

## 5 Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt mit denen zwei verschiedene Zielsetzungen verfolgt wurden. Der erste Teil der Arbeit umfasst die Möglichkeiten der Charakterisierung, Differenzierung und Identifizierung von verschiedenen klinisch relevanten Mikroorganismen mittels schwingungsspektroskopischer Techniken, wobei sowohl Bakterien als auch Hefen Gegenstand der Untersuchung waren. Hierbei wurde zum einen ein Schwerpunkt auf den Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Techniken (FTIR- und RAMAN-Spektroskopie) gelegt, als auch eine vergleichende Betrachtung mit den Ergebnissen der konventionellen phänotypischen und genotypischen Techniken angestellt. Des Weiteren wurden verschiedene chemometrische Auswerteverfahren hinsichtlich ihrer Diskriminierungsfähigkeit untersucht und bewertet.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Potenzial von schwingungsspektroskopischen Techniken zur Detektion des Empfindlichkeitsverhaltens von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika. Dieser Abschnitt lässt sich wiederum in zwei Abschnitte aufteilen. Der erste Teil beschreibt die Möglichkeiten zwischen Antibiotikaisensitiven und resistenten Stämmen auf Basis ihrer Spektren *per se* zu differenzieren. Im zweiten Teil hingegen werden die Ergebnisse eines neu entwickelten mikrospektrometrischen Versuchsansatzes zur Untersuchung der Wechselwirkung von resistenten und sensitiven Zellen mit einem antimikrobiellen Agens vorgestellt.

### 5.1 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Enterococcus*

*Enterococcus* Spezies zählen heute neben *S. aureus* weltweit zu den führenden Hauptverursachern von nosokomialen Infektionen [16]. Daher ist eine schnelle und vor allem präzise Identifizierung von Enterokokken essenziell, um neben der Unterstützung von Infektionskontrollen und epidemiologischen Studien den schnellen und zielgerichteten Einsatz von Antibiotika gewährleisten zu können. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse einer vergleichenden phänotypischen, genotypischen und schwingungsspektroskopischen (FTIR und RAMAN) Studie vorgestellt, die an einer Auswahl von sechs verschiedenen *Enterococcus* Spezies durchgeführt wurde [59]. Die Stämme wurden im Rahmen eines EU-Projektes (MIDAS) von einem der Kooperationspartner (Dr. Allouch) zur Verfügung gestellt.

**Phänotypische Identifizierung durch das API System** Eine erste auf konventionellen phänotypischen Techniken basierende Typisierung, die mittels des API-

## 5 Ergebnisse

Systems (BIOMERIEUX, Marcy l'Etoile, Frankreich) erfolgte, resultierte in den in Tabelle 3.1 auf Seite 41 vorgestellten Identifizierungsergebnissen. Danach wurden von den insgesamt 18 untersuchten Stämmen, fünf als *E. faecium* (die Stämme 1, 5, 12, 15 und 19) und sechs als *E. faecalis* (die Stämme 4, 9, 10, 11, 13 und 17) identifiziert. Drei Isolate wurden als *E. hirae* (die Stämme 2, 3 und 17) und zwei als *E. durans* (die Stämme 6 und 8) identifiziert. Von den verbleibenden zwei Isolaten wurde ein Isolat als *E. gallinarum* (Stamm 14) und das andere als *E. casseliflavus* identifiziert.

**Vergleich zwischen der phänotypischen Identifizierung und der FTIR Analyse** Alle in Tabelle 3.1 auf Seite 41 aufgelisteten Enterokokken Stämme wurden gemäß dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verfahren als Bakterienfilme präpariert und anschließend die Spektren der getrockneten Bakterienfilme gemessen. Insgesamt

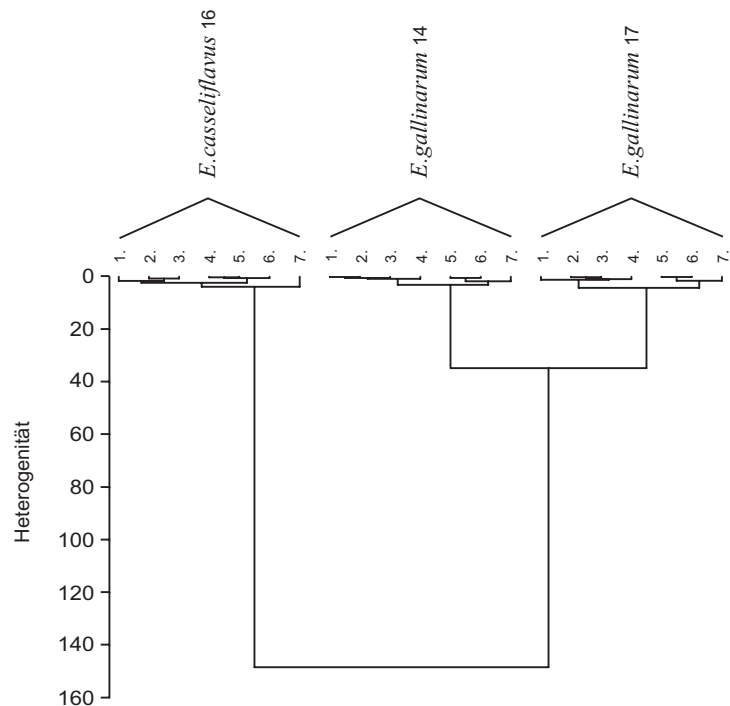


Abbildung 5.1: Dendrogramm der Clusteranalyse der FTIR Spektren der zwei *Enterococcus* Spezies *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* unter Einbeziehung der drei Spektralbereiche von  $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ ,  $900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  und  $1500\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  nach der Methode von WARD. Es wurden alle sieben Wiederholungsmessungen in die Clusteranalyse miteinbezogen, um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu visualisieren.

wurden sieben Wiederholungsmessungen über einen Zeitraum von einem Jahr an unabhängigen Probenpräparationen von allen Stämmen durchgeführt, die in der Aufnahme von 126 Spektren resultierten. Die Wiederholungsmessungen des gleichen Stammes wurden von Kulturen aufgenommen, die auf unterschiedlichen Chargen des glei-

## 5.1 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Enterococcus*

chen Mediums (CASO-Agar) gewachsen waren. Die Wiederholungsmessungen wurden durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Messungen beurteilen zu können. Das in Abbildung 5.1 auf der vorherigen Seite dargestellte Dendrogramm zeigt das Ergebnis einer Clusteranalyse nach WARD, die exemplarisch mit allen Wiederholungsmessungen der beiden *Enterococcus* Spezies *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* durchgeführt wurde. Die hohe Reproduzierbarkeit der Messungen ist anhand der stammspezifischen Subcluster evident, die alle sieben Wiederholungsmessungen des jeweiligen Stammes umfassen. Darüber hinaus wurden die Mittelwertspektren ( $x_M$ ) aus den sieben Wie-

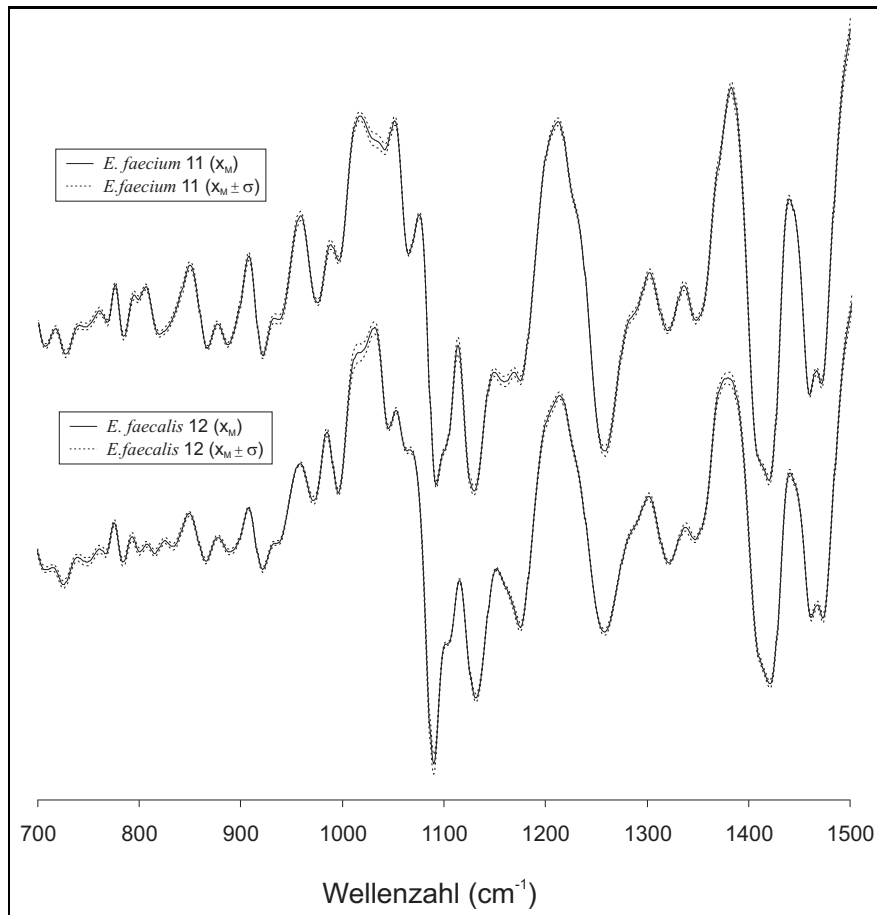


Abbildung 5.2: Mittelwertsspektren der vektornormierten ersten Ableitungen von zwei *Enterococcus* Spezies *E. faecalis* 11 und *E. faecium* 12 im Bereich von 700–1500 cm<sup>-1</sup>. Es sind die Mittelwertsspektren aus jeweils sieben Wiederholungsmessungen mit ihren Standardabweichungen dargestellt.

derholungsmessungen für jeden Stamm und die entsprechenden Standardabweichungen ( $x_M \pm \sigma$ ) berechnet. Die normierten ersten Ableitungen der Mittelwerte aus jeweils sieben Messungen mit ihren Standardabweichungen sind beispielhaft für die Spezies

## 5 Ergebnisse

*E. faecalis* 11 und *E. faecium* 12 in Abbildung 5.2 auf der vorherigen Seite im Bereich von 700 bis 1500  $\text{cm}^{-1}$  dargestellt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Standardabweichungen der Mittelwerte beider Spektren verglichen mit den spektralen Unterschieden, die zwischen den beiden Spezies z. B. im Bereich von 1050 bis 1150  $\text{cm}^{-1}$  zu beobachten sind, sehr gering ausfallen und auch lediglich relative Unterschiede in den Peakintensitäten beinhalten. Hingegen sind keine Peakverschiebungen oder das Auftreten von anderen Banden in den Spektren der Standardabweichungen zu beobachten. Ein repräsentativer Datensatz bestehend aus jeweils vier <sup>1</sup> Wiederholungsmessungen aller Stämme wurde einer multivariaten statistischen Analyse unterzogen, um das Diskriminierungspotenzial der spektralen Information für diese taxonomische Fragestellung zu überprüfen. Typische 1. Ableitungen der IR-Spektren der sechs verschiedenen *Enterococcus* Spezies sind in Abbildung 5.3 für die spektralen Bereiche dargestellt, die auch für die Berechnung der spektralen Distanzen verwendet wurden.

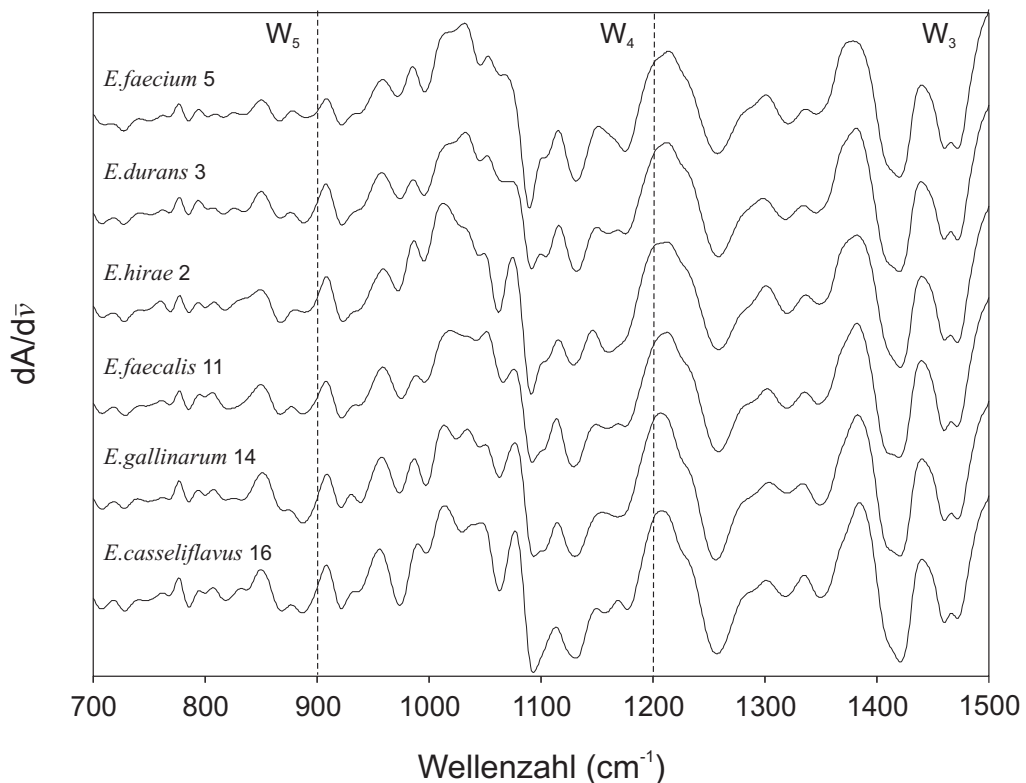


Abbildung 5.3: Typische erste Ableitungen der FTIR Spektren der sechs verschiedenen *Enterococcus* Spezies dargestellt in den Bereichen, die die größten spektralen Unterschiede aufweisen. Die spektralen Fenster bezeichnen  $W_3$ , den Bereich von 1200 bis 1500  $\text{cm}^{-1}$ , der gemischte Bereich,  $W_4$ , den Bereich von 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$ , der Polysaccharidbereich und  $W_5$ , den Bereich von 900 bis 700  $\text{cm}^{-1}$ , der Fingerprintbereich.

<sup>1</sup>Diese Auswahl wurde aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit getroffen.

## 5.1 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Enterococcus*

Die Abbildung 5.3 offenbart die spektralen Unterschiede, die für die Differenzierung der sechs *Enterococcus* Spezies verantwortlich sind. Jedoch konnten die Unterschiede noch nicht mit biochemischen bzw. chemischen Strukturen korreliert werden.

Eine hierarchische Clusteranalyse basierend auf den spektralen Informationen, die in den drei verschiedenen spektralen Bereichen – von 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$ , dem Polysaccharidbereich, von 900 bis 700  $\text{cm}^{-1}$ , dem Fingerprintbereich und von 1500 bis 1200  $\text{cm}^{-1}$ , dem gemischten Bereich, enthalten sind – wurde als Klassifizierungsmethode angewandt, die in dem Dendrogramm, das in Abbildung 5.4 auf der nächsten Seite dargestellt ist, resultierte. Es ist eine klare Differenzierung in sechs distinkte Cluster zu beobachten. Jedoch steht die Gruppierung einiger Stämme im Widerspruch zu den Ergebnissen der herkömmlichen phänotypischen Identifizierung. Auffällig ist vor allem die signifikante Differenzierung zwischen den beiden am häufigsten vorkommenden *Enterococcus* Spezies in zwei klar voneinander getrennte Cluster, wobei alle bis auf einen *E. faecium* Stamm (Stamm 15) in einem Cluster auftreten, während alle *E. faecalis* Stämme (die Stämme 4, 9, 10, 11, 13, und 18) in dem anderen Cluster gruppiert sind. Bei einer näheren Betrachtung werden die Inkonsistenzen zwischen den beiden Methoden deutlich. Das Dendrogramm vermittelt den Eindruck, dass zwischen den Stämmen 2 und 6 und auch zwischen den Stämmen 3 und 8 eine große spektrale Ähnlichkeit besteht, die jedoch im eindeutigen Widerspruch zu der phänotypischen Identifizierung steht. Diese Ergebnisse können entweder darauf hindeuten, dass die FTIR-Klassifizierung nicht geeignet ist für die Differenzierung von Enterokokken oder dass die vier Stämme mittels der konventionellen Techniken nicht korrekt typisiert worden sind. Weitere Diskrepanzen zwischen der FTIR und der konventionellen Methode betreffen Stamm 17, der als *E. hirae* von dem API System typisiert wurde, aber in der FTIR-Analyse zusammen in einem Cluster mit *E. gallinarum* (Stamm 14) auftritt.

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Identifizierung von seltenen *Enterococcus* Spezies, wie *E. hirae* und *E. durans*, mittels konventioneller Identifizierungssysteme, wie dem hier verwendeten API System nicht zuverlässig sind. Hierzu finden sich auch mehrere Hinweise in der Literatur [60, 61]. Tatsächlich sind in Studien, die sich mit der Bewertung der geläufigen kommerziell erhältlichen Bakterien-Identifizierungssysteme beschäftigen, vermehrt Probleme bei der Identifizierung von *Enterococcus* Spezies beobachtet worden [61, 62]. Fehlerquoten für die Identifizierung von Enterokokken Spezies zwischen 2 und 21% für *E. faecalis*, von 5 bis 9% für *E. faecium*, und zwischen 14 und 79% für alle anderen Spezies sind für diese Systeme gefunden worden [63]. Singer *et al* berichten beispielsweise von einem hohen Prozentsatz an Fehlidentifizierungen, die bei der Analyse von Isolaten eines VRE Ausbruchs in einem Krankenhaus nach der Einführung einer automatischen Identifizierungssystemsoftware auftraten (VITEK Identifizierungskarte für GRAM-positive Bakterien) [64]. Er zog aus der Studie die Schlussfolgerungen, dass „die automatisierte mikrobielle Analyse eine potenzielle Fehlerquelle darstellt, die nicht leicht erkannt wird“ [64].

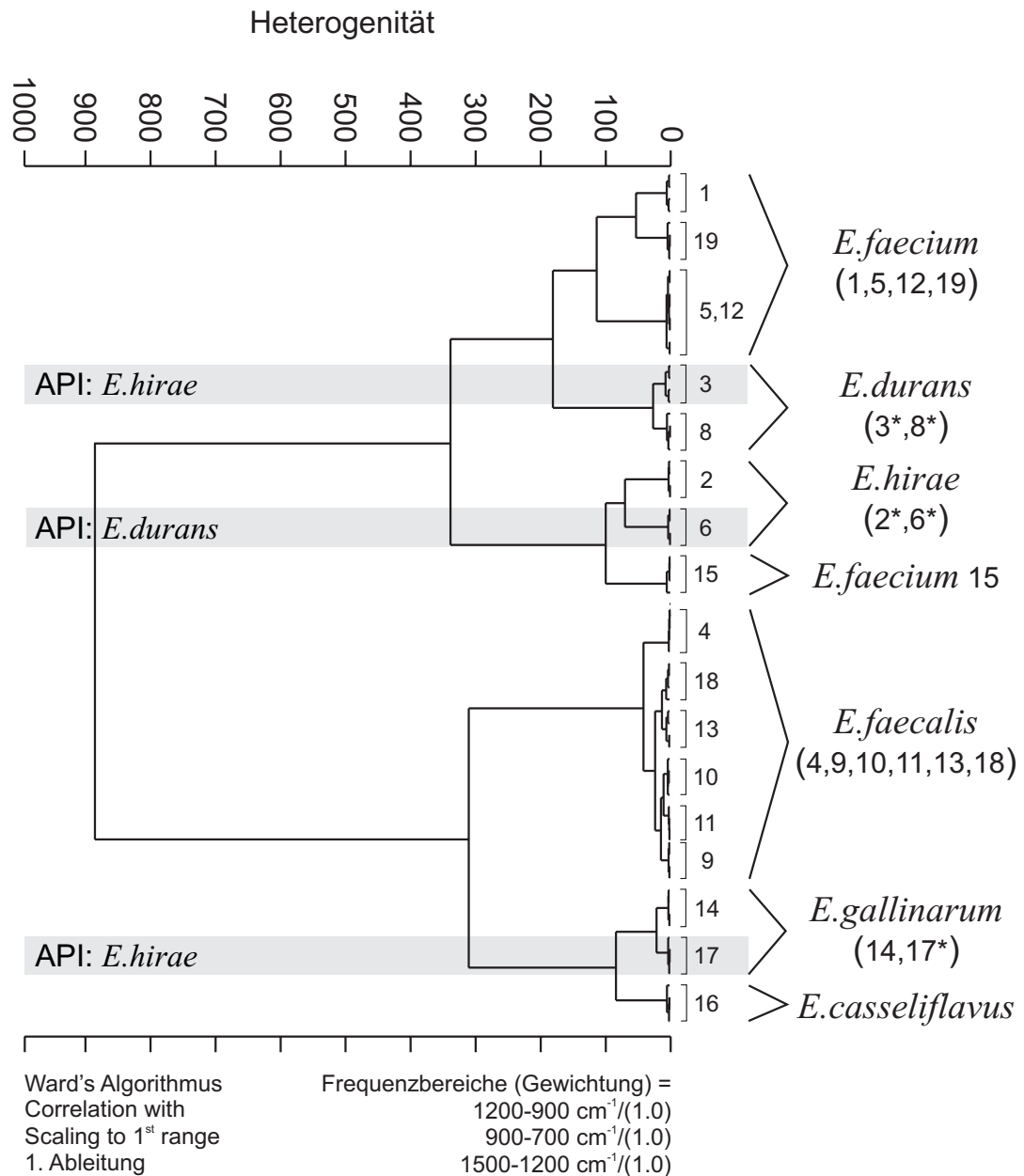


Abbildung 5.4: Dendrogramm der Clusteranalyse der 1. Ableitungen der FTIR-Spektren der sechs verschiedenen *Enterococcus* Spezies unter Einbeziehung der spektralen Bereiche von 1200–900 cm<sup>-1</sup>, 900–700 cm<sup>-1</sup> und von 1500–1200 cm<sup>-1</sup> nach der Methode von WARD. Es wurden vier Wiederholungsmessungen in die Analyse miteinbezogen. Die Identität der Stämme, die mit einem Stern markiert sind, stimmt nicht mit der phänotypischen Identifizierung durch das API-System überein. Die grauen Balken markieren die Identität einiger bestimmter Stämme durch das API-System.

## 5.1 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Enterococcus*

**Spezies Identifizierung mittels MicroScan, PCR und 16S-RNA-Sequenzierung** Zur Klärung der aufgetretenen Diskrepanzen zwischen der FTIR-spektroskopischen und der phänotypischen Klassifizierung wurden weitere diagnostische Untersuchungsmethoden herangezogen. Zum einen wurde ein weiterer auf phänotypischen Merkmalen basierender automatisierter Test, der MICROSCAN- (Dade Interantional, MICROSCAN Inc., West Sacramento, Kalifornien) Test und zum anderen ein Spezies-spezifischer PCR- Ansatz zur Identifizierung von allen 18 Stämmen eingesetzt. In Tabelle 5.1 sind nur die Identifizierungsergebnisse der fünf nicht eindeutig typisierten Stämme (Stämme 2, 3, 6, 8 und 17) zusammengefasst, da alle anderen Stämme mittels der verschiedenen Techniken übereinstimmend identifiziert werden konnten. Ähnlich den Ergebnissen, die mit dem ersten miniaturisierten Identifizierungssystem

Tabelle 5.1: Identifizierung der fünf nicht eindeutig typisierten Stämme basierend auf phänotypischen, genotypischen und schwingungsspektroskopischen Daten

Stamm	Identifizierung mittels				
	API	FTIR- und RAMAN-Clusterbildung <sup>a</sup>	MICROSCAN	PCR	16S-RNA-Sequenzierung
2	<i>E. hirae</i>	6	<i>E. durans</i>	– <sup>b</sup>	<i>E. hirae</i>
3	<i>E. hirae</i>	8	<i>E. durans</i>	– <sup>b</sup>	<i>E. durans</i>
6	<i>E. durans</i>	2	<i>E. durans</i>	– <sup>b</sup>	<i>E. hirae</i>
8	<i>E. durans</i>	3	<i>E. durans</i>	– <sup>b</sup>	<i>E. durans</i>
17	<i>E. hirae</i>	14 ( <i>E. gallinarum</i> )	<i>E. durans</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i>

<sup>a</sup> Die Zahlen geben Aufschluss darüber, mit welchem Stamm der betreffende Stamm zusammen in einem Cluster auftritt

<sup>b</sup> nicht identifizierbar mittels PCR

(API) erzielt wurden, scheiterte auch das MICROSCAN-System bei dem Versuch, die eher selten auftretenden *Enterococcus* Spezies eindeutig zu identifizieren. Mit diesem System wurden alle fünf untersuchten Stämme als *E. durans* identifiziert. Dieses Identifizierungsergebnis steht wiederum im Widerspruch zu beiden, der API- und der FTIR-Analyse. Des Weiteren wurde eine PCR-Analyse der Spezies-spezifischen Gene, die für die Expression von D-Alanin:D-Alanin-(D-Ala:D-Ala)-Ligasen und den verwandten Glykopeptid-Resistenzenzymen kodieren, für alle 18 Stämme durchgeführt. Obwohl diese PCR-basierende Technik sehr spezifisch und auch sensitiv ist, können damit nur vier *Enterococcus* Spezies identifiziert werden<sup>2</sup>, nämlich *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus*, während die anderen Spezies unidentifiziert bleiben [12]. Daher konnten nur 14 der insgesamt 18 untersuchten Stämme mittels dieser Technik identifiziert werden. Die PCR-Analyse lieferte ein Ergebnis, das in guter Übereinstimmung zur FTIR-Klassifizierung steht. Besonders interessant ist dabei die Identifizierung einer der fünf nicht eindeutig typisierten Stämme (Stamm 17)

<sup>2</sup>Der Grund dafür ist, dass die Gene *VanA*, *VanB*, *VanC-1* und *VanC-2*, die mit dieser Technik detektiert werden, bei den übrigen Spezies nicht vorkommen.

als *E. gallinarum* mittels der PCR-Analyse, die demzufolge mit der FTIR-Analyse übereinstimmt, da Stamm 17 in dem Dendrogramm (siehe Abbildung 5.4) zusammen mit Stamm 14, einer *E. gallinarum* Spezies, in einem Cluster auftritt.

Für die fünf *Enterococcus* Spezies, deren phänotypische und genotypische Identifizierung von der FTIR-Klassifizierung differierte, wurde eine 16S-RNA-Sequenzierung durchgeführt, um abschließend die Genauigkeit aller involvierten Methoden beurteilen zu können. Die 16S-RNA-Sequenzierung wird als „Goldstandard“ für die Identifizierung von Mikroorganismen auf Speziesebene betrachtet. Die prokaryotische rRNA (ribosomale RNA) enthält zahlreiche Regionen mit äußerst konstanter Sequenz, die nützlich sind, um die richtige Ausrichtung der Sequenz festzulegen. In anderen Regionen des Moleküls besitzt die rRNA jedoch eine ausreichende Sequenzvariabilität, um in eindeutiger Art und Weise mikrobielle Verwandtschaftsbeziehungen zu bestimmen. Dabei hat sich bei den Prokaryoten von den drei möglichen rRNA-Molekülen die 16S-Untereinheit vor allem deshalb zur Bestimmung von phylogenetischen Beziehungen bewährt, da sie aufgrund ihrer Größe (circa 1500 Nucleotide) experimentell besser zu handhaben ist als die 23S-Untereinheit, die etwa doppelt so viele (2900) Nucleotide aufweist. Hingegen ist die 5S-rRNA für phylogenetische Untersuchungen weniger geeignet. Der Grund hierfür ist ihre geringe Größe ( $\sim 120$  Nucleotide), wodurch der Informationsgehalt, der aus dieser Untereinheit gewonnen werden kann, stark eingeschränkt ist [7]. Das entsprechende Gegenstück für die Aufklärung der Phylogenie von Eukaryoten ist die 18S-rRNA.

Das Ergebnis der 16S-RNA-Sequenzierung für die fünf nicht eindeutig typisierten Stämme stellte eine Bestätigung der FTIR-Klassifizierung dar. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass von allen verwendeten Typisierungstechniken nur die FTIR-Analyse mit dem Ergebnis der 16S-RNA-Sequenzierung übereinstimmte (siehe Tabelle 5.1 auf der vorherigen Seite). Aus Tabelle 5.1 wird ersichtlich, dass die 16S-RNA-Sequenzierung die Stämme 2 und 6 als *E. hirae* und die Stämme 3 und 8 als *E. durans* identifizierte, wodurch die FTIR-Klassifikation unterstützt wird, die zu zwei distinkten Clustern für diese Spezies führte. Weiterhin wurde Stamm 17, der ursprünglich mittels des API-Systems als *E. hirae* typisiert wurde, als *E. gallinarum* bestimmt, wobei dieses Ergebnis wiederum die FTIR-Analyse und auch das PCR-Resultat bestätigt. Diese Ergebnisse demonstrieren die sehr gute Diskriminierungsfähigkeit und taxonomische Potenz der FTIR-Technik auf der einen Seite, aber sie legen auch die offensichtlichen Nachteile der API- und MICROSCAN-Systeme dar.

**Klassifizierung mittels Raman-Spektroskopie** Die Klassifizierungsergebnisse, die in dem Dendrogramm in Abbildung 5.4 dargestellt sind, konnten auch mit der FT-NIR-RAMAN-Spektroskopie reproduziert werden. In Abbildung 5.5 auf der nächsten Seite sind die Originalspektren jeweils eines Stammes der sechs verschiedenen Spezies in dem Bereich von  $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$  dargestellt, in dem die größten spektralen Unterschiede auftraten. Die RAMAN-Spektroskopie führte für fast alle Stämme (bis auf einen Stamm *E. hirae* 6) zur korrekten Spezies Differenzierung, wenn die Clusteranalyse unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von  $400$  bis  $1800\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt



## 5.1 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Enterococcus*

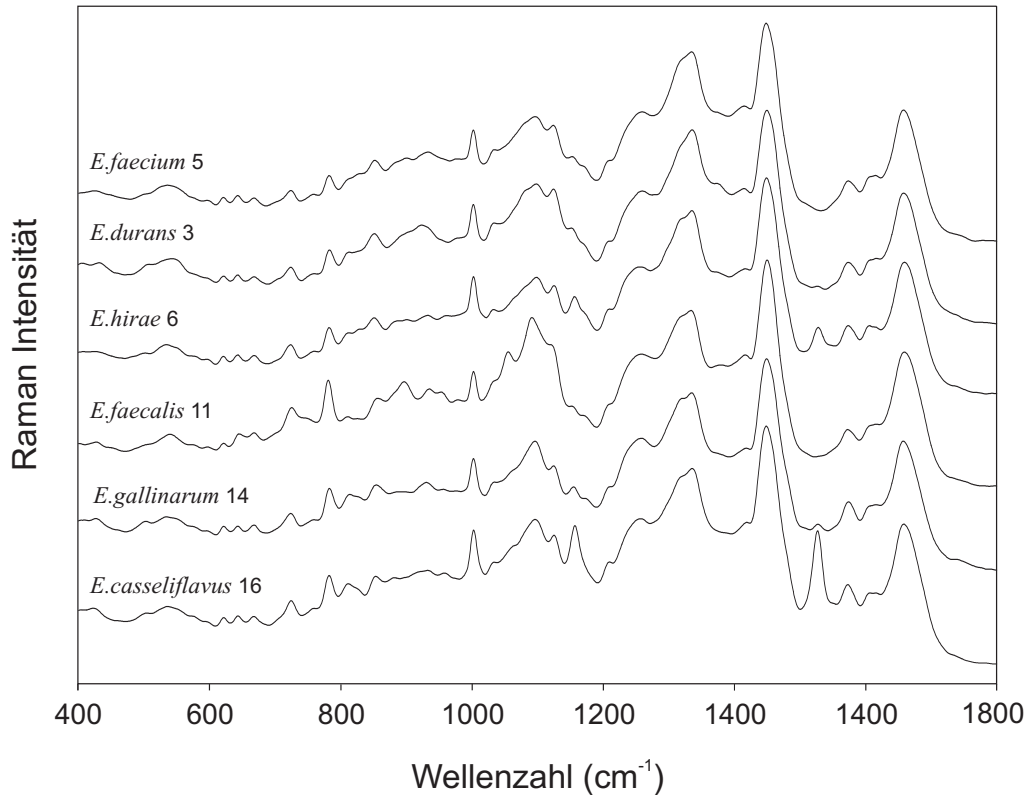


Abbildung 5.5: Typische RAMAN- Originalspektren der sechs verschiedenen *Enterococcus* Spezies dargestellt in dem Bereich von 400–1800  $\text{cm}^{-1}$ , in dem die größten spektralen Unterschiede auftreten.

wurde (Abbildung 5.6 auf der nächsten Seite). Erstaunlicherweise deutet das RAMAN-Dendrogramm im Gegensatz zu dem FTIR-Dendrogramm darauf hin, dass der *E. casseliflavus* Stamm nur eine geringe spektrale Ähnlichkeit zu allen anderen Stämmen aufweist. Dieser Unterschied kann auf die zusätzlichen Banden zurückgeführt werden, die bei dem in Abbildung 5.7 auf Seite 71 dargestellten RAMAN-Spektrum auftreten. Spezifische bakterielle Bestandteile wie Pigmente sind die Ursache für diese zusätzlichen RAMAN-Signale, die von erheblicher Intensität sind, was auf den so genannten prä-Resonanzeffekt zurückzuführen ist. Die in dem Spektrum von *E. casseliflavus* auftretenden Banden bei  $1160 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C}-\text{C})$ ] und bei  $1529 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C}=\text{C})$ ] sind Markerbanden, die darauf hinweisen, dass das gelb bis orange gefärbte Pigment von *E. casseliflavus* (Stamm 16) auf eine Carotinoid-Struktur zurückzuführen ist. Carotinoide sind in der Regel gelb, rot, braun oder grün und absorbieren Licht aus dem blauen Bereich des Spektrums. Diese Farbpigmente bestehen aus langen Kohlenwasserstoffketten mit alternierenden C – C- und C = C- Bindungen, also einem konjugierten Doppelbindungssystem, das für das Auftreten der beiden Markerbanden in dem Raman-Spektrum verantwortlich ist.

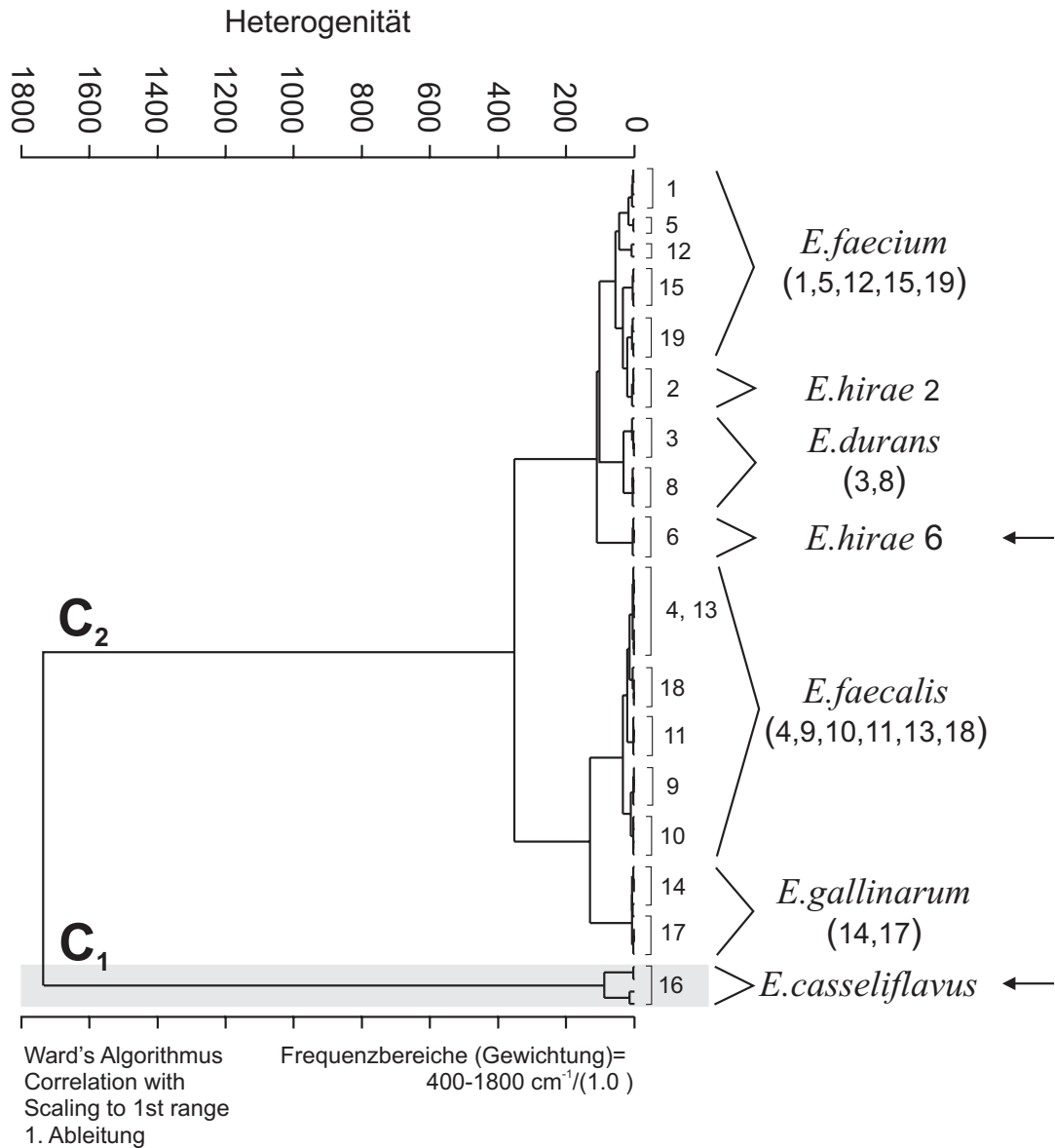


Abbildung 5.6: Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der RAMAN-Spektren der sechs verschiedenen *Enterococcus* Spezies unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von 400–1800 cm<sup>-1</sup> nach der Methode von WARD. C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> bezeichnen die beiden Hauptcluster. Die Pfeile markieren die beiden Stämme, die ein konträres Clusterverhalten verglichen mit dem FTIR-Dendrogramm in Abbildung 5.4 auf Seite 66 aufweisen.

Bei den Carotinoiden handelt es sich um hydrophobe Pigmente, die fest in die Membran eingebettet sind. Die Struktur eines typischen Carotinoids ( $\beta$ -Carotin) ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Carotinoide übernehmen in Zellen die wichtige Funkti-

## 5.1 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Enterococcus*

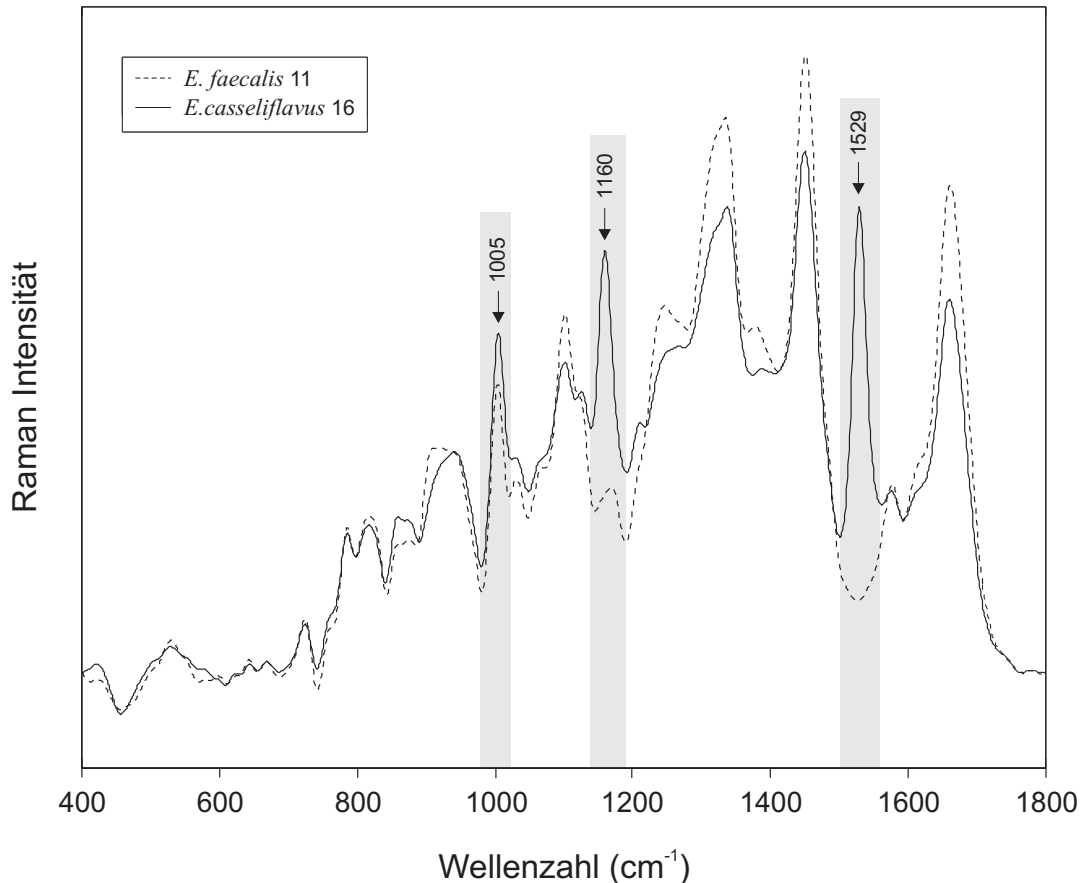


Abbildung 5.7: Spektraler Vergleich der RAMAN-Spektren des *E. casseliflavus* Stamm 16 und des *E. faecalis* Stamm 11. Das RAMAN-Spektrum des pigmentierten *E. casseliflavus* zeigt prä-Resonanz verstärkte Banden, die durch Carotinoide hervorgerufen werden. Drei charakteristische Banden bei 1005, 1155 und 1529  $\text{cm}^{-1}$  sind deutlich zu erkennen.

on eines photoprotektiven Agens. Helles Licht kann für Zellen schädlich sein, da es Photooxidierungsreaktionen verursacht, bei denen toxische Sauerstoffarten wie z. B. Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) entstehen, die zur Zerstörung des Photosyntheseapparats führen können. Carotinoide verhindern dies, indem sie die toxischen Sauerstoffarten auslöschen und zudem einen großen Teil des schädlichen Lichtes absorbieren<sup>3</sup>. Darüber hinaus sind Carotinoide eng mit Chlorophyll oder Bacteriochlorophyll assoziiert. Sie nehmen zwar nicht direkt an den Photophosphorylierungsreaktionen teil, können jedoch Energie zum Reaktionszentrum übertragen, die dann bei der Pho-

<sup>3</sup>Dies geschieht z. B. mittels Energietransfer, bei dem der Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) in den nicht-toxischen Triplett-Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ ) umgewandelt wird. Dabei wird auch das Carotinoid, das quasi als Katalysator agiert, in einen Triplettzustand überführt. Durch Energieabgabe in Form von Wärme kann es wieder in seinen Grundzustand zurückkehren [65].

## 5 Ergebnisse

tophosphorylierung auf die gleiche Weise genutzt werden kann wie die direkt vom Chlorophyll eingefangene Lichtenergie.

Bei einer eingehenden Analyse der Spektren konnte die ebenfalls im Gegensatz zum FTIR-Dendrogramm stehende Gruppierung des *E. hirae* Stammes 6 im RAMAN-Dendrogramm auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass auch dieser Stamm geringe Mengen an Carotinoiden exprimiert. Diese Tatsache wird in Abbildung 5.8 deutlich, in der das Differenzspektrum von dem gering pigmentierten *E. hirae* Stamm 6 und dem pigmentfreien *E. hirae* Stamm 2 berechnet wurde. In dem Differenzspek-

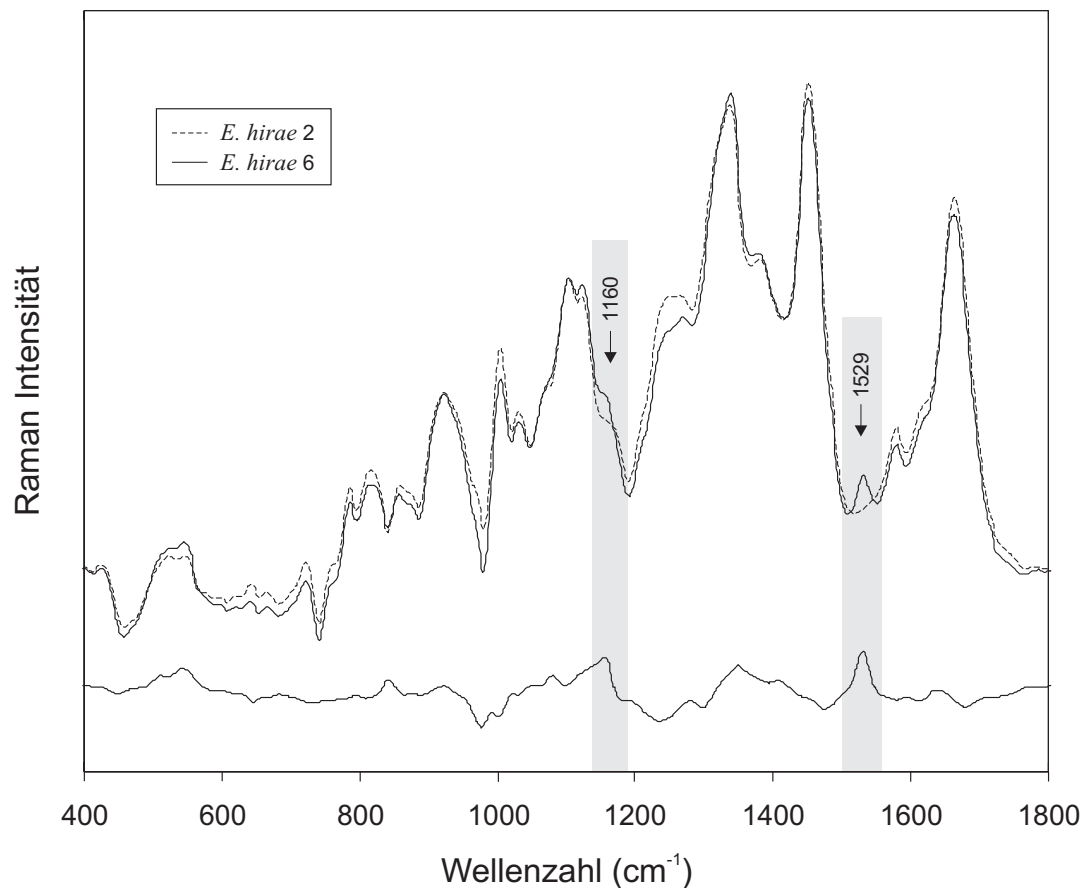


Abbildung 5.8: Spektraler Vergleich der RAMAN-Spektren der beiden *E. hirae* Stämme 2 und 6. Das Differenzspektrum, das aus einer 1:1 Subtraktion des Spektrums von *E. hirae* 6 und *E. hirae* 2 resultiert, zeigt die für Carotinoide charakteristischen Banden bei  $1160\text{ cm}^{-1}$  und  $1529\text{ cm}^{-1}$ .

trum treten die zuvor schon beschriebenen für Carotinoide typischen spektralen Banden bei  $1160\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C}-\text{C})$ ] und  $1529\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C}=\text{C})$ ] auf.

Auf der Basis dieser Erkenntnis wurde eine Clusteranalyse mit den RAMAN-Spektren durchgeführt, ohne die von den Carotinoiden dominierten Regionen zu berücksichtigen. Dies konnte durch eine spezifische Wellenlängenselektion erreicht werden, d. h.



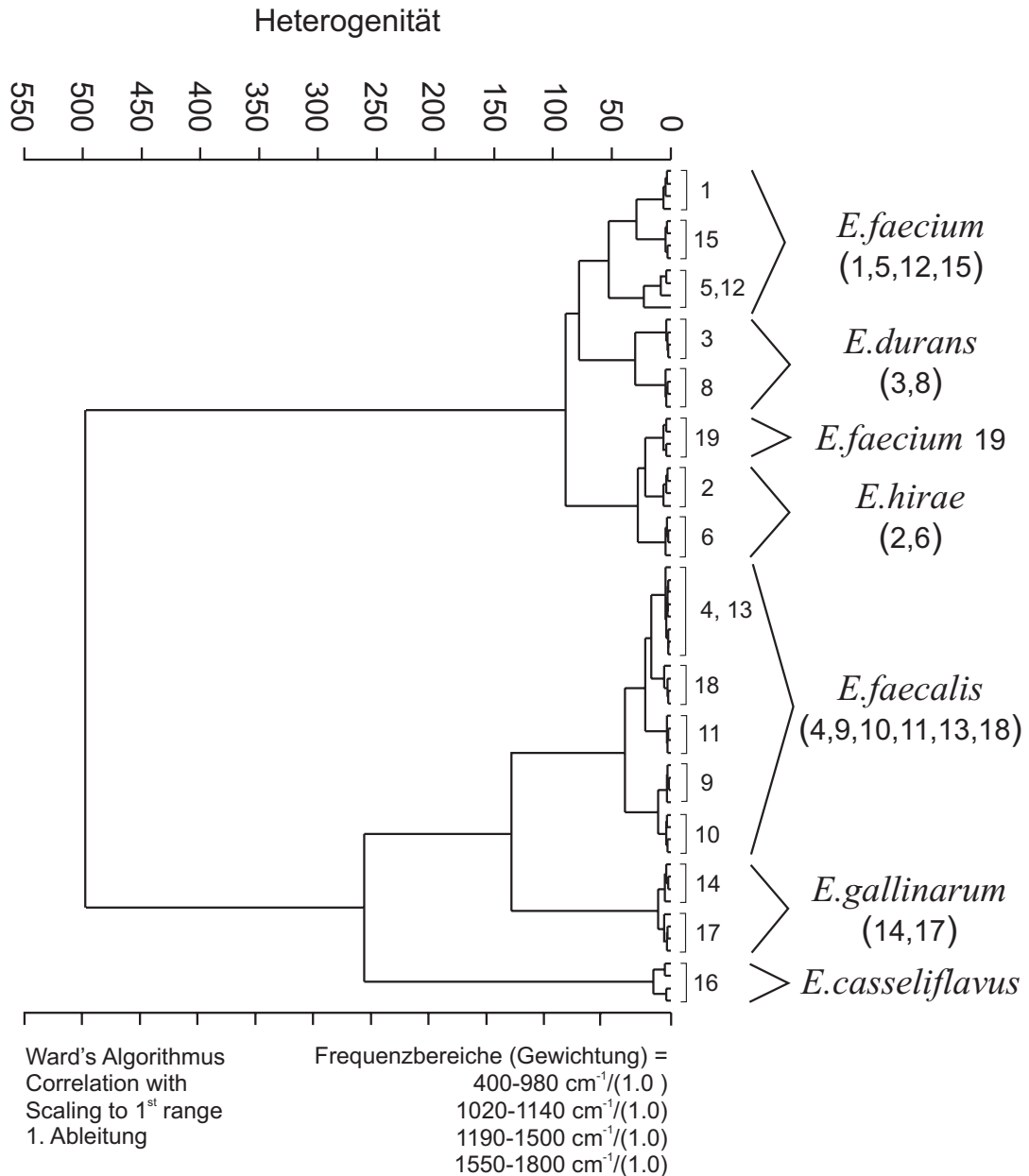


Abbildung 5.10: Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der RAN-Spektren der sechs verschiedenen *Enterococcus* Spezies nach Durchführung einer Wellenlängenselektion. Es wurden die spektralen Bereiche von 400–980 cm<sup>-1</sup>, von 1020–1140 cm<sup>-1</sup>, 1190–1500 cm<sup>-1</sup> und von 1550–1800 cm<sup>-1</sup> miteinbezogen, um die Carotinoid-spezifischen Bereiche aus der Analyse nach der Methode von WARD auszuschließen.

## 5.2 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Candida*

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse einer FTIR-spektroskopischen Studie an einer repräsentativen Auswahl von verschiedenen *Candida* Spezies vorgestellt. Diese Untersuchungen wurden im Hinblick auf zweierlei Aspekte durchgeführt. Zum einen galt es die Möglichkeit zu untersuchen, inwieweit eukaryotische Zellen, am Beispiel von Hefen, mit der FTIR-Spektroskopie differenziert und charakterisiert werden können. Darüber hinaus sollte auch eine vergleichende Betrachtung Aufschluss darüber geben, wie sich die prinzipiellen Unterschiede im Aufbau von Pro- und Eukaryoten auf die FTIR-Spektren auswirken. Insbesondere der hier untersuchten Gattung *Candida* kommt im Hinblick auf die zunehmende Inzidenz nosokomialer Infektionen durch diese imperfekte (keine Sporenbildung) Hefegattung eine klinische Relevanz zu, die den Einsatz und die Evaluierung von neuen Identifizierungstechniken sinnvoll macht.

**Phänotypische Identifizierung der *Candida* Stämme** Die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen wurden an den sieben Spezies der Gattung *Candida*, die im Hinblick auf ihre Pathogenität für den Menschen eine klinische Bedeutung aufweisen, nämlich *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, durchgeführt [67,68]. Insgesamt wurden 42 Stämme verschiedener Herkunft, wie z. B. klinische Isolate und Referenzstämme untersucht. Die Stämme waren zuvor mit phänotypischen Methoden typisiert worden. Diese beinhalteten nach Erhalt einer Reinkultur die Prüfung auf Pseudomyzelbildung nach Kultivierung des Isolates auf Reistweeagar, auch „Hungeragar“ genannt, um *C. albicans* bzw. *C. dubliniensis* Spezies von non-*C. albicans* zu unterscheiden. Bei Pseudomyzelen handelt es sich um sprossende Zellen ohne Abtrennung der Tochterzellen. Sowohl *C. albicans* als auch *C. dubliniensis* sind zur Pseudomyzelbildung befähigt, wobei *C. albicans* nur vereinzelte, lange Pseudomyzele bildet, während *C. dubliniensis* mehrere, kurze Pseudomyzele bildet. *C. albicans* lässt sich dann von *C. dubliniensis* abgrenzen, wenn zusätzlich zur Pseudomyzelbildung auch noch Chlamydosporenbildung bei der zu untersuchenden Hefe beobachtet wird. Hierbei handelt es sich um stark lichtbrechende runde Dauerformen, die für die am häufigsten vorkommende Spezies *C. albicans* charakteristisch sind. Eine weitere biochemische Differenzierung in die übrigen verschiedenen *Candida* Spezies wurde dann aufgrund ihres Zuckervergärungs- bzw. Assimilationsverhaltens getroffen. Hierzu wurde das kommerziell erhältliche API-ID-32C-Identifizierungssystem (BIOMERIEUX) benutzt<sup>4</sup>. Die Ergebnisse dieser phänotypischen Tests sind in Tabelle 3.8 auf Seite 46 wiedergegeben. Danach konnten sechs Stämme der Spezies *C. albicans*, sechs Stämme der Spezies *C. dubliniensis*, sechs Stämme der Spezies *C. tropicalis* und fünf Stämme der Spezies *C. kefyr* zugeordnet werden. Von den verbleibenden Stämme wurden 6 als *C. parapsilosis* und die restlichen sieben als *C. glabrata* identifiziert.

<sup>4</sup>Die phänotypischen Untersuchungsergebnisse wurden uns freundlicherweise von der Mykologie des RKI zur Verfügung gestellt.

**Vergleich zwischen der phänotypischen Identifizierung und der FTIR-Analyse** Alle in Tabelle 3.8 auf Seite 46 aufgeführten *Candida* Stämme wurden gemäß dem in Abschnitt 4.1.1 auf Seite 49 beschriebenen Verfahren als Hefefilme präpariert und anschließend die Spektren der getrockneten Filme gemessen. Typische zweite Ableitungen von jeweils einem Stamm der sieben verschiedenen Spezies sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Die Spektren sind in dem spektralen Bereich von 700 bis 1800  $\text{cm}^{-1}$  abgebildet. In diesem Bereich traten die größten spektralen Unterschiede auf, die auch in die Clusteranalyse miteinbezogen wurden. Die gestrichelten, vertikala-

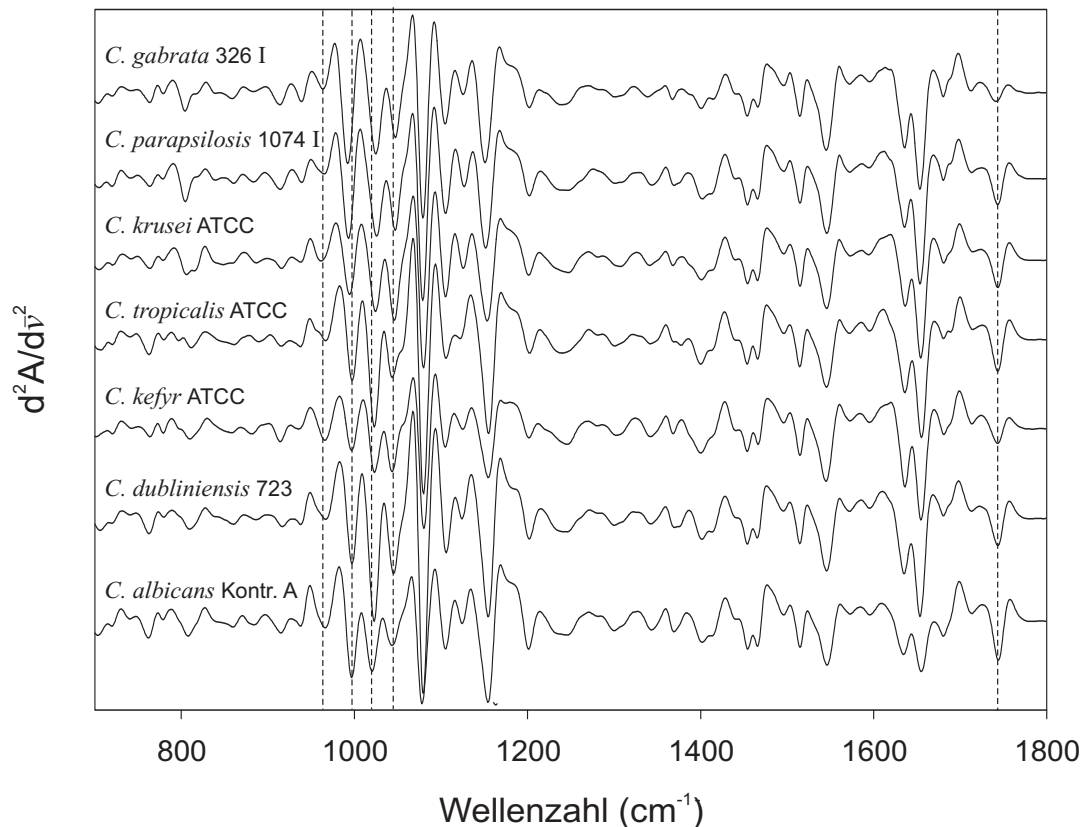


Abbildung 5.11: Typische zweite Ableitungen der sieben verschiedenen *Candida* Spezies dargestellt in dem spektralen Bereich von 700–1800  $\text{cm}^{-1}$ . Die vertikalen gestrichelten Linien markieren Banden, in denen größere spektrale Unterschiede zwischen den Spezies sichtbar sind.

len Linien markieren Banden in denen größere Unterschiede sichtbar sind, wie z. B. die Esterabsorptionsbande bei 1740  $\text{cm}^{-1}$ , die bei den verschiedenen Spezies deutlich variierende Intensitäten aufwies. Bei dem Spektrum des Referenzstammes von *C. albicans* wies die Esterabsorptionsbande die größte Intensität auf. Aber auch in dem Wellenzahlenbereich von 1050–950 konnten einige Banden detektiert werden, die bei den verschiedenen Spezies beträchtlich variieren, jedoch ist in diesem spektralen Bereich eine Zuordnung sehr schwierig. In diesem Bereich absorbieren wie bereits unter



## 5.2 Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Candida*

1.3.2.2 erwähnt, u. a. die Zuckerringe und Phosphate von z. B. DNA und RNA. Die Vergleiche der Bandenintensitäten sind insofern zulässig, als dass alle Spektren auf die Tyrosinabsorptionsbande ( $\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$ ) normiert wurden und darauf geachtet wurde, dass die Präparationsbedingungen für alle Proben identisch waren.

Auch an den *Candida* Spezies wurden Wiederholungsmessungen an unabhängigen Probenpräparationen von allen Stämmen durchgeführt, die in der Aufnahme von 108 Spektren resultierten. Die Wiederholungsmessungen des gleichen Stammes wurden von Kulturen aufgenommen, die auf unterschiedlichen Chargen des gleichen Mediums (SABOURAUD 2% Glucose-Agar) gewachsen waren. Die Wiederholungsmessungen wurden durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Messungen beurteilen zu können. Eine Clusteranalyse wurde mit den Spektren von allen Wiederholungsmessungen unter Einbeziehung der spektralen Bereiche von 900 bis  $700 \text{ cm}^{-1}$ , von 1200 bis  $900 \text{ cm}^{-1}$ , von 1450 bis  $1200 \text{ cm}^{-1}$  und von 1780 bis  $1730 \text{ cm}^{-1}$  durchgeführt. Das aus der Clusteranalyse nach der Methode von WARD resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 5.12 auf der nächsten Seite dargestellt. In dem Dendrogramm sind zwei deutlich voneinander getrennte Hauptcluster zu erkennen, die jeweils aus Subclustern bestehen. Dabei umfasst der eine Hauptcluster  $C_1$  die Spezies *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* und der andere Hauptcluster  $C_2$  die Spezies *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata*. Diese Gruppierung korreliert mit phylogenetischen Studien basierend auf 18S-rRNA-Sequenzierungen, nach der die Spezies *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* eine höhere Verwandtschaft zueinander aufweisen als die Gruppe *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* und *C. glabrata* [69]. Darüber hinaus erfolgt eine eindeutige Trennung auf Speziesebene, da alle Stämme der jeweiligen Spezies in sieben klar voneinander getrennten Speziesclustern auftreten. Dabei fällt auf, dass der alle *C. glabrata* Stämme umfassende Speziescluster im Vergleich zu den anderen sechs Speziesclustern recht heterogen ist. Innerhalb dieses *C. glabrata* Speziesclusters ist eine weitere Differenzierung in zwei Subcluster zu beobachten. Der Subcluster  $S_1$  enthält die FTIR-Spektren von vier Stämmen, und zwar drei klinischen Isolaten und einem Referenzstamm (ATCC), während der andere Subcluster  $S_2$  die FTIR-Spektren von zwei klinischen Isolaten und einen Referenzstamm (ATCC) umfasst. Dieses auf spektroskopischen Daten basierende Ergebnis lässt sich mit dem Ergebnis von genotypischen Studien korrelieren. AP-PCR-Untersuchungen (vergleiche 1.1.3.3) an *C. glabrata* Isolaten von verschiedenen deutschen und ungarischen Zentren führten zu der Differenzierung von drei Hauptgenotypen für diese *Candida* Spezies, von denen zwei Genotypen eine weite Verbreitung aufwiesen [70]. Die beiden auf Basis der FTIR-Spektren gefundenen Subcluster repräsentieren möglicherweise diese zwei weitverbreiteten Genotypen .

Das Dendrogramm in Abbildung 5.12 belegt darüber hinaus, dass auch innerhalb der Gattung *Candida* eine Feindifferenzierung auf Stammebene möglich ist. Dies wird in dem vergrößert dargestellten *C. albicans* Speziescluster deutlich, in dem die Wiederholungsmessungen der verschiedenen Stämme in stammspezifischen Subclustern auftreten.

5 Ergebnisse

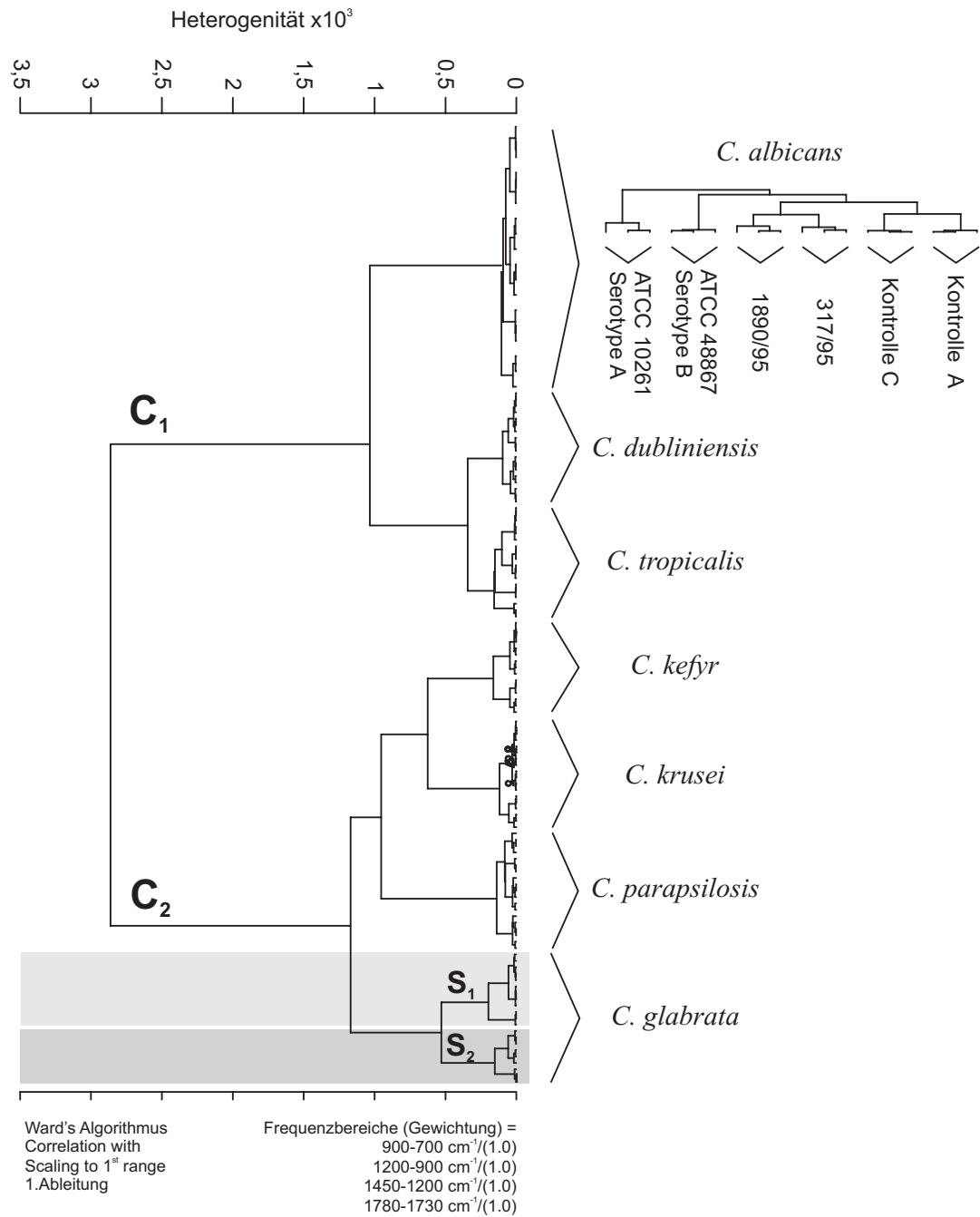


Abbildung 5.12: Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren der sieben verschiedenen *Candida* Spezies durchgeführt mit drei Wiederholungsmessungen nach der Methode von WARD. Die Feindifferenzierung auf Stammebene ist exemplarisch für die Spezies *C. albicans* dargestellt.

## 5.3 FTIR-Mikrospektrometrie

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Messungen an Mikrokolonien mittels der FTIR-Mikrospektrometrie beschrieben. Da diese Messungen erstmalig systematisch an einer repräsentativen Auswahl von Bakterien und Hefen erfolgten, u. a. mit dem Ziel des Aufbaus einer Referenzdatenbank, wurden zunächst einige methodische Aspekte untersucht, die in den beiden nachfolgenden Kapiteln näher erläutert werden.

### 5.3.1 Signal/Rausch-Verhältnis und Heterogenität von Mikrokolonien verschiedener Größen

Für den Aufbau einer Referenzdatenbank auf Basis von Mikrokoloniespektren zu Identifizierungszwecken musste einerseits die günstigste Koloniegröße mittels des Signal/Rausch-Verhältnisses bestimmt werden und andererseits war es essenziell, die Heterogenität innerhalb von Mikrokolonien verschiedener Wachstumsstadien bzw. Koloniegrößen zu evaluieren. Die Bestimmung der für die Messungen günstigsten Koloniegröße war bereits Bestandteil vorangegangener Arbeiten, auf die hier nur kurz eingegangen werden soll [71]. Hierbei mussten zwei Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen stand bei den mikrospektrometrischen Messungen an mikrobiellen Mikrokolonien der zeitliche Aspekt im Vordergrund, d. h. die Kolonien sollten so klein wie möglich sein, um die Kultivierungszeiten drastisch herabzusetzen und so die Identifizierung und Charakterisierung der Proben innerhalb eines Tages zu ermöglichen. Zum anderen sollte die Koloniegröße und damit die Menge der zu untersuchenden Zellmasse immer noch ein genügend hohes Signal/Rausch-Verhältnis gewährleisten. Im Vergleich zu der in den vorigen Abschnitten beschriebenen Technik, bei der Bakterienfilme gemessen werden, für deren Präparation Zellmassen im  $\mu\text{g}$ -Bereich benötigt werden, liegen die bei der Mikrokolonietechnik benötigten Mengen im  $\text{ng}$ -Bereich. Die Vorgehensweise der bereits erwähnten arbeitsgruppeninternen Arbeiten zur Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses von Mikrokolonien verschiedener Größen soll im folgenden Abschnitt nur kurz erläutert werden. Die Beurteilung des S/N-Verhältnisses erfolgte anhand der FTIR-mikrospektrometrischen Messungen von Kolonien verschiedener Größen. Es wurden jeweils fünf Mikrokolonien mit einer Größe von 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$  gemessen. Das Signal/Rausch-Verhältnis wurde folgendermaßen bestimmt. Die Intensität der Amid-I-Bande bei 1654  $\text{cm}^{-1}$  wurde ausgelesen und zu dem Rauschen, das für den spektralen Bereich zwischen 1900 und 2100  $\text{cm}^{-1}$  bestimmt wurde, in dem keine Absorptionen auftreten, ins Verhältnis gesetzt. Für das Rauschen im Bereich von 1900 bis 2100  $\text{cm}^{-1}$  wurde sowohl der *peak-to-peak*-Wert, die maximale Abweichung der Absorptionspeaks innerhalb dieses Wellenzahlenbereichs, und der RMS-Wert (*root mean square*), die Standardabweichung in der Absorption innerhalb dieses Wellenzahlenbereichs, berechnet. Die hierbei erhaltenen Werte ergaben, dass erwartungsgemäß mit zunehmender Koloniegröße auch die S/N-Werte zunehmen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Größe des Signals durch die hinzugewonnene Detektorfläche zunimmt, während das

durch thermisch angeregte Elektronen verursachte Rauschen konstant bleibt. Basierend auf diesen arbeitsgruppeninternen Ergebnissen wurden alle nachfolgenden Messungen an Mikrokolonien in der Größenordnung von 50 bis 80  $\mu\text{m}$  durchgeführt, wodurch zum einen ein genügend großes S/N-Verhältnis gewährleistet wurde, um die in dieser Arbeit angewandten Verfahren zur Mustererkennung (ANNs) durchführen zu können und zum anderen nur kurze Kultivierungszeiten erforderlich waren. Dabei wurden abhängig von dem spezifischen Wachstumsverhalten des Organismus, z. B. bei *S. aureus* 50 bzw. 60  $\mu\text{m}$  große Mikrokolonien gemessen, da *S. aureus* zu vertikalem Koloniewachstum tendiert, während beispielsweise bei *E. coli*, der zu horizontalem Wachstum neigt, Kolonien zwischen 60 und 80  $\mu\text{m}$  gemessen wurden.

Eine genauere Untersuchung der Entwicklung von Mikroorganismen war notwendig, um Informationen über die Heterogenität mikrobiellen Wachstums im Hinblick auf die spektrale Varianz zu erhalten. Daher wurden FTIR spektroskopische Mappingmessungen<sup>5</sup> an verschiedenen großen Mikrokolonien des Referenzstammes *S. aureus* CIP 4.83 durchgeführt. Die Mikrokolonien wurden entsprechend dem in Abschnitt 4.2.1 auf Seite 53 beschriebenen Verfahren präpariert und nach 6 h 40 min., 7 h und 7 h 20 min. abgestempelt, so dass unterschiedliche Koloniegrößen erhalten wurden. Die Heterogenität wurde dann in Abhängigkeit vom Ort anhand einer 100  $\mu\text{m}$  und einer 200  $\mu\text{m}$  großen Kolonie durch lineares Mappen der jeweiligen Kolonie in x- und y-Richtung untersucht, wobei die Schrittweite 15  $\mu\text{m}$  betrug. Die Spektren wurden mit einer 30  $\mu\text{m}$  Blende aufgenommen. Für jede Koloniegröße wurden drei Kolonien linear in x,y-Richtung gemappt, wobei die Kolonien aus unabhängigen Probenpräparationen stammten.

Eine Clusteranalyse wurde jeweils mit allen Spektren, die für die 100  $\mu\text{m}$  bzw. 200  $\mu\text{m}$  großen Mikrokolonien von *S. aureus* CIP 4.83 im linearen Mapping-Experiment gemessen wurden, unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von 800 bis 1800  $\text{cm}^{-1}$  durchgeführt. Die aus den Clusteranalysen nach der Methode von WARD resultierenden Dendrogramme sind in Abbildung 5.13 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Dendrogramme für die 100  $\mu\text{m}$  und die 200  $\mu\text{m}$  Kolonie belegen, dass die Spektren dazu tendieren, verschiedene Cluster in Abhängigkeit von der Messposition auszubilden. Drei deutlich voneinander getrennte Cluster sind zu erkennen, die mit drei Bereichen, nämlich der Peripherie, der intermediären Zone und dem Zentrum der Kolonie korrespondieren. Um den Ursprung der qualitativen Unterschiede, die offensichtlich für die drei Cluster in den Dendrogrammen in Abbildung 5.13 verantwortlich sind, herauszufinden, wurden die Einzelspektren der verschiedenen Messpositionen untersucht und die Differenzspektren berechnet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 5.14 auf Seite 82 dargestellt. Die Spektren in Abbildung 5.14 sind die Mittelwerte der ersten Ableitungen, die vom Zentrum der Kolonie und von der Peripherie der Kolonie stammen. Um potenziell vorhandene Unterschiede zwischen diesen Spektren zu bestimmen, wurden die Differenzspektren zwischen dem Zentrum und der

---

<sup>5</sup>Die *mapping*-Option in der OPUS-Software ermöglicht das Festlegen eines Punktrasters innerhalb einer Probe, von deren Positionen dann in einer bestimmten Reihenfolge Spektren aufgenommen wurden.

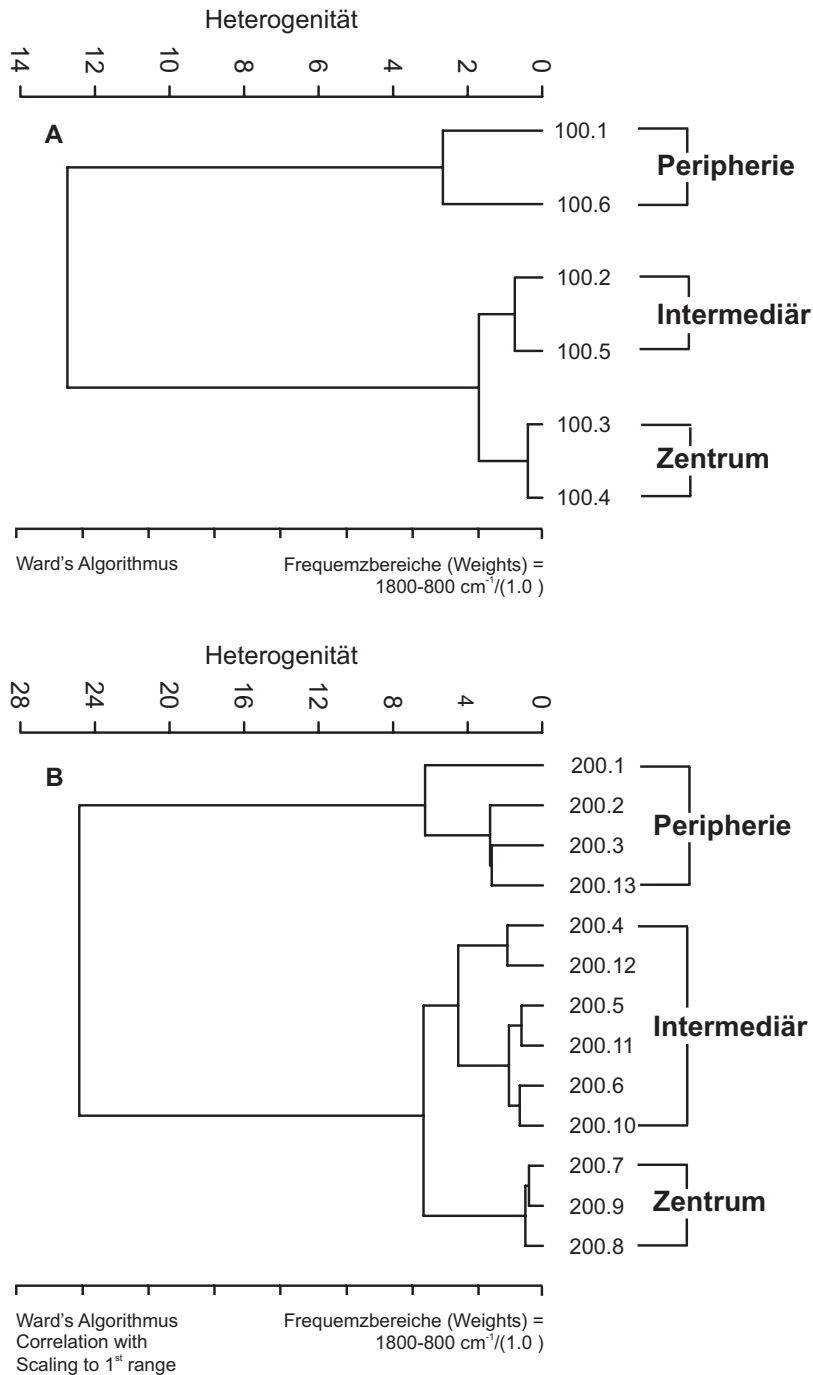


Abbildung 5.13: Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren, die durch das lineare (x,y-Richtung) *Mappen* einer 100  $\mu\text{m}$  (A) und einer 200  $\mu\text{m}$  (B) großen Mikrokolonie von *S. aureus* CIP 4,83 erhalten wurden. Die Clusteranalyse wurde nach der Methode von WARD im Bereich von 800 bis 1800  $\text{cm}^{-1}$  durchgeführt.

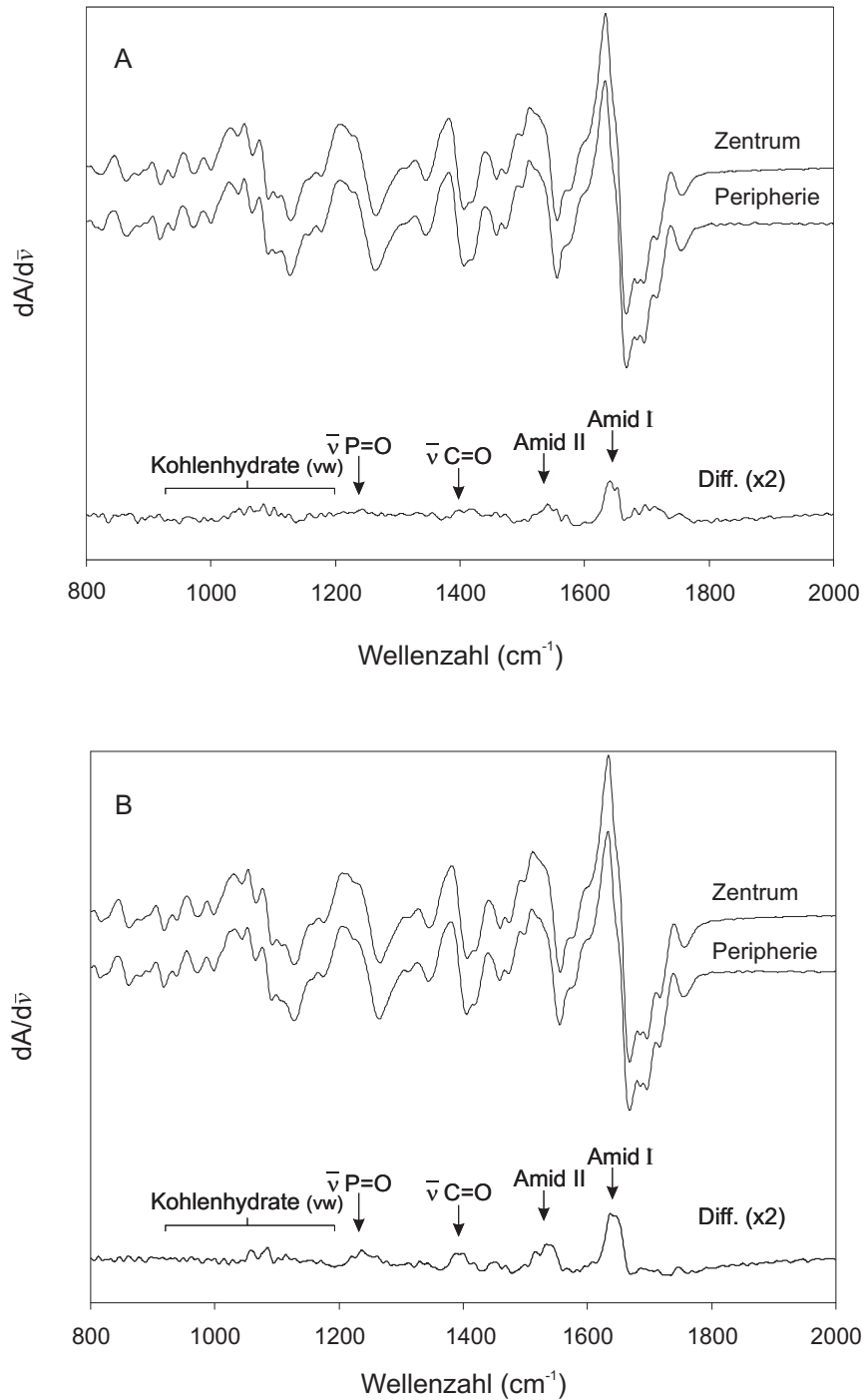


Abbildung 5.14: Mittelwertsspektren der ersten Ableitungen einer 100  $\mu\text{m}$  und einer 200  $\mu\text{m}$  Kolonie von *S. aureus* CIP 4,83 gemessen im Zentrum und an der Peripherie der Kolonie. Das entsprechende Differenzspektrum  $[dA/d\bar{\nu}]_Z - [dA/d\bar{\nu}]_P$  (Vergrößerung, 2x) zwischen dem Zentrum (Z) und der Peripherie (P) wurde durch eine 1-zu-1-Subtraktion der vektornormierten Spektren erhalten.

Peripherie der Kolonie berechnet. Die Differenzspektren weisen Unterschiede in der spektralen Region um  $1230\text{ cm}^{-1}$  auf, die von der Überlagerung von verschiedenen asymmetrischen Streckschwingungen der P=O-Doppelbindungen von Phosphodies-tergruppen herrühren (vergleiche Abschnitt 1.3).

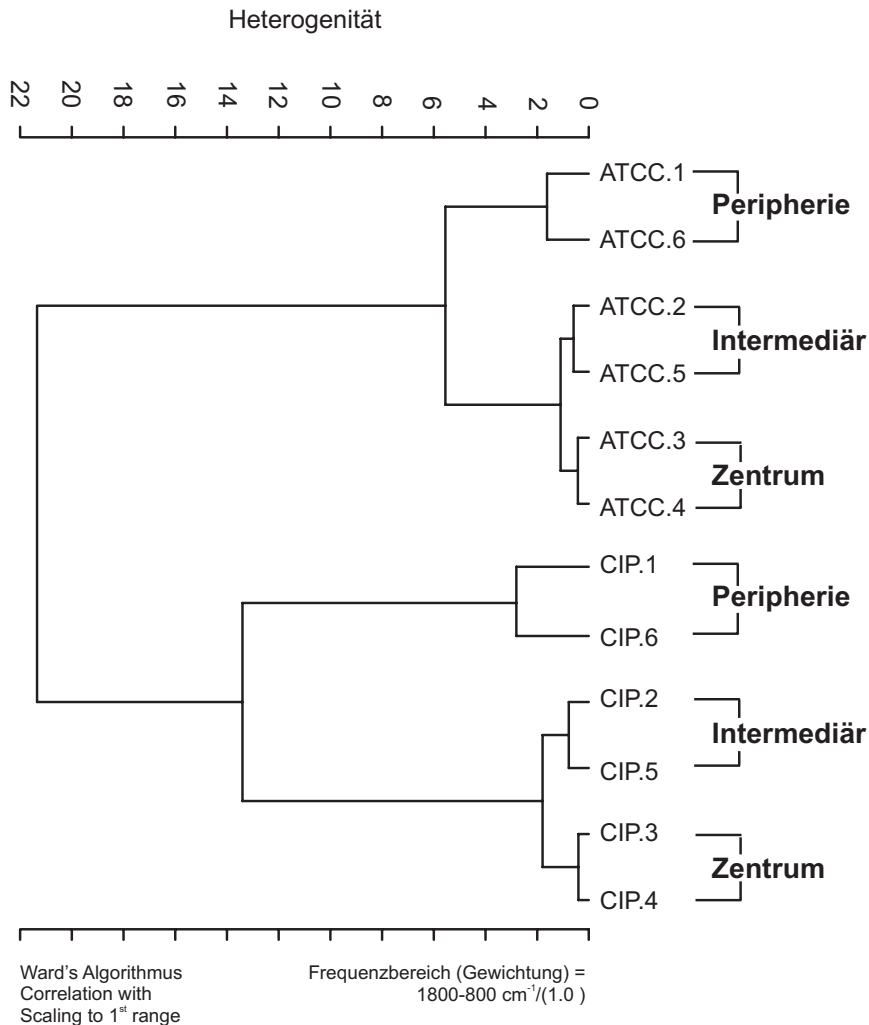


Abbildung 5.15: Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren, die durch das lineare (x,y-Richtung) *Mappen* von zwei verschiedenen  $100\text{ }\mu\text{m}$  großen Mikrokolonien von *S. aureus* CIP 4,83 und ATCC 6538 erhalten wurden. Die Clusteranalyse wurde nach der Methode von WARD im Bereich von  $800\text{ bis }1800\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt.

Kleine Änderungen sind auch in der Amid-I- und der Amid-II-Region, die aus den Streckschwingungen der Carbonyle der Amidgruppen und den NH-Biegeschwingungen im Proteingerüst resultiert, zu beobachten. Weiterhin sind Unterschiede um  $1400\text{ cm}^{-1}$  erkennbar, die möglicherweise den symmetrischen Streckschwingungen der Carboxylat-

gruppen zugeordnet werden können. Sehr geringe Änderungen sind in der Polysaccharid Region zwischen 1200 und 900  $\text{cm}^{-1}$  erkennbar. Die spektralen Änderungen in dem Differenzspektrum der 200  $\mu\text{m}$  großen Kolonie sind nur marginal stärker ausgeprägt. Insgesamt gesehen sind die Änderungen so gering, dass man schlussfolgern kann, dass 6 bis 8 h alte Mikrokolonien nur eine geringe Heterogenität aufweisen. Diese Schlussfolgerung wird zudem durch das in Abbildung 5.15 auf der vorherigen Seite dargestellte Dendrogramm bestätigt, das aus der hierarchischen Clusteranalyse von zwei verschiedenen *S. aureus* Stämmen (CIP 4.83 und ATCC 6538), die jeweils in x und y-Richtung entlang einer 100  $\mu\text{m}$  Mikrokolonie gemappt wurden, resultierte. In dem Dendrogramm in Abbildung 5.15 sind zwei Hauptcluster zu erkennen, die die Differenzierbarkeit der zwei Stämme belegen. Das wiederum bedeutet, dass die spektrale Varianz (und damit die Heterogenität) der Spektren, die vom Rand und dem Zentrum der Kolonien stammen, so gering ist, dass sie keinen Einfluss auf die Stammdifferenzierung hat. Innerhalb der jeweiligen Stammcluster, sind noch Subcluster zu erkennen, die mit den bereits beschriebenen drei Messbereichen, nämlich der Peripherie, der intermediären Zone und dem Zentrum der jeweiligen Kolonie korrespondieren.

### 5.3.2 Aufbau einer spektralen Datenbank auf der Basis von Mikrokoloniespektren

Im folgenden Abschnitt wird der Aufbau einer Referenzdatenbank auf Basis mikrobieller Mikrokoloniespektren beschrieben, anhand dessen das Diskriminierungspotenzial der FTIR-Mikrospektrometrie zur Identifizierung von klinischen Proben untersucht und bewertet werden sollte. Basierend auf den Ergebnissen des vorangegangenen Kapitels zu methodischen Aspekte wie der Bestimmung der günstigsten Koloniegröße bzgl. des Signal/Rausch-Verhältnisses und der Heterogenität, sollte zunächst das Potenzial der Mikrokolonietechnik zur Diskriminierung von GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien untersucht werden. Dazu wurde eine repräsentative Auswahl an Bakterien, die 6 verschiedene Gattungen und 23 verschiedenen Spezies umfasst, getroffen (vergleiche Tabelle 3.2 auf Seite 42). Insgesamt wurden 89 Stämme mikrospektrometrisch gemessen, die nach ihrer klinischen Relevanz ausgewählt worden waren. In Abbildung 5.16 auf der nächsten Seite sind typische Spektren der Mikrokolonien von jeweils zwei GRAM-positiven (*S. aureus*, *E. faecalis*) und zwei GRAM-negativen (*E. coli*, *P. aeruginosa*) Bakterien dargestellt. Die Originalspektren der Mikrokolonien weisen die für Bakterien typische breite Bandenstruktur auf, die aus der Überlagerung der unterschiedlichen Schwingungsmodi der verschiedenen zellulären Bestandteile, wie DNA, RNA, Proteine, Membran- und Zellwandbestandteile resultiert. Dabei stellt die Amid-I-Bande die Bande mit der intensivsten Absorption dar. Trotz der nur wenig aufgelösten Bandenstruktur der hier abgebildeten Originalspektren, lassen sich bereits die spektralen Bereiche, die für die Differenzierung von GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien herangezogen werden können, deutlich erkennen. Dabei treten besonders markante Unterschiede in der spektralen Region um 3000 - 2800  $\text{cm}^{-1}$  auf, die wie bereits in Abschnitt 1.3.2.2 beschrieben wurde, von den Streckschwin-



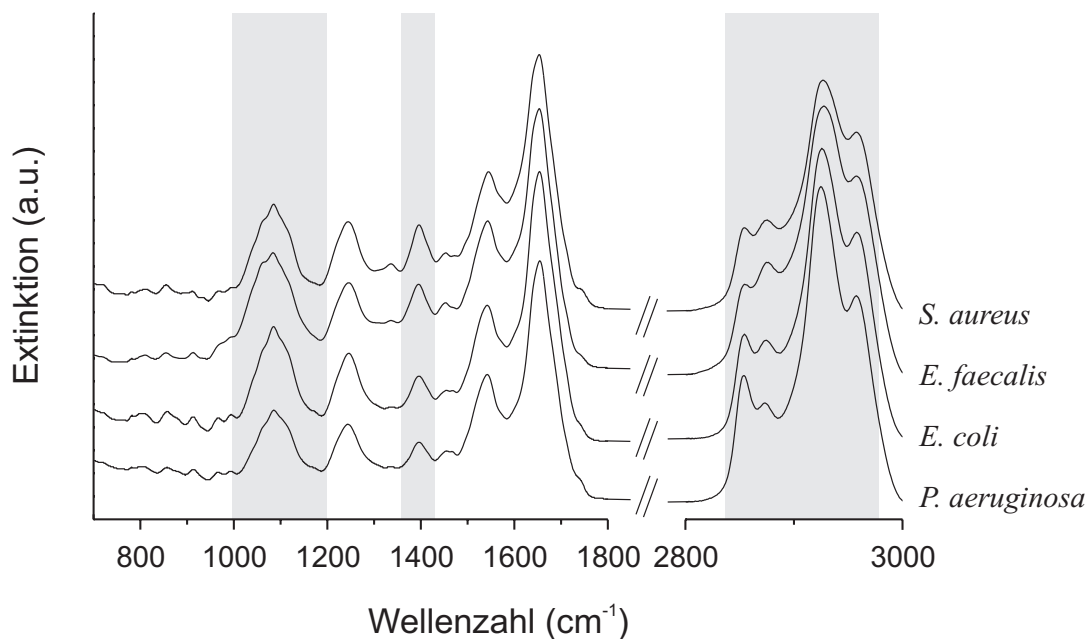


Abbildung 5.16: Typische FTIR-Spektren der Mikrokolonien von GRAM-positiven (*S. aureus*, *E. faecalis*) und GRAM-negativen (*E. coli*, *P. aeruginosa*) Bakterien dargestellt über den gesamten relevanten Spektralbereich. Der Bereich von 1800 bis 2800  $\text{cm}^{-1}$  wurde ausgeschnitten, da hier keine Absorptionen auftreten. Die grauen Balken markieren spektrale Bereiche, in denen signifikante Unterschiede zwischen den Spezies auftreten.

gungen der Fettsäureketten der verschiedenen Membranbestandteile dominiert wird. Daher weisen die Banden um 2955  $\text{cm}^{-1}$  und 2930  $\text{cm}^{-1}$  bzw. um 2870  $\text{cm}^{-1}$  und 2850  $\text{cm}^{-1}$ , die aus der Absorption der asymmetrischen und der symmetrischen C-H-Streckschwingungen der  $\text{CH}_3$ - und  $\text{CH}_2$ -Gruppen resultieren, bei den Spektren der GRAM-negativen Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa* eine höhere Intensität auf als bei den Spektren der GRAM-positiven Bakterien *S. aureus* und *E. faecalis*. Hierfür ist der bereits erwähnte (Abschnitt 1.1.1 auf Seite 1) größere Anteil an Lipiden, die in den GRAM-negativen Bakterien aufgrund der zusätzlichen äußeren Membran (OM) auftreten, verantwortlich. Demzufolge ist auch die Bande um 1458  $\text{cm}^{-1}$ , die von den C-H-Deformationsschwingungen von  $\text{CH}_3$  und  $\text{CH}_2$  hervorgerufen wird, bei den Spektren von *E. coli* und *P. aeruginosa* intensiver als bei den GRAM-positiven Bakterienspektren. Des Weiteren sind Unterschiede in der Bande um 1400  $\text{cm}^{-1}$  zu beobachten, die von der C=O-Streckschwingung von  $\text{COO}^-$ -Gruppen hervorgerufen wird. Darüber hinaus weisen die Spektren in der Polysaccharidregion zwischen 900 und 1200  $\text{cm}^{-1}$  unterschiedliche Bandenkonturen auf.

Die Clusteranalyse einer Auswahl von Stämmen der verschiedenen Bakterien Gattungen und Spezies unter Einbeziehung der im vorigen Absatz diskutierten spektralen

Bereiche von 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$ , von 3000 bis 2800  $\text{cm}^{-1}$  und von 1500 bis 1400  $\text{cm}^{-1}$ , resultierte in dem in Abbildung 5.17 auf der nächsten Seite dargestellten Dendrogramm. Das Dendrogramm zeigt zwei deutlich voneinander getrennte Hauptcluster, wobei die Spektren jeweils aller GRAM-negativen Bakterien in dem einen Hauptcluster und die Messungen an allen GRAM-positiven Bakterien in dem anderen Hauptcluster gruppiert sind. Diese Klassifizierung belegt, dass ein spektroskopischer GRAM-Test auch auf Basis von Mikrokoloniespektren erfolgen kann. Darüber hinaus wurden alle Stämme einer Spezies in speziesspezifischen Subclustern gruppiert. Die Mikrokoloniespektren von Bakterien sind demzufolge so spezifisch, dass eine Differenzierung auf Speziesebene möglich ist.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Mikrokoloniespektren von GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien so spezifisch sind, dass sie sich zur Differenzierung auf Speziesebene eignen, sollte analog das Potenzial der Mikrokolonietechnik zur Klassifizierung von *Candida* Spezies untersucht werden. Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Ergebnisse basieren auf arbeitsgruppeninternen Ergebnissen, die mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden [71]. Es wurden jeweils drei Wiederholungsmessungen an sechs verschiedenen *Candida* Spezies, nämlich *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. glabrata* durchgeführt, um die Spezifität der Mikrokolonietechnik zu testen. Die Probenpräparation und das anschließende Abstempeln der Mikrokolonien erfolgte nach dem in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Verfahren, wobei die Wiederholungsmessungen an unabhängigen Probenpräparationen erfolgten. Es wurden jeweils zwei Stämme pro Spezies mikrospektrometrisch gemessen (vergleiche Tabelle 3.8 auf Seite 46). Eine Clusteranalyse wurde mit den Spektren von allen Wiederholungsmessungen unter Einbeziehung der spektralen Bereiche von 900 bis 700  $\text{cm}^{-1}$ , von 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$  und von 1500 bis 1200  $\text{cm}^{-1}$  durchgeführt. Das aus der Clusteranalyse nach der Methode von WARD resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 5.18 auf Seite 88 dargestellt. Die in dem Dendrogramm deutlich zu erkennende Auftrennung in sechs spektrale Klassen belegt, dass analog zu den für Bakterien erhaltenen Ergebnissen auch für die Gattung *Candida* eine Differenzierung auf Speziesebene auf Basis der Mikrokoloniespektren möglich ist.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass auf Basis von nur 6 bis 9 h alten Mikrokolonien sowohl für die Hefe Gattung *Candida*, als auch für verschiedene Bakterien Gattungen eine Differenzierung auf Speziesebene getroffen werden kann, wurden systematisch Wiederholungsmessungen an den bereits aufgeführten Bakterien Stämmen durchgeführt, und zusätzlich die bereits bestehenden Mikrokoloniemessungen an *Candida* Spezies noch erweitert (siehe Tabelle 3.8 auf Seite 46). Dabei wurde das Ziel verfolgt, Referenzbibliotheken basierend auf Mikrokoloniespektren von Hefen und Bakterien aufzubauen, die ca. 85 % der am häufigsten auftretenden Spezies bei Blutinfektionen (Sepsen) enthalten. Diese Identifizierungsbibliotheken wurden anschließend dazu verwendet, in einer prospektiven klinischen Studie erstmalig die pathogenen Erreger von Blutinfektionen mittels der FTIR-Mikrospektrometrie zu identifizieren.

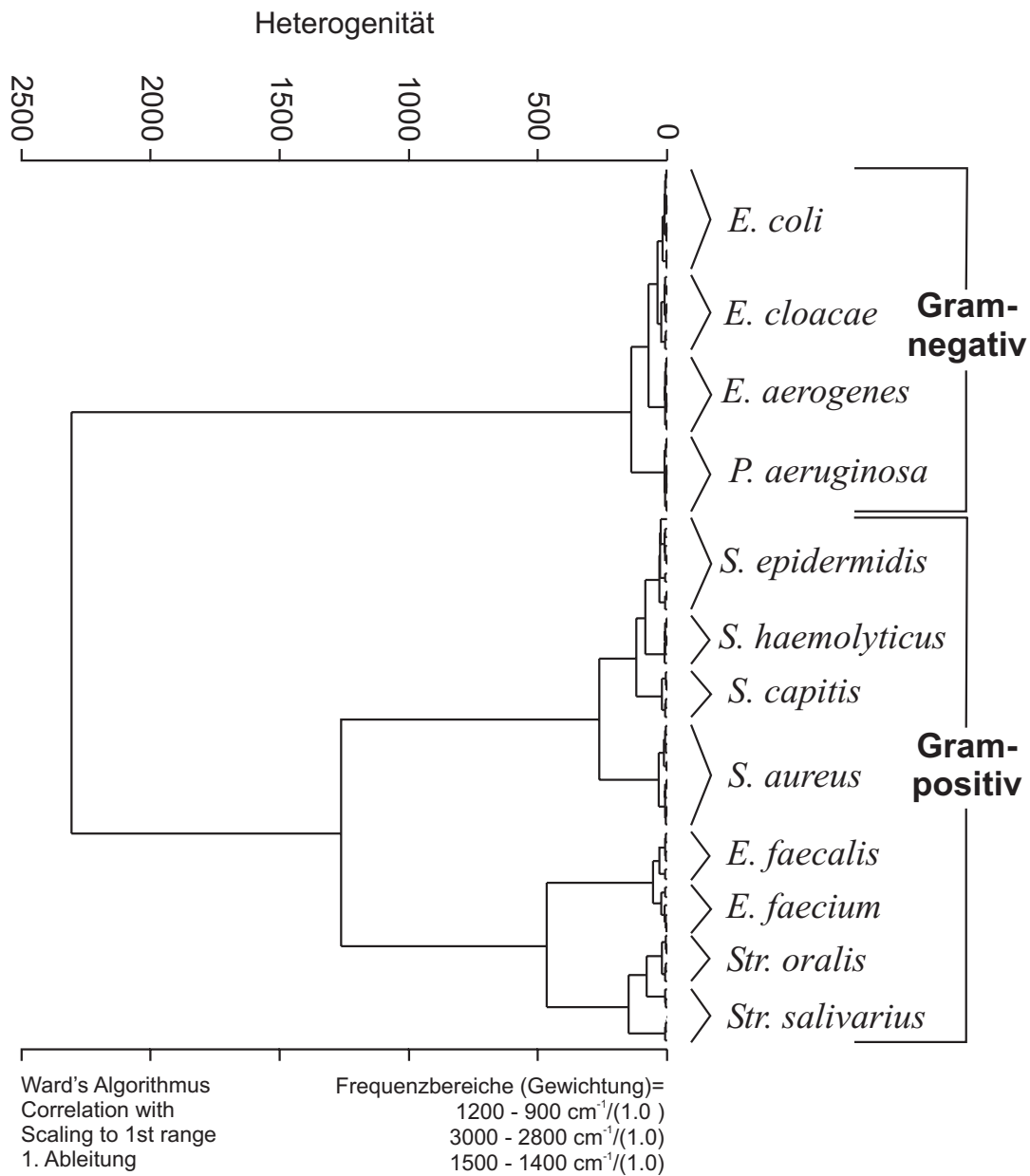


Abbildung 5.17: Dendrogramm der Clusteranalyse der Mikrokoloniespektren von Bakterien, die sechs verschiedene Genera umfassen. Die Clusteranalyse wurde unter Einbeziehung der drei spektralen Bereiche von bis 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$ , 3000 bis 2800  $\text{cm}^{-1}$ , und von 1500 bis 1400  $\text{cm}^{-1}$  nach der Methode von WARD durchgeführt.

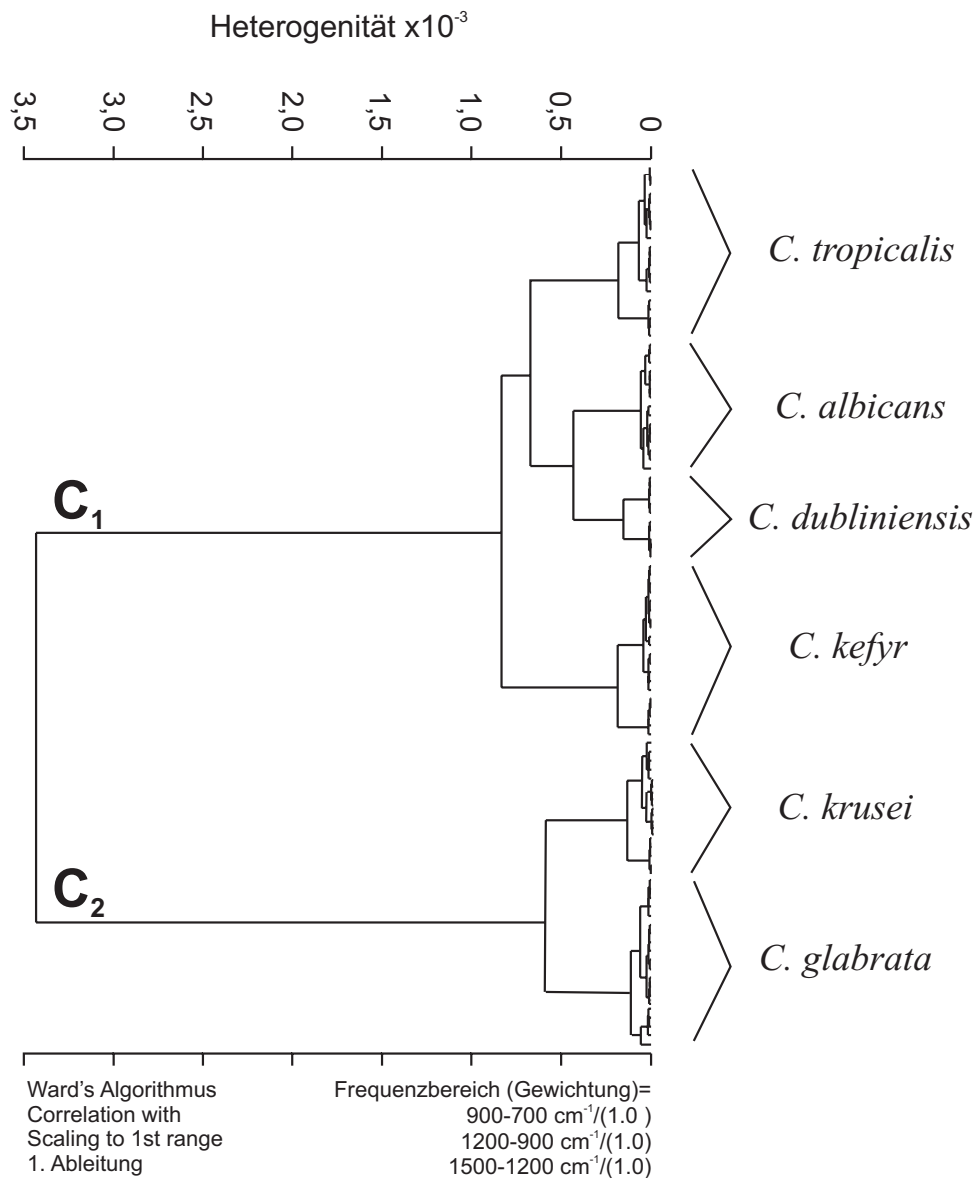


Abbildung 5.18: Dendrogramm der Clusteranalyse von sechs *Candida* Spezies auf Basis ihrer Mikrokoloniespektren. Die Clusteranalyse wurde unter Einbeziehung der drei spektralen Bereiche von 900 bis 700  $\text{cm}^{-1}$ , 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$  und von 1500 bis 1200  $\text{cm}^{-1}$  nach der Methode von WARD durchgeführt. Das Dendrogramm basiert auf arbeitsgruppen-internen Ergebnissen, die mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden [71].

Bei den Stämmen, die zum Aufbau der Bibliotheken benutzt wurden, handelte es sich entweder um Referenzstämmen oder um gut charakterisierte klinische Isolate. Die so erhaltenen Spektrenbibliotheken wurden verwendet, um unter Anwendung von

künstlichen neuronalen Netzen (ANNs) ein Speziesidentifizierungsmodell jeweils für die sechs verschiedenen *Candida* Spezies und die 23 Bakterien Spezies zu entwickeln. Dabei wurde nach folgendem Schema verfahren: Eine hierarchische Clusteranalyse der jeweils in den Bakterien- und Hefe-Referenzbibliotheken enthaltenen Mikrokolonespektren diente als nicht-überwachte Klassifizierungsmethode, um die Hauptgruppierungen in den Datensätzen zu bestimmen. Diese Gruppierungen sind in den Dendrogrammen in Abbildung 5.18 für die *Candida* Spezies und in Abbildung 5.17 auf Seite 87 für die GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien ersichtlich. Diese Gruppierungen wurden dann als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines hierarchischen Identifizierungsmodells basierend auf künstlichen neuronalen Netzen verwendet.

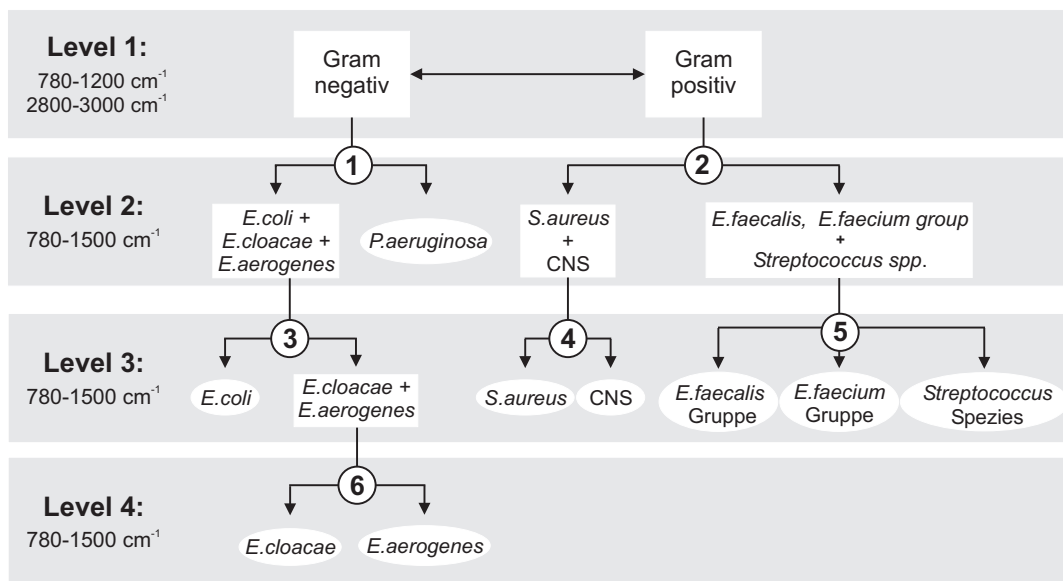


Abbildung 5.19: Schematische Darstellung des hierarchisch organisierten neuronalen Netzes zur Identifizierung von Bakterien. Das Netz besteht aus einem toplevel Netz, mit dem die Differenzierung zwischen GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien erfolgt und aus sechs nachfolgenden sublevel Netzen, die zur Differenzierung der verschiedenen Spezies dienen.

Dabei wurde kein so genanntes monolithisches Netzwerk erstellt, sondern es wurden einzelne neuronale Netze trainiert, die anschließend zu einem hierarchisch organisierten Netzwerk verknüpft wurden. Diese Vorgehensweise bietet sich vor allem beim Vorliegen sehr vieler Klassen, wie es z. B. bei der Identifizierung von Mikroorganismen aus klinischen Isolaten der Fall ist, an. Das Prinzip hinter dieser Vorgehensweise ist, komplexe Klassifizierungsaufgaben in Teilaufgaben zu zerlegen, so dass zur Lösung jeder einzelnen Klassifizierungsaufgabe die jeweils optimalsten Parameter ausgewählt werden können. Das so entwickelte hierarchisch organisierte neuronale Netz, bestand aus einem toplevel Netz und sechs sublevel Netzen, die für die jeweilige Klassifizie-

rungsaufgabe optimiert wurden. In Abbildung 5.19 auf der vorherigen Seite ist das hierarchische Netzwerk, das zur Identifizierung von Bakterien auf Basis ihrer Mikrokoloniespektren eingesetzt wurde, schematisch dargestellt. Es besteht aus einem toplevel Netz, das die Differenzierung zwischen GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien ermöglicht, woran sich sukzessive sechs sublevel Netze anschließen, die auf drei Ebenen zur Differenzierung der verschiedenen Spezies eingesetzt werden.

Analog wurde ein hierarchisches Netz zur Identifizierung von *Candida* Spezies auf Basis ihrer Mikrokoloniespektren entwickelt. Der Aufbau dieses Netzes ist schematisch in Abbildung 5.20 dargestellt. Hier dient das toplevel Netz zur Differenzierung zwischen der in dem Dendrogramm in Abbildung 5.18 ersichtlichen Hauptgruppe  $C_1$  bestehend aus den vier *Candida* Spezies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* und *C. tropicalis* und der Hauptgruppe  $C_2$ , die die beiden Spezies *C. glabrata* und *C. krusei* umfasst. Daran schließen sich sukzessive vier sublevel Netze an, die dann die Differenzierung der einzelnen *Candida* Spezies ermöglichen.

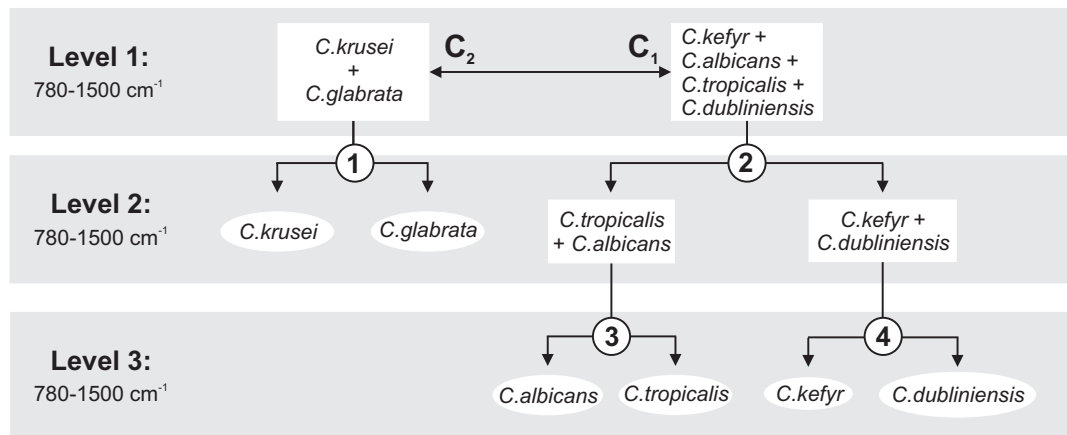


Abbildung 5.20: Schematische Darstellung des hierarchisch organisierten neuronalen Netzes zur Identifizierung von *Candida* Spezies. Das Netz besteht aus einem toplevel Netz, mit dem die Differenzierung zwischen der in dem Dendrogramm in Abbildung 5.18 ersichtlichen Hauptgruppe  $C_1$  bestehend aus den vier *Candida* Spezies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* und *C. tropicalis* und der Hauptgruppe  $C_2$ , die die beiden Spezies *C. glabrata* und *C. krusei* umfasst, erfolgt und aus vier nachfolgenden sublevel Netzen, die zur Differenzierung der verschiedenen Spezies dienen.

### 5.3.3 Training und Validierung der mikrobiellen Datenbank mit künstlichen neuronalen Netzen

Im folgenden Abschnitt wird das Training und die Validierung der beiden hierarchischen neuronalen Netze zur Identifizierung von verschiedenen Bakterien und *Candida* Spezies beschrieben. Die neuronalen Netze wurden gemäß dem in Abschnitt 4.4.4

vorgestellten Verfahren trainiert und validiert. Dabei wurden die einzelnen Netze, die anschließend zu einem hierarchischen Gesamtnetz verbunden wurden, jeweils mit verschiedenen Parametern, die z. B. die selektierten Wellenlängen und damit die resultierende Netzwerktopologie betrafen, trainiert. Dieses Verfahren hat sich für komplexe Klassifizierungsverfahren als besonders geeignet erwiesen, da es zum einen die optimale Anpassung der bereits genannten Parameter ermöglicht und zum anderen, weil es eine hohe Flexibilität gewährleistet, da das bestehende Netz relativ einfach um weitere Klassifizierungsstufen erweitert werden kann. Für eine interne Kalibrierung der einzelnen Netze wurden die Datensätze in zwei unabhängige Datensätze aufgeteilt, einen Trainingsdatensatz, der ca. 80 % der Daten umfasste und einen Validierungsdatensatz, der ca. 20 % der Daten beinhaltete. Die Parameter für das Training und die anschließende Validierung der Daten aus dem Validierungsdatensatz sind für alle Einzelnetze für die Identifizierung von Bakterien in Tabelle 5.2 und für die Identifizierung der *Candida* Spezies in Tabelle 5.3 auf der nächsten Seite angegeben.

Tabelle 5.2: Trainingsparameter für die einzelnen Netze des hierarchischen Gesamtnetzes zur Identifizierung von Bakterien und die Klassifizierungsergebnisse der Daten im Validierungsdatensatz.

Netz	Netzwerk- topologie <sup>a</sup>	Zyklen	SSE <sup>b</sup>	WTA-Klassifizierung <sup>c</sup>	
				Richtig (%)	Falsch (%)
<i>Toplevel Netz:</i>					
GRAM +/-	18-4-2	54	0,33	100	0
<i>Sublevel Netze:</i>					
1	30-6-2	14	0,41	100	0
2	21-4-2	8	0,25	100	0
3	28-6-2	16	0,03	95,2	4,8
4	19-4-2	14	1,92	99,7	0,3
5	20-4-3	22	0,28	100	0
6	25-5-2	15	0,04	97,3	2,7

<sup>a</sup> Es handelt sich hier wie unter Abschnitt 4.4.4 ausgeführt um 3-schichtige multilayer Netze, wobei zuerst die Anzahl der Eingabeneuronen, gefolgt von der Anzahl der Neuronen in der verdeckten Schicht und schließlich die Anzahl der Ausgabeneuronen angegeben ist.

<sup>b</sup> angegeben ist der SSE für den Validierungsdatensatz

<sup>c</sup> bezieht sich auf den Validierungsdatensatz

Aus der zweiten Spalte, in der die Netzwerktopologie in den beiden Tabellen 5.2 und 5.3 angegeben ist, ist ersichtlich, dass die Anzahl der jeweiligen Eingabeneuronen für die verschiedenen sublevel Netz nur sehr gering ist. Dies ergab sich aus einer effektiven Datenreduktion der FTIR-mikrospektrometrischen Spektren durch folgende Schritte: Zunächst wurden mittels einer manuellen Vorselektion die signifikantesten Wellenzahlbereiche für die jeweilige spektrale Differenzierung ausgewählt, woran sich

Tabelle 5.3: Trainingsparameter für die einzelnen Netze des hierarchischen Gesamtnetzes zur Identifizierung der *Candida* Spezies und die Klassifizierungsergebnisse der Daten im Validierungsdatensatz.

Netz	Netzwerk- topologie <sup>a</sup>	Zyklen	SSE <sup>b</sup>	WTA-Klassifizierung <sup>c</sup>	
				Richtig (%)	Falsch (%)
<i>Toplevel Netz:</i>					
C <sub>1</sub> /C <sub>2</sub>	20-4-2	18	0,40	100	0
<i>Sublevel Netze:</i>					
1	20-4-2	16	0,001	100	0
2	20-4-2	40	4,69	96,3	3,7
3	17-4-2	18	0,03	100	0
4	19-4-2	18	0.008	100	0

<sup>a</sup> Es handelt sich hier wie unter Abschnitt 4.4.4 ausgeführt um 3-schichtige multilayer Netze, wobei zuerst die Anzahl der Eingabeneuronen, gefolgt von der Anzahl der Neuronen in der verdeckten Schicht und schließlich die Anzahl der Ausgabeneuronen angegeben ist.

<sup>b</sup> angegeben ist der SSE für den Validierungsdatensatz

<sup>c</sup> bezieht sich auf den Validierungsdatensatz

eine *boxcar* Mittelung über jeweils zwei benachbarte Datenpunkte anschloss, die eine weitere Datenreduktion bewirkte. Wie bereits in Abschnitt 4.4.4 ausgeführt wurde, sind vor allem die Datenreduktion und die Merkmalsselektion (*feature selection*) die wesentlichen Schritte, denen vor dem eigentlichen Training eines neuronalen Netzes, die größte Bedeutung zukommt. Diese Tatsache ergibt sich aus dem Verhältnis der Eingabeneuronen zu der Anzahl der Proben, die für die meisten spektroskopischen Anwendungen limitiert ist. Wenn dieses Verhältnis nicht ausgeglichen ist, also zu sehr zu Lasten der Eingabeneuronen ausfällt, wirkt sich dieses negativ auf die Generalisierungsfähigkeit des Netzes aus. Hingegen gewährleistet eine eher geringe Anzahl an Eingabeneuronen, die durch eine effektive Datenreduktion erreicht wird, eine Reduzierung der Komplexität des Modells und auch eine Verbesserung der Präzision des Modells. Dies lässt sich dadurch erklären, dass eine Klassifizierungssystem, das alle spektralen Eigenschaften (in Form von Eingabeneuronen) nutzt, eine erwartungsgemäß schlechtere Performance aufweist als ein Klassifizierungssystem, das sich nur auf die spektralen Merkmale stützt, die die Unterschiede zwischen den Klassen maximiert, aber die Differenzen innerhalb der Klassen minimiert.

Für das vorliegende Klassifizierungsproblem wurde eine weitergehende Datenreduktion mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Dabei wurden die ersten Hauptkomponenten gemäß KAISERS-Kriterium ausgewählt, die  $\sim 99\%$  bis  $100\%$  der Varianz in dem jeweiligen Datensatz umfassten. Mit Hilfe dieser Datenvorbereitungen konnten Netze trainiert werden, die nur eine geringe Anzahl an Eingabeneuronen besaßen, nämlich zwischen 17 und maximal 30 Hauptkomponenten (vergleiche Tabelle 5.2 und 5.3). Diese günstigen Netzwerktopologien wirkten sich nicht nur positiv auf



Tabelle 5.4: Ergebnisse der *leave-one-out*-Evaluierung des hierarchischen Netzes zur Identifizierung von Bakterien, basierend auf den Stämmen in der Referenzdatenbank.

		FTIR-Identifizierung								
		<i>S. aureus</i>	CNS	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Streptococcus</i>
API-Identifizierung	<i>S. aureus</i>	13(100 %)								
	CNS	1	17(94,4 %)							
	<i>E. coli</i>			12(100 %)						
	<i>E. cloacae</i>				6(100 %)					
	<i>E. aerogenes</i>					6(100 %)				
	<i>P. aeruginosa</i>						5(100 %)			
	<i>E. faecalis</i>							9(100 %)		
	<i>E. faecium</i>								9(100 %)	
	<i>Streptococcus</i>									9(82 %)

## 5 Ergebnisse

die Trainingszeiten aus, wie aus der geringen Anzahl an Lernzyklen, die zwischen 8 und 40 lag, ersichtlich wird, sondern vor allem auf die Klassifizierungsergebnisse der Validierungsdaten mit dem trainierten Netz. Diese weisen mit 95 % bis 100 % korrekt klassifizierten spektralen Mustern ein sehr gutes Klassifizierungsergebnis auf.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der *leave-one-out*-Evaluierung des hierarchischen Netzes zur Identifizierung der *Candida* Spezies, basierend auf den Stämmen in der Referenzdatenbank.

		FTIR-Identifizierung					
		<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
API-Identifizierung	<i>C. albicans</i>	7(87,5 %)	1				
	<i>C. dubliniensis</i>		5(100 %)				
	<i>C. glabrata</i>			5(100 %)			
	<i>C. kefyr</i>				4(100 %)		
	<i>C. krusei</i>					4(100 %)	
	<i>C. tropicalis</i>	1					5(83,3 %)

Die Daten im Validierungsdatensatz können jedoch nicht als vollkommen unabhängig vom Trainingsdatensatz angesehen werden, da das Training jeweils nach Erreichen des Fehlerminimums (SSE) im Validierungsdatensatz abgebrochen wurde. Daher wurde noch eine weitere Methode, das so genannte *leave-one-out*-Verfahren zur Validierung der beiden hierarchischen Netze herangezogen. Hierbei werden die Spektren von allen Stämmen bis auf einen verwendet, um das entsprechende neuronale Netz zu trainieren. Der Stamm, der ausgelassen wurde, wird dann anschließend auf Basis seines Spektrums identifiziert, um das jeweilige Modell zu überprüfen. Die Ergebnisse der *leave-one-out*-Methode in den Tabellen 5.4 auf der vorherigen Seite und 5.5 belegen, dass auf Genusebene eine nahezu perfekte Identifizierung erfolgte, da nur zwei *Streptococcus* Spezies als *E. faecalis* misidentifiziert wurden. Als ebensogut erwies sich die Identifizierung auf Speziesebene, da nur ein CNS-Stamm als *S. aureus* misidentifiziert wurde. Für die Differenzierung der *Candida* Spezies wurde eine fast ebenso hohe Identifizierungsgenauigkeit erreicht, da nur ein *C. albicans* Stamm als *C. dubliniensis* misidentifiziert wurde und ein *C. tropicalis* Stamm als *C. albicans*.

### 5.3.4 Identifizierung von positiven Blutkulturen mit der FTIR-Mikrospektrometrie

**Analyse der klinischen Proben** Für die erstmalig durchgeführte prospektive klinische Studie wurden über einen Zeitraum von drei Monaten alle positiven Blutkulturen (BACT/ALERT, Organon Teknika, Eppelheim) von den Intensivstationen und teilweise anderen Stationen am RUDOLF-VIRCHOW-Klinikum, Berlin verwendet, um die

infrarot-mikrospektroskopische-Identifizierungsmethode im Hinblick auf ihre Präzision und ihren Zeitbedarf im direkten Vergleich mit den phänotypischen Techniken des Routinelabors (in Kooperation mit Dr. Schiller, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Campus RUDOLF VIRCHOW) zu testen. Parallel dazu erfolgte die mikrobielle Identifizierung im Routinelabor des Klinikums unter Verwendung von phänotypischen Identifizierungssystemen wie dem API- und dem VITEK-System. Insgesamt wurden 138 Proben von 121 Patienten untersucht, von denen 131 Bakterien und 7 Hefen enthielten.

Für die Probenpräparation wurden die positiven Patientenproben (BACT/ALERT) mit vorgewärmtem LURIA-BERTANI-Medium bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  verdünnt, um zum einen singularisiert wachsende Mikrokolonien zu gewährleisten und auch um die Konzentration der in dem Kulturmedium des BACT/ALERT-Systems enthaltenen Aktivkohle, die sich störend auf die FTIR-Messungen auswirkt, herabzusetzen. Die Aktivkohle wird dem Medium zugesetzt, um evtl. in den Blutproben vorhandene Therapeutika wie z. B. Antibiotika zu adsorbieren, die das mikrobielle Wachstum negativ beeinflussen bzw. verhindern. Aliquote von 100 µl wurden dann jeweils auf SABOURAUD + 2% Glukose-Agarplatten und CASO-Agarplatten von MERCK ausplattiert, um sowohl das Wachstum von Hefen als auch von Bakterien zu unterstützen. Nach einer Inkubationsdauer von 6 bis 8 h wurde die Zellmorphologie mikroskopisch untersucht, um so eine Differenzierung zwischen Hefen und Bakterien zu treffen. Basierend auf dieser Unterscheidung wurden dann FTIR-Spektren aufgenommen und die so erhaltenen Spektren mittels der entsprechenden Referenzbibliothek (für *Candida* Spezies oder Bakterien) identifiziert.

Alle Stämme, die von dem Routinelabor als einem Genus zugehörig identifiziert wurden, der nicht in der spektralen Referenzdatenbank vorhanden war, wurden von dem Vergleich zwischen der Routineidentifizierung und der infrarot-mikrospektrometrischen Identifizierung ausgeschlossen. Dies traf auf insgesamt 17 Proben zu.

**Vergleich der phänotypischen und der FTIR-mikrospektrometrischen Identifizierungsmethoden** 121 Proben konnten für den Vergleich zwischen der phänotypischen Identifizierung durch das Routinelabor und der infrarot-mikrospektrometrischen Identifizierungsmethode herangezogen werden. Insgesamt 98,3% (119/121) der für den Vergleich herangezogenen Mikroorganismen konnten in Übereinstimmung mit den klassischen phänotypischen Techniken identifiziert werden (vergleiche Tabelle 5.6 auf der nächsten Seite).

Eine nahezu 100%ig korrekte Identifizierung der Hauptverursacher (Staphylokokken und *E. coli*) von Blutinfektionen wurde erzielt. Insbesondere die perfekte Identifizierung (7/7) von allen Proben die *Candida* spp. enthielten war bemerkenswert, da das Identifizierungsergebnis innerhalb von nur 8 bis 9 h nachdem die Probe als positiv von dem BACT/ALERT System detektiert worden war, vorlag, während das Routinelabor noch weitere 48 h benötigte.

Tabelle 5.6: Vergleich der phänotypischen und der infrarot-mikrospektrometrischen-Identifizierungsergebnisse der Patientenproben, die in der prospektiven Studie enthalten sind. 121 Proben konnten für den Vergleich herangezogen werden. Es sind die Anzahl der Stämme und der Prozentsatz (in Klammern) am korrekten Identifizierungen pro Spezies bzw. Speziesgruppe angegeben.

	FTIR-Identifizierung											
	<i>S. aureus</i>											
	CNS											
	<i>E. coli</i>											
	<i>E. cloacae</i>											
	<i>P. aeruginosa</i>											
	<i>E. faecalis</i>											
	<i>E. faecium</i>											
	Streptococcus											
	<i>C. albicans</i>											
	<i>C. glabrata</i>											
	<i>C. tropicalis</i>											
API-Identifizierung	<i>S. aureus</i>	27(96,4 %)	1	12(100 %)	2(100 %)	1(100 %)	6(100 %)	7(100 %)	5(100 %)	5(100 %)	1(100 %)	1(100 %)
	CNS	1	52(98,1 %)									
	<i>E. coli</i>											
	<i>E. cloacae</i>											
	<i>P. aeruginosa</i>											
	<i>E. faecalis</i>											
	<i>E. faecium</i>											
	Streptococcus											
	<i>C. albicans</i>											
	<i>C. glabrata</i>											
	<i>C. tropicalis</i>											

## 5.4 Untersuchungen zum Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten von Mikroorganismen

Aufgrund des heute weit verbreiteten Auftretens von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Therapeutika ist für alle pathogenen Erreger, die von einem Patienten isoliert werden, ein Sensitivitätstest auf Antibiotika erforderlich. Die Bestimmung des Antibiotikaempfindlichkeitsverhaltens ist für die Wahl des am besten geeigneten Antibiotikums zur Behandlung einer bakterielle Infektion entscheidend. Zwar sind viele potenziell gefährliche pathogene Mikroorganismen gegenüber einer Reihe von verschiedenen Antibiotika sensitiv, einige Erreger können jedoch nur noch mit sehr wenigen Antibiotika therapiert werden. Dies trifft vor allem auf die nosokomialen Erreger zu, da diese durch den permanenten Selektionsdruck der durch die breite Anwendung von Antibiotika in Krankenhäusern vorherrscht, häufig Antibiotikaresistenzen entwickeln. Manche pathogenen Erreger, zu denen z. B. MRSA gehören, die eine deutlich verminderte Empfindlichkeit gegenüber dem Reserveantibiotikum Vancomycin entwickelt haben, sind damit gegen fast alle bekannten Antibiotika resistent und somit kaum noch therapierbar. Daher ist die Bestimmung der Antibiotikasensitivität von Mikroorganismen für eine erfolgreiche Antibiotikatherapie essenziell. Jedoch sind die bereits in Abschnitt 1.1.3.2 vorgestellten konventionellen diagnostischen Sensitivitätstests häufig sehr zeit- und arbeitsintensiv. In der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, ob die FTIR-Spektroskopie dazu geeignet ist, das antibiotische Empfindlichkeitsverhalten von Mikroorganismen zu detektieren. In den folgenden Abschnitten werden FTIR-spektroskopische Untersuchungen an Antibiotika-sensitiven und resistenten Stämmen von *E. faecium* und *S. aureus* vorgestellt, anhand derer überprüft werden sollte, ob sich die Spektren *per se* dazu eignen, zwischen resistenten und sensitiven Stämmen zu differenzieren. Mit dem Begriff *per se* ist in diesem Zusammenhang gemeint, dass die Mikroorganismen ohne Antibiotikaeinfluss kultiviert wurden, um zu untersuchen, ob allein aufgrund der in den Spektren enthaltenen Informationen eine Differenzierung zwischen antibiotikaresistenten und -sensitiven Bakterien erreicht werden kann.

### 5.4.1 Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten von VRE/VSE-Stämmen *per se*

Für die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen wurden zwei Datensätze Vancomycin-resistenter und sensitiver *E. faecium* Stämme verschiedener Herkünfte vergleichend untersucht. Wie in Abschnitt 6.1 beschrieben, besitzen Enterokokken klinische Signifikanz. Zum einen gehören sie direkt nach *S. aureus* zu den weltweit am häufigsten auftretenden Organismen, die nosokomiale Infektionen hervorrufen. Zum anderen begründet sich das Interesse an der Gattung *Enterococcus* aber vor allem darin, dass diese Organismen eine Vielzahl an *intrinsischen* und *erworbenen* Resistenzen gegenüber antibiotischen Therapeutika besitzen<sup>6</sup>. Als Beispiele für intrinsische Resistenzen von

---

<sup>6</sup>Der Begriff intrinsisch wird dann verwendet, wenn Mikroorganismen gegen bestimmte Antibiotika *natürliche* Resistenzen besitzen. Als Beispiel ist die natürliche Undurchlässigkeit der meisten

Enterokokken sind die modernen Cephalosporine, die zu den  $\beta$ -Lactamantibiotika zählen, zu nennen. Sie unterscheiden sich strukturell von den Penicillinen, gegen die *Enterococcus* Spezies ebenfalls resistent sind, da sie einen sechsgliedrigen Dihydrothiazinring anstelle des fünfgliedrigen Thiazolidinringes enthalten. Cephalosporine besitzen im Allgemeinen ein breiteres antibiotisches Wirkungsspektrum als die Penicilline und sind stabiler gegenüber  $\beta$ -Lactamasen, den von vielen Mikroorganismen produzierten Enzymen, die den  $\beta$ -Lactamring zerstören. Cephalosporine und Penicilline stellen gemeinsam mehr als die Hälfte aller produzierten und verwendeten Antibiotika dar. Vermutlich hat vor allem der Einsatz dieser Antibiotika, die mittlerweile gegen Enterokokken unwirksam sind, zu dem weltweiten Anstieg von Infektionen durch diese Organismen, geführt. Darüber hinaus waren Enterokokken die ersten Bakterien, die eine Glykopeptidresistenz erworben haben, über die erstmalig Ende der 80er Jahre berichtet wurde [72]. Bei Enterokokken sind bisher drei Haupttypen der Glykopeptidresistenz bekannt, VanA und VanB, bei denen es sich um erworbene Resistenzen handelt und VanC, die eine intrinsische Resistenz darstellt. Dabei kommt der durch das Gen VanA vermittelten Glykopeptid-(Hoch)resistenz die größte Bedeutung zu. Sie ist bei Enterokokken am weitesten verbreitet und auch zwischen verschiedenen *Enterococcus* Stämmen und Spezies, z. B. mittels Plasmidaustausch, übertragbar. Der VanA-Phänotyp tritt hauptsächlich bei *E. faecium* auf, kann aber auch bei *E. faecalis* oder anderen mit *E. faecium* nahe verwandten *Enterococcus* Spezies, wie z. B. *E. hirae* und *E. durans* beobachtet werden. Daher wurden für die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen nur *E. faecium* Stämme, die eine VanA vermittelte Resistenz aufweisen, herangezogen. Die beiden VRE/VSE-Datensätze, die von Herrn Dr. Klare vom Robert Koch-Institut in Werningerode und von Herrn Dr. Maquelin von der Erasmus Universität in Rotterdam zur Verfügung gestellt worden sind, umfassen jeweils 10 glykopeptidsensitive und 10 glykopeptidresistente, VanA-Typ-*E. faecium* Stämme. Genauere Angaben zu den Stämmen, bei denen z. T. eine induzierbare oder eine konstitutive VanA-Typ Resistenz vorlag, sind den Tabellen 3.3 auf Seite 43 und 3.4 auf Seite 43 zu entnehmen.

Alle in den Tabellen 3.3 und 3.4 aufgeführten *E. faecium* Stämme wurden gemäß dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verfahren als Bakterienfilme präpariert und anschließend die Spektren der getrockneten Bakterienfilme gemessen. Eine Clusteranalyse wurde jeweils mit den Spektren von drei Wiederholungsmessungen der beiden Datensätze 1 und 2 (Tabelle 3.3, 3.4) unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von 1200 bis  $900\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt. Die aus der Clusteranalyse nach der Methode von WARD resultierenden Dendrogramme sind in Abbildung 5.21 auf der nächsten Seite dargestellt. Der spektrale Bereich von 1200 bis  $900\text{ cm}^{-1}$  wurde für die Clusteranalyse ausgewählt, da sich dieser Teil des Spektrums, der von Schwingungen der Polysaccharide der Zellwand dominiert ist (siehe Abschnitt 1.3.2.2), bereits in früheren

---

GRAM-negativen Bakterien für Penicillin G zu nennen. Als erworbene Resistenz bezeichnet man hingegen die erworbene Fähigkeit eines Mikroorganismus, gegenüber der Wirkung eines Antibiotikums resistent zu sein, gegen das er normalerweise empfindlich ist. Dieser Resistenztyp basiert auf dem Erwerb eines Plasmids oder Transposons oder auf Mutationen in den chromosomalen Genen (siehe auch Abschnitt 1.2).

## 5.4 Untersuchungen zum Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten

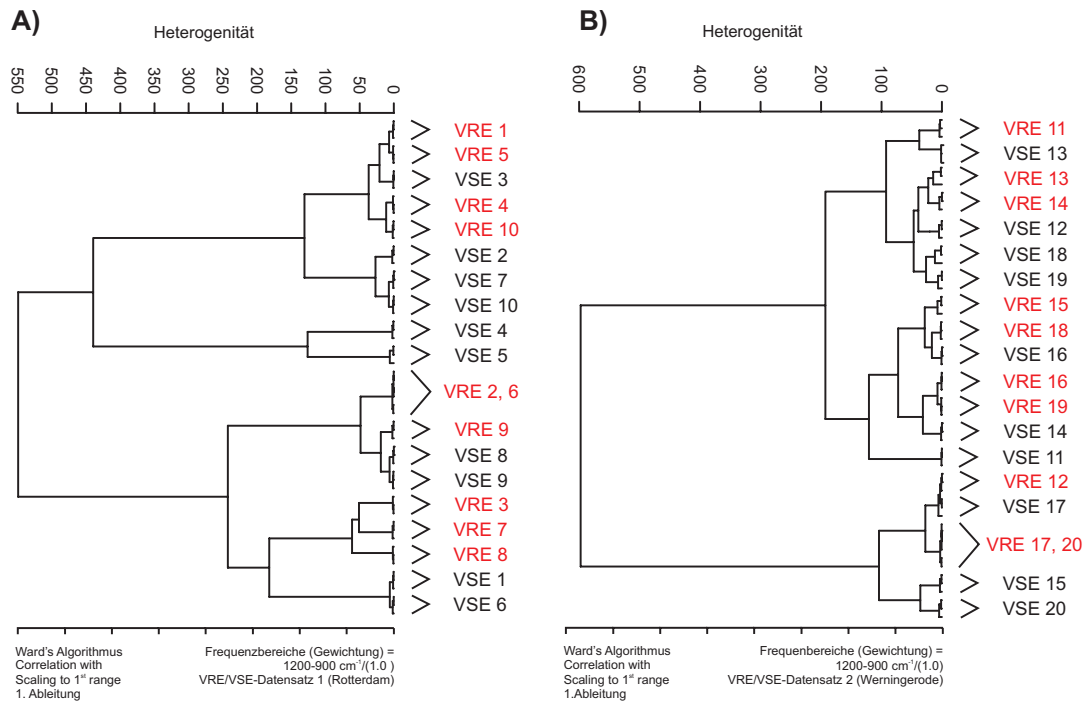


Abbildung 5.21: Dendrogramme der Clusteranalysen der ersten Ableitungen der FTIR Spektren der zwei *Enterococcus* Datensätze (A: 1. Datensatz; B: 2. Datensatz), die jeweils 10 glykopeptidresistente *E. faecium* (VRE) Stämme und 10 glykopeptidsensitive *E. faecium* (VSE) Stämme umfassen. Es wurden drei Wiederholungsmessungen unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von 1200–900 cm<sup>-1</sup> nach der Methode von WARD in die Analyse miteinbezogen.

Studien für die Feindifferenzierung von Bakterien (z. B. Serotypisierung von *E. coli* [40]) als geeignet erwiesen hat. Die Dendrogramme beider Datensätze zeigen, dass diese überwachte Klassifizierungsmethode nicht dazu geeignet ist, die Stämme nach ihrem Antibiotikaverhalten zu gruppieren, da keine eindeutige Trennung zwischen den resistenten und den sensitiven *E. faecium* Stämmen zu beobachten ist. Darüber hinaus belegen die Dendrogramme erneut die hohe Feindifferenzierungskapazität der FTIR-Technik, da jeweils die Wiederholungsmessungen jedes Stammes in stammsspezifischen Clustern gruppiert sind. Weitere Clusteranalysen unter Einbeziehung anderer spektraler Bereiche führten auch zu keiner Differenzierung zwischen resistenten und sensitiven Stämmen.

Der nächste Schritt beinhaltete daher überwachte chemometrische Methoden, in diesem Fall künstliche neuronale Netze, auf ihre Fähigkeit hinzuüberprüfen, sensitive von resistenten Bakterien zu differenzieren. Künstliche neuronale Netze haben sich schon in der Vergangenheit für Klassifizierungsprobleme dieser Art gegenüber überwachten Techniken wie der Clusteranalyse als überlegen erwiesen [73–75]. Die

FTIR-Spektren von acht Wiederholungsmessungen des VRE/VSE-Datensatzes 1 wurden in einen Trainingsdatensatz, der etwa 80% aller Spektren umfasste und einen Validierungsdatensatz, der 20% der Spektren beinhaltete, aufgeteilt. Daran schloss sich das in Abschnitt 5.3.3 bereits erläuterte Verfahren, bestehend aus einer manuellen Vorselektion von Wellenzahlbereichen, Mittelung über drei Datenpunkte und anschließender Hauptkomponentenanalyse (PCA) an, bei der wiederum die ersten Hauptkomponenten, die 99-100 % der spektralen Varianz umfassen, ausgewählt wurden. Daraus ergab sich eine 16-4-2 Netzwerkarchitektur, die mittels des Rprop-Algorithmus bis zum Erreichen eines Fehlerminimums im Validierungsdatensatz ( $SSE_{Val}=0,97$ ) nach nur 16 Zyklen trainiert wurde. Anschließend wurden die Spektren des Trainings-, Validierungs- und Testdatensatzes, der vier Wiederholungsmessungen des VRE/VSE-Datensatzes 2 (Tabelle 3.4) umfasste, mit Hilfe des trainierten Netzes auf Basis des WTA (*winner-takes-all*)-Kriteriums klassifiziert. Dabei war vor allem das Klassifizierungsergebnis des Testdatensatzes (VRE/VSE-Datensatz 2) entscheidend, um die Differenzierungsfähigkeit bzw. Generalisierungsfähigkeit des Netzes beurteilen zu können, da es sich bei diesen Daten um Spektren handelte, die weder im Trainings- noch im Validierungsdatensatz enthalten waren, also um vollkommen unabhängige Daten. Die Klassifizierungsergebnisse sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Aus der

Tabelle 5.7: Klassifizierungsergebnisse der in dem Trainings-, Validierungs- und Testdatensatz enthaltenen Spektren der glykopeptidresistenten und glykopeptidsensitiven *E. faecium* Stämme. Der Anteil korrekt klassifizierter Spektren (Mikroorganismen) ist in Prozent angegeben.

	Trainings- datensatz (Datensatz 1)	Validierungs- datensatz (Datensatz 1)	Test- datensatz (Datensatz 2)
VRE (%)	100	98,8	77
VSE (%)	100	100	62,5
VRE/VSE (%)	100	99,4	70,5

Tabelle 5.7 ist ersichtlich, dass die in dem Trainingsdatensatz enthaltenen Spektren (VRE/VSE-Datensatz 1) erwartungsgemäß 100 % korrekt identifiziert werden konnten. Weiterhin konnten auch die für die Validierung verwendeten Spektren nahezu 100 % korrekt identifiziert werden. Hierbei wurde nur ein Vancomycin-resistenter Stamm nicht korrekt klassifiziert, da die Aktivierung für das die Resistenz ausweisende Neuron unter 0,7 (bei 0,59) lag. Demzufolge wurde dieser Stamm aber auch nicht als sensitiv klassifiziert, sondern wurde als nicht klassifizierbar eingestuft. Jedoch erwies sich die Differenzierungs- bzw. Generalisierungseigenschaft des Netzes bei der Klassifizierung der im Testdatensatz enthaltenen, vollkommen unabhängigen Spektren des VRE/VSE-Datensatzes 2 (Tabelle 3.4) als deutlich schwächer mit nur insgesamt 70,5 % korrekt klassifizierten Spektren.



#### 5.4.2 Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten von MRSA/MSSA-Stämmen *per se*

Neben den im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten FTIR-spektroskopischen Messungen an den zwei VRE/VSE-Datensätzen wurden auch noch vergleichende Untersuchungen an drei Datensätzen Methicillin-resistenter und -sensitiver *S. aureus* Stämmen verschiedener Herkunft durchgeführt. Die Spezies *S. aureus* ist mittlerweile von enormer klinischer Relevanz, da sie die wichtigsten und am weitesten verbreiteten pathogenen Erreger repräsentiert, die nosokomiale Infektionen verursachen. In Abhängigkeit vom Selektionsdruck durch antibiotische Therapeutika tritt bei Staphylokokken vergleichsweise schnell eine Resistenzentwicklung durch Mutationen oder den Erwerb von Resistenzgenen ein. Außerdem weisen diese Pathogene häufig eine multiple Antibiotikaresistenz auf, die von Plasmiden codiert wird. Multiresistente *S. aureus* Stämme sind fast immer resistent gegen Oxacillin (historisch Methicillin, daher die Bezeichnung „Methicillin-resistenter *S. aureus*“, MRSA). Die Mehrfachresistenz der klassischen MRSA schließt in den meisten Fällen eine Reihe verschiedener antibiotischer Substanzklassen ein, so dass oft nur der Einsatz von so genannten Reserveantibiotika, wie den Glykopeptiden Vancomycin und Teicoplanin, als letzte verfügbare Therapiemöglichkeit bleibt [76]. Damit könnte ein potenziell möglicher und *in vitro* bereits beobachteter Transfer des *vanA*-Gens auf multiresistente *S. aureus* Stämme [77, 78] zu nicht mehr therapierbaren MRSA-Infektionen führen. Neben der auf Plasmidebene codierten Antibiotikaresistenz treten bei *S. aureus* auch noch chromosomal bedingte Resistenzen auf. Der Mechanismus der so genannten R-Plasmidresistenz (R-Faktoren) unterscheidet sich wesentlich von dem der chromosomal bedingten Resistenz. In den meisten Fällen bedingt die von einem chromosomalen Gen vermittelte Resistenz eine Modifikation des Angriffsortes (targets) des Antibiotikums. Im Gegensatz dazu geht die R-Plasmidresistenz häufig auf das Vorhandensein von Genen auf dem R-Plasmid zurück, die neue Enzyme codieren, die das Antibiotikum inaktivieren oder auf Gene, die entweder die Aufnahme des Medikaments verhindern oder es aktiv aus der Zelle herauspumpen. Die bei *S. aureus* häufig auftretende multiple Antibiotikaresistenz wird durch R-Plasmide vermittelt, was auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass ein einzelnes R-Plasmid mehrere Gene enthalten kann, von denen jedes ein anderes antibiotikuminaktivierendes Enzym codiert. Jedoch ist es vor allem die chromosomal vermittelte Resistenz, die die Behandlung von Infektionen, die durch MRSA hervorgerufen wurden, so problematisch macht. Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme wurden erstmalig 1961, nach der Einführung des  $\beta$ -Lactams für die Behandlung von Staphylococcus Infektionen, isoliert [79]. Die in diesem Fall chromosomal bedingte Resistenz wird durch das Gen *mecA* vermittelt. Daher wurden für die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen nur MRSA-Stämme, die eine *mecA* vermittelte Resistenz aufweisen, herangezogen. Die drei MRSA/MSSA-Datensätze, von denen zwei von Herrn Prof. Witte vom Robert Koch-Institut in Werningerode und einer von Dr. Allouch vom Centre Hospitalier De Versailles zur Verfügung gestellt wurden, umfassen insgesamt 19 Methicillin-sensitive und 24 Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme.

## 5 Ergebnisse

Das Resistenzverhalten gegenüber Methicillin kann entweder konstitutiv vorliegen [80] oder auch durch  $\beta$ -Lactamantibiotika induziert werden [81]. Letzterer Fall tritt jedoch nur bei Stämmen auf, die ein  $\beta$ -Lactamase Plasmid besitzen. Genauere Angaben zu den klinischen Isolaten, die epidemiologisch sehr verschiedene Stämme beinhalten, sind den Tabellen 3.5 auf Seite 44, und 3.6 und 3.7 auf Seite 45 zu entnehmen. Alle in den Tabellen 3.5, 3.6 und 3.7 aufgeführten *S. aureus* Stämme wurden gemäß dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verfahren als Bakterienfilme präpariert und anschließend die Spektren der getrockneten Bakterienfilme gemessen. Eine genauere Betrachtung der zweiten Ableitungen des Datensatzes 1 (siehe Tabelle 3.5 auf Seite 44) in Abbildung 5.22, der insgesamt 15 Methicillin-sensitiven und -resistenten Stämme umfasste, zeigt, dass sich die Spektren vor allem im Polysaccharidbereich ( $900$  bis  $1200\text{ cm}^{-1}$ ) signifikant unterscheiden. Dabei fiel auf, dass vier (schwarz) der

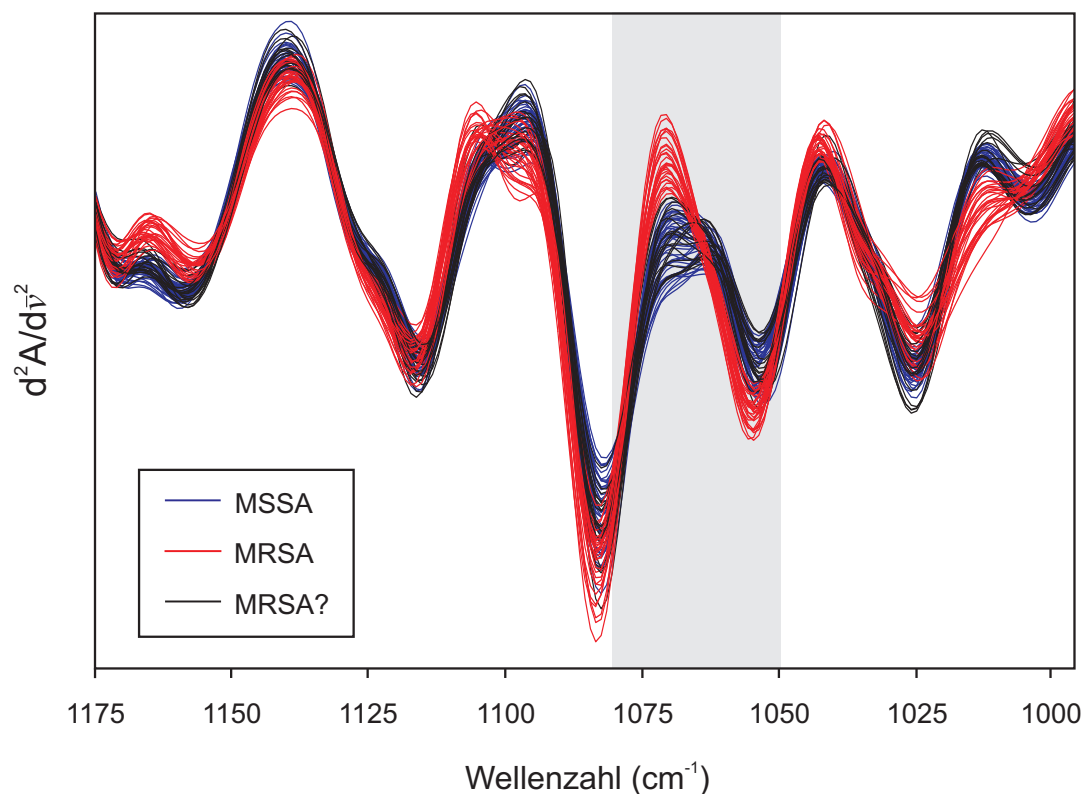


Abbildung 5.22: Typische zweite Ableitungen der 15 Methicillin-sensitiven und -resistenten *S. aureus* Stämme (Datensatz 1) dargestellt in dem spektralen Bereich von  $1000$ - $1200\text{ cm}^{-1}$ . Der grau markierte Bereich hebt den spektralen ( $1050$  bis  $1080\text{ cm}^{-1}$ ) Bereich hervor, in dem die Spektren die größten spektralen Unterschiede aufweisen.

mittels Antibiotikadiffusionstests als resistent charakterisierten Stämme (rot) in dem spektralen Bereich von  $1050$  bis  $1080\text{ cm}^{-1}$  eine größere spektrale Ähnlichkeit zu den MSSA (blau) Spektren aufwiesen als zu den übrigen MRSA Spektren.

## 5.4 Untersuchungen zum Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten

Dieser relativ schmale Wellenzahlbereich von 1050 bis 1080  $\text{cm}^{-1}$ , in dem die größten spektralen Unterschiede auftreten, wurde für eine Clusteranalyse unter Einbeziehung der Spektren von fünf Wiederholungsmessungen verwendet. Das aus der Clusteranalyse nach der Methode von WARD resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 5.23 dargestellt. In dem Dendrogramm sind zwei deutlich voneinander ge-

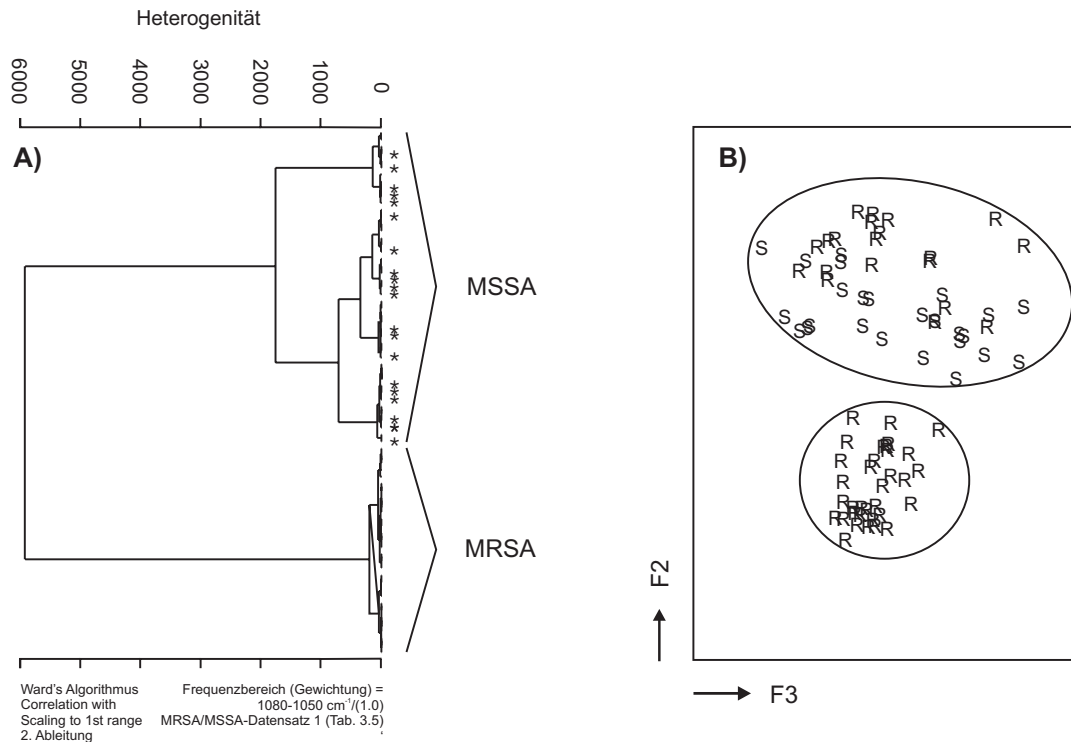


Abbildung 5.23: A) Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren des MRSA/MSSA-Datensatzes 1, der 10 Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) und 5 Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) Stämme umfasst. Die Clusteranalyse wurde unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von 1050–1080  $\text{cm}^{-1}$  nach der Methode von WARD mit fünf Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die missklassifizierten MRSA-Spektren sind gekennzeichnet (\*). (B) Ergebnis einer vergleichenden Faktoranalyse der gleichen Spektren. Für eine Projektion der Daten im Faktorraum wurden die Faktorladungen 2 und 3 verwendet. S bezieht sich auf MSSA und R auf MRSA, wobei jeder Buchstabe ein Isolat darstellt.

trennte Gruppen zu erkennen. Jedoch wurden trotz der beiden distinkten Cluster, die auf eine mögliche Trennung in Abhängigkeit von der Antibiotikaresistenz bzw. -empfindlichkeit hinweisen, vier MRSA-Isolate missklassifiziert. Auch eine zu Vergleichszwecken durchgeführte Faktoranalyse mit den gleichen Spektren lieferte ein ähnliches Ergebnis. Für die Projektion der voneinander unabhängigen Daten im Fak-

## 5 Ergebnisse

torraum wurden die Faktorladungen 2 und 3 verwendet. Auch hier deutete sich eine mögliche Trennung bezüglich der Antibiotikaempfindlichkeit in Form von zwei distinkten Clustern an, wobei wiederum die gleichen vier MRSA-Isolate missklassifiziert wurden. Die Auswertung der FTIR-spektroskopischen Messungen an den MRSA/MSSA-Datensätzen 2 und 3 (siehe Tabelle 3.6 und 3.7) führte zu den in Abbildung 5.24 dargestellten Klassifizierungsergebnissen. Vergleichbar den anhand der VRE/VSE-

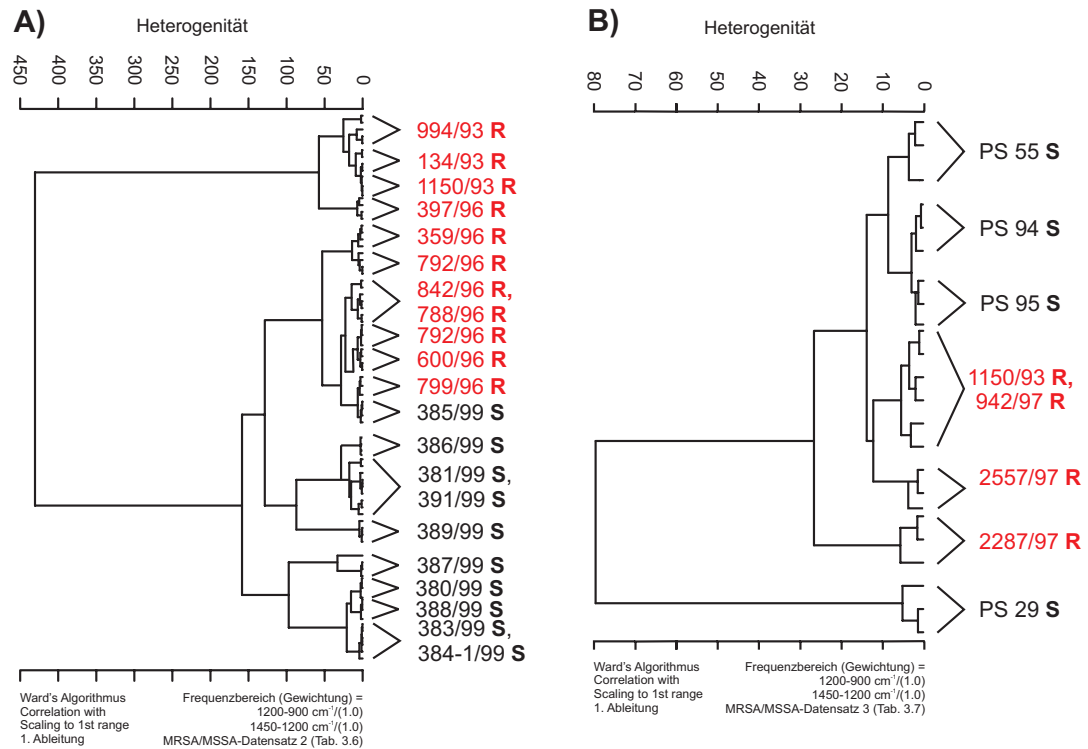


Abbildung 5.24: Dendrogramme der Clusteranalysen der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren der MRSA/MSSA-Datensätze 2 (A) und 3 (B: isogene Stämme). Die Clusteranalyse wurde unter Einbeziehung der spektralen Bereiche von  $1450\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  und von  $1200\text{ bis }900\text{ cm}^{-1}$  nach der Methode von WARD durchgeführt.

Daten erhaltenen Ergebnisse in Abschnitt 5.4.1 kann auch hier bei beiden Dendrogrammen trotz einer scheinbaren Tendenz keine distinkte Trennung zwischen resistenten und sensitiven *S. aureus* Stämmen beobachtet werden. Die drei Datensätze wurden zunächst getrennt analysiert, da es sinnvoll erschien, eine potenziell mögliche Antibiotikaempfindlichkeitsdifferenzierung der einzelnen Datensätze nicht durch eine Erhöhung der Stammvarianz, die eine Vereinigung der Daten zu einem Gesamtdatensatz zur Folge hätte, zu erschweren. Eine Clusteranalyse, die anschließend an dem gesamten Datensatz bestehend aus 19 MSSA- und 24 MRSA-Stämmen, durchgeführt wurde, führte erwartungsgemäß auch zu keiner Differenzierung zwischen resistenten und sensitiven Stämmen.

## 5.4 Untersuchungen zum Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten

Anhand der drei MRSA/MSSA-Datensätze verschiedener Herkunft, die eine beträchtliche epidemiologische Vielfalt repräsentieren, wurde darüber hinaus, die Fähigkeit künstlicher neuronaler Netze evaluiert, diese Isolate nach ihrem Antibiotikaempfindlichkeitsverhalten zu differenzieren. Die FTIR-Spektren von acht Wiederholungsmessungen, die an dem MRSA/MSSA-Datensatz 1 durchgeführt worden waren, wurden analog dem in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen Verfahren in einen Trainingsdatensatz, der etwa 80% aller Spektren umfasste und einen Validierungsdatensatz, der 20% der Spektren beinhaltete, aufgeteilt. Daran schloss sich gemäß dem in Abschnitt 5.3.3 bereits erläuterten Verfahren, eine manuelle Vorselektion relevanter Wellenzahlbereiche, Mittelung über drei Datenpunkte und anschließend eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) an, bei der wiederum die ersten Hauptkomponenten, die 99-100 % der spektralen Varianz umfassen, ausgewählt wurden. Daraus ergab sich eine 16-4-2 Netzwerkarchitektur, die mittels des Rprop-Algorithmus bis zum Erreichen eines Fehlerminimums im Validierungsdatensatz ( $SSE_{Val}=1,23$ ) nach nur 18 Trainingszyklen erreicht wurde. Anschließend wurden die Spektren des Trainings-, Validierungs- und der zwei Testdatensätze, die vier Wiederholungsmessungen an dem zweiten und dritten MRSA/MSSA-Datensatz (Tabelle 3.6 und 3.7) umfasste, mit Hilfe des trainierten Netzes auf Basis des WTA (*winner-takes-all*)-Kriteriums klassifiziert. Wiederum war vor allem das Klassifizierungsergebnis der beiden Testdatensätze entscheidend, um die Differenzierungsfähigkeit des Netzes beurteilen zu können, da es sich bei diesen Daten um Spektren handelte, die weder im Trainings- noch im Validierungsdatensatz enthalten waren, also um vollkommen unabhängige Daten. Die Klassifizierungsergebnisse für alle Daten sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst. Aus der Tabelle 5.8 ist ersichtlich,

Tabelle 5.8: Klassifizierungsergebnisse der in dem Trainings-, Validierungs- und den beiden Testdatensätzen enthaltenen Spektren der Methicillin-resistenten und -sensitiven *S. aureus* Spektren. Es ist der Anteil korrekt klassifizierter Spektren in Prozent angegeben.

	Trainings- datensatz (Datensatz 1)	Validierungs- datensatz (Datensatz 1)	Test- datensatz 1 (Datensatz 2)	Test- datensatz 2 (Datensatz 3)
MRSA (%)	100	93,8	50	65
MSSA (%)	100	100	75	20
MRSA/MSSA (%)	100	95,8	62,5	42,5

dass die in dem Trainingsdatensatz enthaltenen Spektren erwartungsgemäß zu 100 % korrekt identifiziert werden konnten. Weiterhin konnten auch die für die Validierung verwendeten Spektren nahezu zu 100 % korrekt identifiziert werden. Hierbei konnte nur ein Methicillin-resistenter Stamm nicht korrekt klassifiziert werden, da die Aktivierung für das die Resistenz ausweisende Neuron unter 0,7 (bei 0,65) lag. Demzufolge wurde dieser Stamm aber auch nicht als sensitiv klassifiziert, sondern wurde als nicht klassifizierbar eingestuft. Jedoch erweist sich die Differenzierungs- bzw. Generalisierungseigenschaft des Netzes bei der Klassifizierung der in den beiden Testdatensätzen

enthaltenen, vollkommen unabhängigen MRSA/MSSA-Spektren als deutlich schlechter mit nur insgesamt 62,5 % korrekt klassifizierten Spektren für den Testdatensatz 1 (MRSA/MSSA-Datensatz 2) und sogar nur 42,5 % korrekt klassifizierten Spektren für den Testdatensatz 2 (MRSA/MSSA-Datensatz 3). Auch hier führte eine Analyse des Gesamtdatensatzes und einer danach zufällig erfolgten Aufteilung in Trainings-, Validierungs- und Testdatensatz zu keinen signifikant verbesserten Klassifizierungsergebnissen.

### 5.4.3 Das FTIR-spektroskopische Verhalten von sensitiven und resistenten Zellen unter Zugabe eines typischen $\beta$ -Lactam-Antibiotikums

In den beiden vorangegangenen Abschnitten wurden FTIR-spektroskopische Untersuchungen an resistenten und sensitiven Bakterien vorgestellt. Diese hatten zum Ziel, zu überprüfen, ob die Spektren der Antibiotika-resistenten Stämme Informationen enthalten, die spezifisch genug sind, um sie von den Spektren sensitiver Stämme zu unterscheiden. Im nächsten Schritt sollte der Einfluss eines typischen  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums auf sensitive und resistente Zellen mittels der FTIR-Mikrospektrometrie vergleichend verfolgt werden.

#### 5.4.3.1 Antibiotika-Suszeptibilitätstest mittels FTIR-Mikrospektrometrie

Um den Einfluss eines typischen  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums auf resistente bzw. sensitive Stämme, die als Mikrokolonien kultiviert werden, zu untersuchen, wurde nach dem in Abbildung 5.25 auf der nächsten Seite skizzierten experimentellen Schema verfahren. Die zur Präparation von Mikrokolonien notwendigen Schritte wurden wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben, durchgeführt. Nach dem Ausplattieren von 100  $\mu$ L der letzten bakteriellen Verdünnungsstufe ( $10^{-3}$ ) wurde eine mit 5  $\mu$ g Oxacillin, einem semisynthetischen  $\beta$ -Lactam, das die Zellwandsynthese von GRAM-positiven Bakterien hemmt, beladene Suszeptibilitätsdisk in der Mitte der Agarplatte platziert. Nach einer Inkubationsdauer von 5 bis 6 h bei 37 °C, sobald Mikrokoloniewachstum in der Größenordnung von 50 bis 80  $\mu$ m auftrat, wurden die Mikrokolonien beginnend von der Mitte der Agarplatte, nahe der Antibiotikadisk, in radialer Richtung abgestempelt, um auf diese Weise Mikrokolonien entlang des Antibiotikakonzentrationsgradienten zu erhalten. Bei der Konzeption dieses experimentellen Ansatzes wurden mehrere Aspekte berücksichtigt: (i) Zum einen bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, Mikroorganismen unter Einfluss eines Antibiotikums zu untersuchen, ohne dass es einer aufwendigen Probenpräparation bedarf. (ii) Gleichzeitig werden die sonst bei Antibiotikaempfindlichkeitstests üblichen Kultivierungszeiten, die z. B. für den in Abschnitt 1.1.3.2 beschriebenen Diskdiffusionstest mindestens 24 h betragen, deutlich unterschritten. (iii) Darüber hinaus bietet das in Abbildung 5.25 skizzierte Schema die Möglichkeit, Zellen, die unter dem Einfluss des Antibiotikums gewachsen sind mit solchen Zellen, die zwar auf derselben Agarplatte, aber außerhalb des Einflussbereichs des Antibiotikums gewachsen sind (Kontroll-Zellen), zu vergleichen. Mit Hilfe

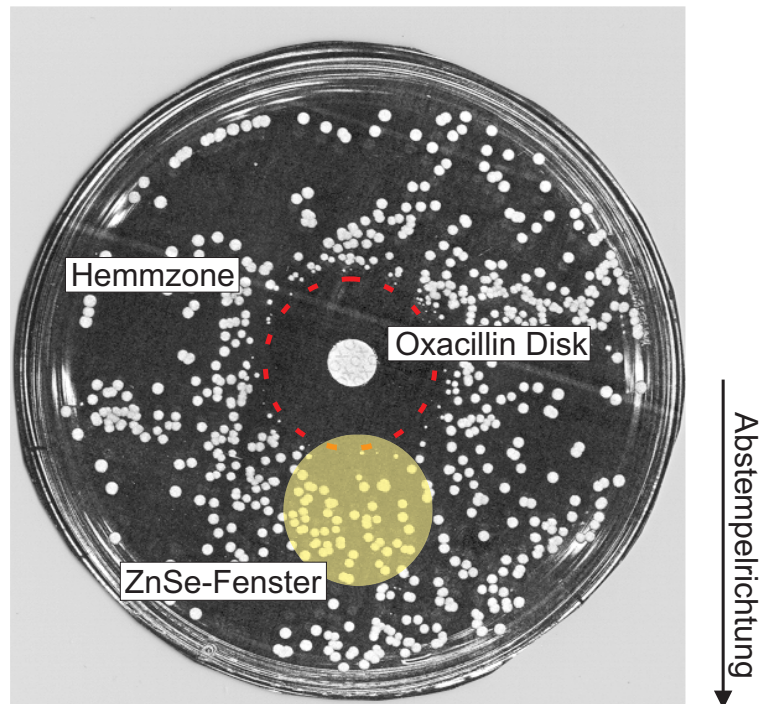


Abbildung 5.25: Schema des experimentellen Aufbaus, das zur Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung an Mikrokolonien entwickelt wurde. Aus Gründen der Anschaulichkeit sind 24 h alte Kolonien anstelle von 6-8 h alten Mikrokolonien dargestellt. Die rot markierte runde Zone um das mit dem Antibiotikum Oxacillin beladene Filterpapierscheibchen, in der kein Koloniewachstum zu beobachten ist, ist die so genannte Hemmzone.

dieses neu entwickelten Ansatzes, bei dem die Mikrokolonien des zu untersuchenden Stammes unter Einfluss des halbsynthetischen  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums Oxacillin auf einem festen Nährmedium kultiviert wurden, wurde die Zielsetzung verfolgt, die molekularen Auswirkungen eines typischen  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums auf sensitive und resistente Stämme von *S. aureus* (MSSA, MRSA) mittels ihrer IR-Spektren zu verfolgen. Für die sensitive Zellen war dabei zu erwarten, dass die Auswirkungen auf molekularer Ebene die Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung reflektieren, die durch den Eingriff des Antibiotikums in den zellulären Metabolismus hervorgerufen wird. Für die resistente Zellen hingegen war davon auszugehen, dass durch die Zell-Antibiotika-Wechselwirkung der antibiotische Resistenzmechanismus ausgelöst wird.

Wie bereits erwähnt bietet der experimentelle Ansatz die Möglichkeit, FTIR-Spektren von mit Oxacillin behandelten Zellen<sup>7</sup> gegenüber unbehandelten Zellen<sup>8</sup>, die

<sup>7</sup>Diese Zellen werden im weiteren Text als „Oxacillin-Zellen“ bezeichnet.

<sup>8</sup>Diese Zellen werden im nachfolgenden Text als „Kontroll-Zellen“ bezeichnet.

## 5 Ergebnisse

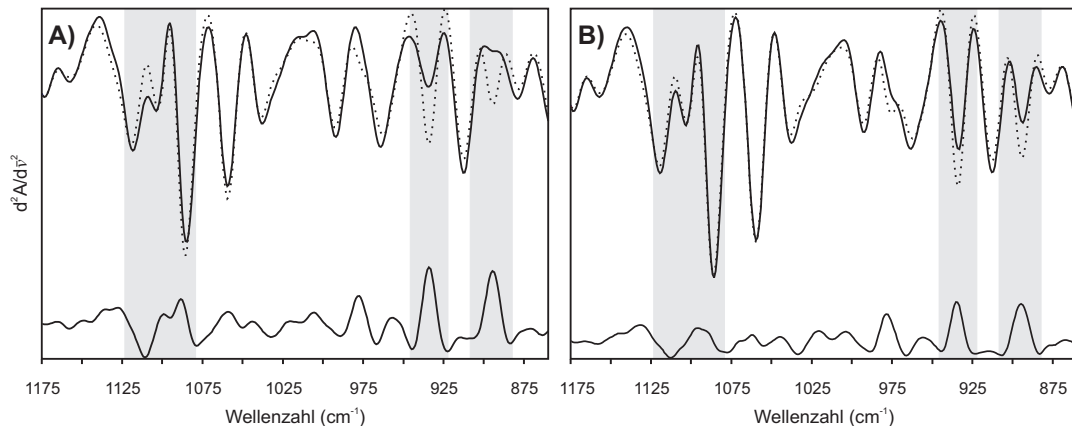


Abbildung 5.26: Typische zweite Ableitungen von mit Oxacillin behandelten (durchgezogene Linie) und unbehandelten (gestrichelte Linie) MSSA- (A) und MRSA- (B) Stämmen und die entsprechenden Differenzspektren. Die grau schattierten Bereiche markieren die prominentesten Unterschiede. Die Differenzspektren wurden durch eine 1:1 Subtraktion der normierten Spektren der behandelten von den unbehandelten Zellen erhalten.

auf derselben Petrischale aber außerhalb des Einflusses des Antibiotikums gewachsen waren, zu vergleichen. Solche Spektren, bzw. die auflösungsverstärkten zweiten Ableitungen sind in Abbildung 5.26 dargestellt. Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass sich die Spektren der Kontroll-Zellen tatsächlich von den Spektren der Oxacillin-Zellen unterscheiden. Die von dem  $\beta$ -Lactam Antibiotikum hervorgerufenen molekularen Veränderungen spiegeln sich in distinkten Veränderungen in den Spektren der mit Oxacillin behandelten sensitiven (A) und resistenten (B) Zellen wider. Darüber hinaus belegen die in Abbildung 5.26 ebenfalls dargestellten FTIR-Differenzspektren, dass die Veränderungen für die sensitiven Zellen erwartungsgemäß viel stärker ausgeprägt sind als für die resistenten Zellen.

In Abbildung 5.27 auf der nächsten Seite ist ein Dendrogramm dargestellt, das aus der Clusteranalyse der Spektren der mit Oxacillin behandelten Mikrokolonien resultiert. Es sind zwei deutlich voneinander getrennte Cluster zu erkennen, die darauf hindeuten, dass die durch das Antibiotikum verursachten molekularen und damit auch spektralen Veränderungen eine eindeutige Differenzierung dieser Bakterien basierend auf ihrer Antibiotikaresistenz bzw. -sensitivität ermöglichen. Die größten spektralen Unterschiede sind wie bei einem typischen  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum, das in die Zellwandsynthese eingreift, zu erwarten war, in dem von Polysacchariden der Zellwand dominierten spektralen Bereich von 900 bis 1200 cm<sup>-1</sup> zu erkennen (siehe Abbildung 5.27 B).

Um darüber hinaus die inter-Stamm-Varianz, die zwischen den unbehandelten MRSA/MSSA-Stämmen im Vergleich zu den mit Oxacillin behandelten Stämmen besteht, zu evaluieren, wurde schließlich eine hierarchische Clusteranalyse mit den Spek-



## 5.4 Untersuchungen zum Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten

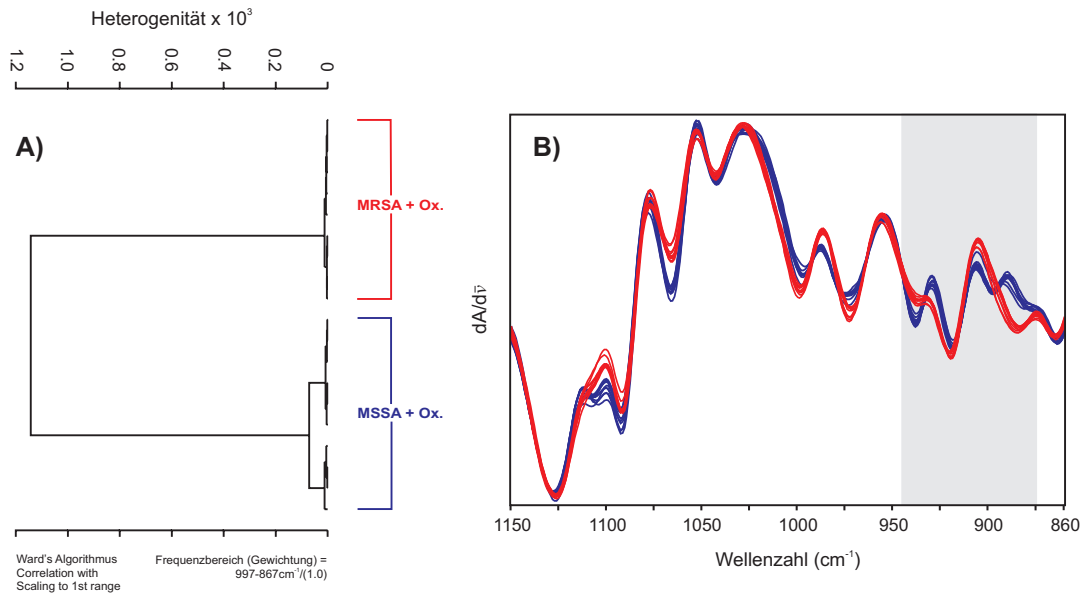


Abbildung 5.27: A) Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse der ersten Ableitungen von MRSA- und MSSA-Stämmen, die mit dem  $\beta$ -Lactam Antibiotikum Oxacillin behandelt wurden. Die Clusteranalyse wurde nach der Methode von WARD unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von  $867$  bis  $997\text{ cm}^{-1}$ , in dem die größten spektralen Unterschiede auftraten, durchgeführt. B) Typische ersten Ableitungen der resistenten und sensitiven mit Oxacillin behandelten Zellen dargestellt im Polysaccharidbereich.

tren von sowohl unbehandelten, als auch behandelten MRSA- und MSSA-Stämmen unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von  $900$  bis  $1800\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt. Es sind vier klar voneinander separierte Cluster in dem in Abbildung 5.28 auf der nächsten Seite dargestellten Dendrogramm zu beobachten, die eine Differenzierung in sensitive und resistente, aber auch behandelte und unbehandelte Zellen belegen. Das Dendrogramm in Abbildung 5.28 zeigt weiterhin, dass die spektrale Varianz zwischen den sensitiven und resistenten Kontroll-Zellen im Vergleich zu den durch das Oxacillin hervorgerufenen Unterschieden sehr gering ist. Zudem bestätigt das Dendrogramm, den bereits in den Differenzspektren (vergleiche Abbildung 5.26) gefundenen Sachverhalt, dass die durch das Oxacillin hervorgerufenen molekularen Veränderungen bei dem sensitiven Stamm am stärksten ausgeprägt sind. Der Cluster der die sensitiven Oxacillin-Zellen enthält ist am deutlichsten separiert von allen anderen Clustern, d. h. die Spektren der sensitiven Oxacillin-Zellen haben die geringste Ähnlichkeit zu allen anderen Spektren.

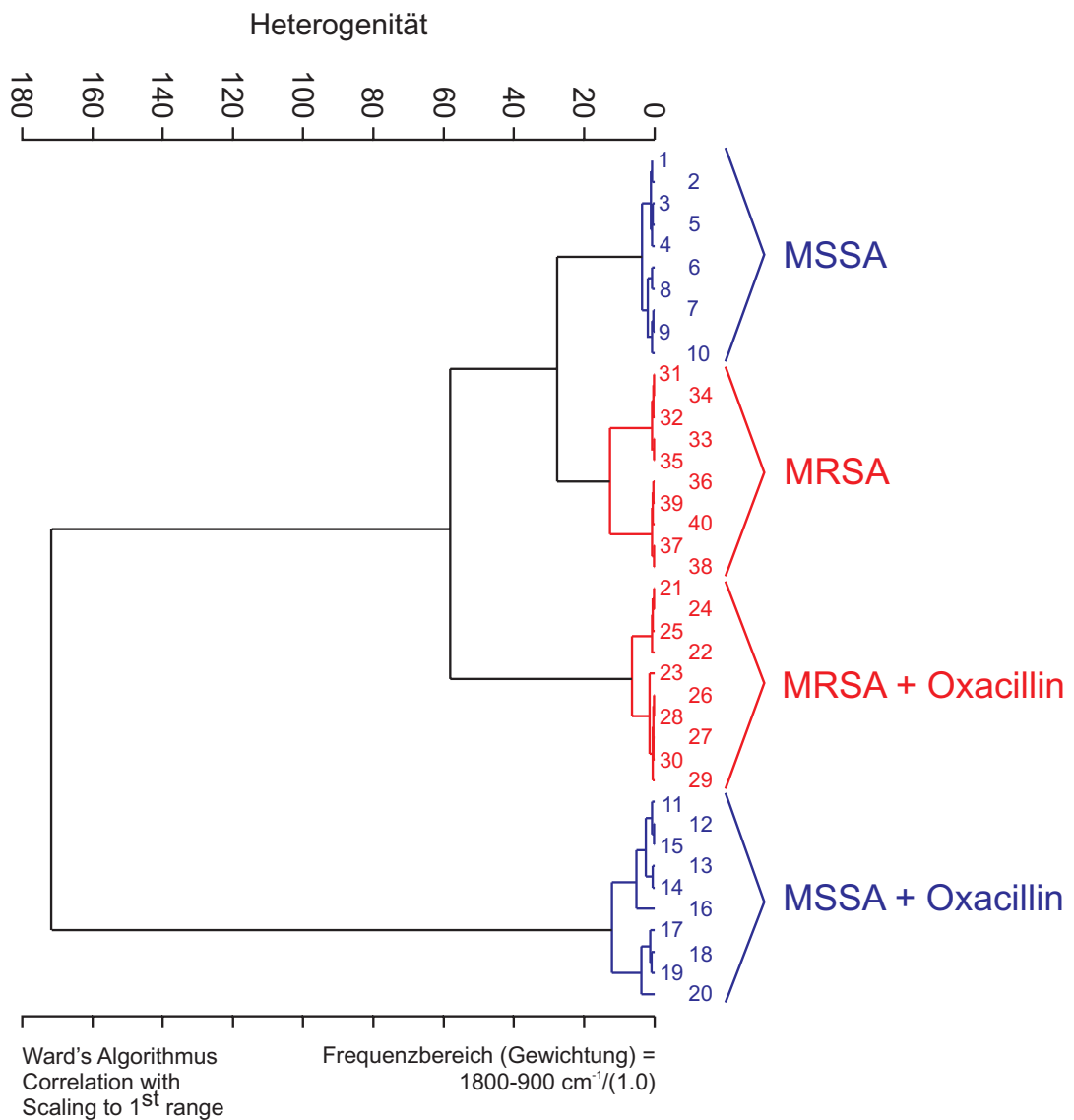


Abbildung 5.28: Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse der ersten Ableitungen von mit Oxacillin behandelten und unbehandelten MRSA- und MSSA-Stämmen. Die Clusteranalyse wurde nach der Methode von WARD mit jeweils zwei unabhängigen Wiederholungsmessungen unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von 900 bis 1800 cm<sup>-1</sup> durchgeführt.