

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Direktor: Prof. Dr. M. Lohoff

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchungen zur Epidemiologie von
Klebsiella pneumoniae auf einer herzchirurgischen
Intensivstation mittels Massenspektrometrie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin bzw. Zahnmedizin, Naturwissenschaften oder
Medizinwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Alexander Schweickhardt
aus Radolfzell am Bodensee

München, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
29.02.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr PD Dr. F. Sommer

1. Korreferent/in: Herr Prof. Dr. J. Babin-Ebell

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

This work is licensed under CC BY-NC 4.0.

To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	5
2	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
2.1	Abkürzungsverzeichnis	7
2.2	Abbildungsverzeichnis	9
2.3	Tabellenverzeichnis	11
3	Einleitung	12
3.1	Einführung in die Thematik	12
3.2	Nosokomiale Pneumonie	15
3.3	Klebsiella pneumoniae	17
3.3.1	Antibiotische Resistenz bei K. pneumoniae	18
3.3.1.1	Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika	18
3.3.1.2	Resistenz gegenüber Fluorchinolonen	20
3.3.1.3	Porinverlust	20
3.4	Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie	21
3.4.1	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	21
3.4.2	Multi-Locus Sequenzanalyse (MLST)	23
3.4.3	MALDI-TOF	23
3.4.3.1	Die Anwendung von MALDI-TOF zur Identifikation und Typisierung von Bakterien	24
4	Zielsetzung	26
5	Material und Methoden	26
5.1	Ethikvotum	26
5.2	Herkunft der Proben	26
5.3	Probenanzüchtung und Aufbereitung	27
5.4	Geräte und Reagenzien	29
5.5	MALDI Messung	31
5.6	Verschlüsselung von Patientendaten	32
5.7	Datenverarbeitung	32
5.8	Softwareassistierte Analyse der Spektren	33
5.9	PFGE-Analysen	38
5.10	Vergleichende Analyse von Typisierungsmethoden	39
6	Ergebnisse	40
6.1	MALDI-TOF Clusteranalyse	41
6.2	Vergleichende Analyse der Typisierungen durch MALDI-TOF und PFGE	43
6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
6.4	Beschreibung und Charakterisierung der MALDI-Cluster	47

6.4.1	MALDI-Cluster 3	47
6.4.2	MALDI-Cluster 5	49
6.4.3	MALDI-Cluster 9	50
6.4.4	MALDI-Cluster 2	51
6.4.5	MALDI-Cluster 8	52
6.4.6	MALDI-Cluster 10 / 12	54
6.5	Zeitliches Auftreten der Cluster	55
6.6	Clusterspezifische Analyse der Resistenzlage	55
7	Diskussion	59
7.1	Einleitung	59
7.2	Anwendbarkeit von MALDI-TOF zur Typisierung von <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolaten	60
7.3	Die Bereinigung der Merkmalstabelle („Purging“)	62
7.4	Korrelation zwischen MALDI-Cluster und Resistenzverhalten	64
7.5	Ausbruchsgeschehen innerhalb dieser Untersuchung	68
7.6	Abschließende Beurteilung und Ausblick	69
8	Zusammenfassung	70
9	Summary	72
10	Literaturverzeichnis	74
11	Anhang	80
11.1	Skript zur Durchführung der MALDI Analysen in R	80
11.2	Stellungnahme der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin an der Philipps-Universität Marburg vom 13.11.2017	84
11.3	Akademische Lehrer	85

2 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

2.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
abs.	absolut
AMP.SUL	Ampicillin Sulbactam
ARI	Adjusted Rand Index
AW	Adjusted Wallace-Koeffizient
CTZ	Ceftazidim
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	extended spectrum β -Laktamase
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunden
ITS	Intensivstation
<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. pneu.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
l	Liter
m/z	Masse pro Ladung
MALDI-TOF	Matrix assisted Laser Desorption and Ionisation – Time of Flight
min	Minuten
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
MLST	Multi-locus Sequence Typingen
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese

PIP.TAZ	Piperacillin Tazobactam
POT	Phage open typing
QUIN	Ciprofloxacin
s	Sekunden
W	Wallace-Koeffizient

2.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 / Europäische Resistenzsituation für <i>K. pneumoniae</i> im Jahr 2010	12
Abbildung 2 / Europäische Resistenzsituation für <i>K. pneumoniae</i> im Jahr 2018	13
Abbildung 3 / <i>K. pneumoniae</i>	17
Abbildung 4 / Aufbau MALDI-TOF	24
Abbildung 5 / Darstellung der Messung D8 des Isolats 144_DG.....	33
Abbildung 6 / Visualisierung der „averageMassSpectra“-Funktion.....	33
Abbildung 7 / Bereinigung der Merkmalstabelle (1).....	35
Abbildung 8 / Bereinigung der Merkmalstabelle (2).....	35
Abbildung 9 / „binPeaks“ Funktion	35
Abbildung 10 / Merkmalstabelle.....	37
Abbildung 11 / Distanzmatrix	37
Abbildung 12 / Dendrogramm nach Durchführung der Clusteranalyse.	42
Abbildung 13 / Gegenüberstellung der beiden Clusteranalysen und Korrelation mit der PFGE-Analyse.....	45
Abbildung 14 / Visualisierung der MALDI-Daten in Form eines Bandenmusters („Gel View“).....	46
Abbildung 15 / MALDI Cluster 3.....	47
Abbildung 16 / Zeitstrahl für das MALDI-Cluster 3.....	48
Abbildung 17 / MALDI Cluster 5.....	49
Abbildung 18 / Zeitstrahl für das MALDI-Cluster 5.....	49
Abbildung 19 / MALDI Cluster 9.....	50
Abbildung 20 / Zeitstrahl für das MALDI Cluster 9.....	50
Abbildung 21 / MALDI Cluster 2.....	51
Abbildung 22 / Zeitstrahl für das MALDI Cluster 2.....	51
Abbildung 23 / MALDI-Cluster 8	52

Abbildung 24 / Zeitstrahl für das MALDI-Cluster 8.....	52
Abbildung 25 / Vergleichende Analyse zu verschiedenen Isolaten von den Patienten ER und CX.....	52
Abbildung 26 / MALDI-Cluster 10.	54
Abbildung 27 / MALDI-Cluster 12.	54
Abbildung 28 / Zeitstrahl für den MALDI-Clusterkomplex 10 und 12.....	54
Abbildung 29 / (vorherige Seite) Zeitliche Übersicht, nach MALDI-Clustern geordnet.....	58

2.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 / Übersicht zur Klassifizierung von gramnegativen Stäbchen hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften.	21
Tabelle 2 / Kriterien zur Interpretation von PFGE-Analysen nach Tenover et al. (Tenover et al., 1995).	23
Tabelle 3 / Geräte	29
Tabelle 4 / Reagenzien	30
Tabelle 5 / Software	31
Tabelle 6 / Transformationsschlüssel entsprechend der Peakintensitäten.....	36
Tabelle 7 / MALDIquant Workflow Parameter.....	38
Tabelle 8 / PFGE Parameter.....	39
Tabelle 9 / Kenngrößen zur vergleichenden Analyse von Typisierungsergebnissen.....	40
Tabelle 10 / Errechnete Kenngrößen (siehe Tabelle 9) zur vergleichenden Analyse von verschiedenen Typisierungsmethoden.	46
Tabelle 11 / Falsche Auftrennung von Mehrfacheinsendungen durch MALDI-TOF.....	61

3 Einleitung

3.1 Einführung in die Thematik

Infektionen, welche aufgrund eines Aufenthaltes im Krankenhaus entstehen (sog. nosokomiale Infektionen), stellen eine ernstzunehmende Bedrohung dar, da sie im Allgemeinen deutlich höhere Morbiditäts- und Mortalitätsraten sowie längere Liegezeiten und damit auch höhere Kosten für das Gesundheitswesen verursachen (Aghdassi et al., 2016). Dabei ist die Lungenentzündung (Pneumonie) die dritthäufigste nosokomiale Infektion in deutschen Krankenhäusern (Behnke et al., 2013). Häufige Erreger von nosokomialen Pneumonien sind in der Gruppe der Enterobacteriaceae zu finden, ein wichtiger Vertreter ist *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Tiefe Atemwegsinfektionen, welche im Krankenhaus erworben und durch *K. pneumoniae* hervorgerufen werden, sind aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen und vermehrt auftretender Ausbrüche von hoher klinischer Relevanz (Karb, 2017; Lippmann, Lübbert, Kaiser, Kaisers, & Rodloff, 2014; Steinmann et al., 2011).

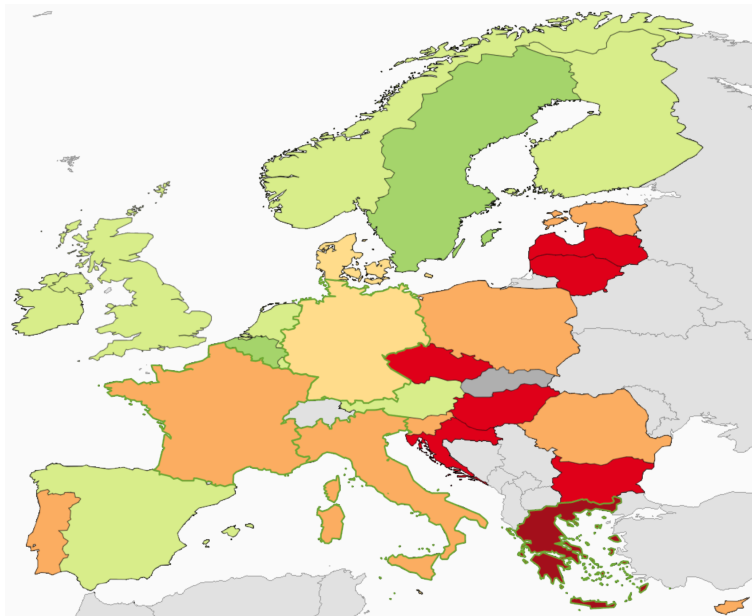


Abbildung 1 / Europäische Resistenzsituation für
K. pneumoniae im Jahr 2010

Nähere Informationen siehe Abbildung 2. (ECDC
Surveillance Atlas of Infectious Diseases,
<https://atlas.ecdc.europa.eu/>, abgerufen am 09.12.2020)

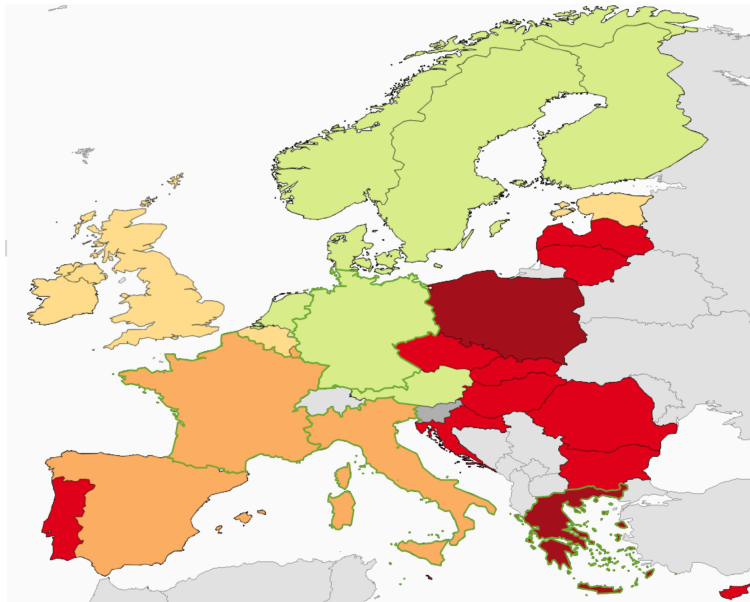


Abbildung 2 / Europäische Resistenzsituation für *K. pneumoniae* im Jahr 2018

Erläuterung und Quellenangabe für Abbildung 1 und Abbildung 2: Anteil an Isolaten die gegen Cephalosporine der dritten Generation, Aminoglykoside oder Fluorchinolone resistent sind. Grün = <5%, Orange = 5 - <25%, Rot = >25%. (ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases, <https://atlas.ecdc.europa.eu/>, abgerufen am 09.12.2020)

Die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen stellt die europäische Gesundheitsversorgung vor große Herausforderungen. Betrachtet man die Resistenzsituation bei *K. pneumoniae*, haben die Prozentzahlen der resistenten Isolate gegenüber Cephalosporinen, Fluorchinolonen und Aminoglykosiden seit dem Jahr 2005 insbesondere in ost- und südeuropäischen Gebieten deutlich zugenommen (vgl. Abbildung 1 und Abbildung 2). Gesamteuropäisch ist darüber hinaus eine Zunahme der Carbapenem-Resistenz von *K. pneumoniae* zu verzeichnen (Weist & Högberg, 2016). Solche hoch-resistenten Keime sind von großer Bedeutung und können teilweise nur noch mit bestimmten Reserveantibiotika wie z.B. Colistin behandelt werden.

Das nachfolgende Beispiel soll die Problematik, der sich verschlechternden Resistenzsituation darlegen. Beginnend im Jahr 2010 kam es am Universitätsklinikum in Leipzig zu einem der größten Ausbrüche von multiresistenten *K. pneumoniae* Stämmen in Deutschland. Dabei wurden insgesamt 103 Patienten mit einem gegenüber Carbapenemen resistenten Stamm infiziert oder kolonisiert. Dieser Ausbruch ereignete sich unmittelbar im Anschluss an die stationäre Aufnahme eines Patienten, welcher zuvor in einem

Krankenhaus in Griechenland behandelt wurde (Lubbert et al., 2014). Dies verdeutlicht, wie schnell Erreger mit Antibiotikaresistenzen verbreitet werden können. Vor dem Hintergrund einer fortschreitenden Globalisierung und des wachsenden interkulturellen Austauschs wird ersichtlich, wie wichtig die rasche Erkennung von epidemiologischen Zusammenhängen bei derartigen Ausbruchssituationen sein kann.

Um die Überwachung von epidemiologischen Zusammenhängen in Zukunft zu verbessern, soll diese Arbeit die Anwendbarkeit und Präzision der bakteriellen MALDI-TOF Analyse zu diesem Zweck beurteilen. Seit der ersten Verfahrensbeschreibung der Analyse von Bakterien mit einem Massenspektrometer im Jahr 1975 von Anhalt und Fenselau (Anhalt & Fenselau, 1975) erlebte die klinische Mikrobiologie durch die Einführung dieses Verfahrens eine der größten technischen Neuerungen ihrer Geschichte. Die routinemäßige Anwendung dieser Technologie zur Identifikation von Bakterien ermöglichte eine enorme Zeitverkürzung ab dem Zeitpunkt der Entnahme des zu untersuchenden Materials bis zur mikrobiologischen Identifikation auf Speziesebene (Bizzini, Durussel, Bille, Greub, & Prod'hom, 2010; Mellmann et al., 2008; Schubert & Wieser, 2011).

Für das Verständnis von epidemiologischen Beziehungen ist die Typisierung einzelner Isolate unabdingbar. Unter der Typisierung von Bakterien versteht man die Zuordnung von Isolaten unterhalb der Speziesebene zu bestimmten, miteinander verwandten Subtypen. Dafür werden bei einem gehäuften Auftreten eines bestimmten Erregers Typisierungsverfahren wie die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Multi-Locus-Sequenzanalyse (MLST) angewandt, um nachvollziehen zu können, inwiefern die Isolate miteinander in Verbindung stehen oder lediglich zufällig gehäuft auftreten.

Während der epidemiologischen Beobachtung und Analyse von MALDI-TOF Daten von *K. pneumoniae* Stämmen auf zwei kardiochirurgischen Intensivstationen in Deutschland soll überprüft werden, wie weit die Ergebnisse der MALDI-TOF Typisierung mit einem etablierten Verfahren übereinstimmen. Im Unterschied zu bereits vorliegenden Studien geschieht dies nicht erst bei

Vorliegen einer Ausbruchssituation, sondern im Rahmen der Beobachtung von alltäglichen epidemiologischen Zusammenhängen.

3.2 Nosokomiale Pneumonie

Der Begriff „nosokomial“ wird aus dem Griechischen abgeleitet und bedeutet so viel wie „auf das Krankenhaus bezogen“. Die nosokomiale Pneumonie, also die im Krankenhaus erworbene Lungenentzündung, wird von der ambulant erworbenen und einer Pneumonie unter Immunsuppression differenziert (Ewig, 2017).

Es existieren verschiedene Definitionen, welche Eigenschaften eine Pneumonie aufzuweisen hat, um als nosokomiale Infektion gelten zu können. Aus therapeutischer Sicht werden Pneumonien auch dann als nosokomial deklariert, wenn die Patienten bis zu drei Monate vor Erkrankungsbeginn schon einmal hospitalisiert waren. Im Gegensatz dazu werden in den meisten epidemiologischen Untersuchungen nur solche Pneumonien als nosokomial klassifiziert, welche mindestens 48 Stunden nach Krankenhauseinweisung entstanden sind. Seit Juni 2017 gilt für das Krankenhaus-Infektions-Überwachungs-System (KISS) eine Pneumonie dann als „nosokomial“, wenn der Tag des Auftretens von ersten Symptomen frühestens Tag 3 des Krankenhausaufenthaltes darstellt, wobei der Tag der Einweisung in das Krankenhaus als Tag 1 angesehen wird ("Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System – KISS-Definitionen," 2017). In der aktuellen S3-Leitlinie von Dalhoff et al. gilt folgende Definition: „Nosokomiale Pneumonien (hospital-acquired Pneumonia = HAP) sind Pneumonien, die frühestens 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme auftreten und sich bei Hospitalisierung nicht in der Inkubationsphase befanden“ (Dalhoff et al., 2017).

Die deutsche Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen ergab, dass an einem Tag im Jahr 2016 ca. 3,3% aller untersuchten Individuen im Rahmen des aktuellen stationären Aufenthaltes eine nosokomiale Infektion aufwiesen. Dieser Anteil war signifikant niedriger im Vergleich zur Punkt-Prävalenzstudie aus dem Jahr 2011 (ca. 3,8%) (Behnke et al., 2013). 24,0% dieser Infektionen waren Infektionen der unteren Atemwege. Solche nosokomialen Pneumonien wurden in ca. 55% der Fälle von fünf Erregern

(*Staphylococcus aureus* 16,1%; *Escherichia coli* 13,2%; *Pseudomonas aeruginosa* 11,4%; *Klebsiella pneumoniae* 9,1% und *Enterobacter cloacae* 5,7%) hervorgerufen und waren mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert (Aghdassi et al., 2016).

Analysen zur Berechnung des Letalitätsrisikos der nosokomialen Pneumonie sind aber schwierig durchzuführen, da die Sterblichkeit entscheidend durch die vorbestehenden Grunderkrankungen der Patienten bestimmt wird. Die meisten vorliegenden Studien beziehen sich auf beatmungs-assoziierte Pneumonien (VAP). Hier wird in der Literatur der Begriff der „attributable mortality“ (AM) verwendet. Dieser beschreibt den alleinigen Anteil an der Letalität durch VAP (Dalhoff et al., 2017).

Melsen et al. führten in den Jahren 2011 bis 2013 umfangreiche Metaanalysen durch und errechneten eine um 9 bis 13% (AM) höhere Sterblichkeitsrate, welche allein auf die VAP zurückgeführt werden konnte (Melsen et al., 2013; Melsen, Rovers, Koeman, & Bonten, 2011). Neben einer erhöhten Mortalität führen beatmungsassoziierte Pneumonien auch zu verlängerten Liegezeiten. Diese stellen wiederum eine zusätzliche Belastung für das Gesundheitssystem dar (Dalhoff et al., 2017). Es wird hierbei von einer zusätzlichen Liegedauer von 5,3 (Beyersmann et al., 2006) bis 6,1 Tagen (Safdar, Dezfulian, Collard, & Saint, 2005) ausgegangen.

Insgesamt ist festzustellen, dass Pneumonien und Infektionen durch multiresistente Keime im klinischen Alltag zunehmend häufiger beobachtet werden (Pfennigwerth, 2020). Diese sind mit signifikant höheren Mortalitätsraten assoziiert (Gasink, Edelstein, Lautenbach, Synnestvedt, & Fishman, 2009; Lubbert et al., 2014). So zeigten Ben-David et al. eine Mortalitätsrate von 48% für Bakteriämien mit Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae* Isolaten, während solche Infektionen mit ESBL-produzierenden (22%) und normal sensiblen Bakterien (17%) deutlich seltener tödlich endeten (Ben-David et al., 2012). Ähnliches konnten im Jahr 2008 schon Schwaber und Carmeli nachweisen, deren Ergebnisse eine 6-fach höhere Wahrscheinlichkeit anzeigten, an einer Pneumonie zu versterben, wenn bei den verursachenden *K. pneumoniae* Isolaten eine Resistenz gegenüber Carbapenemen vorlag (Schwaber & Carmeli, 2007).

3.3 *Klebsiella pneumoniae*

Das Bakterium *Klebsiella pneumoniae* wurde 1882 erstmals durch den deutschen Mikrobiologen Carl Friedländer als Ursache einer seltenen Form der Pneumonie beschrieben. Friedländer bezeichnete den entdeckten Erreger zunächst als „Diplococcus“. Die heute gültige Namensgebung erfolgte ca. vier Jahre später durch den Mikrobiologen Trevisan zu Ehren des Bakteriologen Edwin Klebs (Brisse, Grimont, & Grimont, 2006).

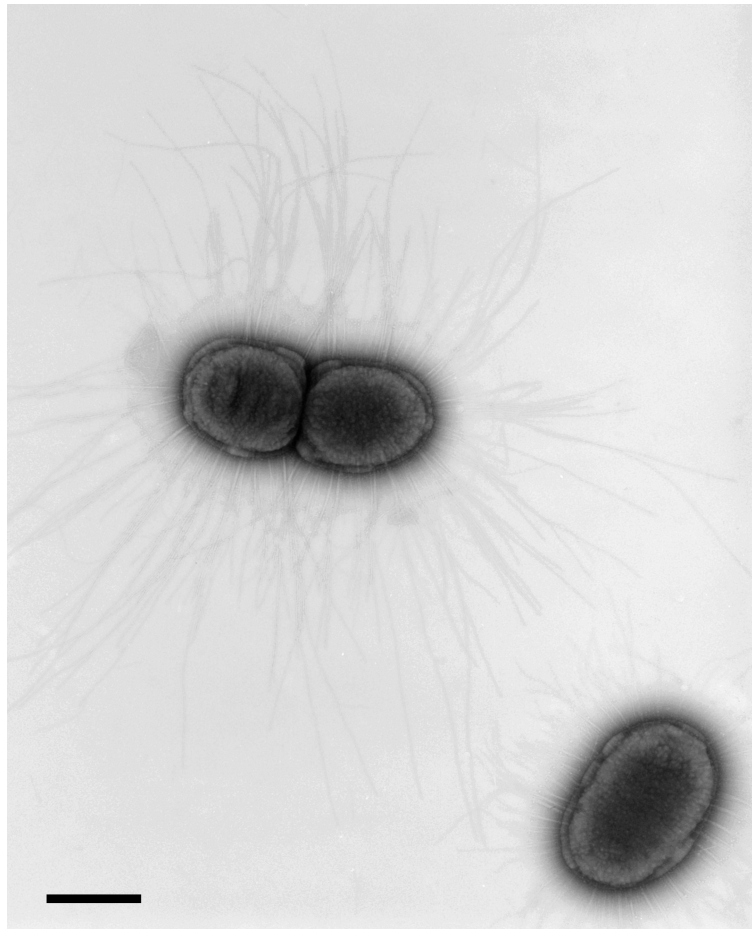


Abbildung 3 / *K. pneumoniae*
Transmissions-Elektronenmikroskopie,
Negativkontrastierung. Maßstab = 1 μ m. Quelle: Hans R.
Gelderblom, Andrea Männel, Rolf Reissbrodt; Robert-
Koch-Institut (RKI); abgerufen am 23.03.2022.

K. pneumoniae ist ein gramnegatives, unbewegliches und stäbchenförmiges Bakterium, welches zur Familie der Enterobacteriaceae gehört. In der natürlichen Umgebung sind *Klebsiella spp.* vor allem in Böden, Wasserleitungen und Abwasseranlagen beheimatet. Ein weiteres Vorkommen findet sich im gastrointestinalen System von Säugetieren. Erkrankungen wie Sepsis, Pneumonie, Harnwegs- und Weichteilinfektionen, welche durch *K. pneumoniae*

verursacht werden, sind in den meisten Fällen nosokomial bedingt. Insbesondere Patienten mit geschwächtem Immunsystem gelten als besonders gefährdet (Podschun & Ullmann, 1998).

3.3.1 Antibiotische Resistenz bei *K. pneumoniae*

Resistenz bedeutet, dass trotz ausreichendem Wirkspiegel einer antibiotisch wirkenden Substanz eine therapeutische Wirkung nicht erwartet werden kann. Bei *K. pneumoniae* können, wie bei anderen Enterobacteriaceae, drei wesentliche Strategien zur Vermittlung von Resistenzen unterschieden werden: die strukturelle Veränderung der Penicillinbindeproteine, die verringerte Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwand gegenüber dem Antibiotikum (Porinverlust) und die enzymatische Spaltung des Antibiotikums (durch β -Laktamasen und andere Enzyme).

3.3.1.1 Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika

β -Laktam-Antibiotika wirken durch eine Blockierung der bakteriellen Zellwandsynthese und führen so zu einer verminderten osmotischen Resistenz der Zelle und damit zu deren Absterben. Die Resistenz von Bakterien gegenüber β -Laktam Antibiotika wird vor allem über die enzymatische Spaltung, durch sog. „ β -Laktamasen“, vermittelt. Diese sind im Jahr 1980 durch Ambler et al. in zwei große Kategorien eingeteilt worden: „Serin- β -Laktamasen“ (Klasse A, C und D), welche die Aminosäure Serin in ihrem aktiven Zentrum vorweisen, und die „Metallo- β -Laktamasen“ (Klasse B), die für die enzymatische Spaltung der β -Laktam-Antibiotika ein zweifach positiv geladenes Kation benötigen (Ambler, 1980).

ESBL-Proteine (extended spectrum β -Laktamasen), also β -Laktamasen mit erweitertem Spektrum, gehören den Klassen A und D an. Sie vermitteln Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation (Cefpodoxim, Ceftazidim und Cefotaxim) und zeichnen sich durch ihre Hemmbarkeit durch β -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure oder Tazobactam aus (Grover, Sahni, & Bhattacharya, 2013; Knothe, Shah, Krcmery, Antal, & Mitsuhashi, 1983; Paterson & Bonomo, 2005; Pfeifer, 2007).

Eine spezielle Form der β -Laktamasen stellen AmpC Proteine (Klasse C nach Ambler) dar. Die Gene für diese Proteine sind bei einigen Vertretern, nicht jedoch

bei *K. pneumoniae*, chromosomal lokalisiert (Philippon, Arlet, & Jacoby, 2002). Sie vermitteln die Inaktivierung von vielen β -Laktam-Antibiotika, sowie Resistenzen gegenüber Cephalomycine (z.B. Cephoxitin) und Monobactame (z.B. Aztreonam). Außerdem zeigen sie eine Stabilität gegenüber β -Laktamase-Inhibitoren wie z. B. Clavulansäure. Für gewöhnlich sind ampC-Gene durch Suppressor-Gene (ampR u.a.) inaktiviert. Durch die Anwesenheit von Cephalosporinen wird eine vermehrte Expression dieser Proteine induziert (Jacoby, 2009). Hierdurch kann eine zeitlich verzögerte Resistenz gegenüber initial sensibel getesteten Isolaten beobachtet werden. Die Übertragung von solchen chromosomal gelegenen Resistenzgenen kann durch Plasmide vermittelt werden. Dadurch werden AmpC Resistenzen auch bei Spezies (z. B. *K. pneumoniae*) beobachtet, welche üblicherweise kein chromosomal gelegenes AmpC Gen besitzen (Pfeifer, Cullik, & Witte, 2010; Philippon et al., 2002).

Wenn gramnegative Bakterien durch β -Laktamasen gegenüber den Penicillinen und Cephalosporinen resistent sind, bleiben neben den Chinolonen nur Carbapeneme als eine der letzten Instanzen einer effektiven antibiotischen Therapie. Zuletzt wurden aber spezielle β -Laktamasen, welche die Inaktivierung solcher Reservemedikamente (Carbapenemasen) vermitteln, häufiger entdeckt (Pfennigwerth, 2020). Das Vorhandensein eines derartigen Resistenzmechanismus ist heutzutage als Surrogat Parameter (siehe Tabelle 1) für die Klassifikation als hochresistente Keime (sog. „4MRGN“) anerkannt ("Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedelung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen," 2012). Die Prävalenzen der verschiedenen Carbapenemasen in Deutschland unterscheiden sich von anderen europäischen Ländern. Im Jahr 2019 wurde die Carbapenemase vom Typ "OXA-48" (Ambler Klasse D) am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von "VIM-1" (Klasse B, Metallo- β -Laktamase) und "KPC-2". Besorgniserregend ist, dass die Carbapenemase "OXA-244" im Jahr 2013 erstmals beschrieben wurde und innerhalb von nur knapp sieben Jahren zu den fünf am häufigsten nachgewiesenen Carbapenemasen zählt. Dies verdeutlicht, wie schnell sich Resistenzgene verbreiten können (Pfennigwerth, 2020).

3.3.1.2 Resistenz gegenüber Fluorchinolonen

Eine weitere wichtige Klasse von Antibiotika stellen die Chinolone dar. Sie wirken antibiotisch, indem sie spezifisch die bakterielle Typ-II-Topoisomerase (Gyrase) blockieren. Dadurch wird die Auftrennung der helikalen DNA-Struktur unterbunden und die DNA-Synthese bzw. Replikation kann nicht stattfinden (Cruz et al., 2013; Drlica & Zhao, 1997). Die Chinolonresistenzgene (*qnrA*, *qnrB* etc.) kodieren meist für kleine fünfkettige Proteine, welche die Bindungsstelle für Fluorchinolone an der bakteriellen Gyrase blockieren (Cruz et al., 2013). Bei ESBL- und Carbapenemase produzierenden *K. pneumoniae* Isolaten findet sich häufig eine Ko-Resistenz gegenüber Chinolonen ("Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedelung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen," 2012). Ursächlich hierfür ist die enorme Verbreitung von plasmid-kodierten ESBL-Genen wie *bla_{CTX-M}*. Da die Gensequenzen für die unterschiedlichen Chinolon- und Aminoglykosidresistenzen sich meist in direkter Nachbarschaft zu den ESBL-kodierenden Genen befinden, können diese mitunter gleichzeitig über horizontalen Gentransfer weitergegeben werden (Canton & Coque, 2006).

3.3.1.3 Porinverlust

Jedes antibiotisch wirkende Therapeutikum muss zunächst an den Ort der Wirkung, das Zellinnere des Bakteriums, gelangen. Häufig sind diese Arzneimittel, insbesondere Wirkstoffe aus der β -Laktam-Gruppe, geladene und hydrophile Moleküle. Diese Eigenschaften verhindern eine spontane Diffusion der Substanzen über die Zellmembran. Porine, oder „outer membrane porins“ (OMP) sind Proteine, welche bestimmte Moleküle, u.a. antibiotisch wirksame Substanzen, durch diese Barriere hindurchlassen. Der Verlust von solchen Porinen stellt einen recht häufigen zusätzlichen Mechanismus der Antibiotikaresistenz von *K. pneumoniae* dar. Sugawara et al. fanden heraus, dass *K. pneumoniae* Porine produziert, welche eine wesentlich höhere Transportrate über die äußere Zellmembran besitzen als ihre korrespondierenden Proteine in anderen Bakterien. Dies könnte ein Grund sein, warum die Resistenzentwicklung bei *K. pneumoniae* eng mit einem Verlust ihrer Porine verknüpft ist. Denn diese Bakterien waren bereits durch die hohe Durchlässigkeit der vorhandenen Porinproteine nicht ausreichend gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen geschützt (Sugawara, Kojima, & Nikaido, 2016).

Tabelle 1 / Übersicht zur Klassifizierung von gramnegativen Stäbchen hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften.

("Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedelung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen," 2012)

Klasse	Leitsubstanz	Enterobacteriaceae	
		3MRGN	4MRGN
Acylureidopenicilline	Piperacillin	R	R
Cephalosporine	Ceftazidim	R	R
Fluorchinolone	Ciprofloxacin	R	R
Carbapeneme	Meropenem	S	R

3.4 Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie

Vor dem Hintergrund immer öfter auftretender Ausbrüche von resistenten Bakterienstämmen, sind schnelle Typisierungsverfahren für die Einleitung von zielgerichteten Maßnahmen zur Eindämmung einer Ausbruchssituation unerlässlich. Wie oben bereits erläutert, ist bei einer auffälligen Häufung eines resistenten Erregers die Frage entscheidend, ob es sich dabei um eine „klonale“ Ausbreitung eines bestimmten Stammes handelt oder um ein zufälliges, gleichzeitiges Auftreten von Resistenzen.

Es wird im Allgemeinen zwischen phänotypischen und genotypischen Typisierungsverfahren unterschieden. Zu den phänotypischen Verfahren gehört unter anderem die vergleichende Analyse und Interpretation von Antibiotika-Resistenzmustern oder biochemischem Reaktionsverhalten. Aufgrund der stetigen Anpassung eines Bakteriums an äußere Gegebenheiten und damit der Veränderung des phänotypischen Musters kann diese Analyse aber zu Fehlinterpretationen führen. Zu den genotypischen Verfahren werden unter anderem die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und die Multi-Locus Sequenzanalyse (MLST) gezählt. Im Folgenden sollen die einzelnen Verfahren erläutert werden.

3.4.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE-Analyse ist, als wichtiger Vertreter genotypisch basierter Methoden, eine seit vielen Jahren genutzte Technologie für die Typisierung von bakteriellen Isolaten (Spinali et al., 2015). Dabei wird die bakterielle DNA mithilfe eines an wenigen Stellen schneidenden Enzyms in Fragmente unterschiedlicher Länge aufgetrennt. Im Gegensatz zur herkömmlichen Elektrophorese erlaubt ein

alternierend wechselndes Spannungsfeld die genauere Auftrennung von besonders großen Fragmenten. So entstehen Bandenmuster, welche miteinander verglichen werden können. Dies erfolgt üblicherweise nach den Kriterien von Tenover et al. (Tenover et al., 1995). Den Autoren zufolge werden zwei verschiedene Isolate dann als Teil eines gemeinsamen Ausbruchs interpretiert, wenn sich deren PFGE-Bandenmuster in weniger als sieben Banden unterscheiden (siehe Tabelle 2). Wichtig ist in diesem Zusammenhang das Wissen um die Beeinflussung der Bandenmuster durch genetische Mutationen. Vimont et al. zeigten, dass das Diskriminierungspotenzial der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) von *K. pneumoniae* Isolaten verglichen mit der Multi Locus Sequenzanalyse (MLST) höher ist und damit epidemiologisch unverwandte Isolate gut voneinander unterschieden werden können (Vimont, Mnif, Fevre, & Brisse, 2008).

Tabelle 2 / Kriterien zur Interpretation von PFGE-Analysen nach Tenover et al. (Tenover et al., 1995).

Kategorie	Anzahl der genetischen Unterschiede zum Indexisolat	Anzahl der Fragmentunterschiede	Epidemiologische Interpretation
„Nicht zu unterscheiden“	0	0	Isolat ist Teil des Ausbruchs
„Nah verwandt“	1	2-3	Isolat ist <u>wahrscheinlich</u> Teil des Ausbruchs.
„Möglicherweise verwandt“	2	4-6	Isolat ist <u>möglicherweise</u> Teil des Ausbruchs
„Nicht verwandt“	≥3	≥7	Isolat ist <u>nicht</u> Teil des Ausbruchs

3.4.2 Multi-Locus Sequenzanalyse (MLST)

Die Multi-Locus Sequenzanalyse beruht auf der Generierung von Allelprofilen für eine bestimmte Anzahl (meist 6-10) von speziesindividuellen und hoch konservierten Genen. Diese Genlokalisierungen werden amplifiziert und einer Gensequenzierung zugeführt, so dass Allelprofile zugeordnet werden können (Ahmed et al., 2006). Die vergleichende Analyse der Allelprofile erlaubt die Zuordnung bzw. Differenzierung von einzelnen Sequenztypen (STs) und deren Verwandtschaftsgrad zueinander.

3.4.3 MALDI-TOF

Die Massenspektrometrie stellt eine seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannte Technologie dar. Sie beruht darauf, dass geladene Moleküle, ihrer Größe und Ladung nach, innerhalb eines elektromagnetischen Feldes unterschiedlich lange Flugzeiten besitzen. Zunächst ausschließlich im Bereich der analytischen Chemie verwendet, zeigten Anhalt und Fenselau 1975 erstmals, dass die Analyse von Bakterien, deren Zellwand zuvor entfernt wurde, im Massenspektrometer speziespezifisch charakteristische Spektren erzeugt (Anhalt & Fenselau, 1975).

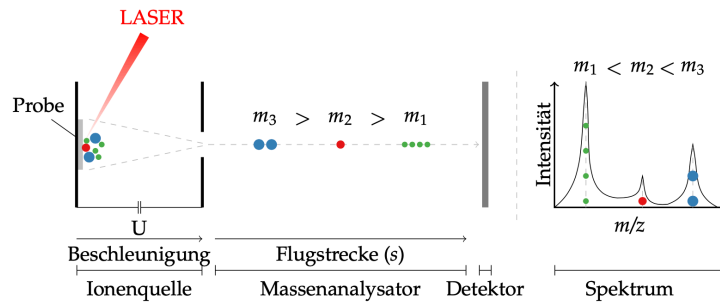


Abbildung 4 / Aufbau MALDI-TOF
Abbildung mit freundlicher Genehmigung von S. Gibb. Aus
(Gibb, 2015) nach (Gross, 2013).

MALDI-TOF, eine Weiterentwicklung der klassischen Massenspektrometrie, steht für "Matrix-assisted laser desorption and ionisation - time of flight analysis". Das MALDI-TOF besteht aus drei Bestandteilen: Ionenquelle, Linearbeschleuniger und Detektor (vgl. Abbildung 4). Die Mischung eines Bakteriums bzw. dessen extrahierter intrazellulärer Proteinmasse mit einer entsprechenden Matrix ist der entscheidende Schritt zur Generierung von Massenspektren. Das zu untersuchende Material „co-kristallisiert“ mit der aufgetragenen Matrix (HCCA = α -cyano-4-hydroxycimtsäure). Dies dient der Isolation und Verdünnung der einzelnen Proteine (Gross, 2013). Durch einen Laserstrahl wird eine große Energiemenge auf die Probe appliziert, und es kommt zur Auftrennung einzelner Proteinmoleküle und zum Übergang derer in die Gasphase. Mithilfe eines Linearbeschleunigers werden die ionisierten Moleküle ihrer Größe und Ladung nach aufgetrennt und erhalten eine unterschiedliche kinetische Energie. In einem feldfreien Vakuum „fliegen“ die Proteinfragmente dem Detektor entgegen. Dieser registriert die Zeit welche das Molekül benötigt, um die Vakuumröhre zu durchfliegen (Gross, 2013). Das Masse- / Ladungsverhältnis (m/z) ist proportional zu der Flugzeit des Moleküls. MALDI-TOF detektiert Proteine bzw. Proteinfragmente im m/z Bereich zwischen 2 und 20.000. Dabei setzt sich dieses Spektrum hauptsächlich aus ribosomalen Proteinen zusammen (Fenselau & Demirev, 2001; Ryzhov & Fenselau, 2001).

3.4.3.1 Die Anwendung von MALDI-TOF zur Identifikation und Typisierung von Bakterien

Mehrere Studien haben die Anwendbarkeit der MALDI-TOF Technologie, Bakterien auf Genus und Spezies Ebene identifizieren zu können, bereits ausreichend untersucht. Mellmann et al. zeigten, dass MALDI-TOF in 85,9% der untersuchten Isolate (n = 78) übereinstimmende Ergebnisse lieferte wie die

16sRNA Gensequenzierung (Mellmann et al., 2008). Seng et al. konnten 2009 nachweisen, dass 95% der untersuchten Bakterienisolate (n = 1660) durch MALDI-TOF bis auf Genus- und Speziesebene korrekt identifiziert worden sind (Seng et al., 2009). Außerdem berechneten sie, dass die Kosten für eine MALDI-Bestimmung von Bakterien nur ca. ein Fünftel der Kosten von „traditionellen“ Verfahren betragen. Der Erfolg der MALDI-TOF Technologie im Bereich der Erkennung und Identifizierung von Bakterien auf der Genus- und Speziesebene war daher enorm. Heute bildet diese Technologie eine zentrale Säule in der Routinediagnostik der meisten großen mikrobiologischen Labore. Natürlich stellte sich bald die Frage, ob dieses Verfahren auch für weitere Zwecke, zum Beispiel zur Typisierung von bakteriellen Isolaten unterhalb der Speziesebene verwendet werden kann. Hierunter versteht man die Zuordnung von bakteriellen Isolaten zu unterschiedlichen Typen, um die phänotypischen und genotypischen Ähnlichkeiten sowie deren epidemiologische Relevanz erkennen zu können. Zahlreiche Studien über die Anwendbarkeit der MALDI-TOF Technologie für die Typisierung von Mikroorganismen sind bereits durchgeführt worden. So zeigten Barbuddhe et al. bereits im Jahr 2008, dass die Differenzierung von Listerien unterhalb der Speziesebene möglich ist, und erbrachten den Nachweis einer korrekten Übereinstimmung (100%) mit den Analysen der Pulsfeldgelelektrophorese (Barbuddhe et al., 2008). Ähnliches gelang Fujinami et al. im Jahr 2011. Die Autoren waren in der Lage bei 21 von 23 *Legionella pneumophila* Isolaten eine Übereinstimmung zwischen MALDI-TOF und PFGE-Analyse festzustellen (Fujinami et al., 2011). Wolters et al. untersuchten das Typisierungsvermögen von MALDI-TOF anhand von 85 Methicillin-resistenten *S. aureus* Isolaten (MRSA) (Wolters et al., 2011). Es konnte in dieser Studie dargelegt werden, dass die Clusteranalyse der Massenspektren nahezu vollständig mit den Ergebnissen einer genotypischen Analyse (sog. spA-Typisierung) übereinstimmte.

4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Epidemiologie von *K. pneumoniae* Stämmen von Patienten einer herzchirurgischen Intensivstation innerhalb eines Zeitraumes von eineinhalb Jahren (März 2015 bis Oktober 2016) mittels MALDI-TOF. Es sollen die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Wie viele verschiedene Typen von *K. pneumoniae* können im Untersuchungszeitraum differenziert werden?
2. Besteht eine Korrelation zwischen bestimmten Gruppen von Spektren und ihren Resistenzmustern?
3. Gibt es Hinweise auf eine Ausbreitung bzw. Übertragung bestimmter *K. pneumoniae* Stämme innerhalb des Beobachtungszeitraums?
4. Wie stark unterscheiden sich die Typisierungsergebnisse der MALDI-TOF Analyse von jenen der Referenzmethode (Pulsfeldgelelektrophorese)?
5. Trägt eine Bereinigung der Merkmalstabelle, durch die Entfernung von besonders häufigen und seltenen Peaklokalisationen, zur Genauigkeit der MALDI-Analyse bei?

5 Material und Methoden

5.1 Ethikvotum

Zur vorliegenden Datenauswertung ist die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin an der Philipps-Universität Marburg befragt worden, ob eine Einverständniserklärung der Patienten notwendig ist. Dies wurde gemäß beiliegendem Schreiben (siehe Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) unter Beachtung der Anonymisierung von patientenbezogenen Daten verneint.

5.2 Herkunft der Proben

Alle Stämme (n = 56) entstammen Proben, die im Rahmen der Routinediagnostik an das mikrobiologische Labor der Universität Marburg gesendet wurden. Verwendet wurde ausschließlich mikrobiologisches Material von den beiden Intensivstationen für Kardiologie und Kardiochirurgie des Klinikums Bad

Neustadt. Die Proben wurden nach Abnahme bereits im Labor in Bad Neustadt auf Agarplatten angelegt und über Nacht bebrütet. Der Transport dieser Platten erfolgte am darauffolgenden Tag zur weiteren Bearbeitung in das Institut für Medizinische Mikrobiologie nach Marburg. Zeigte sich in der Analyse der Proben, dass es sich um gramnegative Stäbchen aus der Gruppe der Enterobakterien handelte, so wurden die entsprechenden Isolate im Gefrierschrank asserviert (Kryokonservierung) und für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Zur Kryokonservierung der bakteriellen Kulturen wurden diese in einem Kryokonservierungsmedium resuspendiert und nach Entfernung des Überstandes mit speziellen Glasperlen (Glasbeads) zusammengeführt. An diesen lagerten sich die Bakterien aufgrund der porösen Oberfläche an und konnten so bei minus 20 °C eingefroren werden.

5.3 Probenanzüchtung und Aufbereitung

Für die Reaktivierung der Bakterien wurde jeweils eine Glasperle der zu untersuchenden Kultur auf Columbia Agar Platten ausgerollt. In einem Brutschrank unter kontinuierlicher 5 %-iger CO₂ Begasung wurden die Agar-Platten bei 35 °C über 24 Stunden bebrütet. Gemäß Freiwald und Sauer erfolgte die Aufbereitung der Isolate nach dem „Ethanol-Ameisensäure“ Extraktionsverfahren welches auch von Seiten des Herstellers „Bruker Daltonics“ empfohlen wird, um eine bessere Auflösung der Massenspektren zu erreichen (Freiwald & Sauer, 2009). Dies beinhaltet im Wesentlichen drei Schritte:

1. Inaktivierung durch Ethanol-Wasser-Gemisch: Es erfolgt eine unspezifische Proteindenaturierung.
2. Zellwandzerstörung durch Ameisensäure
3. Proteinextraktion mithilfe von Acetonitril

In einem 1,5ml Eppendorfgefäß wurde zunächst mithilfe einer Impfschlinge eine solitäre Kolonie des zu untersuchenden Materials aufgenommen und in 300 µl zweifach destilliertem Wasser aufgelöst. Nach der Zugabe von 900 µl Ethanol abs. wurden die Eppendorfgefäße auf einer Mischungsstation gut durchmischt. Die anschließende Zentrifugation wurde bei ca. 15.000 g (relative Zentrifugalbeschleunigung) für 2 min durchgeführt. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das überbleibende Pellet bei 35 °C im Thermoschrank

getrocknet und in 50 μ l 70 %-iger Ameisensäure resuspendiert. Es wurden 50 μ l Acetonitril zugegeben und ein weiteres Mal gut durchmischt. Die abschließende Zentrifugation wurde erneut bei ca. 15.000 g für 2 min durchgeführt. Jeweils 1 μ l des Überstandes aus der Probenextraktion wurde auf acht Spots auf dem MALDI-Target verteilt. Sobald die Flüssigkeitstropfen eingetrocknet waren, wurde die Matrix aufgetragen. Nach einer weiteren Trocknungsphase waren die Targets fertig für die Analyse im Massenspektrometer. Durch die Vervielfältigung der Isolate auf acht Targetspots sowie deren dreimalige Messung, ergab sich eine Varianz der gemessenen Spektren, welche die technischen Messungenauigkeiten abbildete. Es resultierten dadurch pro Isolat 24 Messungen.

5.4 Geräte und Reagenzien

Tabelle 3 / Geräte

Eppendorf-Cup 1,5ml	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Target	MicroScout Target Bruker Corporation Billerica, MA 01821, USA
Zentrifuge	Mikro 220 Andreas Hettich GmbH Tuttlingen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
MALDI-TOF	Microflex WSTBMFD44 Bruker Corporation Billerica, MA 01821, USA
Agar-Platten Columbia 5% SB	Best.-Nr. 254005 Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland
Impfeschlingen, 10µl	Best.-Nr. 86.1562.010 Sarstedt AG & Co. Nürnbrecht, Deutschland
Minishaker MS1	Nr. 34 539 00 IKA-WERKE GMBH & CO.KG Staufen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Langzeitkryokonservierung Microbank 2D	Nr. PL170C Pro-Lab Diagnostics Richmond Hill, Canada
Begasungsbrutschrank BB16	Heraeus Instruments

Tabelle 4 / Reagenzien

Ameisensäure	Best.-Nr.: 94318 Honeywell Fluka Morris Plains, NJ, USA
Acetonitril	Produktnr.: 271004 Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Deionisiertes Wasser	Best.-Nr.: 39253 Honeywell Fluka Morris Plains, NJ, USA
Ethanol, abs.	Produktnr.: 32205-AL Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
MALDI-Matrix	Produktnr.: 8255344 Bruker Corporation Billerica, MA 01821, USA

Tabelle 5 / Software

Windows XP (MALDI-TOF Steuerung)	Microsoft Redmond, USA
MALDI-TOF Steuerung „flexControl“	Vers. 3.3.108.0 Bruker Corporation Billerica, MA 01821, USA
MALDIquant für R	Version 1.19.3 Open-Source „ https://strimmerlab.github.io/ software/malDIquant/index.html “
MALDIquantforeign für R	Version 0.12 Open-Source „ https://strimmerlab.github.io/ software/malDIquant/index.html “
Excel	Microsoft Redmond, USA
R	Version 3.6.2 Open-Source R Core Team, 2014
ComparingPartitions „Vergleich von Clusteranalysen“	comparingpartitions.info Open-Source (Carriço et al., 2006)

5.5 MALDI Messung

Für alle Messungen kam ein Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics zur Anwendung, welches im Labor der Medizinischen Mikrobiologie der Universität Marburg zur Verfügung stand. Die Bedienung des MALDI-TOF Gerätes erfolgte an einem Computer mit dem installierten Betriebssystem „Windows XP“ und der Bedienungsfläche „FlexControl“. MALDI arbeitete bei allen Analysen im „Linear-TOF“ Modus und detektierte Massen innerhalb eines Bereichs von m/z 2.000 - 20.000. Das Spektrum eines einzelnen Spots stellte dabei das Durchschnittsspektrum aus insgesamt 180 Messungen dar. Dabei wurden innerhalb eines jeden Spots an drei verschiedenen Stellen 60 Laserschüsse auf das Target abgegeben. Zur Überprüfung von konstanten

Geräteparametern zwischen den einzelnen Messreihen war im Vorfeld jeweils ein Standardkeim gemessen worden (*E. coli* ATCC Nr. 25922).

5.6 Verschlüsselung von Patientendaten

Die Massenspektrometriedaten sind vor der weiteren post-analytischen Aufbereitung verschlüsselt worden. Dafür wurden mit dem Online Tool „random.org“ zufällige Identifikationsnummern (ID) zwischen 0 und 1000 erstellt. Diese sind anstelle der Systemnummer des Labors nach einem bestimmten Schlüssel zugeordnet worden. Diese Zuordnung war durch eine passwortgeschützte Excel-Datei lediglich dem Autor dieser Arbeit bekannt. Der numerischen ID wurde eine zuvor in der gleichen Art und Weise verschlüsselte, zweistellige alphabetische Kennung beigefügt. Für jeden Patienten war innerhalb dieses Sets nur eine alphabetische Kennung vorhanden.

5.7 Datenverarbeitung

Zur Aufbereitung der Daten wurde „MALDIquant“ verwendet, eine frei verfügbare Software, die für die Statistik-Umgebung „R“ entwickelt wurde. Damit ließen sich komplexe und wiederkehrende Arbeitsabläufe bei der Verarbeitung von Massenspektrometriedaten gut abbilden. Das eigens hierfür angefertigte R-Skript ist dem Punkt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zu entnehmen. Die erhobenen Messungen konnten mithilfe von „MALDIquantforeign“ in „R“ importiert werden. Zunächst ist der Bereich $m/z > 10.000$ entfernt worden. Es folgte die Angleichung der Nulllinien („Baseline-Correction“) durch den SNIP Algorithmus (Statistics Sensitive Non-iterative Peak-clipping) (Ryan, Clayton, Griffin, Sie, & Cousens, 1988). Nachfolgend wurde über den Savitzky-Golay Algorithmus (Savitzky & Golay, 1964) eine Glättung („smoothing“) sämtlicher Spektren vorgenommen. Dabei erkannte der Algorithmus fehlende Messpunkte eines Spektrums und fügte entsprechend errechnete „künstliche Punkte“ hinzu (siehe Abbildung 5). Das näherungsweise Ausgleichen einer möglichen Phasenverschiebung, welche durch kaum beeinflussbare Faktoren wie kleinste Temperaturveränderungen, pH-Wert-Verschiebungen und schwankende Geräteparameter zustande kommt, erfolgte über die Alignment-Funktion.

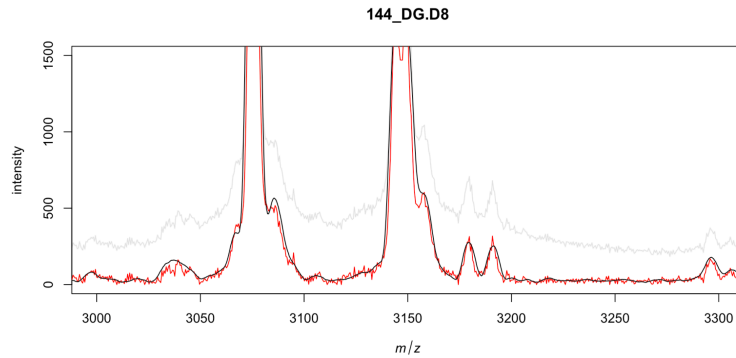


Abbildung 5 / Darstellung der Messung D8 des Isolats 144_DG

Die graue Linie entspricht den Rohdaten. Die rote Linie ergab sich nach der Korrektur der Grundlinie, schwarz nach Durchführung der „Smoothing“-Funktion.

Zur Berücksichtigung technischer Messungenauigkeiten wurden zu jedem Isolat 24 Messungen durchgeführt. Diese konnten mithilfe der „averageMassSpectra“ Funktion zu einem einzigen Massenspektrum zusammengefasst werden (siehe Abbildung 6).

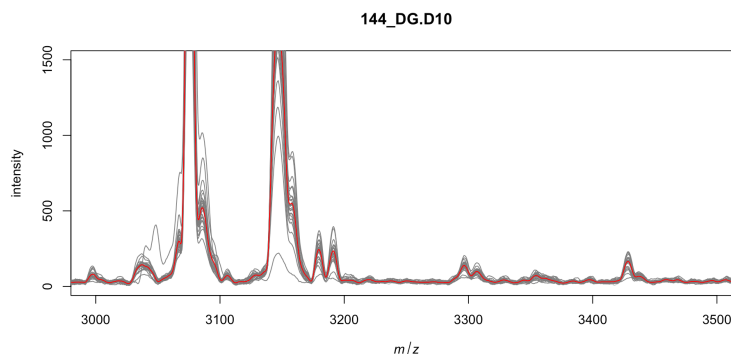


Abbildung 6 / Visualisierung der „averageMassSpectra“-Funktion.

Nach Durchführung der „averageMassSpectra“-Funktion resultierte die rote Linie als Durchschnittsberechnung aller 24 Einzelmessungen.

5.8 Softwareassistierte Analyse der Spektren

Die automatische Erfassung von Peaks innerhalb eines Spektrums wurde durch den Peakerfassungs-Algorithmus des Pakets „MALDIquant“ für die Statistikumgebung „R“ durchgeführt. Ein virtuelles Fenster glitt dazu über die Spektren und verglich die innerhalb einer festgelegten Fensterbreite („halfWindowSize“) vorkommenden Maxima mit dem Hintergrundrauschen. Zur Kalkulation des Hintergrundrauschens kam Friedman's SuperSmoother zur Anwendung (Friedman, 1984). Der Vergleich eines lokalen Maximums mit dem Hintergrundrauschen resultierte in einer „Signal-to-Noise Ratio“. Überschreitet ein

lokales Maximum diesen vorher festgelegten Wert, so wurde das Signal an dieser Stelle als Peak bewertet (Gibb, 2015).

Aufgrund von Messungenauigkeiten zwischen verschiedenen Messungen war eine Uneinheitlichkeit der Peaklokalisationen nicht auszuschließen. Diesbezüglich kam ein Verfahren zum Einsatz, welches als „PeakBinning“ bezeichnet wird. Peaklokalisationen, die nahe beieinander lagen und sehr wahrscheinlich gleiche Proteine oder Proteinfragmente repräsentierten, wurden trotz der Tatsache, dass ihre m/z -Werte nicht exakt identisch waren, einander zugeordnet. Dabei wurden in der Nähe einer bestimmten Peaklokalisation, entsprechend einem festgelegten Toleranzwert, die zugehörigen Peaks mit dem gleichen m/z -Wert versehen. Der Toleranzwert für diese Funktion ist im Vorfeld genau untersucht worden. War dieser Wert zu hoch, wurden teils weit entfernte Peaks zueinander gruppiert (siehe Abbildung 9).

Die Clusteranalysen wurden sowohl auf der Basis von allen erfassten Peaklokalisationen als auch nach Entfernung besonders häufiger und seltener Peaks (Purging) durchgeführt. Die Peaklokalisationen, welche durch dieses Verfahren entfernt wurden, können der Abbildung 7 und Abbildung 8 entnommen werden.

[1] 2034 2048.8 2054.7 2068.5 2070.1 2074.1 2092.2 2095.4 2095.9 2098.5 2100.5 2107.2 2108.2 2114.2 2127.7 2133.2 2140.5 2164.4 2164.9 2167.3 2168.4 2174.2 2187.8
 [24] 2202.4 2204.4 2218.1 2241.8 2247.3 2257.5 2266.2 2267.1 2268.4 2284.7 2294.6 2297.2 2303 2309.9 2352.6 2359.6 2416.3 2426.7 2455.1 2481.9 2494.5 2509 2511.8
 [47] 2516.6 2529.9 2530.9 2555 2578.5 2588.7 2595.6 2613.7 2625 2626.6 2628.8 2698.4 2770 2775.3 2788.9 2817.1 2829 2873.6 2877.4 2886.5 2920.8 2964.5 3033.3
 [70] 3037.2 3044 3045.4 3059.2 3086.9 3103.6 3106.8 3118.2 3135.6 3283 3294.9 3364.5 3367.5 3439.1 3544.9 3556.4 3694.2 3699 3713.2 3714.4 3723.2 3744.6 3833.6
 [93] 3838.2 3840.5 3849.7 3868.9 3881.7 3885.4 3922.9 3937.8 3952.5 3995.9 4041.4 4109.1 4118.9 4175.7 4204.7 4227.5 4253.1 4309.1 4354 4387.6 4398.7 4448.1 4547.3
 [116] 4580.8 4609.1 4651 4657.8 4661.8 4730.7 4897.2 4916.5 4919.1 4954.8 5032.5 5110.6 5134.6 5141 5178.6 5191.4 5195.4 5208.3 5253.2 5407.1 5412.4 5443.1 5916.9
 [139] 5954.7 6026.9 6173.6 6176.1 6199.5 6210.5 6213.4 6237.9 6316.3 6329.9 6349.5 6791 6803.4 6931.5 6953.5 6974.1 6994.4 7061 7118.1 7176.2 7272 7415.1 7446.6
 [162] 7460.5 7621.7 7632.2 7661.1 7666 7677.5 7691.5 7699.8 7723 7730.7 7766.5 7768.1 7770.9 7785.1 7814.6 7848 8001.8 8088.9 8120.3 8175.3 8202.3 8233.7 8343.8
 [185] 8356 8455.2 8894.6 9216.2 9228.4 9300 9321.6 9498.6 9561 9572.5 9606.2 9696.2 9762.3 9793.1 9858.3 9868 9889.2 9895.1 9901.7 9906.6 9921.6 9927.2 9933.9
 [208] 9942.5 9947.9 9952.5 9956.7 9960.5 9963.8 9973.4 9977.4 9981.6 9987.1 9989.5 9993 9998.7

Abbildung 7 / Bereinigung der Merkmalstabelle (1)
 Liste der Peaklokalisationen (m/z), die in weniger als 10% der gemessenen Isolate detektiert wurden. Insgesamt wurden in diesem Schritt 220 von 417 Peaks entfernt.

[1] 2034.9 2047.9 2066.9 2082.7 2166.2 2180.4 2243.1 2265.2 2587.2 2638.5 2689.4 2701.2 2856.5 2900.9 2910.6 3075.5 3085.5 3146.3 3179.4 3580.1 3622.7 3662.4 3711.5
 [24] 3852.8 3871 4155.2 4165.4 4185.4 4198.7 4351.8 4365.9 4439 4450.6 4497.4 4570.1 4646.6 4740 4751.8 4771.3 4781.9 5040.5 5143.9 5281.1 5340.6 5367.4 5382.4
 [47] 5397.5 5824 6081.8 6097.2 6138.1 6153.5 6276.7 6291 6301.2 6385.2 7145.2 7160.5 7230.2 7245.6 7385.8 7430.3 7706.1 7727.2 7743.2 8267.4 8294.1 8310.2 8371
 [70] 8396.8 8877.1 8899.5 8994 9139.3 9291.4 9435.3 9478.6 9541.1

Abbildung 8 / Bereinigung der Merkmalstabelle (2)
 Liste der Peaklokalisationen (m/z), die in mehr als 60% der Isolate detektiert wurden. So erfolgte die Entfernung von weiteren 78 Peaklokalisationen aus der Merkmalstabelle.

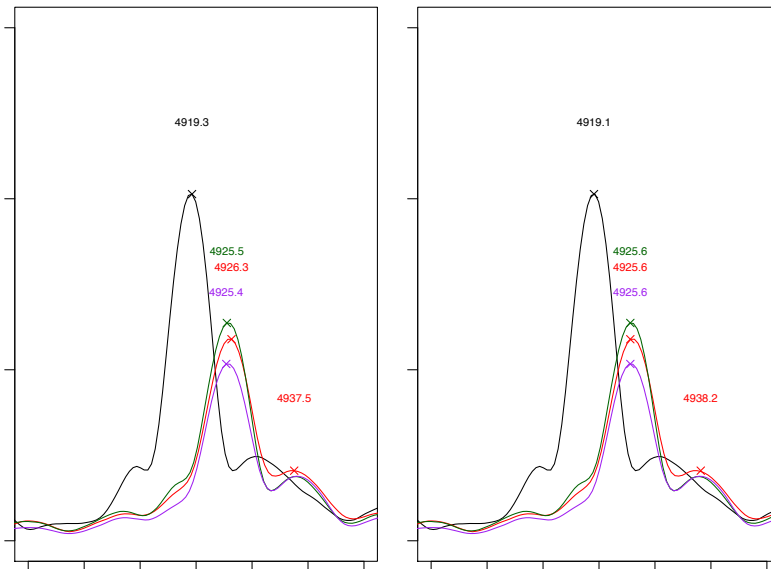


Abbildung 9 / „binPeaks“ Funktion
 Bei der Festlegung von zu engen Toleranzwerten wurden nahe zusammenliegende „Peaks“ nicht einander zugeordnet (linke Seite, 5 unterschiedliche Peaks). Durch die Anwendung der „binPeaks“ Funktion wurden diese Peaklokalisationen einem einzigen m/z Wert zugeordnet. Dadurch resultierten drei anstatt fünf unterschiedliche Peaklokalisationen (rechte Seite). Die Abbildungen zeigen die Isolate 505-CX (schwarz), 808-NG (rot), 603-DI (grün) und 654-AZ (violett).

Die entstandene Merkmalstabelle konnte nun durch R-eigene Clusterverfahren analysiert werden. Zuvor erfolgte die Transformation der Werte, unter Berücksichtigung der Peakintensitäten gemäß Tabelle 6, in ein halb-binäres Punktesystem.

Tabelle 6 / Transformationsschlüssel
entsprechend der Peakintensitäten.

Peakintensität	Punkte
≥ 500	1
≥ 200	0,5
< 200	0

	2023.6	2049.7	2055.9	2090.6	2093.6	2094.5	2104.2	2105.7	2136.8	2172.9	2188.8	2205.6	2258.7
944-RW	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0
637-ZT	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0
89-UH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
444-UH	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0
527-ME	0	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0.5	0	0	0	0
144-DG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
917-BP	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0
758-ZT	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0	0	0	0
703-VJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
640-KL	0	0.5	0	1	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0
264-DE	0	0.5	0	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5
741-UY	0	0.5	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
690-DG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18-DE	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbildung 10 / Merkmalstabelle

	1-IU	129-GU	134-GI	144-DG	15-JQ	18-DE	185-JC	239-ER	258-CX	264-DE	280-ER	315-AZ	361-DI
1-IU	0,0	4,6	5,1	3,6	5,0	4,1	3,4	4,9	4,7	3,3	2,5	4,3	3,1
129-GU	4,6	0,0	4,3	4,1	2,7	2,1	5,4	7,0	7,2	4,2	5,0	3,9	5,2
134-GI	5,1	4,3	0,0	4,5	4,0	4,6	5,1	6,1	6,4	5,3	5,6	4,4	5,4
144-DG	3,6	4,1	4,5	0,0	4,6	3,5	3,8	5,9	5,4	3,7	3,7	3,8	3,7
15-JQ	5,0	2,7	4,0	4,6	0,0	3,4	5,7	7,2	7,3	4,8	5,5	4,1	5,6
18-DE	4,1	2,1	4,6	3,5	3,4	0,0	5,1	6,9	7,0	3,5	4,4	4,1	4,7
185-JC	3,4	5,4	5,1	3,8	5,7	5,1	0,0	5,0	4,5	4,2	3,6	3,7	2,2
239-ER	4,9	7,0	6,1	5,9	7,2	6,9	5,0	0,0	3,0	5,5	4,6	6,0	5,4
258-CX	4,7	7,2	6,4	5,4	7,3	7,0	4,5	3,0	0,0	5,7	4,2	5,9	4,9
264-DE	3,3	4,2	5,3	3,7	4,8	3,5	4,2	5,5	5,7	0,0	3,5	4,6	4,1
280-ER	2,5	5,0	5,6	3,7	5,5	4,4	3,6	4,6	4,2	3,5	0,0	4,8	3,3
315-AZ	4,3	3,9	4,4	3,8	4,1	4,1	3,7	6,0	5,9	4,6	4,8	0,0	3,8
361-DI	3,1	5,2	5,4	3,7	5,6	4,7	2,2	5,4	4,9	4,1	3,3	3,8	0,0

Abbildung 11 / Distanzmatrix

Der Ausschnitt zeigt die euklidische Entfernung verschiedener Isolate in einem mehrdimensionalen Raum.

Vor der Durchführung einer Clusteranalyse wurde mithilfe der Distanzfunktion von „R“ eine Distanzmatrix errechnet. Die hierbei verwendete euklidische Distanz beschreibt die Entfernung der Isolate zueinander in einem mehrdimensionalen Raum. Hierfür definiert jede Peaklokalisierung eine Achse. Zur Berechnung des Abstandes (d) von zwei Punkten (p , q) in einem mehrdimensionalen Raum gilt (Johnson & Tarazaga, 1995; Schoenberg, 1938):

$$d_{(p,q)} = \sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2 + \dots + (p_i - q_i)^2 + (p_n - q_n)^2}$$

Auf der Basis dieser Formel erfolgte die Berechnung der Abstände der einzelnen Isolate zueinander (siehe Abbildung 11), auf deren Grundlage die Clusteranalyse

durchgeführt wurde. Damit stellte die euklidische Distanz in der vorliegenden Anwendung ein Maß für die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit der einzelnen Massenspektren dar. Dies basierte auf den in Tabelle 6 festgelegten Bewertungskriterien für das Vorliegen bzw. die Abwesenheit eines Peaks an einem bestimmten m/z Wert.

In Anlehnung an Ueda et al. wurde für die Clusteranalyse der „ward.d“-Algorithmus verwendet, welcher als Teil der hierarchischen Clustermethoden, ausgehend von nahe beieinander liegenden Isolaten, Schritt für Schritt Gruppen und Cluster formt (Ueda et al., 2015; Ward, 1963).

Tabelle 7 / MALDIquant Workflow Parameter.

baselineCorrection	Method = „SNIP“ iterations = 25
Smoothing	Method = „SavitzkyGolay“ halfWindowSize = 10
Alignment	halfWindowSize = 2 tolerance = 0.002 warpingMethod = lowess
PeakDetection	Signal-to-Noise Ratio = 1.1 Method = “SuperSmoother” halfWindowSize = 2
PeakBinning	tolerance = 0.0004 Method = “strict”
“Purging” = Bereinigung der Merkmalstabelle	Peaklokalisationen mit Vorkommen von >60 % und < 10 %
featureTable	presence / intermediate / absence (1 / 0.5 / 0)
DistanceMethod	“euclidean”
ClusterMethod	“ward.D”

5.9 PFGE-Analysen

Die PFGE-Analysen wurden durch das Nationale Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger (Abteilung für medizinische Mikrobiologie, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die verwendeten Analyseparameter sind im Folgenden tabellarisch dargelegt.

Tabelle 8 / PFGE Parameter

Nach Angaben des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger.

Protokoll	mod. nach Ribot et al.; Foodborne Pathog Dis 2006; 3:59-67
Restriktionsenzym	Xbal
Laufpuffer	TBE + 7,5 mg/l Thiourea
initial switch time	5 s
final switch time	50 s
run time	20 h
voltage	6 V/cm
temperature	14 °C

Nach der Applikation der zu untersuchenden Bakterienisolate auf eine Agarosegelplatte wurde durch Hinzufügen der Restriktionsendonuklease „Xbal“, die DNA in unterschiedlich lange Fragmente entsprechend der Lokalisation der Schnittstellen, geteilt. Das Anlegen von drei elektrischen Feldern sowie deren pulsatile Aktivität in drei verschiedenen Winkelkonstellationen gewährleistete die präzise Auftrennung der großen DNA-Sequenzen. Die vergleichende Analyse erfolgte anhand der allgemein anerkannten Kriterien (siehe Tabelle 2) von Tenover et al. (Tenover et al., 1995).

5.10 Vergleichende Analyse von Typisierungsmethoden

Carriço et al. publizierten im Jahr 2006 ein bioinformatisches Modell, um quantitative Aussagen über die Qualität einer bestimmten Typisierungsmethode im Vergleich zu einer anderen Methode tätigen zu können. Die entsprechenden Kenngrößen sind nachfolgend aufgeführt und erläutert (siehe Tabelle 9). Auch im Rahmen dieser Untersuchung sollten Ergebnisse der MALDI-Clusteranalyse den Typisierungsergebnissen der Pulsfeldgelelektrophorese gegenübergestellt und eine Übereinstimmung quantifiziert werden. Für die Berechnung wurde das ebenfalls in der Publikation von Carriço et al. vorgestellte Online Tool „comparingpartitions.com“ verwendet (Carriço et al., 2006).

Tabelle 9 / Kenngrößen zur vergleichenden Analyse von Typisierungsergebnissen.

Simpsons Index (D)	Kennzahl zur Diversität der Items innerhalb einer Clusteranalyse. (Hunter & Gaston, 1988) <i>D</i> = 1: Methode unterscheidet zwischen allen Items. <i>D</i> = 0: Methode kann <u>nicht</u> zwischen den Items unterscheiden.
„Adjusted Rand“ Koeffizient (ARI)	Indikator über die Kongruenz von zwei Clusterresultaten. (Rand, 1971) ARI = 1: absolute Übereinstimmung ARI = 0: keine Übereinstimmung
„Wallace“ Koeffizient (W)	Beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Paar von Items, welche in der Clusteranalyse P in demselben Cluster sind, auch in der zu vergleichenden Analyse P' in ein Cluster zusammengefasst werden. Hohe Werte nahe bei „1“ deuten an, dass anhand der Ergebnisse einer Clusteranalyse die Clusterzuordnungen einer anderen Methode „vorhergesagt“ werden können. (Wallace, 1983)
„Adjusted Wallace“ Koeffizient (AW)	Um den Zufallsfaktor korrigierter Wallace-Koeffizient. Es entfällt die Möglichkeit aus dem Wert die Vorhersagewahrscheinlichkeit abzulesen. (Severiano, Pinto, Ramirez, & Carriço, 2011)

6 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der epidemiologischen Analyse von *K. pneumoniae* Isolaten anhand von MALDI-TOF Massenspektrometriedaten über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren. Die untersuchten Isolate stammten von Atemwegsproben von Patienten auf einer kardiologischen Intensivstation. Es sollten die folgenden Fragestellungen erörtert werden:

1. Wie viele verschiedene Typen von *K. pneumoniae* konnten im Untersuchungszeitraum differenziert werden?
2. Bestand eine Korrelation zwischen bestimmten Gruppen von Spektren und ihren Resistenzmustern?
3. Gab es Hinweise auf eine Ausbreitung bzw. Übertragung bestimmter *K. pneumoniae* Stämme innerhalb des Beobachtungszeitraums?

4. Wie stark unterschieden sich die Typisierungsergebnisse durch MALDI-TOF von jenen der Referenzmethode (Pulsfeldgelelektrophorese)?
5. Trug eine Bereinigung der Merkmalstabelle durch die Entfernung von besonders häufigen und besonders seltenen Peaklokalisationen zur Genauigkeit der MALDI-Analyse bei?

6.1 MALDI-TOF Clusteranalyse

Nach Durchführung der MALDI-TOF Clusteranalyse ließen sich bei einer euklidischen Distanz von 5 insgesamt 12 Cluster voneinander abgrenzen. Der Wert der euklidischen Distanz entsprach dem Bewertungsmaßstab welcher im Rahmen der manuellen und vergleichenden Analyse zu Beginn dieser Arbeit festgelegt wurde und der Tabelle 6 entnommen werden kann. Die euklidische Distanz beschreibt die durchschnittliche Ähnlichkeit bzw. die Unterschiedlichkeit der hier untersuchten Isolate unter Berücksichtigung des zugrundeliegenden Bewertungsmaßstabes (siehe Tabelle 6). Das bedeutet, dass Isolate, die sich in weniger als 5 Punkten voneinander unterschieden zu einem Cluster zusammengefasst wurden. Das gesamte Resultat der Clusteranalyse ist, in Form eines Dendrogramms, der Abbildung 12 zu entnehmen.

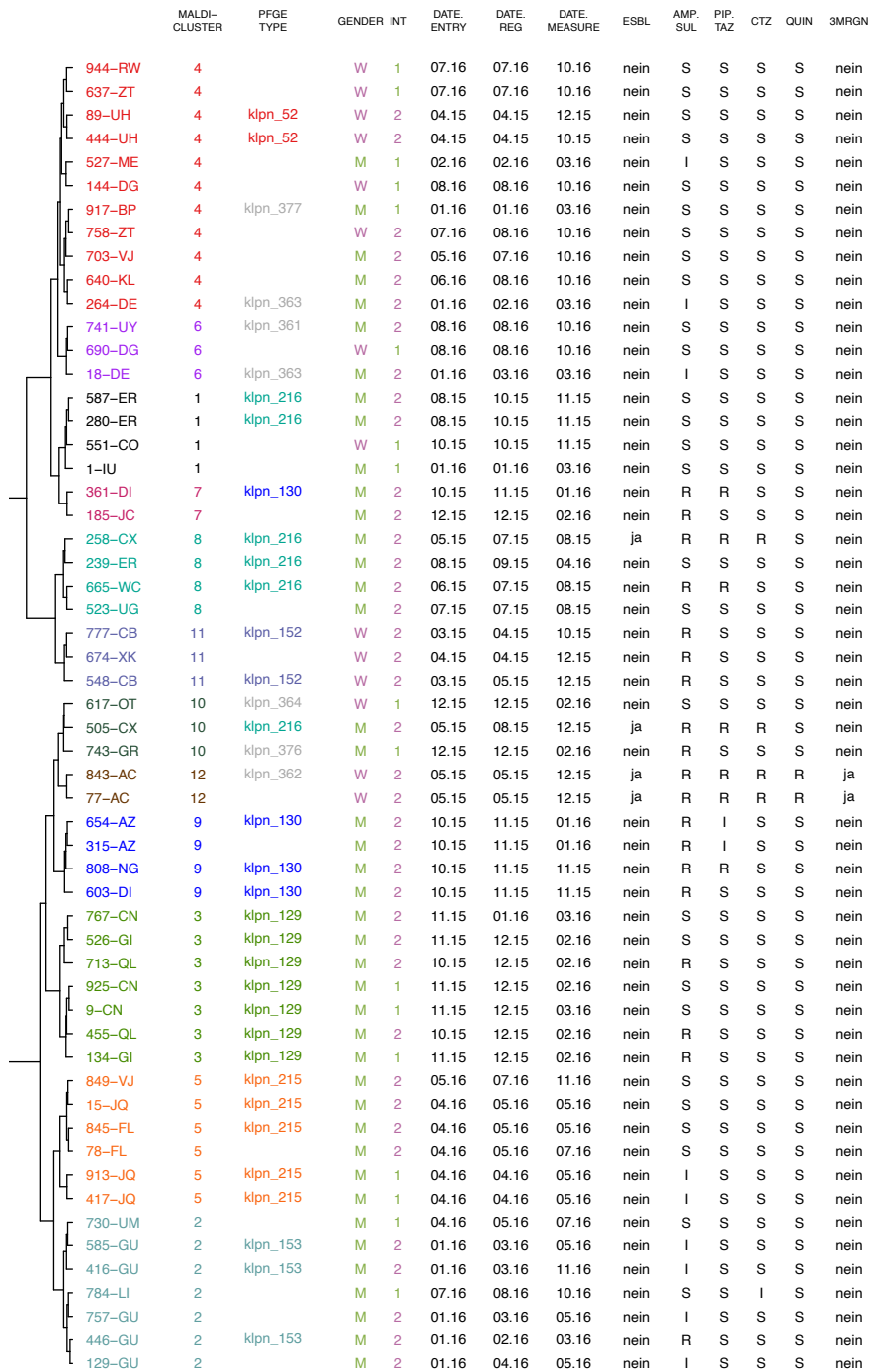


Abbildung 12 / Dendrogramm nach Durchführung der Clusteranalyse.

MALDI-Daten wurden um besonders häufige und seltene Peaklokalisationen bereinigt. Clusteralgorithmus: „ward.D“. Distanzmaß: „euklidian“. DATE.ENTRY: Aufnahmedatum; DATE.REG: Isolat-Erfassungsdatum im Institut für med. Mikrobiologie der Universität Marburg; DATE.MEASURE: Datum der MALDI-Messung für das entsprechende Isolat; ESBL: Vorhandensein einer Breitspektrum β -Laktamase; AMP.SUL: Resistenzverhalten gegenüber Ampicillin/Sulbactam; PIP.TAZ: Piperacillin/Tazobactam; CTZ: Ceftazidim;

QUIN: Chinolone; 3MRGN: Klassifikation als multiresistenter Keim.

6.2 Vergleichende Analyse der Typisierungen durch MALDI-TOF und PFGE

Insgesamt zeigte sich bei der vergleichenden Betrachtung zwischen der Typisierung durch PFGE und MALDI-TOF eine gute Übereinstimmung. Um dies zu objektivieren, wurde der Adjusted Rand Index (**ARI** = 0,761, siehe Kapitel 5.10) bestimmt. Dieser Wert gibt an, wie gut zwei unterschiedliche Typisierungsmethoden hinsichtlich ihrer Typenzuordnung übereinstimmen. Zusätzlich wurden, gemäß Severiano et al. weitere wichtige Kennzahlen berechnet: der Wallace-Koeffizient und den um den Zufallsfaktor korrigierten Wallace-Koeffizienten (**W**, **AW**) (Severiano et al., 2011). Diese beiden Werte ermitteln die Wahrscheinlichkeit, mit welcher ein Item aus einer bestimmten Typisierungsmethode, auch innerhalb der Referenzmethode, in die gleiche Gruppe eingruppiert wird. Es ergab sich keine signifikante Abweichung beider Werte (**AW** = 0,809; **W** = 0,827), sodass eine rein zufällige Übereinstimmung beider Clusteranalysen als unwahrscheinlich angesehen werden durfte. Demzufolge konnte darauf geschlossen werden, dass innerhalb dieses Datensatzes eine „Vorhersage“ von PFGE-Typen auf Grundlage von MALDI-Clustern mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 83% getroffen werden konnte. Die Prognose von MALDI-Clustern aus einer PFGE-Analyse ging indessen mit einer höheren Unsicherheit einher (**AW** = 0,718; **W** = 0,741), was einer Wahrscheinlichkeit von ca. 74% entsprach. Diese Zahlen basierten auf der MALDI-Clusteranalyse, bei welcher eine Entfernung von besonders häufigen wie auch besonders seltenen Peaklokalisationen vorgenommen wurde (sog. Purgung). Demgegenüber stand (vgl. Abbildung 13, Tabelle 10) eine deutlich geringere Kongruenz der beiden Verfahren, wenn kein Purgung erfolgte (**ARI** = 0,570).

Übereinstimmend mit der Literatur, konnte festgestellt werden, dass die derartige Veränderung der Merkmalstabelle zu Clusterergebnissen führte welche mit den Typisierungsergebnissen der Referenzmethode (PFGE) deutlich besser übereinstimmten. Dadurch konnte eine differenziertere Clusterzuordnung vorgenommen werden. Verdeutlicht wird dies ebenfalls in der Abbildung 14,

welche zeigt, dass durch das Purging eine höhere Trennschärfe zwischen den Clustern erreicht werden konnte.

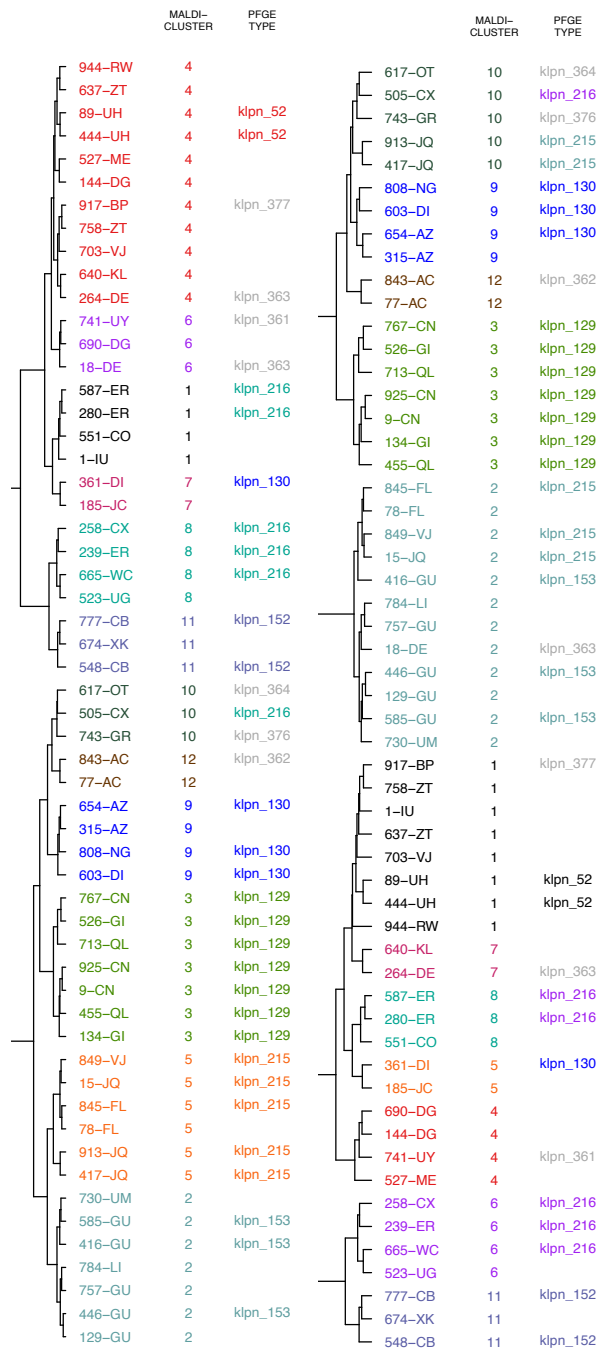


Abbildung 13 / Gegenüberstellung der beiden Clusteranalysen und Korrelation mit der PFGE-Analyse. Auf der linken Seite erfolgte vor der Clusteranalyse eine Modifikation der Peaklokalisationen. Peaks, welche mit einer Häufigkeit von kleiner als 10% sowie größer als 60% auftraten, wurden von der Clusteranalyse ausgeschlossen (siehe Absatz 5.8)

Tabelle 10 / Errechnete Kenngrößen (siehe Tabelle 9)
zur vergleichenden Analyse von verschiedenen
Typisierungsmethoden.

Stichprobe von 36 Isolaten. Gemäß (Hunter & Gaston, 1988) und (Severiano et al., 2011) durch comparingpartitions.info.

	mit Purging		ohne Purging	
D MALDI	0,917		0,900	
D PFGE	0,908		0,908	
ARI MALDI / PFGE	0,761		0,570	
W / AW MALDI → PFGE	0,827 (0,764 – 0,890)	0,809 (0,740 - 0,879)	0,587 (0,484 - 0,690)	0,545 (0,432 - 0,659)
W / AW PFGE → MALDI	0,741 (0,643 - 0,840)	0,718 (0,610 - 0,826)	0,638 (0,522 - 0,754)	0,598 (0,469 – 0,726)

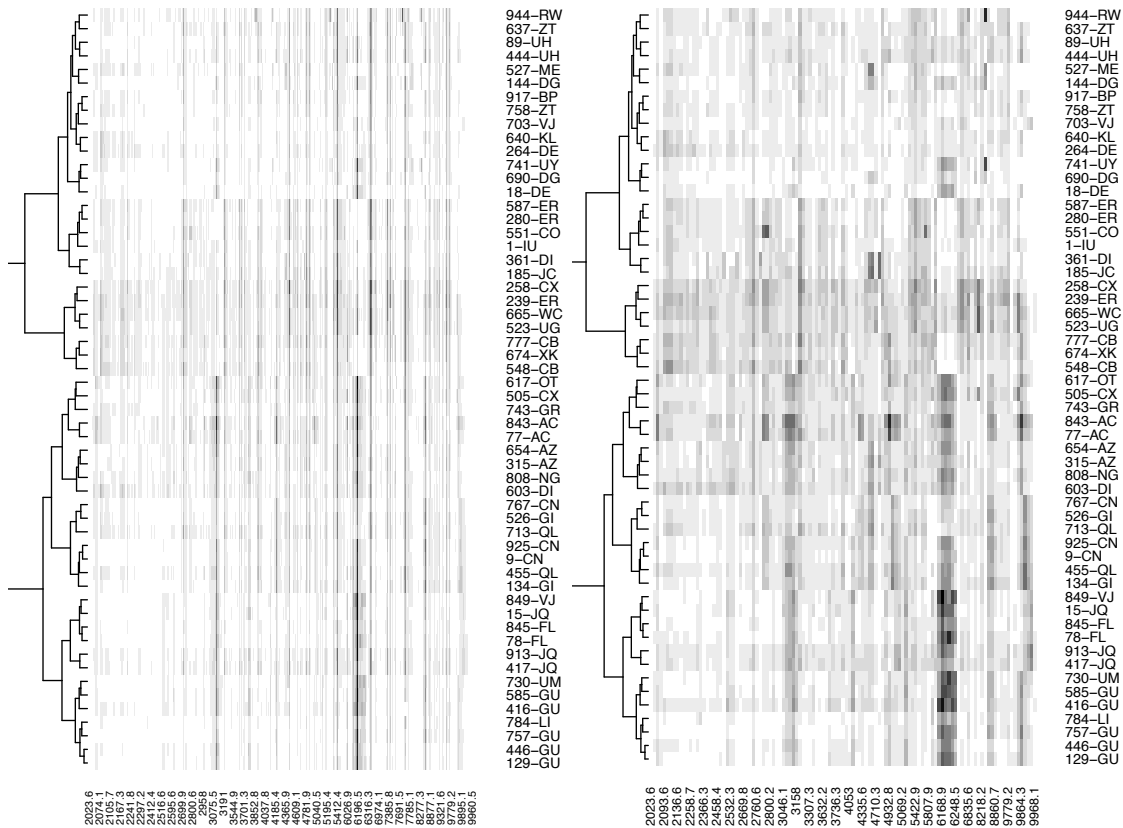


Abbildung 14 / Visualisierung der MALDI-Daten in Form
eines Bandenmusters („Gel View“)
Intensitäten wurden durch Wurzelziehung normalisiert.
Links: Dargestellte Daten ohne Bereinigung (>400
Peaklokalisationen); rechts: Nach Entfernung der
häufigsten und seltensten Peaks (119 Peaks).

6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es ließen sich folgende Kernaussagen treffen:

1. Mittels MALDI-TOF Analyse ließen sich *Klebsiella pneumoniae* Isolate typisieren und „clustern“.
2. Die MALDI-Cluster stimmten mit den Typisierungsergebnissen der Referenzmethode (PFGE) gut, aber nicht vollständig, überein.
3. Eine gute Übereinstimmung ließ sich vor allem dann erzielen, wenn eine Entfernung von besonders häufigen und besonders seltenen Peaklokalisationen vorgenommen wurde.

Nachfolgend soll auf die Cluster einzeln eingegangen werden. Hierbei wurde insbesondere auf die Fragen nach einer möglichen Korrelation zwischen MALDI-Cluster und bestimmten Resistenztypen sowie etwaiger Übertragungsereignisse eingegangen.

6.4 Beschreibung und Charakterisierung der MALDI-Cluster

6.4.1 MALDI-Cluster 3

	MALDI-CLUSTER	PFGE TYPE	GENDER	INT	DATE. ENTRY	DATE. REG	DATE. MEASURE	ESBL	AMP. SUL	PIP. TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
767-CN	3	klpn_129	M	2	11.15	01.16	03.16	nein	S	S	S	S	nein
526-GI	3	klpn_129	M	2	11.15	12.15	02.16	nein	S	S	S	S	nein
713-QL	3	klpn_129	M	2	10.15	12.15	02.16	nein	R	S	S	S	nein
925-CN	3	klpn_129	M	1	11.15	12.15	02.16	nein	S	S	S	S	nein
9-CN	3	klpn_129	M	1	11.15	12.15	03.16	nein	S	S	S	S	nein
455-QL	3	klpn_129	M	2	10.15	12.15	02.16	nein	R	S	S	S	nein
134-GI	3	klpn_129	M	1	11.15	12.15	02.16	nein	R	S	S	S	nein

Abbildung 15 / MALDI Cluster 3

Das Cluster 3 wurde durch sieben Isolate von drei verschiedenen Patienten repräsentiert. Alle waren männlich und wurden im Herbst 2015, innerhalb von drei Wochen, stationär aufgenommen (26.10. - 16.11.2015). Es waren keine ESBL-positiven Isolate in diesem Cluster vorhanden. Das Resistenzmuster war, bis auf die unterschiedliche Sensibilität auf Ampicillin/Sulbactam, identisch. Die PFGE-Analyse zeigte sehr ähnliche Bandenmuster und ordnete alle Isolate dem

gleichen Pulsotyp klpn_129 zu. Dieser war exklusiv innerhalb dieses Clusters 3 zu finden. Zum Zeitpunkt des ersten Nachweises von *K. pneumoniae* wurden die Patienten CN und GI gleichzeitig auf der Intensivstation (ITS) behandelt. Später waren der Patient GI und QL zeitgleich auf der ITS 2. Zwei der drei Isolate (9 und 925) eines weiteren Patienten CN wurden am gleichen Tag im System der Mikrobiologie in Marburg erfasst. Gleiches galt für die zwei Isolate des Patienten QL. Sowohl die einheitliche Bestätigung der Clusterzugehörigkeit durch die PFGE-Analyse als auch die enge zeitliche Korrelation und die Übereinstimmung der Stationszugehörigkeiten wiesen auf ein mögliches Übertragungsgeschehen, mit dem Patienten GI als potenziellen Indexpatienten, hin.

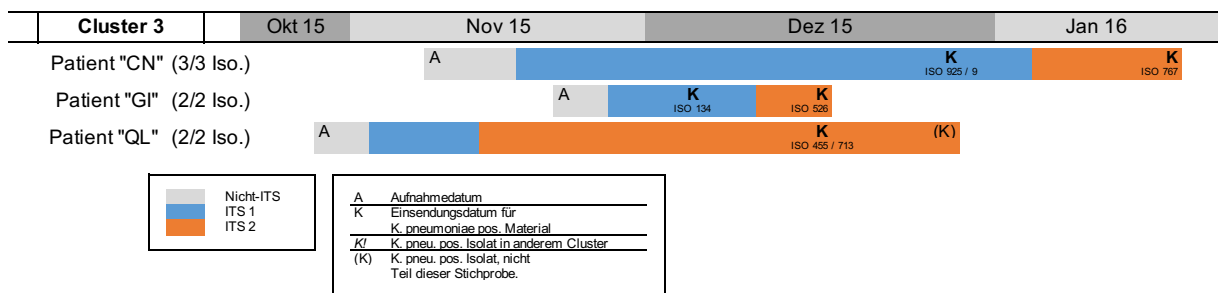


Abbildung 16 / Zeitstrahl für das MALDI-Cluster 3
Die Aufenthaltsorte der Patienten CN, GI und QL wurden zum Zeitpunkt der Probenabnahme aufgetragen. Die dargestellten Zeiträume sind entsprechend der Einsendedaten der einzelnen Isolate an das Institut für med. Mikrobiologie der Universität Marburg rekonstruiert und zur besseren Darstellung teilweise komprimiert worden.

6.4.2 MALDI-Cluster 5

	MALDI-CLUSTER	PFGE TYPE	GENDER	INT	DATE ENTRY	DATE REG	DATE MEASURE	ESBL	AMP. SUL	PIP. TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
849-VJ	5	klpn_215	M	2	05.16	07.16	11.16	nein	S	S	S	S	nein
15-JQ	5	klpn_215	M	2	04.16	05.16	05.16	nein	S	S	S	S	nein
845-FL	5	klpn_215	M	2	04.16	05.16	05.16	nein	S	S	S	S	nein
78-FL	5		M	2	04.16	05.16	07.16	nein	S	S	S	S	nein
913-JQ	5	klpn_215	M	1	04.16	04.16	05.16	nein	I	S	S	S	nein
417-JQ	5	klpn_215	M	1	04.16	04.16	05.16	nein	I	S	S	S	nein

Abbildung 17 / MALDI Cluster 5

Dieses Cluster setzte sich aus sechs Isolaten von drei männlichen Patienten zusammen, welche im Frühjahr des Jahres 2016 stationär aufgenommen wurden. Zwei der Patienten sind am 05. bzw. 07. April 2016 im Krankenhausinformationssystem registriert worden (JQ und FL). Der Patient VJ wurde am 01.05.2016 im Krankenhaus aufgenommen. Ein zweites Isolat (703-VJ) von diesem Patienten wurde in ein anderes MALDI-Cluster (4) eingruppiert. Die Pulsotypen waren bei 5 von 6 Isolaten innerhalb des Clusters 5, einschließlich der Probe des Patienten VJ, identisch. Eine PFGE-Analyse des zweiten Isolates des Patienten VJ (703-VJ) aus dem Cluster 4 konnte nicht durchgeführt werden. Es ließen sich zwei Isolate (913 und 417) des Patienten JQ mit gleichem Erfassungsdatum finden.

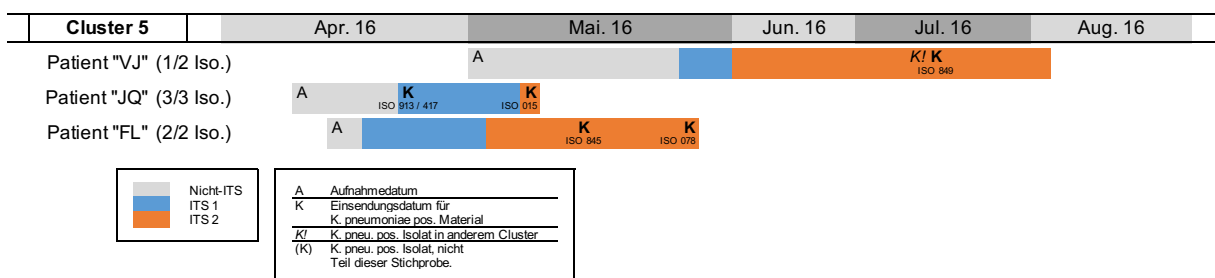


Abbildung 18 / Zeitstrahl für das MALDI-Cluster 5

Bei der Betrachtung des Resistenzprofils zeigten die zum Cluster 5 gehörenden Isolate eine vollständige Übereinstimmung. Keines der Isolate war ein ESBL-Bildner. Aufgrund des gemeinsamen Aufenthaltes auf der Intensivstation 1 war ein Übertragungsgeschehen von JQ auf FL denkbar. Zuvor lag der Patient VJ

nicht mit den anderen beiden Patienten (JQ und FL) auf einer Station. Der enge zeitliche Zusammenhang war allerdings auffällig.

6.4.3 MALDI-Cluster 9

	MALDI-CLUSTER	PFGE-TYPE	GENDER	INT	DATE-ENTRY	DATE-REG	DATE-MEASURE	ESBL	AMP-SUL	PIP-TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
654-AZ	9	klpn_130	M	2	10.15	11.15	01.16	nein	R	I	S	S	nein
315-AZ	9		M	2	10.15	11.15	01.16	nein	R	I	S	S	nein
808-NG	9	klpn_130	M	2	10.15	11.15	11.15	nein	R	R	S	S	nein
603-DI	9	klpn_130	M	2	10.15	11.15	11.15	nein	R	S	S	S	nein

Abbildung 19 / MALDI Cluster 9

Die drei männlichen Patienten, deren vier von fünf Einsendungen das Cluster 9 formten, wurden im Herbst 2015 stationär aufgenommen (08., 13. bzw. 21.10.2015). Alle PFGE-getesteten Isolate (3 von 4) wiesen den gleichen Pulsotyp klpn_130 auf. Die zwei einzigen Isolate des Patienten AZ waren exklusiv nur in diesem MALDI Cluster zu finden. Demgegenüber stand die Trennung der Isolate des Patienten DI dergestalt, dass das Isolat 361-DI in das Cluster 7 eingruppiert wurde. Dies erfolgte, obwohl das Ergebnis der PFGE-Analyse ebenfalls den Pulsotyp klpn_130 anzeigte. Hier ordnete also die MALDI-TOF Analyse diesen Stamm möglicherweise einem falschen Cluster zu. Ein Übertragungsgeschehen war dennoch auch in diesem Fall möglich, denn alle Patienten befanden sich in einem bestimmten Zeitraum gleichzeitig auf der ITS 1.

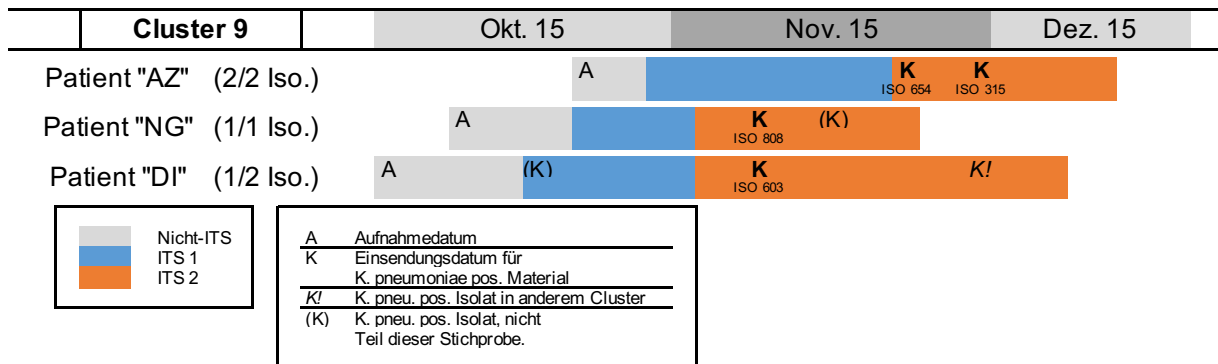


Abbildung 20 / Zeitstrahl für das MALDI Cluster 9

6.4.4 MALDI-Cluster 2

	MALDI-CLUSTER	PFGE TYPE	GENDER	INT	DATE ENTRY	DATE REG	DATE MEASURE	ESBL	AMP. SUL	PIP. TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
730-UM	2		M	1	04.16	05.16	07.16	nein	S	S	S	S	nein
585-GU	2	klpn_153	M	2	01.16	03.16	05.16	nein	I	S	S	S	nein
416-GU	2	klpn_153	M	2	01.16	03.16	11.16	nein	I	S	S	S	nein
784-LI	2		M	1	07.16	08.16	10.16	nein	S	S	I	S	nein
757-GU	2		M	2	01.16	03.16	05.16	nein	I	S	S	S	nein
446-GU	2	klpn_153	M	2	01.16	02.16	03.16	nein	R	S	S	S	nein
129-GU	2		M	2	01.16	04.16	05.16	nein	I	S	S	S	nein

Abbildung 21 / MALDI Cluster 2

Fünf der insgesamt sieben Isolate im Cluster 2 stammten von einem einzigen männlichen Patienten (GU). Zwei Isolate waren zwei weiteren, ebenfalls männlichen Patienten zuzuordnen. Innerhalb dieser Gruppe konnten keine falschen Trennungen durch die MALDI-Clusteranalyse erkannt werden. PFGE-Daten lagen lediglich von den Isolaten des Patienten GU vor. Diese zeigten nur einen einzigen Pulsotyp (klpn_153) an.

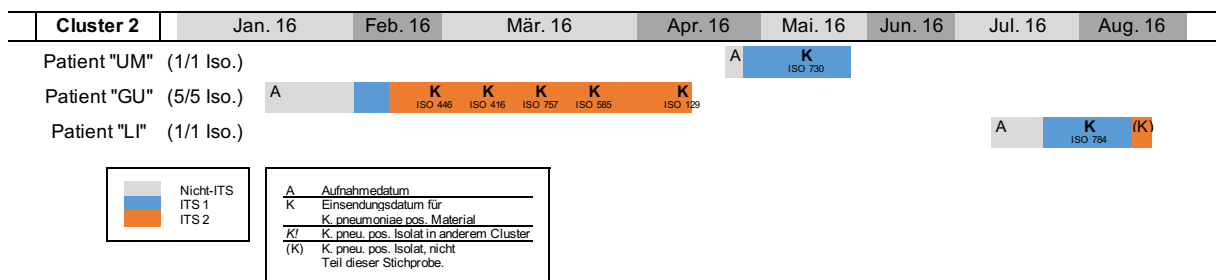


Abbildung 22 / Zeitstrahl für das MALDI Cluster 2

Die erstmalige Registrierung der Patienten fand im Januar (GU), April (UM) und Juli (LI) des Jahres 2016 statt. Die rekonstruierten Liegezeiten (vgl. Abbildung 22) ergaben keine gleichzeitige Anwesenheit aller drei Patienten. Aus diesem Grund war ein unmittelbares Übertragungsereignis unwahrscheinlich. Die erste, diesem MALDI-Cluster zugeordnete Probe, wurde in einem Fall von der Intensivstation 2 (GU) und in zwei Fällen von der Intensivstation 1 (LI und UM) eingesandt. ESBL-Bildner ließen sich in diesem Cluster nicht finden.

6.4.5 MALDI-Cluster 8

	MALDI-CLUSTER	PFGE-TYPE	GENDER	INT	DATE-ENTRY	DATE-REG	DATE-MEASURE	ESBL	AMP-SUL	PIP-TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
258-CX	8	klpn_216	M	2	05.15	07.15	08.15	ja	R	R	R	S	nein
239-ER	8	klpn_216	M	2	08.15	09.15	04.16	nein	S	S	S	S	nein
665-WC	8	klpn_216	M	2	06.15	07.15	08.15	nein	R	R	S	S	nein
523-UG	8		M	2	07.15	07.15	08.15	nein	S	S	S	S	nein

Abbildung 23 / MALDI-Cluster 8

Das Cluster 8 bestand aus vier Isolaten von vier verschiedenen männlichen Patienten. Diese wurden im Sommer 2015 (26.05., 09.06., 03.07. bzw. 04.08.2015) stationär aufgenommen. Drei der in diesem Cluster enthaltenen Isolate wurden mittels PFGE-Analyse typisiert. Diese Analyse bestätigte die durch MALDI-TOF vorgenommene Zuordnung.

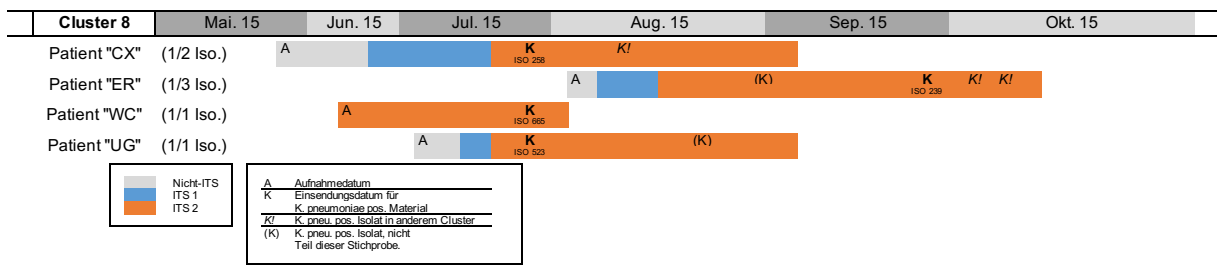


Abbildung 24 / Zeitstrahl für das MALDI-Cluster 8

Alle *K. pneumoniae* positiven Einsendungen dieser Patienten stammten von der Intensivstation 2 und die Liegezeiträume überschneiden sich (Abbildung 24). Dabei unterschied sich jedoch das Isolat 258-CX von den übrigen drei Isolaten hinsichtlich des Vorhandenseins einer ESBL und der Resistenz gegenüber Piperacillin/Tazobactam. Somit wies hier ein Pulsotyp bzw. ein MALDI-Cluster verschiedene Resistenzen in der Testung auf.

	MALDI-CLUSTER	PFGE-TYPE	GENDER	INT	DATE-ENTRY	DATE-REG	DATE-MEASURE	ESBL	AMP-SUL	PIP-TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
505-CX	10	klpn_216	M	2	05.15	08.15	12.15	ja	R	R	R	S	nein
258-CX	8	klpn_216	M	2	05.15	07.15	08.15	ja	R	R	R	S	nein
239-ER	8	klpn_216	M	2	08.15	09.15	04.16	nein	S	S	S	S	nein
587-ER	1	klpn_216	M	2	08.15	10.15	11.15	nein	S	S	S	S	nein
280-ER	1	klpn_216	M	2	08.15	10.15	11.15	nein	S	S	S	S	nein

Abbildung 25 / Vergleichende Analyse zu verschiedenen Isolaten von den Patienten ER und CX

Von dem Patienten ER stammten zwei weitere Isolate (587-ER und 280-ER), welche beide in das MALDI-Cluster 1 eingruppiert wurden. Abweichend hiervon

wurde eine weitere Probe (505-CX) des Patienten CX in das MALDI-Cluster 10 eingruppiert (siehe Abbildung 25). Demgegenüber stand die einheitliche Zuordnung dieser Isolate durch die Pulsfeldgelelektrophorese (klpn_216). MALDI-TOF Analysen und PFGE Resultate führten also hier zu unterschiedlichen Ergebnissen. Da die Isolate von einem einzigen Patienten stammten, war es wahrscheinlich, dass die MALDI-TOF Analyse die übereinstimmende Herkunft dieser beiden Isolate nicht erkannte.

6.4.6 MALDI-Cluster 10 / 12

	MALDI-CLUSTER	PFGE TYPE	GENDER	INT	DATE. ENTRY	DATE. REG	DATE. MEASURE	ESBL	AMP. SUL	PIP. TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
617-OT	10	klpn_364	W	1	12.15	12.15	02.16	nein	S	S	S	S	nein
505-CX	10	klpn_216	M	2	05.15	08.15	12.15	ja	R	R	R	S	nein
743-GR	10	klpn_376	M	1	12.15	12.15	02.16	nein	R	S	S	S	nein

Abbildung 26 / MALDI-Cluster 10.

	MALDI-CLUSTER	PFGE TYPE	GENDER	INT	DATE. ENTRY	DATE. REG	DATE. MEASURE	ESBL	AMP. SUL	PIP. TAZ	CTZ	QUIN	3MRGN
843-AC	12	klpn_362	W	2	05.15	05.15	12.15	ja	R	R	R	R	ja
77-AC	12		W	2	05.15	05.15	12.15	ja	R	R	R	R	ja

Abbildung 27 / MALDI-Cluster 12.

Insgesamt fünf Isolate von vier verschiedenen Patienten ordneten sich in die zwei nahe beieinander liegenden Cluster 10 und 12 ein. Drei dieser fünf Isolate waren ESBL positiv. Davon wurden wiederum zwei Isolate (843-AC und 77-AC), welche durch ihre zusätzliche Chinolonresistenz als 3MRGN zu klassifizieren waren, separat in das Cluster 12 eingruppiert. Alle drei ESBL positiven Isolate innerhalb des Clusters 10 und 12 stammten von zwei Patienten (AC und CX). Die Stämme des Patienten CX wurden von MALDI-TOF in unterschiedliche Cluster eingruppiert (Cluster 10 und 8), wohingegen die Pulsfeldgelelektrophorese diese Isolate einheitlich gruppirt. (klpn_216, siehe Abschnitt MALDI-Cluster 8).

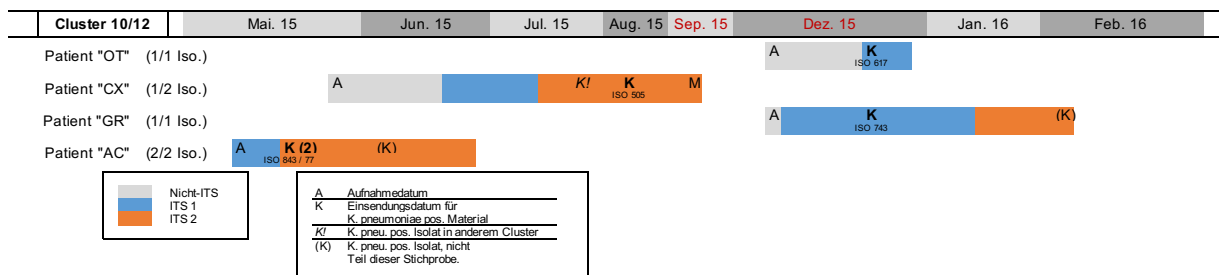


Abbildung 28 / Zeitstrahl für den MALDI-Clusterkomplex 10 und 12.

Die Aufnahmedaten der Patienten im Clusterkomplex 10 und 12 lagen im späten Frühjahr (AC: 15.05.15 und CX: 26.05.15) und im Dezember 2015 (GR: 22.12.15 und OT: 21.12.15) vor. Die beiden Isolate (77-AC und 843-AC) des Patienten AC wurden am 18.05.15 im Laborsystem registriert. Nach dem 29.06.15 (AC) bzw. 02.09.15 (CX) erfolgten keine weiteren Einsendungen dieser beiden Patienten an das mikrobiologische Labor in Marburg. Ein gleichzeitiger Aufenthalt im

Krankenhaus mit den Patienten OT und GR dieses Clusters erschien unwahrscheinlich, da zwischen den letzten Einsendungen von AC und CX sowie dem ersten registrierten Material der Patienten OT und GR ein Zeitraum von über drei Monaten lag. Im Unterschied zu den Patienten AC und CX erfolgten die *K. pneumoniae* positiven Einsendungen von OT und GR, welche durch MALDI-TOF dem Cluster 10 zugeordnet wurden, von der Intensivstation 1. Diese Einsendungen waren stets resistent gegenüber fast allen relevanten Antibiotika.

Zusammenfassend ergab sich bei den Clustern 10 und 12, die nur aus wenigen Stämmen bestanden, keine Übereinstimmung zwischen MALDI-TOF und PFGE. Angesichts der Zeitkinetik und dem Vorhandensein verschiedener Pulsotypen erschienen Übertragungsereignisse im Cluster 10/12 unwahrscheinlich.

6.5 Zeitliches Auftreten der Cluster

Die Abbildung 29 zeigt, nach Clustern geordnet, das zeitliche Auftreten der Isolate im Laufe des Beobachtungszeitraumes von März 2015 bis Oktober 2016. Dabei werden Liegezeiten und Orte entsprechend den Einsendungsdaten an das mikrobiologische Labor in Marburg visualisiert. Zu erkennen ist, dass sich die kleinen Mini-Cluster, welche auch durch die PFGE-Analysen verifiziert wurden, nur über wenige Wochen nachweisen ließen. Der kausale Zusammenhang für die Ausbildung dieser Mini-Cluster, also die Häufung bestimmter Stämme in einem definierten Zeitraum, blieb unklar. Nosokomiale Übertragungsereignisse können als Ursache hierfür in Betracht gezogen werden. Auffallend war das Cluster 4, welches nicht nur hinsichtlich der PFGE-Analyse, sondern auch in der zeitlichen Abfolge seiner Isolate, eine sehr heterogene Gruppe darstellte.

6.6 Clusterspezifische Analyse der Resistenzlage

Innerhalb der hier vorliegenden Stichprobe konnte eine eher homogene Resistenzlage verzeichnet werden. Lediglich vier der insgesamt 56 Isolate (7,1%) waren ESBL-Bildner. Zwei Isolate (3,6%) zeigten sich auch gegenüber Ceftazidim und Ciprofloxacin resistent und wurden demzufolge als 3MRGN klassifiziert.

Innerhalb der gut differenzierten und klar abgrenzbaren Cluster (2, 5, 3 und 9) konnte eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Resistenzlage

beobachtet werden. Insbesondere ergab sich im Hinblick auf die Leitsubstanzen (Ceftazidim und Ciprofloxacin) eine ganzheitliche Kongruenz.

Demgegenüber waren die durch die Pulsfeldgelelektrophorese einheitlich getesteten Isolate (505-CX, 258-CX, 239-ER, 587-ER und 280-ER) in ihren Resistenzeigenschaften heterogen. Sowohl ESBL-positive als auch negative Isolate wurden hier innerhalb eines MALDI-Clusters, aber auch innerhalb eines Pulsotyps, zusammengefasst (siehe Abbildung 25).

Somit schien es nicht möglich zu sein, ausgehend von einem MALDI-Typ, bestimmte Resistenzeigenschaften ableiten zu können. Die Frage, ob gewisse MALDI-Typen doch eine Resistenzaussage erlauben (z. B. Ausschluss des Vorhandenseins einer ESBL), muss durch weitere prospektive Studien beantwortet werden.

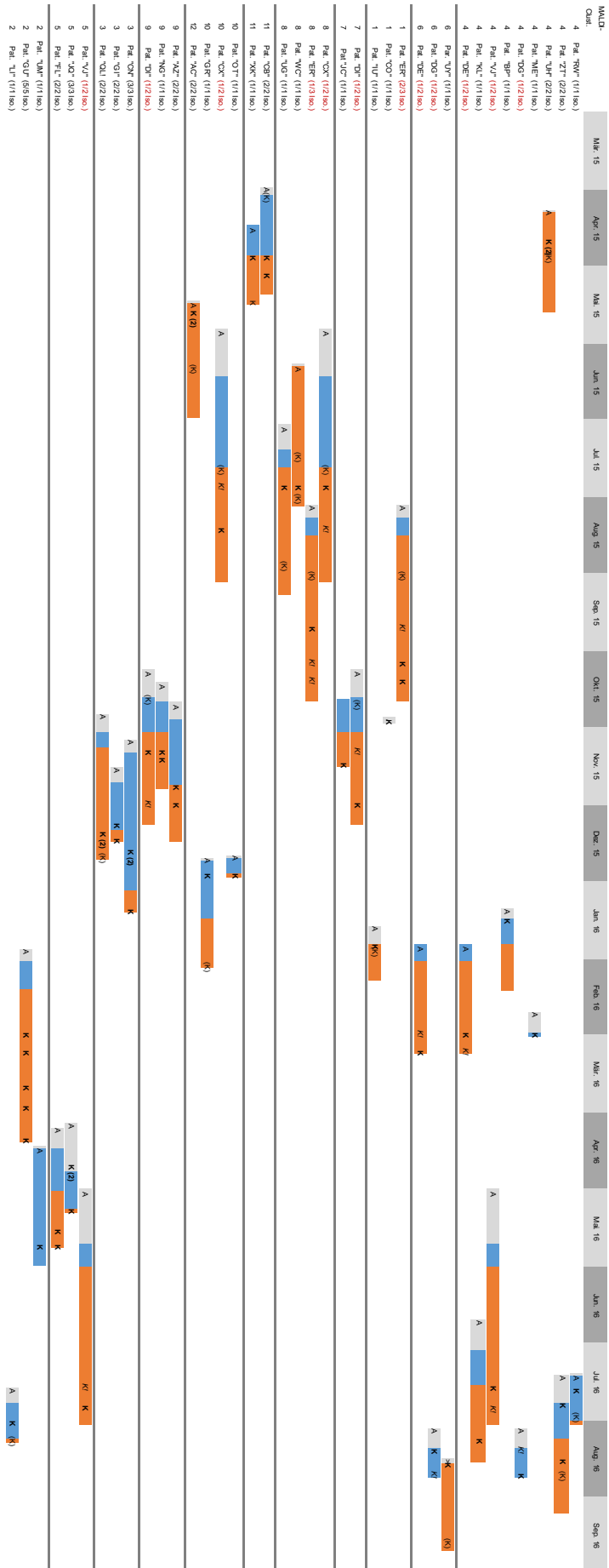


Abbildung 29 / (vorherige Seite) Zeitliche Übersicht,
nach MALDI-Clustern geordnet.

Liegezeiträume und -orte wurden anhand der
Einsendungsdaten an das Labor der medizinischen
Mikrobiologie der Universität Marburg rekonstruiert.
Intensivstation 1 = „blau“; Intensivstation 2 = „orange“; A =
Aufnahmedatum; **K** = *K. pneumoniae* Isolat; *K!* = *K.*
pneumoniae Isolat, welches von MALDI-TOF in ein
anderes Cluster gruppiert wurde; (K) = *K. pneumoniae*
Isolat, welches nicht Teil dieser Stichprobe war.

7 Diskussion

7.1 Einleitung

Im Jahr 2008 veröffentlichten Spellberg et al. als Vertreter der Gesellschaft für Infektiöse Erkrankungen der Vereinigten Staaten von Amerika („Infectious Disease Society of America“, IDSA) einen dringenden Appell, der die Politik in den USA dazu aufforderte, mehr zu tun im Kampf gegen die steigenden Inzidenzen multi-resistenter Erreger (Spellberg et al., 2008). Parallel hierzu zeigte sich, dass die Entwicklung neuer Antibiotika ins Stocken geraten war. Ein Jahrzehnt später gab die Weltgesundheitsorganisation eine Liste von Erregern heraus, für die die Entwicklung von neuen wirksamen Substanzen priorisiert werden sollte (Tacconelli et al., 2018). Daraufhin verdeutlichten Baraldi et al., dass sich im Jahr 2017 nur 41 antibiotisch wirkende Stoffe in klinischer Erprobung befanden ("Antibiotics Currently in Global Clinical Development," 2020; Baraldi, Lindahl, Savic, Findlay, & Årdal, 2018). Die Autoren nahmen an, dass 90% der Substanzen in klinischen Studien nicht bis zur Marktreife entwickelt würden. Dieser Umstand zeichnete ein düsteres Bild der Zukunft, in welchem für viele der hoch-priorisierten Erreger in den nächsten zehn Jahren möglicherweise keine wirksame Behandlung zur Verfügung stehen wird. Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung der zunehmenden Resistenzentwicklung wurde ersichtlich, dass der epidemiologischen Überwachung von Mikroorganismen eine entscheidende Relevanz zukommt.

Eine solche Überwachung der Epidemiologie von Bakterien wurde zu diesem Zeitpunkt insbesondere mithilfe der beiden Standardmethoden Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) bewerkstelligt, wobei die PFGE-Analyse als Goldstandard für die Klassifizierung von Bakterien unterhalb des Spezieslevels galt. (Spinali et al., 2015; Tenover et al., 1995). Sowohl die PFGE als auch die MLST-Analyse wurden in nahezu gleichem Maße als langsam, kosten- und ressourcenintensiv beschrieben. Daher lag der Gedanke nahe, eine Typisierung von Bakterien aus klinischen Materialien mithilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie durchzuführen. Denn diese Technologie ist im Vergleich zu den beiden bereits genannten Methoden deutlich schneller und weniger arbeitsintensiv. Dieses Verfahren und das erforderliche Instrumentarium war weltweit bereits stark

verbreitet und vielfach Teil der mikrobiologischen Routinediagnostik. Somit waren die Investitionskosten für eine erweiterte Anwendung niedrig, da die zentrale Einheit, das Massenspektrometer, in den Laboren schon vorhanden war und die Massenspektrometriedaten im Rahmen der Routine-Identifikation gleichsam schon erhoben wurden.

7.2 Anwendbarkeit von MALDI-TOF zur Typisierung von *Klebsiella pneumoniae* Isolaten

Die Evaluation der Anwendbarkeit von MALDI-TOF zur Typisierung von Bakterien unterhalb des Spezies-Levels war zentraler Untersuchungsgegenstand der hier vorliegenden Arbeit. Diese erfolgte an 36 von insgesamt 56 Isolaten durch die vergleichende Analyse mit den Ergebnissen aus der Pulsfeldgelelektrophorese (Goldstandard). Die Übereinstimmung (siehe Tabelle 9) mit der Referenzmethode (PFGE) war mit einem Adjusted Rand Index (**ARI**) von 0,761 als gut (mit Purging-Schritt) zu bewerten. Insbesondere für einige Cluster (3, 5, 2 und 11) war die Genauigkeit der durch MALDI-TOF erzielten Typisierung durch die PFGE-Analysen offensichtlich.

Gleichwohl musste beachtet werden, dass Mehrfacheinsendungen von 17 Patienten mitberücksichtigt wurden (ca. 1,7 Isolate pro Patienten). Dies verleitete dazu, dass die Größe und Signifikanz der Cluster überschätzt wurde. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass durch MALDI-TOF bei sechs Patienten (siehe Tabelle 11) eine abweichende Auftrennung der zugehörigen Isolate vorgenommen wurde. Bei vier von sechs dieser Patienten war die genetische Zugehörigkeit und Abstammung durch die übereinstimmende PFGE-Analyse sehr wahrscheinlich. Demzufolge konnte aufgrund dieser Beobachtungen die These formuliert werden, dass sich innerhalb eines Kompartiments eines Patienten in der Regel nur ein einziger Typ von *K. pneumoniae* befand. Auf der Basis dieser Annahme bedeutete das Vorliegen eines solchen Resultates, dass die MALDI-Clusteranalyse die Mehrfacheinsendungen dieser sechs Patienten falsch differenzierte. Dabei stellte sich vor allem die Frage, inwiefern solche abweichenden Resultate die gesamte Clusteranalyse von MALDI-TOF infrage stellten.

Wir kommen zu der Schlussfolgerung, dass MALDI-TOF trotz dieser soeben beschriebenen Beobachtungen als orientierende Untersuchung zur Einordnung

und Typisierung verwendet werden kann, da eine gute Übereinstimmung der Typisierungsergebnisse zwischen MALDI-TOF und PFGE erreicht wurde. Die Bestimmung der genauen Fehlerquote würde eine größere Anzahl an Stämmen bedingen und daher weiterführende Untersuchungen erfordern.

Tabelle 11 / Falsche Auftrennung von Mehrfacheinsendungen durch MALDI-TOF.

Durch die PFGE-Analyse der untenstehenden Isolate wurde die unkorrekte Auftrennung durch die MALDI-TOF Clusteranalyse bestätigt. Subtypen innerhalb der PFGE-Analyse wurden durch eine mit Bindestrich verknüpfte Zahl gekennzeichnet. Dabei wiesen die Bandenmuster der Isolate 603-DI und 361-DI einen Unterschied auf. Dies war vereinbar mit einem einzigen genetischen Ereignis. Gemäß den Kriterien von Tenover et al. waren diese beiden Isolate als eng verwandt, und wahrscheinlich als Teil eines gemeinsamen Ausbruchs zu betrachten.

	MALDI	PFGE
505-CX	10	klpn_216-2
258-CX	8	klpn_216-2
587-ER	1	klpn_216-1
280-ER	1	klpn_216-1
239-ER	8	klpn_216-1
603-DI	9	klpn_130-1
361-DI	7	klpn_130-2
18-DE	6	klpn_363-1
264-DE	4	klpn_363-1
849-VJ	5	klpn_215-1
703-VJ	4	-
690-DG	6	-
144-DG	4	-

In diesem Zusammenhang musste in die Überlegungen miteinbezogen werden, dass die Expression von bakteriellen Proteinen nicht unwesentlich von den Umgebungsbedingungen abhängig war. Dies stellte ein grundlegendes Unterscheidungskriterium zwischen MALDI-TOF als Vertreter von phänotypischen, also post-translationalen Typisierungswerkzeugen und genotypischen Verfahren wie MLST oder PFGE dar (vgl. (Sachse et al., 2014)). Es war daher möglich, dass die Unterschiede auf der variablen Expression bestimmter Proteine beruhten.

7.3 Die Bereinigung der Merkmalstabelle („Purging“)

Ein weiteres Hauptaugenmerk wurde in dieser Arbeit auf die Relevanz der Entfernung von besonders häufigen und besonders seltenen Peaks gelegt (Purging). Ohne eine solche Modifikation der Merkmalstabelle wurde eine deutlich schlechtere Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PFGE-Analyse (Referenzmethode) erreicht (vgl. Tabelle 9 und Abschnitt 6). Dennoch konnte der Stellenwert dieser Veränderung nicht vollständig geklärt werden. Insbesondere blieb unklar, in welchem Umfang eine Merkmalstabelle mit Peakinformationen verändert werden sollte. Das Ausmaß der Entfernung von besonders häufigen und seltenen Peaks waren, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit (vgl. Tabelle 7), in den unten dargestellten Studien willkürlich festgelegt. Nachfolgend soll zunächst auf drei Studien näher eingegangen werden, bei welchen ein Purging-Schritt in die post-analytische Aufbereitung der MALDI-TOF Daten eingebaut wurde.

So zeigten im Jahr 2008 Barbuddhe et al., dass die durch MALDI-TOF erreichte Gruppierung von 46 *Listeria spp.* Isolaten mit deren Typisierungsergebnissen einer PFGE-Analyse übereinstimmten. Vor Durchführung der Clusteranalyse wurden die Peaks entfernt, welche in allen Isolaten gleichsam präsent waren (Barbuddhe et al., 2008). In diesem Zusammenhang war zu beachten, dass der in dieser Studie untersuchte Datensatz aus fünf nahe verwandten *Listeria spp.* bestand. Peaks, die in einem bis zu vier Typen vorkamen, wurden im Rahmen eines gewichteten Clusterverfahrens höher bewertet und trugen je nach Exklusivität mehr oder weniger zum Clusterergebnis bei. Auch Ueda et al. beschrieben im Jahr 2016 eine Methode, mit welcher 24 MRSA Stämme mittels MALDI-TOF in kompletter Übereinstimmung zu den Typisierungsergebnissen der PFGE bzw. „Phage Open Typing“ (POT) Analyse gruppiert wurden. Mithilfe eines mehrstufigen Prozesses wurden, durch die vergleichende Analyse der Typisierungsergebnisse aus der Referenzmethode (POT und PFGE) mit den Ergebnissen der Clusteranalyse, störende Peaklokalisationen entfernt (Ueda et al., 2015). Im selben Jahr eliminierten auch Veenemans et al. bei ESBL-produzierenden *E. coli* Stämmen die Peaks, welche in nahezu allen Spektren identisch waren. Dies wurde als Hintergrundähnlichkeit („background similarity“) beschrieben, die eine Zuordnung auf Genus- und Speziesebene zuließ, bei Analysen auf Subspeziesebene aber, so die Annahme der Autoren, hinderlich

sein konnte. Mit diesem Verfahren wurde eine weitgehende Übereinstimmung mit der Referenzmethode erreicht (Veenemans et al., 2016). Die Autoren konstatierten, dass die Suche nach typenspezifischen Peaklokalisationen bei *E. coli* Isolaten zu einer schnelleren Bakterientypisierung führen könnte. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Studien mit *E. coli*, *S. enterica* und MRSA, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden soll (Christner et al., 2014; Dieckmann & Malorny, 2011; Wolters et al., 2011).

Demgegenüber stand eine Reihe von Publikationen, bei welchen eine solche post-analytische Modifikation der MALDI-TOF Daten nicht durchgeführt wurde. Von besonderer Relevanz ist die Studie von Jiang et al. aus dem Jahr 2019. Zum einen, weil auch hier *K. pneumoniae* zentraler Gegenstand der Untersuchungen war, zum anderen aufgrund der Tatsache, dass die Studie quantitative Maßzahlen zur Übereinstimmung der untersuchten Clustermethode mit der entsprechenden Referenzanalyse angab. Darüber hinaus bewegte sich die Zahl der untersuchten Isolate in dem Bereich der hier vorliegenden Arbeit. Die Autoren untersuchten die Anwendbarkeit von MALDI-TOF zur Typisierung von Carbapenemase-positiven *K. pneumoniae* Isolaten ($n = 44$) im Vergleich zur PFGE und zur MLST. Gegenüber den dort beschriebenen Ergebnissen ($ARI_{MALDI/PFGE} = 0,310$, 95% CI = 0,088 – 0,531, Jiang et al.) zeigten sich in der hier vorgestellten Analyse deutlich höhere ARI-Werte ($ARI_{MALDI/PFGE} = 0,761$, 95% CI = 0,524 – 1,000) beim Vergleich zwischen MALDI-TOF Clusterergebnissen und PFGE-Typen (Jiang et al., 2019). Möglicherweise lag die Ursache für die niedrigere Übereinstimmung der beiden Typisierungsverfahren in dem fehlenden Purgung-Schritt in der Arbeit von Jiang et al. Eine andere Erklärung wäre, dass, abweichend zu dieser Untersuchung, die Zusammensetzung der Stichprobe ausschließlich aus Carbapenemase-positiven Isolaten (4MRGN) bestand, während in den Daten dieser Arbeit keine als 4MRGN klassifizierten Isolate vorkamen.

Eine derartige Veränderung (Purgung) der MALDI-Daten führten auch Berrazeg et al. 2013 nicht durch. Sie untersuchten innerhalb einer groß angelegten Studie in Frankreich und Algerien, ob Isolate ($n = 535$) von *K. pneumoniae* aus verschiedenen Regionen Frankreichs und Algeriens mithilfe von MALDI-TOF zu unterscheiden waren. Im Hinblick auf bestimmte phänotypische und pathogenetische Eigenschaften der Bakterien sowie den verschiedenen

geographischen Herkunftsregionen ergaben sich vielversprechende Ergebnisse. Jedoch wurde eine gleichartige Zuordnung der Isolate wie in der parallel durchgeführten MLST-Analyse nicht beobachtet. In der Studie von Berrazeg et al. wurden die Ergebnisse so bewertet, dass die Diskrepanz der beiden Typisierungsergebnisse durch die unterschiedlichen Typisierungsmethoden bedingt war. Während bei den Sequenzierungsanalysen das Kerngenom in den Fokus genommen wurde, konzentrierte sich die MALDI-TOF Analyse auf ein bestimmtes Proteinspektrum. Ein entscheidender Unterschied war, dass sich die hier vorliegende Arbeit „lediglich“ mit dem Erregerspektrum und Ausbruchgeschehen auf lokaler Ebene befasste und damit nur eine begrenzte Vielfalt von Isolaten in den Fokus nahm. Eine multilateral angelegte Studie, wie die von Berrazeg et al., beinhaltete ein Set an Bakterien mit einer wesentlich höheren Diversität und Komplexität.

7.4 Korrelation zwischen MALDI-Cluster und Resistenzverhalten

In dieser Arbeit sollte auch die Frage untersucht werden, ob es möglich ist, aus der Zugehörigkeit eines bestimmten Isolates zu einem MALDI-Cluster, Rückschlüsse auf dessen Resistenzverhalten ziehen zu können. Aus klinischer Sicht wäre dadurch ein entscheidendes Zeitersparnis bis zum Therapiebeginn mit der „richtigen“ antibiotischen Substanz zu erreichen. Die Beantwortung dieser Frage wurde durch zwei wesentliche Gegebenheiten dieser Untersuchung limitiert.

Erstens wurden innerhalb des Beobachtungszeitraums (03/2015 – 10/2016) nur vier (7,14%, n = 56) ESBL-positive Isolate von zwei (6,10%, n = 33) Patienten („AC“ und „CX“) registriert. Zweitens war die Stichprobe für sich gesehen zu klein. Im Rahmen einer umfangreicheren Untersuchung könnte möglicherweise gezeigt werden, dass bestimmte MALDI-Typen mit einer ESBL-Eigenschaft assoziiert werden können, oder diese ggf. auszuschließen vermögen. Innerhalb der MALDI-Analyse konnte eine solche Korrelation auch tendenziell nicht beobachtet werden. Ferner ließen die hier vorliegenden Daten die Annahme zu, dass auch Verwandtschaftsbeziehungen von Isolaten (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 25), welche durch die Referenzmethode (PFGE-Analyse) festgelegt wurden, keine sichere Vorhersage des Resistenzverhaltens erlauben. Hierbei erwies sich insbesondere der Pulsotyp „klpn_216“ als interessant, da sowohl

ESBL-positive als auch negative Isolate in ein gemeinsames Cluster bzw. einem gemeinsamen Pulsotyp zugeordnet wurden. Dies zeigte, dass im Rahmen dieser Untersuchung die Vorhersage von Resistenzverhalten auf der Grundlage von Cluster-Zugehörigkeiten nicht getroffen werden konnte.

Einige wichtige Publikationen sollen hinsichtlich ihrer Erkenntnisse und Schwierigkeiten in dieser speziellen Fragestellung nachfolgend beleuchtet werden.

In der Übersichtsarbeit von Welker und van Belkum aus dem Jahr 2019 wurden im Wesentlichen vier prinzipiell unterschiedliche Herangehensweisen zur Frage nach einer möglichen antibiotischen Resistenztestung durch MALDI-TOF genannt (Welker & van Belkum, 2019):

1. Identifikation von bestimmten Resistenzmustern innerhalb eines MALDI-Clusters.
2. Direkte Detektion von Resistenzproteinen.
3. Nachweis von Assoziationen zwischen Biomarkern und bestimmten Resistenzmechanismen.
4. Indirekter Nachweis von Resistenzmechanismen durch den Nachweis der Spaltprodukte von antibiotischen Substanzen.

Zu von Welker et al. **erstgenanntem Ansatz** muss sicherlich auch eine der Pionierarbeiten auf diesem Gebiet genannt werden. Edwards-Jones et al. konnten im Jahr 2000 darlegen, dass mithilfe von MALDI-TOF Methicillin-resistente *S. aureus* Isolate von sensiblen unterschieden werden können (Edwards-Jones et al., 2000). Die Tatsache, dass MALDI-TOF in der Lage war, diese klinisch äußerst relevante Differenzierung hinsichtlich des Resistenzverhaltens vorzunehmen, lag rückblickend vor allem daran, dass *S. aureus* Isolate in sog. klonalen Komplexen („Clonal Complex“, CC) organisiert sind und zu Beginn des Jahrtausends die Resistenzeigenschaften mehrheitlich innerhalb dieser großen Cluster Verbreitung fanden. Damit wurden zwar unterschiedliche CCs nachgewiesen, deren Massenspektren basierten allerdings nicht auf der Tatsache, dass verschiedene Resistenzproteine nachgewiesen wurden, sondern vielmehr auf der, damals noch vorhandenen, expliziten Trennung der Resistenzeigenschaften innerhalb der klonalen Komplexe. So war

Szabados et. al mehr als ein Jahrzehnt später nicht in der Lage, MRSA-Stämme durch MALDI-TOF von MRSA-negativen Stämmen zu trennen (Szabados, Kaase, Anders, & Gatermann, 2012).

Auch in einer Studie von Schaumann et al. konnten ESBL-positive und negative Enterobacteriaceae und *P. aeruginosa* nicht durch MALDI-TOF differenziert werden. Die Autoren gingen der Frage nach, ob ein Testverfahren für die direkte Detektion von ESBL-positiven bakteriellen Isolaten entwickelt werden kann, um dieses in die MALDI-TOF Routinediagnostik zu integrieren. Dieser **zweite Ansatz** nach Welker et al. ist mit verschiedenen Schwierigkeiten behaftet, die im Folgenden dargelegt werden sollen. Wie bei den meisten anderen Studien dieser Art wurden in der Studie von Schaumann et al. Spektren im m/z -Bereich zwischen 2.000 und 20.000 generiert (Schaumann et al., 2012). Dabei waren Peaks oberhalb eines m/z -Wertes von 10.000 sehr selten zu detektieren (Welker & van Belkum, 2019). Nach Jacoby et al. lag die molekulare Masse vieler resistenzvermittelnder Proteine, wie zum Beispiel den AmpC β -Laktamasen, aber im Bereich von m/z 28.000 – 40.000 (Jacoby, 2009). Demzufolge konnte eine direkte Detektion von Resistenzproteinen erst im höheren m/z Bereich erfolgreich sein, wie in der Arbeit von Camara et al. demonstriert wurde (Camara & Hays, 2007). Diese Tatsache führte, nach Welker et al., zu einer weiteren Herangehensweise, um Resistenzinformationen aus den Massenspektren herauslesen zu können. Solche Verfahren, welche dezidiert dafür entwickelt wurden, Resistenzproteine in höheren m/z -Bereichen zu erfassen, könnten in der Zukunft mit der differenzierten Betrachtung von Proteinen im niedrigeren m/z Bereich kombiniert werden, um die schnelle und zuverlässige Typisierung von Bakterien vorzunehmen und um deren Resistenzverhalten einzuordnen. Ähnlich formulierten auch Hrabak et al. die These, dass die Entdeckung von Biomarkern für Resistenzinformationen in Form von bestimmten Peaklokalisationen nur erfolgreich sein könne, wenn neue Verfahren entwickelt werden, die darauf abzielen, genau solche Proteine im Massenspektrum von Bakterienisolaten ausfindig zu machen (Hrabak, Chudackova, & Walkova, 2013). Gleichwohl muss bedacht werden, dass Resistenzmechanismen nicht nur durch das Vorhandensein von β -Laktamasen, sondern auch durch Porinverlust und die vermehrte Produktion von Effluxpumpen vermittelt werden (Pfeifer et al., 2010).

Eine Besonderheit stellte die Peaklokalisierung m/z 11.109 dar. 2014 äußerten Lau et al. erstmals die Vermutung, dass ein Peak in diesem Bereich bei *K. pneumoniae* mit einer durch das KPC-Gen (*bla_{KPC}*) kodierten Carbapenemase assoziiert war (Lau et al., 2014). Auch Gaibani et al. zeigten 2016, dass der Peak bei m/z 11.109 mit dem Vorhandensein einer Carbapenemase korrelierte (Gaibani et al., 2016). Diese beiden Studien belegen, dass die Suche nach indirekten Markern für das Vorhandensein eines Resistenzproteins (**dritter Ansatz** nach Welker et al.) erfolgreich sein kann. Es wurde weiterhin ersichtlich, dass solche innovativen Ansätze als Screeningmethode zur frühzeitigen Diagnose einer Carbapenem-Resistenz in Erwägung gezogen werden können. Dies lag unter anderem auch daran, dass für die Akquisition von Spektren im Bereich zwischen m/z 10.000 – 15.000 keine zusätzlichen prä-analytischen Schritte notwendig waren. Nachdem keine Carbapenem-resistenten Isolate während des Beobachtungszeitraumes dieser Studie registriert wurden, wurde hinsichtlich dieser Peaklokalisierung keine Untersuchung durchgeführt.

Eine andere vielversprechende Methode stellte die Resistenz Erfassung durch den Nachweis von Spaltprodukten von Antibiotika mittels MALDI-TOF (**vierter Ansatz** nach Welker et al.) in Anwesenheit antibiotikaresistenter Bakterien dar. Dabei wurden Lösungen von antibiotischen Substanzen mit den zu untersuchenden Bakterien versetzt und die Spaltprodukte der Antibiotika mittels MALDI-TOF analysiert. So konnten Sparbier et al. 2012 beweisen, dass die Inkubation von ESBL-positiven *E. coli* ($n = 7$) und *K. pneumoniae* ($n = 3$) Isolaten mit den zu testenden Antibiotika zu einer, mit dem MALDI-TOF messbaren Veränderung der molekularen Masse führt und folglich „Peakverschiebungen“ in den resultierenden MALDI-Spektren erkennbar waren. Die Autoren zeigten, dass durch die Spaltung des Antibiotikums zwar die entsprechende Peaklokalisierung des „unversehrten“ Moleküls nicht mehr oder nur in geringerer Intensität nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurde auch ersichtlich, dass entsprechende Peaklokalisationen der durch die enzymatische Spaltung der Moleküle entstandenen Produkte vorhanden waren. Mithilfe dieses Testverfahrens waren die Autoren in der Lage, mit der Routinetestung übereinstimmende Resistenzinformationen zu generieren (Sparbier, Schubert, Weller, Boogen, & Kostrzewa, 2012). Ferner konnten Laserre et al. im Jahr 2015 insgesamt 266 Bakterienstämme (*Enterobacteriaceae*) in einem ähnlichen

Verfahren in Carbapenemase-resistente und sensible Isolate trennen. Die Autoren kalkulierten das Verhältnis der Peakintensitäten zwischen Carbapenem und der durch Carbapenemasen hervorgerufenen Spaltprodukte. Hier wurde ein Cut-off Wert errechnet, mit welchem diese Stichprobe, mit einer Sensitivität von 99 %, in Carbapenemase-sensible und resistente Isolate getrennt werden konnte. Es wurde berichtet, dass eine solche Analyse innerhalb von ca. 30min Ergebnisse liefern könne (Lasserre et al., 2015).

Die Ansätze 2 bis 4 nach Welker et al. sind in dieser Arbeit nicht untersucht worden und werden hier der Vollständigkeit halber besprochen. In dieser Promotionsarbeit ging es um die Frage, ob in einem kleinen epidemiologischen Umfeld (zwei herzchirurgische Intensivstationen) per MALDI-TOF ermittelte Gruppierungen hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften unterschieden werden können. Wie oben bereits beschrieben (Pulsotyp „klpn-216“, siehe Abbildung 25), konnte eine solche Korrelation nicht gezeigt werden. In diesem Zusammenhang darf ferner nicht unberücksichtigt bleiben, dass die in dieser Studie erhobene Menge an Daten zu klein ist, um diesbezüglich abschließende Aussagen tätigen zu können. Denkbar wäre auch, dass der Einsatz von hochauflösenden Spektrometern und die Mustererkennung durch künstliche Intelligenz zu weiterführenden Ergebnissen führen könnten.

7.5 Ausbruchsgeschehen innerhalb dieser Untersuchung

Während des Beobachtungsintervalls konnten große und lang andauernde Ausbruchsgeschehen nicht festgestellt werden. Vielmehr zeigten sich kleinere, wenige Patienten umfassende Mini-Cluster (9, 8, 5, 3 und 2), welche am ehesten durch limitierte Übertragungsereignisse erklärt werden konnten (vgl. Abbildung 29). Dabei war letztlich unklar, ob eine Übertragung von Patient zu Patient stattgefunden hat. Alternativ wäre auch eine ggf. zeitlich limitierte exogene Quelle, von der aus es zur Besiedelung von Patienten mit einem bestimmten *K. pneumoniae* Subtyp kam, als Ursache für diese „Mini-Ausbrüche“ denkbar gewesen.

7.6 Abschließende Beurteilung und Ausblick

In dieser Studie wurde gezeigt, dass MALDI-TOF durchaus geeignet ist, um eine Typisierung von *K. pneumoniae* Isolaten vorzunehmen.

Die kleine Stichprobengröße und das Fehlen von Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität und der Reproduzierbarkeit dieser Studie stellten wichtige Kriterien dar, welche eine Verallgemeinerung dieser Ergebnisse zum Bearbeitungszeitpunkt nicht zuließen. Außerdem waren trotz der grundsätzlich guten Übereinstimmung mit der Referenzmethode (Pulsfeldgelelektrophorese) einige diskrepante Resultate zu beobachten. Die Ursachen hierfür blieben unklar und bedürfen weiterer Forschung.

Ferner zeigten sich deutliche Hinweise darauf, dass eine post-analytische Modifikation der Merkmalstabelle, welche der Clusteranalyse zugrunde liegt, eine Verbesserung der Übereinstimmung der Typisierungsergebnisse bedingte. Dieser Sachverhalt sollte in weiterführenden Untersuchungen genauer determiniert und auch in der Gegenüberstellung zu anderen Typisierungsmethoden untersucht werden.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob es möglich ist, mithilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie epidemiologische Zusammenhänge von *Klebsiella pneumoniae* Isolaten und deren Abstammungsbeziehungen erkennen zu können. Die analysierten Isolate (n = 56) entstammten der routinemäßigen Testung von intensivmedizinisch betreuten Patienten in einem Krankenhaus in Deutschland. Damit konzentrierte sich diese Untersuchung auf die alltägliche Epidemiologie dieser Bakterienspezies über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren. Mittels MALDI-TOF, softwaregestützter Datenverarbeitung und Clusteranalyse konnten 12 MALDI Typen von *K. pneumoniae* differenziert werden. Die Betrachtung des zeitlichen Auftretens dieser Typen ließ vermuten, dass es sich hierbei um sehr begrenzte und zeitlich kurzfristige Übertragungsereignisse handelte, sog. „Mini-Cluster“. Weiterhin erfolgte eine vergleichende Analyse einer 36 Isolate umfassenden Stichprobe mit Typisierungsergebnissen einer Referenzmethode (Pulsfeldgelelektrophorese, PFGE). Mit einem Adjusted Rand Index (**ARI**) von 0,761 zeigte sich eine gute Übereinstimmung der beiden Typisierungsmethoden.

Bei der post-analytischen Datenverarbeitung wurde der Effekt einer Entfernung von besonders häufigen wie auch besonders seltenen Peaklokalisationen untersucht. Hier zeigte sich, dass eine derartige Bereinigung der Merkmalstabelle zu einem deutlich höheren Diskriminierungsvermögen führte. Damit ließ sich eine beträchtlich höhere Kongruenz der MALDI-Clusteranalyse mit den Ergebnissen der PFGE-Typisierung erreichen, Adjusted Rand Index (**ARI** = 0,761 vs. 0,560).

Ein weiterer Befund war, dass aus MALDI Subtypen im Rahmen dieser Analyse keine sichere Vorhersage zu Resistenzeigenschaften getroffen werden konnte. So waren innerhalb von konsistenten, gut definierten MALDI-Typen verschiedene Resistenzprofile vorhanden. Auch mithilfe der Referenzmethode (PFGE) ließen sich aufgrund von bestimmten Gruppenzugehörigkeiten keine Resistenzeigenschaften ableiten. Für den Nachweis einer solchen Assoziation oder die Erkenntnis, dass bestimmte Cluster niemals mit bestimmten Resistenzeigenschaften einhergehen, bedarf es aber einer größeren Stichprobe und damit weiterführender Forschung.

Die Frage nach der generellen Anwendbarkeit der MALDI-TOF Technologie zur Typisierung von Bakterienstämmen konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Im Gegensatz zur Literatur wurde eine gute Übereinstimmung der MALDI-Clusteranalyse mit den Ergebnissen der PFGE ersichtlich. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass in einzelnen Fällen mehrere *K. pneumoniae* Isolate von einem Patienten durch MALDI-TOF nicht gleichartig einem Typ zugeordnet werden konnten. Zur Evaluation dieses Phänomens sind weitere Untersuchungen notwendig.

9 Summary

In this thesis, the question of whether it is possible to detect epidemiological relationships of *K. pneumoniae* isolates using MALDI-TOF mass spectrometry was investigated. All of the 56 analyzed *Klebsiella pneumoniae* isolates came from routine testing of patients receiving intensive care at a hospital in Germany. The study focused on the day-to-day epidemiology of this bacterial species over a period of 18 months. Using MALDI-TOF, software-assisted data processing and cluster analysis, 12 MALDI types of *K. pneumoniae* could be differentiated. Consideration of the temporal occurrence suggested that many of the *K. pneumoniae* types can be seen as limited and temporally short-term transmission events, so-called "mini-clusters". Furthermore, a comparative analysis of a sample of 36 isolates with typing results of a reference method (pulsed field gel electrophoresis (PFGE)) was performed. With an Adjusted Rand Index (**ARI**) of 0.761, a good agreement between the two typing methods was found.

During post-analytical data processing, the effect of removing particularly frequent as well as particularly rare peak localizations was investigated. Here it was shown that such a cleaning of the feature table, so-called "purging" led to a higher discriminatory power. Therefore, a significantly higher congruence of the MALDI cluster analysis with the results of the PFGE typing could be achieved compared to the cluster analysis without the purging step during the protocol (**ARI** = 0.761 vs. 0.560).

Another finding was that no confident prediction of resistance properties could be made from MALDI subtypes. Within consistent and well-defined MALDI subtypes, different resistance profiles were present. Even when taking the results of the reference method (PFGE) into account, no resistance properties could be deduced from specific group assignments. A larger sample size and further research is required to determine the presence of an association and to demonstrate whether MALDI clusters can be associated with certain resistance properties.

The question of the general applicability of MALDI-TOF technology for typing bacterial strains cannot be conclusively addressed here. However it was observed, that the good agreement of MALDI cluster analysis with PFGE results indicates the potential of this methodology. It was observed that multiple *K.*

pneumoniae isolates from one patient are not homogeneously assigned to one type by MALDI-TOF. Further studies are needed to investigate this phenomenon.

10 Literaturverzeichnis

- Aghdassi, S. J., Behnke, M., Gastmeier, P., Gropmann, A., Hansen, S., Diaz, L. A., & Piening, B. (2016). *Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2016 - Abschlussbericht*. Retrieved from https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS_2016_Abschlussbericht_20.07.2017.pdf
- Ahmed, N., Devi, S. M., de los Á Valverde, M., Vijayachari, P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., & Hartskeerl, R. A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 28. doi:<https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036), 321-331. doi:<https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Anhalt, J. P., & Fenselau, C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 47(2), 219-225. doi:<https://doi.org/10.1021/ac60352a007>
- Antibiotics Currently in Global Clinical Development. (2020). Retrieved from <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development>
- Baraldi, E., Lindahl, O., Savic, M., Findlay, D., & Årdal, C. (2018). Antibiotic Pipeline Coordinators. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, 46(1_suppl), 25-31. doi:<https://doi.org/10.1177/1073110518782912>
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., . . . Hain, T. (2008). Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 74(17), 5402-5407. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.02689-07>
- Behnke, M., Hansen, S., Leistner, R., Diaz, L. A., Gropmann, A., Sohr, D., . . . Piening, B. (2013). Nosocomial infection and antibiotic use: a second national prevalence study in Germany. *Dtsch Arztebl Int*, 110(38), 627-633. doi:<https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0627>
- Ben-David, D., Kordevani, R., Keller, N., Tal, I., Marzel, A., Gal-Mor, O., . . . Rahav, G. (2012). Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), 54-60. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03478.x>
- Beyersmann, J., Gastmeier, P., Grundmann, H., Bärwolff, S., Geffers, C., Behnke, M., . . . Schumacher, M. (2006). Use of Multistate Models to Assess Prolongation of Intensive Care Unit Stay Due to Nosocomial Infection. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 27(5), 493-499. doi:<https://doi.org/10.1086/503375>
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., & Prod'hom, G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 48(5), 1549-1554. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.01794-09>
- Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The Genus *Klebsiella*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* (pp. 159-196). New York, NY: Springer New York.
- Camara, J. E., & Hays, F. A. (2007). Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(5), 1633-1638. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1558-7>
- Canton, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 466-475. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>
- Carrico, J. A., Silva-Costa, C., Melo-Cristino, J., Pinto, F. R., de Lencastre, H., Almeida, J. S., & Ramirez, M. (2006). Illustration of a Common Framework for Relating Multiple Typing Methods by Application to Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2524. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.02536-05>
- Christner, M., Trusch, M., Rohde, H., Kwiatkowski, M., Schluter, H., Wolters, M., . . . Hentschke, M. (2014). Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of

- Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 9(7), e101924. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101924>
- Cruz, G. R., Radice, M., Sennati, S., Pallecchi, L., Rossolini, G. M., Gutkind, G., & Conza, J. A. (2013). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(7), 924-927. doi:<https://doi.org/10.1590/0074-0276130084>
- Dalhoff, K., Abele-Horn, M., Andreas, S., Deja, M., Ewig, S., Gastmeier, P., . . . Welte, T. (2017). S3-Leitlinie, Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten mit nosokomialer Pneumonie - Update 2017. Retrieved from <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/020-013>
- Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System – KISS-Definitionen. (2017). doi:<https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-013.2>
- Dieckmann, R., & Malorny, B. (2011). Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 77(12), 4136-4146. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.02418-10>
- Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 61(3), 377-392. doi:<https://doi.org/10.1128/membr.61.3.377-392.1997>
- Edwards-Jones, V., Claydon, M. A., Evason, D. J., Walker, J., Fox, A. J., & Gordon, D. B. (2000). Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of medical microbiology*, 49(3), 295-300. doi:<https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-3-295>
- Ewig, S. (2017). *Nosokomiale Pneumonie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fenselau, C., & Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4), 157-171. doi:<https://doi.org/10.1002/mas.10004>
- Freiwald, A., & Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc*, 4(5), 732-742. doi:<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.37>
- Friedman, S. D. (1984). *A Measurement of the Intensity of the Cosmic background Radiation at 3,0 cm*. (Ph. D.). University of California, University of California, Berkeley, California.
- Fujinami, Y., Kikkawa, H. S., Kurosaki, Y., Sakurada, K., Yoshino, M., & Yasuda, J. (2011). Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res*, 166(2), 77-86. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.005>
- Gaibani, P., Galea, A., Fagioni, M., Ambretti, S., Sambri, V., & Landini, M. P. (2016). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 54(10), 2609-2613. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.01242-16>
- Gasink, L. B., Edelstein, P. H., Lautenbach, E., Synnestvedt, M., & Fishman, N. O. (2009). Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30(12), 1180-1185. doi:<https://doi.org/10.1086/648451>
- Gibb, S. (2015). *Entwicklung einer flexiblen bioinformatischen Plattform zur Analyse von Massenspektrometriedaten*. (Dr. med.). Universität Leipzig, Leipzig. Retrieved from <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:15-qucosa-178678>
- Gross, J. H. (2013). *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch* (K. Beifuss, Trans.). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Grover, N., Sahni, A. K., & Bhattacharya, S. (2013). Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. *Medical journal, Armed Forces India*, 69(1), 4-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2012.02.001>
- Hrabak, J., Chudackova, E., & Walkova, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms:

- from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev*, 26(1), 103-114. doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.00058-12>
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpsons index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465. doi:<https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
- Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedelung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. (2012). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55(55), 1311-1354. doi:<https://doi.org/10.1007/s00103-012-1549-5>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 161-182, Table of Contents. doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jiang, F., Kong, Z., Cheng, C., Kang, H., Gu, B., & Ma, P. (2019). Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones. *Epidemiology and Infection*, 147. doi:<https://doi.org/10.1017/S0950268819002097>
- Johnson, C. R., & Tarazaga, P. (1995). Connections between the real positive semidefinite and distance matrix completion problems. *Linear Algebra and its Applications*, 223-224, 375-391. doi:[https://doi.org/10.1016/0024-3795\(95\)00096-A](https://doi.org/10.1016/0024-3795(95)00096-A)
- Karb, I. (2017). Nach *Klebsiella*-Fund, Uni-Klinik: Intensivstation bleibt geschlossen. *Frankfurter Allgemeine Zeitung - faz.net*.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., & Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315-317. doi:<https://doi.org/10.1007/bf01641355>
- Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., . . . Tandé, D. (2015). Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2163. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.03467-14>
- Lau, A. F., Wang, H., Weingarten, R. A., Drake, S. K., Suffredini, A. F., Garfield, M. K., . . . Dekker, J. P. (2014). A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 2804-2812. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.00694-14>
- Lippmann, N., Lübbert, C., Kaiser, T., Kaisers, U. X., & Rodloff, A. C. (2014). Clinical epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(4), 271-272. doi:[https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(14\)70705-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(14)70705-4)
- Lubbert, C., Lippmann, N., Busch, T., Kaisers, U. X., Ducomble, T., Eckmanns, T., & Rodloff, A. C. (2014). Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *Am J Infect Control*, 42(4), 376-380. doi:10.1016/j.ajic.2013.12.001
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., . . . Harmsen, D. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*, 46(6), 1946-1954. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.00157-08>
- Melsen, W. G., Rovers, M. M., Groenwold, R. H. H., Bergmans, D. C. J. J., Camus, C., Bauer, T. T., . . . Bonten, M. J. M. (2013). Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(8), 665-671. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70081-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70081-1)
- Melsen, W. G., Rovers, M. M., Koeman, M., & Bonten, M. J. M. (2011). Estimating the attributable mortality of ventilator-associated pneumonia from randomized prevention studies*. *Critical Care Medicine*, 39(12). Retrieved from https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2011/12000/Estimating_the_attributable_mortality_of.21.aspx

- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657-686. doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- Pfeifer, Y. (2007). ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine der Hauptursachen für Cephalosporinresistenz bei Enterobakterien. *Epidemiologisches Bulletin*, 28, 248-250. Retrieved from https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Erreger_ausgewaehlt/ESBL/ESBL_28_07.html
- Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 300(6), 371-379. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
- Pfennigwerth, N. (2020). Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger, 2019. *Epid Bull*, 2020(26), 3-10. doi:<https://doi.org/10.25646/6920>
- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(1), 1-11. doi:<https://doi.org/10.1128/aac.46.1.1-11.2002>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 11(4), 589-603. doi:<https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589>
- Rand, W. M. (1971). Objective Criteria for the Evaluation of Clustering Methods. *Journal of the American Statistical Association*, 66(336), 846-850. doi:<https://doi.org/10.1080/01621459.1971.10482356>
- Ryan, C. G., Clayton, E., Griffin, W. L., Sie, S. H., & Cousens, D. R. (1988). SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of PIXE spectra in geoscience applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 34(3), 396-402. doi:[https://doi.org/10.1016/0168-583X\(88\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0168-583X(88)90063-8)
- Ryzhov, V., & Fenselau, C. (2001). Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from Whole Bacterial Cells. *Analytical Chemistry*, 73(4), 746-750. doi:<https://doi.org/10.1021/ac0008791>
- Sachse, S., Bresan, S., Erhard, M., Edel, B., Pfister, W., Saupe, A., & Rodel, J. (2014). Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of beta-lactam-resistant Klebsiella pneumoniae strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 80(4), 267-271. doi:<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.005>
- Safdar, N., Dezfulian, C., Collard, H. R., & Saint, S. (2005). Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. *Crit Care Med*, 33(10), 2184-2193. doi:<https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000181731.53912.d9>
- Savitzky, A., & Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627-1639. doi:<https://doi.org/10.1021/ac60214a047>
- Schaumann, R., Knoop, N., Genzel, G. H., Losensky, K., Rosenkranz, C., Stingu, C. S., . . . Eschrich, K. (2012). A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa by MALDI-TOF mass spectrometry. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 18(9), MT71-MT77. doi:<https://doi.org/10.12659/msm.883339>
- Schoenberg, I. J. (1938). Metric Spaces and Positive Definite Functions. *Transactions of the American Mathematical Society*, 44(3), 522-536. doi:<https://doi.org/10.2307/1989894>
- Schubert, S., & Wieser, A. (2011). Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik. *LaboratoriumsMedizin*, 35(4), 195-203. doi:<https://doi.org/10.1515/jlm.2011.031>
- Schwaber, M. J., & Carmeli, Y. (2007). Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 60(5), 913-920. doi:<https://doi.org/10.1093/jac/dkm318>

- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49(4), 543-551. doi:<https://doi.org/10.1086/600885>
- Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M., & Carriço, J. A. (2011). Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3997-4000. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.00624-11>
- Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., & Kostrzewa, M. (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*, 50(3), 927-937. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.05737-11>
- Spellberg, B., Gidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., . . . America, T. I. D. S. o. (2008). The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 155-164. doi:<https://doi.org/10.1086/524891>
- Spinali, S., van Belkum, A., Goering, R. V., Girard, V., Welker, M., Van Nuenen, M., . . . Durand, G. (2015). Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol*, 53(3), 760-765. doi:<https://doi.org/10.1128/JCM.01635-14>
- Steinmann, J., Kaase, M., Gatermann, S., Popp, W., Steinmann, E., Damman, M., . . . Rath, P. (2011). Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Eurosurveillance*, 16, 19944. doi:<https://doi.org/10.2807/ese.16.33.19944-en>
- Sugawara, E., Kojima, S., & Nikaido, H. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Major Porins OmpK35 and OmpK36 Allow More Efficient Diffusion of beta-Lactams than Their *Escherichia coli* Homologs OmpF and OmpC. *J Bacteriol*, 198(23), 3200-3208. doi:<https://doi.org/10.1128/JB.00590-16>
- Szabados, F., Kaase, M., Anders, A., & Gatermann, S. G. (2012). Identical MALDI TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic SCCmec-harboring and SCCmec-lacking strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection*, 65(5), 400-405. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.06.010>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., . . . Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239. doi:<https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Ueda, O., Tanaka, S., Nagasawa, Z., Hanaki, H., Shobuike, T., & Miyamoto, H. (2015). Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Hosp Infect*, 90(2), 147-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.025>
- Veenemans, J., Welker, M., van Belkum, A., Saccomani, M. C., Girard, V., Pettersson, A., . . . Kluytmans, J. (2016). Comparison of MALDI-TOF MS and AFLP for strain typing of ESBL-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 35(5), 829-838. doi:<https://doi.org/10.1007/s10096-016-2604-1>
- Vimont, S., Mnif, B., Fevre, C., & Brisse, S. (2008). Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Med Microbiol*, 57(Pt 10), 1308-1310. doi:<https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/003798-0>
- Wallace, D. L. (1983). A Method for Comparing Two Hierarchical Clusterings: Comment. *Journal of the American Statistical Association*, 78(383), 569-576. doi:<https://doi.org/10.2307/2288118>

- Ward, J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236-244. doi:<https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>
- Weist, K., & Högberg, L. D. (2016). ECDC publishes 2015 surveillance data on antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. *Eurosurveillance*, 21, 30401. doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30399>
- Welker, M., & van Belkum, A. (2019). One System for All: Is Mass Spectrometry a Future Alternative for Conventional Antibiotic Susceptibility Testing? *Frontiers in Microbiology*, 10, 2711-2711. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02711>
- Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., . . . Christner, M. (2011). MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(1), 64-68. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.06.002>

11 Anhang

11.1 Skript zur Durchführung der MALDI Analysen in R

```
library("MALDIquant")
library("MALDIquantForeign")
library(dendextend)

# Importiert MALDI Rohdaten in die Umgebung von R
raw0KLPNSpectra <- importBrukerFlex(
  file.path("DATA"),
  verbose = FALSE,
  removeEmptySpectra = TRUE)

# Der Beobachtungsbereich wird verändert. (m/z
2000-10.000)
raw1KLPNSpectra <- trim(raw0KLPNSpectra,
  range=c(2000,10000))

# Angleichung der Grundlinie.
raw2KLPNSpectra <-
removeBaseline(raw1KLPNSpectra,
method="SNIP", iterations=25)

# Glättung der Spektren zur besseren Visualisierung.
raw3KLPNSpectra <-
smoothIntensity(raw2KLPNSpectra,
  halfWindowSize=10,
  method="SavitzkyGolay")

# Angleichung der Spektren zueinander um
messbedingte Verschiebungen zu normalisieren.
KLPNSpectra <- alignSpectra(raw3KLPNSpectra,
  halfWindowSize = 2,
  tolerance = 0.002,
  warpingMethod = "lowess")

# Kreiert eine Liste mit Namen von Isolaten in der
Reihenfolge von KLPNSpectra.
rawisonamesKLPNSpectra <- sapply(KLPNSpectra,

function(x)metaData(x)$sampleName)
rawisonamesKLPNSpectra

# Aus 24 Einzelmessungen zu einem jeden Isolat wird
eine Durchschnittsmessung errechnet.
aKLPNSpectra <- averageMassSpectra(KLPNSpectra,

labels=paste(rawisonamesKLPNSpectra))

# Erfassung der Peaklokalisationen.
peaksKLPNSpectra <- detectPeaks(aKLPNSpectra,
  SNR = 1.1,
  halfWindowSize = 2,
  method = "SuperSmoother")

# Nahe beieinander liegende Peaklokalisationen
werden zu einer einzigen zusammengefasst.
peaksKLPNSpectra <- binPeaks(peaksKLPNSpectra,
  method = "strict",
  tolerance = 0.0004)

# Erstellung der Merkmalstabelle.
featKLPNSpectra <-
intensityMatrix(peaksKLPNSpectra, aKLPNSpectra)

# Umbenennung der Datensätze.
isonamesDATA <- list.files("DATA")
rownames(featKLPNSpectra) <-
paste(isonamesDATA)

# Transformation der Merkmalstabelle in ein halb-
binäres System (Presence/Absence)
wp.featKLPNSpectra <- ifelse(featKLPNSpectra >=
500, 1,

ifelse(featKLPNSpectra >=200, 0.5,
0))

# Durchführung der Clusteranalyse ohne Purgung.
wp.dist.featKLPNSpectra <- dist(wp.featKLPNSpectra,
  method="euclidean")
wp.hclust.featKLPNSpectra <-
hclust(wp.dist.featKLPNSpectra,
  method="ward.D")
wp.clust.featKLPN <- wp.hclust.featKLPNSpectra

# Darstellung der Clusterergebnisse ohne Purgung.
wp.clust.featKLPN <-
as.dendrogram(wp.clust.featKLPN)
wp.clust.featKLPN <- color_labels(wp.clust.featKLPN,
  col="black")
wp.clust.featKLPN %>%
set("labels_cex", c(0.7)) %>%
hang.dendrogram(hang=-1) %>%
plot(xlim=c(20, -500),
  horiz=TRUE,
  main=paste(""),
  cex.main = 0.9)

# Entfernung besonders häufiger und seltener
Peaklokalisationen. (Purgung)
peaksKLPNSpectra <- filterPeaks(peaksKLPNSpectra,
  minFrequency = 0.1)

mf.peaksKLPNSpectra <-
filterPeaks(peaksKLPNSpectra,
  minFrequency = 0.6)

featKLPNSpectra <-
intensityMatrix(peaksKLPNSpectra, aKLPNSpectra)
colnames.featKLPNSpectra <-
as.numeric(colnames(featKLPNSpectra))
colnames.featKLPNSpectra <-
round(colnames.featKLPNSpectra, digits=1)
colnames(featKLPNSpectra) <-
paste(colnames.featKLPNSpectra)
featKLPNSpectra <- round(featKLPNSpectra, digits=1)
rownames(featKLPNSpectra) <-
paste(isonamesDATA)
featKLPNSpectra

mf.featKLPNSpectra <-
intensityMatrix(mf.peaksKLPNSpectra, aKLPNSpectra)
colnames.mf.featKLPNSpectra <-
as.numeric(colnames(mf.featKLPNSpectra))
colnames.mf.featKLPNSpectra <-
round(colnames.mf.featKLPNSpectra, digits=1)
colnames(mf.featKLPNSpectra) <-
paste(colnames.mf.featKLPNSpectra)
mf.featKLPNSpectra <- round(mf.featKLPNSpectra,
digits=1)
rownames(mf.featKLPNSpectra) <-
paste(isonamesDATA)
mf.featKLPNSpectra

df.featKLPNSpectra <-
as.data.frame(featKLPNSpectra)
df.featKLPNSpectra
colnames.mf.featKLPNSpectra <-
as.character(colnames.mf.featKLPNSpectra)
colnames.mf.featKLPNSpectra
purged.featKLPNSpectra <- df.featKLPNSpectra[,
!(colnames(df.featKLPNSpectra) %in%
colnames.mf.featKLPNSpectra)]
purged.featKLPNSpectra
```



```

str(featkLPNSpectra)
str(mf.featkLPNSpectra)
length(purged.featkLPNSpectra)

# Transformation der Merkmalstabelle in ein halb-
binäres System (Presence/Absence)
purged.featkLPNSpectra <-
ifelse(purged.featkLPNSpectra >= 500, 1,
       ifelse(purged.featkLPNSpectra
>=200, 0.5, 0))
purged.featkLPNSpectra
# Durchführung der Clusteranalyse nach Purging.
purged.dist.featkLPNSpectra <-
dist(purged.featkLPNSpectra, method="euclidean")
purged.hclust.featkLPNSpectra <-
hclust(purged.dist.featkLPNSpectra,
method="ward.D")
purged.clust.featkLPN <-
purged.hclust.featkLPNSpectra

# Darstellung der Clusterergebnisse nach Purging.
purged.clust.featkLPN <-
as.dendrogram(purged.clust.featkLPN)
purged.clust.featkLPN <-
color_labels(purged.clust.featkLPN, col="black")
purged.clust.featkLPN %>%
set("labels_cex", c(0.7)) %>%
hang.dendrogram(hang=-1) %>%
plot(xlim=c(20, -500), horiz=TRUE, main=paste("")),

sub=paste(purged.hclust.featkLPNSpectra$method,
purged.hclust.featkLPNSpectra$dist.method),
cex.main = 0.9)

# Erstellung einer csv-Datei aus den gespeicherten
Nebendaten in Excel.
# Einpflegen der Nebendaten in R.
sideData <- read.csv("KLPNData-Okt20-sideData.csv",
sep=";")
sideData <- as.data.frame(sideData)
sideData$ID.ISO.ANON.2 <-
as.numeric(sideData$ID.ISO.ANON.2)
sideData$ID.ISO.ANON <-
as.character(sideData$ID.ISO.ANON)
sideData <- subset(sideData, select = c(ID.ISO.ANON,
ID.ISO.ANON.2,
PFGE.PULSOTYP, ESBL,
AMP.SUL.AS, PIP.TAZ,
CEFUROX.CRM,
CEFTAZ.CFT,
QUIN, X3MRGN,
PAT.ANON.CODE, GESCHL,
DAT.AUFN,
DAT.ERFASSUNG,
DAT.MALDMESS, INT))
sideData <- sideData[-c((seq(from=57, to=200,
by=1))),]
sideData <- sideData[order(sideData$ID.ISO.ANON),]
sideData

# Auslesen der Clusteranalyse in k-Cluster nach
Purging.
k.cluster <- c(12)
clustercut <- cutree(purged.clust.featkLPN,
k=k.clusters)
clustercut <- as.data.frame(clustercut)
clustercut
subset(clustercut, clustercut==10)

# Sortieren der Clustercut-Tabelle entsprechend der
SideData-Tabelle.
clustercut <- data.frame(clustercut$clustercut,
rownames(clustercut))
clustercut$rownames.clustercut <-
as.character(clustercut$rownames.clustercut.)
clustercut <-
clustercut[order(clustercut$rownames.clustercut.),]

data.frame(sideData$ID.ISO.ANON,
clustercut$rownames.clustercut.,
clustercut$clustercut.clustercut)

# Einfügen der Clusternummern in die SideData-
Tabelle.
clustercut$clustercut.clustercut
sideData["CLUSTER.01"] <-
clustercut$clustercut.clustercut
sideData <- sideData[order(sideData$CLUSTER.01),]
data.frame(sideData$CLUSTER.01,
sideData$ID.ISO.ANON.2)

# Generiert eine Tabelle mit Höhenangaben der
einzelnen Isolate entsprechend der Clusteranalyse
und der Anordnung innerhalb des Dendrograms.
xy.height.leaves <-
data.frame(get_leaves_attr(purged.clust.featkLPN,
"label"), seq(from=1, to=56, by=1))
colnames(xy.height.leaves) <- paste(c("Isolat",
"Height"))
xy.height.leaves$Isolat <-
as.character(xy.height.leaves$Isolat)
xy.height.leaves <-
xy.height.leaves[order(xy.height.leaves$Isolat),]
xy.height.leaves

# Ordnet SideData Tabelle entsprechend der
Anordnung der Höhentabelle an.
sideData$ID.ISO.ANON <-
as.character(sideData$ID.ISO.ANON)
sideData <- sideData[order(sideData$ID.ISO.ANON),]
data.frame(sideData$ID.ISO.ANON,
xy.height.leaves$Isolat)

# Fügt die Höhenangaben der Isolate im Dendrogram
in die SideData-Tabelle ein.
sideData["dend.xy.height"] <- xy.height.leaves$Height
sideData <- sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
sideData

# Generiert Farbprofile zur Visualisierung der
Nebendaten.
col.dendrogram.clust <-
sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
levels(col.dendrogram.clust$CLUSTER.01) <-
1:length(levels(col.dendrogram.clust$CLUSTER.01))
col.dendrogram.clust$CLUSTER.01

col.dendrogram.pfge <-
sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
levels(col.dendrogram.pfge$PFGE.PULSOTYP) <-
1:length(levels(col.dendrogram.pfge$PFGE.PULSOTYP))
col.dendrogram.pfge$PFGE.PULSOTYP

col.dendrogram.sex <-
sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
levels(col.dendrogram.sex$GESCHL) <-
1:length(levels(col.dendrogram.sex$GESCHL))
col.dendrogram.sex$GESCHL

col.dendrogram.int <-
sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
levels(col.dendrogram.int$INT) <-
1:length(levels(col.dendrogram.int$INT))
col.dendrogram.int$INT

col.dendrogram.dat.aufn.my <-
sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
col.dendrogram.dat.aufn.my["DAT.AUFN.MY"] <-
as.Date(col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN,
format="%d.%m.%y")
col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.MY <-
paste(format(col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.
MY, "%m.%y"))

```

```
col.dendrogram.dat.aufn.my["DAT.AUFN.MY.LEV"] <-
as.factor(col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.MY)
levels(col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.MY.LEV) <-
1:length(levels(col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.MY.LEV))
col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.MY.LEV
```

```
col.dendrogram.dat.erf.my <-
sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
col.dendrogram.dat.erf.my["DAT.ERFASSUNG.MY"] <-
as.Date(col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG, format="%d.%m.%y")
col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY <-
paste(format(col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY, "%m.%y"))
col.dendrogram.dat.erf.my["DAT.ERFASSUNG.MY.LEV"] <-
as.factor(col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY)
levels(col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY.LEV) <-
1:length(levels(col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY.LEV))
col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY.LEV
```

```
col.dendrogram.dat.maldmess.my <-
sideData[order(sideData$dend.xy.height),]
col.dendrogram.dat.maldmess.my["DAT.MALDMESS.MY"] <-
as.Date(col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS, format="%d.%m.%y")
col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY <-
paste(format(col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY, "%m.%y"))
col.dendrogram.dat.maldmess.my["DAT.MALDMESS.MY.LEV"] <-
as.factor(col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY)
levels(col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY.LEV) <-
1:length(levels(col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY.LEV))
col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY.LEV
```

Darstellung der Clusterergebnisse.

```
graphics.off()
cols <- c("#000000",
"cadetblue",
"chartreuse4",
"#e31a1c",
"#F96714",
"purple",
"#C62168",
"#00A591",
"blue",
"#264E36",
"#5B5EA6",
"#663300",
"#B76BA3",
"#FF6F61",
"#004B8D",
"#9F9C99",
"#88B04B",
"#C48F65",
"#FAE03C")
```

```
par(mfrow=c(1,1))
par(oma=c(0.5,0.5,1,0.5))
par(mar=c(0.5,0.5,0.5,0.5))
```

```
purged.clust.featsKLPN <-
as.dendrogram(purged.clust.featsKLPN)
purged.clust.featsKLPN <-
color_labels(purged.clust.featsKLPN, k=k.clusters)
purged.clust.featsKLPN %>%
set("labels_cex", c(0.7)) %>%
hang.dendrogram(hang=-1) %>%
color_labels(col =
cols[col.dendrogram.clust$CLUSTER.01]) %>%
plot(xlim=c(20, -500),
horiz=TRUE,
main=paste("")),
```

```
sub=paste(purged.hclust.featsKLPNSpectra$method,
purged.hclust.featsKLPNSpectra$dist.method),
cex.main = 0.9)
```

```
# Fügt Nebendaten zum Dendrogram hinzu.
x.offset <- c(-100)
text(paste(sideData$CLUSTER.01), x=x.offset+50,
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7, col =
cols[col.dendrogram.clust$CLUSTER.01])
text(paste("CLUSTER"), x = x.offset+50, y=58,
cex=0.5, col="black")
text(paste(sideData$PFGE.PULSOTYP),
x=x.offset+20, y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7,
col = cols[col.dendrogram.pfge$PFGE.PULSOTYP])
text(paste("PFGE"), x = x.offset+25, y=58, cex=0.5,
col="black")
```

```
text(paste(sideData$GESCHL), x=x.offset-15,
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7, col =
cols[col.dendrogram.sex$GESCHL])
text(paste("SEX"), x = x.offset-15, y=58, cex=0.5,
col="black")
```

```
text(paste(sideData$INT), x=x.offset-30,
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7, col =
cols[sideData$INT])
text(paste("INT"), x = x.offset-30, y=58, cex=0.5,
col="black")
```

```
text(paste(col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.MY),
x=x.offset-60,
y=col.dendrogram.dat.aufn.my$dend.xy.height,
cex=0.7, col =
cols[col.dendrogram.dat.aufn.my$DAT.AUFN.MY.LEV])
text(paste("DAT.lnAUFN.MY"), x = x.offset-60, y=58,
cex=0.5, col="black")
```

```
text(paste(col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY),
x=x.offset-100,
y=col.dendrogram.dat.maldmess.my$dend.xy.height,
cex=0.7, col =
cols[col.dendrogram.dat.maldmess.my$DAT.MALDMESS.MY.LEV])
text(paste("DAT.lnMEASURE.MY"), x = x.offset-100,
y=58, cex=0.5, col="black")
```

```
#text(paste(col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY),
x=x.offset-90,
y=col.dendrogram.dat.erf.my$dend.xy.height, cex=0.7,
col =
cols[col.dendrogram.dat.erf.my$DAT.ERFASSUNG.MY.LEV])
#text(paste("DAT.lnERFASS.MY"), x = x.offset-90,
y=58, cex=0.5, col="black")
```

```
text(paste(sideData$ESBL), x=x.offset-125,
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7)
text(paste("ESBL"), x = x.offset-125, y=58, cex=0.5,
col="black")
```

```
text(paste(sideData$AMP.SUL.AS), x=x.offset-145,
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7)
```

```
text(paste("AMP.\nSUL"), x = x.offset-145, y=58,  
cex=0.5, col="black")
```

```
text(paste(sideData$PIP.TAZ), x=x.offset-160,  
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7)  
text(paste("PIP.\nTAZ"), x = x.offset-160, y=58,  
cex=0.5, col="black")
```

```
text(paste(sideData$CEFUROX.CRM), x=x.offset-175,  
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7)  
text(paste("CRM"), x = x.offset-175, y=58, cex=0.5,  
col="black")
```

```
text(paste(sideData$QUIN), x=x.offset-190,  
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7)  
text(paste("QUIN"), x = x.offset-190, y=58, cex=0.5,  
col="black")
```

```
text(paste(sideData$X3MRGN), x=x.offset-210,  
y=sideData$dend.xy.height, cex=0.7)  
text(paste("3MRGN"), x = x.offset-210, y=58, cex=0.5,  
col="black")
```

11.2 Stellungnahme der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin an der Philipps-Universität Marburg vom 13.11.2017



Philipps-Universität - 35032 Marburg

Herrn
Prof. Dr. Michael Lohoff
Institut für Medizinische Mikrobiologie u.
Krankenhaushygiene
BMFZ
Hans-Meerwein-Str. 2
D-35043 Marburg

Fachbereich Medizin
Dekanat/Ethikkommission
Prof. Dr. med. Gerd Richter (Vors.)

Tel.: 06421 586 6487
Fax: 06421 586 6585
Sek.: D. Raiss/S. Hausmann
E-Mail: ethikkom@staff.uni-marburg.de
Anschrift: Baldingerstrasse/Postfach 2300
35032 Marburg
Web: www.med.uni-marburg.de/ethikkomm
Az.: ek_mr_151117_lohoff

Marburg, den 15.11.2017

Ihr Schreiben vom 13.11.2017 (Mail)

Sehr geehrter Herr Prof. Lohoff,

in Ihrem Mailschreiben fragen Sie an, ob Sie Bakterienstämme die in der Routinediagnostik gewonnen wurden und in eine Bakterienbank (zur Aufbewahrung) gesammelt werden, zu Qualitätssicherungsmaßnahmen, Forschungsprojekten etc. benutzen können und inwiefern dazu eine formale Befassung durch die Ethikkommission notwendig ist.

Hier nehme ich wie folgt Stellung:

1. Die von Ihnen gesammelten Bakterienstämme können dann für solche Untersuchungen herangezogen werden, wenn Sie ohne Patientenbezug verwendet werden. Das gilt auch für Untersuchungen die bei der Identifizierung der Lokalisation (hier zum Beispiel Bettplatz) eingesetzt werden sollen. In diesem Zusammenhang ist eine formale Befassung durch die Ethikkommission nicht notwendig, ebenso entfällt eine Patienteneinverständniserklärung.
2. Sie fragen an inwiefern mit den isolierten Bakterienstämmen Forschungsprojekte durchgeführt werden können und ob dafür eine formale Befassung durch die Ethikkommission notwendig ist. Hier gilt, dass eine retrospektive Datenauswertung von routinemäßig erhobenen Daten in Ihrer Abteilung nicht nach unseren Statuten vorlagepflichtig bei der hiesigen Ethikkommission ist. Die retrospektive Auswertung sollte selbstverständlich anonymisiert erfolgen und personenbezogene Daten dürfen nur dann eingesehen werden, wenn diese Patienten in Ihrem Institut mitbehandelt worden sind. Auch hierfür ist keine Patienteneinverständnis notwendig.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen
für die Ethik-Kommission des
Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

Prof. Dr. med. G. Richter
(Vorsitzender Ethikkommission)

Sekretariat : Frau Raiss Montag – Donnerstag 8.00 – 12.00 Uhr, Freitag 8.00 – 11.00 Uhr
Frau Hausmann Montag – Freitag 12.00 – 14.00 Uhr

Kommissionsmitglieder: Prof. Dr. Jens Puschke, Prof. Dr. Dr. H. Brettel, Prof. Dr. med. J.-C. Krieg, Prof. Dr. med. Czubayko, Prof. Dr. med. G. Richter (Vorsitzender), PD Dr. Carola Seifart, Prof. Dr. med. Uwe Wagner (stellvertretender Vorsitzender), Prof. Dr. med. R. Maier, Prof. Dr. med. N. Donner-Banzhoff, PD Dr. Hans-Heige Müller Dr. rer. nat. Nina Timmesfeld, Prof. Dr. med. A. Neubauer, PD Dr. B. Tackenberg, PD Dr. Barbara Fritz Bettina Nieth, Dr. Thomas Neubert, cand. med. Martin Koch, cand. med. Christian Kreisel,

11.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Adamkiewicz, Al Fakhri, Arenz, Arndt, Baranovski, Baranovski, Bartsch, Baum, Becker, Becker, Bepler, Berger, Best, Bette, Bertoune, Bien, Brehm, Brödje, Burchert, Carl, Cetin, Czubayko, Dannlowski, Decher, Del Rey, Dodel, Donner-Banzhoff, Efe, Eickmann, El-Zayat, Engenhardt, Cabillic, Fendrich, Feuser, Fölsch, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Galambos, Garn, Götze, Gress, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Haberhausen, Helwig-Rolig, Hertl, Herz, Heyse, Höffken, Hofmann, Hoyer, Hundt, Jerrentrup, Kann, Kappus, Kerwat, Kill, Kinscherf, Kircher, Knipper, König, Konrad, Koolman, Krones, Kruse, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisner, Möller, Moll, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oberthür, Oertel, Oliver, Opitz, Ossendorf, Pagenstecher, Pantazis, Peterlein, Plant, Plöger, Preisig-Müller, Quint, Reese, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Riße, Ritter, Ritz, Rivera Gil, Roelcke, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schönbauer, Schratt, Schüttler, Schütz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Shams-Eldin, Sherwood, Skwara, Sommer, Sprenger, Stahl, Steininger, Steinmetzer, Steitz-Naumann, Stibane, Stief, Stiewe, Strik, Strüwer, Subtil, Thieme, Thum, Thursar, Timmesfeld, Toussaint, Völlger, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Wahl, Weber, Weihe, Weisser, Werner, Westermann, Wilhelm, Wittig, Wulf, Wrocklage, Zavorotnyy.

