

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Simulation einer prospektiven Transmissionssurveillance  
mit Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie  
als Echtzeit-Typisierungsverfahren**

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

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

**vorgelegt von**

**Barth-Jakschic, Elisabeth, geb. Barth**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Peter  
2. Berichterstatter: Privatdozentin J. Schulze-Hentrich, Ph.D.

Tag der Disputation: 22.09.2022

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Surveillance in der Krankenhaushygiene .....	1
1.2 Nosokomiale Infektionen und Transmissionen.....	2
1.3 Erregeridentifikation und -typisierung.....	7
2. Zielsetzung der Arbeit .....	13
3. Material.....	14
3.1 Laborbedarf und Einwegmaterial .....	14
3.2 Lösungen .....	15
3.3 Kits .....	15
3.4 Laborgeräte.....	15
3.5 Software und Online Tools.....	16
4. Methoden .....	17
4.1 Ethik .....	17
4.2 Bakterienstämme .....	17
4.3 Evaluation der Reproduzierbarkeit der FTIR Spektroskopie .....	18
4.4 Vorgehensweise bei der Simulation einer Transmissionssurveillance ....	19
4.5 Bakterienkultivierung und Asservierung .....	19
4.6 Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung .....	20
4.7 FTIR Spektroskopie .....	20
4.8 DNA Isolation .....	23
4.9 Ermittlung der DNA Konzentration .....	24
4.10 Whole Genome Sequencing .....	24
4.11 Vergleich der Clusterzuteilung der verschiedenen Methoden .....	29
4.12 Verwendete Cut-Off Werte.....	29
4.13 Accession numbers der Referenzgenome .....	30
5. Ergebnisse .....	31
5.1 Reproduzierbarkeit von FTIR Spektren.....	31
5.2 Simulation einer Transmissionssurveillance .....	33
5.3 Bestätigung der Spezies mittels MALDI-TOF.....	35
5.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	35
5.5 <i>Enterobacter cloacae</i> Komplex .....	41
5.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47

5.7 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
5.8 <i>Acinetobacter baumannii</i> Komplex.....	61
5.9 <i>Stenotrophomonas spp.</i> .....	66
6. Diskussion .....	69
6.1 Reproduzierbarkeit und Einsatz in der Routinediagnostik.....	69
6.2 Cut-Off Werte und Spektralbereich .....	70
6.3 Transmissionssurveillance .....	72
6.4 Ausblick.....	81
7. Zusammenfassung .....	83
8. Literaturverzeichnis .....	85
9. Anhang .....	92
9.1 Erklärung zum Eigenanteil .....	92
9.2 Danksagung.....	93
9.3 Förderung .....	93
9.4 Supplementärmaterial .....	94

Aufgrund der leichteren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit das generische Maskulinum bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. Dies sollte keine Benachteiligung des weiblichen Geschlechts oder intersexueller sowie transsexueller Identitäten darstellen, sondern im Sinne der sprachlichen Vereinfachung als geschlechtsneutral zu verstehen sein.

## Abkürzungsverzeichnis

ANI	Average Nucleotide Identity
ANIb Algorithmus	Algorithmus zur Erhebung der ANI
ARI	Adjusted Rand Index
dDDH	digitale DNA-DNA Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot Spektroskopie
HQ Reads	Hochqualitative Sequenzabschnitte der DNA
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Messung der „time of flight“
MHB	Lagerung auf Müller-Hinton Agar mit nachfolgender Inkubation bei Standardbedingungen
MLST	Multilocus-Sequenz-Typisierung
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RK	Reinheitskontrollen der Routinediagnostik
RKB	Standardinkubationsbedingungen (24 h auf Schafblutagar bei 37 °C)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
<i>spa</i>	Protein A von <i>Staphylococcus aureus</i>
ST	Sequenztyp (bei MLST)
WGS	Whole Genome Sequencing

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Schematische Darstellung der Funktionsweise von MALDI-TOF.	8
Abbildung 2.	Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers in einem FTIR Spektrometer.	9
Abbildung 3.	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.	18
Abbildung 4.	Schematische Darstellung des Clean-ups.	25
Abbildung 5.	Sammlung aller 1543 Isolate der Transmissionssurveillance-Simulation.	34
Abbildung 6.	Dendrogramm der <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolate anhand der FTIR Spektren.	37
Abbildung 7.	Dendrogramm der <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolate anhand der SNP-Analyse.	39
Abbildung 8.	Darstellung der epidemiologischen Verbindung der <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolate, sowie FTIR- und SNP-Cluster.	40
Abbildung 9.	Dendrogramm der Isolate des <i>Enterobacter cloacae</i> Komplexes anhand der FTIR Spektren.	43
Abbildung 10.	Dendrogramm der <i>Enterobacter cloacae</i> Isolate anhand der SNP-Analyse.	45
Abbildung 11.	Darstellung der epidemiologischen Verbindung der Isolate des <i>Enterobacter cloacae</i> Komplexes, sowie FTIR- und SNP-Cluster.	46
Abbildung 12.	Dendrogramm der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolate anhand der FTIR Spektren.	49
Abbildung 13.	Dendrogramm der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolate anhand SNP-Analyse mit 37 und 60 SNPs als Cut-Off Wert.	52
Abbildung 14.	Darstellung der epidemiologischen Verbindung der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolate, sowie FTIR- und SNP-Cluster.	53
Abbildung 15.	Dendrogramm der <i>Staphylococcus aureus</i> Isolate anhand der FTIR Spektren.	56
Abbildung 16.	Dendrogramm der <i>Staphylococcus aureus</i> Isolate anhand SNP-Analyse.	59
Abbildung 17.	Darstellung der epidemiologischen Verbindung der <i>Staphylococcus aureus</i> Isolate, sowie FTIR- und SNP-Cluster.	60
Abbildung 18.	Dendrogramm der Isolate des <i>Acinetobacter baumannii</i> Komplexes anhand FTIR Spektren.	62
Abbildung 19.	Darstellung der epidemiologischen Verbindung der Isolate des <i>Acinetobacter baumannii</i> Komplexes.	65
Abbildung 20.	Dendrogramm der <i>Stenotrophomonas spp.</i> Isolate anhand FTIR Spektren.	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Grenzwerte der Qualitätskriterien technischer Replikate. ....	22
Tabelle 2. Gesammelte und typisierte Bakterienisolate.....	31
Tabelle 3. Einfluss Inkubation und Lagerung auf die FTIR Spektren.....	33
Tabelle 4. Gesammelte Bakterienisolate der simulierten Transmissionssurveillance. ....	34
Tabelle 5. MLST und Kapseleigenschaften der <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolate. .....	38
Tabelle 6. Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	41
Tabelle 7. MLST der Isolate des <i>Enterobacter cloacae</i> Komplexes. ....	44
Tabelle 8. Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei <i>Enterobacter cloacae</i> Komplex. ....	47
Tabelle 9. MLST der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolate.....	50
Tabelle 10. Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
Tabelle 11. MLST und spa-Typisierung der <i>Staphylococcus aureus</i> Isolate. ...	57
Tabelle 12. Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	61
Tabelle 13. Average Nucleotide Identity (ANI) und dDDH verglichen mit dem Referenzgenom.....	63
Tabelle 14. MLST und Kapseleigenschaften der Isolate des <i>Acinetobacter baumannii</i> Komplexes. ....	64
Tabelle 15. Anzahl der SNPs zwischen den Isolaten des <i>Acinetobacter baumannii</i> Komplexes. ....	65
Tabelle 16. Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei <i>Acinetobacter baumannii</i> Komplex. ....	66
Tabelle 17. Average Nucleotide Identity (ANI) der <i>Stenotrophomonas spp.</i> Isolate.....	68
Tabelle 18. MLST der beiden <i>Stenotrophomonas spp.</i> Isolate.....	68
Tabelle 19. Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei <i>Stenotrophomonas spp.</i> ....	68

## Verzeichnis des Supplementärmaterials

Tabelle S 1. ANI der <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolate.....	94
Tabelle S 2. ANI der Isolate des <i>Enterobacter cloacae</i> Komplexes. ....	94
Tabelle S 3. ANI der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolate.....	95
Tabelle S 4. ANI der <i>Staphylococcus aureus</i> Isolate.....	95
Abbildung S 1. Logarithmische Darstellung der SNP-Phylogenie des Clusters A der Spezies <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ....	96
Abbildung S 2. Logarithmische Darstellung der SNP-Phylogenie der Isolate mit ST-78 der Spezies <i>Enterobacter cloacae</i> Komplex.....	97

## **1. Einleitung**

### **1.1 Surveillance in der Krankenhaushygiene**

Das Gebiet der Krankenhaushygiene befasst sich mit der Entwicklung und der Durchführung von präventiven Maßnahmen gegen Infektionskrankheiten sowie der Hygiene in der Patientenversorgung. Wichtige Akteure sind die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) und das Robert Koch-Institut. Anhand Empfehlungen dieser Institutionen werden ständig mögliche Defizite aufgegriffen, Abläufe analysiert und Maßnahmen zur Verbesserung entwickelt. Zur Qualitätssicherung und um bei diesem Prozess auf einem aktuellen Stand zu bleiben, sind die Erhebung und Evaluation von Daten ebenso unerlässlich wie die Forschung an geeigneten Methoden. Unter anderem deshalb besteht ein großes Interesse an effizienten Systemen zur Surveillance. Der Begriff Surveillance beschreibt das Sammeln sowie die Interpretation von Infektionsdaten über einen bestimmten Zeitraum, um daraus neue Erkenntnisse abzuleiten (LANGMUIR 1963; KRINKO 2020).

Zur längerfristigen Surveillance nosokomialer Infektionen und zur einheitlichen Überwachung, wurde das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) entwickelt. Von einer nosokomialen Infektion wird dabei gesprochen, wenn der Tag der ersten Infektionszeichen (Infektionstag) frühestens der dritte Tag des Krankenhausaufenthalts ist (Robert Koch-Institut 2017). Daten, wie beispielsweise die Inzidenz der Lungenentzündung bei Frühgeborenen, werden von den teilnehmenden Kliniken an das Nationale Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) weitergegeben und verglichen. Die Ergebnisse werden jährlich veröffentlicht, um über die Verteilung und die Häufigkeit von bestimmten Infektionen in Risikobereichen zu berichten. Trotz der zahlreichen Bemühungen und den umfangreichen Erkenntnissen des KISS mangelt es dennoch an einer kurzfristigeren, schnelleren Möglichkeit Infektionswege aufzudecken und so die Behandlung der aktuell betroffenen Patienten zu verbessern. Der Bedarf ist gerade bei bakteriellen nosokomialen Infektionen besonders hoch, da diese Behandlungsdauer und -umfang für die Patienten verlängern (Eber et al. 2010; Klevens et al. 2007).

Im Gegensatz zur jährlichen Surveillance des KISS, welches nur retrospektiv Informationen liefert, könnten Patienten durch eine fortlaufende Surveillance und sofortiger Hygienemaßnahmen vor Infektionen geschützt werden. Zudem könnte neben der Infektion auch die Kolonisation von Patienten berücksichtigt werden. Von einer Kolonisation wird gesprochen, wenn ein Individuum zwar Träger eines Erregers ist, jedoch keine Erkrankung entwickelt. Dennoch können diese als Überträger der Erreger fungieren. Unter anderem für diese Fragestellungen fehlt es derzeit an einer schnellen und kostengünstigen Methodik, wobei die hier verwendete Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) Spektroskopie ihren Einsatz finden könnte.

## **1.2 Nosokomiale Infektionen und Transmissionen**

Unter einer Transmission versteht man die Übertragung eines Krankheitserregers von einem Wirt zum nächsten. Gerade bei nosokomialen Infektionen ist das Interesse an den Infektionswegen sehr groß. Im Abschlussbericht von 2016 veröffentlichte das NRZ die Ergebnisse von 64412 beobachteten Patienten. Die häufigsten Erreger nosokomialer Erkrankungen waren: *Escherichia coli* (16,6 %), *Clostridium difficile* (13,6 %), *Staphylococcus aureus* (12,0 %), *Enterococcus faecalis* (6,9 %), *Pseudomonas aeruginosa* (5,8 %), *Staphylococcus epidermidis* (5,7 %), *Enterococcus faecium* (5,7 %), *Klebsiella pneumoniae* (4,5 %), *Proteus mirabilis* (2,8 %) und *Enterobacter cloacae* (2,6 %) (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen 2016). Das Spektrum an Erregern ist ebenso breit gefächert wie die verursachten Erkrankungen. Im Folgenden werden die Spezies behandelt, welche während der hier simulierten Surveillance an Transmissionen beteiligt waren.

### **1.2.1 Enterobacteriaceae**

Diese Familie gramnegativer Bakterien umfasst überwiegend Spezies der Darmflora, was zur Namensgebung führte. Trotz unterschiedlicher phänotypischer Eigenschaften, wie Erscheinungsbild oder Beweglichkeit,

können die Vertreter anhand ihrer Phylogenie zu einer Familie zusammengefasst werden (Adeolu et al. 2016).

#### **1.2.1.1 *Enterobacter cloacae***

Diese Stäbchenbakterien sind bekapselt sowie begeißelt und damit beweglich (Suerbaum et al. 2012; Hof and Schlüter 2019). *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* und *Enterobacter roggenkampii* sind sich phänotypisch sehr ähnlich, weshalb sie einen Komplex bilden, wenn auch Unterschiede im Genom bestehen (Mezzatesta et al. 2012). Es handelt sich um fakultativ pathogene Erreger von Bronchitis, Cholangitis, Harnwegsinfektionen, seltener Sepsis oder Meningitis (Hof and Schlüter 2019). Das Erkrankungsrisiko steigt bei Immunschwäche, weshalb *Enterobacter cloacae* auch bei nosokomialen Infektionen von Bedeutung ist und oft problematisch bei Neugeborenen sein kann (Suerbaum et al. 2012). Neben der natürlichen Resistenz gegen Penicillin G und Aminopenicilline können auch weitere Resistenzmechanismen erworben werden, was zu Multiresistenzen führen kann (Hof and Schlüter 2019; Suerbaum et al. 2012).

#### **1.2.1.2 *Klebsiella pneumoniae***

Diese gramnegative, unbewegliche Spezies ist für ihre Kapselbildung bekannt. Das Stäbchenbakterium gehört zum normalen Mikrobiom des Menschen, kann jedoch auch pathogen wirken (Suerbaum et al. 2012). Die Virulenz entsteht durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren: Die ausgeprägte Schleimkapsel fungiert als Schutz vor Phagozytose, wodurch die Aktivierung des Komplementsystems und damit die Lyse der Bakterienzelle unterbunden werden (Hahn et al. 1991). Adhäsine bewirken ein starkes Anhaften an den Zielzellen. *Klebsiella pneumoniae* besitzt Oberflächenpolysaccharide, wie K-Antigene oder O-Antigene. K-Antigene sind antigen wirksame Bestandteile der Kapsel, von denen keine Virulenz ausgeht. Verschiedene O-Antigene stören die Komplementkaskade und begünstigen die Nekrose des angrenzenden Gewebes (Slonczewski and Foster 2012; Hahn et al. 1991). *Klebsiella pneumoniae* ist

häufig ein Grund für nosokomiale Infektionen und kann beispielsweise Infektionen des Respirationstraktes, Harnwegsinfekte, Sepsis, Meningitis sowie Pleuritis hervorrufen (Madigan et al. 2015; Suerbaum et al. 2012). Klebsiellen weisen eine natürliche Resistenz gegen Penicillin G und Aminopenicilline auf, erwerben häufig zusätzliche Resistenzen und sind fähig zur ESBL-Bildung. (Suerbaum et al. 2012).

### **1.2.2 *Staphylococcus aureus***

Bei diesen grampositiven, zu einem Haufen gelagerten Kugelbakterien, ist die goldgelbe Farbe der Kolonien namensgebend. *Staphylococcus aureus* ist ursächlich für 70 - 80 % aller Wundinfektionen, 50 - 60 % aller Osteomyelitiden, 15 - 40 % aller Gefäßprotheseninfektionen, 30 % aller Fälle von Sepsis und Endokarditis und 10 % aller Pneumonien (Suerbaum et al. 2012). Übertragen wird das Bakterium endogen von besiedelten Gebieten des Patienten selbst oder exogen durch Schmierinfektion, beispielsweise zwischen Patient und Pflegepersonal. Bis zu 50 % aller Menschen sind vor allem im Bereich der Nasenschleimhaut besiedelt und bleiben symptomlos (Suerbaum et al. 2012). Durch verschiedene Virulenzfaktoren besteht jedoch eine Pathogenität: Um an verletztem Gewebe zu haften (Adhäsion) besitzt *Staphylococcus aureus* den sogenannten „clumping factor“ auf der Zellwand, welcher als Rezeptor für Fibrinogen fungiert. Mithilfe von Desoxyribonukleasen, Lipasen oder Hyaluronidasen kann sich das Bakterium durch Zerlegung von zellulären und interzellulären Strukturen im Gewebe weiter ausbreiten (Invasion). Die weitere Etablierung im Wirt ermöglichen Koagulasen, Protein A oder Leukozidin, welche auf unterschiedliche Arten die Immunreaktion erschweren (Madigan et al. 2015; Suerbaum et al. 2012). Die Mehrheit aller Stämme besitzt Penicillinasen und ist daher gegen Penicillin G und dessen Abkömmlinge unempfindlich. Durch die Anwendung von Antibiotika haben sich mit der Zeit Resistenzen gebildet. Bereits 1962 wurden Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (MRSA) entdeckt, welche gegen fast alle beta-Laktam-Antibiotika resistent sind. Bei immungeschwächten Patienten ist die Spezies oft Ursache für nosokomiale Infektionen (Suerbaum et al. 2012; Madigan et al. 2015). In einer Studie zum

Vorkommen von MRSA in deutschen Altenpflegeheimen zeigte sich eine Prävalenz von 3%. Beim Vorliegen eines Risikofaktors, wie beispielsweise ein Harnwegskatheter, besteht ein 3-mal höheres Infektionsrisiko (Neuhaus et al. 2002). Die Einhaltung der vorgeschriebenen Hygienemaßnahmen ist essenziell zur Prävention.

### **1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa***

Bei Pseudomonaden handelt es sich um obligat aerobe, gramnegative Stäbchenbakterien, welche durch Geißeln beweglich sind. Sie können Glukose nur in Anwesenheit von Sauerstoff verwerten und sind nicht dazu fähig diese zu fermentieren, weshalb man von Nonfermentern spricht (Suerbaum et al. 2012). Die Spezies besitzt keine hohen Wachstumsansprüche aber eine hohe Umweltresistenz, weshalb sie als typischer Nasskeim gilt (Suerbaum et al. 2012). So ist *Pseudomonas aeruginosa* in Beatmungsschläuchen, Luftbefeuchtern, Inkubatoren, Waschbecken, Blumenvasen, Seifenbehältern oder Siphons anzutreffen (Hof and Schlüter 2019). Es handelt sich um einen der häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen. Oft sind Verbrennungsverletzungen mit *Pseudomonas aeruginosa* assoziiert (Madigan et al. 2015), wie auch Pneumonien, Harnwegsinfekte, Infektionen der Haut und Nägel oder Mittel- und Außenohrentzündungen (Suerbaum et al. 2012). Pili und Flagellen ermöglichen neben der Beweglichkeit auch das Anhaften an den Zellen des Wirts. Lipopolysaccharide erschweren die Phagozytose, wirken sich vorteilhaft auf die Adhäsion aus und agieren typischerweise als Endotoxin. Eine umhüllende Schleimschicht aus Alginate erschwert ebenfalls die Phagozytose, spielt bei der Chronifizierung eine wesentliche Rolle und ermöglicht die Biofilmbildung auf medizinischen Implantaten (Slonczewski and Foster 2012; Hof and Schlüter 2019; Suerbaum et al. 2012). Die äußere Membran stellt eine Diffusionsbarriere für Antibiotika dar, welche deshalb über spezielle Kanäle ins Innere des Bakteriums gelangen müssen. Konstitutionell werden auch beta-Laktamasen gebildet, wodurch Penicilline und einige Cephalosporine unwirksam bleiben (Hof and Schlüter 2019).

#### **1.2.4 *Acinetobacter baumannii* Komplex**

Aufgrund phylogenetischer Ähnlichkeiten der Stämme des sogenannten *Acinetobacter baumannii* Komplexes, kann die Speziesidentifikation im Labor oftmals erschwert sein. Aus diesem Grund werden *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. nosocomialis* sowie *A. pittii* zu einem Komplex zusammengefasst (Schleicher et al. 2013; Nemeč et al. 2011; Gerner-Smidt et al. 1991; Dijkshoorn and van der Toorn 1992). In den letzten Jahren wurden weitere Stämme mit Gemeinsamkeiten beschrieben und hinzugefügt, wie beispielsweise *A. seifertii* (Nemeč et al. 2015). Namensgebend für die Gattung ist, dass die Vertreter historisch zunächst durch das Fehlen von Flagellen unbeweglich (akinetisch) erschienen (Schleicher et al. 2013). Die gramnegativen, aeroben Bakterien gewinnen im Hinblick auf nosokomiale Infektionen zunehmend an Bedeutung, da sie zahlreiche Infektionen bis hin zur Sepsis verursachen können. Problematisch ist sowohl die Fähigkeit der Resistenzbildung gegen Antibiotika als auch die hohe Umweltresistenz. Die Erreger können nach einem Ausbruchsgeschehen besonders lange auf trockenen Oberflächen überleben und werden durch Schmierinfektion vorrangig auf immungeschwächte Patienten übertragen (Schleicher et al. 2013; Amtliche Mitteilung 2012).

#### **1.2.5 *Stenotrophomonas spp.***

Neben zahlreichen anderen Spezies stellt *Stenotrophomonas maltophilia* den wohl bekanntesten Vertreter dieser Gattung dar (Steinmann et al. 2018; Patil et al. 2016). In dieser Arbeit werden außerdem die Spezies *Stenotrophomonas africana* sowie *Stenotrophomonas pavanii* behandelt. *S. africana* wurde 1997 beschrieben und wird seit 2004 mit *S. maltophilia* gleichgesetzt (Coenye et al. 2004; Drancourt et al. 1997). Die Spezies *S. pavanii* wurde 2011 erstmals auf Nutzpflanzen brasilianischer Plantagen entdeckt (Ramos et al. 2011). Die gramnegativen aeroben Bakterien sind opportunistische Erreger von nosokomialen Infektionen, wie beispielsweise Katheter-assoziierten Bakteriämien und respiratorischen Infekten. Ursächlich dafür wird die Fähigkeit zur Biofilmbildung angenommen, welcher auf Fremdmaterialien wie dem Tubus beatmeter Patienten haftet und so eine Infektion hervorruft (Sharma et al. 2020;

Surapat et al. 2020). Zu der intrinsischen Resistenz gegen Antibiotika durch beta-Laktamasebildung kommen zusätzlich erworbene Resistenzen durch die hohe Bereitschaft zum Genaustausch (Mançano et al. 2020). Diese Faktoren stellen vor allem in der Therapie immungeschwächter, multimorbider Patienten eine große Schwierigkeit dar (Looney et al. 2009).

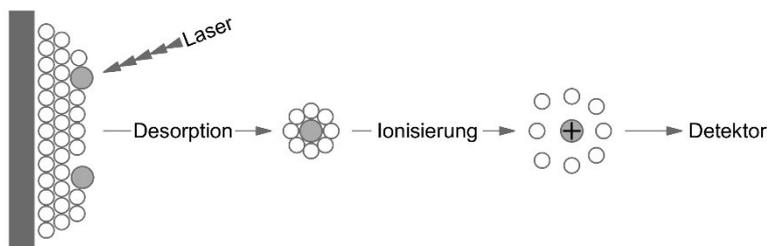
### **1.3 Erregeridentifikation und -typisierung**

Mit der Identifikation eines Bakteriums wird die Zuordnung zu einer Spezies gemeint, wohingegen die Typisierung Isolate gleicher Spezies genauer differenziert. In der mikrobiologischen Routinediagnostik und der Hygiene ist die Identifikation von Krankheitserregern und deren Typisierung von wesentlicher Bedeutung. Die Kenntnis der Verwandtschaft von Bakterien ist grundlegend zur Aufklärung von Infektionswegen und zur Surveillance. Bei nosokomialen Infektionskrankheiten und Ausbruchvorgängen können so infektionshygienische Maßnahmen eingeleitet werden (Wichelhaus and Brade 2000). Es werden phänotypische und genotypische Methoden unterschieden: Erstere charakterisieren ein Bakterium nach seinen Eigenschaften, wohingegen bei Letzteren das Genom zur Typisierung genutzt wird (Wichelhaus and Brade 2000). Um Bakterien im Klinikalltag zu typisieren, muss eine Methode neben der Reproduzierbarkeit auch ein hohes Diskriminationspotential besitzen. Das Verfahren sollte günstig, schnell und einfach durchzuführen und das Ergebnis leicht zu interpretieren sein. Ein perfektes Typisierungsverfahren gibt es nicht, weshalb Vor- und Nachteile gegeneinander abgewogen werden müssen (Wichelhaus and Brade 2000).

#### **1.3.1 Identifikation durch MALDI-TOF**

Wesentlich zur Identifikation von Stämmen in der Routinediagnostik ist die Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI), bei der im Anschluss die „time of flight“ (TOF) der Ionen ermittelt wird (Caprioli et al. 1997). Die zu messende Probe wird auf einem Metalltarget mit Matrix benetzt, welche das Analyt umgibt wie ein Kristallgitter (Karas and Bahr 1990; Caprioli et al. 1997). In der Matrix sind organische Moleküle enthalten, welche die Energie des Lasers aufnehmen

können (Karas and Bahr 1990). Bei der sogenannten Desorption wird die Probe durch die Energie des Lasers in kurzen, hochenergetischen Intervallen angeregt, was zu einer explosionsartigen Freisetzung von Teilchen führt (Karas and Bahr 1993). Die kristallisierten Partikel der Probe werden in das Vakuum des Massenspektrometers überführt. Durch die Abgabe bzw. Aufnahme von Protonen werden sie ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt (Karas and Krüger 2003; Caprioli et al. 1997). Die Flugzeit der ionisierten Partikel sowie deren molare Masse werden von einem Detektor ermittelt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, sodass ein charakteristisches Massenspektrum entsteht (Karas and Bahr 1993). In einer Datenbank wird das Muster der Peaks mit Referenzspektren verglichen und so die Spezies identifiziert (Hof and Schlüter 2019), ohne auf die Phylogenie von Bakterien Antwort zu geben. Die Typisierung von Bakterien mittels MALDI-TOF ist weiterhin Thema der Forschung (Feng et al. 2020; Dinkelacker et al. 2018).



**Abbildung 1. Schematische Darstellung der Funktionsweise von MALDI-TOF.** Die Energie des Lasers verdampft Matrix (weiß) und Analyt (grau). Bei der Ionisierung entsteht eine positiv geladene Wolke, die in Richtung Detektor beschleunigt wird.

## 1.3.2 Phänotypische Typisierung

### 1.3.2.1 Antibiogramm

Sehr weit verbreitet ist die Erstellung eines Antibiotika-Resistenzprofils. Anhand des sog. Antibiogramms wird Rückschluss auf die genetische Ausstattung an Resistenzgenen gezogen und damit auf die Verwandtschaft. Dieses Vorgehen ist zwar einfach, schnell und kostengünstig in der Durchführung, aber aus epidemiologischer Sicht leider oft nicht überzeugend. Zwei verschiedene Bakterienstämme können gleiche Resistenzmuster vorweisen, weshalb fälschlicherweise von einer Verwandtschaft oder Übertragung ausgegangen

werden könnte. So erschweren beispielsweise intrinsische Resistenzen mancher Spezies die Ermittlung individueller Resistenzprofile. Ebenso können identische Stämme ein unterschiedliches Antibiogramm zeigen. Ursächlich dafür ist zum einen der Gentransfer zwischen Bakterien, zum anderen die Entwicklung von Resistenzen unter Therapie (Wichelhaus and Brade 2000).

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

Die Aufnahme von Spektren zur Strukturaufklärung ist in der analytischen Chemie gängige Praxis, da bestimmte funktionelle Gruppen charakteristische Spektren zeigen. Dies wird auch in der Pharmazie, Lebensmitteltechnik oder der Forensik im Hinblick auf Drogen genutzt. Die Technik, die zur Typisierung von Bakterien verwendet wird, entspricht demselben Prinzip. Die Messung eines Spektrums basiert auf der Absorption von infrarotem Licht durch Schwingungen oder Rotationen von Molekülbindungen. Ein Detektor zeichnet diese Intensitätsänderung auf. Historisch wurde jeweils ein Spektrum für jeden einzelnen Wellenlängenbereich aufgenommen und im Anschluss zusammengefügt. Die Besonderheit der FTIR Spektroskopie besteht darin, alle Wellenlängenbereiche zeitgleich zu messen (Bienz et al. 2016). Ein gewohntes Spektrum entsteht erst durch eine mathematische Operation, die Fourier-Transformation (Lambert et al. 2012). Dieses Vorgehen wird durch das Michelson-Interferometer ermöglicht, das aus zwei herkömmlichen Spiegeln und einem strahlenteilenden halbdurchlässigen Spiegel besteht (Abbildung 2).

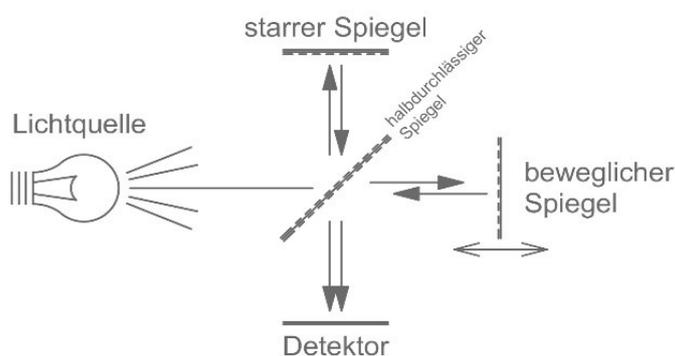


Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers in einem FTIR Spektrometer. (Modifiziert nach Lambert 2013).

Die Infrarotstrahlung trifft zunächst auf einen schräg angeordneten halbdurchlässigen Spiegel, welcher die Hälfte der Strahlung zu dem beweglichen Spiegel ablenkt und die andere Hälfte zu einem ortsfesten Spiegel passieren lässt. Diese beiden Spiegel stehen in einem Winkel von 90 Grad senkrecht zueinander. Der bewegliche Spiegel befindet sich auf einem Mikrometerschlitten, welcher extrem exakt und reproduzierbar verschoben werden kann. Ein Laser wird als Referenzstrahlungsquelle verwendet und gibt Rückschluss auf die Position dieses Spiegels. Beide Spiegel reflektieren die Strahlung wieder zurück zum Strahlenteiler, welcher die ankommenden Anteile erneut aufteilt, sodass 50 % der Strahlung auf den Detektor und 50 % zurück zur Lichtquelle geleitet werden. Bei gleichem Abstand der Spiegel zum Strahlenteiler kommt es zur Interferenz beider Strahlungsanteile, wohingegen die Änderung der Position des beweglichen Spiegels einen Gangunterschied erzeugt (Lambert et al. 2012). Die zu analysierende Probe befindet sich vor dem Detektor. Dadurch, dass der bewegliche Spiegel während der Messung seinen Abstand zum Strahlenteiler mit konstanter Geschwindigkeit verändert, wird die Aufnahme eines Interferogramms ermöglicht, welches mathematisch in ein Spektrum umgewandelt werden kann. Unerlässlich für diese Berechnung ist dabei die genaue Kenntnis über die Position des Spiegels und dessen gleichmäßige Geschwindigkeit. Die Messung an modernen FTIR Geräten bietet neben der Schnelligkeit auch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis, um komplexere Spektren z. B. von Bakterien aufzunehmen (Skoog et al. 2013). Bei einem Spektrum wird die Transmission, also die prozentuale Durchlässigkeit einer Probe gegen die Wellenzahl, den Kehrwert der Wellenlänge, aufgetragen. Ein Analyt erzeugt charakteristische Banden oder Peaks, wenn die Strahlung in einem bestimmten Bereich des elektromagnetischen Spektrums absorbiert wird (Lambert et al. 2012; Bienz et al. 2016). Die Absorptionsbanden von Strukturen auf der Membran von Bakterien, wie beispielsweise der Glykokalix werden mit bekannten funktionellen Gruppen aus der Biochemie verglichen und so zur Identifikation und ferner zur Typisierung genutzt (Novais et al. 2019). Zudem werden alle Bandenmuster in eine Datenbank aufgenommen, die zum weiteren Vergleich dient und dadurch immer präzisere Ergebnisse liefert. Die Methode besitzt großes Potential zur

Surveillance, da Informationen über die Phylogenie der Bakterien schnell zur Verfügung stehen und gegebenenfalls Präventionsmaßnahmen eingeleitet werden können (Vogt et al. 2019; Dinkelacker et al. 2018).

### **1.3.3 Genotypische Typisierung**

#### **1.3.3.1 Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)**

Die Typisierung von Bakterien anhand ihrer genetischen Ausstattung bezüglich sogenannter „house-keeping“ Gene, wurde erstmals 1998 beschrieben (Maiden et al. 1998). Bei den „house-keeping“ Genen handelt es sich um meist sieben relativ hochkonservierte Regionen des bakteriellen Genoms, welche für Stoffwechselfvorgänge eine zentrale Rolle spielen. Für jede Spezies werden spezielle Schemen verwendet, um die verschiedenen, konservierten Genorte (Loci) zu vergleichen. Anhand kleiner Unterschiede in der Sequenz und dem Kombinationsmuster der sieben Loci ist es möglich, Isolate identischer Spezies zu typisieren (Maiden et al. 1998). Durch die Verwendung spezifischer Primer konnte die Methode in der Vergangenheit auch ohne Sequenzierung des kompletten Genoms angewandt werden. Heute werden Datenbanken genutzt und den Allelen Nummern zugewiesen, um den Sequenztyp aus dem Genom zu ermitteln (Maiden 2006; Larsen et al. 2012; Urwin and Maiden 2003).

#### **1.3.3.2 *spa*-Typisierung bei *Staphylococcus aureus***

Zur Typisierung wird die Gensequenz des Proteins A von *Staphylococcus aureus* (*spa*) genutzt. Diese enthält eine hypervariable Region X, welche aus vielfach wiederholten kurzen Sequenzen besteht und von konservierten Abschnitten umgeben ist. Der charakteristischen Abfolge dieser Repeats wird durch den Vergleich mit einer Datenbank ein numerischer Code zugewiesen (Strommenger et al. 2008; Hallin et al. 2009).

#### **1.3.3.3 Whole Genome Sequencing**

Die Ganzgenomsequenzierung gilt als Goldstandard um verwandtschaftliche Beziehungen zweier Stämme mit möglichst hohem Diskriminationspotential zu bestimmen. Dabei wird die Sequenz der bakteriellen DNA komplett abgelesen

und für eine Vielzahl von Fragestellungen herangezogen. Im Vergleich zu früheren Sequenzierungsmöglichkeiten können beim Next Generation Sequencing sehr viele DNA Fragmente gleichzeitig abgelesen werden (Heather and Chain 2016), was die Schnelligkeit und Effizienz steigert. Dennoch ist die Sequenzierung noch zeit-, arbeits- und kostenintensiv. (Balloux et al. 2018; Ranjbar et al. 2014; Salipante et al. 2015). Nach der Isolation der DNA müssen zahlreiche aufwändige Arbeitsschritte sehr präzise durchgeführt werden bevor die phylogenetische Analyse stattfinden kann (Illumina 2017).

Nichtsdestotrotz werden sich in Zukunft, aufgrund erhöhter Nachfrage und technologischem Fortschritt, die Kosten reduzieren und die Effizienz steigern, sodass die Methode mehr und mehr in den klinischen Alltag Einzug halten wird (Balloux et al. 2018).

Die ermittelte Sequenz dient unter anderem zur phylogenetischen Analyse anhand von „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNP). Dabei wird die DNA zweier Bakterien zur Bestimmung von Verwandtschaftsgraden miteinander verglichen. Eine Mutation einer einzelnen Base eines komplementären DNA Abschnitts, lässt auf Vererbung dieses SNPs schließen. Je mehr SNPs ein Vergleichspaar aufweist, desto weiter ist die Verwandtschaft der beiden entfernt (Leaché and Oaks 2017).

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Infektionen durch Mikroorganismen können endogen von der patienteneigenen Flora ausgehen oder auch exogen von der Umwelt oder anderen Patienten übertragen werden. Ein erheblicher Teil nosokomialer Infektionen entsteht durch exogene Übertragungen, weshalb ein großes Potenzial zur Prävention dieser Transmissionen besteht. Epidemiologische Daten in Kombination mit mikrobiologischen Befunden (z.B. Nachweis eines Erregers bei zwei Patienten desselben Patientenzimmers) können auf mögliche Transmissionen hinweisen, wobei allerdings die natürliche Häufigkeitsverteilung der Erreger berücksichtigt werden muss. Für den Beweis einer Übertragung ist eine möglichst hochauflösende Erregertypisierung notwendig, um eine nahe genetische Verwandtschaft der Erregerisolate zu bestätigen. Whole Genome Sequencing besitzt ein hohes Auflösungsvermögen, jedoch ist der Einsatz durch relativ hohe Kosten und den zeitintensiven Workflow derzeit bei prospektiven oder Echtzeit-Fragestellungen noch limitiert (Salipante et al. 2015; Rumore et al. 2018; Ranjbar et al. 2014; Balloux et al. 2018). Die FTIR Spektroskopie hat sich in den vergangenen Jahren als geeignetes, kostengünstiges Typisierungsverfahren von Bakterienstämmen etabliert, wobei in vorangegangenen Arbeiten meist mit kryokonservierten Isolaten gearbeitet wurde (Vogt et al. 2019; Dinkelacker et al. 2018; Martak et al. 2019; Johler et al. 2016; Sousa; Silva; Grosso; Lopes and Peixe 2014). Vor allem durch die Schnelligkeit eignet sich die Methode jedoch zur Verwendung in Echtzeit.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einsatz der FTIR Spektroskopie bei einer simulierten, an die Routinediagnostik angebundene Surveillance in Echtzeit erprobt und mögliche Transmissionen im Rahmen einer prospektiven Untersuchung analysiert werden. Mittels anschließender Ganzgenomsequenzierung der Erreger soll das Auflösungsvermögen und damit die Anwendbarkeit der FTIR Spektroskopie bei häufigen Erregern bestimmt werden. Dies soll im Weiteren Aufschluss über das tatsächliche Bild der Transmissionen geben. Zudem sollten Spektren von Spezies erhoben werden, bei denen die Datenlage noch gering ist und so geeignete Cut-Off Werte oder Spektralbereiche definiert werden.

### 3. Material

#### 3.1 Laborbedarf und Einwegmaterial

Laborbedarf	Hersteller
Columbia-Agarplatten mit 5% Schafblut	Thermo Fisher Scientific Inc.
Müller-Hinton Agarplatten	Thermo Fisher Scientific Inc.
Impfösen 1µl und 10µl	Greiner Bio-One International GmbH
Mikroliterpipetten 0,5 - 10 µl 2 - 20 µl 10 - 100 µl 20 - 200 µl 30 - 300 µl 100 - 1000 µl	Eppendorf AG
Mehrkanalpipetten mit 8 Kanälen 10 µl 100 µl 300 µl	Eppendorf AG
Multipette 1 µl – 10 ml Combitip 10 ml	Eppendorf AG Eppendorf AG
Pipettenspitzen 10 µl 200 µl mit PE-Filter: 10 µl 100 µl 200 µl 300 µl 1000 µl	BRAND GmbH & Co. KG  nerbe plus GmbH & Co. KG
Pipettierhelfer  Pipette 10 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG  Merck KGaA
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
PCR SingleCap 8er SoftStrips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH
Falcon® Conical Tube 50 ml	Corning Inc.
Covaris Microtubes 6 x 16 mm	Covaris Inc.
Qubit™ assay tubes	Thermo Fisher Scientific Inc.
Microbank™ blue	Pro-Lab Diagnostics Inc.
Pasteurpipetten 3 ml	Alpha Laboratories Ltd
Kimtech™ Fusselfreie Tücher	Kimberly-Clark Worldwide, Inc.
sterile Wattestäbchen 15 cm	neoLab Migge GmbH
Zahnstocher	PAPSTAR GmbH
Handschuhe	Abena GmbH

### 3.2 Lösungen

Lösung	Hersteller
Ampuwa (autoklaviert)	Fresenius Kabi AG
Ethanol absolut Ethanol 70 % (unvergällt, steril filtriert) Ethanol 80 % (unvergällt)	AppliChem GmbH Eigenherstellung Eigenherstellung
PCR Grade Water	Biozym Scientific GmbH
NaOH 1 M NaOH 0,2 M	Hedinger GmbH & Co. KG Eigenherstellung
IVD Matrix HCCA Riedel-de Haën™ Standardlösungsmittel (50 % Acetonitril, 47,5 % Wasser, 2,5 % Trifluoressigsäure)	Bruker Daltonik GmbH Honeywell International Inc.

### 3.3 Kits

Kit	Hersteller
DNeasy® UltraClean® Microbial Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
TruSeq DNA Nano für high-throughput (HT)	Illumina Inc.

### 3.4 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
FTIR Spektrometer	Bruker Daltonik GmbH
microflex LT (MALDI)	Bruker Daltonik GmbH
NextSeq™ 500	Illumina Inc.
Ultraschalldispensor	Covaris Inc.
Qubit™ Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Thermocycler Biometra TRIO	Analytik Jena AG
Zentrifuge	Eppendorf AG
Sunlab® Mini-Zentrifuge	Labdiscount GmbH
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Vortexer waagerecht	Scientific Industries Inc.
Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Kühlschrank	Liebherr-Hausgeräte GmbH
Gefrierschrank - 20°C und - 80°C	Liebherr-Hausgeräte GmbH
Autoklav	ZIRBUS technology GmbH
Laborgasbrenner	WLD-TEC GmbH

### 3.5 Software und Online Tools

Software und Online Tool	Entwickler
Excel 2013	Microsoft Corporation
Word 2013	Microsoft Corporation
SwissLab und SwissLab Statistik	NEXUS AG
IR Biotyper Software	Bruker Daltonik GmbH
MALDI Biotyper System	Bruker Daltonik GmbH
BioNumerics (Version 7.6)	Applied Maths NV
SonoLab®	Covaris Inc.
NextSeq System Suite (v2.2.0)	Illumina Inc.
Spine PBS Script (Version 0.1.2)	(Ozer et al. 2014)
SPAdes (Version 3.7.0)	Center for Algorithmic Biotechnology (Nurk et al. 2013; Coil et al. 2015)
Trimmomatic (Version 0.35)	(Bolger et al. 2014)
Type Strain Genome Server	(Meier-Kolthoff and Göker 2019)
JSpeciesWS (Version 3.4.8)	(Richter et al. 2016)
PHASTER	Wishart Research Group (Arndt et al. 2016)
Center for Genomic Epidemiology (Version 2.0) MLST <i>spa</i> -Typisierung	Danish Council for Strategic Research (Larsen et al. 2012) (Bartels et al. 2014)
Kaptive (Version v0.7.0)	Melbourne eResearch Group (Wick et al. 2018; Wyres et al. 2020; Wyres et al. 2016)
Comparing Partitions Website	(Carriço et al. 2006)
Photoshop CS2	Adobe Inc.

## **4. Methoden**

### **4.1 Ethik**

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienisolate stammen aus der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Tübingen. Es wurden für diese Studie keine zusätzlichen Untersuchungsmaterialien gewonnen oder untersucht. Patienten waren physisch nicht in diese Studie involviert. Die Analyse von möglichen Transmissionsereignissen erfolgte durch die Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Tübingen im Rahmen der gesetzlichen Verpflichtung zur Prävention nosokomialer Infektionen und zur Vermeidung der Verbreitung von Krankheitserregern (§ 23 Infektionsschutzgesetz). Die hierbei gewonnenen und in dieser Arbeit genutzten Daten wurden von der Krankenhaushygiene vollständig anonymisiert zur Verfügung gestellt. Die Erlaubnis der Ethikkommission (Projektnummer 841/2018BO1) wurde eingeholt.

### **4.2 Bakterienstämme**

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden in einem vorangestellten Versuch folgende Spezies gesammelt: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter spp.* sowie *Pseudomonas spp.* Dazu wurden sämtliche Reinheitskontrollen der Routinediagnostik im Zeitraum von 28.10.2019 bis 11.11.2019 (15 Tage) verwendet.

Zur Simulation einer Transmissionssurveillance wurden anschließend täglich Patientenisolate im Zeitraum von 12.11.2019 bis 17.01.2020 (67 Tage) in eine Datenbank aufgenommen. Gesammelt wurden selbige Spezies wie bei dem vorausgehenden Versuch mit der Einschränkung auf *P. aeruginosa* und dem Verzicht auf *Escherichia coli*. Das Material wurde den Patienten im Zeitraum zwischen 7.11.2019 und 15.01.2020 (70 Tage) entnommen.

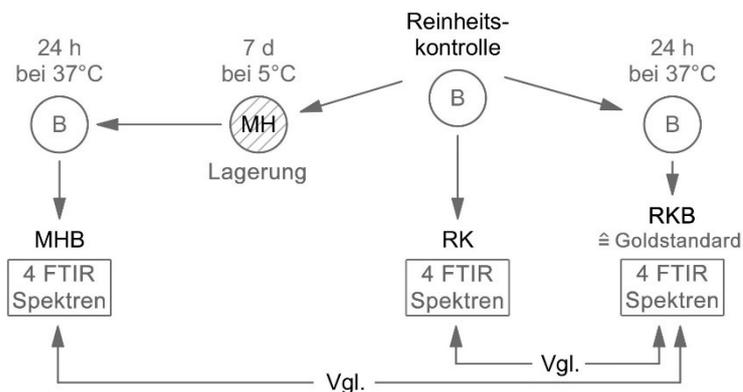
Bei beiden Sammlungen stammten die Proben von Patienten des Universitätsklinikums Tübingen, wobei jede Spezies pro Patient nur einmalig aufgenommen wurde, wenn möglich das Erstisolat. Nach dem Abgleich der Belegungsdaten mit den Labordaten durch die Krankenhaushygiene wurden die

entsprechenden Isolate, welche an möglichen Transmissionen beteiligt waren, typisiert.

### 4.3 Evaluation der Reproduzierbarkeit der FTIR Spektroskopie

Vor der Transmissionssurveillance sollte überprüft werden, ob die Lagerung, Subkultivierung oder der Wechsel des Nährmediums Einfluss auf die Spektren nehmen. Zudem wurde die Häufigkeit der diagnostizierten Spezies sowie die Realisierbarkeit bezüglich Lagerung und Zeitmanagement ermittelt.

Die gesammelten Isolate wurden auf drei unterschiedliche Weisen für die Messung vorbereitet. Die erste Messung erfolgte direkt von der Reinheitskontroll-Platte, die von der Routinediagnostik zu Verfügung gestellt wurde. Die Inkubationszeit war dabei unbekannt und konnte unterschiedlich lange gewesen sein, Nährmedium war Schafblutagar. Die zweite Messung erfolgte nach Subkultivierung auf Schafblutagar mit einer Inkubationszeit von 24 h (+/- 30 min) bei 37 °C. Mit der dritten Messung wurde überprüft ob die Lagerung auf Müller-Hinton Agarplatten im Kühlschrank das Spektrum verändert. Dazu wurden die Isolate auf Müller-Hinton Platten subkultiviert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und sieben Tage bei 5 °C gekühlt. Für die Messung wurde das Isolat wieder auf Schafblutagar abgeimpft und für 24 h (+/- 30 min) bei 37 °C inkubiert.



**Abbildung 3. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.** Jedes Isolat wurde auf drei unterschiedliche Weisen vorbereitet und anschließend die FTIR Spektren miteinander verglichen. Abkürzungen: B: Schafblutagar, MH: Müller-Hinton Agar, MHB: Spektrum nach der Lagerung, RK: Spektrum der Reinheitskontrolle, RKB: Spektrum nach 24-stündiger Inkubation auf Schafblutagar (Goldstandard).

Durch dieses Vorgehen entstanden von jedem Isolat 12 (= 3 x 4) FTIR Spektren, welche miteinander verglichen wurden. Als Goldstandard wurde die Messung

nach 24 h (+/- 30 min) bei 37 °C auf Schafblutagar zum Vergleich herangezogen, wie es sich bei vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe bereits etabliert hatte. Die Spektren der Reinheitskontrolle sowie die Spektren nach Lagerung wurden mit dem Standard verglichen. Die Ähnlichkeiten wurden anschließend gegenübergestellt.

#### **4.4 Vorgehensweise bei der Simulation einer Transmissionssurveillance**

Während des Zeitraums von 03.12.2019 bis 17.01.2020 erfolgte der Abgleich von Belegungsdaten des Klinikums mit Daten der Routinediagnostik durch die Krankenhaushygiene, um mögliche Transmissionen zu detektieren.

Eine potenzielle Übertragung wurde folgendermaßen definiert: Spender und Empfänger des übertragenen Keims waren im selben Patientenzimmer untergebracht. Der Erstdnachweis der Bakterienspezies beim Spender musste innerhalb 28 Tagen **vor** Zimmerkontakt mit dem Empfänger erfolgen. Beim Empfänger musste dieselbe Bakterienspezies erstmals innerhalb 28 Tage **nach** dem Zimmerkontakt mit dem Spender nachgewiesen worden sein. Waren zwei oder mehrere Isolate durch solche Kontakte verbunden, bildeten sie ein sog. Kontaktcluster.

Nach Information über eine potenzielle Transmission durch die Hygiene wurden die Isolate der Sammlung entnommen und typisiert. Die FTIR Spektroskopie wurde umgehend durchgeführt, um den Versuchsaufbau dem Einsatz im Routinebetrieb möglichst anzugleichen. Das Ergebnis wurde im Nachgang mit phylogenetischen Analysen verglichen und überprüft.

#### **4.5 Bakterienkultivierung und Asservierung**

Um die gesammelten Isolate möglichst platzsparend in großer Menge zu lagern, wurden je nach Spezies und Wachstumsmorphologie ein bis acht Isolate auf Müller-Hinton Agar subkultiviert. Nach einer 12 bis 18 h langen Inkubation bei 37 °C, erfolgte die Lagerung der Proben im Kühlschrank bei 5 °C. Nach maximal 14 Tagen Kühlung wurden die Isolate neu subkultiviert, inkubiert und wieder im Kühlschrank gelagert. Durch dieses Vorgehen wurde das Einfrieren von Proben

vermieden, um die Methodik so nah am Routinelaboralltag anzulehnen wie möglich.

Nach der Erhebung der Ergebnisse für die Transmissionssurveillance wurden die Isolate sicherheitshalber eingefroren, um den derzeitigen Zustand für eventuelle spätere Fragestellungen zu konservieren.

Zum Einfrieren wurde Koloniematerial einer frischen Reinkultur unter sterilen Bedingungen mithilfe eines Wattestäbchens abgenommen und in einem Microbank Röhrchen gründlich suspendiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Röhrchen bei - 80 °C eingefroren.

Zum Auftauen wurde das Isolat auf eine Schafblutagarplatte abgeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen auf Sauberkeit und Reinheit überprüft und erneut subkultiviert.

#### **4.6 Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung**

Zur Bestätigung der Spezies wurden die Isolate vor der Erhebung der Spektren und der Sequenzierung, mittels MALDI-TOF in Zweifachmessung identifiziert. Das Ergebnis der Routinediagnostik wurde erneut überprüft, da die Spezies nach Asservierung und wiederholtem Subkultivieren vor der Messung nochmals gesichert werden sollte. Vor Benutzung wurden die Targets gründlich mit Wasser und anschließend mit 70 % Ethanol gereinigt, wobei fusselfreie Tücher verwendet wurden. Nun wurde eine Kolonie mit einem sauberen Zahnstocher angetippt und auf zwei Messpunkten aufgetragen. Anschließend wurden die Messpunkte mit je 1 µl Matrix gleichmäßig bedeckt. Die Matrix wurde aus IVD Matrix HCCA und 250 µl Standardlösungsmittel hergestellt. Nachdem für jedes Isolat jeweils zwei Spots beladen wurden, konnte die Messung nach einer kurzen Trocknungszeit am Gerät microflex LT begonnen werden.

#### **4.7 FTIR Spektroskopie**

Bei der simulierten Transmissionssurveillance wurde jedes Isolat identisch auf die Messung vorbereitet und in drei unabhängigen Messdurchgängen jeweils vier Spektren ermittelt (Dreifachbestimmung). Dazu wurden die Bakterienisolate vor der Messung von Müller-Hinton Agar auf Schafblutagarplatten subkultiviert und

für 24 h (+/- 30 min) bei 37 °C inkubiert (Standardbedingungen). Vor Verwendung der Proben wurde eine Wachstums- und Reinheitskontrolle durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Messung wurden zunächst für jedes Isolat 50 µl Ethanol 70 % in ein Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde mit einer 1 µl Öse etwa eine stecknadelkopfgroße Menge Koloniematerial abgenommen und möglichst vollständig im Ethanol suspendiert. Danach wurden 50 µl steriles Wasser hinzu pipettiert. Eine Silikonplatte wurde mit sterilem Wasser sowie Ethanol 70 % gereinigt, um einen fusselreifen, sauberen Untergrund zu gewährleisten. Jedes Reaktionsgefäß wurde direkt vor dem Auftragen wenige Sekunden vorgetextet und von jeder Probe 15 µl der Suspension auf je einen Messplatz pipettiert. Pro Messdurchlauf wurden vier Messfelder pro Isolat verwendet. Im Anschluss wurde die Silikonplatte ca. 40 Minuten bei 37 °C im Brutschrank schonend getrocknet, um Risse oder Krusten zu vermeiden. Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde jeder Stamm in drei unabhängigen Experimenten gemessen.

Als technische Replikate wurden die vier Spektren bezeichnet, welche die im selben Messdurchgang auf unterschiedlichen Messfeldern aber zur selben Zeit erhoben wurden. Ein biologisches Replikat entsprach dem Durchschnittsspektrum aus den vier technischen Replikaten eines Messdurchgangs. Da an drei unterschiedlichen Zeitpunkten eine Messung durchgeführt wurde, entstanden drei biologische Replikate. Der Durchschnittswert der drei biologischen Replikate wurde als Summenspektrum bezeichnet und war das Spektrum mit dem weitergearbeitet wurde. Zur Messung wurde ein Bruker IR Biotyper System mit zugehöriger IR Biotyper Software unter Standardeinstellungen (pro technischem Replikat 32 Scans, Wellenzahlbereich 1300–800 cm<sup>-1</sup>) verwendet.

Folgende Qualitätskriterien mussten von jedem technischen Replikat erfüllt werden:

*Tabelle 1. Grenzwerte der Qualitätskriterien technischer Replikate.* Spektren von Messpunkten bei denen diese Kriterien nicht erfüllt wurden, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

	<b>Grenzwert</b>
Absorption	0,4 - 2,5
Noise (x 10 <sup>-6</sup> )	< 250
Signal/Noise	> 40
Water vapour (x 10 <sup>-6</sup> )	< 300
Signal/Water	> 200
Fringes (x 10 <sup>-6</sup> )	> 100

#### **4.7.1 Auswertung der FTIR Spektren**

Die Ähnlichkeit zweier Spektren wurde mithilfe des euklidischen Abstandes zwischen den beiden korrespondierenden Vektoren nach folgender Formel bestimmt: Ähnlichkeit [%] = (1 - euklidischer Abstand) x 100.

Abgesehen von den qualitativen Anforderungen der einzelnen technischen Replikate, musste durch eine weitere Kontrolle sichergestellt werden, dass das Summenspektrum nicht von einem technischen Replikat verzerrt wurde. Dazu wurde die Ähnlichkeit der vier technischen Replikate einer Messung in Prozentwerten berechnet. War die Übereinstimmung dieser Spektren kleiner als 85 %, so wurde in Microsoft Excel aus den Spektren ein Graph erstellt. War in dieser graphischen Darstellung ein Spektrum eindeutig von den anderen abweichend, konnte dieses von der Auswertung ausgeschlossen werden. Nachfolgend wurde die Ähnlichkeit der drei biologischen Replikate betrachtet. War diese geringer als 85 %, so wurden die Spektren aller zwölf technischen Replikate in einem Graphen dargestellt. Falls eindeutig ein Ausreißer identifiziert wurde, konnte dieses Spektrum verworfen werden. Eine Abweichung entstand beispielsweise durch Verschmutzung der Silikonplatte, Blasen oder Krümel in der Suspension. Der Ausschluss eines technischen Replikates erfolgte niemals leichtfertig. Gab es mehr abweichende Replikate als nur eins, wurden alle in der Auswertung belassen.

Um die Abweichung innerhalb einer Messung zu quantifizieren, wurden neben der durchschnittlichen Ähnlichkeit der vier technischen Replikate auch der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Für die Abweichung der

Messdurchgänge wurde die Ähnlichkeit der biologischen Replikate bestimmt und ebenfalls Mittelwert sowie Standardabweichung errechnet.

Danach wurde aus den Ähnlichkeiten der Summenspektren eine sog. Matrix berechnet. Hierbei handelt es sich um eine vergleichende Gegenüberstellung der Ähnlichkeiten verschiedener Isolate. Die Matrix wurde mit Hilfe von BioNumerics (Version 7.6) zur Cluster-Analyse verwendet, wobei die ungewichtete Paargruppenmethode mit arithmetischem Mittel (UPGMA) verwendet wurde. Der sog. Cut-Off Wert ist ein Grenzwert, ab dem Isolate als ähnlich gelten und zu einem Cluster zusammengefasst werden. Ein Cluster entspricht demnach einer Gruppe an ähnlichen Isolaten. Isolate, welche keine Ähnlichkeit zu anderen aufwiesen, wurden als Singletons bezeichnet.

#### **4.8 DNA Isolation**

Mit einer Öse wurden etwa 2 ml Bakterienmaterial abgenommen, in 300 µl PowerBead Solution gelöst und zusammen mit 50 µl Solution SL in einem PowerBead Tube für 10 Minuten waagrecht vorgetextet. Die darin enthaltenen Kugeln und das Natriumlaurylsulfat aus der Solution SL bewirkten sowohl die mechanische als auch die chemische Lyse der bakteriellen Zelle. Nach kurzem Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und mit 100 µl Solution IRS in einem Collection Tube vorgetextet. Solution IRS brachte organisches und nicht-organisches Material, mit Ausnahme der DNA, zum Ausfällen. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 5 °C und kurzem Zentrifugieren wurde der DNA haltige Überstand in ein neues Collection Tube überführt, in das 900 µl Solution SB vorgelegt wurden. Solution SB ist eine sehr salzhaltige Lösung, welche ein geeignetes Milieu gewährleistet, um die DNA an die MB Spin Column Membran durch polare Wechselwirkungen zu binden. Nach kurzem Vortexen wurden 650 µl auf die MB Spin Säule gegeben und zentrifugiert. Das Beladen der Säule mit anschließendem Zentrifugieren wurde bei *Staphylococcus aureus* ein zweites Mal durchgeführt, um die DNA Ausbeute zu erhöhen. Die DNA wurde an die Kieselsäuremembran gebunden, wohingegen letzte Verunreinigungen verworfen wurden. Anschließend wurden 300 µl Solution CB auf die Säule gegeben, wobei es sich um eine Waschlösung handelt, welche

überschüssige Salze von der Membran löst, jedoch die Bindung der DNA ermöglicht. Nach Verdampfen des überschüssigen Ethanol wurden 50 µl Solution EB (Elution Buffer) auf die Membran pipettiert und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren löste Solution EB durch einen pH-Wert von 8 die Bindung der DNA, welche nun bei - 20 °C aufbewahrt wurde.

#### **4.9 Ermittlung der DNA Konzentration**

Um die DNA Ausbeute nach der Isolation zu ermitteln und um die Library vor der Sequenzierung zu normalisieren, wurde die DNA-Konzentration gemessen. Dazu wurde eine Working Solution aus Puffer und Fluoreszenz im Verhältnis von 199:1 hergestellt. Die Proben wurden mit zwei Standards verglichen. 190 µl der Working Solution wurden mit je 10 µl von Standard 1 beziehungsweise Standard 2 vorgetextet. Von den Proben wurden 2 µl der DNA zu 198 µl der Working Solution gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die DNA Konzentrationen [ng/µl] der Proben in einem Qubit®-Fluorimeter gemessen.

#### **4.10 Whole Genome Sequencing**

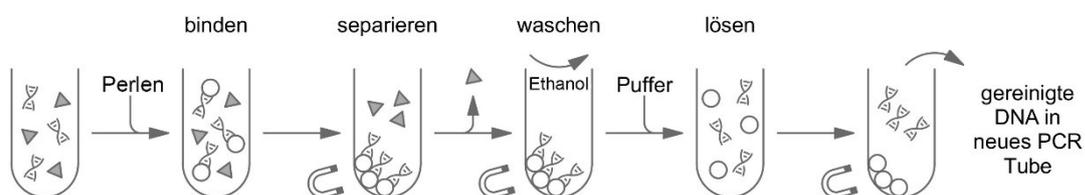
Die Vorbereitung der DNA-Library wurde nach den Vorgaben des Herstellers Illumina® in folgenden Teilschritten durchgeführt: 1. Quantifizierung, 2. Fragmentierung, 3. Clean-up, 4. End-Repair, 5. Size-Selection, 6. A-Tailing, 7. Adapterligation, 8. Clean-up, 9. PCR, 10. Clean-up, 11. Quantifizierung und Qualitätskontrolle und 12. Poolen der Library.

1. Quantifizierung: Zu Beginn wurde für jedes Isolat aus DNA und Resuspension Buffer eine Suspension mit einer Konzentration von 494 ng / 130 µl hergestellt.

2. Fragmentierung: Die gesamten 130 µl wurden ohne Lufteinschlüsse in einem Covaris Microtube durch Ultraschall mittels Covaris Sonicator in 550 bp lange DNA Fragmente zerkleinert.

3. Clean-up: Zur Aufreinigung wurden 80 µl der homogenen Sample Purification Bead Lösung mit 50 µl der Probe gut suspendiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Reaktionsgefäße in einen Magnetständer gestellt. Die Perlen sammelten sich am Rand des Gefäßes,

sodass die Flüssigkeit klar wurde und verworfen werden konnte, da die DNA an den Kügelchen gebunden war. Im Anschluss wurden die Proben zweimalig mit 200 µl Ethanol 80 % bedeckt, welcher nach 30 Sekunden Inkubation wieder vollständig abgenommen wurde. Nach kurzem Abdampfen wurden die PCR Reaktionsgefäße aus den Magnetständern genommen und die DNA wieder durch 62,5 µl Resuspension Buffer von den Perlen gelöst. Nach gründlichem suspendieren und einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben wieder in den Magnetständer gestellt. 60 µl des klaren Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt.



**Abbildung 4. Schematische Darstellung des Clean-ups.** Ein Magnet, der von außen an das Reaktionsgefäß gebracht wurde, hielt die Perlen samt DNA dort gebunden, während Kontaminationen im Überstand durch Ethanol entfernt wurde. Durch Zugabe von Elutionspuffer konnte die DNA wieder von den Perlen gelöst werden.

**4. End-Repair:** Jeweils 40 µl End-Repair-Mix 2 wurden nun mit der DNA gut suspendiert. Es folgte eine 30 Minuten lange Inkubation bei 30 °C im Thermocycler mit einer anschließenden Kühlung auf 4 °C.

**5. Size-Selection:** Für eine Länge der DNA Fragmente von 550 bp wurde eine Lösung aus Sample Purification Beads und PCR Grade Water im Verhältnis 1:1 hergestellt. Diese Verdünnung ermöglicht es, längere DNA Stücke auszusortieren. Zu der DNA wurden 160 µl der verdünnten Lösung gegeben, gut suspendiert und 5 Minuten inkubiert. Im Magnetständer wurde der gesamte klare Überstand abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit je 30 µl unverdünnter Sample Purification Bead Lösung suspendiert. Die Perlen mit den zu langen DNA Fragmenten wurden so verworfen. Nach 5 minütiger Inkubation wurde das Magnetfeld erneut genutzt. Nun wurde der Überstand mit den zu kurzen DNA Stückchen abgenommen und verworfen. Die Perlen wurden wie bei dem vorherigen Waschvorgang zweimalig mit Ethanol 80 % gewaschen und die DNA mit 20 µl Resuspension Buffer von den Kügelchen gelöst, sodass 17,5 µl

des klaren DNA-haltigen Überstandes in ein neues PCR Reaktionsgefäß überführt werden konnten.

6. A-Tailing: Zu jeder Probe wurden nun 12,5 µl A-Tailing Mix gegeben und im Thermocycler 30 Minuten auf 37 °C, 5 Minuten bei 70 °C und 5 Minuten auf 4 °C gebracht. Daraufhin wurde 1 Minute bei 280 G zentrifugiert.

7. Adapterligation: Zu den Proben wurden jeweils 2,5 µl Resuspension Buffer, 2,5 µl Ligation Mix 2 und 2,5 µl eines spezifischen Adapters gegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt, 10 Minuten bei 30 °C im Thermocycler inkubiert und im Anschluss bei 4 °C gekühlt. Mittels jeweils 5 µl Stop Ligation Buffers wurde die Ligation gestoppt.

8. Clean-up: Nun folgten zwei Waschvorgänge, die dem vorherigen Clean-up exakt glichen. Lediglich die Mengen der Lösungen wurden auf die jeweiligen Ausgangs-DNA Mengen angepasst, sodass beim ersten Waschschrift mit 42,5 µl Sample Purification Beads und 52,5 µl Resuspension Buffer gearbeitet wurde. Dabei wurden 50 µl des klaren Überstandes abgenommen. Beim zweiten Waschvorgang wurden 50 µl Sample Purification Beads und 27,5 µl Resuspension Buffer benutzt, sodass 25 µl Überstand gewonnen wurde.

9. Polymerase-Kettenreaktion: Jeweils 5 µl PCR Primer Cocktail sowie 20 µl Enhanced PCR Mix wurden mit jeder Probe suspendiert. Im Thermocycler folgten 3 Minuten bei 95 °C. Danach wurden acht Zyklen mit 20 Sekunden bei 98 °C, 15 Sekunden bei 60 °C sowie 30 Sekunden bei 72 °C durchlaufen. Im Anschluss folgten 5 Minuten bei 72 °C und die Kühlung auf 4 °C.

10. Clean-up: Dieser Waschschrift wurde erneut identisch durchgeführt, wobei mit 50 µl Sample Purification Beads und 32,5 µl Resuspension Buffer gearbeitet wurde. Für die weiteren Schritte wurden 30 µl des klaren Überstandes genutzt.

11. Quantifizierung und Qualitätskontrolle: Um die vorbereitete DNA zu quantifizieren und beim folgenden Pooling zu normalisieren, wurde die DNA Konzentration mit Hilfe Qubit™ dsDNA BR Assay Kits und Fluorimeter ermittelt.

12. Poolen der Library: Um die Library zu normalisieren wurde jede Probe mit der entsprechenden Menge Resuspension Buffer verdünnt, so dass 20 µl mit einer Konzentration von 4 nM entstanden. Da jede Probe einen spezifischen Adapter besaß, wurden sie gemeinsam in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Beim

nachfolgenden Denaturierungsvorgang wurden 5 µl der hergestellten Library zu 5 µl einer 0,2 M NaOH Lösung gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation wurden 5 µl TRIS-Puffer und 985 µl HT1 (Hybridization Buffer) zugefügt. 117 µl dieser Lösung wurden mit 1183 µl HT1 verdünnt auf 1,4 pM. Als Vergleichsmessung wurde PhiX-Lösung identisch zur Library verdünnt. Nach Zugabe von 13 µl der Vergleichslösung zur Library wurden 1300 µl der entstandenen Lösung in die Kartusche des NextSeq™ 500 pipettiert und die Messung wurde gestartet.

Um die Vorbereitung der Library an mehreren Tagen durchzuführen, wurden die vom Hersteller vorgesehenen Safe Stopping Points genutzt, an denen die Proben für sieben Tage bei - 20 °C gelagert werden können.

#### **4.10.1 Genomanalyse**

Die Assemblierung der DNA-Fragmente erfolgte durch die A5-Pipeline (Version 20140604) und SPAdes (Coil et al. 2015; Nurk et al. 2013). Zur Identifizierung der Spezies wurde das Genom jedes Isolats in JSpeciesWS (Richter et al. 2016) mit Referenzgenomen der entsprechenden Spezies verglichen und die Average Nucleotide Identity (ANI) basierend auf dem ANIb Algorithmus bestimmt (Richter and Rosselló-Móra 2009). Alternativ zur Identifizierung mittels JSpeciesWS wurde auch der Type Strain Genome Server (Meier-Kolthoff and Göker 2019) verwendet und die digitale DNA-DNA Hybridisierung (dDDH) berechnet, da der Server eine umfangreiche Datenbank an Vergleichsgenomen bietet. Eine ANI über 96 % bzw. eine dDDH über 70 % erlaubte die Zuordnung einer Spezies (Chun et al. 2018).

Zur weiteren phylogenetischen Analyse wurde aus den assemblierten Sequenzen mittels Spine (Ozer et al. 2014) ein gemeinsames *Core*-Genom ermittelt. Die Parameter wurden dabei wie folgt festgelegt: Die Länge der Alignment-Stücke betrug 1000 Basenpaare, homologe Regionen mussten zu 85 % (bei *E. cloacae*) bzw. 90 % übereinstimmen und 100 % der genomischen Positionen in der Population sollten im *Core*-Genom enthalten sein. Mittels PHASTER (Zhou et al. 2011; Arndt et al. 2016) wurden Abschnitte im Genom ermittelt, welche DNA von Bakteriophagen enthielten. Durch ein individuell angepasstes Skript der A5-Pipeline wurden diese Regionen aus dem *Core*-

Genom entfernt, sodass dieses lediglich die genetische Grundausstattung umfasste, sozusagen das gemeinsame Rückgrat der Genome.

Zur Typisierung erfolgten die Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST) sowie die *spa*-Typisierung bei *Staphylococcus aureus* online durch das Center for Genomic Epidemiology (Larsen et al. 2012; Bartels et al. 2014). Die MLST basiert auf der Ausstattung und Kombination von sieben „house-keeping“ Genen und wurde bei allen Spezies bestimmt. Der MLST bei *Acinetobacter baumannii* wurde entsprechend dem Schema nach Pasteur ermittelt. Der *spa*-Typ wird hinsichtlich unterschiedlicher Abfolgen der Repeat-Region des Proteins A vergeben und war deshalb nur für *Staphylococcus aureus* relevant.

Mit Hilfe der Plattform Kaptive (Wick et al. 2018) wurden folgende Kapseleigenschaften bestimmt: Bei *K. pneumoniae* K Locus und O Locus (Wyres et al. 2016; Wick et al. 2018) und bei *A. baumannii* OC Locus und K Locus (Wyres et al. 2020). Bei *Klebsiella pneumoniae* bot die Plattform neben der wichtigeren Primärreferenz des K Locus zusätzlich die Möglichkeit der Bestimmung von Varianten des K Locus. Die Variantenerkennung wurde genutzt um mehr Informationen über die Kapseleigenschaften zu gewinnen, sollte die Primärreferenz jedoch lediglich ergänzen.

Hochqualitative Sequenzabschnitte (HQ Reads) der Isolate, welche durch Trimmomatic (Bolger et al. 2014) erzeugt wurden, wurden im Anschluss an dem Core-Genom in BioNumerics ausgerichtet und so die Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Phylogenie durchgeführt. Diese Analyse gibt an, in wie vielen einzelnen Basenpaaren sich das Genom des Isolats von dem Core-Genom unterscheidet und ermöglicht so den Vergleich zwischen den Isolaten. Die Zuteilung zu einem Cluster, d.h. Gruppen eng verwandter Isolate, erfolgte anhand eines Cut-Off Wertes. War die Differenz zwischen den Isolaten geringer als der Cut-Off Wert, wurden diese Isolate als eng verwandt klassifiziert und zusammen geclustert. Isolate, welche keine Verwandtschaft zu anderen Isolaten besaßen, wurden als Singletons bezeichnet. Befanden sich die SNPs zwischen den Isolaten sehr nahe am Cut-Off Wert, wurde für diese ein eigenes Core-Genom errechnet und die SNP-Phylogenie nochmals wiederholt, um deren Verwandtschaftsgrad genauer zu ermitteln.

War es aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten einer Spezies nicht möglich ein Core-Genom zu berechnen, wurden die hochqualitativen Sequenzabschnitte eines Isolats an dem Genom des Transmissionspartners in BioNumerics ausgerichtet, um die Anzahl der SNPs zu ermitteln. Im Vergleichs-genom wurde zuvor ebenfalls Phagen-DNA entfernt. Die Anzahl der SNPs zwischen den beiden Partnern musste hierbei in Relation zur Genomlänge des Isolats betrachtet werden. Da sogar beim Vergleich von HQ Reads mit dem Genom desselben Isolats aus technischen Gründen SNPs gefunden wurden, war ein strenger Cut-Off Wert wie beim Mapping gegen ein Core-Genom hier nicht sinnvoll.

#### **4.11 Vergleich der Clusterzuteilung der verschiedenen Methoden**

Nachdem die Isolate sowohl anhand der Ähnlichkeit ihrer FTIR Spektren als auch mittels SNP-Phylogenie in Cluster eingeteilt wurden, wurde der Adjusted Rand Index (ARI) bestimmt. Der Adjusted Rand Index quantifiziert die Übereinstimmung der Clusterzuteilung der verschiedenen Methoden. Ein Wert von 1,0 gibt dabei ein vollständig identisches Clustering der verglichenen Methoden an, wohingegen bei einem Wert von 0 keine Übereinstimmung der Clusterzuteilung ermittelt wurde. Die Berechnung erfolgte mittels Online Tool unter [www.comparingpartitions.info](http://www.comparingpartitions.info) (Carriço et al. 2006).

#### **4.12 Verwendete Cut-Off Werte**

Wenn vorhanden und geeignet, wurden bereits etablierte Cut-Off Werte nach dem Vorbild anderer Autoren verwendet:

##### *Klebsiella pneumoniae*:

FTIR Spektroskopie: 75 %, Vergleichsarbeit: 75 % (Dinkelacker et al. 2018).

SNP-Phylogenie: 18 SNPs, Vergleichsarbeiten: 18 SNPs (Schürch et al. 2018; Dinkelacker et al. 2018).

#### Enterobacter cloacae Komplex:

FTIR Spektroskopie: 83 %, Vergleichsarbeiten: 84 % (Martak et al. 2019), 77 % bzw. 89 % (Vogt et al. 2019).

SNP-Phylogenie: Sechs SNPs, keine direkte Vergleichsarbeit vorhanden, Werte um zehn SNPs sind etabliert für gramnegative Erreger (Schürch et al. 2018).

#### Pseudomonas aeruginosa:

FTIR Spektroskopie: 85 %, Vergleichsarbeit 77,9 % (Martak et al. 2019).

SNP-Phylogenie: 37 und 60 SNPs, Vergleichsarbeit: 37 SNPs (Schürch et al. 2018).

#### Staphylococcus aureus:

FTIR Spektroskopie: 87 %, keine direkte Vergleichsarbeit vorhanden.

SNP-Phylogenie: 15 SNPs, Vergleichsarbeit: 15 SNPs (Schürch et al. 2018).

#### Acinetobacter baumannii Komplex:

FTIR Spektroskopie: 85 %, Vergleichsarbeit: 50,5 % (Martak et al. 2019).

#### Stenotrophomonas spp.:

FTIR Spektroskopie: 85 %, keine direkte Vergleichsarbeit vorhanden.

### **4.13 Accession numbers der Referenzgenome**

Folgende Genome wurden als Referenzgenome herangezogen:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600 (NZ_CP035101.1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC10332 (NZ_LN831024.1)
<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex:	
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	DSM 16691 (NZ_CP017179.1)
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	DSM 16687 (NZ_CP017180.1)
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	DSM 14563 (NZ_CP017186.1)
<i>E. kobei</i>	DSM 13645 (NZ_CP017181.1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P1428 (NZ_CP017994.1)
<i>Acinetobacter baumannii</i> Komplex:	
<i>Acinetobacter pittii</i>	ST220 (NZ_CP029610.1)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13637 (JSpeciesWS Datenbank)
<i>Stenotrophomonas pavarii</i>	DSM 25135 (JSpeciesWS Datenbank)
<i>Stenotrophomonas africana</i>	NCTC 13014 (NZ_LR134301.1)

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Reproduzierbarkeit von FTIR Spektren

Um die Einflussfaktoren auf Spektren und die Anwendbarkeit der FTIR Spektroskopie als Surveillancemethode zu überprüfen, wurden zunächst 268 Isolate (30 Spezies) gesammelt. 115 Stämme (17 Spezies), welche bereits vormittags die Routinediagnostik durchlaufen hatten, wurden mittels Spektroskopie typisiert. Die Verteilung der Spezies ist in Tabelle 2 dargestellt.

*Tabelle 2. Gesammelte und typisierte Bakterienisolate.* Die Anzahl bzw. der Anteil der insgesamt gesammelten Bakterien gibt einen Überblick über die Menge an bakteriellem Material und steht der Anzahl bzw. dem Anteil der typisierten Bakterien gegenüber.

Spezies von Diagnostik	gesammelte Isolate	Anteil [%]	mittels FTIR Spektroskopie typisierte Isolate	Anteil [%]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80	29,9	20	17,4
<i>Escherichia coli</i>	77	28,7	54	47,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	10,0	4	3,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	5,2	9	7,8
<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex	10	3,7	5	4,4
<i>Proteus mirabilis</i>	6	2,2	5	4,4
<i>Proteus vulgaris</i>	6	2,2	3	2,6
<i>Acinetobacter baumannii</i> Komplex	6	2,2	1	0,9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4	1,5	1	0,9
<i>Serratia marcescens</i>	3	1,1		
<i>Pseudomonas putida</i> Gruppe	3	1,1		
<i>Klebsiella variicola</i>	3	1,1	2	1,7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	1,1	2	1,7
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3	1,1	3	2,6
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1,1		
<i>Aeromonas caviae</i> Komplex	2	0,8		
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0,8	2	1,7
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2	0,8	1	0,9
<i>Morganella morganii</i>	2	0,8	1	0,9
<i>Pseudomonas putida</i>	2	0,8	1	0,9
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0,4		
<i>Acinetobacter pittii</i>	1	0,4		
<i>Pseudomonas otitidis</i>	1	0,4		
<i>Pseudomonas synxantha</i>	1	0,4		
<i>Aeromonas veronii</i> Komplex	1	0,4		
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1	0,4		
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1	0,4		
<i>Raoultella planticola</i>	1	0,4	1	0,9
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0,4		
<i>Pseudomonas fragi</i>	1	0,4		
<b>Gesamt</b>	<b>268</b>		<b>115</b>	

Zum einen wurde versucht, die FTIR Spektren direkt von den Reinheitskontrollen der Diagnostik zu erheben, um die Transmissionssurveillance zu beschleunigen und den Zwischenschritt der Kultivierung unter Standardbedingungen zu umgehen. Die 24-stündige Inkubation auf Schafblutagar bei 37 °C erwies sich in anderen Versuchen der Arbeitsgruppe bereits als geeigneter Standard. Der Vergleich der Spektren der Reinheitskontrollen mit den Spektren der Standards ergab einen Mittelwert von 83 % Übereinstimmung für alle Spezies. Dieser Wert war zwar besser als erwartet, jedoch nicht ausreichend, um Spektren ohne Zwischenschritt direkt von den Reinheitskontrollen zu erheben.

Zum anderen wurde überprüft, welchen Einfluss die Lagerung der Bakterien auf Müller-Hinton Agar mit nachfolgender Inkubation unter Standardbedingungen auf die Spektren nimmt. Der Mittelwert der Spektren nach Lagerung verglichen mit dem Standard betrug 89 % Übereinstimmung für alle Spezies. Dieser Wert zeugte in Anbetracht der vielen untersuchten Spezies von einem geringen Einfluss durch die Lagerung. Dem lag vermutlich die identische Vorbereitung der Bakterien auf die Messung zugrunde.

Da 17 Spezies untersucht wurden, wurden die Mittelwerte jeder Spezies nochmals einzeln betrachtet und verglichen (Tabelle 3). Bei *Raoultella planticola* und *Stenotrophomonas maltophilia* war die Ähnlichkeit der Messung von der Reinheitskontrolle im Vergleich zum Goldstandard höher als die Ähnlichkeit zwischen Goldstandard und der Messung nach der Lagerung. Da jedoch jeweils nur ein Isolat dieser Spezies untersucht wurde, wurden diese nicht von der Surveillance Untersuchung ausgeschlossen. Folglich konnten Isolate im Kühlschrank gelagert werden, sofern das Präparationsschema vor der Messung identisch war. Durch dieses standardisierte Vorgehen wurde die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Spektren sichergestellt.

**Tabelle 3. Einfluss Inkubation und Lagerung auf die FTIR Spektren.** Für jede Spezies wurde die Ähnlichkeit der FTIR Spektren des Goldstandards (RKB) mit den Spektren der Reinheitskontrollen (RK) bzw. den Spektren nach der Lagerung (MHB) verglichen. Der höhere Übereinstimmungswert ist grau hinterlegt. Dargestellt ist der Mittelwert der berechneten Ähnlichkeiten für jede Spezies.

Spezies	Anzahl (n)	Vergleich RK mit RKB (Mittelwert [%])	Vergleich MHB mit RKB (Mittelwert [%])
alle Spezies	115	83,0	88,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	83,7	89,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	86,3	91,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	81,0	87,2
<i>Klebsiella variicola</i>	2	80,9	86,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	79,7	88,5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3	82,9	83,0
<i>Escherichia coli</i>	54	83,0	89,1
<i>Citrobacter freundii</i>	2	85,8	92,0
<i>Proteus mirabilis</i>	5	85,7	91,8
<i>Proteus vulgaris</i>	3	81,7	82,6
<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex	5	80,1	88,5
<i>Raoultella planticola</i>	1	89,9	84,0
<i>Morganella morganii</i>	1	69,7	81,5
<i>Pseudomonas putida</i>	1	76,8	88,1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	85,5	76,5
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	86,2	88,7
<i>Acinetobacter baumannii</i> Komplex	1	89,0	90,2

## 5.2 Simulation einer Transmissionssurveillance

Um eine Echtzeit-Surveillance mittels FTIR Spektroskopie zu simulieren, wurden im Zeitraum von 67 Tagen 1543 Isolate gesammelt (45 Spezies) und aufbewahrt. Die Speziesverteilung ist in Tabelle 4 dargestellt. Der Abgleich von Belegungsdaten des Klinikums mit Daten der Routinediagnostik durch die Krankenhaushygiene ergab 103 Isolate (sechs Spezies), welche an 94 potenziellen Transmissionen beteiligt waren. Die möglichen Übertragungen wurden zunächst durch Typisierung anhand FTIR Spektren überprüft. Um die FTIR Spektroskopie als schnelle Vorgehensweise bei einer Transmissionssurveillance zu bewerten, wurden die Ergebnisse im Nachgang mithilfe der Ganzgenomsequenzierung überprüft.



**Abbildung 5. Sammlung aller 1543 Isolate der Transmissionssurveillance-Simulation.** Die einzeln liegenden Agarplatten zeigen die Aufteilung während der Lagerung. *Proteus spp.* (links) wurden einzeln kultiviert, *Pseudomonas aeruginosa* (mittig) wurden maximal zu sechst gelagert und von allen anderen Spezies konnten acht Isolate auf einer Agarplatte (rechts) kultiviert werden.

Eine potenzielle Transmission wurde definiert als Zimmerkontakt der betreffenden Patienten, wobei die Bakterienspezies beim Spender innerhalb 28 Tagen vor Kontakt diagnostiziert wurde, beim Empfänger innerhalb 28 Tagen danach. Alle Isolate wurden nummeriert und anonymisiert.

**Tabelle 4. Gesammelte Bakterienisolate der simulierten Transmissionssurveillance.** Die Anzahl bzw. der Anteil der insgesamt gesammelten Bakterien steht der Anzahl bzw. dem Anteil der Bakterien gegenüber, die an potenziellen Übertragungen beteiligt waren.

Spezies von Diagnostik sowie durch MALDI bestätigt	gesammelte Isolate	Anteil [%]	an potenzieller Transmission beteiligte Isolate	Anteil [%]
<i>Staphylococcus aureus</i>	427	27,7	35	34,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	369	23,9	26	25,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	138	8,9	12	11,7
<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex	118	7,7	24	23,1
<i>Proteus mirabilis</i>	88	5,7		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	68	4,4		
<i>Klebsiella aerogenes</i>	38	2,5		
<i>Serratia marcescens</i>	37	2,4		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	30	1,9	2	1,9
<i>Citrobacter koseri</i>	29	1,9		
<i>Citrobacter freundii</i>	29	1,9		
<i>Proteus vulgaris</i>	18	1,2		
<i>Morganella morganii</i>	18	1,2		
<i>Acinetobacter baumannii</i> Komplex	17	1,1	4	3,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	1,0		
<i>Klebsiella variicola</i>	14	0,9		
<i>Citrobacter braakii</i>	10	0,7		

<i>Hafnia alvei</i>	9	0,6		
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	8	0,5		
<i>Acinetobacter pittii</i>	8	0,5		
<i>Klebsiella pneumoniae/variicola</i>	7	0,5		
<i>Serratia liquefaciens</i>	6	0,4		
<i>Pantoea agglomerans</i>	4	0,3		
<i>Klebsiella species</i>	4	0,3		
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	3	0,2		
<i>Providencia rettgeri</i>	3	0,2		
<i>Pantoea septica</i>	2	0,1		
<i>Proteus hauseri</i>	2	0,1		
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	0,1		
<i>Citrobacter youngae</i>	2	0,1		
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	0,1		
<i>Raoultella planticola</i>	2	0,1		
<i>Acinetobacter ursingii</i>	2	0,1		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	0,1		
<i>Citrobacter farmeri</i>	2	0,1		
<i>Lelliottia amnigena</i>	1	0,1		
<i>Acinetobacter parvus</i>	1	0,1		
<i>Citrobacter sedlakii</i>	1	0,1		
<i>Citrobacter species</i>	1	0,1		
<i>Acinetobacter dijkshoorniae</i>	1	0,1		
<i>Cedecea davisae</i>	1	0,1		
<i>Enterobacter kobei</i>	1	0,1		
<i>Pantoea eucrina</i>	1	0,1		
<i>Providencia stuartii</i>	1	0,1		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0,1		
<b>Gesamt</b>	<b>1543</b>		<b>103</b>	

### 5.3 Bestätigung der Spezies mittels MALDI-TOF

Bei allen 103 Isolaten, welche an potenziellen Übertragungen beteiligt waren, wurde die Spezies vor der Typisierung durch FTIR Spektroskopie und vor der Genomsequenzierung mittels MALDI-TOF identifiziert, um die Richtigkeit der Daten der Routinediagnostik zu bestätigen. Alle Isolate waren der korrekten Spezies zugeordnet.

### 5.4 *Klebsiella pneumoniae*

Insgesamt wurden im Versuchszeitraum 138 Isolate der Spezies *Klebsiella pneumoniae* gesammelt.

#### **5.4.1 Transmissionen**

Bei Betrachtung der epidemiologischen Verbindungen der betreffenden Patienten, waren zwölf Isolate an insgesamt 17 potenziellen Übertragungen beteiligt. Alle Isolate entsprachen Patienten aus einem einzigen Kontaktcluster A (Abbildung 8: Siehe Isolate und Verbindungspfeile).

#### **5.4.2 FTIR Spektroskopie**

Zunächst wurde die FTIR Spektroskopie als schnelle Typisierungsmethode eingesetzt. Bei der Kontrolle der Aufnahmequalität der Spektren zeigten sich Auffälligkeiten bei dem Isolat J00803. Drei technische Replikate der Messung 191219-1015 wichen von den übrigen neun Spektren dieses Isolats ab (Ähnlichkeit der Spektren < 85 %), was möglicherweise durch den mukoiden Phänotyp verursacht wurde. Aufgrund der Anzahl wurden jedoch alle Spektren ausgewertet.

Um die Abweichung innerhalb einer Messung abzuschätzen, wurde nun die durchschnittliche Ähnlichkeit der vier technischen Replikate jedes Isolates ermittelt. Es ergab sich ein Mittelwert von 92,8 % mit einer Standardabweichung von 2,4 %. Für die Abweichung der einzelnen Messungen wurde die Ähnlichkeit der biologischen Replikate berechnet. Hier belief sich der Mittelwert auf 89,4 % mit einer Standardabweichung von 4,0 %.

Nun wurden die Ähnlichkeiten der Überträgerpartner betrachtet, welche im Bereich von - 2,2 % bis 96 % lagen (Abbildung 8).

Nachfolgend wurden alle Isolate anhand der Ähnlichkeit ihrer Spektren in FTIR-Cluster eingeteilt. Dabei wurde der Cut-Off Wert bei 75 % festgelegt, sodass sich vier Singletons und zwei Cluster ergaben, welche zwei bis acht Isolate umfassten (Abbildung 6). Bei Betrachtung der epidemiologischen Kontakte zeigten die Isolate des FTIR-Clusters 1 (Abbildung 8: rosa) im Gegensatz zu den Isolaten des FTIR-Clusters 2 (Abbildung 8: hellblau) nach den Transmissionskriterien direkte Verbindungen zueinander. Die beiden Singletons müssten aufgrund ihrer Kontakte am ehesten zu Isolaten aus dem FTIR-Cluster 1 passen, zeigten jedoch verglichen mit den betreffenden Stämmen keine Ähnlichkeit in ihren Spektren. Würde man die Spektroskopie als Typisierungsmethode verwenden, hätte man insgesamt zehn der 17 potenziellen Transmissionen bestätigt.

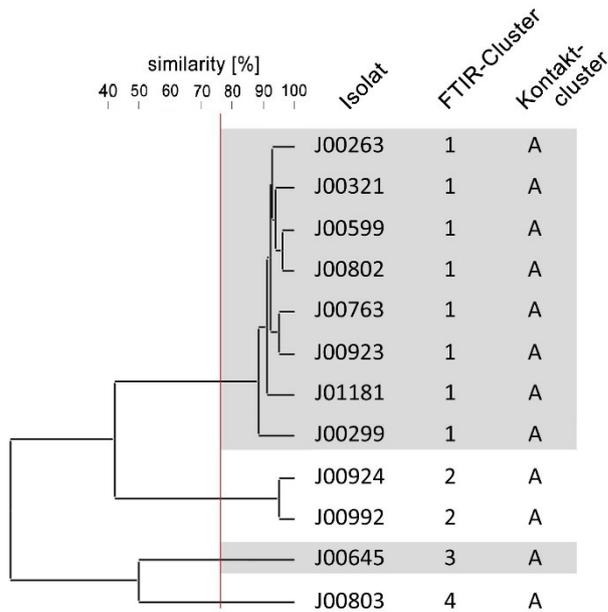


Abbildung 6. Dendrogramm der *Klebsiella pneumoniae* Isolate anhand der FTIR Spektren. Zum Vergleich wurden die Kontaktcluster dargestellt. FTIR-Cluster sind grau/weiß hinterlegt, der Cut-Off Wert (75 %) wird durch die rote Linie markiert.

### 5.4.3 Ganzgenomsequenzierung

Die Typisierungsergebnisse der Spektroskopie wurden in einem nächsten Schritt anhand Genomanalysen der Stämme überprüft.

#### 5.4.3.1 Average Nucleotide Identity (ANI)

Zunächst erfolgte die Speziesidentifizierung und die Ermittlung der ANI durch den Vergleich aller Genome mit einem Referenzgenom, wobei alle Isolate der Spezies *Klebsiella pneumoniae* zugeordnet wurden (Anhang: Tabelle S 1).

#### 5.4.3.2 Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Die MLST erfolgte durch Extraktion der Sequenztypen aus den assemblierten Genomen zur Abschätzung der Verwandtschaft. Es zeigte sich, dass die Isolate drei verschiedene Typen aufwiesen, wobei ST-133 der häufigste Typ war (Tabelle 5).

#### 5.4.3.3 Kapseltypisierung

Neben der MLST wurden außerdem die Kapseltypen mittels Online Tool Kaptive bestimmt (Tabelle 5). Die zehn Isolate mit ST-133 waren auch bezüglich K Locus und O Locus identisch. Bei der K Locus Primärreferenz ließ sich der Typ KL2 ebenfalls von den restlichen zehn Isolaten abgrenzen. Die Variante des K Locus war zwar bei allen zwölf Klebsiellen identisch, ist jedoch hinsichtlich der Aussagekraft im Vergleich zur Primärreferenz unterlegen. Die Primärreferenz

des O Locus unterschied sich lediglich beim Isolat J00645 von den anderen. Die zehn Isolate, welche identische MLST und Kapsel Eigenschaften und besaßen, befanden sich auch im selben FTIR-Cluster.

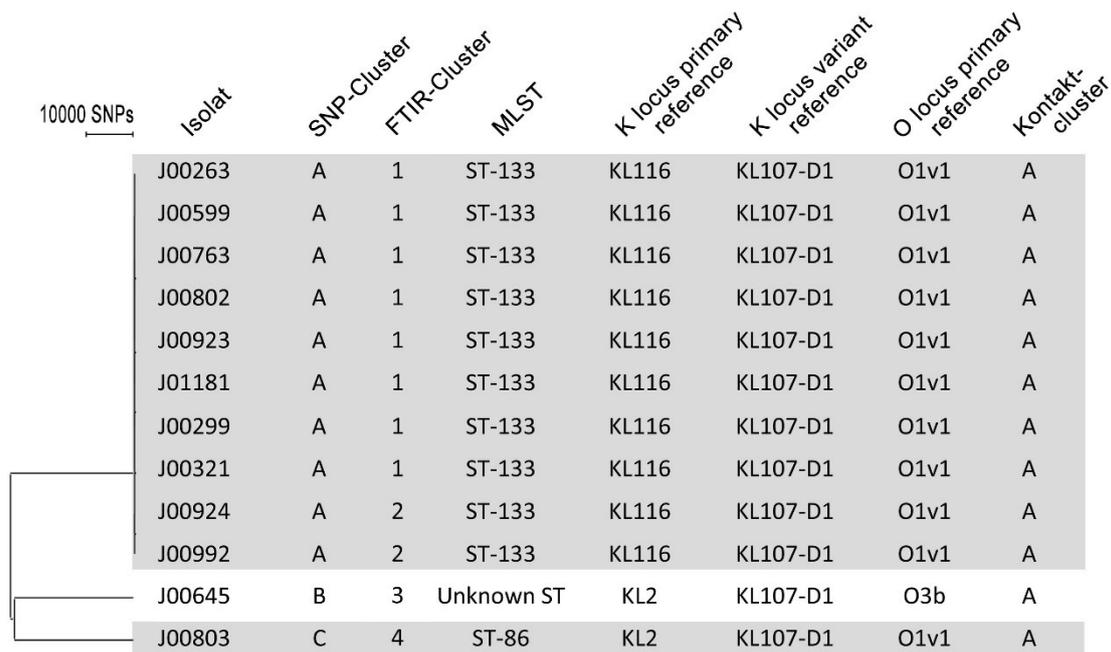
**Tabelle 5. MLST und Kapsel Eigenschaften der *Klebsiella pneumoniae* Isolate.** Der MLST wurde anhand des Genoms den jeweiligen Isolaten zugeordnet. Zudem wurden die Kapseltypen bestimmt. Identische MLST sind grau hinterlegt.

Isolat	MLST	K Locus Primärreferenz	K Locus Variante	O Locus Primärreferenz
J00263	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00599	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00763	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00802	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00923	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J01181	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00299	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00321	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00924	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00992	ST-133	KL116	KL107-D1	O1v1
J00645	Unknown ST	KL2	KL107-D1	O3b
J00803	ST-86	KL2	KL107-D1	O1v1

#### 5.4.3.4 SNP-Analyse

Aus den DNA Sequenzen aller Isolate dieser Spezies wurde ein *Core*-Genom berechnet, welches den gemeinsamen Anteil des Genoms aller Isolate darstellt. Die Länge des *Core*-Genoms betrug 4,7 Mbp.

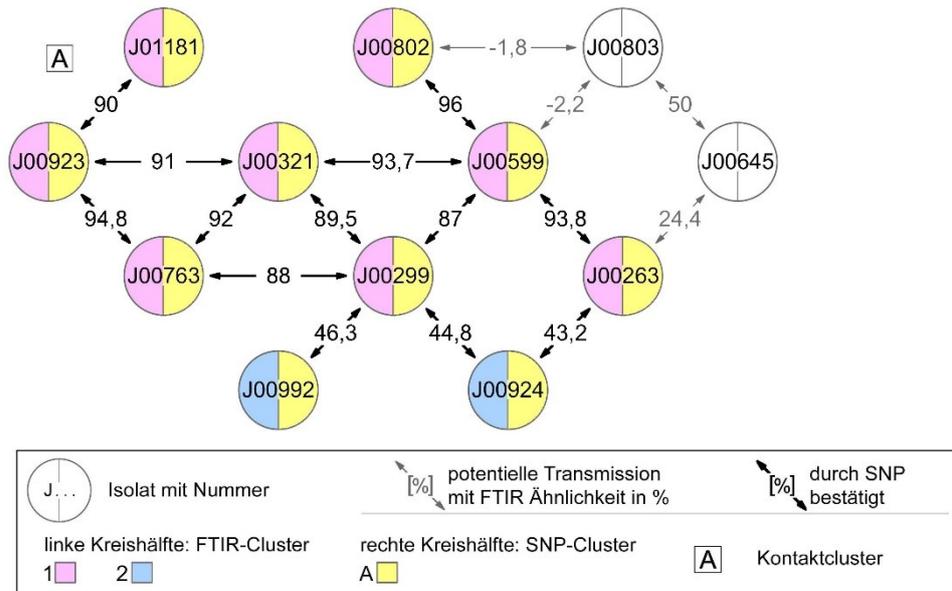
Bei der SNP-Phylogenie wurde ein Cut-Off Wert von 18 SNPs festgelegt, wodurch sich drei SNP-Cluster ergaben. Das Cluster A (Abbildung 7) enthielt zehn der zwölf Stämme. Zwei Isolate waren Singletons, da sie sich voneinander in 25015 SNPs unterschieden. Zwischen Cluster A und den beiden Singletons befanden sich 25910 SNPs.



**Abbildung 7. Dendrogramm der *Klebsiella pneumoniae* Isolate anhand der SNP-Analyse.** Zusätzlich wurden FTIR-Cluster, MLST, Kapseltyp sowie Kontaktcluster dargestellt. SNP-Cluster sind jeweils grau/weiß hinterlegt. Der verwendete Cut-Off Wert betrug 18 SNPs.

Um im Cluster A eine höhere Auflösung zu erreichen, wurde für diese zehn Isolate ein eigenes Core-Genom mit einer Länge von 5,4 Mbp berechnet und eine SNP-Analyse durchgeführt (Anhang: Abbildung S 1). Die Isolate J00263, J00599, J00763, J00802, J00923 und J01181 waren klonal, sie unterschieden sich von J00299 in einem SNP und von J00321 in zwei weiteren SNPs. Die Isolate J00924 und J00992 waren fünf SNPs von den restlichen Isolaten entfernt. Demnach war die Zuordnung in ein SNP-Cluster gerechtfertigt.

Von den 17 möglichen Transmissionen konnten durch die SNP-Phylogenie 13 Übertragungen bestätigt werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8. Darstellung der epidemiologischen Verbindung der *Klebsiella pneumoniae* Isolate, sowie FTIR- und SNP-Cluster.** Beim Clustering anhand FTIR Spektroskopie (Cut-Off Wert 75 %) ergaben sich zwei Cluster und zwei Singletons (linke Kreishälfte farblos). Bei der SNP-Analyse (Cut-Off Wert 18 SNPs) ergaben sich ein Cluster und zwei Singletons (rechte Kreishälfte farblos).

#### 5.4.4 Vergleich der SNP-Cluster mit FTIR-Cluster

In einem weiteren Schritt wurden die Typisierungsergebnisse der FTIR Spektroskopie mit den Ergebnissen der SNP-Analyse verglichen. Die beiden Isolate J00645 und J00803 wurden durch beide Methoden von den restlichen Isolaten abgegrenzt. Die SNP-Phylogenie fasste die übrigen zehn Isolate zu dem SNP-Cluster A zusammen, wohingegen das Clustering durch FTIR Spektroskopie die Isolate J00924 und J00992 deutlich von den acht Isolaten abgrenzte (Abbildung 8). Die SNP-Analyse zeigte zwischen diesen Isolaten (J00924 und J00992) und den übrigen acht lediglich eine Differenz von fünf SNPs.

Um die Übereinstimmung der Typisierungsmethoden zu quantifizieren, wurde der Adjusted Rand Index (ARI) berechnet. Der Vergleich des Clusterings mittels FTIR mit der Clustereinteilung anhand der SNP-Phylogenie ergab einen ARI von 0,536. Wie zu erwarten ergab sich derselbe Wert beim Vergleich zwischen MLST und FTIR-Clustering.

Die FTIR Spektroskopie hätte zehn von 13, also 77 % (Sensitivität) der tatsächlichen Transmissionen richtig erkannt (richtig positiv), keine Transmission fälschlicherweise angezeigt (falsch positiv), drei Transmissionen übersehen

(falsch negativ) und vier Transmissionen zu Recht ausgeschlossen (richtig negativ, 100% Spezifität).

Tabelle 6. **Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei *Klebsiella pneumoniae***. Die Ergebnisse hinsichtlich der Ermittlung der Transmissionen durch FTIR Spektroskopie sind denen der SNP-Phylogenie gegenüber gestellt.

		FTIR Spektroskopie		Gesamt
		Transmission	keine Transmission	
SNP-Phylogenie (=Goldstandard)	Transmission	10	3	13
	keine Transmission	0	4	4
Gesamt		10	7	17

Insgesamt stimmte die Typisierung mittels FTIR Spektroskopie gut mit der Ganzgenomsequenzierung überein. Dem relativ geringen ARI liegt die geringe Isolatanzahl sowie das Clustering der Isolate des FTIR-Clusters 2 zugrunde.

## 5.5 *Enterobacter cloacae* Komplex

Es wurden 118 Isolate dieser Spezies während der simulierten Surveillance gesammelt.

### 5.5.1 Transmissionen

Ausgehend von den Belegungsdaten waren 24 Stämme an insgesamt 30 potenziellen Übertragungen beteiligt. Die Patientenisolate konnten in vier Kontaktcluster unterteilt werden (Abbildung 11: Siehe Isolate und Verbindungspfeile; Cluster A-D). Die Größe der Cluster variierte von zwei bis hin zu 15 Patienten.

### 5.5.2 FTIR Spektroskopie

Die Isolate wurden zunächst mittels FTIR Spektroskopie typisiert. Bei den Spektren der Isolate J01310 und J01309 wurde jeweils eine geringere Ähnlichkeit als der Grenzwert von 85 % errechnet und ein technisches Replikat graphisch als abweichend dargestellt. Diese Spektren wurden deshalb von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Der Mittelwert der spektralen Ähnlichkeit aller technischen Replikate betrug 91,7 % mit einer Standardabweichung von 2,7 %. Für die Ähnlichkeit der Messungen ergab sich ein Mittelwert der biologischen Replikate von 89,6 % mit einer

Standardabweichung von 3,7 %, was ebenfalls für eine hohe Übereinstimmung sprach.

Zunächst wurden die Ähnlichkeiten der Isolate betrachtet, die an potenziellen Transmissionen beteiligt waren. Diese befanden sich in einem Bereich zwischen 39,4 % und 96,5 %. Als Cut-Off Wert der FTIR Typisierung wurde eine Ähnlichkeit von 83 % gewählt. So ergaben sich elf Singletons und drei größere Cluster, die zwei bis neun Isolate umfassten (Abbildung 9).

Die Bakterienstämme des FTIR-Clusters 3 befanden sich nicht im selben Kontaktcluster (Abbildung 11). Ebenfalls war zwischen den Isolat J00613 und J01099 des FTIR-Clusters 13 keine Verbindung erkennbar. Trotz der Ähnlichkeiten der FTIR Spektren, wurden Transmissionen anhand der hier verwendeten Kontaktkriterien nicht bestätigt. Die Ähnlichkeit der Spektren könnte zufällig entstanden sein oder durch eine anderweitige Übertragung bedingt sein. Die Isolate des FTIR-Clusters 12 befanden sich im selben Kontaktcluster, sodass man von den 30 zu überprüfenden potenziellen Transmissionen 14 bestätigt hätte, wenn man die Ergebnisse der FTIR Spektroskopie zur Surveillance verwenden würde.

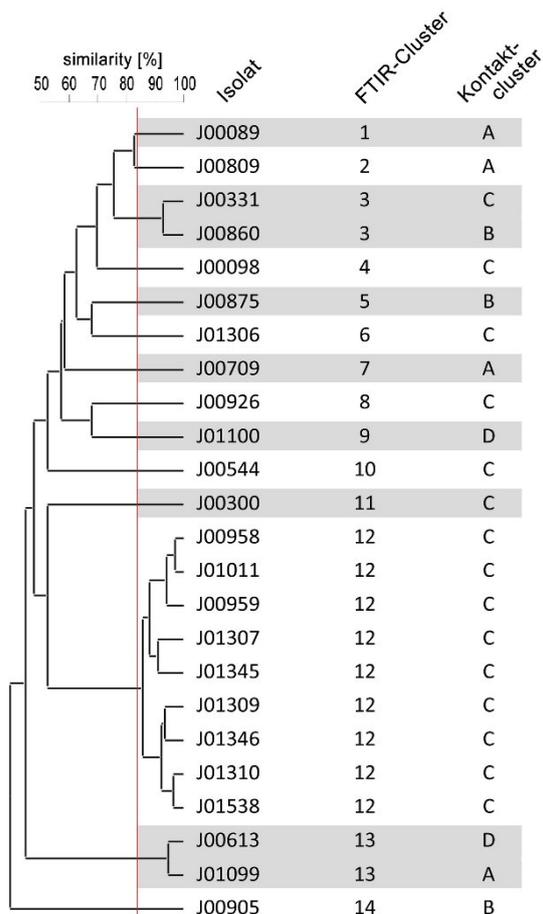


Abbildung 9. Dendrogramm der Isolate des *Enterobacter cloacae* Komplexes anhand der FTIR Spektren. Zusätzlich wurden die Kontaktcluster dargestellt. FTIR-Cluster sind grau/weiß hinterlegt, der Cut-Off Wert (83 %) wird durch die rote Linie markiert.

### 5.5.3 Ganzgenomsequenzierung

Die Typisierungsergebnisse der FTIR Spektroskopie wurden in einem nächsten Schritt mittels Ganzgenomanalyse der Erreger überprüft.

#### 5.5.3.1 Average Nucleotide Identity (ANI)

Die Genome aller Isolate wurden mit Referenzgenomen verglichen, um die ANI zu ermitteln. Werte im Bereich von 97,07 % und 99,85 % identifizierten sechs Isolate als *Enterobacter hormaechei subsp. hoffmannii*, elf Isolate als *Enterobacter hormaechei subsp. oharae*, sechs Isolate als *Enterobacter hormaechei subsp. steigerwaltii* und ein Isolat als *Enterobacter kobei* (Anhang: Tabelle S 2).

#### 5.5.3.2 Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Um die Verwandtschaftsgrade der Isolate anhand MLST zu bestimmen, wurden nun die Sequenztypen aus den Genomen ermittelt (Tabelle 7). ST-68 erwies sich

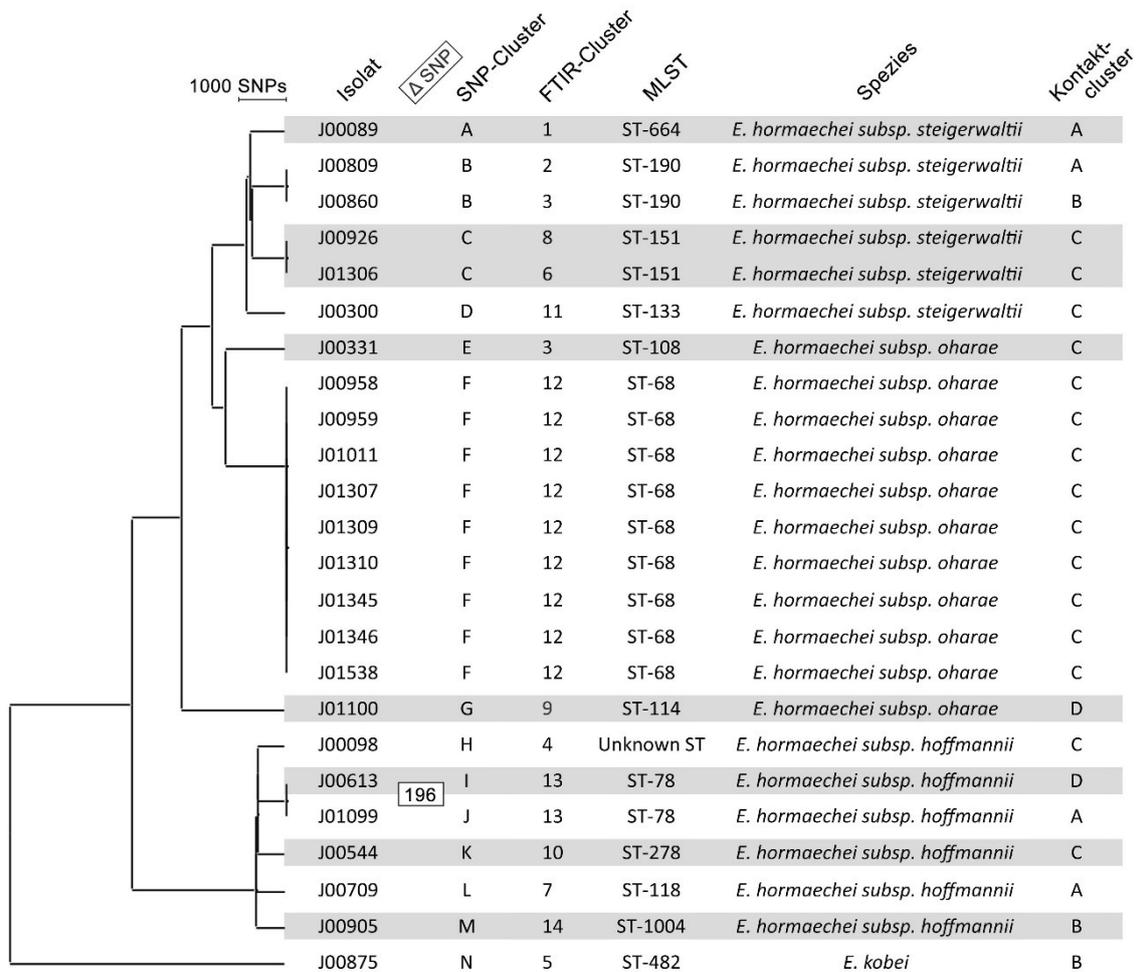
als ein häufig vorkommender Sequenztyp. Alle neun Isolate, die diesem Typ angehörten, befanden sich auch im selben FTIR-Cluster. Die Isolate J00613 und J01099 waren beide ST-78 und wurden ebenfalls anhand FTIR zusammen geclustert. ST-151 (J00926 und J01306) und ST-190 (J00809 und J00860) gab es jeweils zweimal, wobei die Isolate keine Ähnlichkeit anhand ihrer Spektren aufwiesen. Den restlichen neun Isolaten wurden unterschiedliche Typen zugeordnet.

**Tabelle 7. MLST der Isolate des *Enterobacter cloacae* Komplexes.** Der MLST wurde anhand des Genoms den jeweiligen Isolaten zugeordnet. Identische MLST sind grau hinterlegt.

Isolat	MLST
J00958	ST-68
J00959	ST-68
J01011	ST-68
J01307	ST-68
J01309	ST-68
J01310	ST-68
J01345	ST-68
J01346	ST-68
J01538	ST-68
J00613	ST-78
J01099	ST-78
J00331	ST-108
J01100	ST-114
J00709	ST-118
J00300	ST-133
J00926	ST-151
J01306	ST-151
J00809	ST-190
J00860	ST-190
J00544	ST-278
J00875	ST-482
J00089	ST-664
J00905	ST-1004
J00098	Unknown ST

### 5.5.3.3 SNP-Analyse

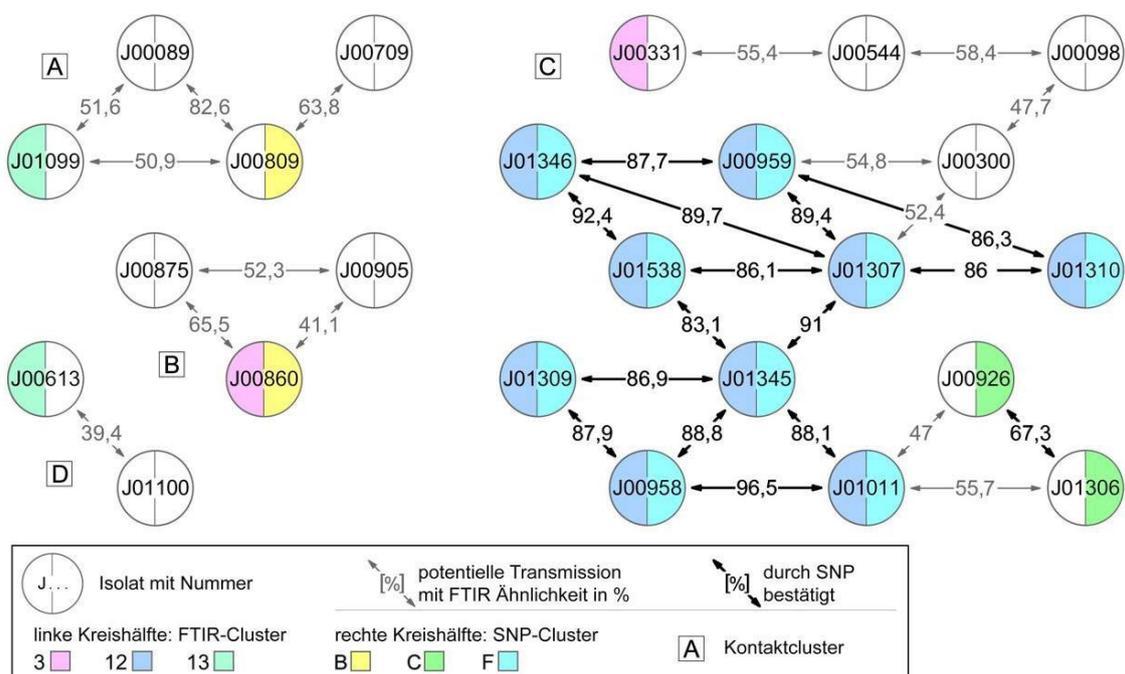
Aus allen Genomen der Spezies wurde zunächst ein *Core*-Genom berechnet, dessen Länge 3,1 Mbp betrug. Bei der SNP-Phylogenie wurden die Isolate mit einem Cut-Off Wert von sechs SNPs eingeteilt. Insgesamt ergaben sich elf Singletons und drei größere Cluster mit zwei bis neun Isolaten (Abbildung 10).



**Abbildung 10. Dendrogramm der *Enterobacter cloacae* Isolate anhand der SNP-Analyse.** Zusätzlich wurden FTIR-Cluster, MLST, Spezies sowie Kontaktcluster dargestellt. Der verwendete Cut-Off Wert betrug sechs SNPs. Identische SNP-Cluster sind jeweils grau/weiß hinterlegt. Die Anzahl der SNP Differenz ( $\Delta$  SNP) zwischen zwei Isolaten mit identischem MLST aber unterschiedlichem SNP-Cluster wird im Kasten angegeben.

Aufgrund der geringen Differenz von sieben SNPs zwischen den Isolaten J00613 und J01099, wurde ein eigenständiges *Core*-Genom berechnet. Das Isolat J00098 wurde dabei als Ankerpunkt miteinbezogen. Die Länge dieses *Core*-Genoms betrug 4,3 Mbp. Durch die feinere Auflösung wurde deutlich, dass eine Verwandtschaft zwischen den Isolaten J00613 und J01099 aufgrund einer Differenz von 196 SNPs ausgeschlossen werden konnte (Anhang: Abbildung S 2). Alle Isolate des SNP-Clusters F und die beiden Isolate des SNP-Clusters C waren Teil desselben Kontaktclusters (Abbildung 11). Die Isolate J00959, J01011, J01307, J01309, J01310, J01345, J01346 und J01538 waren klonal, zu J00958 bestand ein Unterschied von einem SNP. J00926 und J01306 (beide ST-151) waren ebenfalls klonal. Diese vermuteten Transmissionen konnten also

auch genetisch bestätigt werden. Im Kontaktcluster C (Abbildung 11) befanden sich vier Singletons, zwischen denen aufgrund fehlender genetischer Ähnlichkeiten, Transmissionen ausgeschlossen wurden. Die Isolate J00809 und J00860 des SNP-Clusters B waren klonal, obwohl sie in unterschiedlichen Kontaktclustern verteilt waren. Ursächlich dafür könnte ein anderer Transmissionsweg als der Zimmerkontakt vermuten werden. Von 30 potenziellen Transmissionen konnten 15 Übertragungen durch SNP-Phylogenie bestätigt werden, welche sich alle im Kontaktcluster C befanden und hier an sehr engen Patientenkontakt denken ließ.



**Abbildung 11. Darstellung der epidemiologischen Verbindung der Isolate des *Enterobacter cloacae* Komplexes, sowie FTIR- und SNP-Cluster.** Beim Clustering anhand FTIR Spektroskopie (Cut-Off Wert 83 %) ergaben sich drei größere Cluster und elf Singletons (linke Kreishälfte farblos). Bei der SNP-Analyse (Cut-Off Wert sechs SNPs) ergaben sich drei größere SNP-Cluster und elf Singletons (rechte Kreishälfte farblos).

#### 5.5.4 Vergleich der SNP-Cluster mit FTIR-Cluster

In einem weiteren Schritt wurden die Typisierungsergebnisse der FTIR Spektroskopie mit den Ergebnissen der SNP-Analyse verglichen. Die Clusterbildung bezüglich des größten Clusters (SNP-Cluster F und FTIR-Cluster 12) stimmte vollständig überein. Eine Ähnlichkeit der Isolate des FTIR-Clusters 3 bzw. 13 konnte durch die SNP-Phylogenie nicht bestätigt werden. Jedoch gehörten beide Isolate des FTIR-Clusters 13 zum selben Sequenztyp (ST-78).

Die enge Verwandtschaft der Isolate des SNP-Clusters B bzw. der Isolate des SNP-Clusters C wurde anhand der FTIR Spektren nicht deutlich.

Mit Hilfe des Adjusted Rand Index (ARI) wurde die Übereinstimmung des durch die jeweilige Methode erhaltenen Clusterings quantifiziert. Beim Vergleich von FTIR-Clustering und SNP-Clustering wurde ein ARI von 0,939 ermittelt. Die MLST verglichen mit der Clusterbildung anhand FTIR Spektroskopie ergab einen ARI von 0,955.

Die FTIR Spektroskopie hätte 14 von 15 Transmissionen richtig erkannt (richtig positiv, 95 % Sensitivität), keine Transmission fälschlicherweise angezeigt (falsch positiv), eine Transmission übersehen (falsch negativ) und 15 Transmissionen zu Recht ausgeschlossen (richtig negativ, 100 % Spezifität).

Tabelle 8. **Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei *Enterobacter cloacae* Komplex.** Die Ergebnisse hinsichtlich der Ermittlung der Transmissionen durch FTIR Spektroskopie sind denen der SNP-Phylogenie gegenüber gestellt.

		FTIR Spektroskopie		Gesamt
		Transmission	keine Transmission	
SNP-Phylogenie (=Goldstandard)	Transmission	14	1	15
	keine Transmission	0	15	15
Gesamt		14	16	30

Insgesamt wurde für die Spezies *Enterobacter cloacae* Komplex eine hohe Übereinstimmung zwischen der Typisierung mittels FTIR Spektroskopie und Ganzgenomsequenzierung ermittelt.

## 5.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Während der Simulation der Surveillance wurden 369 Isolate der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* gesammelt.

### 5.6.1 Transmissionen

Durch den Abgleich von Belegungsdaten wurden zwischen 26 Isolaten dieser Spezies 14 potenzielle Transmissionen ermittelt. Insgesamt konnten zwölf Kontaktcluster A - L gebildet werden (Abbildung 14: Siehe Isolate und Verbindungspfeile). Elf potenzielle Transmissionen setzten sich jeweils aus

Patientenpaaren zusammen. Kontaktcluster A enthielt vier Patienten, zwischen welchen drei potenzielle Transmissionen überprüft wurden.

### **5.6.2 FTIR Spektroskopie**

Die FTIR Spektroskopie erfolgte als schnelle Typisierungsmethode. Die Messung 191206-1030 wies bei dem Isolat J00526 eine geringere Ähnlichkeit der technischen Replikat als 85 % auf. Ein technisches Replikat zeigte graphisch eine Abweichung, sodass dieses der Auswertung vorenthalten wurde.

Insgesamt ergab sich ein Mittelwert der technischen Replikat von 93,7 % bei einer Standardabweichung von 2,0 %, welcher für eine geringe Abweichung der Spektren eines Isolates innerhalb einer Messung sprach. Um die Unterschiede aller Messungen abzuschätzen, wurde der Mittelwert der biologischen Replikat von 91,5 % mit einer Standardabweichung von 2,4 % errechnet, was die hohe Ähnlichkeit aller Messungen bestätigte.

Nun wurden zum einen die Ähnlichkeiten der FTIR Spektren einzelner Überträgerpaare betrachtet, welche sich im Bereich zwischen 31,7 % und 78,4 % befanden (Abbildung 14). Zum anderen wurden alle Isolate in FTIR-Cluster eingeteilt. Bei einem Cut-Off Wert von 85 % konnten 15 Singletons und fünf Cluster gebildet werden (Abbildung 12). Die FTIR-Cluster bestanden aus zwei bis drei Isolaten, wobei die jeweiligen Stämme zu unterschiedlichen Kontaktclustern gehörten. Dadurch konnte keine der 14 potenziellen Transmissionen bestätigt werden, wenn man die Spektroskopie zur Surveillance herangezogen hätte.

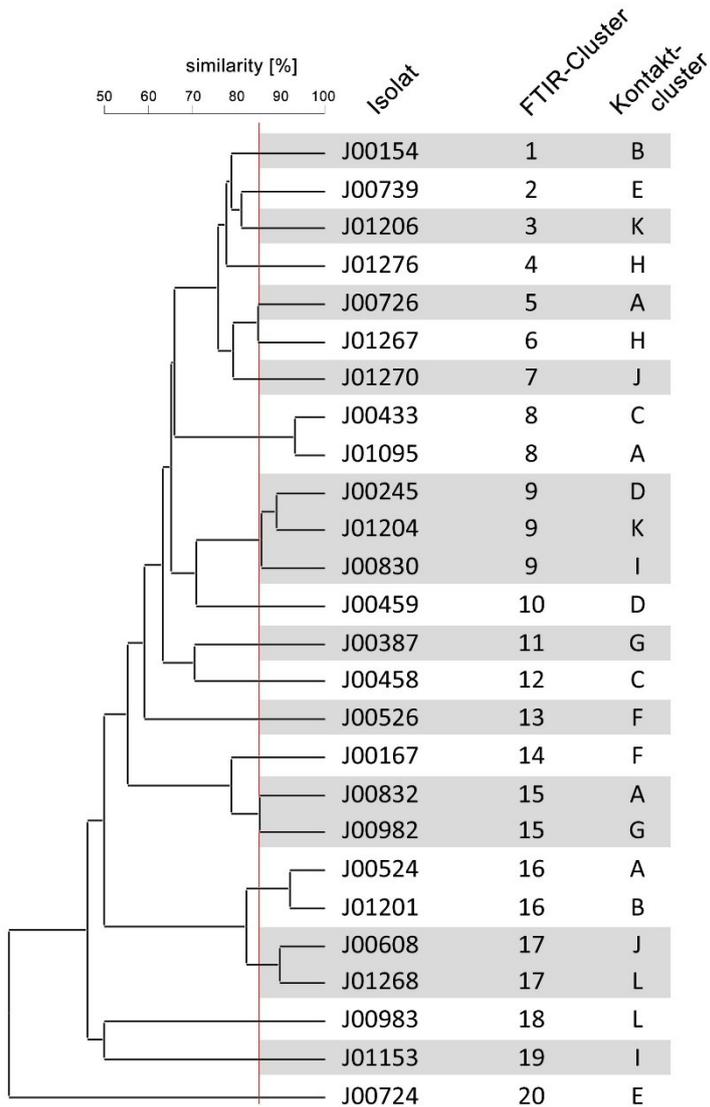


Abbildung 12. Dendrogramm der *Pseudomonas aeruginosa* Isolate anhand der FTIR Spektren. Zusätzlich wurden Kontaktcluster dargestellt. FTIR-Cluster sind grau/weiß hinterlegt, der Cut-Off Wert (85 %) wird durch die rote Linie markiert.

### 5.6.3 Ganzgenomsequenzierung

Mittels Analysen des Genoms wurden die FTIR-Typisierungsergebnisse überprüft, um Transmissionen zu bestätigen oder zu widerlegen.

#### 5.6.3.1 Average Nucleotide Identity (ANI)

Die Identifikation der Spezies erfolgte anhand ANI, welche durch den Vergleich der Genome mit einem Referenzgenom errechnet wurde. Werte im Bereich zwischen 98,43 % und 100 % erlaubten die Zuordnung zu der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* (Anhang: Tabelle S 3).

### 5.6.3.2 Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Nachfolgend wurden die Sequenztypen aus den Genomen extrahiert, um Gemeinsamkeiten zu ermitteln. Insgesamt zeigte sich eine große Vielfalt der Isolate. Zwischen den Isolaten J00387, J00726 und J01270 mit ST-253 bzw. den Isolaten J00458 und J00832 mit ST-395 wurde kein epidemiologischer Zusammenhang festgestellt.

*Table 9. MLST der Pseudomonas aeruginosa Isolate.* Der MLST wurde anhand des Genoms den jeweiligen Isolaten zugeordnet. Identische MLST sind grau hinterlegt.

Isolat	MLST
J01095	ST-207
J00387	ST-253
J00726	ST-253
J01270	ST-253
J00739	ST-254
J01204	ST-274
J01201	ST-298
J01268	ST-308
J00524	ST-316
J00458	ST-395
J00832	ST-395
J00154	ST-446
J00526	ST-560
J00245	ST-840
J00167	ST-982
J01206	ST-1158
J01276	ST-1816
J01267	ST-2167
J00433	ST-2600
J00608	ST-2613
J00982	ST-3346
J00724	Unknown ST
J00830	Unknown ST
J00983	Unknown ST
J01153	Unknown ST
J00459	Unknown ST

### 5.6.3.3 SNP-Analyse

Nachfolgend wurde aus allen Genomen ein Core-Genom berechnet, welches 5,3 Mbp lang war. Dies ermöglichte die SNP-Phylogenie sowie die Clusterzuteilung der Isolate.

Zunächst wurde ein Cut-Off Wert von 37 SNPs verwendet, wodurch die Diversität der 26 Isolate deutlich wurde. Es entstand kein größeres SNP-Cluster, sondern 26 Singletons (Abbildung 13), sodass weder verwandtschaftliche Beziehungen noch Transmissionen zwischen den Isolaten gezeigt werden konnten.

Aufgrund der Überlegung, dass es sich bei *Pseudomonas aeruginosa* um eine Spezies handelt, welche gerne die Umwelt als Reservoir benutzt, wurde zusätzlich ein höherer Cut-Off Wert erprobt. Wurde Cut-Off Wert bei 60 SNPs gesetzt, erhielt man 21 Singletons und zwei Cluster (Abbildung 13). Das Isolat J00387 unterschied sich von dem Isolat J00726 in 46 SNPs, welches sich von dem Isolat J01270 durch 53 SNPs abgrenzte. Diese drei Isolate bildeten das Cluster G. Die Isolate J00458 und J00832 des Clusters O unterschieden sich in 54 SNPs.

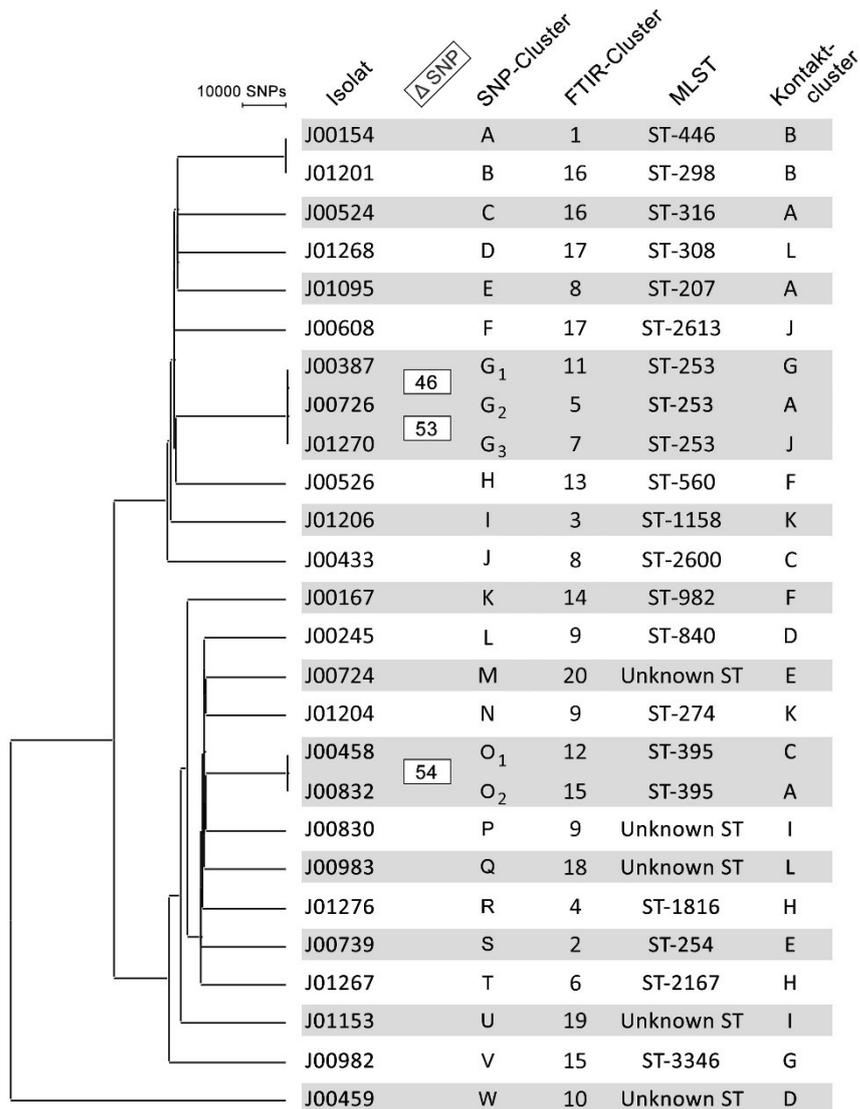
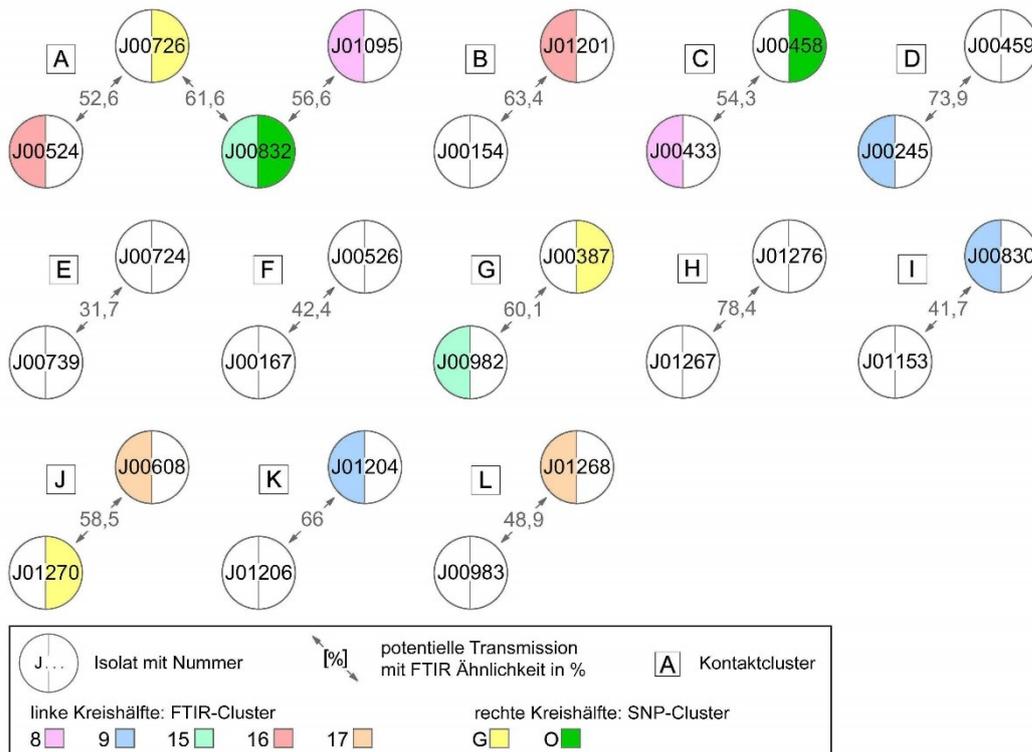


Abbildung 13. Dendrogramm der *Pseudomonas aeruginosa* Isolate anhand SNP-Analyse mit 37 und 60 SNPs als Cut-Off Wert. Zusätzlich wurden MLST sowie Kontaktcluster dargestellt. SNP-Cluster sind jeweils grau/weiß hinterlegt. Durch den Cut-Off Wert von 37 SNPs ergaben sich 26 Singletons (insbesondere G<sub>1-3</sub> sowie O<sub>1-2</sub>). Durch den Cut-Off Wert von 60 SNPs ergaben sich zwei Cluster (G und O) und 21 Singletons. Die Anzahl der SNP Differenz zwischen Isolaten mit identischem MLST wird im Kasten angegeben.

Trotz des höher gewählten Cut-Off Wertes konnte keine der 14 potenziellen Transmissionen bestätigt werden, da die Isolate die Kontaktkriterien nicht erfüllten (Abbildung 14).



**Abbildung 14. Darstellung der epidemiologischen Verbindung der *Pseudomonas aeruginosa* Isolate, sowie FTIR- und SNP-Cluster.** Beim Clustering anhand FTIR Spektroskopie (Cut-Off Wert 85 %) ergaben sich fünf Cluster und 15 Singletons (linke Kreishälfte farblos). Bei der SNP-Analyse (Cut-Off Wert 60 SNPs) ergaben sich zwei Cluster und 21 Singletons (rechte Kreishälfte farblos). Es konnte keine Transmission bestätigt werden.

#### 5.6.4 Vergleich der SNP-Cluster mit FTIR-Cluster

Die potenziellen Transmissionen, welche es zu überprüfen galt, konnten weder anhand der FTIR Messung noch anhand der SNP-Phylogenie bestätigt werden. Beide Methoden zeigten Ähnlichkeiten zwischen Isolaten, jedoch fehlten zwischen diesen Stämmen die hier vorausgesetzten Transmissionskriterien. Isolate, welche eine Verwandtschaft in der SNP-Phylogenie zeigten, wiesen keine Ähnlichkeit in ihren FTIR Spektren auf.

Um die Übereinstimmung der Clusterbildung der Methoden zu quantifizieren, wurde der Adjusted Rand Index (ARI) errechnet, wobei die SNP Analyse mit dem Cut-Off Wert von 60 SNPs verwendet wurde. Beim Vergleich von FTIR-Clustering und SNP-Clustering ergab sich ein ARI von 0, ebenso wie beim Vergleich von FTIR-Clustering und MLST. Der ARI beim Vergleich der MLST mit der SNP-Clusterbildung betrug 0,434. Diesem geringen Werten liegt vermutlich die hohe Anzahl an Singletons zugrunde.

Nichtsdestotrotz wurden alle Transmissionen durch die FTIR Spektroskopie korrekt abgelehnt (richtig negativ, 100 % Spezifität) und keine Übertragung fälschlicherweise angenommen.

Tabelle 10. **Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei *Pseudomonas aeruginosa*.** Die Ergebnisse hinsichtlich der Ermittlung der Transmissionen durch FTIR Spektroskopie sind denen der SNP-Phylogenie gegenüber gestellt.

		FTIR Spektroskopie		Gesamt
		Transmission	keine Transmission	
SNP-Phylogenie (=Goldstandard)	Transmission	0	0	0
	keine Transmission	0	14	14
Gesamt		0	14	14

Insgesamt wurde für diese heterogene Isolatsammlung nur eine geringe Übereinstimmung der Typisierung mittels FTIR Spektroskopie und Ganzgenomsequenzierung gefunden. Die wenigen Ähnlichkeiten zwischen Isolaten in der Spektroskopie könnten zufällig durch die starke Heterogenität entstanden sein.

## 5.7 *Staphylococcus aureus*

Im Zeitraum von über neun Wochen wurden insgesamt 427 *Staphylococcus aureus* Stämme gesammelt.

### 5.7.1 Transmissionen

Die Krankenhaushygiene ermittelte 35 Patientenisolate, welche an 28 potenziellen Transmissionen beteiligt waren. Die Isolate konnten in zehn Kontaktcluster eingeteilt werden, bestehend aus zwei bis zehn Isolaten (Abbildung 17: Siehe Isolate und Verbindungspfeile; Kontaktcluster A-J).

### 5.7.2 FTIR Spektroskopie

Die Kontrolle der Spektren ergab bei den biologischen Replikaten des Isolats J00150 eine geringere Ähnlichkeit als 85 %. In der graphischen Darstellung konnte die Abweichung eines technischen Replikates abgebildet werden, weshalb es nicht in die Auswertung aufgenommen wurde. Um die Unterschiede der Messung eines Isolates zu kalkulieren, wurde der Mittelwert aller technischen Replikate von 93,0 % mit einer Standardabweichung von 1,9 % berechnet. Beim

Vergleich der Messdurchgänge eines Isolates ergab sich ein Mittelwert der biologischen Replikate von 90,9 % mit einer Standardabweichung von 2,9 %. Diese Werte wiesen auf eine hohe Übereinstimmung der Messungen hin.

Zuerst wurden die Ähnlichkeiten der Spektren von Isolaten einer potenziellen Transmission ermittelt, welche im Bereich von 58,8 % bis 94,3 % lagen (Abbildung 17). Als nächstes wurden anhand der Ähnlichkeiten aller Isolatspektren FTIR-Cluster gebildet. Bei einem Cut-Off Wert von 87 % ergaben sich drei Singletons und fünf Cluster mit zwei bis 16 Isolaten (Abbildung 15: FTIR-Cluster 1-8). Besaßen Isolate desselben FTIR-Clusters eine epidemiologische Verbindung, wie es im FTIR-Cluster 1 und 5 zu beobachten war, wäre man anhand der Spektroskopie von einer Übertragung ausgegangen (Abbildung 17). Demnach würde man im FTIR-Cluster 1 folgende Transmissionen bestätigen: J00874 und J01002, J01426 und J01555, J01426 und J00922 sowie J01232 und J01114. Im Cluster 5 würde man zwischen den Isolaten J00252 und J00376 eine Übertragung erkennen. Insgesamt hätte man fünf der 28 potenziellen Übertragungen anhand der Spektroskopie bestätigt.

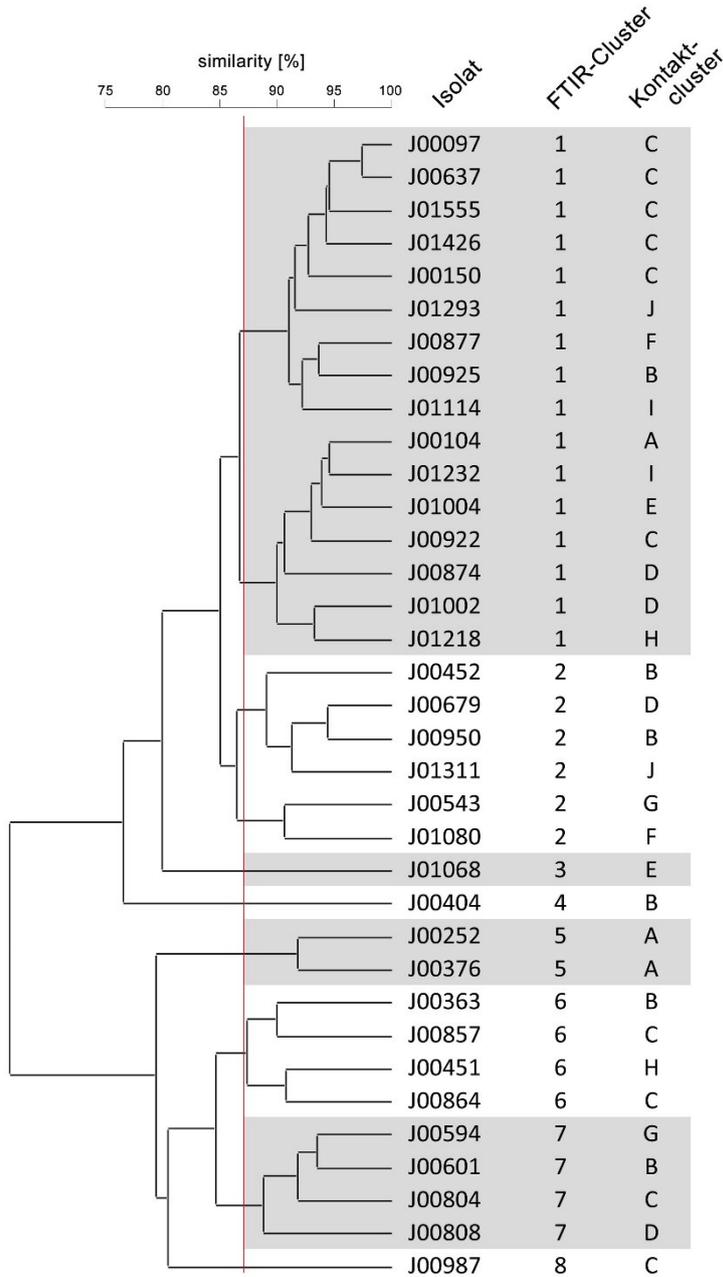


Abbildung 15. Dendrogramm der *Staphylococcus aureus* Isolate anhand der FTIR Spektren. Zum Vergleich wurden Kontaktcluster dargestellt. FTIR-Cluster sind grau/weiß hinterlegt, der Cut-Off Wert (87 %) wird durch die rote Linie markiert.

### 5.7.3 Ganzgenomsequenzierung

Die FTIR Typisierungsergebnisse wurden in einem nächsten Schritt durch Genomanalysen überprüft. Vor der Isolation der DNA fielen bei dem Isolat J00922 einige Kolonien auf, welche auf Schafblutagar Hämolyseverhalten zeigten, wohingegen andere Kolonien nicht hämolysierten. Die Kolonien wurden subkultiviert und benannt in 922 (mit Hämolyse) und 922\_2 (ohne Hämolyse).

Weitere Analysen sollten Rückschluss darauf geben, ob die Hämolyse lediglich aufgrund einer möglichen Schwächung durch die Lagerung vermindert war oder ob es sich um zwei Stämme handelte. Die MLST, die *spa*-Typisierung wie auch die SNP-Phylogenie bewiesen, dass es sich um einen identischen Stamm handelte. Auch die FTIR Spektren der beiden Subkulturen stimmten zu 92,2 % überein. Im Folgenden wird deshalb lediglich das Isolat J00922 behandelt.

### 5.7.3.1 Average Nucleotide Identity (ANI)

Zunächst erfolgte die Identifizierung durch Bestimmung der ANI. Der Vergleich mit dem Referenzgenom ergab Übereinstimmungen zwischen 98,92 % und 100 %, was die eindeutige Zuordnung aller Isolate zu der Spezies *Staphylococcus aureus* erlaubte (Anhang: Tabelle S 4).

### 5.7.3.2 Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Zur weiteren Typisierung erfolgte im nächsten Schritt die Extraktion der Sequenztypen aus den Genomen der Isolate (Tabelle 11). Es zeigten sich mehrere Typen gehäuft, was für eine Verwandtschaft der Isolate sprach oder das natürliche Verteilungsmuster darstellte.

### 5.7.3.3 *spa*-Typisierung

Die charakteristische Abfolge in der Repeat Region der Sequenz des Proteins A wurde ebenfalls zur Typisierung verwendet (Tabelle 11). Auch hier wiederholten sich einige Typen mehrmals, wodurch die Ähnlichkeiten der FTIR Spektren und der MLST bestätigt wurden.

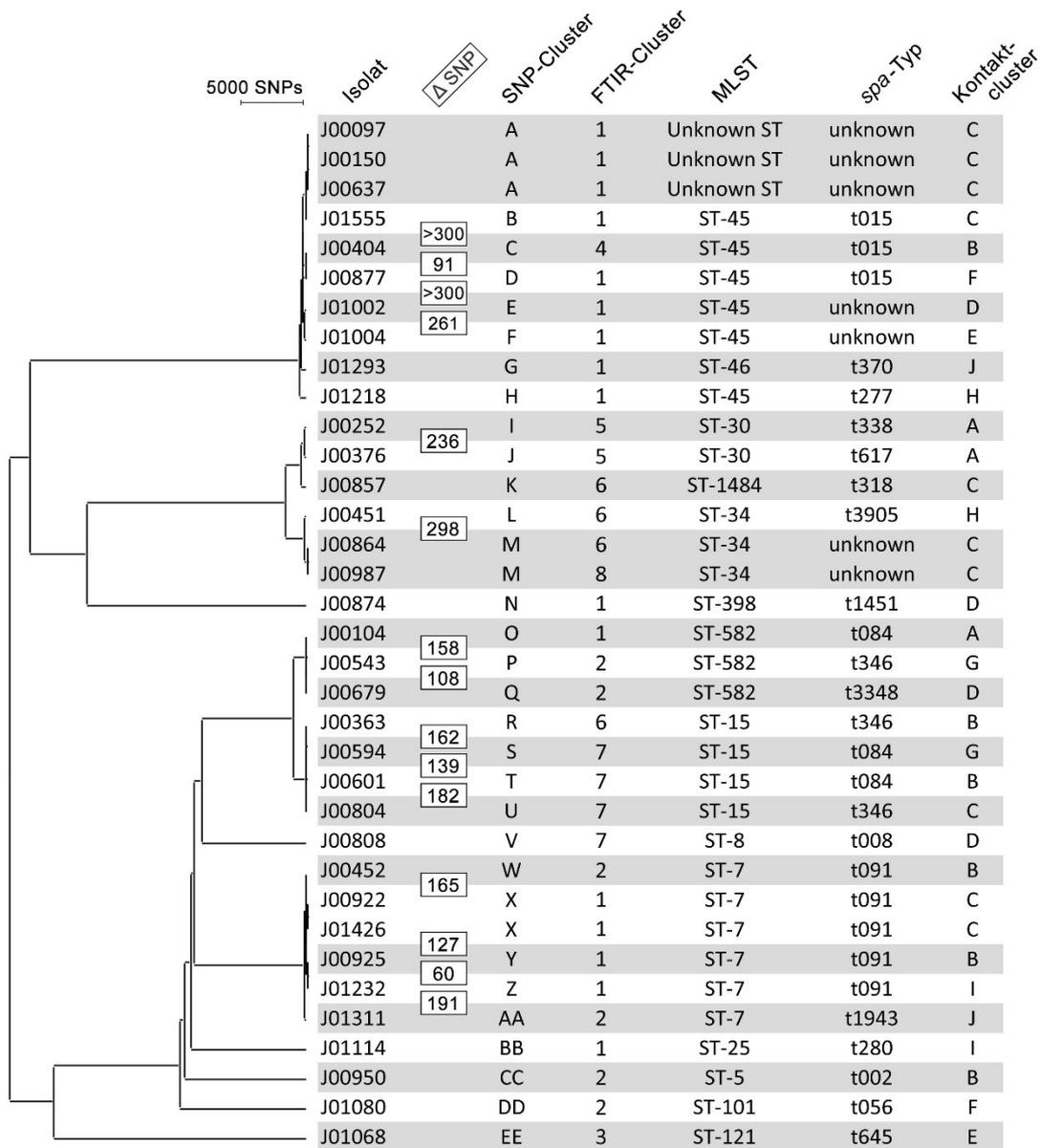
**Tabelle 11. MLST und *spa*-Typisierung der *Staphylococcus aureus* Isolate.** Der MLST wurde anhand des Genoms den jeweiligen Isolaten zugeordnet. Der *spa*-Typ wurde aus der Repeat Region des Proteins A extrahiert, wobei viele Gemeinsamkeiten auffielen. Identische MLST bzw. *spa*-Typen sind grau hinterlegt.

Isolat	MLST	<i>spa</i> -Typ
J00950	ST-5	t002
J01426	ST-7	t091
J00925	ST-7	t091
J01232	ST-7	t091
J00922	ST-7	t091
J00452	ST-7	t091
J01311	ST-7	t1943
J00808	ST-8	t008
J00363	ST-15	t346
J00594	ST-15	t084
J00601	ST-15	t084

J00804	ST-15	t346
J01114	ST-25	t280
J00252	ST-30	t338
J00376	ST-30	t617
J00451	ST-34	t3905
J00864	ST-34	unknown
J00987	ST-34	unknown
J01555	ST-45	t015
J00877	ST-45	t015
J01004	ST-45	unknown
J01002	ST-45	unknown
J01218	ST-45	t277
J00404	ST-45	t015
J01293	ST-46	t370
J01080	ST-101	t056
J01068	ST-121	t645
J00874	ST-398	t1451
J00104	ST-582	t084
J00679	ST-582	t3348
J00543	ST-582	t346
J00857	ST-1484	t318
J00097	unknown ST	unknown
J00637	unknown ST	unknown
J00150	unknown ST	unknown

#### 5.7.3.4 SNP-Analyse

Aus den Sequenzen aller Isolate wurde ein *Core*-Genom errechnet, um anhand Polymorphismen einzelner Nukleotide die SNP-Differenz zu bestimmen. Die Länge des verwendeten *Core*-Genoms betrug 2,3 Mbp. Wurde der Cut-Off Wert der Clusteranalyse bei 15 SNPs festgelegt, so erhielt man 28 Singletons und drei Cluster, welche zwei bis drei Isolate beinhalteten (Abbildung 16: Cluster A, M und X).



**Abbildung 16. Dendrogramm der *Staphylococcus aureus* Isolate anhand SNP-Analyse.** Zusätzlich wurden FTIR-Cluster, MLST, *spa*-Typ sowie Kontaktcluster dargestellt. Es wurde ein Cut-Off Wert von 15 SNPs verwendet. SNP-Cluster sind jeweils grau/weiß hinterlegt. Die Anzahl der SNP Differenz ( $\Delta$  SNP) zwischen Isolaten mit identischem MLST aber unterschiedlichem SNP-Cluster wird im Kasten angegeben.

Zwischen den Isolaten J00987 und J00864 (Cluster M) befanden sich drei SNPs, wodurch eine Transmission bestätigt wurde. Die Isolate J01426 und J00922 (Cluster X) unterschieden sich in einem SNP, weshalb auch hier eine Übertragung ermittelt wurde.

Bei dem Cluster A waren die Isolate J00097 und J00150 klonal und unterschieden sich von J00637 in sechs SNPs. Eine Verwandtschaft wurde dadurch bestätigt, jedoch wurden die Kontaktkriterien dieser Surveillance nicht

erfüllt. Eine Übertragung könnte gegebenenfalls auf einem anderen Infektionsweg erfolgt sein. Insgesamt konnten anhand SNP-Phylogenie zwei der 28 potenziellen Übertragungen bestätigt werden.

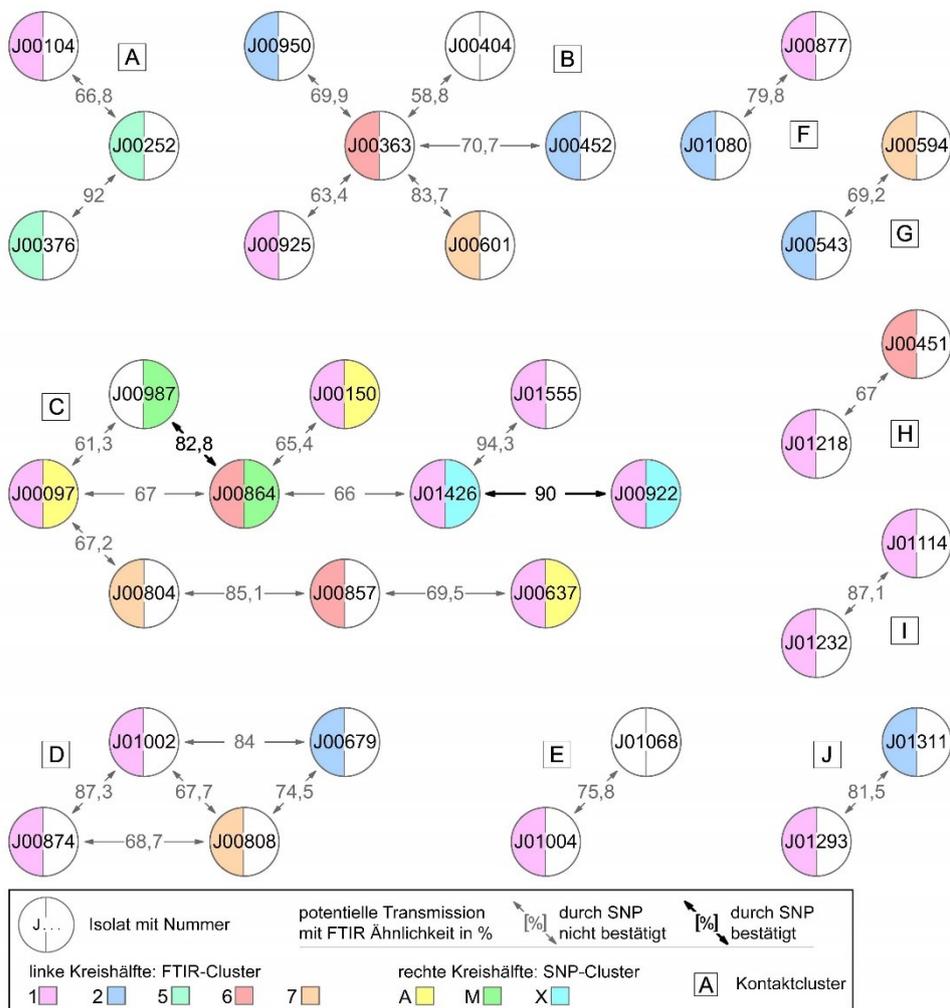


Abbildung 17. Darstellung der epidemiologischen Verbindung der *Staphylococcus aureus* Isolate, sowie FTIR- und SNP-Cluster. Beim Clustering anhand FTIR Spektroskopie (Cut-Off Wert 87 %) ergaben sich fünf größere Cluster und drei Singletons (linke Kreishälfte farblos). Die SNP-Analyse (Cut-Off Wert 15 SNPs) ermittelte drei größere Cluster und 28 Singletons (rechte Kreishälfte farblos).

#### 5.7.4 Vergleich der SNP-Cluster mit FTIR-Cluster

Die Verwandtschaft der Isolate J00987 und J00864 wurde anhand der FTIR Spektren nicht erkannt, eine Transmission wurde fälschlicherweise ausgeschlossen. Die Übertragung der Isolate J01426 und J00922 wurde dagegen auch mittels FTIR Spektroskopie ermittelt. Die phylogenetische Beziehung der Isolate J00097, J00150 und J00637 des SNP-Clusters A spiegelte sich ebenso im Clustering anhand der FTIR Spektren wider, auch wenn es

zwischen den Patienten keinen epidemiologischen Zusammenhang gab. Die Diversität der *Staphylococcus aureus* Isolate, welche die SNP-Analyse aufzeigte, wurde anhand der Spektren der Isolate nicht deutlich.

Um die Clusterzuteilung zweier Methoden zu quantifizieren, wurde der Adjusted Rand Index (ARI) berechnet. Beim Vergleich von FTIR-Clustering und SNP-Clustering ergab sich ein ARI von 0,014. Der ARI beim Vergleich von FTIR-Clustering mit MLST betrug 0,142 und mit der *spa*-Typisierung 0,042. Diese Werte sprechen für eine geringe Übereinstimmung des Clusterings.

Bei Betrachtung der Transmissionen hätte die FTIR Spektroskopie eine von zwei Übertragungen richtig erkannt (richtig positiv, 50 % Sensitivität), vier Transmissionen fälschlicherweise angezeigt (falsch positiv), eine Transmission übersehen (falsch negativ), aber 22 Transmissionen zu Recht ausgeschlossen (richtig negativ, 84 % Spezifität).

Tabelle 12. **Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei *Staphylococcus aureus*.** Die Ergebnisse hinsichtlich der Ermittlung der Transmissionen durch FTIR Spektroskopie sind denen der SNP-Phylogenie gegenüber gestellt.

		FTIR Spektroskopie		Gesamt
		Transmission	keine Transmission	
SNP-Phylogenie (=Goldstandard)	Transmission	1	1	2
	keine Transmission	4	22	26
Gesamt		5	23	28

Hinsichtlich dieser Ergebnisse stellt die Typisierung der Spezies, insbesondere bei einer stark heterogenen Isolatsammlung, eine Herausforderung für die FTIR Spektroskopie dar.

## 5.8 *Acinetobacter baumannii* Komplex

Im Rahmen der Surveillance-Simulation wurden 17 Isolate des *Acinetobacter baumannii* Komplexes gesammelt.

### 5.8.1 Transmissionen

Durch Analyse der Belegungsdaten zeigten sich vier Isolate, welche an vier potenziellen Transmissionen beteiligt waren. Alle Isolate bildeten das Kontaktcluster A (Abbildung 19: Siehe Isolate und Verbindungspfeile).

### 5.8.2 FTIR Spektroskopie

Zunächst wurden die Isolate mittels FTIR Spektroskopie typisiert und die Spektren kontrolliert. Um die Abweichung der Spektren eines Isolates innerhalb derselben Messung zu kalkulieren, wurde die prozentuale Ähnlichkeit aller technischen Replikate berechnet, wobei sich ein Mittelwert von 92,8 % mit einer Standardabweichung von 2,6 % ergab. Um die Unterschiede der Messdurchgänge zu ermitteln, wurde bei jedem Isolat der Mittelwert der biologischen Replikate erhoben, wobei der Mittelwert 92,4 % mit einer Standardabweichung von 0,4 % betrug. Diese Werte zeigen die hohe Übereinstimmung der einzelnen Messungen.

Zu Beginn wurden die Spektren dazu verwendet, die Ähnlichkeiten der Isolate einer potenziellen Transmission zu vergleichen, welche sich im Bereich von 11,5 % bis 93,7 % befanden (Abbildung 19). Anschließend wurden die Isolate je nach Ähnlichkeit der Spektren in FTIR-Cluster eingeteilt. Durch den Cut-Off Wert von 85 % entstanden zwei Cluster (Abbildung 18). Die Wahl des Cut-Off Wertes fiel leicht, da eine Verschiebung in einem großen Bereich keine Auswirkung auf die Clusterzuteilung hatte. Zwischen den Isolaten J00019 und J00460 bzw. J00610 und J00752 wurde jeweils eine Transmission ermittelt. Insgesamt hätten sich zwei von vier Übertragungen bestätigt, insofern man die FTIR Spektroskopie zur Surveillance herangezogen hätte.

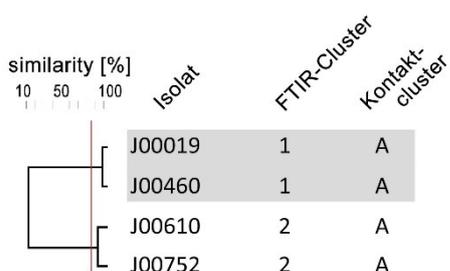


Abbildung 18. Dendrogramm der Isolate des *Acinetobacter baumannii* Komplexes anhand FTIR Spektren. Zusätzlich wurde das Kontaktcluster dargestellt. FTIR-Cluster sind grau/weiß hinterlegt, der Cut-Off Wert (85 %) wird durch die rote Linie markiert.

### 5.8.3 Ganzgenomsequenzierung

Die Typisierungsergebnisse der Spektroskopie wurden in einem nächsten Schritt anhand Genomanalysen überprüft.

### 5.8.3.1 Average Nucleotide Identity (ANI)

Die ermittelte ANI von 97,73 % erlaubte bei den Isolaten J00610 und J00752 die Zuordnung zu der Spezies *Acinetobacter pittii*, welche Teil des *Acinetobacter baumannii* Komplexes ist (Tabelle 13). Die Identifikation der Spezies anhand der ANI lieferte für die Isolate J00019 und J00460 in JSpeciesWS kein Ergebnis über 96 %, wodurch keine Zuordnung möglich war. Da die Datenbank an Referenzgenomen des Type Strain Genome Servers umfangreicher ist, wurde versucht die beiden Isolate mittels digitaler DNA-DNA Hybridisierung (dDDH) einer Spezies zuzuordnen. Jedoch konnte auch hier keine Spezies ermittelt werden, welche eine dDDH über 70% vorwies. Sicher ließ sich jedoch feststellen, dass diese beiden Isolate nicht der Spezies *Acinetobacter pittii* zugeordnet werden können, wie die anderen beiden Isolate, da sie lediglich eine ANI von 94,25 % bzw. eine dDDH von 59,2 % zum Vergleichsgenom besaßen (Tabelle 13). Die Spezies *Acinetobacter geminorum* wurde anhand der beiden Isolate J00019 und J00460 neu beschrieben (Wolf et al. 2021). Eine Übertragung von J00610 zu J00019 bzw. J00460 konnte aufgrund der Zuordnung unterschiedlicher Spezies ausgeschlossen werden.

**Tabelle 13. Average Nucleotide Identity (ANI) und dDDH verglichen mit dem Referenzgenom.** Werte über 96 % (ANI) bzw. über 70 % (dDDH) erlauben die Zuordnung zu der Vergleichsspezies.

Isolat	Referenzgenom	ANI (%)	dDDH (%)
J00610	<i>Acinetobacter pittii</i>	97,73	
J00752	<i>Acinetobacter pittii</i>	97,73	
J00019	<i>Acinetobacter pittii</i>	94,25	59,20
J00460	<i>Acinetobacter pittii</i>	94,25	59,20
J00019	<i>Acinetobacter geminorum</i>	= Type Strain	
J00460	<i>Acinetobacter geminorum</i>	99,98	

### 5.8.3.2 Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Nachfolgend wurden die Sequenztypen aus den assemblierten Genomen entsprechend dem Schema nach Pasteur extrahiert, um die MLST aller Isolate zu vergleichen (Tabelle 14). Die beiden *Acinetobacter pittii* Isolate trugen denselben MLST.

### 5.8.3.3 Kapseltypisierung

Neben dem MLST wurden außerdem die Kapseltypen bestimmt (Tabelle 14). Die OC Locus Primärreferenz zeigte Ähnlichkeiten aller vier Isolate, wohingegen die K Locus Primärreferenz die Isolate ebenfalls in zwei Paare aufteilte.

*Tabelle 14. MLST und Kapseleigenschaften der Isolate des Acinetobacter baumannii Komplexes.* Der MLST sowie die Kapseltypen wurden den Isolaten anhand des Genoms zugeordnet.

Isolat	MLST (nach Pasteur)	OC Locus Primärreferenz	K Locus Primärreferenz
J00019	Unknown ST	OCL6	KL37
J00460	Unknown ST	OCL6	KL37
J00610	ST-64	OCL6	KL38
J00752	ST-64	OCL6	KL38

### 5.8.3.4 SNP-Analyse

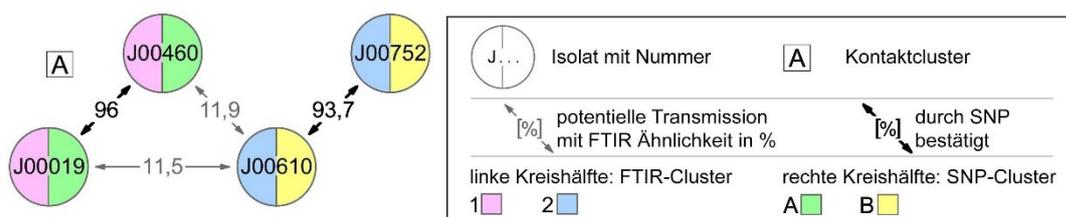
Aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten einer Spezies (jeweils zwei Isolate) musste auf die Berechnung eines Core-Genoms verzichtet werden. Auf die Überprüfung der potenziellen Übertragung von J00610 zu J00019 bzw. J00460 wurde verzichtet, da es sich um unterschiedliche Spezies handelte. Um die Transmissionen zwischen den beiden Isolaten einer Spezies zu überprüfen, wurden 1.) die HQ Reads eines Isolats am Genom des Überträgerpartners ausgerichtet, 2.) der Vorgang anders herum wiederholt und 3.) als Vergleich die HQ Reads nochmals am Genom desselben Isolats ausgerichtet.

Die potenzielle Übertragung zwischen den beiden Isolaten der Spezies *Acinetobacter geminorum* (J00019 und J00460) konnte mit einer Anzahl von 22 bzw. 17 SNPs im Vergleich zu der Genomlänge von ca. 3640000 bp bestätigt werden. Ebenso konnte die Transmission zwischen den Isolaten der Spezies *Acinetobacter pittii* (J00610 und J00752) bei einer Anzahl von vier bzw. zwölf SNPs im Hinblick auf eine Genomlänge von ca. 3925000 bp bestätigt werden (Tabelle 15).

**Tabelle 15. Anzahl der SNPs zwischen den Isolaten des *Acinetobacter baumannii* Komplexes.** Die jeweiligen Genome wurden untereinander sowie mit sich selbst verglichen.

Genom in fasta Format	Länge der fasta Referenzsequenz	HQ Reads des Genoms	SNPs
J00019	3639323 bp	J00019	18
		J00460	22
J00460	3646905 bp	J00019	17
		J00460	12
J00610	3920314 bp	J00610	3
		J00752	4
J00752	3930704 bp	J00610	12
		J00752	12

Insgesamt bewahrheiteten sich durch die Genomanalyse zwei der vier potenziellen Übertragungen.



**Abbildung 19. Darstellung der epidemiologischen Verbindung der Isolate des *Acinetobacter baumannii* Komplexes.** Anhand der FTIR Spektroskopie (Cut-Off Wert 85 %) sowie der Genomanalyse ergab sich eine identische Clusterzuteilung.

#### 5.8.4 Vergleich der SNP Typisierung mit FTIR Typisierung

Das Ergebnis der FTIR Spektroskopie ermittelte zwei Übertragungen zwischen den Isolate J00019 und J00460 bzw. J00610 und J00752 und lehnte zwei Transmissionen ab. Die SNP-Phylogenie, die MLST und die Analyse der Kapseleigenschaften kamen zu demselben Ergebnis wie die Spektroskopie. Bei identischem Clustering der Isolate ergab sich ein Adjusted Rand Index (ARI) von 1,0. Insgesamt wurde in dieser Untersuchung eine komplette Übereinstimmung von FTIR Spektroskopie und der SNP-Phylogenie hinsichtlich Clustering und Transmissionssurveillance erreicht (100 % Sensitivität, 100 % Spezifität).

Tabelle 16. **Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei *Acinetobacter baumannii* Komplex.** Die Ergebnisse hinsichtlich der Ermittlung der Transmissionen durch FTIR Spektroskopie sind denen der SNP-Phylogenie gegenüber gestellt.

		FTIR Spektroskopie		Gesamt
		Transmission	keine Transmission	
SNP-Phylogenie (=Goldstandard)	Transmission	2	0	2
	keine Transmission	0	2	2
Gesamt		2	2	4

Aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten kann jedoch nur bedingt eine allgemeine Gültigkeit für die Spezies abgeleitet werden.

### 5.9 *Stenotrophomonas spp.*

Insgesamt wurden 30 Isolate der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* während der Surveillance gesammelt.

#### 5.9.1 Transmissionen

Anhand der Belegungsdaten wurde lediglich eine potenzielle Übertragung ermittelt.

#### 5.9.2 FTIR Spektroskopie

Zunächst erfolgte die spektroskopische Typisierung. Um die Übereinstimmung der technischen Replikate einer Messung abzuschätzen, wurde der Mittelwert berechnet, welcher 93,5 % mit einer Standardabweichung von 1,2 % betrug. Um die Unterschiede der Messungen zu kalkulieren, wurde der Mittelwert der biologischen Replikate von 86,8 % mit einer Standardabweichung von 1,7 % erhoben. Diese Werte sprachen für eine hohe Übereinstimmung der einzelnen Messungen.

Die Ähnlichkeit der Spektren beider Isolate lag bei 42,2 % und war somit zu gering um eine Transmission zu bestätigen (Abbildung 20). Anhand dieser geringen Übereinstimmung stellten die beiden Stämme bei einem Cut-Off Wert von 85 % Singletons dar.

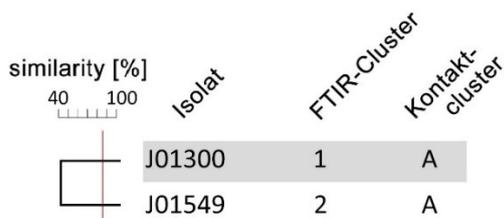


Abbildung 20. Dendrogramm der *Stenotrophomonas* spp. Isolate anhand FTIR Spektren. Zusätzlich wurde das Kontaktcluster dargestellt. FTIR-Cluster sind grau/weiß hinterlegt, der Cut-Off Wert (85 %) wird durch die rote Linie markiert.

### 5.9.3 Ganzgenomsequenzierung

Um die Ergebnisse der FTIR Spektroskopie zu überprüfen, wurden nun Genomanalysen der Isolate durchgeführt.

#### 5.9.3.1 Average Nucleotide Identity (ANI)

Zunächst erfolgte die Speziesidentifizierung durch Bestimmung der ANI, um die MALDI-Identifikation zu überprüfen. Der Vergleich mit einem Referenzgenom der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* zeigte keine Zugehörigkeit der Isolate zu dieser Spezies und legte damit nahe, dass die Identifikation durch MALDI-TOF ein falsches Ergebnis lieferte.

Nun wurden die Genome der beiden Isolate mittels der Datenbank des Type Strain Genome Servers mit anderen Spezies verglichen. Die Identifikation des Isolats J01549 als *Stenotrophomonas pavanii* konnte anhand einer ANI von 98,25 % und einer dDDH von 85,8 % erfolgen. Das Isolat J01300 wurde anhand einer ANI von 97,3 % und einer dDDH von 73,1 % der Spezies *Stenotrophomonas africana* zugeordnet. Die Spezies *Stenotrophomonas africana* wurde 1997 beschrieben (Drancourt et al. 1997) und ist laut einer anderen Arbeit identisch zur früher beschriebenen Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* (Coenye et al. 2004). Eine ANI über 96 % zwischen dem Isolat J01300 und verschiedenen Strängen der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* konnte jedoch nicht ermittelt werden. Die Unstimmigkeit der Type Strains dieser Spezies wurde bereits 2016 festgestellt und beschrieben (Patil et al. 2016).

Der Vergleich beider Genome der Isolate J01300 und J01549 untereinander lieferte eine ANI von 90,46 % sowie eine dDDH von 62,2 % und spricht damit für unterschiedliche Spezies. Eine Transmission konnte anhand dieser Tatsache abgelehnt werden.

Tabelle 17. **Average Nucleotide Identity (ANI) der *Stenotrophomonas spp.* Isolate.** ANI Werte über 96 % sowie dDDH Werte über 70 % erlauben die Zuordnung einer Spezies.

Isolat	ANI (%)	dDDH (%)	Referenzgenom
J01549	98,25	85,8	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>
J01300	97,30	73,1	<i>Stenotrophomonas africana</i>
J01300	90,46	62,2	J01549

### 5.9.3.2 Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Nachfolgend wurden die Sequenztypen aus den assemblierten Genomen extrahiert, um die Isolate zu vergleichen. Diese sprachen ebenfalls gegen eine phylogenetische Beziehung. Das Isolat J01300 trug ST-18, wohingegen bei dem Isolat J01549 kein Typ ermittelt werden konnte.

Tabelle 18. **MLST der beiden *Stenotrophomonas spp.* Isolate.** Der MLST wurde anhand des Genoms den jeweiligen Isolaten zugeordnet.

Isolat	MLST
J01300	ST-18
J01549	Unknown ST

### 5.9.4 Vergleich mit FTIR Typisierung

Die geringe Ähnlichkeit der FTIR Spektren der beiden Isolate wurde durch die Ergebnisse der MLST bestätigt. Zudem konnte eine mögliche Transmission ausgeschlossen werden, da es sich bei beiden Stämmen um unterschiedliche Spezies handelte. Die Ergebnisse der FTIR Spektroskopie stimmen mit den Genomanalysen überein, jedoch kann über die Typisierung innerhalb einer Spezies durch diese Arbeit keine Aussage getroffen werden. Die Transmission wurde durch FTIR Spektroskopie zu Recht abgelehnt (richtig negativ, 100 % Spezifität).

Tabelle 19. **Vier-Felder-Tafel zum Vergleich der Methoden bei *Stenotrophomonas spp.*** Die Ergebnisse hinsichtlich der Ermittlung der Transmissionen durch FTIR Spektroskopie sind denen der SNP-Phylogenie gegenüber gestellt.

		FTIR Spektroskopie		Gesamt
		Transmission	keine Transmission	
SNP-Phylogenie (=Goldstandard)	Transmission	0	0	0
	keine Transmission	0	1	1
Gesamt		0	1	1

## **6. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendbarkeit der FTIR Spektroskopie als Typisierungsverfahren evaluiert. Zur Simulation einer Transmissionssurveillance wurden Spektren von Bakterienstämmen erhoben und die Ergebnisse mit bereits etablierten Typisierungsmethoden verglichen. Im Gegensatz zu anderen Studien beschränkte man sich nicht nur auf vorher ausgewählte Spezies oder vorsortierte Sammlungen von Isolaten, sondern betrachtete alle Isolate, welche einen entsprechenden epidemiologischen Hintergrund aufwiesen. Bei der Simulation der Surveillance erfolgte die FTIR Typisierung sobald die Information über eine mögliche Übertragung durch die Hygiene übermittelt wurde. Dies würde in Zukunft ermöglichen, Transmissionen ausreichend schnell zu detektieren, um Hygienemaßnahmen umzusetzen und Ausbruchereignisse zu vermeiden. Bei insgesamt 103 typisierten Isolaten sechs unterschiedlicher Spezies konnte die Spektroskopie hinsichtlich schneller Durchführbarkeit und geringer Kosten überzeugen. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Ergebnisse nicht bei allen Spezies zur Transmissionssurveillance herangezogen werden sollten. Dem gegenüber konnte durch die Arbeit bestätigt werden, dass die Ganzgenomsequenzierung die beste Trennschärfe besitzt, wobei die Informationen deutlich später vorliegen.

Im Vergleich zu dieser Arbeit erwies sich die FTIR Spektroskopie in vorausgehenden Studien für mehrere Spezies als geeignete Methodik zur Typisierung. Beispielsweise wurden in einer anderen Arbeit 159 konservierte Isolate von mehreren Ausbrüchen unterschiedlicher Kliniken anhand FTIR Spektroskopie typisiert und vielversprechende Ergebnisse im Vergleich zur Multilocus-Sequenz-Typisierung und Pulsfeld-Gelelektrophorese erhoben (Martak et al. 2019).

### **6.1 Reproduzierbarkeit und Einsatz in der Routinediagnostik**

Bei vielen Arbeiten fiel neben den Vorteilen der FTIR Spektroskopie auch eine gewisse Variabilität der Ergebnisse auf, wobei die Reproduzierbarkeit von großer Bedeutung bei der Bewertung einer Methodik ist. Da Spektren im Grunde auf der chemischen Zusammensetzung an funktionellen Gruppen der bakteriellen Zelle

basieren, sind Einflussfaktoren wie die Wachstumsbedingungen sehr bedeutsam (Vogt et al. 2019; Dinkelacker et al. 2018). In einer anderen Arbeit wurden vier Messungen von 20 *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen zeitversetzt, aber unter identischen Wachstumsbedingungen durchgeführt. Die Spektren des jeweiligen Stammes wurden verglichen. Alle Messungen stimmten mit einem hohen Adjusted Rand Index (ARI) von 0,936 überein und die vier Stammbäume der Isolate waren identisch (Martak et al. 2019). Dieses Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Methodik bei identischer Durchführung dasselbe Ergebnis liefert.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde vor der Simulation der Transmissionssurveillance ebenfalls die Reproduzierbarkeit betrachtet, mit dem Hauptaugenmerk auf den Einfluss der Lagerung von Isolaten. Das kurzzeitige Lagern im Kühlschrank war notwendig, um Transmissionen möglichst in Echtzeit zu überprüfen und um das Handling dem Laborbetrieb anzupassen. Es wurden Spektren von 115 Stämmen (17 Spezies) erhoben. Die Vorbereitung auf die Messung wurde in drei unterschiedlichen Varianten durchgeführt und die Spektren miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten zwar, dass ein Spektrum nicht direkt von der Reinheitskontrolle der Routinediagnostik erhoben werden sollte, aber dass die Lagerung möglich ist, sofern das Wachstum unter Standardbedingungen vor der Messung gewährleistet ist. Für das Isolat der Spezies *Stenotrophomonas maltophilia* waren die Spektren der Reinheitskontrolle bereits verwertbar. Ein Grund dafür könnte sein, dass diese durch Zufall von der Routinediagnostik so kultiviert wurde, wie die hier definierten Standardbedingungen.

Bei einer standardmäßigen Verwendung der FTIR Spektroskopie ließe sich die Lagerung und erneute Kultivierung der Isolate beispielsweise durch ein angepasstes Laborprozedere umgehen.

## **6.2 Cut-Off Werte und Spektralbereich**

Für die Praxis wäre es wünschenswert möglichst wenige Anpassungen an einer Methodik durchführen zu müssen, um Ergebnisse schnell und unkompliziert zu erhalten. Es wäre deshalb günstig, einen festen Cut-Off Wert zu etablieren,

welcher bei allen Fragestellungen und allen Spezies zielführend ist. Diese Arbeit hat jedoch gezeigt, dass es sinnvoll ist die Grenzwerte des Clusterings der FTIR Spektroskopie mittels Erhebung des Adjusted Rand Index (ARI) an das Clustering der SNP-Phylogenie anzupassen. Die optimalen Cut-Off Werte wurden somit retrospektiv bestimmt. Andere Autoren versuchten ebenfalls einen Cut-Off Wert zu etablieren oder mit der Software des IR Biotypers zu arbeiten. Sie stellten aber gleichermaßen fest, dass Cut-Off Werte abhängig von der Spezies sowie der genetischen Diversität der untersuchten Population sind (Dinkelacker et al. 2018; Martak et al. 2019; Vogt et al. 2019). In zukünftigen Surveillanceuntersuchungen können die hier definierten Cut-Off Werte für Isolate des Universitätsklinikums Tübingen verwendet werden, weshalb die Cut-Off Wert Definition keinen Negativpunkt der FTIR Spektroskopie darstellen sollte.

Bezüglich des ausgewählten Spektralbereichs konnten in einer vorausgehenden Arbeit fünf Absorptionsbereiche des FTIR-Gesamtspektrums ermittelt werden, welche verschiedenen Zielstrukturen entsprechen (Naumann et al. 1991; Novais et al. 2019). Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde der Wellenzahlbereich zwischen  $1300 - 800 \text{ cm}^{-1}$  verwendet und den Standardeinstellungen des IR Biotypers gefolgt, um die Durchführung so einfach wie möglich zu halten. Dieser Bereich ermöglicht die Betrachtung der Polysaccharide sowie der charakteristischen Fingerprintregion und entspricht bereits erprobten Bereichen anderer Arbeitsgruppen. Der Bereich  $1300 - 800 \text{ cm}^{-1}$  wurde für *Klebsiella pneumoniae* etabliert (Dinkelacker et al. 2018), für *Enterobacter cloacae*  $1200 - 700 \text{ cm}^{-1}$  (Vogt et al. 2019) sowie  $1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$  für *Staphylococcus aureus* (Grunert et al. 2018). Bei Spezies wie *Acinetobacter baumannii* kann es hilfreich sein, den Spektralbereich in Zukunft nach oben auszuweiten, um charakteristische Peaks miteinzuschließen (Sousa; Silva; Grosso and Nemeč et al. 2014). Überwiegend konnte jedoch bestätigt werden, dass der Bereich für Polysaccharide und die Fingerprintregion ideal zur Identifikation und Typisierung sind (Novais et al. 2019).

### **6.3 Transmissionssurveillance**

Um den Einsatz der FTIR Typisierung im Routinebetrieb der Krankenhaushygiene zu erproben, wurden die Spektren erhoben sobald eine potenzielle Übertragung durch die Hygiene detektiert wurde und beide Isolate vorhanden waren. Retrospektiv wurden die Ergebnisse der FTIR Spektroskopie mit SNP-Phylogenie, MLST, Kapseleigenschaften und *spa*-Typisierung verglichen.

Die zeitliche Effizienz der Spektroskopie konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, welche die Ergebnisse der FTIR Typisierung sogar innerhalb 24 Stunden erhoben (Silva et al. 2020; Amiali et al. 2011). Ohne Berücksichtigung der Präparation der Stämme, beträgt die Messdauer am IR Biotyper nur wenige Stunden (Martak et al. 2019). Neben der Schnelligkeit der Methode ist auch der geringe Kostenaufwand nennenswert, welcher sich auf deutlich weniger als ein Zehntel der Kosten einer Sequenzierung beläuft (Novais et al. 2019; Amiali et al. 2011).

Bei der hier vorgestellten Surveillance wurden in 67 Tagen 1543 Isolate gesammelt. Der Platzbedarf und die „Hands On Zeit“, um diese Sammlung zu pflegen, ist in Relation zum Informationsgewinn im Routinebetrieb zu überdenken. Um diese Faktoren an die Realität anzupassen, könnten beispielsweise Einschränkungen bezüglich gesammelter Spezies oder Einsender vorgenommen werden.

Die Verwendbarkeit der Methode zur Surveillance muss für jede Spezies einzeln betrachtet und mit vorausgehenden Arbeiten verglichen werden.

#### **6.3.1 *Klebsiella pneumoniae***

In einer vorausgehenden Untersuchung der Arbeitsgruppe wurden die Spektren von 68 kryokonservierten Isolaten der Neonatologie mit der SNP-Phylogenie sowie MLST verglichen (Dinkelacker et al. 2018). Die FTIR Spektroskopie erwies sich dabei und in anderen Arbeiten bereits als potente, schnelle Typisierungsmethode (Rodrigues et al. 2020; Dinkelacker et al. 2018; Dieckmann et al. 2016; Martak et al. 2019).

Im Rahmen der hier simulierten Surveillance sollten 17 mögliche Transmissionen überprüft werden. Hätte man die Spektroskopie zur Surveillance herangezogen, würde man bei einem Cut-Off Wert von 75 % von zehn Übertragungen ausgehen. Anhand SNP-Phylogenie bewahrheiteten sich bei einem Cut-Off Wert von 18 SNPs 13 Transmissionen. Das bedeutet, spektroskopisch wurden alle Übertragungen bis auf drei erkannt. Die beiden Isolate J00924 und J00992 gruppieren sich anhand FTIR in ein eigenständiges Cluster. Eine Mutation eines Stoffwechselweges könnte möglicherweise die biochemische Zusammensetzung so verändern, sodass es zur Abweichung der Spektren dieser Isolate kommt (Dinkelacker et al. 2018).

Die Ähnlichkeit der untersuchten Population wird auch bei Betrachtung von MLST und Kapseleigenschaften deutlich. ST-133, die Kapseltypen KL116 und O1v1 überwiegen deutlich. In einer anderen Arbeit wurde versucht die Kapseleigenschaften einer möglichst unterschiedlichen Population multiresistenter Isolate durch FTIR Spektroskopie zu bestimmen. Mit Hilfe einer großen Datenbank an Spektren und den epidemiologischen Hintergrundinformationen stellte die Spektroskopie für diese Anwendung eine sehr potente Methodik dar (Rodrigues et al. 2020). In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Kapseleigenschaften zwar ermittelt, jedoch waren die Isolate diesbezüglich überwiegend identisch, sodass darüber nur bedingt eine Aussage getroffen werden kann. Interessant ist, dass der auffällig mukoide Phänotyp des Isolats J00803 anhand FTIR differenziert wurde. Diese Alleinstellung wird ebenfalls an den ermittelten Kapseleigenschaften deutlich. Dieses Ergebnis passt zu der Vermutung, dass Strukturen der Kapsel den phänotypischen Fingerabdruck in Form des jeweiligen Spektrums maßgeblich beeinflussen können (Rodrigues et al. 2020).

Das Clustering der zwölf Isolate mittels FTIR stimmte überwiegend mit dem SNP-Clustering überein. Der ARI von 0,536 spiegelt die niedrige Anzahl an Isolaten und Clustern wider. Die Ergebnisse anderer Autoren weisen höhere ARI auf. Bei der Typisierung von Klebsiellen durch die eigene Arbeitsgruppe wurde mit identischem Cut-Off Wert ein ARI von 0,837 beim Vergleich der beiden Methoden erreicht (Dinkelacker et al. 2018). Eine andere Arbeit ermittelte sogar eine

identische Clusterzuteilung von FTIR und MLST mit einem ARI von 1,0 (Silva et al. 2020). Insgesamt erwies sich die FTIR Spektroskopie als eine potente, schnelle Methode, um Transmissionswege von *Klebsiella pneumoniae* aufzudecken und Hygienemaßnahmen einzuleiten.

### **6.3.2 *Enterobacter cloacae* Komplex**

Das Potenzial der FTIR Spektroskopie als schnelles Typisierungsverfahren konnte bei dieser Spezies bereits durch eine vorherige Arbeit der Arbeitsgruppe bestätigt werden, wobei 24 Isolate einer Kinderintensivstation zur Infektionssurveillance typisiert wurden (Vogt et al. 2019).

Bei der hier simulierten Surveillance wurden 30 potenzielle Transmissionen überprüft. Würde man die Ergebnisse der FTIR Spektroskopie nutzen, könnten 14 potenzielle Übertragungen ermittelt werden. Durch die Typisierung anhand SNP-Phylogenie bewahrheiteten sich 15 Transmissionen. Lediglich die Transmission zwischen den Isolaten J00926 und J01306 wurde durch die Spektroskopie nicht erkannt. Alle Transmissionen entsprachen einem gehäuften Auftreten im Januar 2020, welches durch die Echtzeitsurveillance unmittelbar bemerkt wurde. Auch vorherige Untersuchungen bestätigen die Beteiligung dieser Spezies an Ausbrüchen auf prädestinierten Stationen (Martak et al. 2019; Vogt et al. 2019). Dies verdeutlicht erneut das Potenzial der Spektroskopie zur Verwendung in der Krankenhaushygiene.

Die Clusterzuteilung der Isolatsammlung anhand FTIR Spektroskopie ergab im Vergleich zur SNP-Phylogenie einen ARI von 0,939 bzw. zur MLST 0,955. Diese Werte sprechen für die weitestgehende Übereinstimmung des Clusterings. Das SNP-Cluster F deckte sich beispielsweise vollständig mit dem FTIR-Cluster 12. Lediglich die genetische Ähnlichkeit der Isolate J00926 und J01306 bzw. J00809 und J00860 wurde anhand der FTIR Spektren nicht deutlich. Des Weiteren wies die phänotypische Typisierung hohe Kongruenz zur MLST auf. Die beiden Isolate J00613 und J01099 mit ST-78 und befanden sich im gleichen FTIR-Cluster, obwohl sie sich in 196 SNPs unterschieden. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit einer vorherigen Untersuchung der Arbeitsgruppe, wobei ein ARI von 0,801 bzw. 0,818 beim Vergleich der FTIR Spektroskopie mit MLST bzw. SNP-

Phylogenie erreicht wurde (Vogt et al. 2019). Eine andere Arbeit unterstützt gleichermaßen die hohe Übereinstimmung von FTIR Spektroskopie mit MLST durch einen ARI von 0,963 bei 23 typisierten Isolaten (Martak et al. 2019).

Die Identifikation der Isolate auf Subspeziesebene könnte eine weitere Anwendung der Spektroskopie darstellen. Die vorangestellte Speziesidentifikation durch MALDI-TOF ergab für alle Isolate die Zugehörigkeit zum *Enterobacter cloacae* Komplex. Im Gegensatz dazu scheint die Clusterzuteilung durch Spektroskopie auch die Subspezies widerzuspiegeln. Beispielsweise befinden sich Isolate der Spezies *Enterobacter hormaechei subsp. oharae* größtenteils im FTIR-Cluster F. Diese Beobachtung bestärkt die Schlussfolgerung einer anderen Arbeit, dass MALDI-TOF und FTIR Spektroskopie unterschiedliche bakterielle Strukturen nutzen. Demnach seien zu geringe Unterschiede in der Proteinausstattung innerhalb einer Spezies ursächlich für unspezifischere Ergebnisse von MALDI-TOF. Die Genauigkeit der Ergebnisse ließe sich durch eine umfangreiche Datenbank an Vergleichsspektren deutlich verbessern (Dinkelacker et al. 2018).

Grundsätzlich lohnt sich die Surveillance der Spezies *Enterobacter cloacae* Komplex. Über ein Fünftel der gesammelten Isolate waren in potenzielle Übertragungen verwickelt, von denen sich die Hälfte bewahrheitete.

### **6.3.3 *Pseudomonas aeruginosa***

Bei dieser Arbeit konnten FTIR Spektren trotz der typischen Wachstumsmorphologie der Spezies mit sehr geringer Messabweichung erhoben und zur Typisierung genutzt werden.

Die Wahl eines Cut-Off Wertes der FTIR Spektroskopie ist bei *Pseudomonas aeruginosa* jedoch schwieriger als bei anderen Spezies. Anhand des Dendrogramms der Isolate wird deutlich, dass die Verschiebung des Cut-Off Wertes unmittelbaren Einfluss auf das Clustering der Isolate nimmt (Abbildung 12). Je nach Grenzwert, werden also möglicherweise Ähnlichkeiten von Stämmen fälschlicherweise angenommen bzw. verworfen. Der verwendete Cut-Off Wert von 85 % wurde retrospektiv unter Berücksichtigung des ARI gewählt. In einer anderen Arbeit wurde die individuelle Festlegung eines passenden Cut-Off Wertes empfohlen, abhängig von der genetischen Vielfalt der jeweils

untersuchten Population. In selbiger wurde für *Pseudomonas aeruginosa* der Grenzwert bei 77,9 % gesetzt (Martak et al. 2019).

Insgesamt wurden während der simulierten Surveillance 369 Isolate asserviert, von denen 26 Stämme typisiert wurden, um 14 potenzielle Transmissionen zu überprüfen. Anhand FTIR Spektroskopie ergaben sich fünf Cluster und 15 Singletons. Die Isolate desselben Clusters wiesen jedoch keinen Kontakt auf, weshalb bei den hier vorausgesetzten epidemiologischen Kriterien anhand FTIR Spektroskopie keine Transmission ermittelt werden konnte.

Im Hinblick auf den Lebensraum der Spezies erfolgte die Typisierung anhand SNP-Phylogenie mit zwei Cut-Off Werten. Neben den typischen Herden, kann von Blumenvasen bis hin zu kolonisiertem Personal über eine Vielzahl von Infektionsquellen spekuliert werden (Zabel et al. 2004; Fazeli et al. 2012; Kerr and Snelling 2009). Das Verweilen in Nassräumen als Reservoir könnte über die Zeit zu Mutationen führen, welche bei der SNP-Phylogenie bedacht werden müssen. Bei einem Cut-Off Wert von 37 SNPs, wie in einer vorangehenden Arbeit (Schürch et al. 2018), ergaben sich 26 Singletons, sodass keine der 14 potenziellen Transmissionen bestätigt werden konnte. Durch die Erhöhung des Wertes auf 60 SNPs erhielt man zwei Cluster und 21 Singletons. Die Isolate identischer Cluster erfüllten jedoch nicht die Kontaktkriterien, weshalb wiederum keine Transmission bestätigt werden konnte. Der Verwandtschaft der Isolate im selben SNP-Cluster liegt möglicherweise ein anderer epidemiologischer Zusammenhang zugrunde. Beim Vergleich der SNP-Phylogenie mit der FTIR Spektroskopie ergab sich ein ARI von 0. Beide Methoden zeigten Ähnlichkeiten zwischen Isolaten, stimmten jedoch nicht überein.

Die Unterschiede der Population werden auch bei Betrachtung der MLST deutlich. Lediglich die beiden Sequenztypen ST-253 und ST-395 kommen mehrmals vor. Die spektroskopisch ermittelten Ähnlichkeiten mancher Isolate konnten nicht bestätigt werden. Umgekehrt liefert die FTIR Spektroskopie auch keinen Rückschluss auf die MLST (ARI = 0), wie es bei *Enterobacter cloacae* Komplex der Fall war. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Beobachtung einer anderen Arbeit, welche bei der Typisierung von 100 Stämmen beim Vergleich von MLST zur FTIR Spektroskopie einen ARI von 0,936 erreichte. Ein

direkter Vergleich mit den eigenen Ergebnissen ist jedoch nicht angemessen, da eine in der Vergleichsarbeit homogenere Isolatsammlung typisiert wurde. Die Stämme wurden im Rahmen mehrerer Ausbrüche gesammelt, sodass viele MLST mehrfach vorhanden waren und auch die phänotypische Ähnlichkeit der Isolate wahrscheinlicher war (Martak et al. 2019). Im Gegensatz dazu wurde bei der hier vorliegenden Arbeit eine besonders unterschiedliche Sammlung typisiert mit Isolaten aus überwiegend paarweisen potenziellen Transmissionen von unterschiedlichsten Stationen der Klinik, was es für jede Methodik erschwert Gemeinsamkeiten zu ermitteln.

Wiederum eine andere Arbeitsgruppe erzielte vielversprechende Resultate mittels einer auf FTIR basierten Methodik, bei der die Typisierung bakterieller Isolate durch bildgebende Spektrometrie erfolgt. Die Ergebnisse könnten durch eine umfassendere Vergleichsdatenbank an Spektren sowie durch die Anwendung von maschinellem Lernen nochmals verbessert werden (Lasch et al. 2018).

Zusammenfassend kann der Einsatz der FTIR Spektroskopie als geeignete Typisierungsmethode anhand dieser Ergebnisse nur bei konkretem Verdacht oder bei Ausbruchssituationen empfohlen werden.

#### **6.3.4 *Staphylococcus aureus***

Die Typisierung einer grampositiven Spezies mittels FTIR Spektroskopie erfolgt maßgeblich anhand Unterschieden in der Ausstattung an Polysacchariden der Zellwand, da im Vergleich zur gramnegativen Zellwand Lipopolysaccharide fehlen (Novais et al. 2019; Vogt et al. 2019). Trotz Techniken, welche die Auflösung erhöhen und Verbesserungen der Datenverarbeitung, bleibt es schwierig ähnliche oder überlappende Merkmale der Spektren genau zu differenzieren (Amiali et al. 2011).

Bei der hier durchgeführten Surveillancesimulation sollten 28 potenzielle Transmissionen überprüft werden. Die FTIR Typisierung der 35 Isolate ergab bei einem Cut-Off Wert von 87 % fünf Cluster und drei Singletons. Die Verschiebung des Grenzwerts nimmt unmittelbar Einfluss auf das Clustering. Bei dem gewählten Wert waren viele Isolate ähnlich, was vermuten ließ eine homogene

Population vorliegen zu haben. Die Erhöhung des Cut-Off Werts würde dies nur bedingt vermeiden. Auch die Zahl der richtig positiven Ergebnisse ließe sich im späteren Vergleich mit der SNP-Phylogenie dadurch nicht erhöhen. Würde man die Spektroskopie zur Surveillance heranziehen, könnten lediglich fünf Übertragungen bestätigt werden. Die *spa*-Typisierung sowie die MLST als Vergleichsmethoden zeigten ebenfalls einige sich wiederholende Typen und wiesen auf Ähnlichkeiten der Isolate hin. Neben Transmissionen kann jedoch auch das natürliche Verteilungsmuster eine Ursache für diese Wiederholungen sein. Zudem stimmten die beiden Methoden bei genauerem Betrachten nur bedingt mit der FTIR Typisierung überein, da sich identische Typen nicht immer im selben FTIR-Cluster befanden. Bei dem Vergleich von FTIR Spektroskopie zu MLST bzw. *spa*-Typisierung ergab sich ein ARI von 0,142 bzw. 0,042. Diese Resultate sind gut mit denen einer anderen Arbeit vereinbar, in der 70 Stämme subtypisiert wurden. Hierbei wurde absichtlich eine sehr unterschiedliche Population zusammengestellt und neben der Pulsfeld-Gelelektrophorese auch die *spa*-Typisierung als Referenzmethode genutzt. Einerseits wurde beim Vergleich mit der *spa*-Typisierung lediglich ein Adjusted Wallace Koeffizient von 0,195 erreicht, andererseits zeigte sich aber, dass die FTIR Spektroskopie an sich eine hohe Trennschärfe (Simpson´s index of diversity = 0,983) besitzt (Johler et al. 2016). Dies spricht zwar nicht für eine hohe Übereinstimmung mit den Referenzmethoden, könnte aber auf andere Gemeinsamkeiten von Stämmen hinweisen. Die spektroskopische Untersuchung könnte beispielsweise genutzt werden, um Informationen über die Expression von kapsulären Polysacchariden (CP Typen) zu erhalten. Die Verwendung der FTIR Spektroskopie zur Differenzierung zwischen den klinisch wichtigsten Kapselpolysaccharidtypen (CP5, CP8 und nichttypisierbar) wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe untersucht und als vielversprechend bezeichnet (Grunert et al. 2013).

Die hier durchgeführte SNP-Phylogenie ergab bei einem Cut-Off Wert von 15 SNPs drei Cluster und 28 Singletons. Diese Ergebnisse sprechen für eine hohe Diversität der Isolate und widersprechen der FTIR Spektroskopie, der MLST sowie der *spa*-Typisierung. Das Clustering anhand SNP-Phylogenie verdeutlicht die genetische Entfernung von Stämmen mit identischen MLST bzw. *spa*-Typen.

Lediglich Isolate des größeren Kontaktclusters, welche einem möglichen Ausbruchsgeschehen entsprachen, wiesen Ähnlichkeiten anhand SNP-Analyse auf. Von den 28 potenziellen Transmissionen wurden nur zwei bestätigt. Die Typisierung durch FTIR Spektroskopie hätte davon nur eine entdeckt. Beim Vergleich des Clusterings durch Spektroskopie mit der SNP-Phylogenie ergab sich ein ARI von 0,014.

Die Methodik der Spektroskopie sollte jedoch nicht verworfen werden, da die Technologie möglicherweise auf spezielle Fragestellungen Antwort geben kann: So konnte in einer anderen Arbeit zwischen normalem Phänotyp und small-colony-Variante unterschieden werden, welche mit chronischen Infektionen einhergeht (Becker et al. 2006). Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit dem Zusammenhang von Spektren und Resistenzmustern. Neben der Definition eines geeigneten Wellenlängenbereiches der Spektren konnte diese Gruppe zwischen Vancomycin-resistenten und sensiblen Stämmen unterscheiden (Amiali et al. 2008). Ein anderes Anwendungsbeispiel stellt die FTIR spektroskopische Untersuchung der Teichonsäurezusammensetzung auf der Zellwand dar. Die Differenzierung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -N-Acetylglucosamin ist bereits gelungen und erlaubte so den Rückschluss auf wichtige Pathogenitätsfaktoren (Grunert et al. 2018).

### **6.3.5 *Acinetobacter baumannii* Komplex**

Bei der hier vorliegenden Arbeit sollten vier potenzielle Transmissionen überprüft werden. Die Typisierung der beteiligten Stämme mittels FTIR Spektroskopie ergab bei einem Cut-Off von 85 % zwei Cluster, sodass zwei Übertragungen ermittelt wurden. Durch eine paarweise durchgeführte SNP-Analyse der Genome wurden die beiden Transmissionen bestätigt. Die Ähnlichkeiten der Isolate J0019 und J00460 bzw. J00610 und J00752 wurden auch anhand MLST und K Locus Primärreferenz deutlich. Bei der Identifizierung der Spezies anhand des Genoms zeigten sich wesentliche Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen von MALDI-TOF. Zwei Isolate konnten der Spezies *A. pittii* zugeordnet werden, wohingegen die übrigen beiden Isolate nicht identifiziert werden konnten. Die

Neubeschreibung der Spezies *A. geminorum* ist daraufhin erfolgt (Wolf et al. 2021).

Das Potenzial der FTIR Spektroskopie zur Typisierung von Stämmen des *Acinetobacter baumannii* Komplexes wurde schon 1995 gezeigt. Verglichen mit sechs anderen Typisierungsmethoden, erwies sich die Spektroskopie als eine Option zur Vorsortierung von Stämmen bei epidemiologischen Fragestellungen (Seltmann et al. 1995). Heute untersucht eine andere Arbeitsgruppe die genaue Speziesunterscheidung sowie die Differenzierung von Isolaten mit klinisch relevantem MLST. Dabei wurde im Vergleich zu dieser Arbeit die ATR (Attenuated Total Reflectance) Infrarotspektroskopie verwendet, bei der die Intensität der reflektierten Strahlung aufgezeichnet wird. Dies wirkt sich vorteilhaft auf die Messung von Proben mit starker Absorption aus. Durch die Analyse eines größeren Spektralbereiches (4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ ) konnten durch selbige Arbeitsgruppe charakteristische Peaks aufgezeigt werden, welche bei dem hier verwendeten Spektralbereich von 1300 - 800  $\text{cm}^{-1}$  nicht enthalten waren. Beispielsweise entspricht ein Peak bei 1385  $\text{cm}^{-1}$  einer Art Marker für *A. calcoaceticus* (Sousa; Silva; Grosso; Lopes and Peixe 2014; Sousa; Silva; Grosso and Nemeč et al. 2014).

Eine weitere Studie zeigt das Potenzial der Methodik, indem 20 Isolate aus klinischen Infektionsgeschnehnissen mittels MLST und FTIR Spektroskopie typisiert wurden und ein ARI von 0,755 erreicht wurde (Martak et al. 2019).

Insgesamt erwies sich die FTIR Spektroskopie, trotz einer geringen Anzahl an Isolaten in dieser Arbeit, als geeignete Methodik zur Identifikation und Typisierung.

### **6.3.6 *Stenotrophomonas spp.***

Bei der simulierten Surveillance wurden lediglich zwei Isolate einer potenziellen Transmission betrachtet. Anhand FTIR Spektroskopie wurde eine Übertragung aufgrund der geringen Ähnlichkeit der Spektren von 42,2 % abgelehnt. Die Speziesidentifikation anhand des Genoms zeigte bei dem Isolat J01549 die Zugehörigkeit zur Spezies *S. pavanii*, bei dem Isolat J01300 zu *S. africana*. Anhand der Zuordnung verschiedener Spezies konnte eine Transmission

ebenfalls widerlegt werden. Diese Beobachtung verdeutlicht einerseits die Ungenauigkeit der Identifikation mittels MALDI-TOF, sowie andererseits die hohe Trennschärfe der FTIR Spektroskopie. Allerdings ist die Aussagekraft hinsichtlich der wenigen Isolate nur gering.

Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es 2013 zwei Isolate, welche aus Ölschlamm isoliert wurden, anhand FTIR Spektroskopie zu identifizieren. Der Vergleich mit zwei Referenzstämmen und die Verwendung eines großen Spektralbereichs von  $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ , ermöglichte die Ermittlung spezifischer Peaks. Demnach sind Peaks bei  $1096 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1360 \text{ cm}^{-1}$  charakteristisch für *S. maltophilia* (Maity et al. 2013). Auch bei dieser Untersuchung wurde nur mit wenigen Isolaten gearbeitet, was eine starke Einschränkung darstellt. Nichtsdestotrotz sollte neben der Identifikation auch die Typisierung von *Stenotrophomonas spp.* weiterhin Thema der Forschung sein.

#### **6.4 Ausblick**

Die Typisierung mehrerer Spezies anhand FTIR Spektren wurde bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht. Unter anderem für Isolate der Spezies *Klebsiella pneumoniae* (Rodrigues et al. 2020; Silva et al. 2020; Dinkelacker et al. 2018), *Enterobacter cloacae* Komplex (Vogt et al. 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (Martak et al. 2019), *Klebsiella oxytoca* (Dieckmann et al. 2016) oder *Staphylococcus aureus* (Grunert et al. 2014) wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt. Dies kann anhand der hier vorliegenden Arbeit für die Spezies *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* Komplex bestätigt werden.

Weiterer Forschungsbedarf ergibt sich bei der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* aus dem Vergleich der Ergebnisse mit anderen Autoren. In Zukunft könnten qualitativere Ergebnisse erzielt werden, indem man eine Isolatsammlung mit engerem epidemiologischem Kontakt betrachten würde.

Bei der Spezies *Staphylococcus aureus* wäre ausgehend von den hier vorgestellten Ergebnissen zu fragen, ob die Methodik für andere Fragestellungen eine bessere Anwendung finden würde als zur Typisierung. Hier können andere Arbeiten als Vorbild dienen, bei denen anhand des Spektrums beispielsweise Rückschluss auf Resistenzeigenschaften gezogen wurde (Amiali et al. 2008).

Die gewonnenen Erkenntnisse bei den Spezies *Stenotrophomonas spp.* und *Acinetobacter baumannii* ließen sich durch weitere Untersuchungen ergänzen, um eine höhere Anzahl an Stämmen vergleichen zu können. Zudem könnte eine ähnliche FTIR basierte Methodik bei der Spezies *Acinetobacter baumannii* nach dem Vorbild einer anderen Studie bessere Ergebnisse liefern, als die hier verwendete FTIR Spektroskopie (Sousa; Silva; Grosso; Lopes and Peixe 2014). In folgenden Forschungsarbeiten könnte die Spektroskopie in die Routineabläufe des Labors integriert werden, um die Schnelligkeit weiter zu erhöhen und die Lagerung der Isolate gänzlich zu vermeiden. Zudem wäre es ratsam die Auswahl an Isolaten auf bestimmte Stationen oder Spezies einzugrenzen. Laut einer Studie ist beispielsweise *Enterobacter cloacae* sowohl bei der Kolonisation als auch bei der Infektion von Frühgeborenen weit verbreitet und kann zu tödlichen Infektionen führen (Ferry et al. 2020). Speziell für Patienten der Neonatologie könnte die Methodik einen Benefit im Infektionsmanagement darstellen. Durch die Erweiterung der Vergleichsdatenbank der Spektren, durch Miteinbeziehung epidemiologischer Daten und durch die Verwendung von „Machine Learning“ kann die Funktionalität der FTIR Spektroskopie zukünftig noch weiter verbessert werden.

## 7. Zusammenfassung

Nosokomiale Infektionen stellen eine in vielen Fällen vermeidbare Komplikation einer stationären Behandlung dar. Insbesondere Infektionen, die durch multiresistente Erreger hervorgerufen werden, erfordern den vermehrten Einsatz von Reserveantibiotika sowie aufwändige Isolationsmaßnahmen, wodurch Belastungen sowohl für Patienten als auch das Gesundheitssystem entstehen. Neben der Verlängerung des Krankenhausaufenthalts bedingen Infektionen mit resistenten Erregern zusätzlich eine erhöhte Morbidität und Mortalität (Neidell et al. 2012). Die Aufdeckung von Erregerreservoirs sowie Übertragungswegen stellt ein wichtiges Element der Infektionsprävention dar. Um Transmissionen in einem nutzbaren Zeitrahmen zu überwachen, bedarf es allerdings eines effizienten Surveillance-Systems. Dafür ist neben der Kenntnis epidemiologischer Daten ein schnelles und zuverlässiges Typisierungsverfahren notwendig. Whole Genome Sequencing (WGS) gilt mittlerweile aufgrund des hohen Auflösungsvermögens als Goldstandard zur Typisierung bakterieller Erreger. Der hohe Zeit- und Kostenfaktor dieser Methodik schränkt den Einsatz für Echtzeit-Untersuchungen derzeit noch ein (Salipante et al. 2015; Sabat et al. 2013). In der Vergangenheit wurde bereits in mehreren Studien die Anwendbarkeit der Fourier-Transform-Infrarot (FTIR) Spektroskopie zur Typisierung von Erregern belegt (Dinkelacker et al. 2018; Novais et al. 2019; Vogt et al. 2019; Martak et al. 2019). Die Spektren eines bakteriellen Isolats ergeben sich aus der chemischen Zusammensetzung der bakteriellen Zelle und ermöglichen so im besten Fall den Rückschluss auf genetische Verwandtschaft. Durch die Einfachheit und Schnelligkeit stellt die FTIR Spektroskopie eine attraktive Methode für eine Echtzeit-Surveillance dar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Praktikabilität sowie die Ergebnisqualität der FTIR Spektroskopie im Vergleich mit WGS zu evaluieren. In einem ersten Versuch wurde die Reproduzierbarkeit der Spektren anhand von 115 Bakterienstämmen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kultivierung unter Standardbedingungen die Reproduzierbarkeit der Spektren erhöht. Bei der Simulation einer Transmissionssurveillance wurden 1543 Bakterienisolate (45 Spezies) aus der mikrobiologischen Routinediagnostik gesammelt. Davon

erfüllten 103 Isolate die epidemiologischen Kriterien einer möglichen Transmission und wurden jeweils mittels FTIR Spektroskopie sowie SNP-Phylogenie analysiert. Zusätzlich wurden die Informationen für konventionelle genetische Typisierungsverfahren (MLST, Kapsel Eigenschaften bzw. *spa*-Typisierung) aus den sequenzierten Genomen extrahiert.

Beim Vergleich der FTIR Spektroskopie mit dem Goldstandard WGS konnte gezeigt werden, dass die Aussagekraft bezüglich des Vorliegens einer Transmission von der Spezies abhängig ist. So wurde bei den Spezies *Klebsiella pneumoniae* (n = 12, 17 potentielle Transmissionen), *Enterobacter cloacae* Komplex (n = 24, 30 potentielle Transmissionen), *Acinetobacter baumannii* Komplex (n = 4, 4 potentielle Transmissionen) und *Stenotrophomonas spp.* (n = 2, 1 potentielle Transmission) beim Vergleich der beiden Methoden eine Sensitivität von 77 - 100 % (richtig positive Ergebnisse) erreicht. Die Übereinstimmung des Clusterings anhand der FTIR Spektren verglichen dem Clustering durch Genomanalysen war ebenfalls speziesabhängig. Bei allen Spezies zeigten sich Diskrepanzen zwischen spektralen und phylogenetischen Ähnlichkeiten von Isolaten. Es wurden sowohl genetisch verwandte Isolate aufgrund unterschiedlicher Spektren nicht als solche erkannt, wie auch genetisch unterschiedliche Isolate fälschlicherweise einem Cluster zugeordnet. So war bei der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* (n = 26, 14 potentielle Transmissionen) zwar der Ausschluss von Übertragungen stimmig, jedoch zeigten sich anhand FTIR Spektroskopie Ähnlichkeiten, welche WGS nicht belegen konnte. Dies war auch bei *Staphylococcus aureus* (n = 35, 28 potentielle Transmissionen) der Fall, wodurch 15 % falsch positive Ergebnisse erzielt wurden.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass der Einsatz der FTIR Spektroskopie zur Transmissionssurveillance nicht bei allen bakteriellen Spezies ein befriedigendes Ergebnis erzielt, was das Potenzial der Methode als universelles Typisierungs-Werkzeug einschränkt.

## 8. Literaturverzeichnis

- Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta R., 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. doi:10.1099/ijsem.0.001485.
- Amiali N. M., Mulvey M. R., Berger-Bächli B., Sedman J., et al., 2008. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. doi:10.1093/jac/dkm400.
- Amiali N. M., Golding G. R., Sedman J., Simor A. E., Ismail A. A., 2011. Rapid identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Fourier transform infrared spectroscopy, *Diagnostic microbiology and infectious disease*. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.016.
- Amtliche Mitteilung, 2012. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI), *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. doi:10.1007/s00103-012-1549-5.
- Arndt D., Grant J. R., Marcu A., Sajed T., et al., 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool, *Nucleic acids research*. doi:10.1093/nar/gkw387.
- Balloux F., Brønstad Brynildsrud O., van Dorp L., Shaw L. P., et al., 2018. From Theory to Practice: Translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the Clinic, *Trends in microbiology*. doi:10.1016/j.tim.2018.08.004.
- Bartels M. D., Petersen A., Worning P., Nielsen J. B., et al., 2014. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.01979-14.
- Becker K., Laham N. A., Fegeler W., Proctor R. A., et al., 2006. Fourier-transform infrared spectroscopic analysis is a powerful tool for studying the dynamic changes in *Staphylococcus aureus* small-colony variants, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.00847-06.
- Bienz S., Bigler L., Fox T., Meier H.; 2016. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag. ISBN 978-3-13-576109-1.
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics (Oxford, England)*. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Caprioli R. M., Farmer T. B., Gile J., 1997. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS, *Analytical Chemistry*. doi:10.1021/ac970888i.
- Carriço J. A., Silva-Costa C., Melo-Cristino J., Pinto F. R., et al., 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.02536-05.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., et al., 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes,

- International journal of systematic and evolutionary microbiology*.  
doi:10.1099/ijsem.0.002516.
- Coenye T., Vanlaere E., Falsen E., Vandamme P., 2004. *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. doi:10.1099/ijms.0.63093-0.
- Coil D., Jospin G., Darling A. E., 2015. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data, *Bioinformatics (Oxford, England)*. doi:10.1093/bioinformatics/btu661.
- Dieckmann R., Hammerl J. A., Hahmann H., Wicke A., et al., 2016. Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy, *Faraday discussions*. doi:10.1039/c5fd00165j.
- Dijkshoorn L., van der Toorn J., 1992. *Acinetobacter* species: which do we mean?, *Clinical infectious diseases*. doi:10.1093/clind/15.4.748.
- Dinkelacker A. G., Vogt S., Oberhettinger P., Mauder N., et al., 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, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.00843-18.
- Drancourt M., Bollet C., Raoult D., 1997. *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa, *International journal of systematic bacteriology*. doi:10.1099/00207713-47-1-160.
- Eber M. R., Laxminarayan R., Perencevich E. N., Malani A., 2010. Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia, *Archives of internal medicine*. doi:10.1001/archinternmed.2009.509.
- Fazeli H., Akbari R., Moghim S., Narimani T., et al., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens, *Journal of Research in Medical Sciences* 4:332–7. PubMed-ID 23267393.
- Feng B., Shi H., Xu F., Hu F., et al., 2020. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria, *Analytica chimica acta*. doi:10.1016/j.aca.2020.03.037.
- Ferry A., Plaisant F., Ginevra C., Dumont Y., et al., 2020. *Enterobacter cloacae* colonisation and infection in a neonatal intensive care unit: retrospective investigation of preventive measures implemented after a multiclonal outbreak, *BMC infectious diseases*. doi:10.1186/s12879-020-05406-8.
- Gerner-Smidt P., Tjernberg I., Ursing J., 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.29.2.277-282.1991.
- Grunert T., Wenning M., Barbagelata M. S., Fricker M., et al., 2013. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted Fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.00581-13.
- Grunert T., Monahan A., Lassnig C., Vogl C., et al., 2014. Deciphering host genotype-specific impacts on the metabolic fingerprint of *Listeria*

- monocytogenes by FTIR spectroscopy, *PLoS one*. doi:10.1371/journal.pone.0115959.
- Grunert T., Jovanovic D., Sirisarn W., Johler S., et al., 2018. Analysis of Staphylococcus aureus wall teichoic acid glycoepitopes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy provides novel insights into the staphylococcal glycode, *Scientific reports*. doi:10.1038/s41598-018-20222-6.
- Hahn H., Falke D., Klein P.; 1991. *Medizinische Mikrobiologie*, Springer Berlin Heidelberg. ISBN 9783540193890.
- Hallin M., Friedrich A. W., Struelens M. J., 2009. spa typing for epidemiological surveillance of Staphylococcus aureus, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. doi:10.1007/978-1-60327-999-4\_15.
- Heather J. M., Chain B., 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA, *Genomics*. doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
- Hof H, Schlüter D, editors, 2019. *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme. ISBN 9783132423558.
- Illumina. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology: Herstellervorgaben 2017.
- Johler S., Stephan R., Althaus D., Ehling-Schulz M., Grunert T., 2016. High-resolution subtyping of Staphylococcus aureus strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy, *Systematic and applied microbiology*. doi:10.1016/j.syapm.2016.03.003.
- Karas M., Bahr U., 1990. Laser desorption ionization mass spectrometry of large biomolecules, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi:10.1016/0165-9936(90)85065-F.
- Karas M., Bahr U., 1993. Laser desorption ionization mass spectrometry of bioorganic molecules, *Methods in molecular biology*. doi:10.1385/0-89603-215-9:215.
- Karas M., Krüger R., 2003. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism, *Chemical reviews*. doi:10.1021/cr010376a.
- Kerr K. G., Snelling A. M., 2009. Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary, *The Journal of hospital infection*. doi:10.1016/j.jhin.2009.04.020.
- Klevens R. M., Edwards J. R., Richards C. L., Horan T. C., et al., 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002, *Public health reports*. doi:10.1177/003335490712200205.
- KRINKO, 2020. Surveillance von nosokomialen Infektionen: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut, *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. doi:10.1007/s00103-019-03077-8.
- Lambert J. B., Gronert S., Shurvell H. F., Lightner D. A.; 2012. *Spektroskopie*, Pearson. ISBN 978-3-86894-146-3.
- LANGMUIR A. D., 1963. The surveillance of communicable diseases of national importance, *The New England journal of medicine*. doi:10.1056/NEJM196301242680405.
- Larsen M. V., Cosentino S., Rasmussen S., Friis C., et al., 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.06094-11.

- Lasch P., Stämmler M., Zhang M., Baranska M., et al., 2018. FT-IR Hyperspectral Imaging and Artificial Neural Network Analysis for Identification of Pathogenic Bacteria, *Analytical Chemistry*. doi:10.1021/acs.analchem.8b01024.
- Leaché A. D., Oaks J. R., 2017. The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110316-022645.
- Looney W. J., Narita M., Mühlemann K., 2009. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen, *The Lancet Infectious Diseases*. doi:10.1016/S1473-3099(09)70083-0.
- Madigan M. T., Brock T. D., Sahn K., Blank S., Antranikian G.; 2015. *Mikrobiologie*, Pearson. ISBN 978-3-86894-144-9.
- Maiden M. C. J., Bygraves J. A., Feil E., Morelli G., et al., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.95.6.3140.
- Maiden M. C. J., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria, *Annual review of microbiology*. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121325.
- Maity J. P., Kar S., Lin C.-M., Chen C.-Y., et al., 2013. Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy, *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. doi:10.1016/j.saa.2013.07.062.
- Mañano S. M. C. N., Campana E. H., Felix T. P., Barrueto L. R. L., et al., 2020. Frequency and diversity of *Stenotrophomonas* spp. carrying blaKPC in recreational coastal waters, *Water research*. doi:10.1016/j.watres.2020.116210.
- Martak D., Valot B., Sauget M., Cholley P., et al., 2019. Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks, *Frontiers in microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2019.01440.
- Meier-Kolthoff J. P., Göker M., 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy, *Nature communications*. doi:10.1038/s41467-019-10210-3.
- Mezzatesta M. L., Gona F., Stefani S., 2012. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance, *Future microbiology*. doi:10.2217/fmb.12.61.
- Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2016. Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung.
- Naumann D., Helm D., Labischinski H., 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy, *nature*. doi:10.1038/351081a0.
- Neidell M. J., Cohen B., Furuya Y., Hill J., et al., 2012. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms, *Clinical infectious diseases*. doi:10.1093/cid/cis552.
- Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., van der Reijden T. J. K., et al., 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter*

- calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU), *Research in microbiology*. doi:10.1016/j.resmic.2011.02.006.
- Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., Sedo O., et al., 2015. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. doi:10.1099/ijs.0.000043.
- Neuhaus B., Bocter N., Braulke C., Heuck C., Witte W., 2002. Studie zum Vorkommen von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* in Alten- und Altenpflegeheimen in Nordrhein-Westfalen, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. doi:10.1007/s00103-002-0521-1.
- Novais Â., Freitas A. R., Rodrigues C., Peixe L., 2019. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing, *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. doi:10.1007/s10096-018-3431-3.
- Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A. A., et al., 2013. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products, *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*. doi:10.1089/cmb.2013.0084.
- 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*. doi:10.1186/1471-2164-15-737.
- Patil P. P., Midha S., Kumar S., Patil P. B., 2016. Genome Sequence of Type Strains of Genus *Stenotrophomonas*, *Frontiers in microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2016.00309.
- Ramos P. L., van Trappen S., Thompson F. L., Rocha R. C. S., et al., 2011. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. doi:10.1099/ijs.0.019372-0.
- Ranjbar R., Karami A., Farshad S., Giammanco G. M., Mammina C., 2014. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide, *The new microbiologica* 1:1–15. PubMed-ID 24531166.
- Richter M., Rosselló-Móra R., 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.0906412106.
- Richter M., Rosselló-Móra R., Oliver Glöckner F., Peplies J., 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison, *Bioinformatics (Oxford, England)*. doi:10.1093/bioinformatics/btv681.
- Rodrigues C., Sousa C., Lopes J. A., Novais Â., Peixe L., 2020. A Front Line on *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide Knowledge: Fourier

- Transform Infrared Spectroscopy as an Accurate and Fast Typing Tool, *mSystems*. doi:10.1128/mSystems.00386-19.
- Rumore J., Tschetter L., Kearney A., Kandar R., et al., 2018. Evaluation of whole-genome sequencing for outbreak detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from the Canadian perspective, *BMC genomics*. doi:10.1186/s12864-018-5243-3.
- Sabat A. J., Budimir A., Nashev D., Sá-Leão R., et al., 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance, *European communicable disease bulletin*. doi:10.2807/ese.18.04.20380-en.
- Salipante S. J., SenGupta D. J., Cummings L. A., Land T. A., et al., 2015. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.03385-14.
- Schleicher X., Higgins P. G., Wisplinghoff H., Körber-Irrgang B., et al., 2013. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009), *Clinical microbiology and infection*. doi:10.1111/1469-0691.12026.
- 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, *Clinical microbiology and infection*. doi:10.1016/j.cmi.2017.12.016.
- Seltmann G., Beer W., Claus H., Seifert H., 1995. Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods, *Zentralblatt für Bakteriologie*. doi:10.1016/s0934-8840(11)80707-3.
- Sharma R., Jade D., Mohan S., Chandel R., Sugumar S., 2020. In-silico virtual screening for identification of potent inhibitor for L2- $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* through molecular docking, molecular dynamics analysis study, *Journal of biomolecular structure & dynamics*. doi:10.1080/07391102.2020.1805365.
- Silva L., Rodrigues C., Lira A., Leão M., et al., 2020. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy typing: a real-time analysis of an outbreak by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *European journal of clinical of Clinical Microbiology & infectious diseases*. doi:10.1007/s10096-020-03956-y.
- Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R.; 2013. *Instrumentelle Analytik*, Springer Spektrum. ISBN 978-3-642-38169-0.
- Slonczewski J. L., Foster J. W.; 2012. *Mikrobiologie - Eine Wissenschaft mit Zukunft*, Springer Spektrum. ISBN 978-3-8274-2909-4.
- Sousa C., Silva L., Grosso F., Lopes J., Peixe L., 2014. Development of a FTIR-ATR based model for typing clinically relevant *Acinetobacter baumannii* clones belonging to ST98, ST103, ST208 and ST218, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.02.015.
- Sousa C., Silva L., Grosso F., Nemeč A., et al., 2014. Discrimination of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species by Fourier transform infrared spectroscopy, *European journal of clinical of*

- Clinical Microbiology & infectious diseases*. doi:10.1007/s10096-014-2078-y.
- Steinmann J., Mamat U., Abda E. M., Kirchhoff L., et al., 2018. Analysis of Phylogenetic Variation of *Stenotrophomonas maltophilia* Reveals Human-Specific Branches, *Frontiers in microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2018.00806.
- Strommenger B., Braulke C., Heuck D., Schmidt C., et al., 2008. spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.01599-07.
- Suerbaum S., Hahn H., Burchard G. D., Kaufmann S. H. E., Schulz T. F.; 2012. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer. ISBN 978-3-642-24166-6.
- Surapat B., Montakantikul P., Malathum K., Kiertiburanakul S., et al., 2020. Microbial epidemiology and risk factors for relapse in gram-negative bacteria catheter-related bloodstream infection with a pilot prospective study in patients with catheter removal receiving short-duration of antibiotic therapy, *BMC infectious diseases*. doi:10.1186/s12879-020-05312-z.
- Urwin R., Maiden M. C. J., 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology, *Trends in microbiology*. doi:10.1016/j.tim.2003.08.006.
- Vogt S., Löffler K., Dinkelacker A. G., Bader B., et al., 2019. Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Typing of Clinical *Enterobacter cloacae* Complex Isolates, *Frontiers in microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2019.02582.
- Wichelhaus T., Brade V., 2000. Typisierungsv erfahren in der Infektionsepidemiologie, *Chemotherapie Journal* 2:93–8.
- Wick R. R., Heinz E., Holt K. E., Wyres K. L., 2018. Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for *Klebsiella* Genomes, *Journal of clinical microbiology*. doi:10.1128/JCM.00197-18.
- Wolf S., Barth-Jakschic E., Birkle K., Bader B., et al., 2021. *Acinetobacter geminorum* sp. nov., isolated from human throat swabs, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. doi:10.1099/ijsem.0.005018.
- Wyres K. L., Wick R. R., Gorrie C., Jenney A., et al., 2016. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data, *Microbial genomics*. doi:10.1099/mgen.0.000102.
- Wyres K. L., Cahill S. M., Holt K. E., Hall R. M., Kenyon J. J., 2020. Identification of *Acinetobacter baumannii* loci for capsular polysaccharide (KL) and lipooligosaccharide outer core (OCL) synthesis in genome assemblies using curated reference databases compatible with Kaptive, *Microbial genomics*. doi:10.1099/mgen.0.000339.
- Zabel L. T., Heeg P., Goelz R., 2004. Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*-isolates in a neonatal intensive care unit over a one year-period, *International journal of hygiene and environmental health*. doi:10.1078/1438-4639-00288.
- Zhou Y., Liang Y., Lynch K. H., Dennis J. J., Wishart D. S., 2011. PHAST: a fast phage search tool, *Nucleic acids research*. doi:10.1093/nar/gkr485.

## **9. Anhang**

### **9.1 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Dr. med. Jan Liese und Frau Dr. med. Sophia Wolf.

Die Sammlung bakterieller Isolate und deren Asservierung wurden eigenständig durchgeführt.

Die Informationen über epidemiologische Kontakte wurden von Herrn Dr. med. Jan Liese im Rahmen der Krankenhaushygiene anonymisiert zur Verfügung gestellt. Nach Einarbeitung durch Dr. med. Sophia Wolf und Kim Löffler erfolgte die Typisierung am FTIR Spektrometer durch mich.

Die Durchführung der Ganzgenomsequenzierung wurde von Herrn Baris Bader unterstützt und angeleitet.

Alle Ergebnisse aus der FTIR Spektroskopie, der Genomanalysen sowie die epidemiologischen Verbindungen wurden von mir in einer Datenbank zusammengeführt. Die Zusammenstellung und Auswertung der Daten erfolgte durch mich, Dr. med. Sophia Wolf und Dr. med. Jan Liese.

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

Tübingen, den 21. Februar 2022

## **9.2 Danksagung**

Mein Dank gebührt allen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Jan Liese, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe zu verfassen und mir das Vertrauen entgegen brachte, die Thematik sorgfältig zu bearbeiten. Vielen Dank für die engagierte und oftmals zeitintensive Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. med. Silke Peter für die Ermöglichung der Dissertation und die schnelle Übernahme der Betreuung bedanken. Mein herzlicher Dank gilt außerdem Frau Dr. med. Sophia Wolf für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre Geduld bei jeglichen Fragen oder Problemen. Ein aufrichtiges Dankschön gilt der Doktorandin Kim Löffler für den freundschaftlichen Empfang im Labor, die Einarbeitung in die Methodik und den Austausch während der gesamten Bearbeitung. Herrn Baris Bader möchte ich für das durchwegs nette Arbeitsklima und für die Anleitung bei der Sequenzierung danken.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei meinen Freunden und meiner Familie für jeglichen ermutigenden Zuspruch und den stetigen Rückhalt bedanken. Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann für die Hilfe und Unterstützung bei jedem einzelnen Schritt dieser Arbeit, für seine Geduld und das viele Korrekturlesen. Danke für die zahlreichen Aufmunterungen und den moralischen Beistand während der gesamten Studienzeit.

## **9.3 Förderung**

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) in Form eines finanziellen Stipendiums gefördert. Vergeben wurden die Mittel durch die Interfaculty Graduate School of Infection Biology and Microbiology (IGIM) Tübingen. Ziel des Programms ist die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses in der Medizin im Bereich der Infektionsforschung.

## 9.4 Supplementärmaterial

**Tabelle S 1. ANI der *Klebsiella pneumoniae* Isolate.** Werte über 96 % erlauben die Zuordnung zu der Referenzspezies.

Isolat	ANI [%]	Spezies
J00263	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00299	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00321	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00599	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00645	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00763	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00802	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00803	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00923	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00924	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J00992	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
J01181	99,9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

**Tabelle S 2. ANI der Isolate des *Enterobacter cloacae* Komplexes.** Werte über 96 % erlauben die Zuordnung zu der Referenzspezies.

Isolat	ANI [%]	Spezies
J00098	98,93	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>
J00544	98,81	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>
J00613	98,79	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>
J00709	98,75	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>
J00905	98,74	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>
J01099	98,59	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>
J00331	99,85	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J00958	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J00959	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01011	98,33	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01100	97,07	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01307	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01309	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01310	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01345	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01346	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J01538	98,34	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>
J00089	98,64	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
J00300	98,82	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
J00809	98,84	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
J00860	98,84	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
J00926	98,95	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
J01306	98,95	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>
J00875	98,76	<i>Enterobacter kobei</i>

**Tabelle S 3. ANI der *Pseudomonas aeruginosa* Isolate.** Werte über 96 % erlauben die Zuordnung zur Referenzspezies.

Isolat	ANI [%]	Spezies
J00154	99,71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00167	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00245	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00387	99,31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00433	98,43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00458	99,61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00459	98,43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00524	99,71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00526	99,12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00608	98,73	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00724	99,9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00726	99,31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00739	99,9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00830	99,9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00832	99,61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00982	98,73	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J00983	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01095	98,92	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01153	99,71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01201	99,71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01204	98,63	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01206	99,51	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01267	99,9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01268	98,82	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01270	99,31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
J01276	99,71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Tabelle S 4. ANI der *Staphylococcus aureus* Isolate.** Werte über 96 % erlauben die Zuordnung zu der Referenzspezies.

Isolat	ANI (%)	Spezies
J00097	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00104	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00150	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00252	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00363	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00376	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00404	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00451	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00452	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00543	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00594	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00601	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00637	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>

J00679	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00804	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00808	100	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00857	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00864	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00874	99,12	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00877	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00922	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00925	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00950	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J00987	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01002	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01004	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01068	98,92	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01080	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01114	99,31	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01218	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01232	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01293	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01311	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01426	99,41	<i>Staphylococcus aureus</i>
J01555	99,02	<i>Staphylococcus aureus</i>

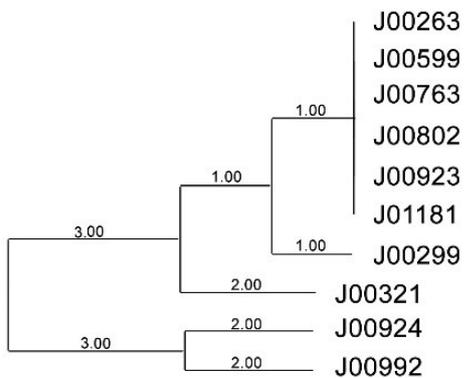
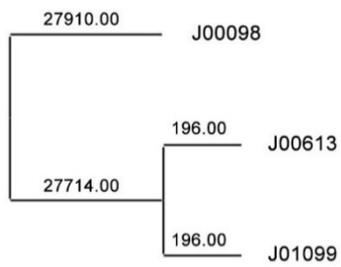


Abbildung S 1. Logarithmische Darstellung der SNP-Phylogenie des Clusters A der Spezies *Klebsiella pneumoniae*. Die Anzahl der SNPs zwischen den Isolatentypen entsprechen den Zahlen an den Schenkeln des Stammbaums. Es erfolgte die Zuordnung der zehn Isolate in ein SNP-Cluster.



**Abbildung S 2. Logarithmische Darstellung der SNP-Phylogenie der Isolate mit ST-78 der Spezies *Enterobacter cloacae* Komplex.** Die Anzahl der SNPs zwischen den Isolaten entsprechen den Zahlen an den Schenkeln des Stammbaums. Bei einer Differenz von 196 SNPs zwischen J00613 und J01099 wurde eine Verwandtschaft ausgeschlossen.