

Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Evaluation der FTIR-Spektroskopie als innovatives  
Typisierungsverfahren bei der Transmissionssurveillance  
multiresistenter Erreger**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Löffler, Kim Akemi**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatterin: Professorin Dr. S. Peter

2. Berichterstatterin: Professorin Dr. C. Wolz

Tag der Disputation: 02.02.2023



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>2</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 MULTIRESISTENTE GRAMNEGATIVE BAKTERIEN (MRGN) .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 ENTEROBACTERIALES .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	8
1.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> allgemein.....	8
1.2.1.2 <i>Escherichia coli</i> MRGN.....	10
1.2.2 <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> .....	11
1.2.2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> allgemein .....	11
1.2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> MRGN .....	13
<b>1.3 SURVEILLANCE UND TYPISIERUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4 FOURIER-TRANSFORM-INFRAROT (FTIR)-SPEKTROSKOPIE .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 PRINZIP DER FTIR-SPEKTROSKOPIE.....	16
1.4.2 FTIR-SPEKTROSKOPIE ALS TYPISIERUNGSMETHODE.....	17
<b>1.5 MULTI-LOCUS-SEQUENZ-TYPISIERUNG (MLST).....</b>	<b>20</b>
1.5.1 MLST BEI <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	21
<b>1.6 GANZGENOMSEQUENZIERUNG .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)-ANALYSE .....</b>	<b>24</b>
<b>1.8 FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>26</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 MATERIAL .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 ISOLATE.....	27
2.1.2 NÄHRMEDIEN.....	32
2.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	33
2.1.4 GERÄTE .....	34
2.1.5 SOFTWARE.....	35
<b>2.2 METHODEN .....</b>	<b>35</b>
2.2.1 STUDIENDESIGN UND ETHIK .....	35
2.2.2 ISOLATE .....	36
2.2.2.1 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie.....	36
2.2.3 GENOMSEQUENZIERUNG DER <i>E. COLI</i> -ISOLATE.....	37
2.2.3.1 DNS-Isolation .....	37
2.2.3.2 DNS-Konzentrationsbestimmung .....	38
2.2.3.3 Herstellung der DNS-Libraries .....	39
2.2.3.4 DNS-Sequenzierung.....	40
2.2.3.5 Genomanalyse der <i>E. coli</i> -Isolate .....	40
2.2.4 FTIR-SPEKTROSKOPIE DER <i>E. COLI</i> - UND <i>K. PNEUMONIAE</i> -ISOLATE.....	41
2.2.4.1 Vorbereitung der Proben für FTIR-Spektroskopie .....	41

2.2.4.2	Erstellung und Analyse der FTIR-Spektren.....	41
2.2.4.3	Berechnung von Clustern aus FTIR-Spektren .....	42

### **3 ERGEBNISSE..... 44**

<b>3.1</b>	<b>TRANSMISSIONSSURVEILLANCE VON MRGN-<i>E. COLI</i> .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	ISOLATAUSWAHL.....	44
3.1.2	GANZGENOMSEQUENZIERUNG .....	45
3.1.2.1	Speziesidentifizierung.....	45
3.1.2.2	MLST-Analyse .....	45
3.1.2.3	SNP-Analyse.....	46
3.1.3	FTIR-SPEKTROSKOPIE .....	47
3.1.3.1	Erstellung und Analyse der FTIR-Spektren.....	47
3.1.3.2	Berechnung von Clustern aus FTIR-Spektren .....	48
3.1.3.3	Vergleich von FTIR-Spektroskopie und MLST-Analyse.....	52
3.1.3.4	Vergleich von FTIR-Spektroskopie und SNP-Analyse .....	53
3.1.4	TRANSMISSIONSSURVEILLANCE MIT VERSCHIEDENEN TYPISIERUNGSMETHODEN .....	56
3.1.4.1	Transmissionssurveillance mit epidemiologischen Daten .....	56
3.1.4.2	Transmissionssurveillance mit SNP-Analyse als Typisierungsmethode.....	59
3.1.4.3	Transmissionssurveillance mit MLST-Analyse als Typisierungsmethode .....	61
3.1.4.4	Transmissionssurveillance mit FTIR-Spektroskopie als Typisierungsmethode .....	63
<b>3.2</b>	<b>EINFLUSS VON NÄHRMEDIUM UND INKUBATIONSZEIT AUF DIE FTIR-SPEKTREN .....</b>	<b>67</b>
3.2.1	EINFLUSS DES NÄHRMEDIUMS AUF DIE FTIR-SPEKTREN VON <i>E. COLI</i> -ISOLATEN .....	67
3.2.2	EINFLUSS DER INKUBATIONSZEIT AUF DIE FTIR-SPEKTREN VON <i>E. COLI</i> -ISOLATEN.....	68
<b>3.3</b>	<b>TRANSMISSIONSSURVEILLANCE VON MRGN-<i>K. PNEUMONIAE</i>.....</b>	<b>73</b>
3.3.1	ISOLATAUSWAHL.....	73
3.3.2	FTIR-SPEKTROSKOPIE .....	73
3.3.2.1	Erstellung und Analyse der FTIR-Spektren.....	73
3.3.2.2	Berechnung von Clustern aus FTIR-Spektren .....	74
3.3.3	TRANSMISSIONSSURVEILLANCE MIT VERSCHIEDENEN TYPISIERUNGSMETHODEN .....	76
3.3.3.1	Transmissionssurveillance mit epidemiologischen Daten .....	76
3.3.3.2	Transmissionssurveillance mit FTIR-Spektroskopie als Typisierungsmethode.....	77

### **4 DISKUSSION..... 79**

<b>4.1</b>	<b>TRANSMISSIONSSURVEILLANCE VON MRGN-<i>E. COLI</i> UND MRGN-<i>K. PNEUMONIAE</i>.....</b>	<b>79</b>
4.1.1	ISOLATAUSWAHL.....	79
4.1.2	GANZGENOMSEQUENZIERUNG .....	80
4.1.2.1	MLST-Analyse .....	80
4.1.2.2	SNP-Analyse.....	81
4.1.3	FTIR-SPEKTROSKOPIE .....	81
4.1.3.1	Vergleich von FTIR-Spektroskopie und MLST-Analyse.....	84
4.1.3.2	Vergleich von FTIR-Spektroskopie und SNP-Analyse .....	86
4.1.4	TRANSMISSIONSSURVEILLANCE MIT VERSCHIEDENEN TYPISIERUNGSMETHODEN .....	89
<b>4.2</b>	<b>EINFLUSS VON NÄHRMEDIUM UND INKUBATIONSZEIT AUF DIE FTIR-SPEKTREN .....</b>	<b>93</b>
4.2.1	EINFLUSS DES NÄHRMEDIUMS AUF DIE FTIR-SPEKTREN VON <i>E. COLI</i> -ISOLATEN .....	93
4.2.2	EINFLUSS DER INKUBATIONSZEIT AUF DIE FTIR-SPEKTREN VON <i>E. COLI</i> -ISOLATEN.....	94
<b>4.3</b>	<b>FAZIT .....</b>	<b>96</b>

4.4	AUSBlick .....	98
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	99
	<u>LITERATURVERZEICHNIS .....</u>	<u>102</u>
	<u>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT .....</u>	<u>112</u>
	<u>ANHANG .....</u>	<u>113</u>
	ZU KAPITEL 3.1.2.2: MLST-ANALYSE .....	113
	ZU KAPITEL 3.2.1: EINFLUSS DES NÄHRMEDIUMS AUF DIE FTIR-SPEKTREN DER <i>E. COLI</i> -ISOLATE.....	114
	ZU KAPITEL 3.2.2: EINFLUSS DER INKUBATIONSZEIT AUF DIE FTIR-SPEKTREN DER <i>E. COLI</i> -ISOLATE .....	115
	<u>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</u>	<u>119</u>
	<u>DANKSAGUNG .....</u>	<u>120</u>

## Abkürzungsverzeichnis

ANN	<i>Artificial Neural Networks</i> (künstliche neuronale Netzwerke)
ARI	<i>Adjusted Rand Index</i>
CLED-Agar	Cystine Lactose Electrolyte Deficient-Agar
CRE	Carbapenem-resistente <i>Enterobacterales</i>
CVA	<i>Canonical Variate Analysis</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EARS-Net	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
ECDC	<i>European Center for Disease Prevention and Control</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum- $\beta$ -Laktamasen
ETEC	Enterotoxinbildende <i>E. coli</i>
EU	Europäische Union
FTIR-Spektroskopie	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (hierarchische Clusteranalyse)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert-Koch-Institut
MALDI-TOF Massenspektrometrie	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i> Massenspektrometrie
MLST	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung
MRGN	Multiresistente gramnegative Bakterien

MRSA	Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PC-DFA	<i>Principal Component-Discriminant Function Analysis</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i>
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i>
SLV	<i>Single Locus Variants</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeats</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> (Ganzgenomsequenzierung)

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN)

Weltweit ist in den letzten Jahren zu beobachten, dass die Anzahl der Nachweise von multiresistenten gramnegativen Bakterien (MRGN) angestiegen ist. Jeder zehnte Patient, der in ein deutsches Krankenhaus aufgenommen wird, ist bereits mit multiresistenten Enterobakterien kolonisiert. Zwar verläuft die Kolonisierung in der Regel asymptomatisch, es besteht jedoch die Gefahr einer endogenen Infektion und einer Übertragung auf andere Patienten. Die Therapiemöglichkeiten sind durch die Multiresistenz auf wenige Reserveantibiotika beschränkt, eine Möglichkeit zur Dekolonisierung besteht bisher nicht (Hamprecht und Göttig, 2018).

Gemäß der Definition der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert-Koch-Institut (KRINKO) von 2012 werden 3MRGN- und 4MRGN-Bakterien unterschieden, die anhand ihrer Resistenz gegenüber den vier wichtigsten bakteriziden Antibiotikaklassen eingeteilt werden (KRINKO, 2012): Acylureidopenicilline, Cephalosporine der dritten und vierten Generation, Carbapeneme und Fluorchinolone. Für Enterobakterien gilt, dass Stämme, die gegen alle Antibiotikagruppen außer Carbapenemen resistent sind, als 3MRGN klassifiziert werden. Stämme, die Resistenzen gegen alle vier Gruppen aufweisen, werden als 4MRGN definiert. Bei Früh- und Neugeborenen, die intensivmedizinisch behandelt werden, existiert außerdem der Resistenzphänotyp 2MRGN NeoPäd für Bakterienstämme, die lediglich gegen zwei der definierten Antibiotikaklassen resistent sind. Fluorchinolone werden hier aufgrund der eingeschränkten Anwendbarkeit bei Kindern nicht berücksichtigt. Eine Ausnahmeregelung besteht für die Carbapenem-Resistenz: Ist eine Carbapenemase vorhanden, handelt es sich unabhängig von der weiteren Resistenzlage um 4MRGN-Bakterien. Die MRGN-Klassifikation der KRINKO gilt für Enterobakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* und den *Acinetobacter baumannii*-Komplex und umfasst somit einen Großteil der krankenhaushygienisch relevanten gramnegativen Stäbchenbakterien (KRINKO, 2012; Hamprecht und Göttig, 2018).

## 1.2 *Enterobacterales*

Bei der Ordnung der *Enterobacterales* aus der Abteilung der Proteobakterien handelt es sich um gramnegative Stäbchenbakterien, die keine Sporen bilden und fakultativ anaerob sind. Ein wesentlicher Bestandteil ihrer Pathogenität ist die Bildung von Endotoxin. Neben ihrer Rolle als Indikator für fäkale Verunreinigung kommt den Enterobakterien vor allem als Erreger nosokomialer, also im Krankenhaus erworbener Infektionen klinische Bedeutung zu.

Verschiedene Antigenstrukturen lassen eine serologische Differenzierung zwischen den Spezies und Serovaren innerhalb der *Enterobacterales* zu: Beim O-Antigen (Oberflächenantigen) handelt es sich um einen Bestandteil thermostabiler Lipopolysaccharide in der bakteriellen Zellwand, die bei Zerfall der Bakterien als Endotoxin freigesetzt werden und eine Immunreaktion provozieren. Das thermolabile Protein Flagellin, welches ein Bestandteil der bakteriellen Geißel ist, wird als H-Antigen (Geißelantigen) bezeichnet. Auch die Fimbrien, die die Adhärenz der Bakterien an befallene Zellen vermitteln, bestehen aus Proteinen, die das F-Antigen (Fimbrienantigen) darstellen. Die Kapsel, die manche Bakterienspezies auszeichnet, wird von Polysacchariden gebildet, die das K-Antigen ausmachen (Kapselantigen). Bei den OMP-Antigenen (*Outer Membrane Proteins*) schließlich handelt es sich um Porine in der Lipiddoppelschicht, deren äußere Domänen zum Teil eine Immunreaktion induzieren.

Klinische Relevanz bekommen die verschiedenen Antigenstrukturen durch epidemiologische Studien, die eine enge Assoziation bestimmter Serotypen und klinisch bedeutsamer Klone zeigen (Mora et al., 2011). Die serologische Unterscheidung der Antigenmuster lässt beispielsweise im Fall der Salmonellen eine Klassifikation in mehr als 2500 Serovare mithilfe des Kauffmann-White-Schemas zu.

### 1.2.1 *Escherichia coli*

#### 1.2.1.1 *Escherichia coli* allgemein

Bei Bakterien der Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*) handelt es sich wie bei allen *Enterobacterales* um gramnegative, sporenlose Stäbchenbakterien, die zudem eine peritriche Begeißelung aufweisen, wodurch ihnen Bewegung ermöglicht wird. Die Gattung *Escherichia* umfasst noch weitere Spezies (*E. fergusonii*,

*E. hermanii*, etc.), die nur selten aus menschlichen Materialien isoliert werden. Aufgrund ihrer Rolle als Bestandteil der Intestinalflora treten Bakterienstämme der Spezies *E. coli* häufig als Erreger von Infektionen des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes, beispielsweise durch Aufnahme fäkal verunreinigter Lebensmittel, sowie der Blutbahn auf. In der Europäischen Union (EU) stellt *E. coli* den häufigsten Erreger der bakteriellen Sepsis und von Harnwegsinfektionen dar (ECDC, 2018), außerdem ist die Spezies für viele nosokomiale Infektionen verantwortlich. Im Bereich der Trinkwasser- und Lebensmittelhygiene fungiert *E. coli* als Indikator für fäkale Verunreinigung. Von vergleichsweise harmlosen *E. coli*-Stämmen werden primär pathogene Subtypen wie enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) oder enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC) unterschieden.

Anhand des Reports des *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) zum Jahr 2017 (ECDC, 2018) lässt sich die vermehrte Resistenzentwicklung der Spezies erkennen: 58,2 % der Isolate, deren Analyseergebnisse dem EARS-Net für 2017 übermittelt wurden, waren gegen mindestens eine untersuchte Antibiotikaklasse (Fluorochinolone, Cephalosporine der dritten Generation, Aminoglykoside, Carbapeneme) resistent, wobei sich ein großer Teil der Resistenzmechanismen gegen Aminopenicilline richtete. 12,3 % der 2017 in Deutschland getesteten Isolate waren gegen Cephalosporine der dritten Generation resistent, hier lässt sich im Vergleich zu 2014 (10,5 %) ein leichter, wenn auch signifikanter Anstieg erkennen. Diese Anteile variieren innerhalb der EU, wobei vor allem in den südlichen und östlichen Regionen Europas höhere Resistenzraten ermittelt wurden. Eine Resistenz gegen Carbapeneme wiesen weniger als 0,1 % der in Deutschland getesteten Isolate auf (ECDC, 2018).

Ihren Ursprung haben neu erworbene Resistenzen in Mutationen und dem Erwerb mobiler genetischer Elemente. Beispiele für Resistenzmechanismen stellen Extended-Spectrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL) und Carbapenemasen dar. Die ESBL vermitteln Resistenzen gegen Penicilline, Cephalosporine und Monobactame und somit gegen einen Großteil der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, so dass Carbapeneme als eine der wenigen übrigen Therapieoptionen verbleiben. Die

Bedeutung der ESBL-bildenden Bakterienstämme zeigt sich auch in den Daten des EARS-Net von 2017 (ECDC, 2018): 87,4 % der getesteten, gegen Cephalosporine der dritten Generation resistenten Isolate waren ESBL-Bildner, ein Anteil, der in den letzten Jahren stabil geblieben ist. Die weite Verbreitung der ESBL-Bildner könnte mit zunehmendem Verbrauch von Carbapenemen einhergehen, was die Gefahr einer Selektion von Carbapenem-resistenten *Enterobacterales* (CRE) birgt. Carbapenem-Resistenz wird unter anderem durch Carbapenemasen vermittelt, durch sie werden bis auf wenige Ausnahmen alle verfügbaren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wirkungslos. Die Kodierung der Carbapenemasen erfolgt meist auf Plasmiden (ECDC, 2018).

Für das Erkennen und die genomische Surveillance von *E. coli*-Ausbrüchen hat sich die Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) bewährt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Ein weiterer Klassifikationsansatz für *E. coli*, der bereits in den 1940er Jahren begründet wurde, ist die O:H:K-Serotypisierung. Basierend auf einer Agglutinationsreaktion der Antigene mit spezifischen Antisera macht diese Methode sich die Variabilität der Oberflächenantigene innerhalb der Spezies zunutze und erlaubt so eine Differenzierung von Subtypen unterhalb des Spezieslevels. Da nur wenige Labors die Typisierung des K-Antigens durchführen, ist die O:H-Serotypisierung der aktuelle Goldstandard (Joensen et al., 2015; Fratamico et al., 2016).

#### 1.2.1.2 *Escherichia coli* MRGN

Wie auch die Daten des EARS-Net zeigen, ist die Prävalenz von Antibiotikaresistenzen bei *E. coli* in den letzten Jahren erheblich gestiegen, besonders in den südöstlichen Regionen der EU gibt es besorgniserregend hohe Resistenzraten (Coque et al., 2008; KRINKO, 2012; ECDC, 2018). 4,5 % der vom EARS-Net untersuchten *E. coli*-Isolate wiesen hierbei einen 3MRGN-Phänotyp auf, das 4MRGN-Resistenzmuster ist in dieser Publikation nicht näher aufgeschlüsselt (ECDC, 2018).

Die Verbreitung antibiotikaresistenter *E. coli*-Stämme erfolgt in erster Linie außerhalb des Krankenhauses über kontaminierte Lebensmittel, unzureichend aufbereitetes Trinkwasser, Haustiere oder von Mensch zu Mensch bei man-

gelnder Basishygiene (Warren et al., 2008; Ewers et al., 2010; Murphy et al., 2010; Askar et al., 2011; Dolejska et al., 2011; Hauri et al., 2011; Coleman et al., 2012; KRINKO, 2012). Die Reproduktionsrate in Krankenhäusern ist gering (Harris et al., 2007a; Harris et al., 2007b; Fankhauser et al., 2009; Willemsen et al., 2011; Kohlenberg et al., 2012; KRINKO, 2012). Eine reine Kolonisierung mit 3MRGN-*E. coli* verschlechtert den klinischen Verlauf nach bisherigen Erkenntnissen nicht, kommt es allerdings zu einer Infektion, erhöht sich die Mortalität im Vergleich zu sensiblen Stämmen (Schwaber und Carmeli, 2007; Ahmed et al., 2009; KRINKO, 2012). Ein bedeutender Risikofaktor für eine Besiedlung stellt eine Antibiotikatherapie dar, in Bezug auf 4MRGN-*E. coli* außerdem der Aufenthalt in Regionen mit erhöhter Prävalenz (Harris et al., 2007b; Hsieh et al., 2010; Kumarasamy et al., 2010; Rodriguez-Bano et al., 2010; Pfeifer et al., 2011; KRINKO, 2014). Für 3MRGN-*E. coli* im stationären Bereich empfiehlt die KRINKO eine Prävention lediglich in Risikoabteilungen mit verstärkt infektionsgefährdeten Patienten. Ein aktives Screening wird auch in der endemischen Situation nicht empfohlen, da es sich als ineffektiv erwiesen hat (Gardam et al., 2002; Willemsen et al., 2011; KRINKO, 2012). Für 4MRGN-*E. coli* wird wegen der stark eingeschränkten Therapiemöglichkeiten eine Prävention für jeden Bereich und ein Screening aller Risikopatienten empfohlen. Aktuell sind für *E. coli* mit 3MRGN- und 4MRGN-Profil noch keine erfolgsversprechenden Sanierungskonzepte etabliert (Buehlmann et al., 2011; KRINKO, 2012).

### 1.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

#### 1.2.2.1 *Klebsiella pneumoniae* allgemein

Bakterien der Gattung *Klebsiella* sind gramnegative sporenlöse Stäbchenbakterien aus der Ordnung der *Enterobacterales*, die als charakteristisches Merkmal eine Kapsel aufweisen. Klebsiellen sind fakultativ pathogen und typischerweise für nosokomiale Infektionen des Harntrakts, der unteren Atemwege sowie der Blutbahn verantwortlich. Innerhalb der Klebsiellen hat *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) als häufiger Erreger der bakteriellen Sepsis und der nosokomial erworbenen Pneumonie die größte Bedeutung inne (KRINKO, 2012; ECDC, 2018). Nach Informationen des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) von 2011, das Daten von auf Intensivstationen erworbenen

Neuinfektionen in mehr als 800 Krankenhäusern gesammelt hat, gehört *K. pneumoniae* zu den fünf häufigsten Erregern der beatmungsassoziierten Infektion der unteren Atemwege, der Zentralvenenkatheter-assoziierten Sepsis und der Harnblasenkatheter-assoziierten Harnwegsinfektion (Geffer und Gastmeier, 2011). Klebsiellen verfügen über eine intrinsische chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamase der Klasse A, die sie resistent gegenüber Aminopenicillinen und Benzylpenicillin macht. Schon diese natürliche Resistenz schränkt die Therapiemöglichkeiten bei einer Infektion ein, hinzu kommen häufig durch Plasmide erworbene Mehrfachresistenzen.

Nach den Daten des EARS-Net von 2017 ließen sich bei *K. pneumoniae* generell höhere Anteile von Multiresistenz als bei *E. coli* feststellen. 34,1 % der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate waren gegen mindestens eine getestete Antibiotikagruppe (Fluorochinolone, Cephalosporine der dritten Generation, Aminoglykoside und Carbapeneme) resistent. Dabei richtete sich ein Großteil der Resistenzen gegen Aminoglykoside, gefolgt von Cephalosporinen. Die Resistenzrate gegen Cephalosporine der dritten Generation in Deutschland betrug 14,7 %, wobei sich im Vergleich zu 2014 (12,7 %) ein leichter Anstieg abzeichnete. In einigen Regionen im Südosten der EU wurden Resistenzraten von bis zu 76,3 % ermittelt. Bei einem Großteil der resistenten Stämme konnte ESBL-Bildung nachgewiesen werden. Gegen Carbapeneme waren lediglich 0,5 % der in Deutschland getesteten Isolate resistent, im Gegensatz dazu stellt Griechenland mit einer Resistenzrate von 64,7 % ein Hochprävalenzgebiet dar. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass phänotypische Methoden die Prävalenz Carbapenemase-produzierender Stämme möglicherweise unterschätzen (ECDC, 2018).

Die Klassifikation der *K. pneumoniae*-Isolate unterhalb des Spezieslevels wird durch Serotypisierung ermöglicht. Die Methode basiert ähnlich der *E. coli*-Serotypisierung auf den Oberflächenantigenen O und K. H-Antigene existieren bei Klebsiellen nicht, da man bisher davon ausgeht, dass *K. pneumoniae* keine Flagellen besitzt (Novais et al., 2019).

#### 1.2.2.2 *Klebsiella pneumoniae* MRGN

Sowohl 3MRGN- als auch 4MRGN-Stämme der Spezies *K. pneumoniae* verbreiten sich in erster Linie nosokomial, die Reproduktionsraten sind allgemein eher gering (Kola et al., 2007; KRINKO, 2012). Im Rahmen eines Ausbruches kann es jedoch vereinzelt zu hohen Reproduktionsraten klonal identischer Stämme kommen (Vranic-Ladavac et al., 2010; Calbo et al., 2011). Exakte Daten zur Häufigkeit von MRGN-*Klebsiella spp.* sind in der Publikation des EARS-Net nicht aufgeschlüsselt, 15,5 % der getesteten *K. pneumoniae*-Isolate waren jedoch gegen drei der untersuchten Antibiotikaklassen resistent (ECDC, 2018). Die Übertragung erfolgt in der Regel von Mensch zu Mensch, allerdings ist auch die Übertragung über feuchte Habitate in unbelebter Umgebung, beispielsweise bei der Verwendung von Medizinprodukten, möglich (Carbonne et al., 2010; Robustillo Rodela et al., 2012; Snitkin et al., 2017). Bedeutende Risikofaktoren für eine Infektion mit MRGN-*Klebsiella spp.* stellen antibiotische Therapien in der Vorgeschichte und Krankenhausaufenthalte, besonders in Endemiegebieten und in Kombination mit invasiven Eingriffen, dar (Kassis-Chikhani et al., 2006; Tumbarello et al., 2006; Bogaerts et al., 2010; Liu et al., 2018). Die klinische Manifestationsrate, bezogen auf alle Patienten mit Nachweis eines Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae*-Stammes, betrug in Studien mit systematischer Surveillance bis zu 38,1 % (Lopez et al., 2011). Kommt es zu einer Infektion, ist der Krankheitsverlauf bei 4MRGN-Stämmen häufig schwerwiegender als bei 3MRGN-Stämmen (Schwaber und Carmeli, 2007; Ben-David et al., 2012). Für 3MRGN-*Klebsiella spp.* empfiehlt die KRINKO präventive Maßnahmen zum Schutz nicht-besiedelter Patienten lediglich in Risikobereichen, in denen eine erhöhte Infektionsgefahr besteht (KRINKO, 2012). Ein Screening für 3MRGN-*Klebsiella spp.* hat sich in der endemischen Situation jedoch als ineffektiv erwiesen (Gardam et al., 2002; Willemsen et al., 2011). Für 4MRGN-*Klebsiella spp.* werden aufgrund der stark reduzierten Therapiemöglichkeiten präventive Maßnahmen in allen Bereichen und ein Screening von Risikopatienten empfohlen. Erfolgsversprechende Sanierungskonzepte für *Klebsiella spp.* mit 3MRGN- und 4MRGN-Profil sind bislang nicht bekannt (KRINKO, 2012).

### 1.3 Surveillance und Typisierung

Die Surveillance, das heißt epidemiologische Überwachung, von Infektionskrankheiten dient deren systematischer Erfassung und Analyse sowohl auf Klinikenebene als auch in einem regionalen und überregionalen Kontext. Besonders nosokomiale Infektionen können, wie oben beschrieben, die Prognose der teilweise schwer erkrankten Klinikpatienten erheblich einschränken und die Dauer des Krankenhausaufenthalts sowie die entstehenden Kosten erhöhen. Invasive Maßnahmen, wie sie beispielsweise bei intensivmedizinisch versorgten Patienten oder Frühgeborenen eingesetzt werden, erhöhen das Infektionsrisiko ebenso wie Multimorbidität (Vincent et al., 1995). Kommt es zu gehäuftem Nachweisen eines Pathogens, gilt es, einen möglichen Ausbruch frühzeitig zu erkennen und entsprechende Eindämmungsmaßnahmen wie die Isolation der betroffenen Patienten oder flächendeckende Screenings, wie sie beispielsweise für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme in Krankenhäusern eingeführt wurden, zu beginnen. Hierbei ist es ausschlaggebend zu wissen, ob es tatsächlich zu einem Ausbruch einer nosokomialen Infektion gekommen ist oder lediglich eine Häufung ambulant erworbener Infektionen vorliegt. Hinweisend für ein Ausbruchsgeschehen kann eine genetische Verwandtschaft der Bakterienstämme verschiedener Patienten sein. Eine systematische Surveillance ermöglicht außerdem einen globalen Überblick über die Häufigkeitsverteilung verschiedener Erreger und die Wirksamkeit präventiver Maßnahmen.

Vor dem Hintergrund zunehmender nosokomialer Ausbrüche multiresistenter Erreger hat die Typisierung von Bakterienisolaten somit enorm an Bedeutung gewonnen. Nicht nur die Spezies, sondern vor allem die Stammzuordnung ist grundlegend, um Ausbrüche frühzeitig zu erkennen und Übertragungswege zu identifizieren. Hierbei ist eine Typisierungsmethode, die zuverlässig und schnell möglichst präzise Ergebnisse zu Verfügung stellt, ausschlaggebend. Einen Überblick über die Entwicklung und Charakteristika verschiedener Verfahren gibt ein Review-Artikel von 2019 (Novais et al., 2019): In den 1930er Jahren wurde die traditionelle Serotypisierung, die auf Agglutination spezifischer Antisera mit Polysacchariden auf der Zelloberfläche basiert, als phänotypische Methode zur Typisierung von Bakterienisolaten entwickelt. Mit der Entwicklung

der Genotypisierung in den späten 1970er Jahren gewannen Verfahren wie *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) für die Surveillance bakterieller Infektionen an Bedeutung. Techniken, die auf der Analyse des bakteriellen Genotyps basieren, sind auch heute noch der Goldstandard für die Typisierung von Bakterienstämmen. PFGE ist im Vergleich zu anderen genotypischen Verfahren eine robuste und weniger kostenintensive Methode, die dennoch über eine gute Trennschärfe verfügt. Dank der genannten Eigenschaften stellt PFGE den am häufigsten genutzten Ansatz für die Charakterisierung von Ausbruchsisolaten dar. Eine neuere genotypische Methode ist die Ganzgenomsequenzierung (*Whole Genome Sequencing*, WGS), die Variationen des gesamten Genoms darstellen kann und somit eine sehr viel höhere Auflösung als die genotypischen Vergleichsmethoden bietet (Sabat et al., 2013; Novais et al., 2019). In einem Review-Artikel von 2013 wird allerdings zu bedenken gegeben, dass die Umstände und jeweiligen Prioritäten bei der Wahl der Typisierungsmethode eine wichtige Rolle spielen (Sabat et al., 2013): Ist beispielsweise in einer akuten Ausbruchssituation primär die Geschwindigkeit des Typisierungsprozesses von Bedeutung, ist die Verwendung von auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierenden Methoden angebracht. Handelt es sich um eine auf viele geographische Standorte verteilte Entwicklung, werden tendenziell robustere Techniken wie PFGE bevorzugt. Hat dagegen die Eindeutigkeit einer Isolat-Charakterisierung Priorität, empfiehlt sich ein Verfahren mit hoher Auflösung wie die Ganzgenomsequenzierung (Sabat et al., 2013).

Während einige genotypische Methoden über ein gutes diskriminatorisches Potenzial verfügen und zuverlässig reproduzierbar sind, wird die routinemäßige Durchführung vieler Verfahren durch die Entstehung vergleichsweise hoher Kosten und den erheblichen Zeitaufwand erschwert. Als Alternative zur Genotypisierung haben sich spektroskopische Methoden hervorgetan, die sich in ihrer einfachen Handhabung und dem geringen Zeit- und Kostenaufwand von genotypischen Verfahren unterscheiden. Wegen ihrer guten diskriminatorischen Fähigkeiten hat sich in den letzten Jahren vor allem die Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie etabliert (Novais et al., 2019).

## 1.4 Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

### 1.4.1 Prinzip der FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-Spektroskopie wird eingesetzt, um die Zusammensetzung verschiedenster Probenmaterialien zu identifizieren. Das Verfahren basiert auf Absorption von Infrarotstrahlen durch eine Probe, in diesem Fall durch die Moleküle der Bakterienzelle. Das FTIR-Spektrum wird also maßgeblich durch den bakteriellen Phänotyp bestimmt. Die durch die Strahlung ausgelösten Schwingungen der Moleküle erzeugen ein spezifisches FTIR-Spektrum, welches die chemische Struktur der gesamten Zelle repräsentiert. Üblicherweise liegt die Wellenzahl zwischen  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  und somit im mittleren Infrarotbereich des elektromagnetischen Spektrums. Da jede funktionelle Gruppe Infrarotstrahlen in einem spezifischen Wellenzahlbereich absorbiert, lässt sich jeder Molekül- oder Stoffgruppe (Proteine und Peptide, Polysaccharide, Lipide, Nukleinsäuren) ein charakteristisches spektrales Fenster zuordnen. Die Eigenschaften dieser Fenster sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die gemischte Region und die den Polysacchariden zugeordnete Region lassen hierbei die präziseste Diskrimination von Bakterienstämmen zu (Helm et al., 1991b).

Tabelle 1: Eigenschaften der spektralen Fenster (Helm et al., 1991b).

Spektrales Fenster	Region	Wellenzahl (cm <sup>-1</sup> )	Repräsentierte Bestandteile
W <sub>1</sub>	Fettsäuren-Region I	3000-2800	-CH <sub>3</sub> >CH <sub>2</sub> ≡CH Lipide
W <sub>2</sub>	Amid-Region	1800-1500	Carboxyl-, Carbonyl-, Keto- gruppen Proteine, Peptide
W <sub>3</sub>	Gemischte Region	1500-1200	Proteine, Fettsäuren, Phosphatgruppen
W <sub>31</sub>	Fettsäuren-Region II	1500-1400	-CH <sub>3</sub> >CH <sub>2</sub> Lipide
W <sub>4</sub>	Polysaccharid-Region	1200-900	Polysaccharide
W <sub>5</sub>	<i>Fingerprint</i> -Region	900-700	Nicht auf zelluläre Bestandteile bezogen

#### 1.4.2 FTIR-Spektroskopie als Typisierungsmethode

Nachdem bereits in den 1950er Jahren die ersten Experimente zur Anwendung von Infrarotspektroskopie für die Typisierung von Mikroorganismen durchgeführt wurden (Goulden und Sharpe, 1958), etablierten Naumann und Mitarbeiter die Technik in den 1990er Jahren für die mikrobiologische Verwendung (Helm et al., 1991b; Naumann et al., 1991). In den folgenden Jahrzehnten wurde die Methode im Rahmen vielfältiger Studien weiterentwickelt und auf verschiedene taxonomische Ränge bis hin zur Stammdifferenzierung angewandt. Allerdings konnte erst in den letzten Jahren nachvollzogen werden, dass spezifische Oberflächenstrukturen der Bakterienstämme für die intraspezifische Variabilität von FTIR-Spektren verantwortlich sind (Novais et al., 2019).

Da die FTIR-Spektroskopie mit vollständig erhaltenen Zellen arbeitet und somit eine nicht-destruktive Technik darstellt, geht die Vorbereitung der Bakterien mit

minimalem Aufwand einher. Es muss lediglich eine Bakterienkultur auf einem festen Nährboden oder in Flüssigkeit hergestellt werden. Verschiedene Versuchsanordnungen haben gezeigt, dass Variationen der Inkubationszeit bis vier Stunden und die Verwendung verschiedener, nicht-selektiver Nährböden die Reproduzierbarkeit nicht signifikant verschlechtern (Helm et al., 1991a; Lefier et al., 1997; Wenning et al., 2014). Darüber hinausgehende Veränderungen bergen allerdings die Gefahr, einen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung der Zelle und somit auf das FTIR-Spektrum zu haben (Helm et al., 1991b; van der Mei et al., 1996; Grunert et al., 2013).

Einen Überblick über die bisher durchgeführten Studien zur FTIR-Spektroskopie bei verschiedensten Spezies gibt ein Review-Artikel aus dem Jahr 2019 (Novais et al., 2019). Die Anwendung der FTIR-Spektroskopie zur Differenzierung von *E. coli*-Stämmen auf Subspezies-Ebene wurde in einer Vielzahl von Studien belegt, von denen hier einige aktuellere Beispiele genannt sind: Bei der erfolgreichen Subtypisierung von *E. coli* O157:H7-Stämmen durch FTIR-Spektroskopie konnte im Vergleich mit PFGE eine verbesserte Trennschärfe von FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Davis et al., 2012). 2013 konnten bestimmte *E. coli*-Isolate der phylogenetischen Gruppen B2 und D, u.a. ST131-Klone, mittels FTIR-Spektroskopie verlässlich differenziert werden (Sousa et al., 2013). Bei der Analyse uropathogener *E. coli*-Isolate verschiedener Sequenztypen (u.a. ST131) mittels FTIR-Spektroskopie und *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA) hing der Erfolg der FTIR-Typisierung stark vom jeweiligen Sequenztyp ab (Dawson et al., 2014).

Die Anwendung der FTIR-Spektroskopie auf Bakterien der Spezies *Klebsiella* wurde beispielsweise in den folgenden Publikationen evaluiert: Bei der Typisierung klinischer *Klebsiella*-Stämme auf Subspezies-Ebene zeigte die FTIR-Spektroskopie eine hohe Übereinstimmung mit WGS (Dinkelacker et al., 2018). Die genotypische Typisierung Carbapenem-resistenter *K. pneumoniae*-Isolate konnte mithilfe der FTIR-Spektroskopie und Hauptkomponentenanalyse (PCA) bzw. PLS-DA vollkommen reproduziert werden (Silva et al., 2016). In einer Studie von 2006 konnten gramnegative Isolate (u.a. *Klebsiella spp.*) mithilfe von

FTIR-Spektroskopie und hierarchischer Clusteranalyse (HCA) mit geringerem Erfolg typisiert werden als grampositive Isolate (Sandt et al., 2006).

Ein Review-Artikel von 2019 stellt folgende Vorzüge der FTIR-Spektroskopie zusammen (Novais et al., 2019): Aufgrund der nicht-destruktiven Herangehensweise ist nur eine kurze Vorbereitungszeit nötig, man benötigt nur wenige Chemikalien und lediglich eine geringe Probenmenge. Die Verfügbarkeit semi-automatisierter Verfahren reduziert den Arbeitsaufwand im Gegensatz zu Methoden wie WGS. Zusätzlich ermöglicht die Methode einen hohen Durchsatz, ist wesentlich kostengünstiger als genotypische Typisierungsmethoden und einfach in der Durchführung, was sie zukünftig für die Routineanwendung attraktiv machen könnte. Im Vergleich zur Ganzgenomsequenzierung ist die Trennschärfe der FTIR-Spektroskopie nach Meinung der Autorinnen geringfügig reduziert. Da es sich um eine phänotypische Methode handelt, besteht eine Korrelation zwischen den FTIR-Spektren und den Oberflächenantigenen der bakteriellen Zellwand, so dass der Bezug zu Pathogen-Wirt-Interaktionen des Bakteriums hergestellt werden kann (Novais et al., 2019).

Während diese Eigenschaften die FTIR-Spektroskopie zu einer geeigneten Methode für die Bakterientypisierung machen könnten, weist die Technik noch einige Einschränkungen auf, die bisher eine Etablierung in der diagnostischen Routine verhindern: In einem Review-Artikel aus dem Jahr 2018 wird erläutert, dass standardisierte Protokolle verfügbar sein müssen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen und die Vergleichbarkeit von in verschiedenen Laboren durchgeführten Analysen zu gewährleisten (Quintelas et al., 2018). Auch die Etablierung internationaler Referenzdatenbanken ist essenziell für die breite Anwendung von FTIR-Spektroskopie. Weiterhin wird betont, dass FTIR-Spektroskopie die intrinsische Variabilität von Klonen bisher nicht miteinbezieht. Diese offenen Fragen veranlassen die Autorinnen und Autoren zu der Annahme, dass die FTIR-Spektroskopie zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht für Routineanalysen geeignet ist (Quintelas et al., 2018).

### 1.5 Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Genotypische Methoden machen sich unterschiedliche Merkmale der bakteriellen Genomsequenz zunutze, um Bakterienstämme zu differenzieren. Die MLST ist eine mögliche Herangehensweise bei der Genom-Analyse. Der traditionelle Ansatz der MLST, der in dieser Studie angewandt wurde, beinhaltet die Amplifizierung und Sequenzierung mindestens sieben verschiedener Genloci. Bei den ausgewählten Loci handelt es sich um hochkonservierte Regionen von *Housekeeping*-Genen, die konstitutiv exprimiert werden und am zentralen Stoffwechsel beteiligt sind. Trotz der zentralen Bedeutung weisen diese Regionen eine gewisse genetische Variabilität auf, die die Einteilung in sogenannte Sequenztypen ermöglicht. Eine höhere Trennschärfe kann mit einer auf WGS-Daten basierenden wgMLST-Analyse (*Whole Genome MLST*) oder einer auf dem *Core Genome* basierenden cgMLST-Analyse (*Core Genome MLST*) erreicht werden. Ein *Core Genome* umfasst orthologe, d.h. auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehende Sequenzen, die Bestandteil aller untersuchten Genome sind (Jagadeesan et al., 2019). Review-Artikel von 2013 und 2019 befassen sich mit den Charakteristika der MLST-Analyse (Sabat et al., 2013; Novais et al., 2019). Das Vorliegen vollständig standardisierter Protokolle für viele Spezies und großer Datenbanken (zum Beispiel <http://pubmlst.org>) machen die MLST-Analyse zu einer robusten Methode, die beispielsweise gut für die Surveillance von Klonen, die sich großräumig ausbreiten oder durch Lebensmittel übertragen werden, geeignet ist. Die Trennschärfe einer MLST-Analyse ist durch den kleinen Anteil des Genoms, der sequenziert wird, eher gering. Für eine präzisere Überwachung und Charakterisierung von Ausbruchsisolaten sind Methoden mit höherer Auflösung geeigneter (Sabat et al., 2013; Novais et al., 2019). In einer Publikation von 2016 wird zu bedenken gegeben, dass sich genetische Mutationen in *Housekeeping*-Genen nur langsam anhäufen, wodurch sich MLST eher für die Beurteilung von Langzeitentwicklungen empfiehlt. Wie alle genotypischen Methoden geht MLST außerdem mit einer aufwendigen, zeitintensiven Durchführung und hohen Kosten einher (Dieckmann et al., 2016).

### 1.5.1 MLST bei *Escherichia coli*

In einem Artikel von 2015 wurden diverse verfügbare MLST-Typisierungsschemata für *E. coli* zusammengestellt. Die drei bedeutendsten MLST-Datenbanken für *E. coli* beruhen auf der Analyse von sieben bzw. acht *Housekeeping*-Genen, die in Tabelle 2 zusammengestellt sind (Clermont et al., 2015). Die Diversität der typisierten Genloci ist am höchsten für das Typisierungsschema des Pasteur-Institutes, gefolgt von dem Schema der Michigan State University (Kaas et al., 2012). In dieser Studie wurde das Schema der Warwick Medical School verwendet.

Tabelle 2: Übersicht über MLST-Datenbanken (modifiziert nach Clermont et al., 2015).

Datenbank	Gene	Website
Michigan State University (St7-Schema)	aspC, clpX, fadD, icd, lysP, mdh, uidA	<a href="http://shigatox.net/new/#">http://shigatox.net/new/#</a>
Warwick Medical School	adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA	<a href="http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli">http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli</a>
Pasteur-Institut	dinB, icd, pabB, polB, putP, trpA, trpB, uidA	<a href="https://bigsdbs.pasteur.fr/ecoli/">https://bigsdbs.pasteur.fr/ecoli/</a>

Die Häufigkeitsverteilung der Sequenztypen von *E. coli* wurde beispielsweise in einer Publikation aus dem Jahr 2017 untersucht: Hier wurden die Sequenztypen ESBL-produzierender *E. coli*-Isolate aus verschiedenen Populationen in Deutschland (u.a. aus Krankenhäusern und Arztpraxen) ermittelt und festgestellt, dass ST131 in allen Populationen der dominierende Sequenztyp ist. Auch bei ST410, ST10 und ST38 handelte es sich um vergleichsweise häufige Sequenztypen (Pietsch et al., 2017).

### 1.6 Ganzgenomsequenzierung

Moderne Sequenzierungsansätze, die unter dem Begriff *Next Generation Sequencing* (NGS) zusammengefasst werden, sind in der Lage, Millionen von DNS-Fragmenten im Hochdurchsatzverfahren simultan zu sequenzieren. Das ermöglicht beispielsweise die Sequenzierung eines kompletten menschlichen Genoms innerhalb weniger Tage, während die traditionelle Sequenzierung nach

Sanger über zehn Jahre für eine derartige Analyse benötigen würde. Eine Anwendungsmöglichkeit der NGS-Methode ist die Ganzgenomsequenzierung bakterieller Isolate (*Whole Genome Sequencing*, WGS). WGS umfasst die nahezu vollständige Sequenzierung des Genoms, inklusive nicht-kodierender Regionen, wodurch besonders umfangreiche und detaillierte Analyseergebnisse erzielt werden. Während andere Sequenzierungsmethoden lediglich einzelne Aspekte des bakteriellen Genoms betrachten können, verbindet WGS verschiedene Ansätze und liefert essenzielle Informationen für ein effektives Ausbruchmanagement, ohne auf Spezies-abhängige Protokolle angewiesen zu sein.

Für die Sequenzierung mit Brückensynthese (Illumina-Technologie) wird die DNS in unzählige Fragmente aufgespalten, die aufgetrennt und parallel analysiert werden. Die Fragmente werden hierfür zunächst mit Adapter-DNS-Sequenzen verbunden und vervielfältigt. Die Fragmente werden in einer Flusszelle aufgetrennt, indem sich die Adaptersequenzen an komplementäre Oligonukleotide auf der Flusszelle anlagern. Es folgt eine klonale Vervielfältigung über Brückenamplifikation: Durch Zugabe von Nukleotiden und Polymerasen werden die Fragmente in mehreren Zyklen zu doppelsträngigen Brücken ergänzt und durch Denaturierung in einzeln stehende Stränge gespalten. Hierbei entstehen in den jeweiligen Bereichen der Flusszelle Cluster einer bestimmten Sequenz, die durch Zugabe verschiedenfarbig fluoreszierender Kettenabbruchsubstrate in Echtzeit ermittelt werden kann. Dieses Vorgehen nennt sich *Sequencing by Synthesis* (Bentley et al., 2008; Bronner et al., 2014). Die Sequenz des gesamten Genoms wird dann entweder als *de novo*-Assemblierung oder durch den Vergleich mit bereits sequenzierten Referenzgenomen ermittelt (Sabat et al., 2013).

Mehrere Publikationen der letzten Jahre beschäftigen sich mit Charakteristika und Verwendungsmöglichkeiten von WGS in der Mikrobiologie (Sabat et al., 2013; Dieckmann et al., 2016; Quainoo et al., 2017; Tagini und Greub, 2017; Rossen et al., 2018): Maßgebliche Vorteile der WGS sind die ausgezeichnete Trennschärfe und die erreichbare Auflösung, die eine Differenzierung bis zur Ebene von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphism*,

SNP) erlaubt. Die große Menge an verfügbaren genetischen Informationen qualifiziert WGS für viele Anwendungen: Besonders gut geeignet ist die Methode für die Typisierung und Analyse von Ausbrüchen, wobei die Klassifikation entweder SNP-basiert oder MLST-basiert erfolgen kann. Aus der bakteriellen Genomsequenz lassen sich also sowohl MLST-Daten generieren (durch Betrachtung der *Housekeeping*-Gene) als auch ein SNP-Profil erstellen. Es ist außerdem möglich, durch Sequenzierung auf die Präsenz von antimikrobiellen Resistenzgenen oder Virulenzgenen zu schließen. Auf diesem Weg können beispielsweise Resistenz- oder Virulenzgene identifiziert werden, die lediglich während der Infektion exprimiert werden und dadurch in der Routinediagnostik durch Analyse des Phänotyps nicht auffallen (Sabat et al., 2013; Dieckmann et al., 2016; Quainoo et al., 2017; Tagini und Greub, 2017; Rossen et al., 2018).

In der Forschung ist WGS als sehr umfassendes Verfahren bereits etabliert, für die Verwendung in der Routinediagnostik ist der Zeit- und Kostenaufwand jedoch noch deutlich zu hoch. Solange keine standardisierten Protokolle vorliegen und WGS nicht automatisiert abläuft, erschwert zudem die Komplexität der Verfahren die Anwendung. In einem Review-Artikel von 2018 wird die Etablierung von Typisierungs-Schemata, externen Qualitätskontrollen sowie bioinformatischen Pipelines empfohlen, um die Durchführung zu vereinfachen und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (Rossen et al., 2018). Eine schnelle Auswertung großer Datenmengen ist derzeit noch aufwendig, würde jedoch durch Etablierung einer weltweiten Referenzdatenbank vereinfacht werden. In einem weiteren Review-Artikel von 2013 wird zu bedenken gegeben, dass lediglich 90 % des bakteriellen Genoms mittels WGS analysiert werden (Sabat et al., 2013). Bei den übrigen Abschnitten handelt es sich um Minisatelliten (*Variable Number Tandem Repeats*, VNTR), deren Anzahl an Wiederholungen individuell ist und den genetischen Fingerabdruck darstellt. Ein Einschluss der VNTR in die Auswertung wäre mithilfe größerer Plattformen, die die Sequenzierung längerer DNS-Fragmente bewältigen, möglich (Sabat et al., 2013; Quainoo et al., 2017; Tagini und Greub, 2017; Rossen et al., 2018).

### 1.7 *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)-Analyse

Die Typisierungsmethode mit dem aktuell höchsten Auflösungsvermögen ist die Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Bei diesen SNPs handelt es sich um sehr häufige, erbliche Punktmutationen, die sich in gewissem Maße in einem Genpool etabliert haben. Sie sind ungleichmäßig in kodierenden und nicht-kodierenden DNS-Abschnitten verteilt und weisen eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Isolaten auf, was die Typisierung innerhalb einer Spezies ermöglicht. Als Grundlage für die SNP-Analyse können ebenso wie bei der MLST-Analyse entweder WGS-Daten oder ein *Core Genome* dienen. Bei der Analyse werden die Fragmente der Isolat-DNS mit einem Referenzgenom verglichen und die Anzahl der SNPs als Indikator für das Verwandtschaftsverhältnis der Genome verwendet (Schürch et al., 2018; Jagadeesan et al., 2019). Im Fall eines Ausbruchs kann eines der Probeisolate assembliert werden und als Referenz für die Analyse der anderen Ausbruchs isolate dienen, da die Ausbruchsstämme in den meisten Fällen eng verwandt sind (Haley et al., 2016; van der Graaf-van Bloois et al., 2016). Mithilfe eines *Cut-off*-Wertes wird festgelegt, um wie viele SNPs sich Isolatgenome innerhalb eines Clusters maximal unterscheiden dürfen. Die Wahl des *Cut-off*-Wertes hängt von verschiedenen Faktoren wie der Fragestellung, der epidemiologischen Situation und der Sequenzierungsmethode ab und sollte gemäß einem Review-Artikel von 2019 auch innerhalb einer Spezies nicht generalisiert werden (Jagadeesan et al., 2019). Bei der WGS-Analyse von *E. coli*-Isolaten wurde in einer Publikation von 2017 eine Differenz von zehn SNPs als *Cut-off*-Wert für die Definition eines nationalen Ausbruchs festgelegt (Roer et al., 2017). In einer weiteren Arbeit wurde eine Differenz von weniger als 21 SNPs als grobe Richtlinie für eine enge Verwandtschaft angegeben und empfohlen, neben den SNP-Differenzen zusätzlich die Topologie des phylogenetischen Baumes miteinzubeziehen (Pightling et al., 2018).

Die Anwendung der SNP-Analyse wird durch etablierte Pipelines für die Auswertung und die zunehmende Entwicklung benutzerfreundlicher Software vereinfacht. Durch diverse verfügbare Analyseinstrumente und die Verwendung verschiedener Referenzgenome lassen sich die Typisierungsergebnisse allerdings noch nicht einheitlich reproduzieren. Die Methode ist im Gegensatz zur

MLST-Analyse weniger robust, zeichnet sich jedoch durch eine höhere Sensitivität aus (Schürch et al., 2018; Jagadeesan et al., 2019).

## 1.8 Fragestellung

Die Zielsetzung dieser Dissertation war es, die FTIR-Spektroskopie als Methode zur Typisierung von Bakterienstämmen im Kontext der Transmissionssurveillance zu evaluieren. Als Probeisolate wurden MRGN-Stämme der Spezies *E. coli* und *K. pneumoniae* verwendet, denen aufgrund ihrer zunehmenden Verbreitung und prekären Resistenzsituation hohe klinische Relevanz zukommt. Die Typisierung der Stämme auf Basis der FTIR-Spektroskopie wurde mit WGS-basierter Typisierung verglichen und die FTIR-Spektren hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit beurteilt. Zusätzlich wurde untersucht, inwiefern Variationen des Nährmediums oder der Inkubationszeit die Reproduzierbarkeit der Spektren beeinflussen. Anhand dieser Faktoren wurde die Eignung der FTIR-Spektroskopie für die Surveillance von Übertragungen und Ausbrüchen multiresistenter Erreger beurteilt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Isolate

Tabelle 3: Übersicht über verwendete *E. coli*-Isolate (MRGN = multiresistente gramnegative Bakterien). Ergänzend sind die für die Untersuchung der Spektren bei Variation des Nährmediums und der Inkubationszeit verwendeten Isolate markiert.

Stamm	ID			MRGN-Phänotyp	Variation des Nährmediums	Variation der Inkubationszeit		
	Isolat	Patient	Station			1	2	3
MRGN4612	1	1	2	3MRGN	x			
MRGN4617	2	2	11	3MRGN	x			
MRGN4622-1	3	3	16	3MRGN	x			
MRGN4622-2	4	3	16	3MRGN	x			
MRGN4633	5	4	16	3MRGN	x			
MRGN4651	6	5	19	3MRGN	x			
MRGN4652	7	6	19	3MRGN	x			
MRGN4657-1	8	7	2	3MRGN	x			
MRGN4657-2	9	7	2	3MRGN	x			
MRGN4666	10	8	2	3MRGN	x			
MRGN4669	11	9	16	3MRGN	x			
MRGN4677	12	10	1	3MRGN	x			
MRGN4678	13	11	1	3MRGN	x			
MRGN4695	14	12	2	3MRGN	x			
MRGN4707	15	13	8	3MRGN	x			
MRGN4717	16	14	4	3MRGN	x			
MRGN4726	17	15	28	3MRGN	x			
MRGN4744	18	16	1	3MRGN	x			
MRGN4758	19	17	21	3MRGN	x			
MRGN4759	20	18	15	3MRGN	x			

<sup>1</sup> 6, 8, 24 h auf Brain-Heart-Infusion-Agar; 8, 24 h auf Columbia-Agar

<sup>2</sup> 16, 18, 20, 22, 24, 26 h auf Columbia-Agar

<sup>3</sup> 24, 48, 72 h auf Columbia-Agar

Stamm	ID			MRGN- Phänotyp	Variation des Nähr- mediums	Variation der Inku- bationszeit		
	Isolat	Patient	Station			1	2	3
MRGN4772	21	19	1	3MRGN	x			
MRGN4778	22	20	27	3MRGN	x			
MRGN4783	23	21	1	3MRGN				
MRGN4790	24	22	20	3MRGN				
MRGN4794	25	23	16	3MRGN				
MRGN4800	27	24	15	3MRGN				
MRGN4803	26	25	20	3MRGN				
MRGN4810	28	26	16	3MRGN				
MRGN4823	29	27	10	3MRGN				
MRGN4834	30	28	16	3MRGN				
MRGN4839	31	29	9	3MRGN				
MRGN4849	32	30	26	3MRGN				
MRGN4854	33	31	16	3MRGN				
MRGN4884	34	32	16	3MRGN				
MRGN4892	35	33	16	3MRGN				
MRGN4898	36	34	16	3MRGN				
MRGN4906	37	35	6	3MRGN				
MRGN4918	38	36	16	3MRGN				
MRGN4931-1	39	37	15	3MRGN				
MRGN4931-2	40	37	15	3MRGN				
MRGN4932	41	38	16	3MRGN				
MRGN4943-1	43	39	16	3MRGN				
MRGN4943-2	42	39	16	3MRGN				
MRGN4952	44	40	15	3MRGN				
MRGN4966	45	41	12	3MRGN				
MRGN4972	46	42	16	3MRGN				
MRGN4993	47	43	2	3MRGN				
MRGN5030	48	44	23	3MRGN				
MRGN5033	49	45	24	3MRGN				
MRGN5040	50	46	24	3MRGN				

Stamm	ID			MRGN- Phänotyp	Variation des Nähr- mediums	Variation der Inku- bationszeit		
	Isolat	Patient	Station			1	2	3
MRGN5053	51	51	22	3MRGN				
MRGN5066	52	47	16	3MRGN				
MRGN5072	53	48	16	3MRGN				
MRGN5076	54	49	16	3MRGN				
MRGN5086	55	50	24	3MRGN				
MRGN5096	56	46	24	3MRGN				
MRGN5100	58	52	16	3MRGN				
MRGN5106	59	53	16	3MRGN				
MRGN5109	57	54	1	3MRGN				
MRGN5115	60	55	15	3MRGN				
MRGN5136	61	56	15	3MRGN				
MRGN5138	62	57	16	3MRGN				
MRGN5147	63	58	15	3MRGN				
MRGN5162	64	59	2	3MRGN				
MRGN5163	65	60	13	3MRGN				
MRGN5164	66	61	8	3MRGN				
MRGN5165	67	62	15	3MRGN				
MRGN5180	68	63	16	3MRGN				
MRGN5193	69	64	3	3MRGN				
MRGN5198	70	65	12	3MRGN				
MRGN5200	71	66	16	3MRGN				
MRGN5211	72	67	2	3MRGN				
MRGN5220	73	68	2	3MRGN				
MRGN5225	74	69	16	3MRGN				
MRGN5228	75	70	2	3MRGN				
MRGN5229	76	71	16	3MRGN				
MRGN5231	77	70	1	3MRGN				
MRGN5239	78	72	15	3MRGN				
MRGN5241	80	73	16	3MRGN				
MRGN5250	79	74	16	3MRGN				

Stamm	ID			MRGN- Phänotyp	Variation des Nähr- mediums	Variation der Inku- bationszeit		
	Isolat	Patient	Station			1	2	3
MRGN5257	81	75	15	3MRGN				
MRGN5262	82	76	1	3MRGN				
MRGN5265	83	77	15	3MRGN				
MRGN5266	84	78	5	3MRGN				
MRGN5287	85	79	5	3MRGN				
MRGN5300	86	80	15	3MRGN				
MRGN5312	87	81	4	3MRGN				
MRGN5344	88	82	2	3MRGN				
MRGN5350	89	83	18	3MRGN				
MRGN5353	90	84	7	3MRGN				
MRGN5356	91	85	18	3MRGN				
MRGN5368	92	86	28	3MRGN				
MRGN5370	93	87	15	3MRGN				
MRGN5378	95	88	15	3MRGN				
MRGN5379	94	89	22	3MRGN				
MRGN5412	96	90	2	3MRGN				
MRGN5426-1	97	91	2	3MRGN				
MRGN5426-2	98	91	2	3MRGN				
MRGN5447	99	91	2	3MRGN				
MRGN5462	100	92	14	3MRGN				
MRGN5464	102	93	25	3MRGN				
MRGN5465	101	94	17	3MRGN				x
MRGN5477	103	95	15	3MRGN				x
MRGN5481	104	96	15	3MRGN				x
MRGN5482	105	97	15	3MRGN		x		x
MRGN5487	107	98	15	3MRGN		x	x	x
MRGN5491	106	99	19	2MRGN NeoPäd				
MRGN5508	109	100	14	3MRGN		x	x	x

Stamm	ID			MRGN-Phänotyp	Variation des Nährmediums	Variation der Inkubationszeit		
	Isolat	Patient	Station			1	2	3
MRGN5509	108	101	19	2MRGN NeoPäd		x	x	x

Tabelle 4: Übersicht über verwendete *K. pneumoniae*-Isolate (MRGN = multiresistente gramnegative Bakterien).

Stamm	ID			MRGN-Phänotyp
	Isolat	Patient	Station	
BK8783	1	01	1	3MRGN
MRGN3945	2	02	3	3MRGN
MRGN3953	3	03	3	3MRGN
MRGN4228	4	04	4	3MRGN
MRGN4302	5	05	2	3MRGN
MRGN4345	7	06	4	3MRGN
MRGN4357	6	07	2	3MRGN
MRGN4359	8	08	4	3MRGN
MRGN4486	9	09	7	2MRGN NeoPäd
MRGN4487	10	10	7	2MRGN NeoPäd
MRGN4488	11	11	7	2MRGN NeoPäd
MRGN4510	12	12	6	2MRGN NeoPäd
MRGN4515	13	13	5	2MRGN NeoPäd
MRGN4527	14	14	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5023	15	15	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5024	16	16	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5071	17	17	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5103	18	18	6	2MRGN NeoPäd
MRGN5160	19	19	6	2MRGN NeoPäd
MRGN5187	20	20	8	2MRGN NeoPäd
MRGN5223	21	21	8	2MRGN NeoPäd
MRGN5251	22	22	4	3MRGN

Stamm	ID			MRGN-Phänotyp
	Isolat	Patient	Station	
MRGN5255	23	23	4	3MRGN
MRGN5272	24	24	4	3MRGN
MRGN5280	25	25	5	2MRGN NeoPäd
MRGN5289	26	26	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5308	27	27	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5311	28	28	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5323	29	29	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5331	30	27	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5352	31	30	7	2MRGN NeoPäd
MRGN5363	32	31	4	3MRGN
MRGN5383	33	32	4	3MRGN
MRGN5396	34	33	4	3MRGN

### 2.1.2 Nährmedien

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Nährmedien.

Nährmedium	Hersteller
Columbia-Agar (Blutagar) mit Schafsblut Plus	Oxoid
Müller-Hinton-Agar	
Brain-Heart-Infusion-Agar	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen
CLED-Agar	
Endo-Agar	
MacConkey-Agar	

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
DNeasy® UltraClean® Microbial Kit	QIAGEN
Qubit® double-stranded DNA (dsDNA) BR Assay Kit	Invitrogen
TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit	Illumina
TruSeq DNA CD Indexes Kit	Illumina
NextSeq 500/550 Kit	Illumina
Qubit® Assay Tube	Invitrogen
PhiX Control v3	Illumina
Microbanks™	Fisher Scientific
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf
Falcon™ 50 ml, konische Zentrifugenröhrchen	Fisher Scientific

Tabelle 7: Übersicht über Bestandteile der verwendeten Kits.

Kit	Bestandteile
Dneasy® UltraClean® Microbial Kit	Collection Tube 2 ml PowerBead Solution PowerBead Tube Solution SL Solution IRS Solution SB MB Spin Column Solution EB
Qubit® double-stranded DNA (dsDNA) BR Assay Kit	Qubit® dsDNA BR Reagent Qubit® dsDNA BR Buffer Qubit® dsDNA BR Standard #1 bzw. #2

TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit	Resuspension Buffer Sample Purification Beads End Repair Mix 2 A-Tailing Mix Ligation Mix 2 Stop Ligation Buffer PCR Primer Cocktail Enhanced PCR Mix
TruSeq DNA CD Indexes Kit	DNA Adapter Plate
NextSeq 500/550 Kit	HT1 Hybridization Buffer Reagent Cartridge Buffer Cartridge Flow Cell

#### 2.1.4 Geräte

Tabelle 8: Übersicht über verwendete Analysegeräte.

Produkt	Hersteller
IR Biotyper <sup>®</sup>	Bruker Daltonics
MALDI Biotyper <sup>®</sup> CA System	Bruker Daltonics
Qubit <sup>®</sup> 2.0 Fluorometer	Invitrogen
M220 Focused-Ultrasonicator	Covaris
QIAxcel Advanced System	QIAGEN
Illumina <sup>®</sup> NextSeq <sup>™</sup> 500	Illumina
Reax top Vortexgerät	Heidolph Instruments
Zentrifuge	Eppendorf AG
Thermocycler Biometra TRIO	Analytik Jena AG

## 2.1.5 Software

Tabelle 9: Übersicht über verwendete Analyse-Software.

Produkt	Hersteller
MALDI Biotyper® System	Bruker Daltonics
IR Biotyper® Software (Version 1.5.0.90)	Bruker Daltonics
OPUS Spektroskopiesoftware (Version 7.5)	Bruker Daltonics
BioNumerics (Version 7.6)	Applied Maths
NextSeq System Suite (v2.2.0)	Illumina
A5-Miseq Pipeline (Version 20140604)	Andrew Tritt, Aaron Darling
SPAdes (Version 3.7.0)	Center for Algorithmic Biotechnology, Universität St. Petersburg (Bankevich et al., 2012)
JSpecies Web Server (Version 1.2)	Ribocon (Richter et al., 2016)
Spine (Version 0.1.2)	(Ozer et al., 2014)
PHASTER	(Arndt et al., 2016)
Trimmomatic (Version 0.35)	(Bolger et al., 2014)
MLST-Server des Center for Genomic Epidemiology (CGE) Schema: <i>Escherichia coli</i> #1	(Wirth et al., 2006)
Comparing Partitions	(Carrico et al., 2006)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studiendesign und Ethik

Bei dieser Studie handelt es sich um eine rein retrospektive Auswertung. Die verwendeten Bakterienisolate wurden im Rahmen der mikrobiologischen Routinediagnostik entsprechend der im Infektionsschutzgesetz (§ 23) vorgeschriebenen Verpflichtung zur Vermeidung nosokomialer Infektionen entnommen und nachträglich von der Abteilung für Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Tübingen für diese Studie ausgewählt. Es wurden keine zusätzlichen Probenentnahmen vorgenommen. Die Auswertung der Bakteri-

enisolate erfolgte pseudonymisiert und ohne Verwendung patientenbezogener Daten. Für diese Studie wurde vor Beginn der Arbeit ein Votum der Ethik-Kommission am Universitätsklinikum Tübingen ausgestellt (Projektnummer 841/2018BO1).

#### 2.2.2 Isolate

Für diese retrospektive Studie wurden *E. coli*-Isolate und *K. pneumoniae*-Isolate aus Rachen- und Analabstrichen von Patienten des Universitätsklinikum Tübingen verwendet, die im Rahmen der infektionspräventiven Tätigkeit der Abteilung für Krankenhaushygiene gewonnen wurden. Aus der bestehenden Sammlung der von Januar bis Dezember 2017 isolierten MRGN-Stämme wurde durch die Abteilung für Krankenhaushygiene retrospektiv eine Auswahl an verwendeten Isolaten getroffen. Für diese Isolatauswahl wurden Patientenpaare mithilfe eines Algorithmus identifiziert, welcher folgende Faktoren berücksichtigte: Um mögliche Transmissionen von MRGN-Stämmen zu erkennen, beschränkte sich die Auswahl zum einen auf Isolate mit einem MRGN-Resistenzmuster. Zum anderen wurden ausschließlich Isolate von Patienten berücksichtigt, die mit mindestens einem anderen ausgewählten Patienten Kontakt hatten. Als Patientenkontakt wurde der Umstand definiert, dass zwei Patienten im selben Zeitraum auf derselben Station oder in derselben Ambulanz untergebracht waren und bei mindestens einem der beiden Patienten der Erstnachweis des MRGN-Stammes innerhalb von 28 Tagen nach dem Kontakt erfolgte. Nach Analyse im Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Tübingen wurden die Isolate bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C in flüssigem Nährmedium oder Microbanks™ gelagert und später für unsere Analysen auf Columbia-Blutagar aufgetaut und über Nacht bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>-Zusatz inkubiert. Die Isolate wurden mittels FTIR-Spektroskopie und Genomsequenzierung analysiert.

##### 2.2.2.1 *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie*

Vor der Verwendung der Kulturen für die Ganzgenomsequenzierung bzw. FTIR-Spektroskopie wurde die Spezies mithilfe der *Matrix-Assisted Laser Desorp-*

*tion/Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometrie verifiziert. Die Messungen erfolgten durch das MALDI Biotyper<sup>®</sup> CA System. Hierfür wurde eine einzelne Kolonie auf eine zum System gehörige Trägerplatte aufgebracht und mit Matrixsubstanz vermischt. Jedes Isolat wurde auf zwei Felder der Trägerplatte aufgetragen. Die Platte wurde vermessen und die ermittelten MALDI-TOF-Spektren mit der Referenz-Library des MALDI Biotyper<sup>®</sup> CA Systems verglichen. Aus dem Vergleich der Proben mit den Referenzen ergeben sich Werte von 0,0 bis 3,0, die die Ähnlichkeit des Isolates mit den Referenzorganismen widerspiegeln. Für *Enterobacterales* gilt, dass das Ergebnis auf Speziesebene übernommen werden darf, wenn der Vergleichswert mindestens 2,0 beträgt und der Abstand zwischen der Spezies mit der größten Ähnlichkeit und der nachfolgenden Spezies mindestens 0,3 beträgt. Für unsere Fragestellung war es ausreichend, wenn auf einem der zwei Felder eines Isolates eine eindeutige Zuordnung erfolgen konnte. Wurde die Spezies der Isolate bestätigt, konnte die FTIR-Spektroskopie durchgeführt werden. Konnte keine klare Spezies-Zuordnung erfolgen (Vergleichswert unter 2,0), wurde die Kultur erneut abgeimpft, für 24 ( $\pm$  0,5) Stunden bzw. 18 ( $\pm$  0,5) Stunden inkubiert und die MALDI-TOF-Messung am Folgetag wiederholt.

### 2.2.3 Genomsequenzierung der *E. coli*-Isolate

Die bakterielle DNS wurde mithilfe des Dneasy<sup>®</sup> UltraClean<sup>®</sup> Microbial Kit isoliert und die DNS-Konzentration mit dem Qubit double-stranded DNA (dsDNA) BR Assay Kit bestimmt. Nach Vorbereitung der Genbibliothek mithilfe des TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit erfolgte die Sequenzierung durch den Illumina<sup>®</sup> NextSeq<sup>™</sup> 500 Sequencer. Die einzelnen Sequenzinformationen wurden mithilfe der A5-Miseq Pipeline zusammengefügt. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte näher beschrieben.

#### 2.2.3.1 DNS-Isolation

Die bakterielle DNS wurde mithilfe des Dneasy<sup>®</sup> UltraClean<sup>®</sup> Microbial Kit isoliert. Die Isolate wurden zunächst nach oben genanntem Standard inkubiert. Eine Impföse voll bakteriellen Materials wurde in 300  $\mu$ l PowerBead Solution

suspendiert und 50 µl Solution SL hinzugefügt. Die Suspension wurde anschließend horizontal für zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in einem Vortex Adapter gemischt. Nach Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10.000 x g und Raumtemperatur (in dieser Arbeit verwendete Standardbedingungen für Zentrifugation) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Solution IRS vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 4 °C und einminütiger Zentrifugation wurde der entstandene Überstand mit 900 µl Solution SB vermischt. 700 µl des entstandenen Volumens wurden in eine MB Spin Column überführt und wiederum für 30 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und dem Überstand 300 µl Solution CB hinzugefügt. Die Zentrifugation für 30 Sekunden wurde wiederholt, der Durchfluss verworfen und die Lösung abermals für eine Minute zentrifugiert. Die MB Spin Column wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und 50 µl Solution EB mittig auf die Filtermembran der MB Spin Column pipettiert. Nach Zentrifugation für 30 Sekunden wurde die MB Spin Column verworfen. Der Durchfluss, der die bakterielle DNS enthielt, wurde entweder bei -20 °C zwischengelagert oder sofort für die Bestimmung der DNS-Konzentration weiterverwendet.

#### 2.2.3.2 DNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der bakteriellen DNS wurde mit dem Qubit® double-stranded DNA (dsDNA) BR Assay Kit bestimmt. Zunächst wurde Qubit® dsDNA BR Reagent im Verhältnis von 1:200 in Qubit® dsDNA BR Buffer gelöst und vermischt. Die benötigten Volumina wurden mithilfe folgender Formeln berechnet:

$$\begin{aligned} &\text{benötigtes Volumen Qubit® dsDNA BR Reagent} \\ &= 1 \mu\text{l} \times (\text{Anzahl Proben} + \text{Anzahl Standards} + 1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{benötigtes Volumen Qubit® dsDNA BR Buffer} \\ &= 199 \mu\text{l} \times (\text{Anzahl Proben} + \text{Anzahl Standards} + 1) \end{aligned}$$

Für jede Probe wurden je 198 µl der hergestellten Lösung und 2 µl der im ersten Schritt isolierten DNS vermischt. Für die zwei zur Kalibrierung benötigten Leerproben wurden je 190 µl der hergestellten Lösung und 10 µl Qubit® dsDNA

BR Standard #1 bzw. #2 gegeben. Die Messung der DNS-Konzentration erfolgte mithilfe des Qubit® 2.0 Fluorometers unter dem Assay-Typ dsDNA Broad Range. Aus dem durch das Fluorometer angegebenen Wert (QF-Wert) wurde nun mithilfe folgender Formel die DNS-Konzentration der Proben berechnet:

$$\text{DNS-Konzentration Probe [mg/ml]} = \text{QF-Wert} \times 100$$

Nach erfolgter DNS-Konzentrationsbestimmung wurden die DNS-Proben bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.3 Herstellung der DNS-Libraries

Die sogenannte DNS-Library einer Probe stellt eine Bibliothek von Sequenzen des Isolates dar und repräsentiert die Gesamtheit ihres Genoms. Die DNS-Libraries wurden mithilfe des TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep Kit für die Sequenzierung vorbereitet. Die DNS wurde zunächst mithilfe des Covaris® M220 Focused-Ultrasonicator fragmentiert. Da durch beliebige Fragmentierung ungleichmäßige Fragmentenden entstehen, war nun eine Reparatur der Enden zu sogenannten *Blunt Ends*, das heißt stumpfen, nicht überstehenden Strangenden, erforderlich. Für die gewünschte Insertgröße von 550 Basenpaaren war hierbei eine DNS-Masse von 494 ng erforderlich. Die Länge der Fragmente stellt ebenfalls ein wichtiges Qualitätsmerkmal dar, da Effizienz und Genauigkeit der Sequenzierung sensibel auf zu große Längenvariationen reagieren. Mithilfe einer Größenselektion wurden deshalb zu lange Fragmente aussortiert. Im Anschluss wurden die Fragmentenden adenyliert. Die Ergänzung eines einzelnen A-Nukleotids an die 3'-Enden der Fragmente macht die nachfolgende Ligation mit dem auf T-Nukleotide endenden Adaptern effektiver und verhindert die Bildung von DNS-Concatemeren, also repetitiven DNS-Sequenzen. Die adenylierten Fragmentenden wurden nun an Adapter aus dem TruSeq DNA CD Indexes Kit gebunden. Um eine korrekte Clusteramplifikation zu ermöglichen, muss jedes Fragmentende mit einer anderen Adaptersequenz ligiert werden. Die an Adapter gebundenen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Die PCR dient der Vervielfältigung der DNS für die Sequenzierung

und der Ligation der Strangenden mit Oligonukleotiden, die für eine Hybridisierung mit der Flusszelle erforderlich sind. Im Anschluss wurden die vervielfältigten Fragmente quantifiziert. Die DNS-Konzentration der Libraries bestimmt die Anzahl der auf der Flusszelle gebildeten Cluster und hat somit maßgeblichen Einfluss auf die Ausbeute der Sequenzierung. Die Quantifizierung der in den PCR-Ansätzen enthaltenen DNS erfolgte mithilfe des Qubit® double-stranded DNA (dsDNA) BR Assay Kit, wie oben beschrieben. Mithilfe des QIAxcel Advanced Systems wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt, die gleichzeitig eine Abschätzung der Größe der Library ermöglichte. Der angestrebte Umfang der Libraries lag bei einer Insertgröße von 550 Basenpaaren bei ungefähr 670 Basenpaaren. Nach der Qualitätskontrolle wurden die DNS-Libraries normalisiert, gepoolt und denaturiert. Den gepoolten Libraries wurde außerdem eine Kontroll-Library (PhiX Library) zugesetzt.

#### 2.2.3.4 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung der gepoolten DNS-Libraries erfolgte unter Zuhilfenahme des NextSeq 500/550 Kits durch den Illumina® NextSeq™ 500 Sequencer mit einer Insertgröße von 550 Basenpaaren.

#### 2.2.3.5 Genomanalyse der *E. coli*-Isolate

Für die Genomanalyse wurden die einzelnen Sequenzabschnitte der *E. coli*-Genome im ersten Schritt mithilfe der A5-Miseq Pipeline und des Programms SPAdes (Bankevich et al., 2012) mit einer *Read*-Mindestlänge von 100 Basenpaaren assembliert. Die assemblierten Sequenzen wurden anschließend mithilfe des JSpecies Web Server (Richter et al., 2016) durch den Vergleich der Genome miteinander auf ihre gemeinsame Spezies hin überprüft. JSpecies kalkulierte die *Average Nucleotide Identity* (ANI) basierend auf dem ANIm Algorithmus (Richter und Rossello-Mora, 2009). Die MLST-Typisierung der assemblierten Sequenzen erfolgte auf dem MLST-Server des Center for Genomic Epidemiology (CGE) nach dem Schema *Escherichia coli*#1 der Warwick Medical School (Wirth et al., 2006).

Für die weitere phylogenetische Analyse der assemblierten Sequenzen wurden die gemeinsamen *Core*-Genome mithilfe von Spine (Ozer et al., 2014) ermittelt.

Folgende Einstellungen wurden hierbei vorgenommen: Die Länge der *Alignment*-Stücke betrug 500 Basenpaare, homologe Regionen mussten zu mindestens 85,0 % übereinstimmen und 100,0 % der genomischen Positionen in der Population sollten zum *Core* gehören. Die Gesamtlänge des ermittelten *Core*-Genoms betrug 3,2 Mio. Basenpaare. Die zusätzlich im *Core*-Genom enthaltenen Prophagen-Regionen wurden mit PHASTER (Arndt et al., 2016) lokalisiert und mithilfe eines individuell modifizierten Skriptes der A5-Miseq Pipeline entfernt. Die durch Trimmomatic (Bolger et al., 2014) erzeugten, hochqualitativen Sequenzabschnitte wurden an dem *Core*-Genom ausgerichtet. Durch Vergleich der am *Core*-Genom ausgerichteten Genome wurden die SNP-Differenzen zwischen den verglichenen Isolaten berechnet. Die Zuteilung zu einem Cluster, d.h. Gruppen eng verwandter Isolate, erfolgte bei einer Differenz von weniger als sieben SNPs zwischen den enthaltenen Isolaten. Wenn sich demnach zwei Isolate um maximal sechs SNPs unterschieden, wurden sie als eng verwandt klassifiziert.

#### 2.2.4 FTIR-Spektroskopie der *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolate

##### 2.2.4.1 Vorbereitung der Proben für FTIR-Spektroskopie

Von den aufgetauten Isolaten wurde je eine Kolonie auf Columbia-Blutagar abgeimpft und die Kultur wiederum für 24 ( $\pm$  0,5) Stunden im Fall der *E. coli*-Isolate bzw. 18 ( $\pm$  0,5) Stunden im Fall der *K. pneumoniae*-Isolate bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>-Zusatz inkubiert. Die beschriebenen Anzucht-Bedingungen entsprechen dem in dieser Arbeit angewandten Standard und wurden immer, wenn keine abweichenden Vorgaben erfolgen, eingehalten. Für die FTIR-Spektroskopie wurde Material jeder Kolonie in 50  $\mu$ l steril filtriertem 70 % (v/v) Ethanol suspendiert und 50  $\mu$ l steril filtriertes destilliertes Wasser hinzugefügt.

##### 2.2.4.2 Erstellung und Analyse der FTIR-Spektren

Für die Erstellung der Spektren mithilfe der IR Biotyper<sup>®</sup> Systems wurde der Transmissionsmodus gewählt, bei dem die Bakteriensuspensionen auf die Felder einer Trägerplatte aufgetragen und getrocknet werden. Die Trägerplatte des IR Biotyper<sup>®</sup> Systems wurde für die Messung zunächst mit destilliertem Wasser und 70 % Ethanol gereinigt. Je 15  $\mu$ l der angesetzten Suspensionen wurden auf

die Felder der Trägerplatte aufgebracht, durch Lagerung bei 37 °C für 45 min getrocknet und mithilfe der IR Biotyper® Software und der OPUS Spektroskopiesoftware analysiert. Hierbei wurde jedes Isolat in drei unabhängigen Durchläufen gemessen, wodurch sich drei biologische Replikate vergleichen ließen. Pro Durchlauf wurden jeweils vier technische Replikate eines Isolates analysiert. Nach Ausschluss von Spektren, die den systeminternen Qualitätskriterien (Höhe der Absorption, Höhe des Rauschsignals, Signal-Rausch-Verhältnis, Wasserdampf-Gehalt, Signal-Wasser-Verhältnis, Randbereiche) nicht genügten, erfolgte die weitere Analyse basierend auf der zweiten Ableitung der Spektren im Wellenzahl-Bereich von 1300-800 cm<sup>-1</sup>. Die IR Biotyper® Software ermittelte mithilfe des Euklidischen Abstands die Ähnlichkeit der Isolate und stellte sie in einer Matrix dar. Für die weitere Auswertung wurden die Spektren in eine Tabelle mit einzelnen Messpunkten umgewandelt und gemittelt. So ergaben sich nach Durchführung einer Vektor-Normalisierung Summenspektren der technischen bzw. biologischen Replikate jedes Isolates. Abweichende Spektren innerhalb eines biologischen Replikates wurden ausgeschlossen, wenn die Übereinstimmung der Spektren unter einem *Cut-off*-Wert von 85,0 % lag. Bei Abweichung eines einzelnen Spektrums von den anderen Spektren des biologischen Replikates wurde dieses ausgeschlossen. Ebenso wurde bei zwei abweichenden Spektren innerhalb eines biologischen Replikates verfahren, solange diese zueinander ebenfalls eine Übereinstimmung unter 85,0 % aufwiesen.

#### 2.2.4.3 Berechnung von Clustern aus FTIR-Spektren

Die Summenspektren ermöglichten außerdem die Erstellung von Clustern aus den Isolaten auf Basis einer Ähnlichkeitsmatrix. Hierbei wurde ein einzelnes Isolat jeweils mit jedem anderen Isolat verglichen. Auf Basis dieses Vergleichs wurde die Methode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*), eine Variante der HCA, zur Rekonstruktion des Verwandtschaftsgrades angewandt. Die ermittelten Cluster ließen sich mithilfe der Plattform BioNumerics, die ebenfalls UPGMA verwendet, in Dendrogrammen und Matrices visualisieren. Um ein Cluster zu definieren, wurde für den Verwandtschaftsgrad

der Isolate ein *Cut-off-Wert* gewählt, bis zu dem Isolate demselben Cluster zugeordnet werden. Der *Cut-off-Wert* wurde in Abhängigkeit von der Spezies und der jeweiligen Fragestellung festgesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Transmissionssurveillance von MRGN-*E. coli*

##### 3.1.1 Isolatauswahl

Das Ziel dieser Studie war es, mithilfe der untersuchten Methoden FTIR-Spektroskopie und Ganzgenomsequenzierung potenzielle Transmissionen von MRGN-Stämmen zu identifizieren. Die Auswertung erfolgte rein retrospektiv, die verwendeten Isolate wurden im Rahmen der infektionspräventiven Routinediagnostik gewonnen. Ausgewählt wurden MRGN-*E. coli*-Stämme von Patienten, die mit mindestens einem weiteren ausgewählten Patienten Kontakt gehabt hatten. Insgesamt wurden 103 MRGN-*E. coli*-Isolate von 101 Patienten in die finale Auswertung dieser Studie eingeschlossen. Die Isolate stammen aus 28 Stationen bzw. Ambulanzen und wurden im Zeitraum von Januar bis Dezember 2017 aus Rachen- und Analabstrichen gewonnen.

Die Auswahl der Isolate für die finale Auswertung wurde wie folgt getroffen: Von ursprünglich 104 eingefrorenen *E. coli*-Isolaten spalteten sich fünf der Isolate (MRGN4622, MRGN4657, MRGN4931, MRGN4943, MRGN5426) während der Vorbereitung der Kulturen in zwei Morphologie-Typen auf. Da ein Zusammenhang zwischen der Morphologie bzw. dem Phänotyp eines Bakterienstammes und dessen FTIR-Spektrum besteht, wurden die zwei Typen jeweils getrennt abgeimpft und als zwei verschiedene Isolate (Stamm-1 und -2) analysiert. Von sechs Patienten (Patienten-ID 3, 7, 37, 39, 46, 70) lagen somit zwei Isolate und von einem weiteren Patienten (Patienten-ID 91) drei Isolate vor. Insgesamt wurden 109 *E. coli*-Isolate mittels FTIR-Spektroskopie und Genomsequenzierung analysiert. Zeigte sich in der Genomsequenzierung eine genetische Übereinstimmung von Isolaten desselben Patienten (SNP-Differenz < 7), wurde nur eines der Isolate in die Auswertung eingeschlossen, um Verfälschungen im Verhältnis zu einfach vorkommenden Isolaten zu vermeiden. Auf diese Weise wurden die Isolate MRGN4622-2, MRGN4931-2, MRGN5096, MRGN5231, MRGN5426-2 und MRGN5447 von der Auswertung ausgeschlossen. In der weiteren Auswertung verblieben somit noch 103 *E. coli*-Isolate von 101 Patienten.

Die Speziesidentität aller Isolate wurde mithilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft. 101 Isolate wurden im ersten Durchgang sicher der Spezies

*E. coli* zugeordnet, bei zwei Isolaten konnte keine eindeutige Spezies-Zuordnung erfolgen. Diese Isolate wurden ein zweites Mal abgeimpft und inkubiert und die Messung am Folgetag wiederholt. Das Isolat MRGN5198 konnte auch in der wiederholten Messung keiner Spezies zugeordnet werden, die Zuordnung zu *E. coli* erfolgte schließlich im Rahmen der Ganzgenomsequenzierung mithilfe von JSpecies (Richter et al., 2016).

### 3.1.2 Ganzgenomsequenzierung

#### 3.1.2.1 Speziesidentifizierung

Die DNS der *E. coli*-Isolate wurde isoliert, DNS-Libraries erstellt und die Ganzgenomsequenzierung durchgeführt. Nach Assemblierung der Sequenzabschnitte wurde die gemeinsame Spezies der Isolate mithilfe von JSpecies (Richter et al., 2016) anhand ihrer genetischen Ähnlichkeit bestätigt. Alle Isolate konnten eindeutig als der Spezies *E. coli* zugehörig identifiziert werden. Auf dieser Basis wurde auch das Isolat MRGN5198, dessen Spezies mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie nicht bestätigt werden konnte, in die weitere Auswertung eingeschlossen.

#### 3.1.2.2 MLST-Analyse

Auf Basis der Ganzgenomsequenzierung erfolgte zunächst die MLST-Typisierung der Stämme durch Extraktion von sieben *Housekeeping*-Genen aus den assemblierten Genomen. Die Typisierung ergab eine Bandbreite von 22 Sequenztypen und zwei Isolaten, deren Sequenztyp nicht identifizierbar bzw. unbekannt war. Die Verteilung der verschiedenen Sequenztypen auf die untersuchte Stammaswahl ist in Tabelle 10 dargestellt. Zehn der ermittelten bekannten Sequenztypen hatten mindestens zwei Vertreter unter den analysierten Isolaten, 14 Sequenztypen (inklusive der zwei unbekanntem Sequenztypen) kamen nur bei einzelnen Isolaten vor (*Singletons*). Die häufigsten Sequenztypen waren ST131 ( $n = 43$  bzw. 41,7 %) und ST410 ( $n = 11$  bzw. 10,7 %). Diese Verteilung entspricht der bekannten Häufigkeitsverteilung der Sequenztypen in klinischen Isolaten (Pietsch et al., 2017).

Tabelle 10: Verteilung der Sequenztypen auf die untersuchten 103 *E. coli*-Isolate. Dargestellt sind die Anzahl der zu einem Sequenztyp gehörigen Isolate und die prozentualen Anteile der Sequenztypen an der Gesamtheit der untersuchten Isolate. Sequenztypen mit nur einem zugeordneten Isolat (*Singletons*) und Isolate mit unbekanntem Sequenztyp sind nicht dargestellt.

Sequenztyp	Anzahl <i>n</i> der zugehörigen <i>E. coli</i> -Isolate	Anteil an allen untersuchten <i>E. coli</i> -Isolaten [%]
ST131	43	41,7
ST410	11	10,7
ST38	9	8,7
ST648	8	7,8
ST10	6	5,8
ST69	4	3,9
ST46	2	1,9
ST73	2	1,9
ST405	2	1,9
ST1193	2	1,9

### 3.1.2.3 SNP-Analyse

Aus den Sequenzierungsdaten wurden die SNP-Differenzen zwischen den Isolaten durch den Vergleich der am *Core*-Genom ausgerichteten Genome berechnet. Isolate mit einer Differenz von weniger als sieben SNPs wurden als genetisch identisch gewertet und einem SNP-Cluster zugeordnet. Die SNP-Analyse besitzt von den hier angewandten Analysemethoden die höchste Aussagekraft für genetische Verwandtschaft und diente als Referenzmethode für die FTIR-Spektroskopie. Die genetische Übereinstimmung von Isolaten stellt außerdem die Voraussetzung für den Beweis von Transmissionen zwischen Patienten dar. Die Isolate wurden in 89 SNP-Cluster mit einem bis vier Isolaten aufgeteilt (siehe Abbildung 1). 80 der Cluster enthielten lediglich ein Isolat (*Singletons*), neun Cluster umfassten mindestens zwei Isolate. Die größten Isolatgruppen waren Cluster 1 und 8 (jeweils  $n = 4$ ). Insgesamt kommen somit neun Cluster für potenzielle Transmissionen infrage, größere Cluster im Sinne einer möglicher Ausbruchssituation gibt es nicht.

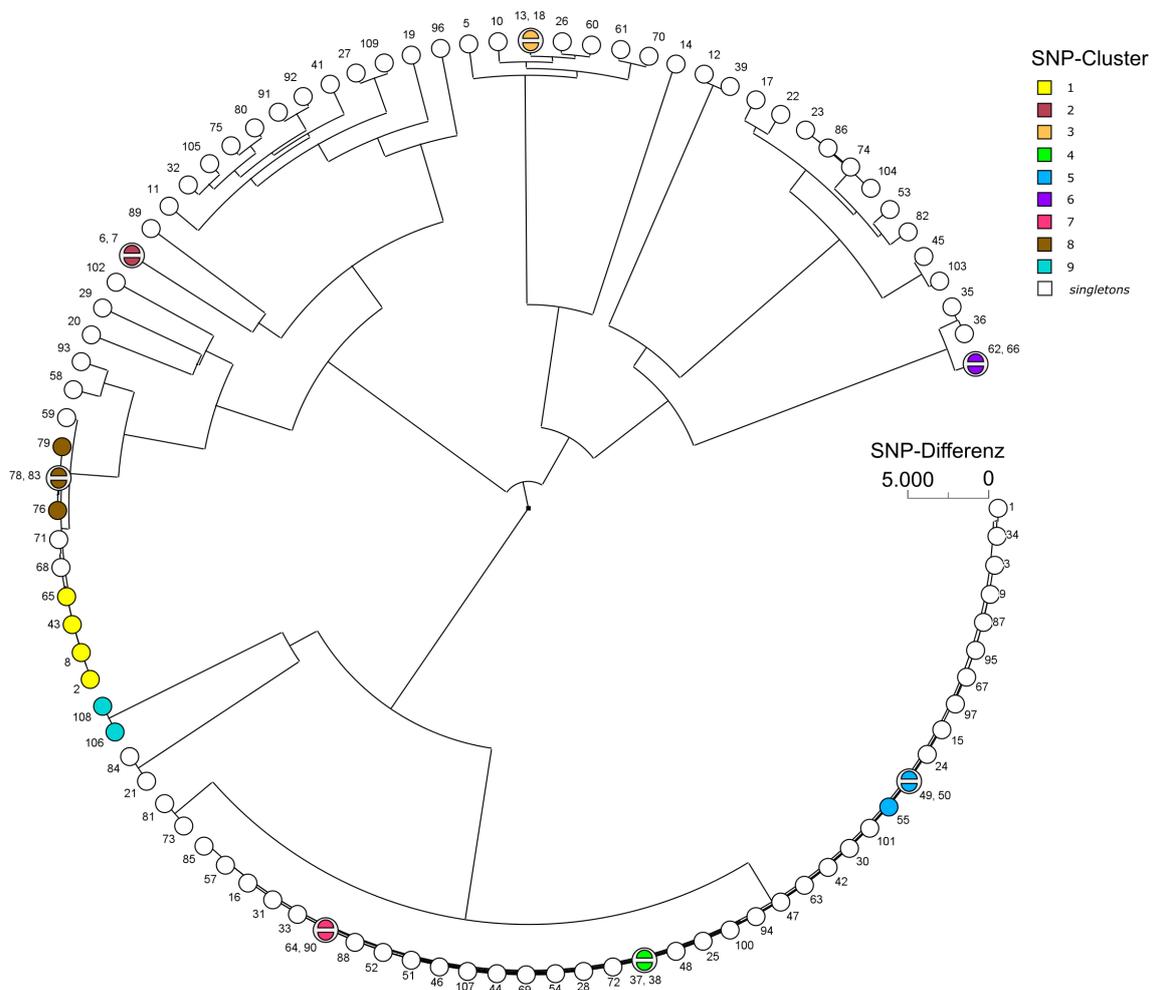


Abbildung 1: Phylogenie der 103 *E. coli*-Isolate auf Grundlage der Core-Genom-basierten SNP-Analyse. Anhand der SNP-Differenzen zwischen den Isolaten wurden Cluster definiert, die verschiedenfarbig dargestellt sind. Die Zuteilung zu einem Cluster erfolgte bei einer Differenz von weniger als sieben SNPs zwischen den enthaltenen Isolaten. Die Kennzeichnung der Isolate erfolgte anhand der Isolat-ID.

### 3.1.3 FTIR-Spektroskopie

#### 3.1.3.1 Erstellung und Analyse der FTIR-Spektren

Die *E. coli*-Isolate wurden in 19 Messdurchläufen mithilfe der FTIR-Spektroskopie analysiert. Spektren mit mangelhafter Qualität wurden durch das IR Biotyper System ausgeschlossen, zwei Messdurchgänge der Isolate MRGN5225 und MRGN5481 wurden deshalb wiederholt. Die häufigste Ursache für qualitative Mängel stellte eine unzureichende Absorption dar, die in der Re-

gel durch eine zu geringe Konzentration der Bakteriensuspension verursacht wurde. Drei biologische Replikate wiesen eine Übereinstimmung von unter 85,0 % zwischen den enthaltenen Spektren auf, was durch Ausschluss jeweils eines technischen Replikates korrigiert werden konnte. Die Übereinstimmung der technischen Replikate lag nach diesem Schritt bei 92,1 %, die Übereinstimmung der biologischen Replikate bei 91,1 %. Für die weiteren Analysen wurden die Summenspektren der Isolate verwendet.

Insgesamt zeigt sich hier eine einfache Durchführbarkeit ohne die Notwendigkeit vieler Wiederholungsmessungen und die sehr gute Reproduzierbarkeit der FTIR-Messungen, die durch Ausschluss einzelner Spektren von der Auswertung marginal verbessert werden kann.

#### 3.1.3.2 Berechnung von Clustern aus FTIR-Spektren

Auf Basis einer Ähnlichkeitsmatrix wurden die *E. coli*-Isolate in Cluster eingeteilt, die in einem FTIR-basierten Dendrogramm visualisiert werden konnten (siehe Abbildung 2). Der optimale *Cut-off*-Wert für die FTIR-Clustereinteilung wurde im Vergleich mit den Referenzmethoden WGS und MLST gewählt: Mithilfe des ARI wurde die Übereinstimmung zwischen der FTIR-Clustereinteilung und den Referenzmethoden quantifiziert und der *Cut-off*-Wert, bei dem sich der höchste ARI und damit die höchste Übereinstimmung zwischen den Clustering-Methoden ergab, für die weitere Auswertung zugrunde gelegt.

Die höchste Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung mit der MLST-Analyse zeigte sich bei einem *Cut-off*-Wert von 74,0 % Ähnlichkeit der Isolatspektren. Für diesen *Cut-off*-Wert ergab sich ein ARI von 0,416. Die Spektren wurden 38 Clustern mit einem bis 29 Isolaten zugeordnet, davon enthielten 24 Cluster lediglich ein Isolat (*Singletons*) und 14 Cluster mindestens zwei Isolate. Die meisten Isolate umfasste FTIR-Cluster Nr. 1 ( $n = 29$ ). In Abbildung 2 ist das FTIR-Dendrogramm der *E. coli*-Isolate bei einem *Cut-off*-Wert von 74,0 % dargestellt, wobei die FTIR-Cluster farbig markiert sind.

Somit kommen insgesamt 14 Cluster für eine potenzielle Transmission auf Basis der FTIR-Spektroskopie infrage. Die Übereinstimmung mit der MLST-Analyse ist mit einem ARI von 0,416 nur im mittleren Bereich. Ein möglicher

Grund findet sich in der heterogenen Stammsammlung mit vielen *Singletons*, die die Klassifikation komplizierter gestaltete und der routinemäßigen Proben-gewinnung außerhalb einer Ausbruchssituation geschuldet ist.

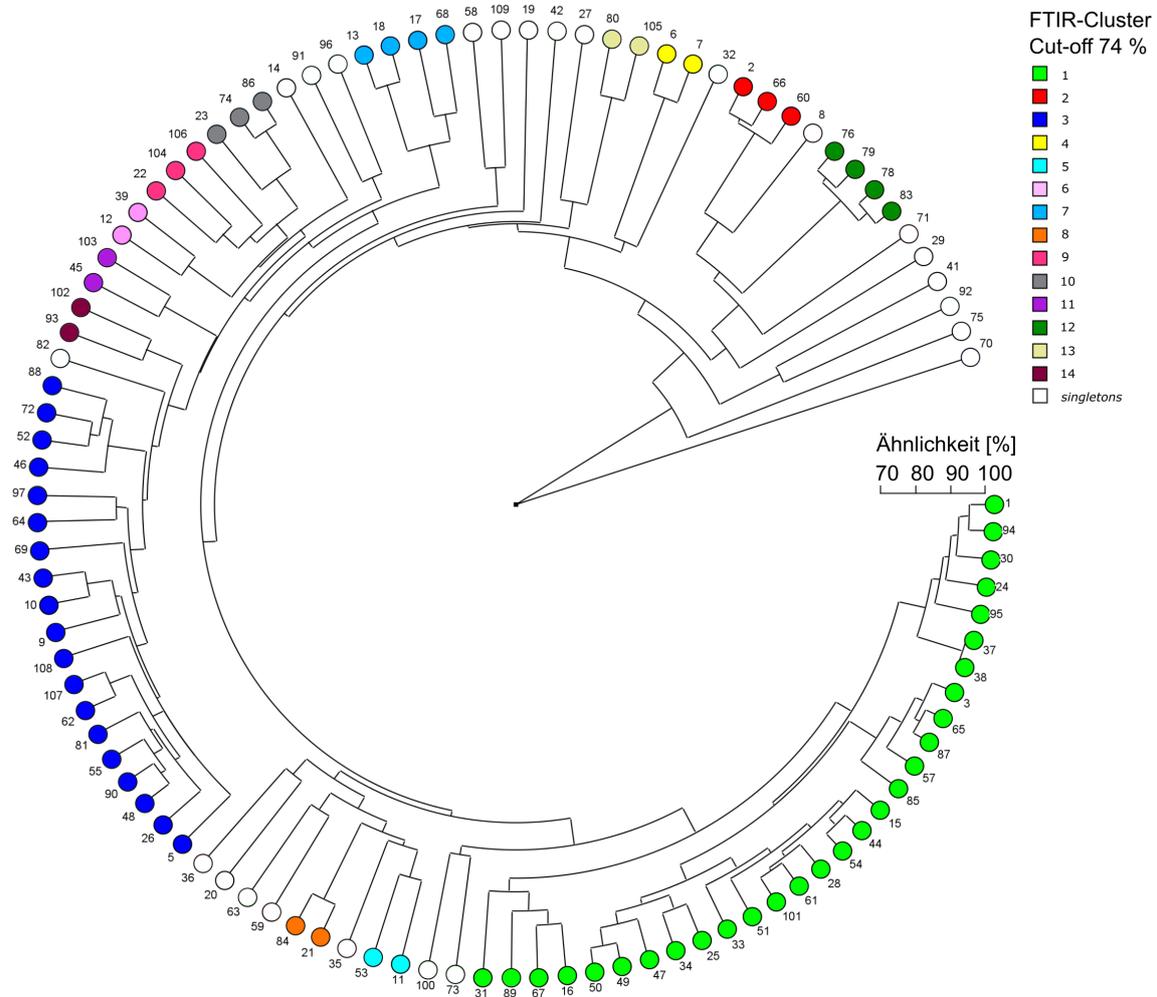


Abbildung 2: Phylogenie der 103 *E. coli*-Isolate auf Basis der FTIR-Spektren, Clusterbildung mithilfe der UPGMA-Methode. Der *Cut-off*-Wert für die Zugehörigkeit zu einem Cluster wurde bei 74,0 % Ähnlichkeit festgelegt. Die Cluster sind verschiedenfarbig dargestellt. Die Kennzeichnung der Isolate erfolgte anhand der Isolat-ID.

Für den Vergleich der FTIR-Clustereinteilung mit der SNP-Analyse ergab sich die höchste Übereinstimmung bei einem *Cut-off*-Wert von 92,0 % Ähnlichkeit der Isolatspektren. Der ARI betrug für diesen *Cut-off*-Wert 0,378. Für den *Cut-off*-Wert von 92,0 % Ähnlichkeit ergab sich eine Einteilung in 87 Cluster mit ei-

nem bis vier Isolaten. Elf der Cluster enthielten mindestens zwei Isolate, 76 Cluster waren *Singletons*. Die meisten Isolate gehörten dem FTIR-Cluster Nr. 69 ( $n = 4$ ) an. Die FTIR-Clustereinteilung für einen *Cut-off*-Wert von 92,0 % Ähnlichkeit ist in Abbildung 3 zu sehen, die verschiedenen FTIR-Cluster sind farbig dargestellt. Elf Cluster von geringem Umfang wurden identifiziert, deren Isolate bei späterer epidemiologischer Betrachtung für Übertragungen infrage kommen. Auch hier konnte mit einem ARI von 0,378 keine hohe Übereinstimmung mit der Referenzmethode erzielt werden, was unter anderem durch das Fehlen größerer Ausbruchcluster begründet sein kann. Der Blick auf die SNP-Clustereinteilung zeigt erheblich mehr *Singletons* als die Einteilung in Sequenztypen, was die Klassifikation noch anspruchsvoller macht.

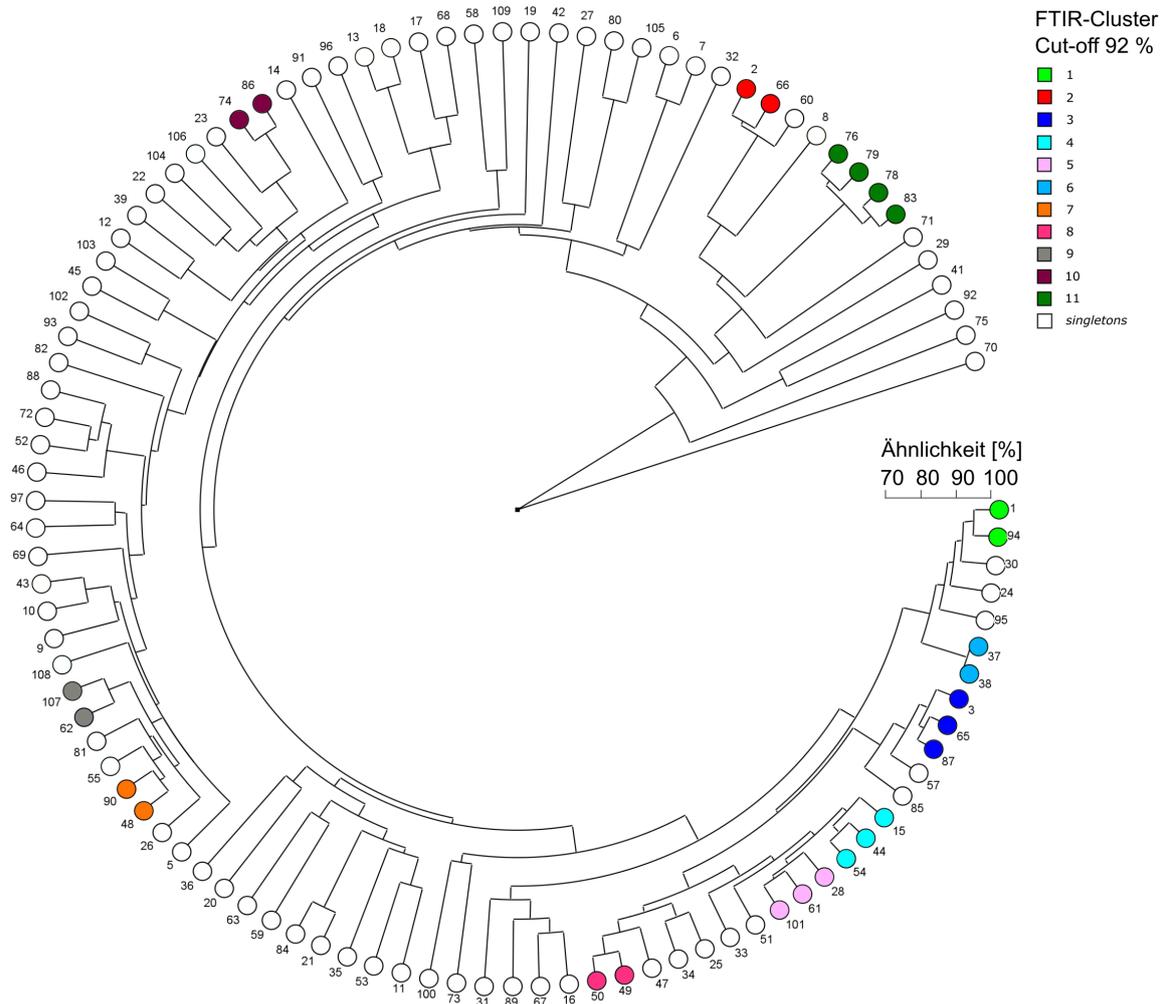


Abbildung 3: Phylogenie der 103 *E. coli*-Isolate auf Basis der FTIR-Spektren, Clusterbildung mithilfe der UPGMA-Methode. Der *Cut-off*-Wert für die Zugehörigkeit zu einem Cluster wurde bei 92,0 % Ähnlichkeit festgelegt. Die Cluster sind verschiedenfarbig dargestellt. Die Kennzeichnung der Isolate erfolgte anhand der Isolat-ID.

In Ergänzung zu dem oben beschriebenen Ansatz wurden die FTIR- und die SNP-Clustereinteilungen im Folgenden ausschließlich für die Isolate verglichen, die aus SNP-Clustern mit mindestens zwei Isolaten stammten und somit keine *Singletons* waren. Das Ziel dieses Vorgehens war, die Genauigkeit des Cluster-Vergleiches zu erhöhen, indem nur Isolate mit potenziellen Transmissionen basierend auf der SNP-Analyse berücksichtigt wurden. Unter diesen Bedingungen

verblieben 27 Isolate für den Vergleich. Der höchste ARI betrug hier 0,670 bei einem für die FTIR-Clustereinteilung zugrunde gelegten optimalen *Cut-off*-Wert von 88,0 % Ähnlichkeit. Durch den Ausschluss der *SNP-Singletons* konnte ein wesentlich höherer ARI und somit eine größere Ähnlichkeit der Clustereinteilungen für die verbliebenen Isolate erzielt werden. Für die weitere Auswertung wurde der hier errechnete optimale *Cut-off*-Wert jedoch nicht zugrunde gelegt, da hier alle 103 *E. coli*-Isolate berücksichtigt werden müssen.

### 3.1.3.3 Vergleich von FTIR-Spektroskopie und MLST-Analyse

Um die Trennschärfe der FTIR-Spektroskopie als Methode zur Transmissionsanalyse in einer retrospektiven Isolatsammlung zu ermitteln, erfolgte der Vergleich der FTIR-Clustereinteilung mit den ermittelten Sequenztypen bei einem optimalen *Cut-off*-Wert von 74,0 % Ähnlichkeit. In Abbildung 4 ist die FTIR-Clustereinteilung im Vergleich zu den Sequenztypen der *E. coli*-Isolate dargestellt. In einem FTIR-Cluster waren ein bis fünf Sequenztypen enthalten, parallel dazu wurden Isolate eines Sequenztyps in eines bis acht FTIR-Cluster aufgeteilt. Für drei Sequenztypen (ohne *Singletons*) war die Einteilung in FTIR-Cluster für alle Isolate übereinstimmend (ST1193, ST405, ST46), für fünf FTIR-Cluster (ohne *Singletons*) gehörten alle Isolate demselben Sequenztyp an (FTIR-Cluster Nr. 4, 6, 8, 10, 12).

Die Übereinstimmung der Methoden ist, wie im ARI bereits abgebildet, insgesamt nicht besonders hoch. Für einzelne Sequenztypen bzw. FTIR-Cluster sind die Einteilungen ähnlich, was jedoch stark vom jeweiligen Sequenztyp abhängen scheint. Der weit verbreitete ST131 ist beispielsweise zu großen Teilen in den FTIR-Clustern 1 und 3 abgebildet, während Isolate des ST10 im FTIR-Dendrogramm über viele verschiedene Cluster verteilt sind. Ein möglicher Grund für dieses auch in der Literatur beschriebene Verhalten ist die phänotypische und genotypische Diversität der Sequenztypen (Dawson et al., 2014). Auch gilt es zu beachten, dass es sich hier nicht um die Referenzmethode mit der höchsten Trennschärfe handelt (Novais et al., 2019). Der Vergleich mit der SNP-Analyse, die über eine wesentlich höhere Auflösung verfügt, ergibt eine präzisere Aussage über die Trennschärfe der FTIR-Spektroskopie.

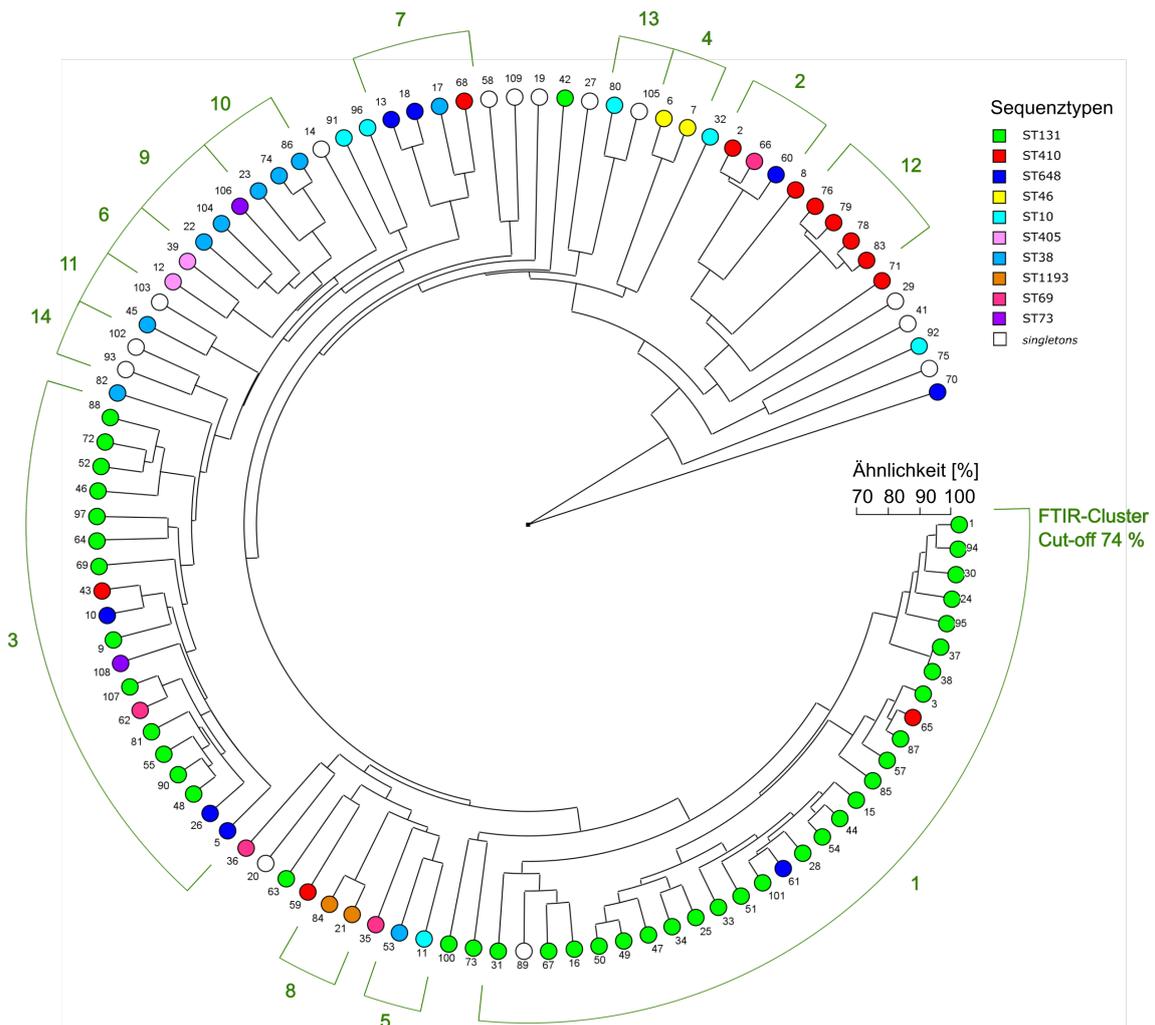


Abbildung 4: Phylogenie der 103 *E. coli*-Isolate auf Basis der FTIR-Spektren, Clusterbildung mithilfe der UPGMA-Methode. Der *Cut-off*-Wert für die Zugehörigkeit zu einem FTIR-Cluster wurde bei 74,0 % Ähnlichkeit festgelegt. FTIR-Cluster (ohne *Singletons*) sind als Klammern um die Isolate dargestellt. Zusätzlich sind die Sequenztypen der Isolate verschiedenfarbig dargestellt. Die Kennzeichnung der Isolate erfolgte anhand der Isolat-ID.

### 3.1.3.4 Vergleich von FTIR-Spektroskopie und SNP-Analyse

Die FTIR-Clustereinteilung bei einem optimalen *Cut-off*-Wert von 92,0 % Ähnlichkeit wurde hier mit der SNP-Phylogenie verglichen. In Abbildung 5 ist die FTIR-Clustereinteilung den SNP-Clustern gegenübergestellt. In einem FTIR-Cluster waren Isolate aus einem bis drei SNP-Clustern vertreten. Isolate eines SNP-Clusters waren auf ein bis vier FTIR-Cluster verteilt. Bei zwei SNP-Clustern (ohne *Singletons*) war die Einteilung in FTIR-Cluster für alle Isolate

identisch (SNP-Cluster Nr. 4 und 8), bei drei FTIR-Clustern (ohne *Singletons*) waren alle Isolate demselben SNP-Cluster zugehörig (FTIR-Cluster Nr. 6, 8 und 11). Passend zum ARI entsprechen sich die Cluster nur teilweise, eine zuverlässige Abbildung der genetischen Verwandtschaft durch die FTIR-Spektroskopie findet nicht statt. In der Literatur finden sich für andere Bakterienpezies hiervon abweichende Ergebnisse, teils ließ sich eine sehr gute Übereinstimmung der FTIR-Cluster mit der SNP-Phylogenie erzielen (Dinkelacker et al., 2018; Vogt et al., 2019). Die Beschaffenheit unserer Isolatsammlung, die Routineabstrichen und keinem Ausbruchsgeschehen entstammt und somit von geringerer genetischer Verwandtschaft gekennzeichnet ist, kann ebenso wie die gewählten technischen Einstellungen für die niedrige Übereinstimmung der Methoden mitverantwortlich sein.

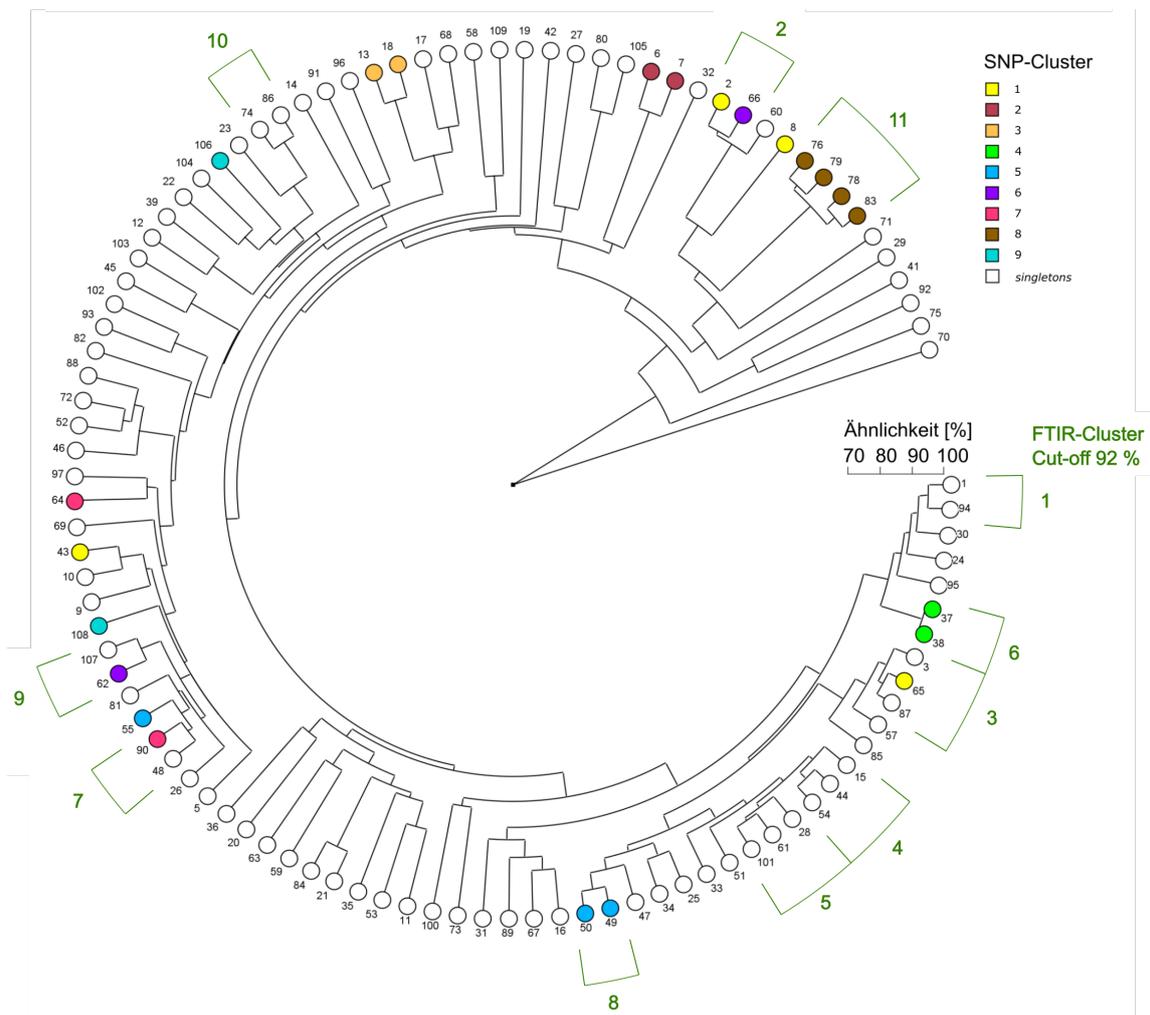


Abbildung 5: Phylogenie der 103 *E. coli*-Isolate auf Basis der FTIR-Spektren, Clusterbildung mithilfe der UPGMA-Methode. Der *Cut-off*-Wert für die Zugehörigkeit zu einem Cluster wurde bei 92,0 % Ähnlichkeit festgelegt. FTIR-Cluster (ohne *Singletons*) sind als Klammern um die Isolate dargestellt. Zusätzlich sind die SNP-Cluster verschiedenfarbig dargestellt. Die Kennzeichnung der Isolate erfolgte anhand der Isolat-ID.

Zusätzlich wurden statistische Gütekriterien (Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert) der FTIR-Clustereinteilung für *Cut-off*-Werte zwischen 51,0 % und 95,0 % berechnet. Die SNP-Cluster dienten als Referenz. In Abbildung 6 ist das Verhalten der statistischen Gütekriterien bei verschiedenen *Cut-off*-Werten als Graph dargestellt. Die Abbildung ermöglicht so, den bestgeeigneten *Cut-off*-Wert je nach benötigter Sensitivität bzw. Spezifität zu

finden. Ist beispielsweise das Ziel, mit der FTIR-Spektroskopie nur möglichst sichere Transmissionen zu identifizieren, sollte eine hohe Spezifität und somit ein möglichst hoher *Cut-off*-Wert gewählt werden. Sollen jedoch möglichst viele Transmissionen aufgedeckt werden mit dem Risiko, auch nicht stattgehabte Übertragungen fälschlicherweise anzunehmen, ist eher eine hohe Sensitivität bei einer verkraftbar niedrigen Spezifität gefordert.

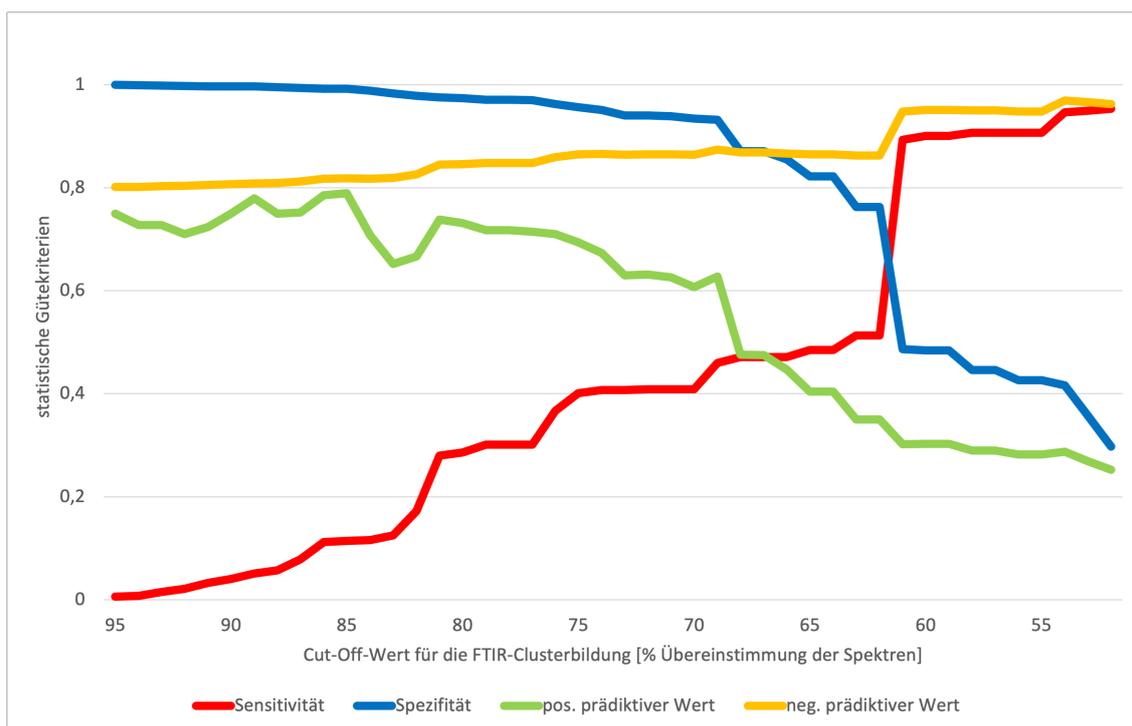


Abbildung 6: Verhalten der statistischen Gütekriterien Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert in Abhängigkeit vom *Cut-off*-Wert für die FTIR-Clusterbildung. Als Referenz diente die Cluster-Einteilung auf Basis der SNP-Analyse.

### 3.1.4 Transmissionssurveillance mit verschiedenen Typisierungsmethoden

#### 3.1.4.1 Transmissionssurveillance mit epidemiologischen Daten

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sich vermutete Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten durch Anwendung der verschiedenen Typisierungsmethoden bestätigen ließen. Die aus Routineabstrichen gewonnene MRGN-Isolatsammlung wurde hierfür retrospektiv auf mögliche Übertragungen hin untersucht und Isolate von Patienten mit Kontakt zueinander

ausgewählt. Als Patientenkontakt wurde der Umstand definiert, dass zwei Patienten im selben Zeitraum auf derselben Station untergebracht waren und bei mindestens einem der beiden Patienten der Erstdnachweis des MRGN-*E. coli* innerhalb von 28 Tagen nach dem Kontakt erfolgte. Hierdurch wurden Patientenpaare gebildet, wobei einige Patienten Kontakt zu mehr als einem Patienten aufwiesen und größere Patientencluster entstanden. Ein Patient wurde einem Kontakt-Cluster zugeteilt, wenn er mit mindestens einem Patienten dieser Gruppe Kontakt hatte. Insgesamt ergaben sich 26 Kontakt-Cluster, bestehend aus 15 Patientenpaaren und elf größeren Patientengruppen. Die größte Patientengruppe stellt Kontakt-Cluster Nr. 6 ( $n = 13$ ) dar. Die epidemiologischen Verbindungen der 101 Patienten sind in Abbildung 7 dargestellt. Insgesamt lagen 94 Patientenkontakte und damit 94 potenzielle Übertragungen vor.

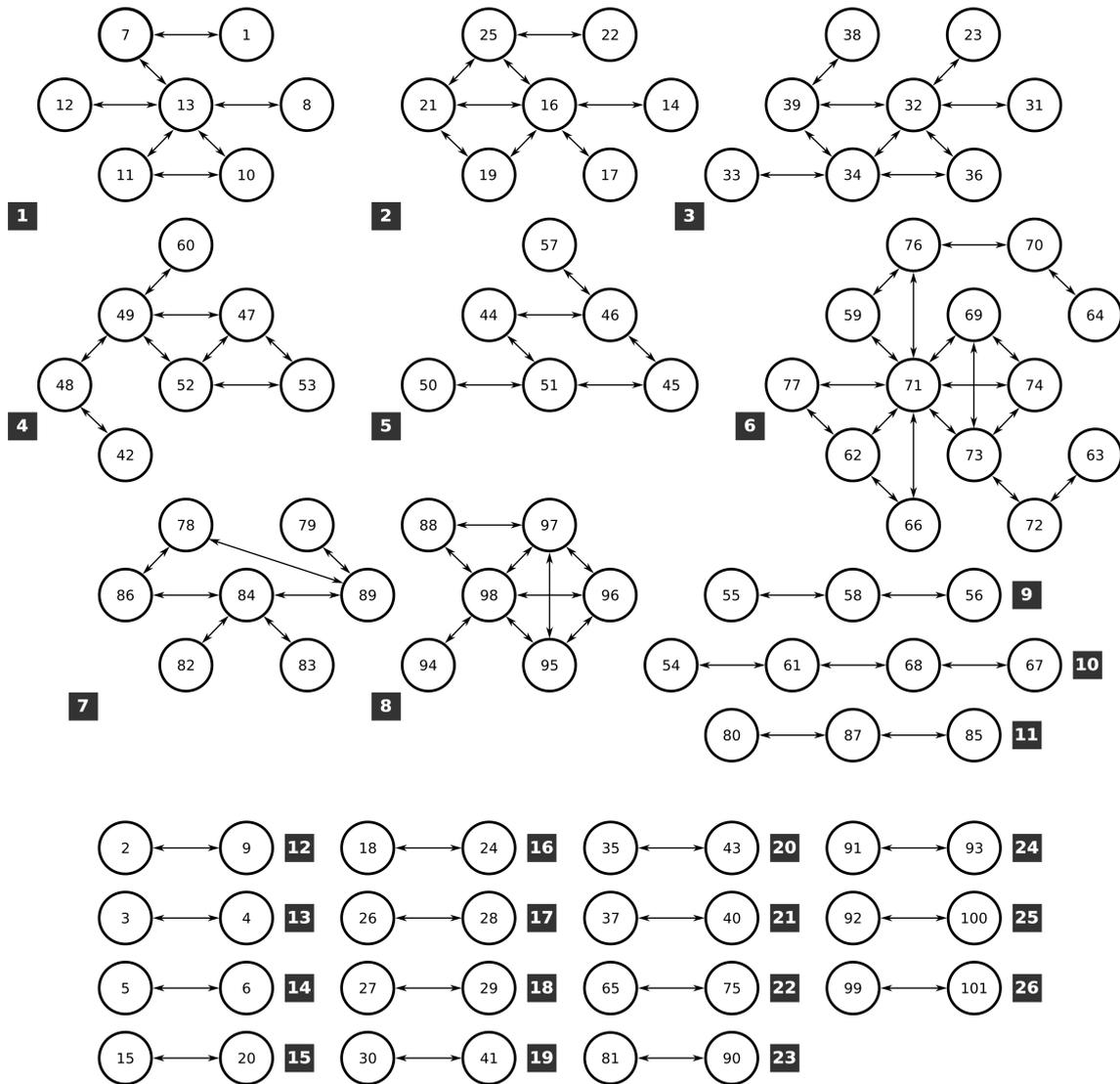


Abbildung 7: Potenzielle Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten der 101 Patienten, von welchen die *E. coli*-Isolate stammen. Die Patienten sind als Nummern kodiert und ihre Anordnung den Kontaktgruppen angepasst. Die 94 potenziellen Transmissionen zwischen Patienten sind mit einem Doppelpfeil dargestellt. Die Kontaktdaten ermöglichten die Einteilung der Patienten in 26 Kontakt-Cluster, wobei ein Patient einem Cluster zugeordnet wurde, wenn er mit mindestens einem anderen Patienten aus diesem Cluster Kontakt hatte. Die Nummern der Kontakt-Cluster sind in schwarzen Kästchen dargestellt.

#### 3.1.4.2 Transmissionssurveillance mit SNP-Analyse als Typisierungsmethode

Um zu untersuchen, welche Übertragungen der MRGN-*E. coli*-Stämme durch eine Typisierungsmethode angenommen werden, wurden die Stationskontakte der Patienten mit der genetischen Verwandtschaft ihrer Isolate in Kontext gesetzt. Hierfür wurden in Abbildung 8 die SNP-Cluster der Isolate eingefärbt und Stationskontakte zwischen Patienten, deren Isolate demselben SNP-Cluster zugeordnet waren, hervorgehoben. Mit Blick auf die Zusammenhänge zwischen SNP-Phylogenie und Stationskontakten lassen sich folgende Aussagen treffen: Fünf der potenziellen 94 Transmissionen ließen sich durch die SNP-Analyse als Typisierungsmethode bestätigen. In fünf SNP-Clustern zeigten die Isolate der Patienten Klonalität, aber es konnten keine epidemiologischen Zusammenhänge festgestellt werden. Einem Kontakt-Cluster waren Isolate aus einem bis zehn SNP-Clustern zugeordnet. Die Isolate eines SNP-Clusters stammten von Patienten aus einem bis vier Kontakt-Clustern. In vier Fällen waren alle Isolate eines SNP-Clusters im selben Kontakt-Cluster enthalten (SNP-Cluster Nr. 2, 5, 8 und 9), wobei *Singletons* für diese Angabe nicht berücksichtigt wurden. In zwei weiteren Fällen waren die Isolate aller Patienten eines Kontakt-Clusters demselben SNP-Cluster zugeordnet (Kontakt-Cluster Nr. 14 und 26).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei fünf Patientenpaaren mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Transmission stattgefunden hat, da die Patienten Kontakt miteinander hatten und genetisch eng verwandte MRGN-*E. coli*-Stämme isoliert wurden. Die bestätigten Transmissionen dienen im Folgenden als Referenz für die Beurteilung der Vergleichsmethoden MLST-Analyse und FTIR-Spektroskopie.

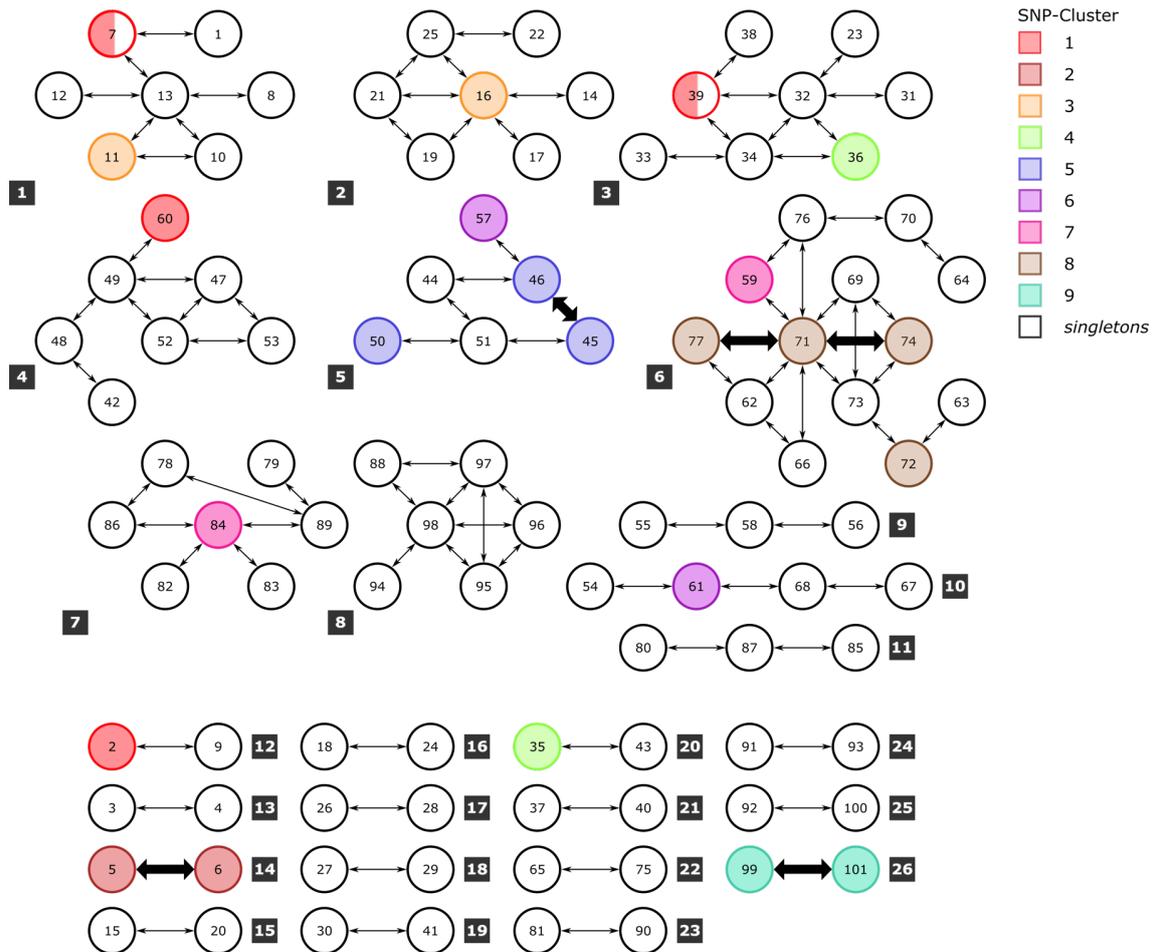


Abbildung 8: Potenzielle Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten der 101 Patienten, von welchen die *E. coli*-Isolate stammen. Die Patienten sind als Nummern kodiert und ihre Anordnung den Kontaktgruppen angepasst. Die Kontaktdaten ermöglichten die Einteilung der Patienten in 26 Kontakt-Cluster, wobei ein Patient einem Cluster zugeordnet wurde, wenn er mit mindestens einem anderen Patienten aus diesem Cluster Kontakt hatte. Die Nummern der Kontakt-Cluster sind in schwarzen Kästchen dargestellt. Zusätzlich sind die SNP-Cluster der Isolate verschiedenfarbig dargestellt. Von zwei Patienten liegen mehrere Isolate vor, in diesen Fällen wurde der zugehörige Kreisinhalt aufgeteilt. Die 94 epidemiologisch vermuteten Transmissionen zwischen Patienten sind mit einem Doppelpfeil dargestellt. In fünf Fällen wurde in der SNP-Analyse eine enge genetische Verwandtschaft von Isolaten innerhalb einer Kontaktgruppe nachgewiesen, eine Transmission wurde somit genetisch bestätigt. Die Doppelpfeile zwischen den betroffenen Isolaten sind verdickt dargestellt. In allen anderen Fällen wurde eine Transmission auf Basis der SNP-Differenzen ausgeschlossen, hier sind die Doppelpfeile dünn dargestellt.

#### 3.1.4.3 Transmissionssurveillance mit MLST-Analyse als Typisierungsmethode

Neben der umfassenderen SNP-Analyse wurde die Bestimmung der Sequenztypen als Typisierungsmethode untersucht. In Abbildung 9 sind die Sequenztypen der Isolate farblich dargestellt und die Kontakte zwischen Patienten, deren Isolate denselben Sequenztyp aufweisen, hervorgehoben. Fünf der 28 auf Basis der MLST-Analyse angenommenen Transmissionen wurden durch die SNP-Analyse bestätigt. In 23 Fällen wurde fälschlicherweise eine Transmission angenommen. Einem Kontakt-Cluster waren Isolate von einem bis fünf Sequenztypen zugeordnet. Die Isolate eines Sequenztyps stammten wiederum von Patienten aus einem bis 19 Kontakt-Clustern. In zwei Fällen waren alle Isolate eines Sequenztyps im selben Kontakt-Cluster enthalten (ST46 und ST73), wobei *Singletons* für diese Angabe nicht berücksichtigt wurden. In fünf Fällen waren die Isolate aller Patienten eines Kontakt-Clusters vom selben Sequenztypen (Kontakt-Cluster Nr. 14, 15, 17, 20 und 26). Unter den analysierten Isolaten waren ST131 und ST410 am häufigsten vertreten, zwischen Isolaten dieser Sequenztypen wurden auf Basis von Epidemiologie und MLST-Analyse auch die meisten Transmissionen vermutet. Bei weit verbreiteten Sequenztypen ist nicht auszuschließen, dass ein übereinstimmender Sequenztyp nach Patientenkontakt dem Zufall geschuldet ist und keine Übertragung stattfand. Aufgrund der niedrigeren Trennschärfe ist die MLST-Analyse weniger gut zur Transmissionssurveillance geeignet als die SNP-Analyse.

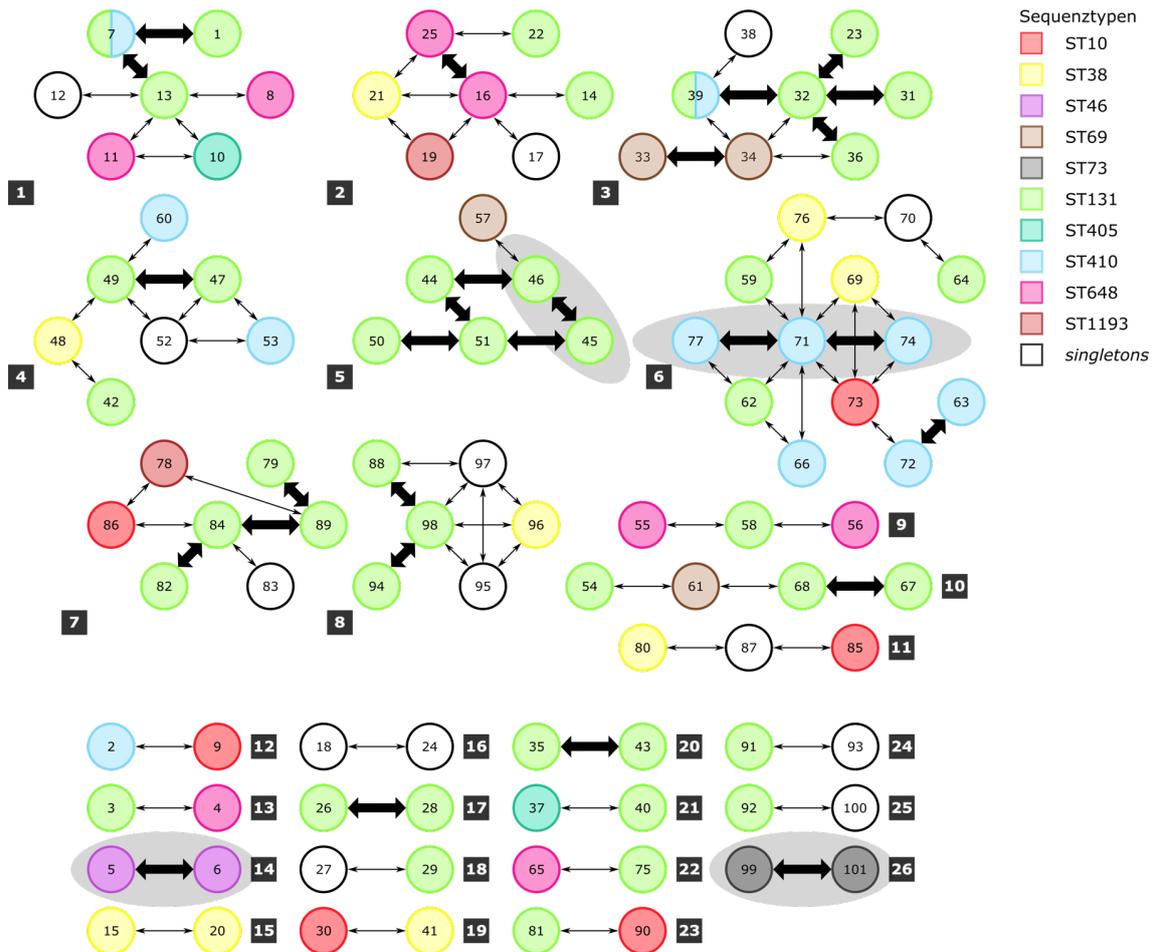


Abbildung 9: Potenzielle Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten der 101 Patienten, von welchen die *E. coli*-Isolate stammen. Die Patienten sind als Nummern kodiert und ihre Anordnung den Kontaktgruppen angepasst. Die Kontaktcluster ermöglichten die Einteilung der Patienten in 26 Kontakt-Cluster, wobei ein Patient einem Cluster zugeordnet wurde, wenn er mit mindestens einem anderen Patienten aus diesem Cluster Kontakt hatte. Die Nummern der Kontakt-Cluster sind in schwarzen Kästchen dargestellt. Zusätzlich sind die Sequenztypen der Isolate verschiedenfarbig dargestellt. Von zwei Patienten liegen mehrere Isolate vor, in diesen Fällen wurde der zugehörige Kreisinhalt aufgeteilt. Die 94 epidemiologisch vermuteten Transmissionen zwischen Patienten sind mit einem Doppelpfeil dargestellt. In 28 Fällen wurden Isolate einer Kontaktgruppe demselben Sequenztyp zugeordnet, eine Transmission wurde somit auf Grundlage von Epidemiologie und MLST-Analyse vermutet. Die Doppelpfeile zwischen den betroffenen Isolaten sind verdickt dargestellt. In allen anderen Fällen wurde eine Transmission auf Basis der Sequenztypen nicht angenommen, hier sind die Doppelpfeile dünn dargestellt. Als Referenz sind die fünf in der SNP-Analyse verifizierten Transmissionen grau hinterlegt.

#### 3.1.4.4 Transmissionssurveillance mit FTIR-Spektroskopie als Typisierungsmethode

Im Weiteren wurde untersucht, inwiefern Übertragungen auf Basis der FTIR-Spektroskopie angenommen wurden. Hierfür wurden die epidemiologischen Daten der Patienten mit der FTIR-Clustereinteilung der von ihnen isolierten *E. coli*-Stämme für einen *Cut-off*-Wert von 74,0 % kombiniert. In Abbildung 10 sind alle Patientenkontakte und die Zuteilung der Isolate zu FTIR-Clustern dargestellt. Kontakte zwischen Patienten, deren Isolate sich im selben FTIR-Cluster befinden, sind hervorgehoben. Vier der 13 auf Basis der FTIR-Spektroskopie angenommenen Transmissionen wurden durch die SNP-Analyse bestätigt. In neun Fällen wurde fälschlicherweise eine Transmission angenommen. Ein Kontakt-Cluster enthielt hierbei Isolate aus mindestens einem und maximal neun FTIR-Clustern, die Isolate eines FTIR-Clusters stammten von Patienten aus mindestens einem und maximal 16 Kontakt-Clustern. In zwei Fällen waren alle Isolate eines FTIR-Clusters im selben Kontakt-Cluster enthalten (FTIR-Cluster Nr. 4 und 12), wobei *Singletons* für diese Angabe nicht berücksichtigt wurden. In drei Fällen waren die Isolate aller Patienten eines Kontakt-Clusters im selben FTIR-Cluster vertreten (Kontakt-Cluster Nr. 14, 17 und 20).

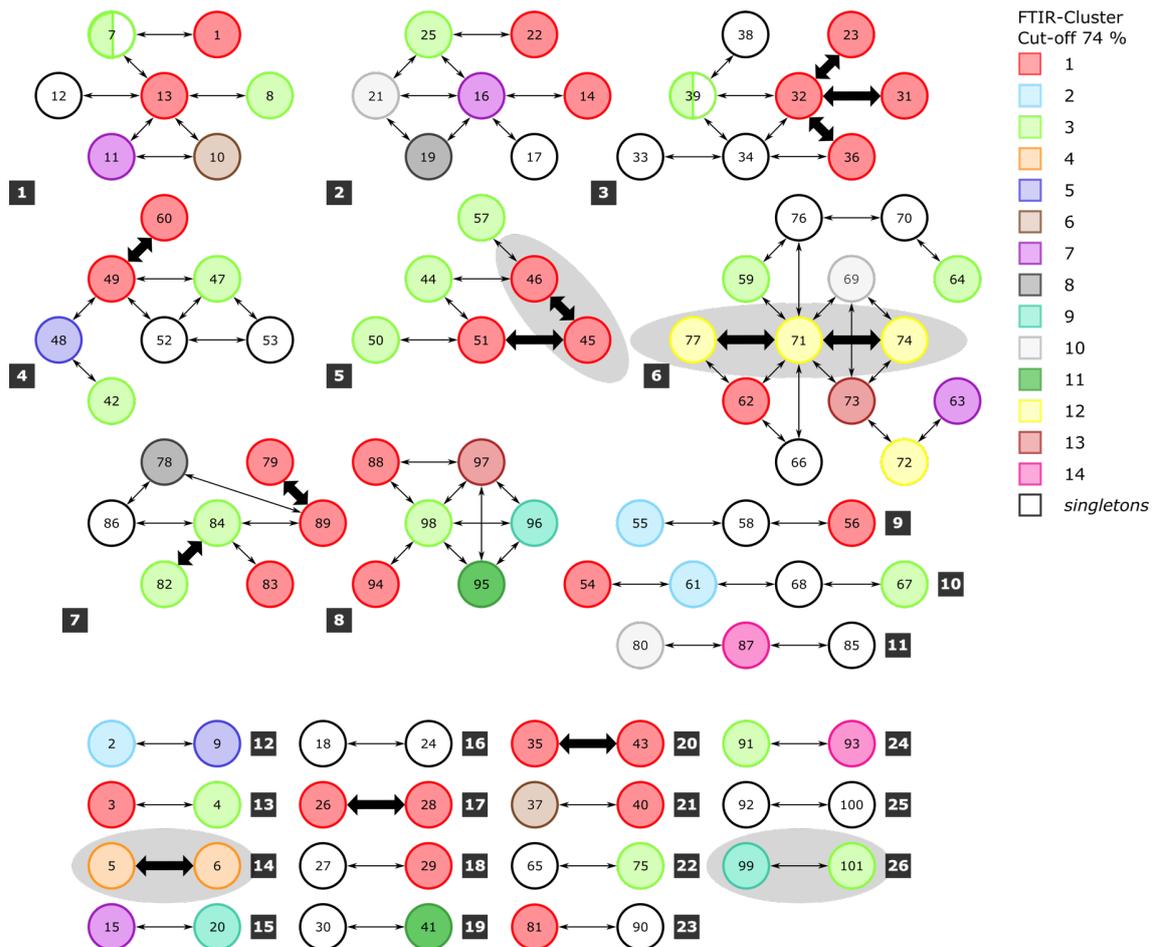


Abbildung 10: Potenzielle Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten der 101 Patienten, von welchen die *E. coli*-Isolate stammen. Die Patienten sind als Nummern kodiert und ihre Anordnung den Kontaktgruppen angepasst. Die Kontaktdaten ermöglichten die Einteilung der Patienten in 26 Kontakt-Cluster, wobei ein Patient einem Cluster zugeordnet wurde, wenn er mit mindestens einem anderen Patienten aus diesem Cluster Kontakt hatte. Die Nummern der Kontakt-Cluster sind in schwarzen Kästchen dargestellt. Zusätzlich sind die FTIR-Cluster (*Cut-off*-Wert bei 74,0 % Ähnlichkeit) verschiedenfarbig dargestellt. Von zwei Patienten liegen mehrere Isolate vor, in diesen Fällen wurde der zugehörige Kreisinhalt aufgeteilt. Die 94 epidemiologisch vermuteten Transmissionen zwischen Patienten sind mit einem Doppelpfeil dargestellt. In 13 Fällen wurden Isolate einer Kontaktgruppe demselben FTIR-Cluster zugeordnet, eine Transmission wurde somit auf Grundlage von Epidemiologie und FTIR-Spektroskopie vermutet. Die Doppelpfeile zwischen den betroffenen Isolaten sind verdickt dargestellt. In allen anderen Fällen wurde eine Transmission auf Basis der FTIR-Cluster nicht angenommen, hier sind die Doppelpfeile dünn dargestellt. Als Referenz sind die fünf in der SNP-Analyse verifizierten Transmissionen grau hinterlegt.

Zudem wurde die Typisierung mittels FTIR-Spektroskopie bei einem *Cut-off*-Wert von 92,0 % untersucht. In Abbildung 11 sind alle Patientenkontakte und die Zuteilung der Isolate zu FTIR-Clustern dargestellt. Kontakte zwischen Patienten, deren Isolate sich im selben FTIR-Cluster befinden, sind hervorgehoben. Alle drei auf Basis der FTIR-Spektroskopie angenommenen Transmissionen wurden durch die SNP-Analyse bestätigt. Ein Kontakt-Cluster beinhaltete unter diesen Bedingungen Isolate aus zwei bis maximal zehn FTIR-Clustern. Die Isolate eines FTIR-Clusters stammten von Patienten aus mindestens einem und maximal drei Kontakt-Clustern. In zwei Fällen waren alle Isolate eines FTIR-Clusters im selben Kontakt-Cluster enthalten (FTIR-Cluster Nr. 8 und 11). In keinem Fall gehörten die Isolate der Patienten eines Kontakt-Clusters demselben FTIR-Cluster an.

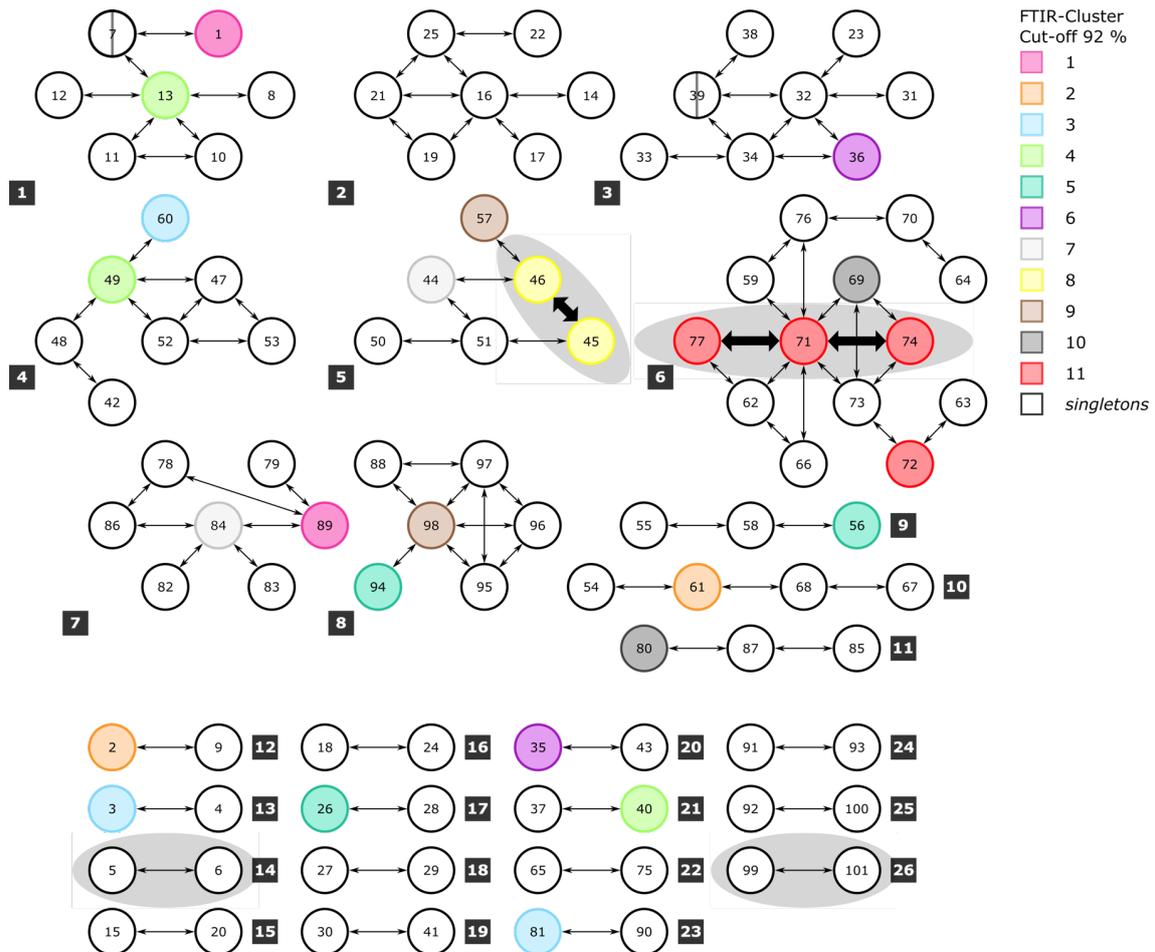


Abbildung 11: Potenzielle Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten der 101 Patienten, von welchen die *E. coli*-Isolate stammen. Die Patienten sind als Nummern kodiert und ihre Anordnung den Kontaktgruppen angepasst. Die Kontaktdaten ermöglichten die Einteilung der Patienten in 26 Kontakt-Cluster, wobei ein Patient einem Cluster zugeordnet wurde, wenn er mit mindestens einem anderen Patienten aus diesem Cluster Kontakt hatte. Die Nummern der Kontakt-Cluster sind in schwarzen Kästchen dargestellt. Zusätzlich sind die FTIR-Cluster (*Cut-off*-Wert bei 92,0 % Ähnlichkeit) verschiedenfarbig dargestellt. Von zwei Patienten liegen mehrere Isolate vor, in diesen Fällen wurde der zugehörige Kreisinhalt aufgeteilt. Die 94 epidemiologisch vermuteten Transmissionen zwischen Patienten sind mit einem Doppelpfeil dargestellt. In drei Fällen wurden Isolate einer Kontaktgruppe demselben FTIR-Cluster zugeordnet, eine Transmission wurde somit auf Grundlage von Epidemiologie und FTIR-Spektroskopie vermutet. Die Doppelpfeile zwischen den betroffenen Isolaten sind verdickt dargestellt. In allen anderen Fällen wurde eine Transmission auf Basis der FTIR-Cluster nicht angenommen, hier sind die Doppelpfeile dünn dargestellt. Als Referenz sind die fünf in der SNP-Analyse verifizierten Transmissionen grau hinterlegt.

### 3.2 Einfluss von Nährmedium und Inkubationszeit auf die FTIR-Spektren

#### 3.2.1 Einfluss des Nährmediums auf die FTIR-Spektren von *E. coli*-Isolaten

Um den Einfluss des Nährmediums auf die FTIR-Spektroskopie zu untersuchen, wurden elf *E. coli*-Isolate neben Columbia-Blutagar zusätzlich auf abweichenden Nährmedien kultiviert und wie im Methodenteil beschrieben mithilfe der FTIR-Spektroskopie analysiert. Die kulturelle Anzuchtung erfolgte auf Brain-Heart-Infusion-Agar, CLED-Agar, Endo-Agar, MacConkey-Agar, Müller-Hinton-Agar und Columbia-Blutagar als Vergleichsmedium. Die Kulturen wurden für 24 ( $\pm 0,5$ ) Stunden inkubiert und im Anschluss in 14 Messdurchläufen spektroskopisch analysiert. Hierbei wurden alle elf Isolate zeitgleich auf einem der Nährmedien kultiviert und auf derselben Trägerplatte vermessen, um die Bedingungen für die Untersuchung eines Nährbodens möglichst ähnlich zu halten. Von jedem Isolat lagen pro Nährmedium zwölf Spektren vor. Spektren mit mangelhafter Qualität wurden vom IR Biotyper System ausgeschlossen, 19 Messdurchgänge wurden deshalb wiederholt. Messungen von Endo-Kulturen waren besonders häufig von unzureichender Qualität. Die mittlere Übereinstimmung der technischen Replikate betrug 93,0 %, die mittlere Übereinstimmung der biologischen Replikate bei 89,7 %. Die Übereinstimmung der in einem biologischen Replikat enthaltenen Spektren lag hier immer bei mindestens 85,0 %.

Die Summenspektren der auf den alternativen Nährböden gewachsenen Kulturen wurden für jedes Isolat mit den FTIR-Spektren der auf Columbia-Agar gewachsenen Kulturen verglichen: Mithilfe von BioNumerics wurde die Ähnlichkeit der Spektren ermittelt, was einen Vergleich zwischen den Nährmedien ermöglicht. In Tabelle 11 ist eine zusammenfassende Matrix zu sehen, die die Mittelwerte der einzelnen Isolate enthält und so einen Überblick über die Ähnlichkeit der Nährmedien gibt. Im Vergleich zum Standard-Nährmedium Columbia-Blutagar konnte durch Kultivierung auf Brain-Heart-Infusion- und Müller-Hinton-Agar die höchste Ähnlichkeit der Spektren erzielt werden. Die größte Abweichung entstand bei Verwendung von MacConkey-Agar. Zusammenfassend zeigt sich für die nicht-selektiven Nährmedien Brain-Heart-Infusion-Agar und Müller-Hinton-Agar eine gute Übereinstimmung mit Columbia-Blutagar, während die selektiven Nährmedien Endo-, MacConkey- und CLED-Agar ledig-

lich unter 70 % Übereinstimmung erzielen konnten. Ein möglicher Grund für diese Differenz ist der Einfluss der unterschiedlichen Inhaltsstoffe auf den Metabolismus der Bakterienstämme, der in der FTIR-Spektroskopie mitabgebildet wird. Für die Routineanwendung der FTIR-Spektroskopie ist eine hohe Vergleichbarkeit der Kultivierungsbedingungen erwünscht, weshalb sich die verschiedenen nicht-selektiven Nährmedien gut für den Einsatz im klinischen Alltag eignen.

Tabelle 11: Übersicht mit Mittelwerten aller Isolate – Ähnlichkeit der Isolatspektren nach Inkubation auf unterschiedlichen Nährböden [%]. Die Isolate wurden für 24 ( $\pm 0,5$ ) Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar, CLED-Agar, Endo-Agar, MacConkey-Agar, Müller-Hinton-Agar und Columbia-Blutagar inkubiert und im Anschluss jeweils mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die prozentuale Übereinstimmung der Summenspektren wurde für jedes Isolat errechnet, die Mittelwerte kalkuliert und in dieser Matrix zusammengefasst.

Abkürzungen: Brain-Heart = Brain-Heart-Infusion-Agar, CLED = CLED-Agar, Endo = Endo-Agar, MacConkey = MacConkey-Agar, Müller-Hinton = Müller-Hinton-Agar, ColS+ = Columbia-Blutagar.

### 3.2.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die FTIR-Spektren von *E. coli*-Isolaten

Da neben dem Nährmedium auch die Inkubationszeit Einfluss auf die FTIR-Spektren hat, wurden die Kulturen einiger *E. coli*-Isolate statt 24 ( $\pm 0,5$ ) Stunden für einen längeren bzw. kürzeren Zeitraum inkubiert. Folgendes Schema wurde zugrunde gelegt: Vier Isolate wurden für sechs, acht und 24 ( $\pm 0,5$ ) Stunden inkubiert, drei Isolate für 16, 18, 20, 22, 24 und 26 ( $\pm 0,5$ ) Stunden und sieben Isolate für 24, 48 und 72 ( $\pm 0,5$ ) Stunden. In jedem Experiment wurden somit Spektren von für 24 ( $\pm 0,5$ ) Stunden inkubierten Kulturen vermessen, um einen Vergleich zwischen den Experimenten zu ermöglichen. Die Anzahl der gewählten Isolate wurde auf die Größe der Trägerplatte abgestimmt. Die Isolate MRGN5487, MRGN5508 und MRGN5509 waren in allen Experimenten enthalten und sind somit gut geeignet für einen übergreifenden Vergleich. Alle Ansätze eines Experimentes wurden zeitgleich und auf derselben Trägerplatte vermessen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Spektren zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Kulturen in 15 Messdurchläufen mittels FTIR-

Spektroskopie analysiert, sieben Messdurchläufe wurden wegen mangelhafter Qualität wiederholt. Von jedem Isolat lagen pro Inkubationszeit zwölf Spektren vor. Die mittlere Übereinstimmung der technischen Replikate betrug 92,2 %, die mittlere Übereinstimmung der biologischen Replikate bei 88,6 %. Die Übereinstimmung der in einem biologischen Replikat enthaltenen Spektren betrug immer mindestens 85,0 %. Die FTIR-Spektren der Kulturen mit alternativen Inkubationszeiten wurden für jedes Isolat mit den FTIR-Spektren der für 24 Stunden inkubierten Kulturen verglichen und die Ähnlichkeit der Spektren mithilfe von BioNumerics ermittelt.

Wenn die Inkubationszeit der Isolate möglichst gering gehalten werden kann, wird der Typisierungsprozess verkürzt und somit der routinemäßige Einsatz der FTIR-Spektroskopie vereinfacht. Um das sehr geringe Kulturwachstum bei kurzen Inkubationszeiten auf Columbia-Blutagar zu berücksichtigen, erfolgte die Inkubation für sechs, acht und 24 Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar. Für acht und 24 Stunden Inkubationszeit wurde zusätzlich auf Columbia-Blutagar inkubiert, um eine Vergleichbarkeit mit den folgenden Experimenten zu gewährleisten. In Tabelle 12 ist eine zusammenfassende Matrix zu sehen, die die Mittelwerte der einzelnen Isolate enthält und so einen Überblick über den Einfluss verschiedener Inkubationszeiten auf die FTIR-Spektren gibt. Im Vergleich zu den Standardbedingungen (Inkubation für 24 Stunden auf Columbia-Blutagar) konnte durch Inkubation für 24 Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar und durch Inkubation für acht Stunden auf Columbia-Blutagar die größte Ähnlichkeit der Spektren erreicht werden. Bei Inkubation für sechs Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar zeigte sich die größte Abweichung von den Standardbedingungen.

Tabelle 12: Übersicht mit Mittelwerten aller Isolate – Ähnlichkeit der Isolatspektren nach Inkubation für sechs, acht und 24 Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar bzw. für acht und 24 Stunden auf Columbia-Blutagar [%]. Nach Inkubation wurden die Isolate mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die prozentuale Übereinstimmung der Summenspektren wurde für jedes Isolat errechnet, die Mittelwerte kalkuliert und in dieser Matrix zusammengefasst.

Abkürzungen: Brain-Heart = Brain-Heart-Infusion-Agar, ColS+ = Columbia-Blutagar.

	6h Brain-Heart	8h Brain-Heart	24h Brain-Heart	8h ColS+
8h Brain-Heart	90,6			
24h Brain-Heart	74,2	78,3		
8h ColS+	78,5	81,0	78,3	
24h ColS+	64,1	67,9	82,9	78,8

Um die FTIR-Spektroskopie routinemäßig zur Transmissionssurveillance einsetzen zu können, sollte ihre Anwendung möglichst unkompliziert gehalten werden. Dafür ist beispielsweise interessant, wie viel Abweichung von der Standard-Inkubationszeit tolerabel ist, ohne die Typisierungsergebnisse zu verfälschen. Im Folgenden wurden deshalb Inkubationszeiten in relativ geringem Abstand zum Standard von 24 Stunden untersucht. Die Isolate wurden hierfür für 16, 18, 20, 22, 24 und 26 Stunden auf Columbia-Blutagar inkubiert und mithilfe der FTIR-Spektroskopie analysiert. In Tabelle 13 ist eine zusammenfassende Matrix zu sehen, die die Mittelwerte der einzelnen Isolate enthält und so einen Überblick über den Einfluss der verschiedenen Inkubationszeiten auf die FTIR-Spektren gibt. Für alle untersuchten Inkubationszeiten zeigten die Spektren eine Ähnlichkeit von über 90 % mit den unter Standardbedingungen generierten Spektren (Inkubation für 24 Stunden auf Columbia-Blutagar). Die größte Ähnlichkeit zum Standard zeigten Isolatspektren im Mittel nach Inkubation für 20 bzw. 26 Stunden.

Tabelle 13: Übersicht mit Mittelwerten aller Isolate – Ähnlichkeit der Isolatspektren nach Inkubation für 16, 18, 20, 22, 24 und 26 Stunden [%]. Die Isolate wurden nach der Inkubation mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die prozentuale Übereinstimmung der Summenspektren wurde für jedes Isolat errechnet, die Mittelwerte kalkuliert und in dieser Matrix zusammengefasst.

Um das breite Spektrum der Inkubationszeiten vollständig abzudecken, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob besonders lange Inkubationszeiten einen Einfluss auf die Ähnlichkeit der Spektren haben. Die Isolate wurden deshalb für 24, 48 und 72 Stunden auf Columbia-Blutagar inkubiert und die Ähnlichkeit der Isolatspektren bestimmt. In Tabelle 14 ist eine zusammenfassende Matrix zu sehen, die die Mittelwerte der einzelnen Isolate enthält und so einen Überblick über den Einfluss besonders langer Inkubationszeiten auf die FTIR-Spektren gibt. Im Mittel zeigen die Spektren nach Inkubation für 48 oder 72 Stunden eine relativ geringe Übereinstimmung (< 80 %) mit dem Standard von 24 Stunden Inkubationszeit. Vergleicht man die Ähnlichkeit der Spektren nach 48 und 72 Stunden untereinander, zeigt sich mit über 85 % im Mittel hingegen eine relativ hohe Ähnlichkeit.

Tabelle 14: Übersicht mit Mittelwerten aller Isolate – Ähnlichkeit der Isolatspektren nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%]. Die Isolate wurden nach der Inkubation mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die prozentuale Übereinstimmung der Summenspektren wurde für jedes Isolat errechnet, die Mittelwerte kalkuliert und in dieser Matrix zusammengefasst.

Für eine zusammenfassende Beurteilung ist in Tabelle 15 ein Überblick über alle untersuchten Inkubationszeiten dargestellt. In jedem Experiment wurden alle Isolate einmal unter den Standardbedingungen (Inkubation für 24 Stunden auf Columbia-Blutagar) inkubiert und in einer gemeinsamen Messung mit den Kulturen mit variiertem Inkubationszeit spektroskopisch analysiert. So wurde ver-

sucht, eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit dem Standard zu gewährleisten. Im Vergleich zum Standard konnte durch eine Inkubation für 26 Stunden auf Columbia-Blutagar die größte Ähnlichkeit der Spektren erreicht werden. Insgesamt wiesen alle gering vom Standard abweichenden Inkubationszeiten im Zeitraum von 16 bis 26 Stunden eine Ähnlichkeit von über 90 % im Vergleich zu Standardbedingungen auf. Sowohl sehr lange (48 bzw. 72 Stunden) als auch sehr kurze Inkubationszeiten (sechs bzw. acht Stunden) erzielten lediglich eine Ähnlichkeit von unter 80 % im Vergleich zum Standard. Das zeigt, dass eine Variation der Inkubationszeit in geringem Rahmen (16-26 Stunden) im Routinebetrieb gut möglich wäre, was die Abläufe im Labor enorm vereinfachen würde. Eine Variation in größerem Maße, insbesondere eine stark verkürzte Inkubationszeit, scheint jedoch nicht sinnvoll, so dass die Durchführung der FTIR-Spektroskopie auf Basis dieser Ergebnisse weiterhin an zeitliche Limitationen gebunden ist. Insgesamt ist der Einfluss der gewählten Inkubationszeit auf die FTIR-Spektren klar erkennbar.

Tabelle 15: Übersicht mit Mittelwerten aller Isolate – Ähnlichkeit der Isolatspektren für alle untersuchten Inkubationszeiten im Vergleich zu den unter Standardbedingungen (Inkubation für 24 Stunden auf Columbia-Blutagar) ermittelten Spektren [%]. Die Isolate wurden nach der Inkubation mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die prozentuale Übereinstimmung der Summenspektren wurde für jedes Isolat errechnet, die Mittelwerte kalkuliert und in dieser Matrix zusammengefasst.

Abkürzungen: Brain-Heart = Brain-Heart-Infusion-Agar, ColS+ = Columbia-Blutagar.

	24h ColS+
6h Brain-Heart	64,1
8h Brain-Heart	67,9
24h Brain-Heart	82,9
8h ColS+	78,8
16h ColS+	91,4
18h ColS+	91,2
20h ColS+	93,9
22h ColS+	92,4
26h ColS+	94,1
48h ColS+	77,7
72h ColS+	66,8

### 3.3 Transmissionssurveillance von MRGN-*K. pneumoniae*

#### 3.3.1 Isolatauswahl

Neben den *E. coli*-Stämmen (siehe Kapitel 3.1) wurden 34 Isolate der Spezies *K. pneumoniae* untersucht. Die Isolate stammen von 33 Patienten aus acht Stationen bzw. Ambulanzen des Uniklinikums Tübingen und wurden im Zeitraum von April 2016 bis November 2017 aus Rachen- und Analabstrichen gewonnen. 14 der *K. pneumoniae*-Isolate wiesen ein 3MRGN-Resistenzmuster auf, 20 weitere Isolate waren vom Resistenzphänotyp 2MRGN-NeoPäd. Zudem wurden nur Isolate von Patienten ausgewählt, die Stationskontakt zu mindestens einem anderen eingeschlossenen Patienten hatten. Von einem Patienten wurden zwei Isolate ausgewählt, die bei der initialen Routinediagnostik ein unterschiedliches Antibiotogramm gezeigt hatten. Die *K. pneumoniae*-Isolate wurden mittels FTIR-Spektroskopie analysiert. Alle analysierten Isolate wurden in die weitere Auswertung miteinbezogen.

Vor Durchführung der FTIR-Spektroskopie wurde die Spezies der Isolate mithilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigt. Alle 34 Isolate wurden im ersten Durchgang sicher der Spezies *K. pneumoniae* zugeordnet.

#### 3.3.2 FTIR-Spektroskopie

##### 3.3.2.1 Erstellung und Analyse der FTIR-Spektren

Die 34 *K. pneumoniae*-Isolate wurden im Oktober 2018 mittels FTIR-Spektroskopie analysiert. Die kulturelle Anzucht der Isolate erfolgte auf Columbia-Agar mit einer Inkubationszeit von 18 ( $\pm 0,5$ ) Stunden. Analog zu den *E. coli*-Isolaten wurden von jedem Isolat zwölf Spektren erstellt. Spektren von ungenügender Qualität wurden durch das IR Biotyper System im Voraus ausgeschlossen und die Messung bei weniger als zwei verbleibenden Spektren eines biologischen Replikates mit einer neu abgeimpften Kultur wiederholt. Insgesamt waren sieben Messdurchläufe nötig, um von allen *K. pneumoniae*-Isolaten die erforderliche Anzahl an Spektren zu erstellen. Nach Ausschluss mangelhafter Spektren wurde die Messung des Isolates MRGN5289 wiederholt. Die eingeschlossenen Spektren wurden summiert, verglichen und ihre Übereinstimmung ermittelt. Die mittlere Übereinstimmung der technischen Replikate eines biologischen Replikates betrug 92,6 %, die mittlere Übereinstimmung der

drei biologischen Replikate eines Isolates lag bei 88,1 %. Alle in einem biologischen Replikat enthaltenen Spektren wiesen hierbei eine Übereinstimmung von mindestens 85,0 % auf.

#### 3.3.2.2 Berechnung von Clustern aus FTIR-Spektren

Die Einteilung der FTIR-Spektren in Cluster erfolgte mit einem *Cut-off*-Wert von 75,0 %, der bereits in einer Publikation von 2018 etabliert wurde (Dinkelacker et al., 2018). Auf diesem Weg wurden die *K. pneumoniae*-Isolate in 15 Cluster mit einem bis neun Isolaten eingeteilt (siehe Abbildung 12). Hierbei enthielten acht Cluster mindestens zwei Isolate und sieben Cluster lediglich ein Isolat (*Singltons*). Die meisten Isolate umfasste FTIR-Cluster Nr. 3 ( $n = 9$ ). Somit kommen acht Cluster für potenzielle Transmissionen infrage.

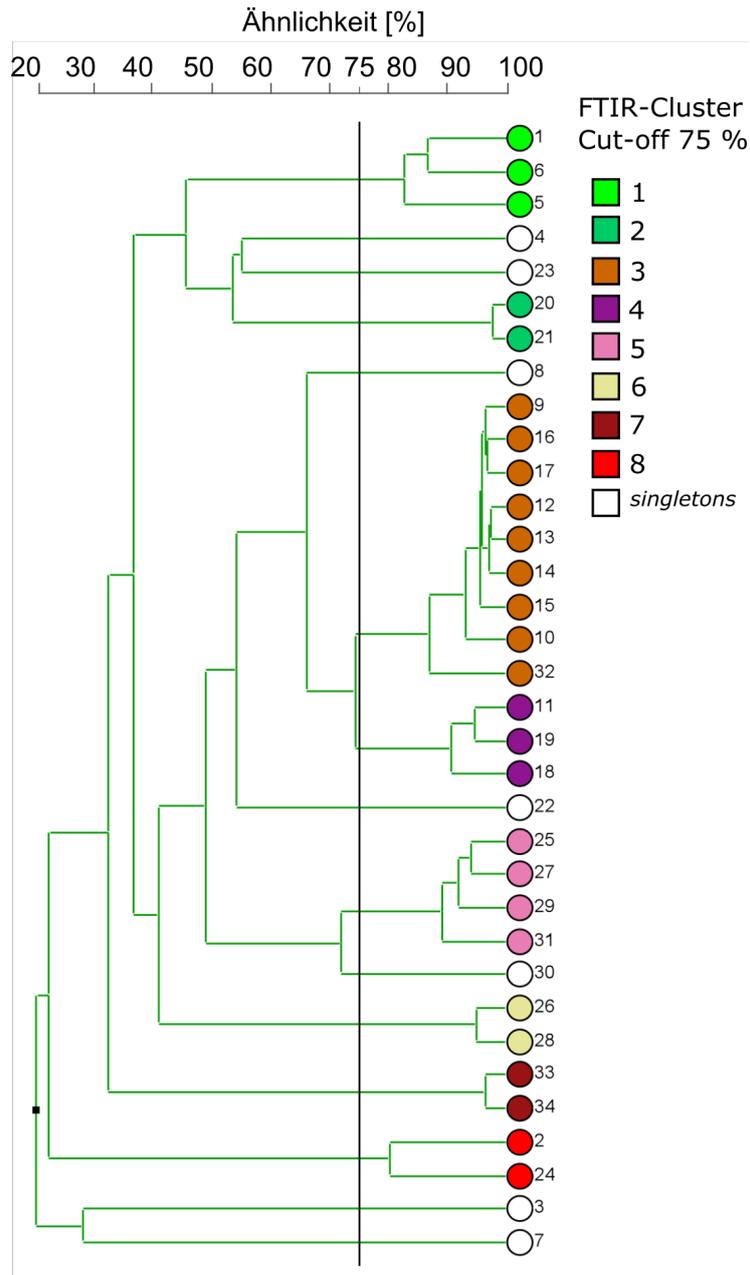


Abbildung 12: Phylogenie der 34 *K. pneumoniae*-Isolate auf Basis der FTIR-Spektren, Clusterbildung mithilfe der UPGMA-Methode. Der *Cut-off*-Wert für die Zugehörigkeit zu einem Cluster wurde bei 75,0 % Ähnlichkeit festgelegt. Die Cluster sind verschiedenfarbig dargestellt. Die Kennzeichnung der Isolate erfolgte anhand der Isolat-ID.

### 3.3.3 Transmissionssurveillance mit verschiedenen Typisierungsmethoden

#### 3.3.3.1 Transmissionssurveillance mit epidemiologischen Daten

Wie für die *E. coli*-Isolate eingehend beschrieben (siehe Kapitel 3.1.4), wurde anhand der Patientenkontakte auf potenzielle Transmissionen der *K. pneumoniae*-Stämme geschlossen. Anhand der epidemiologischen Informationen wurden neun Kontakt-Cluster mit jeweils zwei bis sieben Patienten erstellt. Die größte Patientengruppe stellt Kontakt-Cluster Nr. 3 ( $n = 7$ ) dar. Die epidemiologischen Verbindungen der 33 Patienten sind in Abbildung 13 dargestellt. Insgesamt lagen 37 Patientenkontakte und damit mögliche Transmissionen vor.

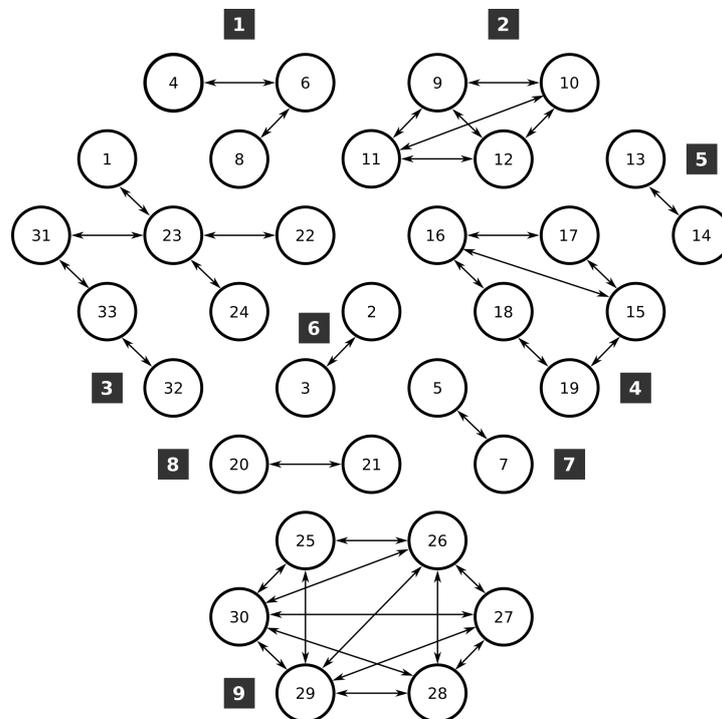


Abbildung 13: Potenzielle Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten der 33 Patienten, von welchen die *K. pneumoniae*-Isolate stammen. Die Patienten sind als Nummern kodiert und ihre Anordnung den Kontaktgruppen angepasst. Die 37 potenziellen Transmissionen zwischen Patienten sind mit einem Doppelpfeil dargestellt. Die Kontaktdaten ermöglichen die Einteilung der Patienten in neun Kontakt-Cluster, wobei ein Patient einem Cluster zugeordnet wurde, wenn er mit mindestens einem anderen Patienten aus diesem Cluster Kontakt hatte.

### 3.3.3.2 Transmissionssurveillance mit FTIR-Spektroskopie als Typisierungsmethode

Im Folgenden wurde analog zum Vorgehen bei den *E. coli*-Isolaten untersucht, inwiefern sich von epidemiologischen Daten suggerierte Transmissionen durch Anwendung der FTIR-Spektroskopie bestätigen ließen. Die Kontaktdaten der Patienten wurden mit der FTIR-Clustereinteilung der von ihnen isolierten *E. coli*-Stämme für einen *Cut-off*-Wert von 75,0 % kombiniert (siehe Abbildung 14). Kontakte zwischen Patienten, deren Isolate demselben FTIR-Cluster zugeordnet wurden, sind hervorgehoben. Zusätzlich ist die Einteilung in FTIR-Cluster farbig dargestellt. Ein Kontakt-Cluster enthielt hierbei Isolate aus einem bis sechs FTIR-Clustern, die Isolate eines FTIR-Clusters stammten von Patienten aus einem bis vier Kontakt-Clustern. In vier Fällen waren alle Isolate eines FTIR-Clusters im selben Kontakt-Cluster enthalten (FTIR-Cluster Nr. 2, 5, 6 und 7). In drei Fällen waren die Isolate der Patienten eines Kontakt-Clusters im selben FTIR-Cluster vertreten (Kontakt-Cluster Nr. 5, 7 und 8). Somit werden auf Basis von Epidemiologie und FTIR-Spektroskopie 17 von 33 möglichen Transmissionen als bestätigt angesehen.

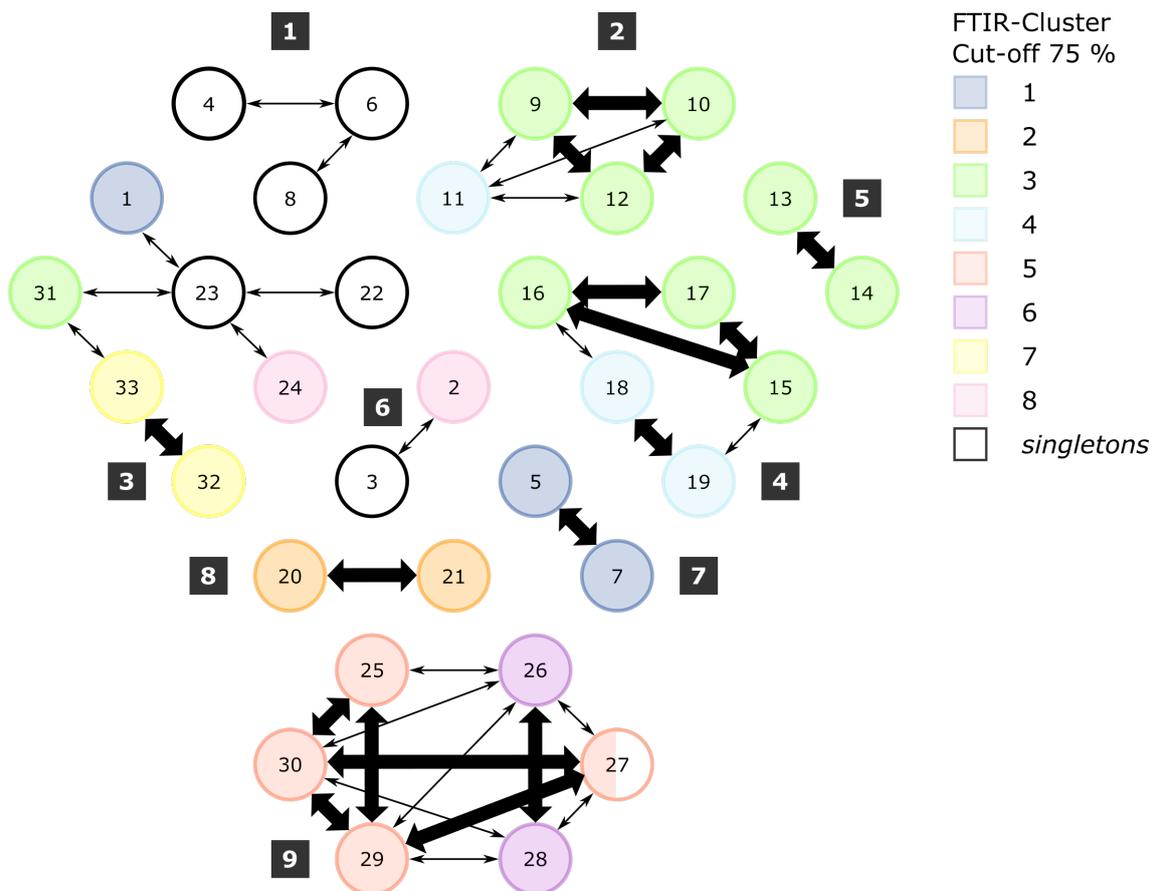


Abbildung 14: Potenzielle Transmissionen basierend auf epidemiologischen Daten der 33 Patienten, von welchen die *K. pneumoniae*-Isolate stammen. Die Patienten sind als Nummern kodiert und ihre Anordnung den Kontaktgruppen angepasst. Die Kontaktdaten ermöglichten die Einteilung der Patienten in 9 Kontakt-Cluster, wobei ein Patient einem Cluster zugeordnet wurde, wenn er mit mindestens einem anderen Patienten aus diesem Cluster Kontakt hatte. Zusätzlich sind die FTIR-Cluster (*Cut-off*-Wert bei 75,0 % Ähnlichkeit) verschiedenfarbig dargestellt. Von zwei Patienten liegen mehrere Isolate vor, in diesen Fällen wurde der zugehörige Kreisinhalt aufgeteilt. Die 37 epidemiologisch vermuteten Transmissionen zwischen Patienten sind mit einem Doppelpfeil dargestellt. In 17 Fällen wurden Isolate einer Kontaktgruppe demselben FTIR-Cluster zugeordnet, eine Transmission wurde somit auf Grundlage von Epidemiologie und FTIR-Spektroskopie vermutet. Die Doppelpfeile zwischen den betroffenen Isolaten sind verdickt dargestellt. In allen anderen Fällen wurde eine Transmission auf Basis der FTIR-Cluster nicht angenommen, hier sind die Doppelpfeile dünn dargestellt.

## 4 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Dissertation war es, die FTIR-Spektroskopie als Methode zur Transmissionssurveillance von Bakterienstämmen im klinischen Kontext zu evaluieren. Mithilfe der FTIR-Spektroskopie wurden Isolate auf Subspeziesebene typisiert und die Spektren hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit beurteilt. Es erfolgte jeweils der Vergleich mit der WGS-basierten SNP- und MLST-Analyse als etablierte Referenzmethoden. Zusätzlich wurde der Einfluss des Nährmediums und der Inkubationszeit auf die Reproduzierbarkeit der Spektren untersucht. Die FTIR-Spektroskopie zeigte sich in dieser Studie als eine unkomplizierte und gut reproduzierbare Methode zur Subtypisierung von MRGN-*E. coli*- und MRGN-*K. pneumoniae*-Isolaten, allerdings war die Trennschärfe der FTIR-Spektroskopie der SNP-Analyse als Methode zur Transmissionssurveillance unterlegen. Die Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung mit der MLST-Analyse hing stark vom jeweiligen Sequenztyp ab. Die Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren wurde durch den Einsatz verschiedener nicht-selektiver Nährmedien und Variation der Inkubationszeit um wenige Stunden nicht signifikant eingeschränkt.

### 4.1 Transmissionssurveillance von MRGN-*E. coli* und MRGN-*K. pneumoniae*

#### 4.1.1 Isolatauswahl

Eine Besonderheit dieser Arbeit ist die Verwendung von MRGN-Stämmen, da die Typisierung und Überwachung multiresistenter Stämme spezielle klinische Relevanz haben. Die Isolate entstammen keinem bestimmten Ausbruchsgeschehen, wie es bei anderen Studien der Fall ist (Martak et al., 2019; Vogt et al., 2019), sondern wurden innerhalb des Jahres 2017 gewonnen. Mit dieser Konstellation wurde angestrebt, ein möglichst breites Spektrum an Stämmen aus dem klinischen Alltag abzudecken. Die Grundvoraussetzung für die Auswahl eines Stammes war das Vorliegen eines Kontaktes mit einem anderen eingeschlossenen Patienten, womit ein Minimum an epidemiologischen Verbindungen gewährleistet war und der Vergleich der untersuchten Typisierungsmethoden mit epidemiologischen Daten ermöglicht wurde.

Als Patientenkontakt wurde der Umstand definiert, dass zwei Patienten im selben Zeitraum auf derselben Station untergebracht waren und bei mindestens einem der beiden Patienten der Erstdnachweis des MRGN-Stammes innerhalb von 28 Tagen nach dem Kontakt erfolgte. Auf diese Weise sollte vermieden werden, dass beide beteiligten Patienten den Bakterienstamm bereits ambulant erworben hatten und nur zufällig Kontakt hatten. Hierbei war es allerdings keine Bedingung, dass dem Erstdnachweis ein negativer Abstrich vorausgegangen war, so dass eine Infektion oder Kolonisierung zu einem früheren Zeitpunkt nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Insgesamt resultierte eine Auswahl von 103 *E. coli*-Isolaten aus den genannten Kriterien. Von zwei Patienten (Patienten-ID 7 und 39) wurden weiterhin zwei Isolate in der Auswertung eingeschlossen, die Unterschiede in der SNP-Analyse zeigten und damit nicht klonal waren. Die Isolate wurden von 101 Patienten auf 28 Stationen bzw. Ambulanzen gewonnen. Von einer Station stammten Isolate von bis zu 26 Patienten. Für die Isolate, die von der Station mit den meisten eingeschlossenen Patienten stammten, konnte in der SNP- und MLST-Analyse kein besonderer Zusammenhang gezeigt werden.

Die 34 untersuchten *K. pneumoniae*-Stämme wurden von 33 Patienten aus acht Stationen bzw. Ambulanzen gewonnen. 20 der *K. pneumoniae*-Isolate stammten von der neonatologischen Abteilung und wiesen den Resistenzphänotyp 2MRGN-NeoPäd auf, die übrigen Isolate waren 3MRGN-Stämme.

#### 4.1.2 Ganzgenomsequenzierung

##### 4.1.2.1 MLST-Analyse

Für die untersuchten *E. coli*-Stämme ergab die MLST-Analyse eine Verteilung auf 22 bekannte und zwei nicht identifizierbare bzw. unbekannte Sequenztypen. ST131 war mit 43 Isolaten und einem prozentualen Anteil von 41,7 % aller untersuchten MRGN-*E. coli* mit Abstand am häufigsten repräsentiert, gefolgt von ST410 mit 11 enthaltenen Isolaten. In einer Arbeit von 2017 wurden ebenfalls 127 nosokomial gewonnene *E. coli*-Isolate untersucht, die eine Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation aufwiesen. Auch hier war ST131 mit einem Anteil von 32,3 % aller untersuchten nosokomialen Isolate dominant, mit

einigem Abstand gefolgt von ST410 und ST10. Es wurden außerdem Proben ambulanter Populationen typisiert, die eine ähnliche Verteilung aufwiesen. Zusammenfassend dominierte ST131 mit einem Gesamtanteil von 35,8 % aller untersuchten Isolate und auch die Sequenztypen ST410, ST10 und ST38 wurden vergleichsweise häufig nachgewiesen (Pietsch et al., 2017). Diese Verteilung ist kongruent mit den Sequenztypen der hier untersuchten Stammauswahl.

#### 4.1.2.2 SNP-Analyse

Die SNP-Analyse bildet die genetische Verwandtschaft der untersuchten *E. coli*-Stämme in einer wesentlich höheren Auflösung ab als die MLST-Bestimmung, die lediglich auf sieben Genloci basiert. Auf der SNP-Analyse basierende Cluster wurden bei einer Differenz von weniger als sieben SNPs definiert, was auch der Größenordnung des *Cut-off*-Wertes in anderen Studien entspricht (Lee et al., 2019; Treacy et al., 2019). Für die untersuchten MRGN-*E. coli* ergab sich ein heterogenes Bild mit sehr vielen *Singletons* ( $n = 80$ ) und insgesamt kleinen Clustergrößen mit maximal vier zugehörigen Isolaten. Somit kommen auf Basis der SNP-Analyse nur in den neun Clustern, die mindestens zwei Isolate enthalten und somit mindestens zwei Patienten repräsentieren, Transmissionen infrage. Potenzielle Ausbrüche oder Übertragungen in Gruppen mit mehr als vier Patienten konnten anhand der SNP-Analyse nicht festgestellt werden.

#### 4.1.3 FTIR-Spektroskopie

Herausragende Vorteile der FTIR-Spektroskopie sind neben den geringen Kosten die einfache Handhabung und die kurze Dauer der Durchführung (Novais et al., 2019). Die Vorbereitung und Messung der bereits aufgetauten Proben nahm ungefähr 26 bzw. 20 Stunden in Anspruch, die sich aus 24 bzw. 18 Stunden Inkubation auf Columbia-Blutagar und circa zwei Stunden Vorbereitung bzw. Erstellung der FTIR-Spektren zusammensetzen. Als Probenmaterial wurde lediglich eine Bakteriensuspension in Ethanol und destilliertem Wasser benötigt, eine Destruktion der Bakterienzellen ist für die FTIR-Spektroskopie nicht erforderlich (Naumann et al., 1991). Auf diese Weise wurde ein minimaler

Arbeitsaufwand gewährleistet. Der für die Erstellung der Spektren gewählte Transmissionsmodus ermöglicht die Analyse von mehreren Proben pro Messdurchgang und bietet einen guten Kontrast des detektierten Signals zum Hintergrund, geht allerdings durch die nicht exakt reproduzierbare Befüllung der Probenfelder mit einer etwas größeren Variabilität der Spektren einher (Novais et al., 2019).

Basierend auf der Qualitätsprüfung des IR Biotyper® Systems wurden drei Messdurchgänge wegen Qualitätsmängeln wiederholt. Die häufigste Ursache für qualitative Mängel stellte eine unzureichende Absorption dar, die in der Regel durch eine zu geringe Konzentration der Bakteriensuspension verursacht wurde und sich bei Wiederholung der Messung leicht korrigieren ließ. Die FTIR-Spektroskopie zeigte sich somit in der Anwendung unkompliziert und robust, für die Durchführung war kein spezifisch geschultes Fachpersonal erforderlich. Da nur eine geringe Probenmenge benötigt wurde, gelang die Messung auch bei Bakterienstämmen, die nur geringes Wachstum zeigten. Die Stabilität der FTIR-Spektren über verschiedene Kulturen eines Isolates bzw. verschiedene Messdurchläufe hinweg zeigt sich in der Übereinstimmung der Replikate von über 88,0 %. Insgesamt konnten bei der Vorbereitung, Erstellung und Analyse der FTIR-Spektren keine Unterschiede zwischen den Spezies *E. coli* und *K. pneumoniae* festgestellt werden. Die genannten Werte befinden sich in der gleichen Größenordnung wie die Übereinstimmung der in einer Publikation von 2018 untersuchten klinischen Klebsiellen-Isolate (Dinkelacker et al., 2018), was für eine konstant gute Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren spricht.

Die weitere Auswertung basierte auf der zweiten Ableitung der Spektren in der Region mit einer Wellenzahl von 1300-800  $\text{cm}^{-1}$ , die sich im Wellenzahlbereich der Polysaccharid- bzw. gemischten Region befindet. Diese Regionen ermöglichen die präziseste Diskrimination von Bakterienstämmen (Helm et al., 1991b). Für die *E. coli*-Isolate wurde der *Cut-off*-Wert für die Clusterzuteilung anhand des ARI durch einen Vergleich mit den Referenzmethoden bestimmt, um eine möglichst hohe Übereinstimmung und optimale Vergleichbarkeit zu erreichen. Die erreichten ARI für beide *Cut-off*-Werte (74,0 % und 92,0 %) lagen um 0,4 und damit in einem Bereich eher geringer Ähnlichkeit der Methoden. Ein ARI

von 1,0 entspricht einer vollständigen Übereinstimmung der Clustermethoden. Bei der Bewertung des ARI muss beachtet werden, dass eine ungleichmäßige Verteilung der Sequenztypen in der Isolatauswahl einen hohen ARI zum Ergebnis haben kann, obwohl die Clustermethode unzureichend ist. Wenn die FTIR-Clustereinteilung beispielsweise Isolate des dominanten ST131 korrekt zuordnet, Isolate der anderen Sequenztypen dagegen nicht ausreichend differenzieren kann, resultiert durch den großen Anteil von ST131-Stämmen in der Isolatauswahl ein hoher ARI, der die geringe Trennschärfe der Methode bei bestimmten Sequenztypen nicht widerspiegelt. Für den Vergleich von FTIR-Spektroskopie und SNP-Analyse für die *E. coli*-Isolate erfolgte eine zusätzliche Kalkulation ohne Isolate, die in der SNP-Analyse als *Singletons* klassifiziert wurden, wodurch der ARI bei einem optimalen *Cut-off*-Wert von 88,0 % auf 0,670 erhöht werden konnte. Bei diesem zusätzlichen Vergleich wurden nur Isolate berücksichtigt, denen basierend auf der SNP-Analyse potenzielle Transmissionen zugrunde lagen. So sollte der Vergleich auf die aus krankenhaushygienischer Sicht relevanten Isolate begrenzt werden. Zwar ist dieses Vorgehen nicht für die Routinediagnostik anwendbar, wenn die FTIR-Spektroskopie als alleiniges Surveillance-Verfahren eingesetzt werden soll, allerdings zeigt es, dass im Ausbruchsfall durch die hohe genetische Ähnlichkeit der Isolate bzw. große Anzahl an potenziellen Transmissionen eine bessere Annäherung der FTIR-Typisierung an die Referenzmethode möglich sein könnte.

Für die *K. pneumoniae*-Stämme wurde in einer Publikation von 2018 ein *Cut-off*-Wert von 75,0 % etabliert und hier für die Clustereinteilung zugrunde gelegt (Dinkelacker et al., 2018). Im Vergleich zu den bei einem *Cut-off*-Wert von 74,0 % typisierten *E. coli*-Isolaten war der Anteil der *Singletons* für die *K. pneumoniae*-Isolate vergleichbar (24 % der *E. coli*-Isolate bzw. 21 % der *K. pneumoniae*-Isolate), ebenso der Anteil des größten Clusters an der Gesamtzahl der Isolate (31 % der *E. coli*-Isolate bzw. 26 % der *K. pneumoniae*-Isolate). Zusammenfassend konnten bei den FTIR-Clustereinteilungen der zwei untersuchten Spezies keine wesentlichen Unterschiede beobachtet werden.

Die *K. pneumoniae*-Clustereinteilung ähnelt den Ergebnissen der oben genannten Publikation: Für diese wurden 68 klinische Klebsiellen-Isolate untersucht, die bei einem äquivalenten *Cut-off*-Wert von 75,0 % in 28 Cluster mit maximal acht Isolaten eingeteilt wurden. Der Anteil der *Singletons* betrug (ähnlich unseren Ergebnissen) 24 %. Zusätzlich wurde eine hohe Übereinstimmung mit der SNP-Phylogenie beobachtet (Dinkelacker et al., 2018). In einer Studie von 2020 wurden 18 ESBL-produzierende *K. pneumoniae*-Isolate von Neugeborenen und ihren Müttern typisiert, die einem Ausbruch auf der neonatologischen Intensivstation entstammten. Bei einer Distanz von 0,037 als *Cut-off*-Wert (nach eigener Berechnung entsprechend einer Ähnlichkeit der Spektren von 96,3 %) zeigte sich ein dominanter Ausbruchsklon und sechs weitere kleine Cluster. Diese Einteilung stimmte bis auf ein Isolat mit den mithilfe der *Core Genome* MLST (cgMLST)-Analyse ermittelten Sequenztypen der Isolate überein, bei einem *Cut-off*-Wert von 0,046 (entsprechend 95,4 % Ähnlichkeit) konnte eine vollständige Übereinstimmung der Einteilung erreicht werden (Rakovitsky et al., 2020). Im Vergleich der beschriebenen Ergebnisse zeigt sich die weitaus engere Verwandtschaft von Ausbruchs-Isolaten im Gegensatz zu Isolaten aus Routineabstrichen.

#### 4.1.3.1 Vergleich von FTIR-Spektroskopie und MLST-Analyse

Die FTIR-Clustereinteilung bei einem *Cut-off*-Wert von 74,0 % wurde mit der Einteilung in Sequenztypen auf Basis der Ganzgenomsequenzierung verglichen. Hierbei konnte nicht immer eine eindeutige Zuordnung von FTIR-Clustern zu Sequenztypen erfolgen. Der dominante Sequenztyp ST131 war zu 90,7 % in den FTIR-Clustern 1 und 3 repräsentiert und für einige kleinere Sequenztypen (ST46, ST405, ST1193) stimmte die Einteilung vollständig mit den FTIR-Clustern überein. Bei anderen Sequenztypen (ST10, ST69, ST73) war keines der enthaltenen Isolate im FTIR-Dendrogramm korrekt typisiert. Der ARI stellt einen guten Indikator für die Ähnlichkeit der Clustereinteilungen dar: Bei einem optimalen *Cut-off*-Wert von 74,0 % für die FTIR-Cluster lag der ARI dennoch bei einem vergleichsweise geringen Wert von 0,416. Durch die Anpassung des *Cut-off*-Werts konnten die Sequenztypen nur unzureichend im FTIR-

Dendrogramm abgebildet werden, die Übereinstimmung der Methoden hing stark vom jeweiligen Sequenztyp ab.

Die variable Übereinstimmung der einzelnen Sequenztypen mit der FTIR-Typisierung wurde auch in einer Publikation von 2014 festgestellt: Bei der Analyse von 95 uropathogenen *E. coli*-Stämmen konnte für ST131-Stämme eine hohe Übereinstimmung erzielt werden (91 %), Isolate des ST10 und ST73 wurden lediglich in unter 40 % der Fälle korrekt diskriminiert (Dawson et al., 2014). Diese Prozentwerte bewegen sich in einer ähnlichen Größenordnung wie die Übereinstimmung der hier untersuchten Isolate, was die Vermutung nahelegt, dass es sich um ein stabiles Phänomen handelt. In einer Studie von 2013 konnte mithilfe der FTIR-Spektroskopie eine hundertprozentige Diskrimination von ST131-Isolaten gegenüber Isolaten anderer Sequenztypen (u.a. ST69, ST405) erreicht werden. Für ST69- und ST405-Isolate wurde eine ähnlich gute Diskrimination gezeigt, was nur in Teilen den hier beschriebenen Ergebnissen entspricht (Sousa et al., 2013).

Als mögliche Ursache für die Sequenztyp-abhängige Genauigkeit der FTIR-Typisierung wurde die bekannte phänotypische Variabilität zwischen den *E. coli*-Sequenztypen aufgeführt (Dawson et al., 2014). So ist beispielsweise für uropathogene Isolate vom Sequenztyp ST131 ein besonders hohes metabolisches Potenzial und daraus folgend eine hohe Virulenz festgestellt worden, was die klare Abgrenzung von ST131-Isolaten gegenüber anderen Sequenztypen mit phänotypischen Methoden erklären könnte (Gibreel et al., 2012). Auch innerhalb der Sequenztypen (inklusive ST131) wurde eine große phänotypische und genotypische Diversität beobachtet, beispielsweise bezüglich des Antibiotikaresistenz-Profils oder des O- und K-Antigenlocus (Clark et al., 2012; Alqasim et al., 2014). Die MLST-Analyse hat gemäß einem Review-Artikel von 2019 somit eine geringere Trennschärfe als die SNP-Analyse oder auch die FTIR-Spektroskopie, was bei der Bewertung der hier gezeigten Ergebnisse berücksichtigt werden sollte (Novais et al., 2019). In einer Publikation von 2013 zeigte sich, dass die FTIR-Spektroskopie Sequenztypen, die sich nur in einem Allel unterschieden (*Single Locus Variants*, SLV), nicht differenzieren konnte. Die Autorinnen und Autoren postulierten deshalb, dass die FTIR-Typisierung

über eine niedrigere Auflösung als die MLST-Analyse verfügt, und kamen zu dem Schluss, dass die FTIR-Clustereinteilung ihrer Isolate zwar mit deren Sequenztypen und phylogenetischen Gruppen übereinstimmte, aber weder mit der Einteilung mittels PFGE noch dem Antibiotikaresistenz-Profil oder den Virulenzgenen korrelierte. Deshalb wurde in Betracht gezogen, dass die FTIR-Spektroskopie andere, stabilere Merkmale der Bakterienstämme als die genannten Profile darstelle (vgl. Sousa et al., 2013). Merkmale, die durch die FTIR-Spektroskopie abgebildet werden, sind beispielsweise Komponenten der gramnegativen Zellwand oder der bakteriellen Kapsel wie die O- oder K-Antigene (Helm et al., 1991b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschiedenen Sequenztypen unterschiedlich gut im FTIR-Dendrogramm abgebildet werden. Die FTIR-Spektroskopie scheint nach den hier beschriebenen Ergebnissen nicht in der Lage, die MLST-Analyse zu ersetzen. In die Diskussion sollte allerdings auch miteinbezogen werden, dass es sich bei der MLST-Analyse nicht um die Surveillancemethode mit der höchsten Trennschärfe handelt. Der folgende Vergleich mit der SNP-Analyse gibt mehr Aufschluss darüber, wie gut die FTIR-Spektroskopie für das Aufdecken von Klonalität geeignet ist.

#### 4.1.3.2 Vergleich von FTIR-Spektroskopie und SNP-Analyse

Für den Vergleich mit der hochauflösenden SNP-Analyse wurde ein wesentlich höherer *Cut-off*-Wert von 92,0 % für die FTIR-Clustereinteilung zugrunde gelegt. Die dominierenden SNP-*Singletons* waren zum Großteil auch im FTIR-Dendrogramm als *Singletons* abgebildet, allerdings waren nur zwei der SNP-Cluster auch korrekt als FTIR-Cluster dargestellt. Der ermittelte ARI für diese FTIR-Clustereinteilung im Vergleich zu der SNP-Typisierung beträgt 0,378, die Sensitivität und die Spezifität liegen bei 0,015 bzw. 0,998. Hierin zeigt sich eine unzureichende Übereinstimmung mit der Referenzmethode, die FTIR-Spektroskopie ist mit den hier verwendeten Voraussetzungen nicht in der Lage, klonale Beziehungen mit ausreichender Trennschärfe abzubilden.

Bei Betrachtung der SNP-Cluster, die im FTIR-Dendrogramm ebenfalls als Cluster definiert wurden (SNP-Cluster Nr. 4, 5, 8), fällt auf, dass diese zwar bei

der MLST-Analyse demselben Sequenztypen zugeordnet wurden, dort allerdings nicht als einzelnes Cluster erkennbar waren, sondern Bestandteil eines größeren Sequenztypen (u.a. ST131) waren. Für diese Isolate stellt die FTIR-Analyse (bei einem *Cut-off*-Wert von 92,0 %) eine spezifischere Typisierungsmethode als die MLST-Analyse dar.

Die unzureichende Studienlage zur FTIR-Spektroskopie mit der SNP-Analyse als Referenz lässt für *E. coli*-Stämme aktuell noch keinen Literaturvergleich zu, allerdings liegen Untersuchungen verwandter Spezies vor: Bei *Klebsiella spp.* zeigte die FTIR-Spektroskopie in Bezug auf die SNP-Phylogenie eine hohe Trennschärfe, in einer Publikation von 2018 konnten über 90 % der untersuchten Isolate korrekt typisiert werden. Die Klebsiellen-Isolate stammten ebenfalls aus Routineabstrichen und waren nicht an einen Ausbruch gebunden (Dinkelacker et al., 2018). Die Typisierung von *K. oxytoca*-Stämmen in einer Arbeit von 2016 zeigte ebenfalls eine hohe Übereinstimmung von FTIR, sowohl mit der SNP-Analyse als auch mit MLST und PFGE (Dieckmann et al., 2016). Bei der Untersuchung von Routine-Isolaten der Spezies *Enterobacter cloacae* wurde im Vergleich mit der SNP-Analyse ein ARI von 0,818 erzielt, was einer guten Übereinstimmung der FTIR-Spektroskopie mit der Referenzmethode entspricht. Zusätzlich wurden im Rahmen eines Ausbruchs 14 *Enterobacter cloacae*-Isolate typisiert, wobei das FTIR-Dendrogramm vollständig mit der SNP-Phylogenie übereinstimmte (Vogt et al., 2019).

Ein Review-Artikel von 2019 beschreibt mögliche Ursachen für die variable Genauigkeit der FTIR-Spektroskopie in der Literatur (Novais et al., 2019): Ein Faktor, der die Typisierungsergebnisse beeinflussen kann, ist die analysierte Wellenzahl-Region. In den von Helm et al. definierten spektralen Fenstern werden jeweils spezifische Stoffgruppen repräsentiert (Helm et al., 1991b), weshalb beispielsweise für die Typisierung des O-Antigens bevorzugt das Polysaccharid-Fenster ( $1200-900\text{ cm}^{-1}$ ) ausgewertet wird (Beutin et al., 2007). Es ist denkbar, dass die Übereinstimmung mit der WGS-Typisierung auch vom analysierten Wellenzahlbereich abhängig ist. Bei der Analyse des spektralen Bereiches von  $1500-900\text{ cm}^{-1}$  wurde eine Übereinstimmung von 100 % mit der

MLST-Typisierung erreicht (Sousa et al., 2013), in einer weiteren Publikation wurde hingegen der gesamte Wellenzahlbereich von 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  ausgewertet (Dawson et al., 2014). Für *E. coli* O157:H7 wurden verschiedene spektrale Fenster untersucht und für den Bereich von 1700-750  $\text{cm}^{-1}$  die einheitlichste Klassifikation festgestellt (Davis et al., 2012). Für die Typisierung von fünf *E. coli*-Stämmen auf Basis ihrer Lipopolysaccharide wurde im Bereich von 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  die beste Diskrimination erreicht (Kim et al., 2006).

Neben der Wellenzahlregion beeinflusst die Auswahl des chemometrischen Verfahrens den Erfolg der FTIR-Typisierung. Unüberwachte Methoden wie hierarchische Clusteranalyse (HCA) und Hauptkomponentenanalyse (PCA) eignen sich zur Diskrimination unbekannter Stämme. In dieser Arbeit wurde eine Variante der HCA, der UPGMA-Algorithmus, zur Clustererstellung eingesetzt. Besteht bereits Vorwissen zu Stämmen, kommen überwachte Methoden wie *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA), *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA) oder künstliche neuronale Netzwerke (ANN) zum Einsatz (Wenning und Scherer, 2013; Novais et al., 2019). Beim Vergleich der HCA mit den überwachten Methoden SIMCA und PLS-DA wurde festgestellt, dass bei Analyse durch die HCA einzelne Isolate einem falschen Sequenztyp zugeordnet wurden, während die überwachten Methoden durchgehend eine Sensitivität und Spezifität von 100 % erreichten (Sousa et al., 2013). Eine weitere Methode zur Clustererstellung ist die *Principal Component-Discriminant Function Analysis* (PC-DFA), die auf einer PCA (unüberwacht) und einer anschließenden *Discriminant Function Analysis* (DFA; überwacht) basiert. Die PCA alleine konnte die einzelnen Sequenztypen nicht differenzieren, in Kombination mit der DFA hingegen konnte eine klare Zuordnung zu Sequenztypen erfolgen, wofür zusätzlich eine getrennte Analyse einzelner Cluster erforderlich war. Ergänzend wurde eine PLS-DA durchgeführt, die die Sequenztypen von dem Modell unbekanntem Isolat vorherzusagen sollte. Die Genauigkeit der Vorhersagen war stark vom Sequenztyp des Isolates abhängig und lag für den ST131 bei über 90 % (Dawson et al., 2014). In der Studie von 2012 wurden *Canonical Variate Analysis* (CVA; überwacht) und HCA (unüber-

wacht) verglichen, wobei die HCA eine bessere Trennschärfe zeigte (Davis et al., 2012).

Zuletzt werden in dem genannten Review-Artikel die unterschiedlichen Merkmale der ausgewählten Isolate als Faktor erläutert, der zur Diversität der FTIR-Typisierungsergebnisse beiträgt (Novais et al., 2019). Dazu zählen beispielsweise die Anzahl der Stämme oder die Antibiotika-Empfindlichkeit, die ausgewählten Sequenztypen und phylogenetischen Gruppen oder die Virulenzfaktoren der Isolate. Bei den hier untersuchten 103 Isolaten handelt es sich um MRGN-Stämme. In eine Studie von 2013 wurden beispielsweise 88 Isolate der phylogenetischen Gruppen B2 und D eingeschlossen, darunter Hochrisikoklone und Mitglieder der Sequenztypen ST69, ST131, ST393 und ST405 (Sousa et al., 2013). In einer Arbeit von 2014 wurden 95 uropathogene *E. coli*-Isolate der häufigsten Sequenztypen (ST10, ST69, ST95, ST73, ST127 und ST131) untersucht (Dawson et al., 2014), in einer weiteren Studie wurden 30 Shigatoxinproduzierende *E. coli* O157:H7-Stämme typisiert (Davis et al., 2012). Die hier aufgeführten Studien deuten an, wie die Heterogenität der Stammauswahl die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschweren kann.

#### 4.1.4 Transmissionssurveillance mit verschiedenen Typisierungsmethoden

Aus den Aufenthaltsdaten der Patienten konnten mögliche Übertragungswege rekonstruiert werden. Für die 101 Patienten, von denen die hier untersuchten *E. coli*-Stämme isoliert wurden, ergaben sich insgesamt elf größere Kontaktgruppen ( $n = 3-13$ ), deren Patienten mit mindestens einem anderen Gruppenmitglied Stationskontakt hatten, und 15 Kontaktpaare, wenn nur zwei Patienten miteinander in Kontakt standen. Die Zimmerbelegung auf den einzelnen Stationen wurde nicht aufgeschlüsselt. Weiterhin wurde nicht berücksichtigt, ob einzelne bereits vor dem Krankenhausaufenthalt kolonisierte bzw. infizierte Patienten präventiv isoliert wurden, was jedoch die Übertragungswahrscheinlichkeit zu anderen Patienten auf derselben Station beeinflussen könnte. Die Reproduktionsrate antibiotikaresistenter *E. coli*-Stämme ist zwar nach Einschätzung der KRINKO im Krankenhaus relativ gering, allerdings führt eine nosokomiale Infektion im Unterschied zu einer reinen

Kolonisation zu einer erhöhten Mortalität (KRINKO, 2012), weshalb die Aufdeckung von Infektionsketten für den Krankheitsverlauf insbesondere von Risikopatienten entscheidend sein kann.

Für die 33 Patienten, von denen die untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate stammen, ergaben sich neun Kontakt-Cluster mit fünf größeren Patientengruppen ( $n = 3-7$ ). Für Isolate von neonatologischen Stationen ergaben sich deutlich mehr Patientenkontakte und damit mögliche Übertragungswege als bei den *E. coli*-Isolaten (z.B. Kontakt-Cluster Nr. 9). MRGN-Stämme der Spezies *K. pneumoniae* verbreiten sich bevorzugt nosokomial und weisen außerhalb eines Ausbruchgeschehens eher geringe Reproduktionsraten auf (Kola et al., 2007; KRINKO, 2012). Besonders auf neonatologischen Intensivstationen kommt es immer wieder zu Ausbrüchen antibiotikaresistenter Klone (Corbella et al., 2018; Chen et al., 2019; Rakovitsky et al., 2020).

Für die *E. coli*-Isolate wurden die Informationen zu Patientenkontakten mit der genetischen Phylogenie ihrer Isolate kombiniert, da die Epidemiologie allein keinen Aufschluss über Transmissionswege gibt. Die Möglichkeit einer Übertragung zwischen zwei Patienten besteht demnach, wenn die Patienten Kontakt hatten und ihre Isolate klonal waren, also demselben SNP-Cluster zugeordnet wurden. Das war bei fünf Patientenpaaren aus vier SNP-Clustern der Fall. In fünf weiteren SNP-Clustern (mit mindestens zwei Isolaten) fand sich kein Patientenkontakt und damit auch keine aus den bekannten Daten ersichtliche Übertragungsmöglichkeit. Hierbei könnte es sich beispielsweise um in der Bevölkerung verbreitete Klone handeln, die ohne Erstnachweis schon vor dem Krankenhausaufenthalt vorlagen. Denn die Einschlusskriterien der Isolate sehen nicht vor, dass zu Beginn des Krankenhausaufenthaltes ein negativer Kontrollabstrich vorliegen musste, weshalb eine ambulante Besiedelung der Patienten nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Außerdem ist denkbar, dass Übertragungen innerhalb des Klinikums auf durch die vorliegenden epidemiologischen Daten nicht erfassten Wegen erfolgt sind. In diesem Zusammenhang aufschlussreich wäre die Sequenzierung von Isolaten aus Routineabstrichen, die von Patienten ohne erfasste Kontakte stammen, um die

Prävalenz von klonalen Isolaten in einer Kontrollgruppe zu beurteilen. Insgesamt ließ sich nur eine kleine Anzahl möglicher Übertragungen feststellen, es lag kein Ausbruchsgeschehen vor.

Verschiedene Untersuchungen mikrobiologischer Routineabstriche in Krankenhäusern bestätigen diese geringe Übertragungsaktivität: Bei der Untersuchung von 24 *Enterobacter cloacae*-Isolaten aus Routineabstrichen von der Neugeborenen-Intensivstation wurden 18 SNP-Cluster ermittelt und wenig Anhalt für Übertragungen gesehen (Vogt et al., 2019). Die Typisierung von 68 Klebsiellen-Isolaten, die ebenfalls aus Routineabstrichen der Neugeborenen-Intensivstation stammten, ergab 29 SNP-Cluster, die auf keine Übertragungstätigkeit in großem Maßstab hinwiesen (Dinkelacker et al., 2018). In einer aus Israel stammenden Studie wurde hingegen eine Ausbruchssituation auf einer Neugeborenen-Intensivstation beschrieben. Hier wurden 18 ESBL-produzierende *K. pneumoniae*-Isolate typisiert und ein dominanter Klon sowie mehrere kleine WGS-Cluster definiert (Rakovitsky et al., 2020). Zusammenfassend passen die Ergebnisse unserer Transmissionssurveillance zur Studienlage für Routineabstriche, die Übertragungsaktivität war, wie zu erwarten, sehr niedrig.

Die epidemiologischen Daten der *E. coli*-Isolate in Kombination mit der MLST-Analyse konnten alle durch die SNP-Analyse bestätigten Übertragungen darstellen. Zusätzlich wurden 23 Übertragungen fälschlicherweise angenommen, wobei es sich bevorzugt um Isolate des dominanten ST131 handelte. Durch die hohe Prävalenz der betroffenen Sequenztypen ist eine Besiedelung unabhängig von Kontakten innerhalb des Klinikums wahrscheinlich. Im Vergleich mit der Anwendung der SNP-Analyse als Typisierungsmethode lässt sich zusammenfassend sagen, dass durch die MLST-Analyse häufig Isolate demselben Sequenztypen zugeordnet werden, ohne dass eine epidemiologische Basis dafür besteht. Für das Erkennen der wenigen Transmissionen außerhalb eines Ausbruchsgeschehens ist die MLST-Analyse somit nicht geeignet.

Für die Bewertung der FTIR-Spektroskopie als Surveillance-Instrument ist vor allem die Anzahl der korrekt angenommenen Übertragungen aussagekräftig. Für die *E. coli*-Isolate gilt folgendes: Bei Kombination der epidemiologischen Daten mit der FTIR-Spektroskopie (*Cut-off*-Wert bei 74,0 %) wurden vier von

fünf bestätigten Übertragungen dargestellt. Neun Übertragungen innerhalb der größten FTIR-Cluster (FTIR-Cluster Nr. 1 und 3) wurden fälschlicherweise angenommen. Aus diesen Daten lässt sich entnehmen, dass bei einem *Cut-off*-Wert von 74,0 % zwar ein ausreichender Nachweis der bestätigten Transmissionen erfolgt, aber auch hier häufig Isolate ohne epidemiologische Grundlage demselben FTIR-Cluster zugeordnet werden. Bei einem *Cut-off*-Wert von 92,0 % wurden drei von fünf bestätigten Transmissionen und keine falschen Übertragungen angenommen. Bei einem *Cut-off*-Wert von 92,0 % typisiert die FTIR-Spektroskopie somit zwar sehr spezifisch, allerdings besteht das Risiko stattgefundenen Übertragungen zu übersehen.

Diese Daten lassen eine zusammenfassende Bewertung der FTIR-Spektroskopie in Hinblick auf die wichtigste Funktion einer Surveillancemethode zu: Wie zuverlässig werden Transmissionen identifiziert? Es zeigt sich eindeutig, dass der *Cut-off*-Wert einen großen Einfluss auf die Qualität der Surveillance hat. Für die in dieser Studie evaluierten *Cut-off*-Werte von 74,0 bzw. 92,0 % konnte nur eine unzureichende Identifikation von Übertragungen erfolgen. Allerdings sind Übertragungswege zwischen nur zwei Patienten von weniger großem Interesse für die Kliniken als Ausbrüche mit Übertragungen innerhalb großer Patientengruppen. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die FTIR-Spektroskopie im Ausbruchsgeschehen deutlich besser eignet, um große Übertragungscluster aufzudecken.

Für eine mögliche Routineanwendung der FTIR-Spektroskopie muss der *Cut-off*-Wert dem Zweck der Typisierung angepasst werden. Neben der Anwendung als alleinige Surveillancemethode ist beispielsweise denkbar, die FTIR-Spektroskopie zunächst mit einem eher niedrigen *Cut-off*-Wert als eine Methode zur Vorauswahl derjenigen Bakterienstämme einzusetzen, die zur genaueren Surveillance sequenziert werden. Auf diese Weise wäre es möglich, Kosten und Zeit zu sparen, indem die Sequenzierung nur bei Isolaten durchgeführt wird, bei denen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eine Transmission stattgefunden hat. Legt man für diese Anwendung einen *Cut-off*-Wert von 74,0 % zugrunde, würde auf Basis der hier dargestellten Daten eine von fünf Transmissionen übersehen werden. Um den optimalen *Cut-off*-Wert für die An-

wendung zur Vorauswahl besser zu untersuchen, sind allerdings Studien mit einer wesentlich größeren Übertragungszahl notwendig.

Für die *K. pneumoniae*-Isolate konnten mithilfe der FTIR-Clustereinteilung 17 von 37 mögliche Transmissionen bestätigt werden, die sich bis auf zwei Ausnahmen auf neonatologische Patienten bezogen. Die Übertragungen auf neonatologischen Stationen scheinen besonders häufig zu sein, was auch durch die nosokomiale Verbreitung von multiresistenten *K. pneumoniae*-Stämmen begründet sein kann. Durch spezielle Risikofaktoren von Neugeborenen wie Frühgeburtlichkeit, parenterale Ernährung, das Vorhandensein von Kathetern oder Antibiotikagabe können sich MRGN-Stämme in neonatologischen Intensivstationen bevorzugt ausbreiten (Akturk et al., 2016; Chen et al., 2019). Eine SNP-Analyse der untersuchten Isolate könnte genaueren Aufschluss über eine mögliche Klonalität der Isolate eines FTIR-Clusters und die Reproduktionsraten der MRGN-Klebsiellen geben. Da hier keine SNP-Analyse der Klebsiellen-Isolate durchgeführt wurde, lässt sich auch keine Aussage über die Anzahl korrekt angenommener Transmissionen treffen. In einer Arbeit von 2018 zeigte sich jedoch bereits eine hohe Übereinstimmung der FTIR-Cluster mit der SNP-Phylogenie (Dinkelacker et al., 2018).

#### 4.2 Einfluss von Nährmedium und Inkubationszeit auf die FTIR-Spektren

##### 4.2.1 Einfluss des Nährmediums auf die FTIR-Spektren von *E. coli*-Isolaten

In verschiedenen Versuchsanordnungen konnte bisher gezeigt werden, dass die Verwendung verschiedener nicht-selektiver Nährböden keinen signifikanten Einfluss auf die Reproduzierbarkeit von FTIR-Spektren hat (Helm et al., 1991b; Lefier et al., 1997; Wenning et al., 2014). Die Kultivierung auf davon abweichenden Nährmedien schränkt hingegen die Vergleichbarkeit der auf verschiedenen Nährböden angezüchteten Isolate ein (van der Mei et al., 1996; Grunert et al., 2013). In dieser Studie wurde der Einfluss mehrerer selektiver und nicht-selektiver Nährmedien (Brain-Heart-Infusion-Agar, CLED-Agar, Endo-Agar, MacConkey-Agar, Müller-Hinton-Agar, Columbia-Blutagar) auf die FTIR-Spektren untersucht. Im Vergleich mit Columbia-Blutagar, der hier als Stan-

dardmedium verwendet wurde, zeigten die nicht-selektiven Nährmedien Brain-Heart-Infusion-Agar und Müller-Hinton-Agar die größte Übereinstimmung der Spektren (> 84 %). Die selektiven Nährmedien Endo-, MacConkey- und CLED-Agar stimmten lediglich zu unter 70 % mit den durch Kultivierung auf Columbia-Blutagar gewonnenen Spektren überein.

Eine plausible Erklärung für die Beeinflussung der Spektren durch das verwendete Nährmedium ist, dass die Inhaltsstoffe des Agars den Metabolismus und damit auch die biochemische Zusammensetzung der Bakterien verändern. Da die FTIR-Spektren alle Zellbestandteile widerspiegeln, werden auch sie durch die Inhaltsstoffe des Nährmediums beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die FTIR-Spektren von *Streptococcus mitis*-Stämmen nach Anzüchtung auf Trypton-Soya-Agar zwei zusätzliche Peaks aufwiesen, die auf das Auftreten zusätzlicher amphiphiler Moleküle hindeuten (van der Mei et al., 1996). Bei der Typisierung von 84 *Staphylococcus aureus*-Isolaten anhand ihrer kapsulären Polysaccharide wurde für Trypton-Soya-Agar bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C die beste Diskrimination der Isolate festgestellt (Grunert et al., 2013). In einer Studie von 2014 wurden 23 Isolate verschiedener Spezies typisiert und für nicht-selektive Nährmedien eine nur moderate Abweichung der Identifikationsrate gefunden. Für selektive Nährmedien allerdings zeigte sich eine bedeutende Abweichung der Identifikationsrate auf Speziesebene von 55 % (Wenning et al., 2014). Die gute Übereinstimmung der FTIR-Spektren auf bestimmten nicht-selektiven Nährböden könnte mit der ausgewählten Wellenzahlregion zusammenhängen: Auf das meist zur Typisierung von Bakterienstämmen betrachtete Polysaccharid-Fenster könnten die Kulturbedingungen einen geringeren Einfluss haben (Novais et al., 2019).

#### 4.2.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die FTIR-Spektren von *E. coli*-Isolaten

Auch die Inkubationszeit kann in einem gewissen Rahmen variiert werden, ohne dass die Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren signifikant reduziert wird (Lefier et al., 1997; Wenning et al., 2014). Eine Abweichung von  $\pm 4$  Stunden wird als tolerabel beschrieben (Novais et al., 2019). Die hier untersuchten Isolate wurden in mehreren Versuchsanordnungen mit Inkubationszeiten von sechs

bis 72 Stunden kultiviert. Die FTIR-Spektren der für 16 bis 26 Stunden inkubierten Isolate stimmten alle im Mittel über 90 % mit den unter Standardbedingungen für *E. coli*-Stämme (24 Stunden Inkubation auf Columbia-Blutagar) gewonnenen Spektren überein. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Abweichung der Inkubationszeit in diesem Zeitraum tolerabel ist, um die Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren zu erhalten. Dieser Spielraum vereinfacht die Durchführung der FTIR-Spektroskopie in der Routinediagnostik stark, da der Inkubationszeitraum so besser in den Arbeitsablauf eingebunden werden kann. Die Spektren nach acht bzw. 48 Stunden Inkubation auf Columbia-Blutagar wiesen bereits eine mäßige Abweichung auf (78,8 bzw. 77,7 % Übereinstimmung). Als unpraktikabel erwiesen sich die Inkubation für 72 Stunden auf Columbia-Blutagar und die Inkubation für sechs und acht Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar, die alle eine Übereinstimmung unter 70 % mit den Standardbedingungen zeigten. Bemerkenswert war hierbei, dass die Spektren nach 48 und 72 Stunden einander deutlich mehr ähnelten als die Spektren nach 48 und 24 Stunden. Die Übereinstimmung der Spektren scheint deshalb nicht linear mit der Zeit abzunehmen. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung der Spektren ab 48 Stunden Inkubationszeit könnte die reduzierte metabolische Aktivität der Bakterien im Vergleich zu kürzer inkubierten Isolaten sein. Im Bereich sehr langer Inkubationszeiten (ab 48 Stunden) verändern sich die Spektren hingegen kaum, die metabolische Aktivität fällt hier nicht mehr ins Gewicht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Inkubationszeiten im Zeitraum von 16 bis 26 Stunden für die untersuchten MRGN-*E. coli* eine gute Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren gewährleisten, während von einer starken Verkürzung oder Verlängerung der Inkubationszeit abzuraten ist.

An Listerien-Stämmen, deren Inkubationszeit von sechs bis 168 Stunden variiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Übereinstimmung mit den Spektren anderer Inkubationszeiten am höchsten war, wenn die Inkubationszeit der Modelldaten nahe der mittleren Inkubationszeit von 48 Stunden war. Insgesamt erwiesen sich die untersuchten Isolate als relativ robust gegenüber einer Veränderung der Wachstumsbedingungen (Lefier et al., 1997). Für eine Veränderung der Inkubationszeit von 24 Stunden auf 18 Stunden wurde kein

Einfluss auf die FTIR-Spektren festgestellt, allerdings zeigte sich eine signifikant verschlechterte Identifikationsrate bei einer Verlängerung auf 48 bzw. 72 Stunden, insbesondere bei sporenbildenden Spezies (Wenning et al., 2014). Diese Ergebnisse bestätigen die hier beobachteten Veränderungen der Spektren und die Einschätzung, dass geringe Abweichungen der Inkubationszeit die Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren nicht signifikant einschränken. Bei den hier errechneten Werten für die Übereinstimmung der Nährmedien bzw. der Inkubationszeiten muss außerdem beachtet werden, dass jeweils die FTIR-Summenspektren und nicht die daraus resultierende Clustereinteilung bei einem bestimmten *Cut-off*-Wert verglichen wurden. Es ist denkbar, dass die Variation der Wachstumsbedingungen auf die Cluster einen geringeren, auch vom jeweiligen *Cut-off*-Wert abhängigen Einfluss hat, so dass eine geringere Übereinstimmung der FTIR-Spektren für die Routineanwendung verkräftbar wäre. Zukünftige Studien sollten sich auch der Frage widmen, ob die hier gewählten Standardbedingungen für *E. coli*-Stämme (Inkubation für 24 Stunden auf Columbia-Blutagar) überhaupt optimal sind. Hierfür wäre es sinnvoll, die FTIR-Spektren unter verschiedenen Wachstumsbedingungen mit der SNP-Typisierung zu vergleichen und die Bedingung mit der höchsten Übereinstimmung als Referenz zu definieren. Allgemein finden sich in Studien zur FTIR-Spektroskopie bei *E. coli*-Isolaten häufig Inkubationszeiten von 18 bis 24 Stunden, zum Teil werden andere nicht-selektive Nährmedien wie Trypton-Soya-Agar oder Müller-Hinton-Agar verwendet (Kim et al., 2006; Davis et al., 2012; Sousa et al., 2013; Wenning et al., 2014).

#### 4.3 Fazit

In dieser Arbeit wurde die FTIR-Spektroskopie als Surveillancemethode zur Subtypisierung von MRGN-*E. coli*- und MRGN-*K. pneumoniae*-Stämmen eingesetzt und die Trennschärfe und Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektroskopie im Vergleich zu den Referenzmethoden MLST- und SNP-Analyse evaluiert. Zusätzlich wurde der Einfluss des Nährmediums und der Inkubationszeit auf die FTIR-Spektren untersucht. Die Trennschärfe der FTIR-Spektroskopie war in dieser Studie der SNP-Analyse als Methode zur Transmissionssurveillance un-

terlegen. Bei einem *Cut-off*-Wert von 92,0 % zur FTIR-Typisierung der *E. coli*-Isolate konnten lediglich drei der fünf durch die SNP-Analyse bestätigten Transmissionen in dem untersuchten Patientenkollektiv durch die FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Die Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung (*Cut-off*-Wert 74,0 %) mit der MLST-Analyse hing stark vom Sequenztyp ab, die Sequenztypen wurden nur teilweise korrekt abgebildet. Die Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren war für beide untersuchten Spezies gewährleistet und wurde auch durch Einsatz verschiedener nicht-selektiver Nährmedien und Variation der Inkubationszeit um wenige Stunden nicht signifikant reduziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FTIR-Spektroskopie einige Vorteile für die Anwendung in der Routinediagnostik mit sich bringt: Die Durchführung ist unkompliziert und gut reproduzierbar, der Kosten- und Zeitaufwand ist unter anderem dank hoher Durchsatzraten denkbar gering. Auch bei der Wahl der Wachstumsbedingungen ist die Methode robust und toleriert Abweichungen der Inkubationszeit um wenige Stunden bzw. die Verwendung verschiedener nicht-selektiver Nährmedien. Eine Typisierung ist auch unterhalb des Spezieslevels möglich. Auf der anderen Seite konnte die FTIR-Spektroskopie in dieser Studie nicht die Trennschärfe der SNP-Analyse erreichen, eine zuverlässige Identifikation einzelner Transmissionen war nicht gegeben. Die Sequenztypen wurden ebenfalls nur teilweise gut im FTIR-Dendrogramm dargestellt. Die in der Literatur beobachtete Trennschärfe der FTIR-Spektroskopie variiert in Abhängigkeit von der Isolatauswahl, den chemometrischen Analysemethoden, dem ausgewerteten Wellenzahlbereich oder dem epidemiologischen Hintergrund. Angesichts dieser Studienlage war keine stabil mit der SNP-Analyse vergleichbare Trennschärfe zu erwarten. Für die Anwendung als Surveillancemethode ist außerdem in erster Linie die Detektion von Ausbrüchen relevant, weshalb nicht unbedingt die Trennschärfe der SNP-Analyse erreicht werden muss. Der Einsatz der FTIR-Spektroskopie im Ausbruchsgeschehen war jedoch nicht Gegenstand dieser Studie. Derzeit mangelt es der FTIR-Spektroskopie außerdem noch an standardisierten Protokollen und Referenzdatenbanken, die einen Vergleich der Spektren über

mehrere Laboratorien hinweg ermöglichen. Insgesamt zeigten sich jedoch bereits vielversprechende Ergebnisse, die in Kombination mit einem verbesserten Verständnis des FTIR-Fingerabdrucks und optimierten Analyseverfahren in Zukunft den Weg zur Routineanwendung der FTIR-Spektroskopie ebnen könnten.

#### 4.4 Ausblick

Die Einsatzmöglichkeiten der FTIR-Spektroskopie sind breit gefächert und beinhalten, wie auch in dieser Studie gezeigt wurde, neben der Genus- und Speziesebene auch die Typisierung von Bakterien auf Stammebene. Auch die Zahl der bereits typisierten grampositiven und gramnegativen Bakterienspezies ist groß und deutet auf eine breite Anwendbarkeit der FTIR-Spektroskopie hin (Quintelas et al., 2018; Novais et al., 2019). Im Vergleich zu MALDI-TOF Massenspektrometrie, bei der es sich ebenfalls um eine phänotypische Typisierungsmethode handelt, zeigte sich die FTIR-Spektroskopie zwar auf Speziesebene unterlegen, allerdings scheint die Methode durch die Abbildung der gesamten Zellzusammensetzung besser für die Stammtypisierung geeignet zu sein (Wenning et al., 2014; Dinkelacker et al., 2018). In einem Review-Artikel wird zu bedenken gegeben, dass die FTIR-Spektroskopie bei der Stammtypisierung immer auf die Manifestation von Zellveränderungen an den Oberflächenstrukturen angewiesen ist (Novais et al., 2019). Neben der Unterscheidung einzelner Bakterienstämme ist auch die Einteilung anhand von Oberflächenstrukturen in Serogruppen oder Kapselantigentypen mittels FTIR-Spektroskopie denkbar (Novais et al., 2019). Ob die Methode auch für die Testung von Antibiotika-Resistenzen geeignet ist, wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Bouhedja et al., 1997; Amiali et al., 2008; AlRabiah et al., 2013). Als Surveillance-Methode kommt die FTIR-Spektroskopie zur Erkennung und Überwachung von mikrobiologischen Übertragungswegen bis hin zu Ausbrüchen in Krankenhäusern infrage. Viele Studien zeigen außerdem das Potenzial der FTIR-Spektroskopie in der Lebensmittelbranche zur Qualitätskontrolle und Aufdeckung von Verunreinigungen (Al-Qadiri et al., 2006; Davis et al., 2010; Oelofse et al., 2010; Davis et al., 2012).

## 5 Zusammenfassung

In dieser retrospektiven Arbeit wurde die FTIR-Spektroskopie als Methode zur Transmissionssurveillance multiresistenter Erreger evaluiert. Hierfür wurde die FTIR-Spektroskopie zur Subtypisierung von MRGN-Bakterienstämmen der Spezies *E. coli* und *K. pneumoniae* eingesetzt und hinsichtlich der Trennschärfe und Reproduzierbarkeit der Typisierung mit den WGS-basierten Referenzmethoden SNP- und MLST-Analyse verglichen. Als zusätzliche Fragestellung wurde der Einfluss der Inkubationszeit und des Nährmediums auf die Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren untersucht. Die Isolatauswahl erfolgte retrospektiv und beschränkte sich auf MRGN-Stämme, die in der mikrobiologischen Routinediagnostik gewonnen wurden. In die finale Auswertung wurden 103 *E. coli*-Isolate und 34 *K. pneumoniae*-Isolate einbezogen. Um potenziell stattgehabte Übertragungen erkennen zu können, wurden lediglich MRGN-Isolate von Patienten mit gegenseitigem Kontakt in die Auswahl miteinbezogen. Die SNP-Analyse stellt den aktuellen Goldstandard für die Subtypisierung von Bakterienstämmen dar und bestätigte in Zusammenschau mit den Kontaktdaten des Patientenkollektivs fünf Transmissionen zwischen Patienten. Mittels FTIR-Spektroskopie konnten bei einem *Cut-off*-Wert von 92,0 % lediglich drei der fünf bestätigten Transmissionen nachgewiesen werden. Somit konnte auf Basis der FTIR-Spektroskopie keine vollständige Transmissionssurveillance gewährleistet werden. Auf Basis der MLST-Analyse wurden wiederum 28 potenzielle Transmissionen angenommen, von denen lediglich fünf Transmissionen durch die SNP-Analyse bestätigt wurden. Die FTIR-Spektroskopie, für die hier ein *Cut-off*-Wert von 74,0 % zugrunde gelegt wurde, zeigte eine stark vom Sequenztyp abhängige Übereinstimmung mit der MLST-Analyse. Die verschiedenen Sequenztypen konnten nicht zuverlässig in der auf der FTIR-Spektroskopie basierenden Typisierung abgebildet werden, der weit verbreitete ST131 kam jedoch beispielsweise in der FTIR-Clustereinteilung gut zur Darstellung. Eine mögliche Ursache stellt die phänotypische Heterogenität der Sequenztypen dar. Unter den hier gewählten Standardbedingungen (Inkubation für 24 Stunden auf Columbia-Blutagar) konnte eine gute Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren erreicht werden. Bei der Untersuchung des Nährmediums zeigte sich eine hohe

Vergleichbarkeit von über 80 % der verwendeten nicht-selektiven Nährmedien mit Columbia-Blutagar, wohingegen bei der Verwendung selektiver Nährmedien keine ausreichende Reproduzierbarkeit gewährleistet werden konnte. Durch die Verwendung verschiedener nicht-selektiver Nährmedien ist der für die Routineanwendung bedeutende Vergleich von FTIR-Spektren über verschiedene Laboratorien hinweg möglich. Bei der Variation der Inkubationszeit zwischen 16 und 26 Stunden zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der FTIR-Spektren mit über 90 % Übereinstimmung mit den Standardbedingungen (24 Stunden Inkubationszeit). Eine stärkere Abweichung der Inkubationszeit würde den Typisierungsprozess mittels FTIR-Spektroskopie zwar vereinfachen, kann jedoch keine ausreichende Vergleichbarkeit der Spektren gewährleisten. Aktuell liegen noch keine standardisierten Protokolle zur Durchführung der FTIR-Spektroskopie vor, die in Zukunft die Vergleichbarkeit der Spektren verschiedener Laboratorien verbessern könnten.

Zusammenfassend zeigte sich eine unkomplizierte Durchführung der FTIR-Spektroskopie mit geringem Kosten- und Zeitaufwand sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, auch bei einer geringgradigen Variation der Standardbedingungen. Die Typisierung der verwendeten Bakterienstämme erfolgte auch auf Subspeziesebene. Allerdings war es nicht möglich, einzelne Transmissionen mit der FTIR-Spektroskopie zuverlässig zu identifizieren, die Trennschärfe der SNP-Analyse wurde nicht erreicht. Die Studienlage hierzu ist heterogen und zeigt in Abhängigkeit von der Isolatauswahl und der epidemiologischen Situation, den gewählten chemometrischen Verfahren sowie dem analysierten Wellenzahlbereich unterschiedliche Trennschärfen der FTIR-Spektroskopie. In dieser Studie wurden Routine-Isolate außerhalb eines Ausbruchsgeschehens verwendet, was die Anzahl der stattgehabten Transmissionen vermindert. Der Einsatz der FTIR-Spektroskopie zur Transmissions-surveillance dient jedoch in erster Linie der Detektion von Ausbrüchen, weshalb nicht zwingend die Trennschärfe der SNP-Analyse erreicht werden muss. Bei einer weiteren Optimierung der Analysemethoden sowie der Entwicklung standardisierter Prozesse ist ein zukünftiger Einsatz der FTIR-Spektroskopie als Routinemethode zur Transmissions-surveillance durchaus denkbar.



## Literaturverzeichnis

- AHMED, S. H., DAEF, E. A., BADARY, M. S., MAHMOUD, M. A. & ABD-ELSAIED, A. A. 2009. Nosocomial blood stream infection in intensive care units at Assiut University Hospitals (Upper Egypt) with special reference to extended spectrum beta-lactamase producing organisms. *BMC Res Notes*, 2, 76.
- AKTURK, H., SUTCU, M., SOMER, A., AYDIN, D., CIHAN, R., OZDEMIR, A., COBAN, A., INCE, Z., CITAK, A. & SALMAN, N. 2016. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. *Braz J Infect Dis*, 20, 134-40.
- AL-QADIRI, H. M., LIN, M., CAVINATO, A. G. & RASCO, B. A. 2006. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. *Int J Food Microbiol*, 111, 73-80.
- ALQASIM, A., SCHEUTZ, F., ZONG, Z. & MCNALLY, A. 2014. Comparative genome analysis identifies few traits unique to the *Escherichia coli* ST131 H30Rx clade and extensive mosaicism at the capsule locus. *BMC Genomics*, 15, 830.
- ALRABIAH, H., CORREA, E., UPTON, M. & GOODACRE, R. 2013. High-throughput phenotyping of uropathogenic *E. coli* isolates with Fourier transform infrared spectroscopy. *The Analyst*, 138.
- AMIALI, N. M., MULVEY, M. R., BERGER-BACHI, B., SEDMAN, J., SIMOR, A. E. & ISMAIL, A. A. 2008. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 61, 95-102.
- ARNDT, D., GRANT, J. R., MARCU, A., SAJED, T., PON, A., LIANG, Y. & WISHART, D. S. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*, 44, W16-21.
- ASKAR, M., FABER, M. S., FRANK, C., BERNARD, H., GILSDORF, A., FRUTH, A., PRAGER, R., HOHLE, M., SUESS, T., WADL, M., KRAUSE, G., STARK, K. & WERBER, D. 2011. Update on the ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O104, Germany, May 2011. *Euro Surveill*, 16.
- BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S., LESIN, V. M., NIKOLENKO, S. I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A. D., PYSHKIN, A. V., SIROTKIN, A. V., VYAHHI, N., TESLER, G., ALEKSEYEV, M. A. & PEVZNER, P. A. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19, 455-77.
- BEN-DAVID, D., KORDEVANI, R., KELLER, N., TAL, I., MARZEL, A., GAL-MOR, O., MAOR, Y. & RAHAV, G. 2012. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect*, 18, 54-60.
- BENTLEY, D. R., BALASUBRAMANIAN, S., SWERDLOW, H. P., SMITH, G. P., MILTON, J., BROWN, C. G., HALL, K. P., EVERS, D. J., BARNES, C. L., BIGNELL, H. R., BOUTELL, J. M., BRYANT, J., CARTER, R. J., KEIRA CHEETHAM, R., COX, A. J., ELLIS, D. J., FLATBUSH, M. R., GORMLEY, N. A., HUMPHRAY, S. J., IRVING, L. J., KARBELASHVILI, M. S., KIRK, S. M., LI, H., LIU, X., MAISINGER, K. S., MURRAY, L. J., OBRADOVIC, B., OST, T., PARKINSON, M. L., PRATT, M. R., RASOLONJATOVO,

- I. M., REED, M. T., RIGATTI, R., RODIGHIERO, C., ROSS, M. T., SABOT, A., SANKAR, S. V., SCALLY, A., SCHROTH, G. P., SMITH, M. E., SMITH, V. P., SPIRIDOU, A., TORRANCE, P. E., TZONEV, S. S., VERMAAS, E. H., WALTER, K., WU, X., ZHANG, L., ALAM, M. D., ANASTASI, C., ANIEBO, I. C., BAILEY, D. M., BANCARZ, I. R., BANERJEE, S., BARBOUR, S. G., BAYBAYAN, P. A., BENOIT, V. A., BENSON, K. F., BEVIS, C., BLACK, P. J., BOODHUN, A., BRENNAN, J. S., BRIDGHAM, J. A., BROWN, R. C., BROWN, A. A., BUERMANN, D. H., BUNDU, A. A., BURROWS, J. C., CARTER, N. P., CASTILLO, N., CHIARA, E. C. M., CHANG, S., NEIL COOLEY, R., CRAKE, N. R., DADA, O. O., DIAKOUMAKOS, K. D., DOMINGUEZ-FERNANDEZ, B., EARNSHAW, D. J., EGBUJOR, U. C., ELMORE, D. W., ETCHIN, S. S., EWAN, M. R., FEDURCO, M., FRASER, L. J., FUENTES FAJARDO, K. V., SCOTT FUREY, W., GEORGE, D., GIETZEN, K. J., GODDARD, C. P., GOLDA, G. S., GRANIERI, P. A., GREEN, D. E., GUSTAFSON, D. L., HANSEN, N. F., HARNISH, K., HAUDENSCHILD, C. D., HEYER, N. I., HIMMS, M. M., HO, J. T., HORGAN, A. M., et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456, 53-9.
- BEUTIN, L., WANG, Q., NAUMANN, D., HAN, W., KRAUSE, G., LEOMIL, L., WANG, L. & FENG, L. 2007. Relationship between O-antigen subtypes, bacterial surface structures and O-antigen gene clusters in Escherichia coli O123 strains carrying genes for Shiga toxins and intimin. *J Med Microbiol*, 56, 177-84.
- BOGAERTS, P., MONTESINOS, I., RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H., BLAIRON, L., DEPLANO, A. & GLUPCZYNSKI, Y. 2010. Emergence of clonally related Klebsiella pneumoniae isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 65, 361-2.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M. & USADEL, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-20.
- BOUHEDJA, W., SOCKALINGUM, G. D., PINA, P., ALLOUCH, P., BLOY, C., LABIA, R., MILLOT, J. M. & MANFAIT, M. 1997. ATR-FTIR spectroscopic investigation of E. coli transconjugants beta-lactams-resistance phenotype. *FEBS Lett*, 412, 39-42.
- BRONNER, I. F., QUAIL, M. A., TURNER, D. J. & SWERDLOW, H. 2014. Improved Protocols for Illumina Sequencing. *Curr Protoc Hum Genet*, 80, 18.2.1-42.
- BUEHLMANN, M., BRUDERER, T., FREI, R. & WIDMER, A. F. 2011. Effectiveness of a new decolonisation regimen for eradication of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Hosp Infect*, 77, 113-7.
- CALBO, E., FREIXAS, N., XERCAVINS, M., RIERA, M., NICOLAS, C., MONISTROL, O., SOLE MDEL, M., SALA, M. R., VILA, J. & GARAU, J. 2011. Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology and control. *Clin Infect Dis*, 52, 743-9.
- CARBONNE, A., THIOLET, J. M., FOURNIER, S., FORTINEAU, N., KASSIS-CHIKHANI, N., BOYTCHEV, I., AGGOUNE, M., SEGUIER, J. C., SENECHAL, H., TAVOLACCI, M. P., COIGNARD, B., ASTAGNEAU, P. & JARLIER, V. 2010. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing Klebsiella pneumoniae type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill*, 15.
- CARRICO, J. A., SILVA-COSTA, C., MELO-CRISTINO, J., PINTO, F. R., DE LENCASTRE, H., ALMEIDA, J. S. & RAMIREZ, M. 2006. Illustration of a common framework for

- relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol*, 44, 2524-32.
- CHEN, D., HU, X., CHEN, F., LI, H., WANG, D., LI, X., WU, C., LI, N., WU, S., LI, Z., CHEN, L. & CHEN, Y. 2019. Co-outbreak of multidrug resistance and a novel ST3006 *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: A retrospective study. *Medicine (Baltimore)*, 98, e14285.
- CLARK, G., PASZKIEWICZ, K., HALE, J., WESTON, V., CONSTANTINIDOU, C., PENN, C., ACHTMAN, M. & MCNALLY, A. 2012. Genomic analysis uncovers a phenotypically diverse but genetically homogeneous *Escherichia coli* ST131 clone circulating in unrelated urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother*, 67, 868-77.
- CLERMONT, O., GORDON, D. & DENAMUR, E. 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology*, 161, 980-8.
- COLEMAN, B. L., SALVADORI, M. I., MCGEER, A. J., SIBLEY, K. A., NEUMANN, N. F., BONDY, S. J., GUTMANIS, I. A., MCEWEN, S. A., LAVOIE, M., STRONG, D., JOHNSON, I., JAMIESON, F. B., LOUIE, M. & GROUP, A. R. O. W. S. 2012. The role of drinking water in the transmission of antimicrobial-resistant *E. coli*. *Epidemiol Infect*, 140, 633-42.
- COQUE, T. M., BAQUERO, F. & CANTON, R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*, 13.
- CORBELLA, M., CALTAGIRONE, M., GAIARSA, S., MARIANI, B., SASSERA, D., BITAR, I., MUZZI, A., MIGLIAVACCA, R., SCUDELLER, L., STRONATI, M. & CAMBIERI, P. 2018. Characterization of an Outbreak of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Italy. *Microb Drug Resist*, 24, 1128-1136.
- DAVIS, R., IRUDAYARAJ, J., REUHS, B. L. & MAUER, L. J. 2010. Detection of *E. coli* O157:H7 from ground beef using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics. *J Food Sci*, 75, M340-6.
- DAVIS, R., PAOLI, G. & MAUER, L. J. 2012. Evaluation of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics as a rapid approach for sub-typing *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Food Microbiol*, 31, 181-90.
- DAWSON, S. E., GIBREEL, T., NICOLAOU, N., ALRABIAH, H., XU, Y., GOODACRE, R. & UPTON, M. 2014. Implementation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid typing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33, 983-8.
- DIECKMANN, R., HAMMERL, J. A., HAHMANN, H., WICKE, A., KLETA, S., DABROWSKI, P. W., NITSCHKE, A., STAMMLER, M., AL DAHOUK, S. & LASCH, P. 2016. Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. *Faraday Discuss*, 187, 353-75.
- DINKELACKER, A. G., VOGT, S., OBERHETTINGER, P., MAUDER, N., RAU, J., KOSTRZEWA, M., ROSSEN, J. W. A., AUTENRIETH, I. B., PETER, S. & LIESE, J. 2018. Typing and Species Identification of Clinical *Klebsiella* Isolates by Fourier Transform

- Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*, 56.
- DOLEJSKA, M., MATULOVA, M., KOHOUTOVA, L., LITERAK, I., BARDON, J. & CIZEK, A. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: national survey reveals widespread isolates with bla(SHV-12) genes on IncFII plasmids. *Lett Appl Microbiol*, 53, 271-7.
- ECDC 2018. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm.
- EWERS, C., GROBBEL, M., STAMM, I., KOPP, P. A., DIEHL, I., SEMMLER, T., FRUTH, A., BEUTLICH, J., GUERRA, B., WIELER, L. H. & GUENTHER, S. 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother*, 65, 651-60.
- FANKHAUSER, C., ZINGG, W., FRANCOIS, P., DHARAN, S., SCHRENZEL, J., PITTET, D. & HARBARTH, S. 2009. Surveillance of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a Swiss Tertiary Care Hospital. *Swiss Med Wkly*, 139, 747-51.
- FRATAMICO, P. M., DEBROY, C., LIU, Y., NEEDLEMAN, D. S., BARANZONI, G. M. & FENG, P. 2016. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 7, 644.
- GARDAM, M. A., BURROWS, L. L., KUS, J. V., BRUNTON, J., LOW, D. E., CONLY, J. M. & HUMAR, A. 2002. Is surveillance for multidrug-resistant enterobacteriaceae an effective infection control strategy in the absence of an outbreak? *J Infect Dis*, 186, 1754-60.
- GEFFERS, C. & GASTMEIER, P. 2011. Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int*, 108, 87-93.
- GIBREEL, T. M., DODGSON, A. R., CHEESBROUGH, J., BOLTON, F. J., FOX, A. J. & UPTON, M. 2012. High metabolic potential may contribute to the success of ST131 uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 50, 3202-7.
- GOULDEN, J. D. & SHARPE, M. E. 1958. The infra-red absorption spectra of lactobacilli. *J Gen Microbiol*, 19, 76-86.
- GRUNERT, T., WENNING, M., BARBAGELATA, M. S., FRICKER, M., SORDELLI, D. O., BUZZOLA, F. R. & EHLING-SCHULZ, M. 2013. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted Fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol*, 51, 2261-6.
- HALEY, B. J., KIM, S. W., PETTENGILL, J., LUO, Y., KARNS, J. S. & VAN KESSEL, J. A. 2016. Genomic and Evolutionary Analysis of Two *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Sequence Types Isolated from Bovine and Poultry Sources in North America. *PLoS One*, 11, e0161225.
- HAMPRECHT, A. G. & GÖTTIG, S. 2018. [Prevalence of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria]. *Dtsch Med Wochenschr*, 143, 625-633.

- HARRIS, A. D., KOTETISHVILI, M., SHURLAND, S., JOHNSON, J. A., MORRIS, J. G., NEMOY, L. L. & JOHNSON, J. K. 2007a. How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Am J Infect Control*, 35, 97-101.
- HARRIS, A. D., MCGREGOR, J. C., JOHNSON, J. A., STRAUSS, S. M., MOORE, A. C., STANDIFORD, H. C., HEBDEN, J. N. & MORRIS, J. G., JR. 2007b. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and intensive care unit admission. *Emerg Infect Dis*, 13, 1144-9.
- HAURI, A., GOTSCH, U., STROTMANN, I., KRAHN, J., BETTGE-WELLER, G., WESTBROCK, H., BELLINGER, O. & UPHOFF, H. 2011. Secondary transmissions during the outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 in Hesse, Germany, 2011. *Euro Surveill*, 16.
- HELM, D., LABISCHINSKI, H. & NAUMANN, D. 1991a. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 127-142.
- HELM, D., LABISCHINSKI, H., SCHALLEHN, G. & NAUMANN, D. 1991b. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol*, 137, 69-79.
- HSIEH, C. J., SHEN, Y. H. & HWANG, K. P. 2010. Clinical implications, risk factors and mortality following community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Immunol Infect*, 43, 240-8.
- JAGADEESAN, B., GERNER-SMIDT, P., ALLARD, M. W., LEUILLET, S., WINKLER, A., XIAO, Y., CHAFFRON, S., VAN DER VOSSEN, J., TANG, S., KATASE, M., MCCLURE, P., KIMURA, B., CHING CHAI, L., CHAPMAN, J. & GRANT, K. 2019. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiol*, 79, 96-115.
- JOENSEN, K. G., TETZSCHNER, A. M., IGUCHI, A., AARESTRUP, F. M. & SCHEUTZ, F. 2015. Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol*, 53, 2410-26.
- KAAS, R. S., FRIIS, C., USSERY, D. W. & AARESTRUP, F. M. 2012. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics*, 13, 577.
- KASSIS-CHIKHANI, N., DECRE, D., GAUTIER, V., BURGHOFFER, B., SALIBA, F., MATHIEU, D., SAMUEL, D., CASTAING, D., PETIT, J. C., DUSSAIX, E. & ARLET, G. 2006. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*, 57, 142-5.
- KIM, S., BURGULA, Y., OJANEN-REUHS, T., COUSIN, M. A., REUHS, B. L. & MAUER, L. J. 2006. Differentiation of Crude Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* Strains Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. 71, M57-M61.
- KOHLBERG, A., SCHWAB, F. & RUDEN, H. 2012. Wide dissemination of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in acute care and rehabilitation hospitals. *Epidemiol Infect*, 140, 528-34.

- KOLA, A., HOLST, M., CHABERNY, I. F., ZIESING, S., SUERBAUM, S. & GASTMEIER, P. 2007. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period. *J Hosp Infect*, 66, 46-51.
- KRINKO 2012. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlungen der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert-Koch-Institut (RKI). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55, 1311-54.
- KRINKO 2014. Ergänzung zu den „Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen“ (2012) im Rahmen der Anpassung an die epidemiologische Situation. *Epidemiologisches Bulletin*, 21/2014.
- KUMARASAMY, K. K., TOLEMAN, M. A., WALSH, T. R., BAGARIA, J., BUTT, F., BALAKRISHNAN, R., CHAUDHARY, U., DOUMITH, M., GISKE, C. G., IRFAN, S., KRISHNAN, P., KUMAR, A. V., MAHARJAN, S., MUSHTAQ, S., NOORIE, T., PATERSON, D. L., PEARSON, A., PERRY, C., PIKE, R., RAO, B., RAY, U., SARMA, J. B., SHARMA, M., SHERIDAN, E., THIRUNARAYAN, M. A., TURTON, J., UPADHYAY, S., WARNER, M., WELFARE, W., LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 10, 597-602.
- LEE, K., IZUMIYA, H., IYODA, S. & OHNISHI, M. 2019. Effective Surveillance Using Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Whole-Genome Sequencing for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol*, 85.
- LEFIER, D., HIRST, D., HOLT, C. & WILLIAMS, A. G. 1997. Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis. 147, 45-50.
- LIU, P., LI, X., LUO, M., XU, X., SU, K., CHEN, S., QING, Y., LI, Y. & QIU, J. 2018. Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Meta-Analysis. *Microb Drug Resist*, 24, 190-198.
- LOPEZ, J. A., CORREA, A., NAVON-VENEZIA, S., CORREA, A. L., TORRES, J. A., BRICENO, D. F., MONTEALEGRE, M. C., QUINN, J. P., CARMELI, Y. & VILLEGAS, M. V. 2011. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect*, 17, 52-6.
- MARTAK, D., VALOT, B., SAUGET, M., CHOLLEY, P., THOUVEREZ, M., BERTRAND, X. & HOCQUET, D. 2019. Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks. *Front Microbiol*, 10, 1440.
- MORA, A., BLANCO, M., LOPEZ, C., MAMANI, R., BLANCO, J. E., ALONSO, M. P., GARCIA-GARROTE, F., DAHBI, G., HERRERA, A., FERNANDEZ, A., FERNANDEZ, B., AGULLA, A., BOU, G. & BLANCO, J. 2011. Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and

- ONT:H21,42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. *Int J Antimicrob Agents*, 37, 16-21.
- MURPHY, C. P., REID-SMITH, R. J., BOERLIN, P., WEESE, J. S., PRESCOTT, J. F., JANECKO, N., HASSARD, L. & MCEWEN, S. A. 2010. *Escherichia coli* and selected veterinary and zoonotic pathogens isolated from environmental sites in companion animal veterinary hospitals in southern Ontario. *Can Vet J*, 51, 963-72.
- NAUMANN, D., HELM, D. & LABISCHINSKI, H. 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*, 351, 81-2.
- NOVAIS, A., FREITAS, A. R., RODRIGUES, C. & PEIXE, L. 2019. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38, 427-448.
- OELOFSE, A., MALHERBE, S., PRETORIUS, I. S. & DU TOIT, M. 2010. Preliminary evaluation of infrared spectroscopy for the differentiation of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines. *Int J Food Microbiol*, 143, 136-42.
- OZER, E. A., ALLEN, J. P. & HAUSER, A. R. 2014. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGent. *BMC Genomics*, 15, 737.
- PFEIFER, Y., WITTE, W., HOLFELDER, M., BUSCH, J., NORDMANN, P. & POIREL, L. 2011. NDM-1-producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1318-9.
- PIETSCH, M., ELLER, C., WENDT, C., HOLFELDER, M., FALGENHAUER, L., FRUTH, A., GROSSL, T., LEISTNER, R., VALENZA, G., WERNER, G., PFEIFER, Y. & GROUP, R. S. 2017. Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. *Vet Microbiol*, 200, 130-137.
- PIGHTLING, A. W., PETTENGILL, J. B., LUO, Y., BAUGHER, J. D., RAND, H. & STRAIN, E. 2018. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. *Front Microbiol*, 9, 1482.
- QUAINOO, S., COOLEN, J. P. M., VAN HIJUM, S., HUYNEN, M. A., MELCHERS, W. J. G., VAN SCHAİK, W. & WERTHEIM, H. F. L. 2017. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev*, 30, 1015-1063.
- QUINTELAS, C., FERREIRA, E. C., LOPES, J. A. & SOUSA, C. 2018. An Overview of the Evolution of Infrared Spectroscopy Applied to Bacterial Typing. *Biotechnol J*, 13.
- RAKOVITSKY, N., FRENK, S., KON, H., SCHWARTZ, D., TEMKIN, E., SOLTER, E., PAIKIN, S., COHEN, R., SCHWABER, M. J., CARMELI, Y. & LELLOUCHE, J. 2020. FT-IR Spectroscopy is a New Option for Outbreak Investigation: A Retrospective Analysis of an ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Microbiol*.
- RICHTER, M. & ROSSELLO-MORA, R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19126-31.
- RICHTER, M., ROSSELLO-MORA, R., OLIVER GLOCKNER, F. & PEPLIES, J. 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32, 929-31.

- ROBUSTILLO RODELA, A., DIAZ-AGERO PEREZ, C., SANCHEZ SAGRADO, T., RUIZ-GARBAJOSA, P., PITA LOPEZ, M. J. & MONGE, V. 2012. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill*, 17.
- RODRIGUEZ-BANO, J., PICON, E., GIJON, P., HERNANDEZ, J. R., CISNEROS, J. M., PENA, C., ALMELA, M., ALMIRANTE, B., GRILL, F., COLOMINA, J., MOLINOS, S., OLIVER, A., FERNANDEZ-MAZARRASA, C., NAVARRO, G., COLOMA, A., LOPEZ-CERERO, L. & PASCUAL, A. 2010. Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 48, 1726-31.
- ROER, L., HANSEN, F., THOMSEN, M. C. F., KNUDSEN, J. D., HANSEN, D. S., WANG, M., SAMULIONIENE, J., JUSTESEN, U. S., RODER, B. L., SCHUMACHER, H., OSTERGAARD, C., ANDERSEN, L. P., DZAJIC, E., SONDERGAARD, T. S., STEGGER, M., HAMMERUM, A. M. & HASMAN, H. 2017. WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *J Antimicrob Chemother*, 72, 1922-1929.
- ROSSEN, J. W. A., FRIEDRICH, A. W., MORAN-GILAD, J., GENOMIC, E. S. G. F. & MOLECULAR, D. 2018. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect*, 24, 355-360.
- SABAT, A. J., BUDIMIR, A., NASHEV, D., SA-LEAO, R., VAN DIJL, J., LAURENT, F., GRUNDMANN, H. & FRIEDRICH, A. W. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*, 18, 20380.
- SANDT, C., MADOULET, C., KOHLER, A., ALLOUCH, P., DE CHAMPS, C., MANFAIT, M. & SOCKALINGUM, G. D. 2006. FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. *J Appl Microbiol*, 101, 785-97.
- SCHÜRCH, A. C., ARREDONDO-ALONSO, S., WILLEMS, R. J. L. & GOERING, R. V. 2018. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect*, 24, 350-354.
- SCHWABER, M. J. & CARMELI, Y. 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 60, 913-20.
- SILVA, L., RODRIGUES, C., SOUSA, C., LIRA, A. & LEÃO M, M. M., LOPES P, LAMEIRÃO A, ABREU G, LOPES J, NOVAIS Â, PEIXE L 2016. Real-time identification of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak isolates by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *11th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (Poster Presentation)*. Estoril, Portugal.
- SNITKIN, E. S., WON, S., PIRANI, A., LAPP, Z., WEINSTEIN, R. A., LOLANS, K. & HAYDEN, M. K. 2017. Integrated genomic and interfacility patient-transfer data reveal the transmission pathways of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a regional outbreak. *Sci Transl Med*, 9.

- SOUSA, C., NOVAIS, A., MAGALHAES, A., LOPES, J. & PEIXE, L. 2013. Diverse high-risk B2 and D *Escherichia coli* clones depicted by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Sci Rep*, 3, 3278.
- TAGINI, F. & GREUB, G. 2017. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36, 2007-2020.
- TREACY, J., JENKINS, C., PARANTHAMAN, K., JORGENSEN, F., MUELLER-DOBLIES, D., ANJUM, M., KAINDAMA, L., HARTMAN, H., KIRCHNER, M., CARSON, T. & KARPURKAYASTHA, I. 2019. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 linked to raw drinking milk resolved by rapid application of advanced pathogen characterisation methods, England, August to October 2017. *Euro Surveill*, 24.
- TUMBARELLO, M., SPANU, T., SANGUINETTI, M., CITTON, R., MONTUORI, E., LEONE, F., FADDA, G. & CAUDA, R. 2006. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 498-504.
- VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L., DUIM, B., MILLER, W. G., FORBES, K. J., WAGENAAR, J. A. & ZOMER, A. 2016. Whole genome sequence analysis indicates recent diversification of mammal-associated *Campylobacter fetus* and implicates a genetic factor associated with H<sub>2</sub>S production. *BMC Genomics*, 17, 713.
- VAN DER MEI, H. C., NAUMANN, D. & BUSSCHER, H. J. 1996. Grouping of streptococcus mitis strains grown on different growth media by FT-IR. *Infrared Physics & Technology*, 37, 561-564.
- VINCENT, J. L., BIHARI, D. J., SUTER, P. M., BRUINING, H. A., WHITE, J., NICOLAS-CHANOIN, M. H., WOLFF, M., SPENCER, R. C. & HEMMER, M. 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*, 274, 639-44.
- VOGT, S., LOFFLER, K., DINKELACKER, A. G., BADER, B., AUTENRIETH, I. B., PETER, S. & LIESE, J. 2019. Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Typing of Clinical *Enterobacter cloacae* Complex Isolates. *Front Microbiol*, 10, 2582.
- VRANIC-LADAVAC, M., BOSNJAK, Z., BEADER, N., BARISIC, N., KALENIC, S. & BEDENIC, B. 2010. Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *J Med Microbiol*, 59, 1069-78.
- WARREN, R. E., ENSOR, V. M., O'NEILL, P., BUTLER, V., TAYLOR, J., NYE, K., HARVEY, M., LIVERMORE, D. M., WOODFORD, N. & HAWKEY, P. M. 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 61, 504-8.
- WENNING, M., BREITENWIESER, F., KONRAD, R., HUBER, I., BUSCH, U. & SCHERER, S. 2014. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*, 103, 44-52.

- WENNING, M. & SCHERER, S. 2013. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 7111-20.
- WILLEMSSEN, I., ELBERTS, S., VERHULST, C., RIJNSBURGER, M., FILIUS, M., SAVELKOUL, P., KLUYTMANS, J., LOMMERSE, E., SPANJAARD, L., VLAMINCKX, B., VOS, A., WULF, M., VOS, M., WINTERMANS, R., ANDRIESSE, G., VAN ZEIJL, J., VAN DER VORM, E., BUITING, A., STURM, P., BLOK, H., TROELSTRA, A., KAISER, A. & VANDENBROUCKE-GRAULS, C. 2011. Highly resistant gram-negative microorganisms: incidence density and occurrence of nosocomial transmission (TRIANGLE Study). *Infect Control Hosp Epidemiol*, 32, 333-41.
- WIRTH, T., FALUSH, D., LAN, R., COLLES, F., MENSA, P., WIELER, L. H., KARCH, H., REEVES, P. R., MAIDEN, M. C., OCHMAN, H. & ACHTMAN, M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol*, 60, 1136-51.

## Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter Betreuung von Prof. Dr. med. Silke Peter durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. med. Jan Liese, Oberarzt und Leitung der Krankenhaushygiene, und Dr. med. Sophia Wolf, Assistenzärztin.

Die Probenauswahl und -entnahme erfolgte durch die Abteilung Krankenhaushygiene des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Die Versuche zur FTIR-Spektroskopie wurden (nach Einarbeitung durch Dr. med. Sophia Wolf) von mir eigenständig durchgeführt. Die Versuche zur Ganzgenomsequenzierung wurden von mir in Zusammenarbeit mit Baris Bader durchgeführt. Die Methode MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde ebenfalls (nach Einarbeitung durch Dr. med. Sophia Wolf) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte (nach Anleitung durch Dr. med. Jan Liese und Dr. med. Sophia Wolf) durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig (nach Anleitung durch Dr. med. Jan Liese und Dr. med. Sophia Wolf) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 09.02.2023

Kim Löffler

# Anhang

## Zu Kapitel 3.1.2.2: MLST-Analyse

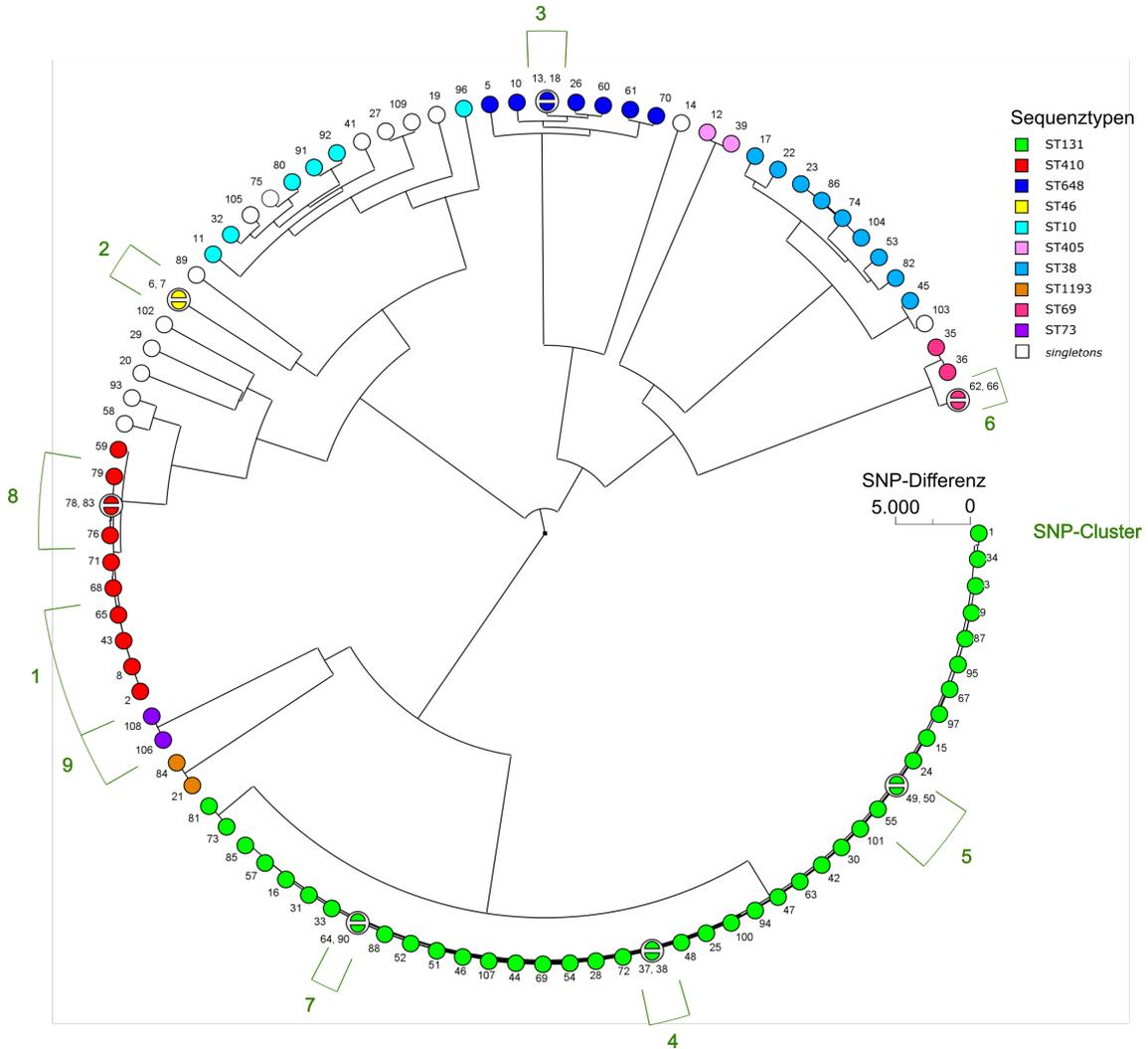


Abbildung 15: Phylogenie der 103 *E. coli*-Isolate auf Grundlage der Core-Genom-basierten SNP-Analyse. Anhand der SNP-Differenzen zwischen den Isolaten wurden Cluster definiert, die als Klammern um die Isolate dargestellt sind. Die Zuteilung zu einem Cluster erfolgte bei einer Differenz von weniger als sieben SNPs zwischen den enthaltenen Isolaten. Zusätzlich sind die Sequenztypen verschiedenfarbig dargestellt. Die Kennzeichnung der Isolate erfolgte anhand der Isolat-ID.

zu Kapitel 3.2.1: Einfluss des Nährmediums auf die FTIR-Spektren der *E. coli*-Isolate

Tabelle 16: Ähnlichkeit der Isolatspektren des Isolates MRGN4612 nach Inkubation auf unterschiedlichen Nährböden [%]. Das Isolat wurde für 24 ( $\pm 0,5$ ) Stunden bei 37 °C auf Brain-Heart-Infusion-Agar, CLED-Agar, Endo-Agar, MacConkey-Agar, Müller-Hinton-Agar und Columbia-Blutagar inkubiert und im Anschluss jeweils mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die FTIR-Spektren nach Inkubation auf den unterschiedlichen Nährböden wurden summiert, verglichen und ihre prozentuale Übereinstimmung errechnet.

	Brain-Heart	CLED	Endo	MacConkey	Müller-Hinton
CLED	70,4				
Endo	74,8	83,0			
MacConkey	27,6	47,3	39,5		
Müller-Hinton	77,2	77,8	75,6	44,2	
ColS+	85,7	71,4	73,1	31,0	83,0

Tabelle 17: MRGN4617 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 18: MRGN4622-1 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 19: MRGN4622-2 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 20: MRGN4633 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 21: MRGN4651 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 22: MRGN4652 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 23: MRGN4657-1 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 24: MRGN4657-2 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 25: MRGN4666 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

Tabelle 26: MRGN4669 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation auf verschiedenen Nährböden [%].

zu Kapitel 3.2.2: Einfluss der Inkubationszeit auf die FTIR-Spektren der *E. coli*-Isolate

Tabelle 27: MRGN5482 – Ähnlichkeit der Isolatspektren des Isolates MRGN5482 nach Inkubation für sechs, acht und 24 Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar bzw. für acht und 24 Stunden auf Columbia-Blutagar [%]. Das Isolat wurde bei 37 °C auf Columbia-Blutagar inkubiert und im Anschluss jeweils mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die FTIR-Spektren bei unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden summiert, verglichen und ihre prozentuale Übereinstimmung errechnet.

	6h Brain-Heart	8h Brain-Heart	24h Brain-Heart	8h ColS+
8h Brain-Heart	87,9			
24h Brain-Heart	74,5	82,5		
8h ColS+	64,1	74,3	79,8	
24h ColS+	59,5	68,1	81,1	84,3

Tabelle 28: MRGN5487 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für sechs, acht und 24 Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar bzw. für acht und 24 Stunden auf Columbia-Blutagar [%].

	6h Brain-Heart	8h Brain-Heart	24h Brain-Heart	8h ColS+
8h Brain-Heart	94,7			
24h Brain-Heart	76,5	80,3		
8h ColS+	82,2	83,3	76,0	
24h ColS+	71,6	74,7	84,7	81,5

Tabelle 29: MRGN5508 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für sechs, acht und 24 Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar bzw. für acht und 24 Stunden auf Columbia-Blutagar [%].

	6h Brain-Heart	8h Brain-Heart	24h Brain-Heart	8h ColS+
8h Brain-Heart	88,9			
24h Brain-Heart	76,8	75,0		
8h ColS+	80,0	74,1	82,5	
24h ColS+	63,2	59,5	81,0	77,9

Tabelle 30: MRGN5509 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für sechs, acht und 24 Stunden auf Brain-Heart-Infusion-Agar bzw. für acht und 24 Stunden auf Columbia-Blutagar [%].

	6h Brain-Heart	8h Brain-Heart	24h Brain-Heart	8h ColS+
8h Brain-Heart	91,0			
24h Brain-Heart	68,9	75,3		
8h ColS+	87,5	92,4	75,0	
24h ColS+	61,9	69,2	84,7	71,4

Tabelle 31: MRGN5487 – Ähnlichkeit der Isolatspektren des Isolates MRGN5487 nach Inkubation für 16, 18, 20, 22, 24 und 26 Stunden [%]. Das Isolat wurde bei 37 °C auf Columbia-Blutagar inkubiert und im Anschluss jeweils mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die FTIR-Spektren bei unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden summiert, verglichen und ihre prozentuale Übereinstimmung errechnet.

Tabelle 32: MRGN5508 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 16, 18, 20, 22, 24 und 26 Stunden [%].

Tabelle 33: MRGN5509 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 16, 18, 20, 22, 24 und 26 Stunden [%].

Tabelle 34: MRGN5462 – Ähnlichkeit der Isolatspektren des Isolates MRGN5462 nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%]. Das Isolat wurde bei 37 °C auf Columbia-Blutagar inkubiert und im Anschluss jeweils mithilfe der FTIR-Spektroskopie typisiert. Die FTIR-Spektren bei unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden summiert, verglichen und ihre prozentuale Übereinstimmung errechnet.

Tabelle 35: MRGN5477 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%].

Tabelle 36: MRGN5481 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%].

Tabelle 37: MRGN5482 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%].

Tabelle 38: MRGN5487 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%].

Tabelle 39: MRGN5508 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%].

Tabelle 40: MRGN5509 – Übereinstimmung der FTIR-Clustereinteilung nach Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden [%].

## Veröffentlichungen

VOGT, S., LÖFFLER, K., BADER, B., PETER, S., LIESE, J. 2020. Transmission Surveillance of Multi-Drug Resistant (MDR-) *Escherichia coli* Using Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Whole Genome Sequencing as Strain Typing Methods. *Vortrag und Poster bei der Jahrestagung 2020 der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie).*

## Danksagung

Viele Stunden und ebenso viel Energie sind in dieses Projekt geflossen und ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei allen Menschen bedanken, die mir auf diesem Weg zur Seite standen. Allen voran danke ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Silke Peter, die neben ihrer Tätigkeit als Institutsleitung auch die Supervision meiner Dissertation bereitwillig übernommen hat. Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Jan Liese und Frau Dr. med. Sophia Wolf bedanken, die mit mir das Konzept dieser Arbeit entwickelt haben, mich in Laborarbeit und Analysetechniken eingearbeitet und von Anfang an geduldig alle Fragen beantwortet haben. Ohne Euch wäre meine Dissertation nie zustande gekommen und dafür danke ich Euch von Herzen! Weiterhin bin ich Baris Bader zu großem Dank verpflichtet, der mir bei der Ganzgenomsequenzierung mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch allen anderen, hier nicht namentlich aufgezählten Mitarbeitenden des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene, die im Laufe der Zeit mit mir oder meinen Proben zu tun hatten, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen. Für die großzügige finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums der Interfakultären Graduiertenschule für Infektions- und Mikrobiologie Tübingen (IGIM) danke ich dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF).