5	16	696,5
703,5	719,5	16	711,5
718,5	734,5	16	726,5
733,5	750,5	17	742
749,5	769,5	20	759,5
768,5	788,5	20	778,5
787,5	808,5	21	798
807,5	830,5	23	819
829,5	854,5	25	842
853,5	884,5	31	869
883,5	915,5	32	899,5
914,5	950,5	36	932,5
949,5	986,5	37	968
985,5	1030,5	45	1008
1029,5	1080,5	51	1055
1079,5	1150,5	71	1115

**Tabelle S 4:** Gene ontology (cellular component) Prozentanteil aller gefundener Proteine innerhalb einer Methode

Protokoll	Gene ontology (cellular component)	Prozent der Proteine
Basic	ATP-binding cassette (ABC) transporter complex [GO:0043190]	1,3
Basic	cell outer membrane [GO:0009279]	2,0
Basic	cytoplasm [GO:0005737]	18,4
Basic	cytosol [GO:0005829]	27,1
Basic	extracellular region [GO:0005576]	2,6
Basic	integral component of membrane [GO:0016021]	5,8
Basic	integral component of plasma membrane [GO:0005887]	3,5
Basic	membrane [GO:0016020]	8,4
Basic	outer membrane-bounded periplasmic space [GO:0030288]	5,1
Basic	periplasmic space [GO:0042597]	2,0
Basic	plasma membrane [GO:0005886]	9,0
Basic	protein-containing complex [GO:0032991]	1,6
Basic	NA	26,9
BeaST	cell outer membrane [GO:0009279]	2,3
BeaST	cytoplasm [GO:0005737]	18,7
BeaST	cytosol [GO:0005829]	28,7
BeaST	extracellular region [GO:0005576]	3,9
BeaST	integral component of membrane [GO:0016021]	5,5
BeaST	integral component of plasma membrane [GO:0005887]	3,4
BeaST	membrane [GO:0016020]	9,7
BeaST	outer membrane-bounded periplasmic space [GO:0030288]	5,5
BeaST	periplasmic space [GO:0042597]	2,1
BeaST	plasma membrane [GO:0005886]	8,7
BeaST	protein-containing complex [GO:0032991]	1,6
BeaST	NA	23,9
FAST	ATP-binding cassette (ABC) transporter complex [GO:0043190]	1,4
FAST	cell outer membrane [GO:0009279]	2,0
FAST	cytoplasm [GO:0005737]	18,2
FAST	cytosol [GO:0005829]	26,9
FAST	extracellular region [GO:0005576]	2,8
FAST	integral component of membrane [GO:0016021]	6,1
FAST	integral component of plasma membrane [GO:0005887]	3,6
FAST	membrane [GO:0016020]	8,6
FAST	outer membrane-bounded periplasmic space [GO:0030288]	5,1
FAST	periplasmic space [GO:0042597]	2,0
FAST	plasma membrane [GO:0005886]	9,0
FAST	protein-containing complex [GO:0032991]	1,6
FAST	NA	26,3

**Tabelle S 5: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit**

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
149-12	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	36	1177159,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	163	
149-12	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	4	4211633	PCR	Acinetobacter	baumannii	163	
155-12	Richtig positiv	OXA-80	OXA-80	Korrekt	Korrekt	OXA	19	8436486,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	164	
383-19	Richtig positiv	OXA-66	OXA-82	Falsch	Korrekt	OXA	10	1047524,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	110	Intrinsisch
16-15	Richtig positiv	OXA-72	OXA-72	Korrekt	Korrekt	OXA	32	67147,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	158	
180-12	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	32	261620700	PCR	Acinetobacter	baumannii	165	
180-12	Falsch negativ	PER-7;PER-8				PER			PCR	Acinetobacter	baumannii	165	
181-12	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	33	1363772,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	166	
181-12	Richtig positiv	PER-1	PER-1;PER-7	Korrekt	Korrekt	PER	15	20869400	PCR	Acinetobacter	baumannii	166	
188-12	Richtig positiv	OXA-82	OXA-82	Korrekt	Korrekt	OXA	16	525362,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	167	
188-12	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	21	3087066,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	167	
212-19-1	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	35	731862,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	109	
212-19-1	Richtig positiv	PER	PER-1	Korrekt	Korrekt	PER	11	7584046,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	109	
212-19-1	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	805455,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	109	
24-15	Richtig positiv	OXA-72	OXA-23	Falsch	Korrekt	OXA	53	1488592,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	159	
24-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	4450454,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	159	
26-15	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	27	1114478,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	160	
26-15	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	21	289994,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	160	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
27-15	Richtig positiv	OXA-72	OXA-72	Korrekt	Korrekt	OXA	35	6261096,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	161	
3-15	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	37	1976263,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	155	
3-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	578148,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	155	
383-19	Richtig positiv	GES-11	GES-11	Korrekt	Korrekt	GES	20	19357200	PCR	Acinetobacter	baumannii	110	
4-15	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	32	2418846,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	156	
45-15	Richtig positiv	OXA-23	OXA-23	Korrekt	Korrekt	OXA	33	97596800	PCR	Acinetobacter	baumannii	162	
45-15	Richtig positiv	PER-1	PER-1;PER-7	Korrekt	Korrekt	PER	15	12444840	PCR	Acinetobacter	baumannii	162	
45-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	4568411,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	162	
542-13	Richtig positiv	CTX-M-115	CTX-M-115;CTX-M-2	Korrekt	Korrekt	CTX-M	15	3145006,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	121	
542-13	Richtig positiv	OXA-72	OXA-72	Korrekt	Korrekt	OXA	34	2572406,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	121	
542-13	Falsch negativ	TEM-1				TEM			PCR	Acinetobacter	baumannii	121	
745-18	Richtig positiv	GES-11	GES-11	Korrekt	Korrekt	GES	17	302970,3	PCR	Acinetobacter	baumannii	111	
745-18	Richtig positiv	OXA-72	OXA-72	Korrekt	Korrekt	OXA	28	2110826,7	PCR	Acinetobacter	baumannii	111	
20-16	Richtig positiv	CMY	CMY-6	Korrekt	Korrekt	CMY	3	1365561,7	PCR	Citrobacter	freundii	153	Intrinsisch
20-16	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	8	1488592,3	PCR	Citrobacter	freundii	153	
20-16	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	18	18144000	PCR	Citrobacter	freundii	153	
20-16	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	114801,7	PCR	Citrobacter	freundii	153	
20-16	Richtig positiv	OXA-1;OXA-9nf	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	12	490621,3	PCR	Citrobacter	freundii	153	
20-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	20	4136296,7	PCR	Citrobacter	freundii	153	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
231-20	Richtig positiv	CMY	CMY-6	Korrekt	Korrekt	CMY	14	62464800	PCR	Citrobacter	freundii	101	
231-20	Falsch negativ	ACT				SHV			PCR	Citrobacter	freundii	101	
231-20	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	19	8236256,7	PCR	Citrobacter	freundii	101	
231-20	Richtig positiv	VIM-2	VIM-2	Korrekt	Korrekt	VIM	14	3748146,7	PCR	Citrobacter	freundii	101	
608-16	Richtig positiv	CMY	CMY-4;CMY-6;CMY-99	Korrekt	Korrekt	CMY	3	1614817,7	PCR	Citrobacter	freundii	147	Intrinsisch
608-16	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	10	264965,3	PCR	Citrobacter	freundii	147	
608-16	Richtig positiv	KPC-2	KPC-3	Falsch	Korrekt	KPC	18	128071,3	PCR	Citrobacter	freundii	147	
608-16	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	12	850446,3	PCR	Citrobacter	freundii	147	
608-16	Falsch negativ	OXY-1-1				OXY			PCR	Citrobacter	freundii	147	
608-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	20	2626856,7	PCR	Citrobacter	freundii	147	
231-20	Richtig positiv	GES-11	GES-11	Korrekt	Korrekt	GES	19	3456866,7	PCR	Citrobacter	freundii	101	
629-16	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	9	567495,3	PCR	Enterobacter	cloacae	148	
629-16	Richtig positiv	ACT-7	ACT-7	Korrekt	Korrekt	ACT	4	270510	PCR	Enterobacter	cloacae	148	Intrinsisch
733-14	Richtig positiv	ACT	ACT-7	Korrekt	Korrekt	ACT	11	5738070	PCR	Enterobacter	cloacae	107	Intrinsisch
629-16	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	21	6391496,7	PCR	Enterobacter	cloacae	148	
629-16	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	1684225,7	PCR	Enterobacter	cloacae	148	
629-16	Richtig positiv	OXA-1;OXA-9nf	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	11	913192,3	PCR	Enterobacter	cloacae	148	
629-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	23	8712856,7	PCR	Enterobacter	cloacae	148	
733-14	Falsch negativ	<i>aac(6')-Ib-cr</i>				AAC(6')-Ib			PCR	Enterobacter	cloacae	107	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
733-14	Richtig positiv	CTX-M-9	CTX-M-27;CTX-M-104	Falsch	Korrekt	CTX-M	17	435665,3	PCR	Enterobacter	cloacae	107	
733-14	Richtig positiv	OXA-48;OXA-9nf	OXA-48	Korrekt	Korrekt	OXA	27	399990,3	PCR	Enterobacter	cloacae	107	
733-14	Falsch negativ	QnrA				Qnr			PCR	Enterobacter	cloacae	107	
733-14	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	20	1418490	PCR	Enterobacter	cloacae	107	
733-14	Richtig positiv	VIM-4	VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	13	341181,3	PCR	Enterobacter	cloacae	107	
506-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	7	1355490,7	PCR	Enterobacter	hormaechei	132	
506-15	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	11	1232869	PCR	Enterobacter	hormaechei	132	
506-15	Falsch negativ	QnrA7				Qnr			PCR	Enterobacter	hormaechei	132	
506-15	Richtig positiv	VIM-1	VIM-2;VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	12	2404126,7	PCR	Enterobacter	hormaechei	132	
506-15	Richtig positiv	ACT	ACT-7	Korrekt	Korrekt	ACT	8	1242758,3	PCR	Enterobacter	hormaechei	132	Intrinsisch
92-09	Richtig positiv	ACT	ACT-7	Korrekt	Korrekt	ACT	12	363688,3	PCR	Enterobacter	hormaechei	131	Intrinsisch
92-09	Falsch negativ	QnrA				Qnr			PCR	Enterobacter	hormaechei	131	
92-09	Richtig positiv	SHV-12	SHV-1;SHV-5;SHV-11;SHV-28	Falsch	Korrekt	SHV	17	9192206,7	PCR	Enterobacter	hormaechei	131	
92-09	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	17	1047945	PCR	Enterobacter	hormaechei	131	
92-09	Richtig positiv	VIM-1	VIM-2	Falsch	Korrekt	VIM	15	52501100	PCR	Enterobacter	hormaechei	131	
485-17	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Enterobacter	roggenkampii	130	
485-17	Richtig positiv	VIM-1	VIM-1;VIM-4;VIM-28	Korrekt	Korrekt	VIM	13	1048584,3	PCR	Enterobacter	roggenkampii	130	
UW13072	Richtig positiv	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	Korrekt	Korrekt	<i>vanA</i>	14	809038	PCR	Enterococcus	faecium	UW13072	
UW13072	Falsch negativ	<i>vanRA</i>				<i>vanRA</i>			PCR	Enterococcus	faecium	UW13072	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
UW13072	Falsch negativ	vanSA				vanSA			PCR	Enterococcus	faecium	UW13072	
UW13358	Falsch negativ	vanB				vanB			PCR	Enterococcus	faecium	UW13358	
UW13358	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	6	371524,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW13358	
UW13358	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	3	11423978,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW13358	
UW13532	Richtig positiv	vanA	vanA	Korrekt	Korrekt	vanA	14	1100766	PCR	Enterococcus	faecium	UW13532	
UW13532	Richtig positiv	vanRA	vanRA	Korrekt	Korrekt	vanRA	9	1535656,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW13532	
UW13532	Richtig positiv	vanSA	vanSA	Korrekt	Korrekt	vanSA	6	214995,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW13532	
UW13991	Richtig positiv	vanA	vanA	Korrekt	Korrekt	vanA	12	8962486,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW13991	
UW13991	Richtig positiv	vanRA	vanRA	Korrekt	Korrekt	vanRA	4	2661309,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW13991	
UW13991	Falsch negativ	vanSA				vanSA			PCR	Enterococcus	faecium	UW13991	
UW14004	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	14	1638240,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW14004	
UW14004	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	7	97791,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW14004	
UW14004	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	4	3412362,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW14004	
UW14142	Richtig positiv	vanA	vanA	Korrekt	Korrekt	vanA	11	361336	PCR	Enterococcus	faecium	UW14142	
UW14142	Richtig positiv	vanRA	vanRA	Korrekt	Korrekt	vanRA	8	344010	PCR	Enterococcus	faecium	UW14142	
UW14142	Falsch negativ	vanSA				vanSA			PCR	Enterococcus	faecium	UW14142	
UW14657	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	9	407422,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW14657	
UW14657	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	6	604087	PCR	Enterococcus	faecium	UW14657	
UW14657	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	6	3629396	PCR	Enterococcus	faecium	UW14657	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
UW15097	Richtig positiv	vanA	vanA	Korrekt	Korrekt	vanA	13	1336376,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW15094	
UW15097	Richtig positiv	vanRA	vanRA	Korrekt	Korrekt	vanRA	10	1281146,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW15094	
UW15097	Richtig positiv	vanSA	vanSA	Korrekt	Korrekt	vanSA	4	312175	PCR	Enterococcus	faecium	UW15094	
UW16096	Richtig positiv	vanA	vanA	Korrekt	Korrekt	vanA	13	538817,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW16069	
UW16096	Richtig positiv	vanRA	vanRA	Korrekt	Korrekt	vanRA	9	7901046,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW16069	
UW16096	Falsch negativ	vanSA				vanSA			PCR	Enterococcus	faecium	UW16069	
UW16158	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	11	2041980	PCR	Enterococcus	faecium	UW16158	
UW16158	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	6	517185	PCR	Enterococcus	faecium	UW16158	
UW16158	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	4	1678877,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW16158	
UW16517	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	4	462062	PCR	Enterococcus	faecium	UW16517	
UW16517	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	9	2181498,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW16517	
UW16517	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	3	1872716,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW16517	
UW17459	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	8	583659	PCR	Enterococcus	faecium	UW17459	
UW17459	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	9	2181498,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW17459	
UW17459	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	5	401809	PCR	Enterococcus	faecium	UW17459	
UW17739	Richtig positiv	vanA	vanA	Korrekt	Korrekt	vanA	9	305024	PCR	Enterococcus	faecium	UW17739	
UW17739	Falsch negativ	vanRA				vanRA			PCR	Enterococcus	faecium	UW17739	
UW17739	Falsch negativ	vanSA				vanSA			PCR	Enterococcus	faecium	UW17739	
UW18273	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	13	1962986,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW18273	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
UW18273	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	9	2057741	PCR	Enterococcus	faecium	UW18273	
UW18273	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	4	1544098	PCR	Enterococcus	faecium	UW18273	
UW19185	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	5	226717,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW19185	
UW19185	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	7	474502,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW19185	
UW19185	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	4	1831249,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW19185	
UW19484	Richtig positiv	vanB	vanB	Korrekt	Korrekt	vanB	11	1102052,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW19484	
UW19484	Richtig positiv	vanRB	vanRB	Korrekt	Korrekt	vanRB	7	9723746,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW19484	
UW19484	Richtig positiv	vanSB	vanSB	Korrekt	Korrekt	vanSB	4	1146384,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW19484	
UW19605	Richtig positiv	vanA	vanA	Korrekt	Korrekt	vanA	13	1033205,7	PCR	Enterococcus	faecium	UW19605	
UW19605	Richtig positiv	vanRA	vanRA	Korrekt	Korrekt	vanRA	9	635736	PCR	Enterococcus	faecium	UW19605	
UW19605	Falsch negativ	vanSA				vanSA			PCR	Enterococcus	faecium	UW19605	
UW13291	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW13291	
UW13408	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW13408	
UW14883	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW14883	
UW15795	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW15795	
UW16369	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW16369	
UW17278	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW17278	
UW18010	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW18010	
UW19211	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW19211	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
UW19305	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Enterococcus	faecium	UW19305	
UW15795	Falsch positiv		<i>vanRA</i>		Keine signifikante Änderung	<i>vanRA</i>	9	1692,3	PCR	Enterococcus	faecium	UW15795	Carry-over
23-16	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	5	909294,3	PCR	Escherichia	coli	154	
10-16	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	25	1202474,7	PCR	Escherichia	coli	97	
10-16	Richtig positiv	MCR-1	MCR-1.1	Korrekt	Korrekt	MCR	10	885616,3	PCR	Escherichia	coli	97	
10-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	19	1222526,3	PCR	Escherichia	coli	97	
128-16	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	8	1486585,7	PCR	Escherichia	coli	151	
128-16	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	8464700	PCR	Escherichia	coli	151	
128-16	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	3145006,3	PCR	Escherichia	coli	151	
128-16	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	9	2598759,7	PCR	Escherichia	coli	151	
128-16	Falsch negativ					TEM			PCR	Escherichia	coli	151	
20-20	Richtig positiv	CTX-M-14	CTX-M-27;CTX-M-104	Falsch	Korrekt	CTX-M	15	541852,3	PCR	Escherichia	coli	114	
20-20	Richtig positiv	OXA-244	OXA-244	Korrekt	Korrekt	OXA	18	1212268,3	PCR	Escherichia	coli	114	
2-10	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	7	23930460	PCR	Escherichia	coli	123	
2-10	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	19	1084500,7	PCR	Escherichia	coli	123	
2-10	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	11062440	PCR	Escherichia	coli	123	
2-10	Richtig positiv	OXA-1;OXA-2	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	15	4073700	PCR	Escherichia	coli	123	
2-10	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	25	1010578,3	PCR	Escherichia	coli	123	
212-17	Richtig positiv	KPC-2	KPC-3	Falsch	Korrekt	KPC	16	177974,3	PCR	Escherichia	coli	149	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
212-17	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	16	8114786,7	PCR	Escherichia	coli	149	
23-16	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	1383140,7	PCR	Escherichia	coli	154	
24-16	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	10	310884,3	PCR	Escherichia	coli	152	
24-16	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	1281014,7	PCR	Escherichia	coli	152	
24-16	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	1429421,7	PCR	Escherichia	coli	152	
24-16	Richtig positiv	OXA-1;OXA-9nf	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	11	44534,3	PCR	Escherichia	coli	152	
24-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	20	131517,3	PCR	Escherichia	coli	152	
338-18	Richtig positiv	MCR-1	MCR-1.1	Korrekt	Korrekt	MCR	7	240062,3	PCR	Escherichia	coli	136	
338-18	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Escherichia	coli	136	
338-18	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	26	1394556,7	PCR	Escherichia	coli	136	
349-14	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	18	439782,3	PCR	Escherichia	coli	92	
349-14	Richtig positiv	CTX-M-27	CTX-M-27;CTX-M-104	Korrekt	Korrekt	CTX-M	14	2554836,7	PCR	Escherichia	coli	92	
349-14	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1;TEM-52	Korrekt	Korrekt	TEM	6	9404166,7	PCR	Escherichia	coli	92	
35-16	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	15	228022,3	PCR	Escherichia	coli	93	
35-16	Richtig positiv	SHV-12	SHV-5;SHV-11	Falsch	Korrekt	SHV	3	1051812,7	PCR	Escherichia	coli	93	
37-16	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	18	3884036,7	PCR	Escherichia	coli	94	
37-16	Richtig positiv	SHV-12	SHV-11	Falsch	Korrekt	SHV	5	129747,3	PCR	Escherichia	coli	94	
39-16	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	18	5156876,7	PCR	Escherichia	coli	95	
39-16	Richtig positiv	MCR-1	MCR-1.1	Korrekt	Korrekt	MCR	8	198434,3	PCR	Escherichia	coli	95	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
39-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1;TEM-52	Korrekt	Korrekt	TEM	4	6589256,7	PCR	Escherichia	coli	95	
489-16	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	17	3609666,7	PCR	Escherichia	coli	96	
50-16	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	17	4879510	PCR	Escherichia	coli	98	
50-16	Richtig positiv	CTX-M-2	CTX-M-2;CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	19	227778,3	PCR	Escherichia	coli	98	
50-16	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Escherichia	coli	98	
50-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1;TEM-52	Korrekt	Korrekt	TEM	6	9441296,7	PCR	Escherichia	coli	98	
51-16	Richtig positiv	CMY-2	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	19	884909,3	PCR	Escherichia	coli	99	
51-16	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Escherichia	coli	99	
51-16	Richtig positiv	SHV-5	SHV-11	Falsch	Korrekt	SHV	10	395135,3	PCR	Escherichia	coli	99	
51-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1;TEM-52	Korrekt	Korrekt	TEM	7	127678,3	PCR	Escherichia	coli	99	
607-16	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	8	21626920	PCR	Escherichia	coli	146	
607-16	Richtig positiv	KPC-2	KPC-3	Falsch	Korrekt	KPC	18	126926000	PCR	Escherichia	coli	146	
607-16	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	11	4760290	PCR	Escherichia	coli	146	
607-16	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	19	1363210	PCR	Escherichia	coli	146	
51-16	Richtig positiv	OKP-A	OKP-A-5	Korrekt	Korrekt	OKP-A	3	2490837,7	PCR	Escherichia	coli	99	Intrinsisch
700-18	Richtig positiv	CTX-M-1	CTX-M-15	Falsch	Korrekt	CTX-M	17	4412120	PCR	Escherichia	coli	90	
700-18	Richtig positiv	NDM-5	NDM-5;NDM-1;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	7	1146181,3	PCR	Escherichia	coli	90	
700-18	Richtig positiv	TEM	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	20	9340986,7	PCR	Escherichia	coli	90	
70-15	Richtig positiv	CMY-4	CMY-42	Falsch	Korrekt	CMY	18	809466,3	PCR	Escherichia	coli	169	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
70-15	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	1034367,3	PCR	Escherichia	coli	169	
70-15	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	1004874,7	PCR	Escherichia	coli	169	
70-15	Richtig positiv	OXA-2	OXA-2	Korrekt	Korrekt	OXA	3	510551	PCR	Escherichia	coli	169	
70-15	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	24	143115,3	PCR	Escherichia	coli	169	
865-18	Richtig positiv	MCR-1	MCR-1.1	Falsch	Korrekt	MCR	7	8692506,7	PCR	Escherichia	coli	137	
865-18	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	19	2803306,7	PCR	Escherichia	coli	137	
23-16	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	5	1918602	PCR	Escherichia	coli	154	
164-10-1	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	10	4013946,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	135	
404-08	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	10	2151439	PCR	Klebsiella	pneumoniae	104	
55-16	Richtig positiv	TEM	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	12	398762	NGS	Klebsiella	pneumoniae	145	NGS bestätigt
55-16	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	9137160	NGS	Klebsiella	pneumoniae	145	
55-16	Falsch negativ	<i>ompK35-STOP</i>				<i>ompK35</i>			NGS	Klebsiella	pneumoniae	145	
55-16	Richtig positiv	SHV-76	SHV-76	Korrekt	Korrekt	SHV	10	439918,3	NGS	Klebsiella	pneumoniae	145	
652-15	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	20	119201,3	NGS	Klebsiella	pneumoniae	144	NGS bestätigt
652-15	Falsch negativ	<i>mgrB-Stop</i>				<i>mgrB</i>			NGS	Klebsiella	pneumoniae	144	
652-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	10	24768600	NGS	Klebsiella	pneumoniae	144	
652-15	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	945771,3	NGS	Klebsiella	pneumoniae	144	
652-15	Falsch negativ	OXA-1				OXA			NGS	Klebsiella	pneumoniae	144	NGS unbestätigt
652-15	Richtig positiv	SHV-28	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	8	4053546,7	NGS	Klebsiella	pneumoniae	144	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
653-15	Falsch negativ	<i>ompK35</i> -STOP				<i>ompK35</i>			NGS	Klebsiella	pneumoniae	142	
653-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	10	29934800	NGS	Klebsiella	pneumoniae	142	
653-15	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	15788,3	NGS	Klebsiella	pneumoniae	142	
653-15	Richtig positiv	OXA-1;OXA-9nf	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	15	2148656,7	NGS	Klebsiella	pneumoniae	142	
653-15	Richtig positiv	SHV-1	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	6	640221,3	NGS	Klebsiella	pneumoniae	142	
653-15	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	17	712698,3	NGS	Klebsiella	pneumoniae	142	
656-15	Richtig positiv	CTX-M-14	CTX-M-104;CTX-M-27	Falsch	Korrekt	CTX-M	16	1873536,7	NGS	Klebsiella	pneumoniae	143	
656-15	Richtig positiv	SHV-11	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	8	751146	NGS	Klebsiella	pneumoniae	143	
670-15	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	17	1236120	NGS	Klebsiella	pneumoniae	141	NGS bestätigt
670-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	9	21508700	NGS	Klebsiella	pneumoniae	141	
670-15	Richtig positiv	CTX-M-15;CTX-M-27	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	28	20427000	NGS	Klebsiella	pneumoniae	141	
670-15	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	11	1167703	NGS	Klebsiella	pneumoniae	141	
670-15	Richtig positiv	SHV-1	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	10	6303370	NGS	Klebsiella	pneumoniae	141	
675-15	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	18	8360266,7	NGS	Klebsiella	pneumoniae	139	NGS bestätigt
675-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	9	2741246,7	NGS	Klebsiella	pneumoniae	139	
675-15	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	7595416,7	NGS	Klebsiella	pneumoniae	139	
675-15	Falsch negativ	<i>mgrB</i> -Stop				<i>mgrB</i>			NGS	Klebsiella	pneumoniae	139	
675-15	Falsch negativ	OXA-1				OXA			NGS	Klebsiella	pneumoniae	139	
675-15	Richtig positiv	SHV-28	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	8	4472486,7	NGS	Klebsiella	pneumoniae	139	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
674-15	Richtig positiv	OKP-B-8	OKP-A-5	Falsch	Korrekt	OKP-A	7	433242,3	NGS	Klebsiella	quasipneumoniae	140	Intrinsisch
674-15	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	16	2215686,7	NGS	Klebsiella	quasipneumoniae	140	
674-15	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			NGS	Klebsiella	quasipneumoniae	140	
543-13	Richtig positiv	ACC-1	ACC-1	Korrekt	Korrekt	ACC	18	1469292,7	PCR	Klebsiella	grimmoniti	125	
543-13	Richtig positiv	OXA-10	OXA-10	Korrekt	Korrekt	OXA	10	1674900	PCR	Klebsiella	grimmoniti	125	
543-13	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Klebsiella	grimmoniti	125	
543-13	Richtig positiv	VIM-1	VIM-4;VIM-28	Falsch	Korrekt	VIM	14	2929206,7	PCR	Klebsiella	grimmoniti	125	
98-08	Falsch negativ	OXY-1-1				OXY			PCR	Klebsiella	michiganensis	128	
98-08	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Klebsiella	michiganensis	128	
98-08	Richtig positiv	VIM-1	VIM-1;VIM-4;VIM-6;VIM-28	Korrekt	Korrekt	VIM	14	5881556,7	PCR	Klebsiella	michiganensis	128	
52-07	Richtig positiv	OXY-2-8	OXY-2-8	Korrekt	Korrekt	OXY	15	1306126,7	PCR	Klebsiella	oxytoca	129	
52-07	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Klebsiella	oxytoca	129	
52-07	Richtig positiv	VIM-1	VIM-1;VIM-4;VIM-28	Korrekt	Korrekt	VIM	12	6589716,7	PCR	Klebsiella	oxytoca	129	
1080-16	Richtig positiv	CMY-4	CMY-4;CMY-6	Korrekt	Korrekt	CMY	17	3642920	PCR	Klebsiella	pneumoniae	150	
1080-16	Richtig positiv	KPC-2	KPC-3	Falsch	Korrekt	KPC	20	190260,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	150	
1080-16	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	6	12760110	PCR	Klebsiella	pneumoniae	150	
1080-16	Richtig positiv	SHV-1	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	10	1011401,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	150	
132-21	Falsch negativ	<i>mgrB</i> -Insertion				<i>mgrB</i>			PCR	Klebsiella	pneumoniae	126	
132-21	Richtig positiv	SHV	SHV-76	Korrekt	Korrekt	SHV	8	5511876,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	126	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
154-19	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	705794,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	113	
154-19	Richtig positiv	CTX-M-1	CTX-M-15	Falsch	Korrekt	CTX-M	18	3079196,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	113	
154-19	Richtig positiv	OXA-232	OXA-232	Korrekt	Korrekt	OXA	25	198067,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	113	
154-19	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Klebsiella	pneumoniae	113	
154-19	Richtig positiv	SHV-1	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	7	261982	PCR	Klebsiella	pneumoniae	113	
404-08	Richtig positiv	CMY-2	CMY-4;CMY-6	Falsch	Korrekt	CMY	12	8644686,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	104	
164-10-1	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	18	1090779,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	135	
164-10-1	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	12	2481796,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	135	
164-10-1	Falsch negativ					SCO			PCR	Klebsiella	pneumoniae	135	
164-10-1	Richtig positiv	SHV-28	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	8	3845761,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	135	
164-10-1	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	22	10248000	PCR	Klebsiella	pneumoniae	135	
164-10-1	Richtig positiv	VIM-4	VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	14	224079,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	135	
52-07	Falsch positiv		CTX-M-8		Keine signifikante Änderung	CTX-M	5	55419640	PCR	Klebsiella	oxytoca	129	Carry-over
291-21	Richtig positiv	CTX-M-1	CTX-M-15	Falsch	Korrekt	CTX-M	17	3010940	PCR	Klebsiella	pneumoniae	127	
291-21	Falsch negativ	<i>mgrB</i> -Insertion				<i>mgrB</i>			PCR	Klebsiella	pneumoniae	127	
291-21	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Klebsiella	pneumoniae	127	
291-21	Richtig positiv	SHV	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	9	718891,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	127	
404-08	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	18	861551,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	104	
404-08	Richtig positiv	SHV-1	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	7	23819,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	104	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
404-08	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	10	176067,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	104	
404-08	Richtig positiv	VIM-4	VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	14	2595856,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	104	
98-08	Falsch positiv		CTX-M-9		Keine signifikante Änderung	CTX-M	3	76332821,3	PCR	Klebsiella	michiganensis	128	
49-11	Richtig positiv	SHV-5	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	10	8327790	PCR	Klebsiella	pneumoniae	133	
49-11	Richtig positiv	VIM-1	VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	13	5515916,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	133	
62-07	Richtig positiv	CMY-4	CMY-4;CMY-6	Korrekt	Korrekt	CMY	13	1042891	PCR	Klebsiella	pneumoniae	100	
62-07	Richtig positiv	CTX-M-14	CTX-M-27;CTX-M-104	Falsch	Korrekt	CTX-M	16	37045300	PCR	Klebsiella	pneumoniae	100	
62-07	Richtig positiv	SHV-1	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	7	311956,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	100	
62-07	Richtig positiv	VIM-19	VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	15	103339600	PCR	Klebsiella	pneumoniae	100	
716-18	Falsch negativ	MCR-8				MCR			PCR	Klebsiella	pneumoniae	138	
716-18	Richtig positiv	SHV-1	SHV-76	Falsch	Korrekt	SHV	6	2238424,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	138	
716-18	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	22	5727240	PCR	Klebsiella	pneumoniae	138	
156-09	Richtig positiv	SHV-1	SHV-11	Falsch	Korrekt	SHV	13	649081,3	PCR	Klebsiella	quasipneumoniae	134	
156-09	Richtig positiv	VIM-1	VIM-2;VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	15	81798900	PCR	Klebsiella	quasipneumoniae	134	
156-09	Richtig positiv	OKP-A-5	OKP-A-5	Korrekt	Korrekt	OKP-A	15	5015906,7	PCR	Klebsiella	quasipneumoniae	134	Intrinsisch
404-08	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	10	1513290,7	PCR	Klebsiella	pneumoniae	104	
156-09	Falsch positiv		OXA-23		Keine signifikante Änderung	OXA	3	4516687,3	PCR	Klebsiella	quasipneumoniae	134	Carry-over
154-19	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1	Korrekt	Korrekt	TEM	15	26710,3	PCR	Klebsiella	pneumoniae	113	Nicht getestet

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
28-16	Richtig positiv	CTX-M-1	CTX-M-1	Korrekt	Korrekt	CTX-M	17	2741416,7	PCR	Morganella	morganii	116	
28-16	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	7	2499970	PCR	Morganella	morganii	116	
64-08	Richtig positiv	VIM-4	VIM-6	Falsch	Korrekt	VIM	16	2123016,7	PCR	Morganella	morganii	98	
28-16	Falsch negativ	DHA				DHA			PCR	Morganella	morganii	116	Intrinsisch
64-08	Falsch negativ	DHA-1				DHA			PCR	Morganella	morganii	98	Intrinsisch
695-17	Richtig positiv	AAC-1	ACC-1	Korrekt	Korrekt	ACC	18	34240400	PCR	Proteus	mirabilis	115	
175-09	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	2161032,7	PCR	Proteus	mirabilis	119	
175-09	Richtig positiv	DHA-1	DHA-1	Korrekt	Korrekt	DHA	10	274568,3	PCR	Proteus	mirabilis	119	
175-09	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Proteus	mirabilis	119	
175-09	Richtig positiv	VEB-1	VEB-1;VEB-5	Falsch	Korrekt	VEB	11	485724,3	PCR	Proteus	mirabilis	119	
57-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	8	19252000	PCR	Proteus	mirabilis	168	
57-15	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-15	Korrekt	Korrekt	CTX-M	16	8131010	PCR	Proteus	mirabilis	168	
57-15	Richtig positiv	DHA-1	DHA-1	Korrekt	Korrekt	DHA	6	394195,3	PCR	Proteus	mirabilis	168	
57-15	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	7	553385,3	PCR	Proteus	mirabilis	168	
57-15	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	9	1020199	PCR	Proteus	mirabilis	168	
695-17	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	7	2173316,7	PCR	Proteus	mirabilis	115	
695-17	Richtig positiv	KPC-2	KPC-3	Falsch	Korrekt	KPC	11	1715990	PCR	Proteus	mirabilis	115	
695-17	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	5	1535656,3	PCR	Proteus	mirabilis	115	
695-17	Falsch negativ	QnrB2				Qnr			PCR	Proteus	mirabilis	115	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
695-17	Richtig positiv	TEM-1	TEM-135	Falsch	Korrekt	TEM	9	202496,3	PCR	Proteus	mirabilis	115	
175-09	Richtig positiv	OXA-10	OXA-10	Korrekt	Korrekt	OXA	6	460974,3	PCR	Proteus	mirabilis	119	
57-15	Richtig positiv	TEM-1	TEM-1;TEM-135	Korrekt	Korrekt	TEM	3	561022	PCR	Proteus	mirabilis	168	
71-15	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	1993958,7	PCR	Providencia	rettgeri	170	
71-15	Richtig positiv	CMY-6	CMY-6	Korrekt	Korrekt	CMY	19	8298600	PCR	Providencia	rettgeri	170	
71-15	Richtig positiv	NDM-1	NDM-1;NDM-5;NDM-7	Korrekt	Korrekt	NDM	7	1616917,3	PCR	Providencia	rettgeri	170	
71-15	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	10	3768540	PCR	Providencia	rettgeri	170	
71-15	Falsch negativ	<i>qnrS1</i>				Qnr			PCR	Providencia	rettgeri	170	
71-15	Falsch negativ	VEB-1				VEB			PCR	Providencia	rettgeri	170	
40-14	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	4	388397,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	122	
48-09	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	3	268339,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	124	
613-16	Falsch positiv		IMP-7		Keine signifikante Änderung	IMP	3	2452862,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	91	Nicht getestet
64-15-2	Richtig positiv	OXA-1	OXA-1	Korrekt	Korrekt	OXA	10	7562526,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	171	
1005-14	Richtig positiv	PER-1	PER-1;PER-7	Korrekt	Korrekt	PER	13	1137341,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	103	
1005-14	Richtig positiv	VIM-2	VIM-2	Korrekt	Korrekt	VIM	14	5096856,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	103	
230-10	Richtig positiv	OXA-10	OXA-10	Korrekt	Korrekt	OXA	10	2544700	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	102	
163-21	Richtig positiv	VIM-2	VIM-2	Korrekt	Korrekt	VIM	11	7826220	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	108	
21-12	Richtig positiv	OXA-10	OXA-10	Korrekt	Korrekt	OXA	9	1607566,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	120	
21-12	Richtig positiv	VEB-1	VEB-1;VEB-5	Korrekt	Korrekt	VEB	10	1095851	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	120	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
230-10	Richtig positiv	VEB-1	VEB-1;VEB-5	Korrekt	Korrekt	VEB	12	11233140	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	102	
230-10	Richtig positiv	VIM-2	VIM-2	Korrekt	Korrekt	VIM	11	17640800	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	102	
369-11	Richtig positiv	OXA-10	OXA-10	Korrekt	Korrekt	OXA	12	3441420	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	106	
24-11	Richtig positiv	GIM-1	GIM-1	Korrekt	Korrekt	GIM	11	29385700	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	172	
24-11	Richtig positiv	OXA-2	OXA-10	Falsch	Korrekt	OXA	10	348565,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	172	
369-11	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	5	4851170	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	106	
369-11	Richtig positiv	VIM-6	VIM-6	Korrekt	Korrekt	VIM	12	2940400	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	106	
1005-14	Richtig positiv	OXA-2	OXA-2	Korrekt	Korrekt	OXA	16	3116946,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	103	
40-14	Richtig positiv	IMP-7	IMP-7	Korrekt	Korrekt	IMP	15	3784586,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	122	
40-14	Richtig positiv	OXA-2	OXA-2	Korrekt	Korrekt	OXA	10	2052806,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	122	
434-17	Richtig positiv	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Korrekt	Korrekt	AAC(6')-Ib	4	2043402,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	112	
434-17	Richtig positiv	IMP-15	IMP-15	Korrekt	Korrekt	IMP	12	8094660	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	112	
47-09	Richtig positiv	VIM-2	VIM-2	Korrekt	Korrekt	VIM	12	467849,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	105	
48-09	Richtig positiv	IMP-16	IMP-16	Korrekt	Korrekt	IMP	9	174825,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	124	
613-16	Richtig positiv	VIM-2	VIM-2	Korrekt	Korrekt	VIM	11	740857,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	91	
64-15-2	Richtig positiv	VIM-2	VIM-2	Korrekt	Korrekt	VIM	14	5101736,7	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	171	
82-10	Richtig positiv	IMP-1	IMP-1	Korrekt	Korrekt	IMP	18	1258172,3	PCR	Pseudomonas	aeruginosa	118	
701/18	Falsch positiv		<i>qnrS1</i>		Keine signifikante Änderung	Qnr	3	88043,2	PCR	Shigella	sonnei	701_18	Carry-over
457/19-1	Richtig positiv	CTX-M-14	CTX-M-9	Falsch	Korrekt	CTX-M	15	18411233,3	PCR	Shigella	sonnei	457/19-1	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
547/13	Richtig positiv	CTX-M-1	CTX-M-1	Korrekt	Korrekt	CTX-M	18	21933900	PCR	Shigella	sonnei	547_13_20220317170006	
547/13	Richtig positiv	TEM-135	TEM-135	Korrekt	Korrekt	TEM	25	24046333,3	PCR	Shigella	sonnei	547_13_20220317170006	
667/17	Richtig positiv	CTX-M-3	CTX-M-1	Falsch	Korrekt	CTX-M	18	5860610	PCR	Shigella	sonnei	667_17	
701/18	Richtig positiv	CTX-M-15	CTX-M-1	Falsch	Korrekt	CTX-M	16	4930203,3	PCR	Shigella	sonnei	701_18	
21-00033	Richtig positiv	lukPV	lukPV	Korrekt	Korrekt	lukPV	5		PCR	Staphylococcus	aureus	21-00033	
21-00033	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	18	2164730	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00033	
21-00047	Falsch negativ	mecA				mecA			PCR	Staphylococcus	aureus	21-00047	
21-00053	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	17	2447816,7	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00053	
21-00090	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	17	4895640	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00090	
21-00102	Richtig positiv	lukPV	lukPV	Korrekt	Korrekt	lukPV	11		PCR	Staphylococcus	aureus	21-00102	
21-00102	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	16	235940,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00102	
21-00130	Richtig positiv	lukPV	lukPV	Korrekt	Korrekt	lukPV	10		PCR	Staphylococcus	aureus	21-00130	
21-00130	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	18	366455,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00130	
21-00155-2	Falsch negativ	lukPV	lukPV			lukPV			PCR	Staphylococcus	aureus	21-00155-2	
21-00155-2	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	9	1073098,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00155-2	
21-00158	Richtig positiv	lukPV	lukPV	Korrekt	Korrekt	lukPV	9		PCR	Staphylococcus	aureus	21-00158	
21-00158	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	16	1470052,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00158	
21-00185	Richtig positiv	lukPV	lukPV	Korrekt	Korrekt	lukPV	3		PCR	Staphylococcus	aureus	21-00185	
21-00194	Richtig positiv	mecA	mecA	Korrekt	Korrekt	mecA	21	105651,7	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00194	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	Precursor Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
21-00352	Richtig positiv	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecA</i>	19	7228466,7	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00352	
21-00444	Richtig positiv	<i>lukPV</i>	<i>lukPV</i>	Korrekt	Korrekt	<i>lukPV</i>	7		PCR	Staphylococcus	aureus	21-00444	
21-00529	Richtig positiv	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecA</i>	19	435775,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00529	
21-00579	Richtig positiv	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecC</i>	8	3654286,7	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00579	
21-00593	Richtig positiv	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecA</i>	11	160156,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-00593	
21-01256	Richtig positiv	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecC</i>	3	2661309,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-01256	
21-01319	Richtig positiv	<i>mecC</i>	<i>mecC</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecC</i>	18	3522766,7	PCR	Staphylococcus	aureus	21-01319	
21-01323	Falsch negativ	<i>mecC</i>				<i>mecC</i>			PCR	Staphylococcus	aureus	21-01323	
21-01371	Richtig positiv	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecA</i>	15	2300746,7	PCR	Staphylococcus	aureus	21-01371	
21-01484	Richtig positiv	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecA</i>	10	1334715,3	PCR	Staphylococcus	aureus	21-01484	
21-01557	Richtig positiv	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	Korrekt	Korrekt	<i>mecA</i>	15	2863226,7	PCR	Staphylococcus	aureus	21-01557	
21-00140	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00140	
21-00185	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00185	
21-00208	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00208	
21-00227	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00227	
21-00288	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00288	
21-00292	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00292	
21-00332	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00332	
21-00354	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00354	

## Anhang

Sample	AMR Wertung	PCR-Determinanten	MS-Determinanten	Isoform Wertung	Phänotyp Wertung	AMR Gen-Familie	Peptide	<i>Precursor</i> Quantity Top3	Referenz	Genus	Spezies	MS Lauf Nummer	Besonderheit
21-00363	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00363	
21-00444	Richtig negativ			Korrekt	Korrekt				PCR	Staphylococcus	aureus	21-00444	

## Referenzen

1. J. Rau, R.S., T. Eisenberg *Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers*, S.A.e.M.-T. Massenspektrometers, Editor. 2015, CVUA Stuttgart.
2. Daniel , N.-C., *LC-MS spectrum of each resolved peak*, L.-M.s.o.e.r. peak, Editor. 2017
3. WHO, *WHO model list of essential medicines - 22nd list, 2021*. World Health Organization, 2021: p. 1--66.
4. Uluseker, C., et al., *A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives*. Frontiers in Microbiology, 2021. **12**.
5. WHO, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data (2022)*. WHO Report. 2022: World Health Organization.
6. WHO, *ANTIMICROBIAL RESISTANCE: Global Report on Surveillance*. WHO Report. 2014.
7. WHO, *GLOBAL ACTION PLAN on antimicrobial resistance*. WHO Report. 2015.
8. O’Neill, J., *TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS*. AMR-review. 2016.
9. van Veen, S.Q., E.C.J. Claas, and E.J. Kuijper, *High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories*. J. Clin. Microbiol., 2010. **48**(3): p. 900--907.
10. Patel, R., *MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases*. Clin. Chem., 2015. **61**(1): p. 100--111.
11. Foudraine, D.E., et al., *Accurate Detection of the Four Most Prevalent Carbapenemases in E. coli and K. pneumoniae by High-Resolution Mass Spectrometry*. Front. Microbiol., 2019. **10**: p. 2760.
12. Strich, J.R., et al., *Identification of the OXA-48 Carbapenemase Family by Use of Tryptic Peptides and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. J. Clin. Microbiol., 2019. **57**: p. 5.
13. Charretier, Y., et al., *Rapid Bacterial Identification, Resistance, Virulence and Type Profiling using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry*. Sci. Rep., 2015. **5**: p. 13944.
14. Hassing, R.-J., et al., *Detection of amino acid substitutions in the GyrA protein of fluoroquinolone-resistant typhoidal Salmonella isolates using high-resolution mass spectrometry*. Int. J. Antimicrob. Agents, 2016. **47**(5): p. 351--356.
15. Cecchini, T., et al., *Deciphering Multifactorial Resistance Phenotypes in Acinetobacter baumannii by Genomics and Targeted Label-free Proteomics*. PubMed. comprises. more. than. 30 million. citations. for. biomedical. literature. from. MEDLINE, life. science. journals., and. online. books., 2018. **17**(3): p. 442--456.
16. Blumenschein, C., et al., *Unbiased Antimicrobial Resistance Detection from Clinical Bacterial Isolates Using Proteomics*. Anal Chem, 2021. **93**(44): p. 14599-14608.
17. Henle, J., *Von den Miasmen und Contagien*. 1840.
18. La Rochelle, P. and A.-S. Julien, *How dramatic were the effects of handwashing on maternal mortality observed by Ignaz Semmelweis?* Journal of the Royal Society of Medicine, 2013. **106**(11): p. 459-460.
19. Pasteur, L., *Recherches sur la putréfaction*. C. R. Acad. Sci., 1863. **56**: p. 5.
20. Tyndall, J.A.d.t. and L.A.d.t. Pasteur, *Les Microbes organisés, leur rôle dans la fermentation, la putréfaction et la contagion, mémoires de MM. Tyndall et Pasteur*. 1878.
21. Koch, R., *Über bakteriologische Forschung*. 2010: Robert Koch-Institut.

22. Koch, R., *Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis*. 2010: Robert Koch-Institut.
23. Nicolle, L.E., et al., *Clinical Practice Guideline for the Management of Asymptomatic Bacteriuria: 2019 Update by the Infectious Diseases Society of America*. Clin. Infect. Dis., 2019. **68**(10): p. e83--e110.
24. Solassol, J., C. Crozet, and S. Lehmann, *Prion propagation in cultured cells*. Br. Med. Bull., 2003. **66**(1): p. 87--97.
25. Levy, S.B., *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*. 2013: Springer.
26. Schwartz, R.S., *Paul Ehrlich's magic bullets*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(11): p. 1079-1080.
27. Pruitt, R. *William Osler and his Gulstonian Lectures on malignant endocarditis*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 1982.
28. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. British journal of experimental pathology, 1929. **10**(3): p. 226.
29. Fisher, R.B., *Joseph Lister 1827-1912*. 1977. 351.
30. Wainwright, M. and J.E. Kristiansen, *On the 75th anniversary of Prontosil*. Dyes Pigm., 2011. **88**(3): p. 231--234.
31. Colebrook, L. and M. Kenny, *Treatment of human puerperal infections, and of experimental infections in mice, with prontosil*. The Lancet, 1936. **227**(5884): p. 1279-1281.
32. TREFOUEL, J., *Activité du p-aminophénylsulfonamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin*. CR Soc Biol (Paris), 1935. **120**: p. 756-758.
33. Aminov, R.I., *A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future*. Front Microbiol, 2010. **1**: p. 134.
34. Kapoor, G., S. Saigal, and A. Elongavan, *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2017. **33**(3): p. 300-305.
35. Mohsen, S., J.A. Dickinson, and R. Somayaji, *Update on the adverse effects of antimicrobial therapies in community practice*. Can Fam Physician, 2020. **66**(9): p. 651-659.
36. Vikesland, P., et al., *Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World*. Accounts of Chemical Research, 2019. **52**(4): p. 916-924.
37. Michael, C.A., D. Dominey-Howes, and M. Labbate, *The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management*. Frontiers in Public Health, 2014. **2**(145).
38. Rendueles, O., *Deciphering the role of the capsule of Klebsiella pneumoniae during pathogenesis: A cautionary tale*. Mol. Microbiol., 2020. **113**(5): p. 883.
39. Taylor, P.K., A.T. Yeung, and R.E. Hancock, *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies*. J Biotechnol, 2014. **191**: p. 121-30.
40. Rahman, T., B. Yarnall, and D.A. Doyle, *Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance*. Eur Biophys J, 2017. **46**(7): p. 647-653.
41. Iyer, R.N., *Beta lactam*. Comprehensive Pharmacology, 2022: p. 3-63.
42. Doi, Y., J.I. Wachino, and Y. Arakawa, *Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases*. Infect Dis Clin North Am, 2016. **30**(2): p. 523-537.
43. Ventola, C.L., *The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats*. Pharmacy and Therapeutics, 2015. **40**(4): p. 277.
44. Martin, M.J., S.E. Thottathil, and T.B. Newman, *Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers*. American Journal of Public Health, 2015. **105**(12): p. 2409.

45. Bhullar, K., et al., *Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34953.
46. Polianciuc, S.I., et al., *Antibiotics in the environment: causes and consequences*. Medicine and Pharmacy Reports, 2020. **93**(3): p. 231.
47. Bengtsson-Palme, J., E. Kristiansson, and D.G.J. Larsson, *Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2018. **42**(1).
48. O'Neill, J., *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations: December 2014*. AMR-review. 2014: Review on antimicrobial resistance.
49. Murray, C.J., et al., *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. The Lancet, 2022. **399**(10325): p. 629--655.
50. Årdal, C., et al., *Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges*. Nature Reviews Microbiology, 2020. **18**(5): p. 267-274.
51. Rice, L.B., *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. 2008, The University of Chicago Press. p. 1079-1081.
52. Mulani, M.S., et al., *Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 539.
53. Navidinia, M., *The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections*. 2016.
54. Muntean, M.M., et al., *Phenotypic and genotypic detection methods for antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens (Review)*. Exp Ther Med, 2022. **24**(2): p. 508.
55. WHO, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data*. WHO Report. 2022.
56. Gajdács, M., et al., *Urinary Tract Infections in Elderly Patients: A 10-Year Study on Their Epidemiology and Antibiotic Resistance Based on the WHO Access, Watch, Reserve (AWaRe) Classification*. Antibiotics, 2021. **10**(9): p. 1098.
57. Hernández, C., et al., *Clinical characteristics and outcome of elderly patients with community-onset bacteremia*. Journal of Infection, 2015. **70**(2): p. 135-143.
58. Naylor, N.R., et al., *Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review*. Antimicrob. Resist. Infect. Control, 2018. **7**(1): p. 1--17.
59. Najem, S., et al., *High prevalence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriage in children screened prospectively for multidrug resistant organisms at admission to a paediatric hospital, Hamburg, Germany, September 2018 to May 2019*. Euro Surveill, 2022. **27**(15).
60. Arefian, H., et al., *Extra length of stay and costs because of health care-associated infections at a German university hospital*. Am J Infect Control, 2016. **44**(2): p. 160-6.
61. Geffers, C., et al., *No increase of device associated infections in German intensive care units during the start of the COVID-19 pandemic in 2020*. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2022. **11**(1): p. 67.
62. Mitha, M., E.Y. Furuya, and E. Larson, *Risk of healthcare associated infections in HIV positive patients*. J Infect Prev, 2014. **15**(6): p. 214-220.
63. McFee, R.B., *Nosocomial or hospital-acquired infections: an overview*. Dis Mon, 2009. **55**(7): p. 422-38.
64. Hornberg, C., et al., *Das Problem der MRSA-Infektionen bei der Behandlung des Diabetischen Fußsyndroms*. Der Orthopäde, 2003. **32**(3): p. 213-217.
65. Baseel, D., et al., *The Ideal Time to Administer Pre-operative Antibiotics: Current and Future Practices*. Cureus, 2022. **14**(5): p. e24979.
66. Bloom, G., et al., *Antimicrobial resistance and universal health coverage*. BMJ Glob Health, 2017. **2**(4): p. e000518.
67. IHME, *Antimikrobielle Resistenzen: Krankheitslast in G7-Staaten und weltweit EIN DRINGENDER AUFRUF ZUM HANDELN*. 2022, University of Washington.

68. Kaprou, G.D., et al., *Rapid Methods for Antimicrobial Resistance Diagnostics*. Antibiotics, 2021. **10**(2): p. 209.
69. RKI, *RKI - 2022 - Antibiotikaresistenzen, eine schleichende Pandemie: Einweihung des WHO-Kooperationszentrums für Antibiotikaresistenz am RKI*, RKI, Editor. 2022, RKI.
70. Wang, H., et al., *Paving the way for precise diagnostics of antimicrobial resistant bacteria*. Front. Mol. Biosci., 2022. **0**.
71. Becerra, S.C., et al., *An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue*. BMC Res Notes, 2016. **9**: p. 216.
72. Rodríguez-Sánchez, B., et al., *Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018*. Euro Surveill, 2019. **24**(4).
73. Ghyselinck, J., et al., *Evaluation of MALDI-TOF MS as a tool for high-throughput dereplication*. J Microbiol Methods, 2011. **86**(3): p. 327-36.
74. Fournier, R., et al., *Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria*. Anaerobe, 2012. **18**(3): p. 294-297.
75. Mortier, T., et al., *Bacterial species identification using MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning techniques: A large-scale benchmarking study*. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2021. **19**: p. 6157-6168.
76. Burnham, C.-A.D., et al., *Diagnosing antimicrobial resistance*. Nature Reviews Microbiology, 2017. **15**(11): p. 697-703.
77. Tenover, F.C., *Antibiotic Susceptibility Testing*, in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, M. Schaechter, Editor. 2009, Academic Press: Oxford. p. 67-77.
78. Zhang, C., et al., *Multiplex PCR and Nanopore Sequencing of Genes Associated with Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae Directly from Clinical Samples*. Clin Chem, 2021. **67**(4): p. 610-620.
79. Viehweger, A., et al., *Context-aware genomic surveillance reveals hidden transmission of a carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae*. Microb. Genomics, 2021. **7**(12): p. 000741.
80. Martak, D., et al., *Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks*. Front. Microbiol., 2019. **0**.
81. Bruker, *IR Biotyper® for Food Microbiology*. 2022.
82. Lozano, C., et al., *Identification and Characterization of Marine Microorganisms by Tandem Mass Spectrometry Proteotyping*. Microorganisms, 2022. **10**(4): p. 719.
83. Kondori, N., et al., *Mass Spectrometry Proteotyping-Based Detection and Identification of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Candida albicans in Blood*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021. **11**.
84. Lasch, P., et al., *Identification of Microorganisms by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS(1)) and in Silico Peptide Mass Libraries*. Mol Cell Proteomics, 2020. **19**(12): p. 2125-2139.
85. Jaen-Luchoro, D., et al., *Genomic and Proteomic Characterization of the Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli Strain CCUG 73778: A Virulent, Nosocomial Outbreak Strain*. Microorganisms, 2020. **8**(6): p. 893.
86. Correa-Martinez, C.L., et al., *Rapid Detection of Extended-Spectrum beta-Lactamases (ESBL) and AmpC beta-Lactamases in Enterobacterales: Development of a Screening Panel Using the MALDI-TOF MS-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 13.
87. Verschaffelt, P., et al., *Unipept Desktop: A Faster, More Powerful Metaproteomics Results Analysis Tool*. Journal of Proteome Research, 2021.
88. Demichev, V., et al., *High sensitivity dia-PASEF proteomics with DIA-NN and FragPipe*. bioRxiv, 2021: p. 2021.03.08.434385.

89. Doellinger, J., et al., *Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion (SPEED) - A Universal, Rapid, and Detergent-free Protocol for Proteomics Based on Acid Extraction*. Molecular & Cellular Proteomics, 2020. **19**(1): p. 209--222.
90. Messner, C.B., et al., *Scanning SWATH acquisition enables high-throughput proteomics with chromatographic gradients as fast as 30 seconds*. bioRxiv, 2020: p. 656793.
91. Demichev, V., et al., *DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput*. Nat. Methods, 2019. **17**(1): p. 41--44.
92. Ding, Z., et al., *Proteomics technologies for cancer liquid biopsies*. Molecular Cancer, 2022. **21**(1): p. 53.
93. Deutsch, E.W., et al., *Advances and Utility of the Human Plasma Proteome*. Journal of Proteome Research, 2021.
94. Ignjatovic, V., et al., *Mass Spectrometry-Based Plasma Proteomics: Considerations from Sample Collection to Achieving Translational Data*. Journal of Proteome Research, 2019.
95. Fleurbaaij, F., et al., *Direct detection of extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M) from blood cultures by LC-MS/MS bottom-up proteomics*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2017. **36**(9): p. 1621--1628.
96. Barry, A., et al., *Rapid determination of antimicrobial susceptibility for urgent clinical situations*. American Journal of Clinical Pathology, 1973. **59**(5): p. 693-699.
97. Luber, P., et al., *Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(3): p. 1062-8.
98. Caron, K., et al., *The Requirement of Genetic Diagnostic Technologies for Environmental Surveillance of Antimicrobial Resistance*. Sensors (Basel), 2021. **21**(19).
99. Deurenberg, R.H., et al., *Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention*. J Biotechnol, 2017. **243**: p. 16-24.
100. Sampaio, P.S. and C.R.C. Calado, *Potential of FTIR-Spectroscopy for Drugs Screening against Helicobacter pylori*. Antibiotics, 2020. **9**(12): p. 897.
101. Ribeiro da Cunha, B., L.P. Fonseca, and C.R.C. Calado, *Metabolic Fingerprinting with Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: Towards a High-Throughput Screening Assay for Antibiotic Discovery and Mechanism-of-Action Elucidation*. Metabolites, 2020. **10**(4).
102. van den Beld, M.J.C., et al., *MALDI-TOF MS Using a Custom-Made Database, Biomarker Assignment, or Mathematical Classifiers Does Not Differentiate Shigella spp. and Escherichia coli*. Microorganisms, 2022. **10**(2): p. 435.
103. Brackmann, M., et al., *Antimicrobial resistance classification using MALDI-TOF-MS is not that easy: lessons from vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. Clinical Microbiology and Infection, 2020. **26**(3): p. 391--393.
104. Nix, I.D., et al., *Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus From Agar Cultures and Directly From Positive Blood Cultures Using MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 232.
105. Correa-Martínez, C.L., et al., *Development of a MALDI-TOF MS-based screening panel for accelerated differential detection of carbapenemases in Enterobacterales using the direct-on-target microdroplet growth assay*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 4988.
106. Thomson, G.P., *J.J. Thomson | Biography, Nobel Prize, & Facts*. 2022.
107. Christoph, S. and S. Linda, *After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics*. Clinical Biochemistry, 2020. **82**: p. 2-11.
108. Hou, T.-Y., C. Chiang-Ni, and S.-H. Teng, *Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology*. J. Food Drug Anal., 2019. **27**(2): p. 404--414.
109. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.

110. Dupree, E.J., et al., *A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field*. *Proteomes*, 2020. **8**(3).
111. Ke, M., et al., *Identification, quantification, and site localization of protein posttranslational modifications via mass spectrometry-based proteomics*. *Modern proteomics—sample preparation, analysis and practical applications*, 2016: p. 345-382.
112. Schwanhäusser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 337-342.
113. Al-Amrani, S., et al., *Proteomics: Concepts and applications in human medicine*. *World J Biol Chem*, 2021. **12**(5): p. 57-69.
114. van Belkum, A., et al., *Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020. **18**(5): p. 299--311.
115. van Belkum, A. and W.M. Dunne, *Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing*. *J. Clin. Microbiol.*, 2013. **51**(7): p. 2018--2024.
116. Dubourg, G., B. Lamy, and R. Ruimy, *Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2018. **24**(9): p. 935--943.
117. Su, M., et al., *Genome-Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019. **57**(3): p. e01405-18.
118. Alcock, B.P., et al., *CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database*. *Nucleic Acids Res.*, 2020. **48**(D1): p. 517--525.
119. Welker, M. and A. van Belkum, *One System for All: Is Mass Spectrometry a Future Alternative for Conventional Antibiotic Susceptibility Testing?* *Front Microbiol*, 2019. **10**: p. 2711.
120. Lange, C., et al., *Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection*. *J. Clin. Microbiol.*, 2014. **52**(12): p. 4155--4162.
121. Sparbier, K., S. Schubert, and M. Kostrzewa, *MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing?* PubMed. comprises. more. than. 30 million. citations. for. biomedical. literature. from. MEDLINE, life. science. journals., and. online. books., 2016. **104**: p. 48--54.
122. Trip, H., et al., *Simultaneous Identification of Multiple  $\beta$ -Lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Relation to Carbapenem and Ceftazidime Resistance, Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015. **53**(6): p. 1927-1930.
123. Chang, C.-J., et al., *Diagnosis of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Acinetobacter baumannii* Using Shotgun Proteomics and LC-Nano-Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(5): p. 2802-2808.
124. Jaén-Luchoro, D., et al., *Genomic and Proteomic Characterization of the Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Strain CCUG 73778: A Virulent, Nosocomial Outbreak Strain*. *Microorganisms*, 2020. **8**(6): p. 893.
125. Chen, C.-Y., et al., *Detection of Antimicrobial Resistance Using Proteomics and the Comprehensive Antibiotic Resistance Database: A Case Study*. *Proteomics Clin. Appl.*, 2019. **e1800182**.
126. Pfeifer, Y., et al., *Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital*. *Microbial Drug Resistance*, 2017. **23**(3): p. 301-307.
127. Rieber, H., A. Frontzek, and Y. Pfeifer, *Molecular Investigation of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* spp. from Hospitals in North Rhine-Westphalia, Germany*. *Microbial Drug Resistance*, 2017. **23**(1): p. 25-31.

128. Pfeifer, Y., et al., *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii ST78 with OXA-72 carbapenemase and ESBL gene blaCTX-M-115*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. **71**(5): p. 1426-1428.
129. Encho, S., et al., *Isolation of Acinetobacter radioresistens from a clinical sample in Bulgaria*. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2016. **4**: p. 57-59.
130. Schweizer, C., et al., *Plasmid-Mediated Transmission of KPC-2 Carbapenemase in Enterobacteriaceae in Critically Ill Patients*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**.
131. Weber, R.E., et al., *IS26-Mediated Transfer of blaNDM-1 as the Main Route of Resistance Transmission During a Polyclonal, Multispecies Outbreak in a German Hospital*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**.
132. Pfeifer, Y., et al., *NDM-1-Producing Escherichia coli in Germany*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011. **55**(3): p. 1318-1319.
133. Rieber, H., et al., *Emergence of metallo- $\beta$ -lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in North Rhine-Westphalia, Germany*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. **67**(4): p. 1043-1045.
134. Becker, L., et al., *Genome-based analysis of Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolates from German hospital patients, 2008-2014*. Antimicrob. Resist. Infect. Control, 2018. **7**.
135. Gröbner, S., et al., *Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates at the university hospital of Tübingen, Germany*. J. Med. Microbiol., 2009. **58**(Pt): p. 7.
136. Pfeifer, Y., et al., *Molecular characterization of blaNDM-1 in an Acinetobacter baumannii strain isolated in Germany in 2007*. J. Antimicrob. Chemother., 2011. **66**(9): p. 1998--2001.
137. Turton, J.F., et al., *Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species*. J. Clin. Microbiol., 2006. **44**(8): p. 2974--2976.
138. Park, C.H., et al., *Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme*. Antimicrob. Agents Chemother., 2006. **50**(11): p. 3953--3955.
139. Liu, Y.-Y., et al., *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. Lancet Infect. Dis., 2016. **16**(2): p. 161--168.
140. Werner, G., et al., *Vancomycin-resistant vanB-type Enterococcus faecium isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU*. Robert Koch-Institut, Infektionskrankheiten / Erreger, 2012.
141. Becker, K., et al., *Detection of mecA- and mecC-Positive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen 3 PCR Assay*. J. Clin. Microbiol., 2016. **54**(1): p. 180.
142. Chen, S., et al., *fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor*. Bioinformatics, 2018. **34**(17): p. i884--i890.
143. Wick, R.R., et al., *Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads*. PLoS Comput. Biol., 2017. **13**(6): p. e1005595.
144. Prjibelski, A., et al., *Using SPAdes De Novo Assembler*. Current Protocols in Bioinformatics, 2020. **70**(1): p. e102.
145. Lam, M.M.C., et al., *A genomic surveillance framework and genotyping tool for Klebsiella pneumoniae and its related species complex - Nature Communications*. Nat. Commun., 2021. **12**(1): p. 1--16.
146. Waas, M., et al., *SP2: Rapid and Automatable Contaminant Removal from Peptide Samples for Proteomic Analyses*. Journal of Proteome Research, 2019.

147. Waterhouse, R.M., et al., *BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics*. Mol. Biol. Evol., 2018. **35**(3): p. 543--548.
148. Buchfink, B., C. Xie, and D.H. Huson, *Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND*. Nat. Methods, 2014. **12**(1): p. 59--60.
149. Katoh, K. and D.M. Standley, *MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(4): p. 772-80.
150. Rozewicki, J., et al., *MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment*. Nucleic Acids Res., 2019. **47**(W1): p. W5--W10.
151. Silva, J.C., et al., *Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition*. PubMed. comprises. more. than. 30 million. citations. for. biomedical. literature. from. MEDLINE, life. science. journals., and. online. books., 2006. **5**(1): p. 144-156.
152. Grossmann, J., et al., *Implementation and evaluation of relative and absolute quantification in shotgun proteomics with label-free methods*. J. Proteomics, 2010. **73**(9): p. 1740--1746.
153. Naas, T., et al., *Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function*. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2017. **32**(1): p. 917--919.
154. Doellinger, J., et al., *Isolation Window Optimization of Data-Independent Acquisition Using Predicted Libraries for Deep and Accurate Proteome Profiling*. Anal Chem, 2020. **92**(18): p. 12185-12192.
155. Schweizer, C., et al., *Plasmid-Mediated Transmission of KPC-2 Carbapenemase in Enterobacteriaceae in Critically Ill Patients*. Front. Microbiol., 2019. **10**.
156. Pietsch, M., et al., *Molecular characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolates from hospital and ambulatory patients in Germany*. Veterinary Microbiology, 2017. **200**: p. 130--137.
157. Pfeifer, Y., et al., *Emergence of OXA-48-Type Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in German Hospitals*. Antimicrob. Agents Chemother., 2012. **56**(4): p. 2125.
158. Eller, C., et al., *Presence of  $\beta$ -lactamases in extended-spectrum-cephalosporin-resistant Salmonella enterica of 30 different serovars in Germany 2005–11*. J. Antimicrob. Chemother., 2013. **68**(9): p. 1978--1981.
159. Clowes, R.C. and D. Rowley, *Some Observations on Linkage Effects in Genetic Recombination in Escherichia coli K-12*. Microbiology, 1954. **11**(2): p. 250--260.
160. O. n. s. o. r. t. i. u. m. UniProt, C., *UniProt: a worldwide hub of protein knowledge*. Nucleic Acids Res., 2019. **47**(D1): p. 506--515.
161. Sielaff, M., et al., *Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range*. ACS Publications, 2017.
162. León, I.R., et al., *Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis\**. Molecular & Cellular Proteomics, 2013. **12**(10): p. 2992--3005.
163. Tanca, A., et al., *Comparison of detergent-based sample preparation workflows for LTQ-Orbitrap analysis of the Escherichia coli proteome*. Proteomics, 2013. **13**(17): p. 2597--2607.
164. Wiśniewski, J.R., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. Nature Methods, 2009. **6**(5): p. 359-362.
165. Zougman, A., P.J. Selby, and R.E. Banks, *Suspension trapping (STrap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis*. PROTEOMICS, 2014. **14**(9): p. 1006-1000.
166. Duan, X., et al., *A Straightforward and Highly Efficient Precipitation/On-Pellet Digestion Procedure Coupled with a Long Gradient Nano-LC Separation and Orbitrap Mass Spectrometry for Label-Free Expression Profiling of the Swine Heart Mitochondrial Proteome*. Journal of Proteome Research, 2009. **8**(6): p. 2838-2850.

167. Hughes, C.S., et al., *Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology*. *Molecular Systems Biology*, 2014. **10**(10): p. 757.
168. Lippi, G. and G.D. Rin, *Advantages and limitations of total laboratory automation: a personal overview*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2019. **57**(6): p. 802-811.
169. Nichols, Z.E. and C.D. Geddes, *Sample Preparation and Diagnostic Methods for a Variety of Settings: A Comprehensive Review*. *Molecules*, 2021. **26**(18): p. 5666.
170. Roux-Dalvai, F., et al., *Fast and Accurate Bacterial Species Identification in Urine Specimens Using LC-MS/MS Mass Spectrometry and Machine Learning*. *Mol Cell Proteomics*, 2019. **18**(12): p. 2492-2505.
171. Bache, N., et al., *A Novel LC System Embeds Analytes in Pre-formed Gradients for Rapid, Ultra-robust Proteomics*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018. **17**(11): p. 2284--2296.
172. Meier, F., et al., *Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer*. *Mol Cell Proteomics*, 2018. **17**(12): p. 2534-2545.
173. Schubert, O.T., et al., *Building high-quality assay libraries for targeted analysis of SWATH MS data*. *Nature Protocols*, 2015. **10**(3): p. 426-441.
174. Ludovic, C.G., et al., *Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis\**. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012. **11**(6): p. O111.016717.
175. von Ziegler, L.M., et al., *Subregion-Specific Proteomic Signature in the Hippocampus for Recognition Processes in Adult Mice*. *Cell Rep*, 2018. **22**(12): p. 3362-3374.
176. Bouchal, P., et al., *Breast Cancer Classification Based on Proteotypes Obtained by SWATH Mass Spectrometry*. *Cell Rep*, 2019. **28**(3): p. 832-843.e7.
177. Arya, S., et al., *Quantitative proteomic changes in LPS-activated monocyte-derived dendritic cells: A SWATH-MS study*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 4343.
178. Gessulat, S., et al., *Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning*. *Nature Methods*, 2019. **16**(6): p. 509-518.
179. Sugawara, E., S. Kojima, and H. Nikaido, *Klebsiella pneumoniae Major Porins OmpK35 and OmpK36 Allow More Efficient Diffusion of  $\beta$ -Lactams than Their Escherichia coli Homologs OmpF and OmpC*. *J Bacteriol*, 2016. **198**(23): p. 3200-3208.
180. Penha Filho, R.A.C., et al., *Emergent multidrug-resistant nontyphoidal Salmonella serovars isolated from poultry in Brazil coharboring bla(CTX-M-2) and qnrB or bla(CMY-2) in large plasmids*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2019. **95**(1): p. 93-98.
181. Garoff, L., K. Yadav, and D. Hughes, *Increased expression of Qnr is sufficient to confer clinical resistance to ciprofloxacin in Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 2018. **73**(2): p. 348-352.
182. Mhaya, A., et al., *MgrB Inactivation Is Responsible for Acquired Resistance to Colistin in Enterobacter hormaechei subsp. steigerwaltii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2020. **64**(6).
183. Corona, F. and J.L. Martinez, *Phenotypic Resistance to Antibiotics*. *Antibiotics*, 2013. **2**(2): p. 237.
184. Bochner, B.R., *Global phenotypic characterization of bacteria*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2009. **33**(1): p. 191.
185. Galhano, B.S.P., et al., *Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages*. *Microorganisms*, 2021. **9**(5).
186. Shafer, D., et al., *Comparison of direct smear and chemical extraction methods for MALDI-TOF mass spectrometry identification of clinical relevant anaerobic bacteria*. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2017. **1**(1): p. 27--30.

187. Khot, P.D. and M.A. Fisher, *Novel Approach for Differentiating Shigella Species and Escherichia coli by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*. J. Clin. Microbiol., 2013. **51**(11): p. 3711--3716.
188. Paauw, A., et al., *Rapid and reliable discrimination between Shigella species and Escherichia coli using MALDI-TOF mass spectrometry*. Int. J. Med. Microbiol., 2015. **305**(4): p. 446--452.
189. Kuhns, M., et al., *Rapid Discrimination of Salmonella enterica Serovar Typhi from Other Serovars by MALDI-TOF Mass Spectrometry*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e40004.
190. Sandow, J.J., et al., *Simplified high-throughput methods for deep proteome analysis on the timsTOF Pro*. bioRxiv, 2021: p. 657908.
191. Huang, Z., et al., *Proteomic datasets of HeLa and SiHa cell lines acquired by DDA-PASEF and diaPASEF*. Data in Brief, 2022. **41**: p. 107919.
192. Bian, Y., et al., *Identification of 7 000–9 000 Proteins from Cell Lines and Tissues by Single-Shot Microflow LC–MS/MS*. Anal. Chem., 2021.
193. Demichev, V., et al., *dia-PASEF data analysis using FragPipe and DIA-NN for deep proteomics of low sample amounts*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 3944.
194. Krieger, J.R., et al., *EvoSep One Enables Robust Deep Proteome Coverage Using Tandem Mass Tags while Significantly Reducing Instrument Time*. Journal of Proteome Research, 2019.
195. Zhang, Q., H. Liu, and F. Bu, *High performance of a GPU-accelerated variant calling tool in genome data analysis*. bioRxiv, 2021: p. 2021.12.12.472266.
196. Buntara, F., et al., *Is GPUs Ready to Boost Genomic Alignment Computation*. 2019 International Conference on Innovative Trends in Computer Engineering (ITCE), 2019: p. 130--135.
197. Wick, R.R., L.M. Judd, and K.E. Holt, *Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing*. Genome Biol., 2019. **20**(1): p. 1--10.
198. Naidu, V., et al., *Identification of a Novel Ciprofloxacin Tolerance Gene, aciT, Which Contributes to Filamentation in Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2021. **65**(6): p. e01400-20.
199. Liang, Y., et al., *Quantitative proteomics implicates YggT in streptomycin resistance in Salmonella enterica serovar Enteritidis*. Biotechnol. Lett, 2021. **43**(4): p. 919--932.
200. Varadarajan, A.R., et al., *An integrated model system to gain mechanistic insights into biofilm-associated antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa MPAO1*. NPJ Biofilms Microbiomes, 2020. **6**(1): p. 46.