

## 6 Diskussion

### 6.1 Korrelation der spektroskopischen, phänotypischen und genotypischen Differenzierungsergebnisse innerhalb der Gattung *Enterococcus*

Bei der Durchführung der vergleichenden Studie lagen unterschiedliche Zielsetzungen vor. Zum einen sollte die Differenzierbarkeit auf Speziesebene innerhalb der Gattung *Enterococcus* auf Basis ihrer FTIR- und RAMAN-Spektren im direkten Vergleich mit phänotypischen und genotypischen Methoden untersucht werden. Ein weiterer Schwerpunkt lag darauf, das diagnostische Potenzial der komplementären FTIR- und RAMAN-spektroskopischen Techniken für die Differenzierung von Mikroorganismen zu evaluieren und zu bewerten.

Zur Durchführung der Differenzierbarkeitsstudie wurden Stämme verschiedener Spezies der Gattung *Enterococcus* ausgewählt, da diesen Mikroorganismen aus klinischer Sicht eine große Bedeutung zukommt. Bei den Enterokokken handelt es sich um so genannte opportunistische humanpathogene Bakterien. Die beiden wichtigsten Vertreter dieser Spezies, *E. faecium* und *E. faecalis*, kommen im menschlichen Körper im Intestinaltrakt vor, und gehören auch zu den wichtigsten und am weitesten verbreiteten pathogenen Erregern, die Nosokomialinfektionen einschließlich der lebensbedrohlichen Sepsis (Septikämie) und Bakteriämie verursachen [16]. Diese Infektionen sind zumeist schwer zu behandeln, da sich in zunehmendem Maß mehrfachresistente Stämme dieser Organismen entwickelt haben [60, 82, 83]. Dabei ist vor allem die seit kurzem zu verzeichnende Zunahme von Vancomycin resistenten *E. faecium* Stämmen in klinischen Isolaten sehr problematisch, da es sich bei diesem zu der Gruppe der Glykopeptide gehörendem Antibiotikum um ein Reserveantibiotikum handelt, das bei lebensbedrohlichen Infektionen als letztmögliche Therapiemaßnahme eingesetzt wird [84]. Darüber hinaus haben Enterokokken eine Vielzahl von Mechanismen für die Übertragung von Resistenzplasmiden (R-Faktoren) entwickelt [85]. Die größte Gefahr geht daher nicht von den Enterokokken selbst aus, sondern von der Möglichkeit, dass sie ihre R-Faktoren auf andere, noch pathogenere GRAM-positive Bakterien, wie zum Beispiel *S. aureus* übertragen. Daraus könnte ein sehr gefährlicher humanpathogener Organismus resultieren, der mit den derzeit zur Verfügung stehenden Antibiotika nicht mehr zu behandeln wäre [86].

Des Weiteren haben neuere Studien ergeben, dass das Auftreten von eher seltenen Spezies, wie z. B. *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* in klinischen Enterokokken Isolaten signifikant zugenommen hat. Insgesamt gesehen haben diese Entwicklungen den Bedarf nach einer schnellen und präzisen Identifizierungsmethode

von Enterokokken auf Spezies und Sub-Spezies Niveau erhöht, die unerlässlich ist, um effektive Infektionskontrollen und die Durchführung von epidemiologischen Studien gewährleisten zu können. Darüber hinaus könnte durch eine frühzeitige Identifizierung des pathogenen Mikroorganismus, eine effektivere Behandlung bei der Therapie mit antibiotischen Wirkstoffen erzielt werden.

Zur Identifizierung von Enterokokken bzw. Mikroorganismen im Allgemeinen werden wie bereits in Abschnitt 1.1.3.2 erwähnt in erster Linie phänotypische Techniken eingesetzt. Jedoch haben verschiedene Studien gezeigt, dass eine eindeutige Spezies Identifizierung von Enterokokken mittels phänotypischer Methoden ein aufwendiges und schwieriges Verfahren darstellt, das aufgrund der phänotypischen und biochemischen Ähnlichkeiten, die zwischen vielen Enterokokken existieren, mehrere Tage in Anspruch nehmen kann [87]. Darüber hinaus scheitern gerade die automatisierten, wachstumsabhängigen Identifizierungssysteme, die derzeit häufig in der Routinediagnostik Anwendung finden, oft daran, die eher selten auftretenden Spezies korrekt zu identifizieren [61, 62, 88–90].

Molekulargenetische Techniken, wie z. B. RAPD (vergleiche Abschnitt 1.1.3.3), *intergenic-ribosomal*-PCR oder andere auf der Polymerasekettenreaktion basierende Verfahren, die die Unterscheidung der Spezies anhand verschiedener Gene zum Ziel haben, sind erfolgreich zur Identifizierung von *Enterococcus* Spezies eingesetzt worden [89, 91–95]. Wie bereits in Abschnitt 1.1.3.3 ausführlich erläutert, beruhen die Stärken der molekulargenetischen Diagnostik vor allem auf zwei Faktoren: 1. Nukleinsäuren lassen sich schnell und sensitiv bestimmen; 2. Bestimmte DNA-Sequenzen lassen sich sehr spezifisch für Spezies und Sub-Spezies Identifizierungen einsetzen. Trotz dieser Vorteile ist eine routinemäßige Anwendung dieser Techniken in der klinischen Diagnostik noch nicht praktikabel. Dies liegt zum einen an den relativ hohen Kosten und dem Bedarf an hochqualifiziertem Personal, die diese Verfahren mit sich bringen.

Schwingungsspektroskopische Verfahren wie die FTIR- und die RAMAN-Spektroskopie stellen hier eine potenzielle Alternative zu den konventionellen Techniken dar, da sie eine Differenzierung von intakten mikrobiellen Zellen ermöglichen. Darüber hinaus liefern sie komplexe *fingerprint*-ähnliche Spektren, die wie in Abschnitt 5.1 umfassend gezeigt wurde, sehr distinkt und reproduzierbar für die verschiedenen Spezies sind. Diese Techniken liefern außerdem schnell ein Ergebnis, da nur wenig Biomasse benötigt wird, so dass die Kultivierungszeiten signifikant reduziert werden können. Hinzu kommt, dass sowohl die IR, als auch die RAMAN-Spektroskopie praktisch ohne jegliche Reagenzien, wie z. B. Indikatorfarbstoffe auskommt. Die FTIR- und die RAMAN-Spektroskopie führen häufig zu ähnlichen Spektren, doch es existieren zusätzlich noch genügend Unterschiede, so dass sie einander ergänzende oder komplementäre Informationen liefern können. Eine Kombination beider Spektroskopiearten zur Untersuchung von Mikroorganismen könnte zu einem umfassenderen Bild über die chemischen/biochemischen Strukturen des untersuchten Stammes beitragen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass beide spektroskopischen Techniken zur Differenzierung von *Enterococcus* Spezies verschiedener Herkunft, wie Isolaten aus Nahrung, Patientenmaterial und Referenzstämmen geeignet sind. Dabei

## 6.1 Korrelation der spektroskopischen, phänotypischen und genotypischen Ergebnisse

reflektieren die Ergebnisse der Studie vor allem das hohe Diskriminierungspotenzial der FTIR- und RAMAN-Spektroskopie, das es ermöglicht phylogenetisch so nah verwandte Bakterien wie Enterokokken eindeutig zu differenzieren. Ein unmittelbarer Vergleich der beiden spektroskopischen Techniken mittels ihrer auf einer Clusteranalyse basierenden Dendrogramme deutet auf eine signifikante Konsistenz der beiden Verfahren hin, da sehr ähnliche Klassifikationsschemata erhalten wurden (vergleiche Abschnitt 5.1). Jedoch zeigte ein erster Vergleich des auf den FTIR-Spektren mit dem auf den RAMAN-Spektren basierendem Dendrogramm (vergleiche hierzu die Abbildungen 5.4 und 5.6 auf den Seiten 66 und 70), dass zwei Stämme, nämlich *E. casseliflavus* (Stamm 16) und *E. hirae* (Stamm 6) im RAMAN-Dendrogramm deutlich anders gruppiert werden als in dem FTIR-Dendrogramm. Eine genauere Betrachtung der beiden RAMAN-Spektren (vergleiche Abbildung 5.7 auf Seite 71) zeigte im Vergleich zu dem Spektrum von *E. faecalis*, dass zwei intensive Banden bei  $1160\text{ cm}^{-1}$  und bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  für die unterschiedliche Gruppierung verantwortlich waren. Diese Banden werden durch carotinoide Farbpigmente hervorgerufen. Die beträchtliche Intensität der beiden Banden ist auf den so genannten prä-Resonanz-RAMAN-Effekt zurückzuführen. Dieser Effekt tritt auf, wenn die Anregungsstrahlung nahezu mit der Anregungsenergie eines elektronischen Überganges der chromophoren Gruppen des untersuchten Moleküls übereinstimmt. Mit dem Aufkommen von abstimmbaren Lasern hat man begonnen sich diesen Effekt zunutze zu machen und die Anregungsstrahlung genau auf die Absorptionsbande der elektronischen Übergänge abzustimmen. Dieses Verfahren wird als Resonanz-RAMAN-Spektroskopie bezeichnet und wird z. B. für die selektive Verstärkung von Banden von chromophoren Gruppen innerhalb eines Moleküls genutzt [96]. Durch den Resonanzeffekt wird die Polarisierbarkeit des Moleküls wesentlich erhöht, so dass die Intensität der gestreuten Strahlung um ein Vielfaches gesteigert wird (bis um den Faktor  $10^6$ ). Auch bei *E. hirae* (Stamm 6) lassen sich die auf dem Carotinoid-Pigment basierenden Banden beobachten, die allerdings eine viel geringere Intensität aufweisen (siehe Abbildung 5.8 auf Seite 72). In dem Differenzspektrum, das durch Subtraktion des nur sehr schwach pigmentierten Stammes *E. hirae* 6 von dem nicht-pigmentierten *E. hirae* 2 erhalten wurde, lässt sich vor allem die Bande bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  deutlich ausmachen, während die Bande bei  $1160\text{ cm}^{-1}$  nur sehr schwach ausgeprägt ist (Abbildung 5.8). Dieser Stamm exprimiert das Carotinoid somit in viel geringerem Maße als der stark orange-pigmentierte *E. casseliflavus* Stamm 16.

Eine erneute Clusteranalyse unter Anwendung einer spezifischen Wellenlängenselektion, bei der die Carotinoid dominierten Wellenzahlenbereiche nicht in die Analyse miteinbezogen wurden, führte zu einem Dendrogramm, das sehr gut mit dem FTIR-Dendrogramm übereinstimmt. Dies ist besonders bemerkenswert im Hinblick auf die Tatsache, dass bei der FTIR- und der RAMAN-Spektroskopie aufgrund der unterschiedlichen Anregungsbedingungen unterschiedliche Schwingungen angeregt werden, woraus der komplementäre Charakter der Informationen resultiert. Dieses Beispiel zeigt, dass die Untersuchung einer Probe sowohl mit der FTIR-, als auch mit der RAMAN-Spektroskopie zusätzliche Informationen liefern kann, wie in diesem Fall das ausgeprägte (sichtbare) und das weniger ausgeprägte (nicht sichtbare) Vorhandensein

eines Pigmentes bei zwei Stämmen, das bei Anwendung von nur einer der beiden Methoden nicht erhalten wird. Dieses Beispiel gibt jedoch nur einen kleinen Aspekt der Komplementarität der beiden Spektroskopiearten wieder. Etwas allgemeiner betrachtet, ist die IR-Spektroskopie besonders gut zur Untersuchung von polaren Verbindungen geeignet, während die RAMAN-Spektroskopie bevorzugt für die Analyse von unpolaren Stoffen eingesetzt wird.

Neben der guten Speziesdifferenzierung zeigt die vergleichende Studie auch, dass beide spektroskopischen Methoden dazu geeignet sind, eine Feindifferenzierung zu erreichen. Dies wird durch die Tatsache belegt, dass beide Dendrogramme eine präzise Differenzierung auf Stammebene aufweisen, da die Wiederholungsmessungen der jeweiligen Stämme in stammspezifischen Subclustern auftreten. Diese gute Feindifferenzierung weist beide Methoden als potenzielle Kandidaten für weitere Anwendungen wie z. B. die Durchführung von epidemiologischen Studien aus. Beispiele für die hohe Feindifferenzierungskapazität der FTIR-Spektroskopie lassen sich auch in der Literatur finden. Tindall *et al.* beschreibt z. B. die Möglichkeit, die FTIR-Spektroskopie als schnelles Verfahren zur Sortierung von Umweltisolaten auf Sub-Spezies Ebene einzusetzen [97]. Diese Gruppierungen dienen dann als Grundlage für weiterführende differenzielle biochemische und molekulargenetische Techniken. Andere Studien belegen, dass es mittels der FTIR-Spektroskopie sogar möglich ist, Mikroorganismen basierend auf ihren serologischen Eigenschaften zu differenzieren [98, 99], zu dessen Bestimmung in der Routineanalytik normalerweise sehr viel aufwendigere serologische Techniken angewandt werden müssen.

Im Vergleich zu den konventionellen phänotypischen Verfahren, die in der klinischen mikrobiologischen Diagnostik routinemäßig angewandt werden und sich nur als verlässlich einsetzbar für die Speziesidentifizierung der beiden am häufigsten vorkommenden klinischen Enterokokken Isolate, nämlich *E. faecalis* und *E. faecium* erwiesen haben, hat sich durch diese Studie erwiesen, dass die FTIR- und die RAMAN-Spektroskopie auch für die Bestimmung von eher selten auftretenden *Enterococcus* Spezies, wie *E. hirae* und *E. durans*, zuverlässig eingesetzt werden können. Darüber hinaus deutet das Ergebnis der Studie darauf hin, dass die schwingungsspektroskopischen Techniken nicht nur den herkömmlichen phänotypischen Verfahren überlegen sind, sondern auch eine breitere Anwendung haben als die genotypisch basierende Identifizierung mittels einer spezifischen PCR-Analyse, die bislang auf die Identifizierung von nur vier *Enterococcus* Spezies begrenzt ist. Schließlich hat diese vergleichende Studie gezeigt, dass von allen verwendeten Analysetechniken nur die Spezies Differenzierung auf Basis der spektroskopischen Daten mit den Ergebnissen der molekulargenetischen 16S-rRNA-Sequenzierung, dem „Goldstandard“ der mikrobiellen Analyse, übereinstimmt.

## 6.2 Vergleich der Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Candida*

Die in den Abschnitten 5.2 und 5.3.2 vorgestellten Ergebnisse belegen, dass die FTIR-Spektroskopie nicht nur die Möglichkeit eröffnet, Bakterien zu differenzieren und zu

## 6.2 Vergleich der Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Candida*

identifizieren, sondern auch zur Charakterisierung von Hefen, in diesem Falle von *Candida* spp. eingesetzt werden kann. Dabei ist von besonderem Interesse, dass auch die Spektren von Mikrokolonien, in der Größenordnung von 50 bis 80  $\mu\text{m}$ , zur schnellen Differenzierung von verschiedenen *Candida* Spezies verwendet werden können [71]. Basierend auf diesem Ergebnis konnten neben den Mikrokoloniespektren von Bakterien auch die Mikrokoloniespektren von *Candida* spp. erstmalig zum Aufbau von Bibliotheken zur schnellen Identifizierung der pathogenen Erreger von Blutinfektionen verwendet werden (vergleiche Abschnitt 5.3.4). In der Literatur lassen sich Studien finden, bei denen die Spektren von Hefen, die mittels der Filmpräparationstechnik erhalten wurden, bereits erfolgreich zum Aufbau von Identifizierungsbibliotheken verwendet wurden.

Kümmerle *et al.* hat z. B. in einer Studie die Kapazität der FTIR-Spektroskopie zur Identifizierung von lebensmittelrelevanten, fermentativen Hefen evaluiert [100]. Basierend auf einer standardisierten Probenpräparation, wurde im Rahmen dieser Studie eine spektrale Referenzbibliothek aufgebaut, die 332 gut definierte Hefestämme, einschließlich einiger Stämme aus internationalen Hefesammlungen, umfasste. Die Identifizierungsfähigkeit dieser Bibliothek wurde dann mittels 772 unbekannter Hefeisolate, die nicht in der Bibliothek enthalten waren, getestet und bewertet. Parallel dazu wurden die Stämme mit konventionellen Techniken typisiert. Insgesamt konnte ein zu 97% korrektes Klassifizierungsergebnis basierend auf der FTIR-Referenzbibliothek erzielt werden. Die Autoren zogen aus diesem Ergebnis der Studie die Schlussfolgerung, dass die FTIR-Technik eine gegenüber den konventionellen Techniken überlegene und schnellere Alternative zur Identifizierung von lebensmittelrelevanten Hefen darstellt, die nur durch die Qualität der Referenzspektrenbibliothek limitiert ist.

Darüber hinaus konnte in zwei weiteren voneinander unabhängigen Studien das Potenzial, das die FTIR-Spektroskopie zur Differenzierung der beiden Spezies *C. albicans* und *C. dubliniensis* besitzt, gezeigt werden [101,102]. Dabei ist die eindeutige Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* von klinischer Relevanz, weil die Spezies *C. dubliniensis* häufig eine Fluconazolresistenz aufweist, die demzufolge eine andere fungizide Therapie erfordert. Die Unterscheidung der beiden Spezies *C. albicans* und *C. dubliniensis* mittels phänotypischer Techniken ist jedoch sehr schwierig und zudem auch zeitaufwendig. Grundlage dieser Studien von Tintelnot *et al.* und Timmins *et al.* waren ebenfalls die FTIR-Spektren von Makrokolonien, d. h. 24 h alten Kulturen.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl FTIR-spektroskopische Messungen an Makrokolonien (24 h alten Kulturen) basierend auf der Filmpräparationstechnik, als auch Messungen an Mikrokolonien (8-9 h alten Kulturen), die mit der Stempeltechnik erhalten wurden, durchgeführt. Ein Ziel dabei war es, diese beiden Techniken, die sich im Zeit- und Arbeitsaufwand unterscheiden, miteinander zu vergleichen. Ein Vergleich der beiden Techniken bezüglich ihrer Differenzierungskapazität innerhalb der Gattung *Candida* kann anhand der Dendrogramme in den Abbildungen 5.12 und 5.18 auf den Seiten 78 und 88 angestellt werden. Das Dendrogramm in Abbildung 5.12 belegt, dass die Makrokolonietechnik eine eindeutige Differenzierung zwischen den sieben klinisch relevanten *Candida* Spezies ermöglicht, wobei die Hauptgruppierungen

auch im Einklang mit den Ergebnissen von phylogenetischen Studien (18S-rRNA-Sequenzierungen) stehen. Mit der Mikrokolonietechnik sind bisher sechs der sieben Spezies gemessen und klassifiziert worden. Die mikrospektrometrischen Messungen wurden auch an einer geringeren Anzahl an Stämmen durchgeführt, so dass hier nur ein vorläufiger Vergleich zwischen den beiden Techniken erfolgen kann. Im Unterschied zur Makrokolonietechnik zeigt das auf den Mikrokoloniemessungen basierende Dendrogramm in Abbildung 5.18, dass die Spezies *C. kefyri* eine größere spektrale Ähnlichkeit zu den Spezies *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* aufweist als zu den beiden Spezies *C. krusei* und *C. glabrata*, wie es für die Makrokolonietechnik (siehe Abbildung 5.12) gefunden wurde. Diese unterschiedlichen Gruppierungen für die Spezies *C. kefyri* könnten z. B. darauf zurückgeführt werden, dass in diesem frühen Wachstumsstadium, das nach nur 9 h Kultivierung für die Mikrokolonietechnik erreicht wurde, noch nicht alle phänotypischen Merkmale exprimiert wurden, die nach 24 h Wachstumszeit vorhanden sind. Trotzdem scheint auch dieses frühe Wachstumsstadium für eine korrekte Speziesidentifizierung ausreichend zu sein, wie die anhand von Blutkulturen erhaltenen Ergebnisse aus der klinischen Studie in Abschnitt 5.3.4 belegen.

### 6.3 Auswahl der optimalen Mikrokoloniegröße im Hinblick auf das S/N-Verhältnis und die Heterogenität

Die in dem Kapitel 5.3.1 vorgestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass Mikrokolonien in der Größenordnung von 50 bis 80  $\mu\text{m}$  ein ausreichend gutes S/N-Verhältnis und darüber hinaus auch nur ein geringes Maß an Heterogenität aufweisen. Die in Abbildung 5.14 auf Seite 82 dargestellten Differenzspektren belegen zwar, dass spektrale Unterschiede in mehreren Bereichen des Spektrums wie z. B. der Amid-I-Region existieren. Diese sind jedoch so marginal ausgeprägt, dass die zwischen zwei unterschiedlichen Stämmen existierenden spektralen Varianzen deutlich größer sind. Dies wird aus Abbildung 5.15 auf Seite 83 deutlich, in der das Dendrogramm dargestellt ist, das auf der Clusteranalyse von zwei *S. aureus* Stämmen, die jeweils in x- und y-Richtung entlang einer 100  $\mu\text{m}$  Mikrokolonie gemappt wurden, basiert. In dem Dendrogramm in Abbildung 5.15 sind zwei Hauptcluster zu erkennen, die die Differenzierbarkeit der zwei Stämme belegen. Die nur gering ausgeprägte Heterogenität von Mikrokolonien in dieser Größenordnung zeigt sich in den Subclustern, die mit den drei Messbereichen, nämlich der Peripherie, der intermediären Zone und dem Zentrum der jeweiligen Kolonie korrespondieren. Diese Ergebnisse werden darüber hinaus durch die weitergehenden Ergebnisse in einer mit Choo-Smith *et al.* gemeinsam publizierten Studie bestätigt [103]. In dieser Studie wurde die Heterogenität von 6, 12 und 24 h alten Kolonien von *S. aureus*, *E. coli* und *C. albicans* mittels verschiedener spektroskopischer Techniken untersucht. Dabei wurden in dieser Studie auch FTIR-mikrospektrometrische Messungen an 7 h und 12 h alten Kolonien von zwei *E. coli* Stämmen (CIP 54,8T und 53,126) beschrieben. Die Ergebnisse für die

#### 6.4 Vergleich der mikrospektrometrischen Methode mit den konventionellen Methoden

7 h alten Mikrokolonien von *E. coli* entsprechen den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen für die 6 h alten *S. aureus* (100  $\mu\text{m}$ ) Stämme, die belegen, dass 6 bis 7 h alte Mikrokolonien kaum Heterogenität entwickeln. In der Studie von Choo-Smith *et al.* außerdem hinaus gezeigt werden, dass die Spektren von 12 h alten Kolonien der beiden untersuchten *E. coli* Stämme hingegen bereits ein beträchtliches Maß an Heterogenität entwickelt hatten, die eine Differenzierung der beiden Stämme beeinflusste bzw. verhinderte. Dies konnte anhand einer Clusteranalyse gezeigt werden, da in dem Dendrogramm, die Spektren der 12 h alten Kolonien der beiden Stämme gemischte Cluster bildeten.

Weiterhin konnte im Rahmen der Studie von Choo-Smith *et al.* gezeigt werden, dass neben der FTIR-Mikrospektrometrie vor allem die konfokale RAMAN-Mikrospektrometrie ein geeignetes Instrument darstellt, um die Heterogenität der Makrokolonien (12 h bzw. 24 h alte Kolonien) nicht nur in horizontaler Ebene zu untersuchen, sondern auch in vertikaler Richtung. Ähnlich den bereits beschriebenen FTIR-Ergebnissen, wiesen auch die RAMAN-Spektren der nur 6 h alten Mikrokolonien kaum Heterogenität in diesem frühen Wachstumsstadium auf. Mittels dieser konfokalen Messmethode, die im Gegensatz zur IR-Spektroskopie Messungen in verschiedenen Schichten der Kolonie erlaubt, zeigte sich wiederum, dass 12 h und 24 h alte Kolonien bereits beträchtliche Heterogenitäten entwickelt hatten. Mittels hierarchischer Clusteranalyse ließen sich in diesen älteren Kolonien verschiedene Schichten differenzieren. So zeigten z. B. die oberen Schichten eines pigmenthaltigen *S. aureus* Stamms die für Carotinoide bereits erwähnten charakteristischen Banden bei  $1160\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C} - \text{C})$ ] und bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{C} = \text{C})$ ], die in den unteren Schichten der Kolonie nicht auftraten. Eine Korrelation zwischen Wachstumszeit und der Carotinoidbildung bei *S. aureus* ist schon früher von Naumann *et al.* mittels FT-RAMAN-Spektroskopie beobachtet worden [104]. Allerdings konnte der Autor dieser Studie, bei der die FT-RAMAN-Spektroskopie eingesetzt wurde, keine Aussagen über die Lokalisierung des Pigments treffen. Für einen anderen, nicht-pigmentierten *S. aureus* Stamm beschreibt Choo-Smith *et al.* in derselben Studie, dass ebenfalls basierend auf konfokalen RAMAN-mikrospektrometrischen Messungen an 12 h und 24 h alten Kolonien zusätzliche Banden beobachtet werden konnten. Anhand der charakteristischen Markerbanden bei  $723$ ,  $783$ ,  $813$  und  $1575\text{ cm}^{-1}$  konnten diese zusätzlichen Banden auf einen höheren RNA-Gehalt, der in den tieferen Zellschichten vorhanden ist, zurückgeführt werden. Diese Untersuchungen belegen, dass 6 h alte Kolonien kaum Heterogenität entwickeln, so dass sie zum Aufbau von Referenzbibliotheken, die zur Identifizierung von Mikroorganismen eingesetzt werden können, geeignet sind. Hingegen entwickeln Kolonien, die älter als 6 h sind, erhebliche Heterogenitäten, die sie für den Aufbau einer Referenzdatenbank ungeeignet machen.

#### 6.4 Vergleich der mikrospektrometrischen Methode mit den konventionellen Identifizierungsmethoden

Die Ergebnisse der in Abschnitt 5.3.4 vorgestellten prospektiven klinischen Studie belegen das hohe Potenzial, welches die FTIR-Mikrospektrometrie im Hinblick auf

Präzision und Zeitbedarf zur Identifizierung von Mikroorganismen aufweist. Eine korrekte Identifizierung von 98.3% der Proben (119/121) konnte, basierend auf Mikrokoloniespektren, die nach nur 6 bis 8 h vorlagen, erreicht werden. Eine schnelle und korrekte Speziesidentifizierung von Patientenproben bildet die Grundvoraussetzung für eine folgerichtige Antibiotikatherapie. Nach einer Studie von Wheeler *et al.* erhalten jedoch ca. 10% der Patienten, die an einer lebensbedrohlichen Sepsis erkrankt sind, nicht von Anfang an eine geeignete Antibiotikatherapie [105]. Die Tatsache, dass die Mortalitätsrate für diese Patienten um 10 bis 15% höher liegt als für solche Patienten, die unmittelbar eine geeignete Antibiotikatherapie erhalten, unterstreicht die Notwendigkeit, die für die Entwicklung von schnellen Identifizierungstechniken wie der FTIR-Mikrospektroskopie besteht.

Einen wesentlichen Anteil an dem sehr guten Identifizierungsergebnis der hier untersuchten Blutkulturen hatte der optimierte Aufbau der Referenzbibliotheken. Diese wurden auf Basis von hierarchisch organisierten neuronalen Netzwerken erstellt. Dieser Typ von Netzwerk bietet im Gegensatz zu monolithischen Netzen den Vorteil, dass man zunächst individuelle Netze für die in dem gesamten Referenzdatensatz vorhandenen Sub-gruppen trainieren und optimieren kann, die dann anschließend zu einem hierarchisch organisierten Netzwerk verknüpft werden. In der Literatur existieren mehrere Studien, in denen neuronale Netze erfolgreich zur Identifizierung von Mikroorganismen eingesetzt wurden. Goodacre *et al.* konnte in einer Studie erfolgreich künstliche neuronale Netze trainieren, um die anhand von klinischen Isolaten erhaltenen DR (*Diffuse Reflectance*)-FTIR-Spektren verschiedener *Enterococcus* und *Streptococcus* Spezies zu differenzieren [106]. In einer weiteren Studie von Goodacre *et al.* konnten ebenfalls mittels neuronaler Netze die am häufigsten auftretenden aus klinischen Bakteriurien isolierten Harnwegspathogene identifiziert werden [107]. Bei diesen Studien wurden jedoch ausschließlich monolithische Netze verwendet, die im Hinblick auf die hierbei untersuchte eher geringe Anzahl an verschiedenen Gattungen und Spezies auch sinnvoll sind. In verschiedenen Studien von Schmitt *et al.* und Udelhoven *et al.* wurden hierarchisch organisierte Netzwerke für den Aufbau von mikrobiellen Referenzdatenbanken verwendet [108, 109] mittels derer z. B. verschiedene Spezies und Stämme der Gattungen *Staphylococcus*, *P. aeruginosa* und *Bacillus* und sechs verschiedene *Candida* Spezies differenziert werden konnten [110]. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit entwickelten mikrospektrometrischen Identifizierungsmethode basieren die hier kurz skizzierten Studien aus der Literatur auf Makrokolonien, also Kulturen, die für 24 h kultiviert wurden. Darüber hinaus wurden in diesen Studien entweder gar keine oder nur sehr wenige unabhängige Testmessungen zur Überprüfung der Identifizierungseigenschaften der jeweiligen Netze herangezogen. Im Rahmen der hier vorgestellten klinischen Studie wurden hingegen erstmalig (i) die Spektren von nur 6-8 h alten Mikrokolonien zur Identifizierung von unbekanntem Isolat (Blutkulturen) eingesetzt. (ii) Weiterhin wurden die hierbei verwendeten hierarchisch organisierten Netzwerke mittels Validierungsdatensatz und *leave-one-out*-Verfahren hinreichend validiert. (iii) Schließlich wurden die sehr guten Identifizierungseigenschaften der beiden Netze mit einem umfangreichen, 121 klinische Proben umfassenden, unabhängigen Testdatensatz im direkten Vergleich mit

phänotypischen Identifizierungstechniken unter Beweis gestellt [111].

Die erreichte Identifizierungsgenauigkeit kann zudem durch eine Erweiterung der spektralen Referenzbibliotheken mit einer umfangreicheren Anzahl an Mikroorganismen verschiedener Gattungen, Spezies und Stämme kontinuierlich verbessert werden.

Die momentan benötigte Zeit von 18 Minuten für die Aufnahme eines FTIR-Spektrums<sup>1</sup> limitiert zwar den derzeitigen Probendurchsatz, jedoch ist eine Reduzierung der Aufnahmezeit auf wenige Minuten mittels einer Geräteoptimierung durchaus im Rahmen des Möglichen. Dies könnte vor allem durch eine Probenschleuse realisiert werden. Hierdurch ließe sich die Aufnahmezeit um 15 Minuten reduzieren, da dann nicht mehr nach Einbringen der Proben abgewartet werden müsste bis der den Probenraum umgebende Kasten ausreichend gespült ist, um so ein konstantes Wasserdampf-Kohlendioxidniveau gewährleisten zu können.

### 6.5 Die Differenzierbarkeit zwischen sensitiven und resistenten Zellen auf Basis ihrer FTIR-Spektren *per se*

Um die Differenzierbarkeit zwischen sensitiven und resistenten Stämmen auf Basis ihrer FTIR-Spektren *per se* zu untersuchen, wurden zwei Bakteriengattungen ausgewählt, die klinisch relevante Antibiotikaresistenzen entwickelt haben. Bei der einen Spezies handelt es sich um Vancomycin-resistente *E. faecium* Stämme, die als erste Bakterienspezies überhaupt eine Resistenz gegenüber dem sehr wichtigen Reserveantibiotikum Vancomycin entwickelt haben. Des Weiteren wurden FTIR-spektroskopische Untersuchungen an Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen durchgeführt, denen aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung als Verursacher von nosokomialen Infektionen und ihres hohen Pathogenitätspotentials ebenfalls eine große klinische Bedeutung zukommt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den nachfolgenden Abschnitten unter Einbeziehung der jeweiligen Resistenzmechanismen (siehe Abschnitt 1.2) diskutiert.

#### 6.5.1 Differenzierbarkeit von VRE/VSE-Stämmen *per se* auf Basis ihrer FTIR-Spektren

Wie bereits in den vorangehenden Abschnitten deutlich wurde, stellt die Bestimmung der Sensitivität von mikrobiellen Isolaten gegenüber Antibiotika eine der wichtigsten diagnostischen Aufgabenstellungen in der klinischen Mikrobiologie dar. Aufgrund des verstärkten Auftretens von Antibiotikaresistenzen ist die Bestimmung der Antibiotikasensitivität von pathogenen Erregern entscheidend, um eine erfolgreiche Chemotherapie gewährleisten zu können. Der Einsatz von schwingungsspektroskopischen Techniken zur Differenzierung von Antibiotika-sensitiven und -resistenten Stämmen besitzt ein beträchtliches diagnostisches Potenzial, da sich die Unterschiede zwischen

---

<sup>1</sup>Die reine Messzeit beträgt dabei nur 3 Minuten, jeweils 1,5 Minuten für die Messung der Probe und des Hintergrundspektrums.

sensitiven und resistenten Stämmen in Modifikationen der molekularen Zusammensetzung manifestieren und diese dann prinzipiell mittels der FTIR-Spektroskopie detektiert werden können. In einer Studie von Sockalingum *et al.* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Differenzierung isogener *P. aeruginosa* Stämme, die unterschiedliche Resistenzniveaus gegenüber dem Antibiotikum Imipenem exprimierten, auf Basis ihrer FTIR-Spektren *per se* möglich ist [112]. Isogene Stämme sind besonders geeignet zur Untersuchung von Resistenzmechanismen und der Wirkung von Antibiotika, da es sich bei diesen Stämmen um Mutanten eines Wildstammes handelt, die zu diesem nur einen einzigen, genau definierten genetischen Unterschied aufweisen, in diesem Fall Gene, die für die Resistenz gegen Imipenem kodieren. Die spektralen Änderungen konnten zwar in dieser Studie nicht mit der direkten Wirkungsweise des Antibiotikums korreliert werden, aber sie konnten den indirekten biochemischen Änderungen, die aus der Resistenzeigenschaft resultieren, zugeordnet werden. Weitere FTIR-spektroskopische Studien, die jeweils an transkonjugaten *E. coli* und *P. aeruginosa* Stämmen erhalten wurden, führten zu vergleichbaren Ergebnissen, [113,114]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden infolgedessen FTIR-spektroskopische Untersuchungen sowohl an isogenen Stämmen (Datensatz 3, siehe Tabelle 3.7 auf Seite 45) von MRSA bzw. MSSA, als auch an klinischen Isolaten (Datensatz 1 und 2, siehe Tabellen 3.5 und 3.6 auf den Seiten 44 und 44) von MRSA/MSSA-Stämmen und von VRE/VSE-Stämmen durchgeführt, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

Die Ergebnisse der Clusteranalysen, die an den beiden jeweils 20 VRE/VSE-Stämme umfassenden Datensätzen erhalten wurden (vergleiche Tabellen 3.3 und 3.4 auf Seite 43), belegen, dass eine Differenzierung zwischen resistenten und sensitiven *E. faecium* Stämmen mittels nicht-überwachter Klassifizierungstechniken nicht möglich ist. Hier überwiegen vermutlich in den einzelnen Datensätzen die stammspezifischen Unterschiede, so dass die eher gering ausgeprägten durch die Antibiotikaresistenz hervorgerufenen spektralen Varianzen nicht ausreichen, um beide Klassen voneinander zu separieren. Dabei spielt sicherlich auch die Tatsache eine Rolle, dass die Vancomycinresistenz, die durch das *VanA*-Gen vermittelt wird, erst durch Glykopeptidantibiotika induziert wird. Dies wird auch durch eine von Maquelin *et al.* durchgeführte Studie belegt, in der die Differenzierbarkeit zwischen VRE- und VSE-Stämmen auf Basis von RAMAN-mikrospektrometrischen Messungen untersucht wurde [115]. Die Stämme wurden in dieser Studie entweder auf normalen MH-Agarplatten oder auf MH-Agarplatten, die sub-inhibitorische Vancomycinkonzentrationen enthielten, kultiviert. Das Wachstum der Vancomycin-sensitiven *E. faecium* Stämme wurde durch diese geringen Antibiotikakonzentrationen nicht gehemmt, sondern es diente vielmehr dazu, die Expression der in den VRE-Stämmen enthaltenen Resistenzgene zu stimulieren. Ähnlich den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen FTIR-spektroskopischen Ergebnissen konnten die Autoren dieser RAMAN-spektroskopischen Studie jedoch auch keine klare Differenzierung zwischen den RAMAN-Spektren der sensitiven und resistenten Stämme ohne Zugabe von Antibiotikum beobachten. Hingegen führte die Anwendung von sub-inhibitorischen Vancomycinkonzentrationen, die zur Kultivierung der Stämme verwandt worden war, zu einer eindeutigen Diskriminierung zwischen VRE-Stämmen und VSE-Stämmen. Für diese verbesserte Differenzierbarkeit ist vermutlich

ähnlich wie bei den Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen ein Veränderung im Zellwandaufbau (siehe nachfolgende Diskussion zu den MRSA/MSSA-Stämmen in Abschnitt 6.5.2) verantwortlich. Jedoch wird dieser veränderte Zellwandaufbau im Gegensatz zu den MRSA-Stämmen erst durch Glykopeptidantibiotika induziert, die die Substitution eines D-Ala-Rests gegen einen D-Lac-Rest am Pentapeptid der Peptidoglykanvorstufe bewirken.

Eine Verbesserung der Differenzierung zwischen VRE- und VSE-Stämmen konnte für den Datensatz 1 durch die Anwendung von künstlichen neuronalen Netzen erzielt werden, die erwartungsgemäß in einer 100% korrekten Klassifizierung des Trainingsdatensatzes, aber auch einer nahezu 100% (99,4%) korrekten Klassifizierung des Validierungsdatensatzes resultierte. Das Klassifizierungsergebnis der in dem Testdatensatz (VRE/VSE-Datensatz 2) enthaltenen, von Training und Validierung unabhängigen Daten erwies sich jedoch mit insgesamt 70,5% korrekt klassifizierten Spektren als deutlich schlechter. Bei diesem als eher negativ einzustufenden Ergebnis kommt sicherlich erneut die im Vergleich zur Antibiotikasenresistenz hohe Varianz der stamm-spezifischen Unterschiede des gesamten VRE/VSE-Datensatzes zum Tragen.

### 6.5.2 Differenzierbarkeit von MRSA/MSSA-Stämmen *per se* auf Basis ihrer FTIR-Spektren

Hierarchische Clusteranalyse und Faktoranalyse wurden auf die drei unterschiedlichen FTIR-Datensätze von MRSA- und MSSA-Stämmen, die eine epidemiologisch repräsentative Auswahl darstellen, angewandt, um zu überprüfen, ob auf Basis der spektralen Information *per se* eine Differenzierung zwischen sensitiven und resistenten Stämmen erfolgen kann. Interessanterweise konnte für den Datensatz 1 bei einer eingehenderen Betrachtung der auflösungsverstärkenden zweiten Ableitungen der Spektren ein Bereich ermittelt werden, der sich von  $1050\text{ cm}^{-1}$  bis  $1080\text{ cm}^{-1}$  erstreckt (vergleiche Abbildung 5.22 auf Seite 102), in dem sich die Spektren der sensitiven von den resistenten Stämmen signifikant unterscheiden. Dabei sind vor allem die Unterschiede in der Absorptionsbande um  $1070\text{ cm}^{-1}$  auffällig, die für die resistenten Stämme eine höhere Intensität aufweist, während für die sensitiven Stämme an dieser Stelle eine Bandenverbreiterung zu beobachten ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass zwischen  $1095\text{ cm}^{-1}$  und  $1070\text{ cm}^{-1}$  die symmetrischen  $\text{PO}_2^-$ -Streckschwingungsbanden sowohl von DNA als auch RNA lokalisiert sind [47]. Spektrale Unterschiede in diesem Bereich könnten demzufolge auf eine verändertes relatives Verhältnis von Nukleinsäuren (DNA und RNA) in der Zelle hindeuten. Da die *mecA* vermittelte Methicillin-Resistenz konstitutiv vorliegt, und je nach Ausprägungsgrad der Expression dieses Resistenzgens Veränderungen in der Zusammensetzung der RNAs bewirken kann, spiegeln die beschriebenen Bandenveränderungen dieses Verhalten vermutlich wider. Dieser Vermutung steht allerdings widersprüchlich gegenüber, dass keine vergleichbaren spektralen Unterschiede zwischen den resistenten und den sensitiven Stämmen für die MRSA/MSSA-Datensätze 2 und 3 beobachtet werden konnten. Weiterhin zeigen auch die Ergebnisse der nicht-überwachten Klassifizierung (hierarchische Clusteranalyse), dass unter Einbeziehung der spektralen

Bereiche von 1450 bis 1200  $\text{cm}^{-1}$  und von 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$ , die für die Zellwandbestandteile charakteristisch sind, keine Differenzierung der MRSA- und MSSA-Stämme der Datensätze 2 und 3 möglich ist. Hingegen lieferte die Clusteranalyse für den MRSA/MSSA-Datensatz 1 eine lediglich 74%ig<sup>2</sup> korrekte Differenzierung der sensitiven und resistenten Stämmen auf Basis ihrer Spektren *per se*. Dieses Klassifizierungsergebnisse steht im Widerspruch zu den von Goodacre *et al.* in einer ähnlichen Studie beschriebenen Ergebnissen. Ähnlich den für die beiden MRSA/MSSA Datensätze 2 und 3 gefundenen Ergebnissen konnte auch Goodacre keine eindeutige Differenzierung mittels Clusteranalyse zwischen sensitiven und resistenten Stämmen [75] beobachten. Eine Erklärung hierfür könnte möglicherweise in den unterschiedlichen MHK<sup>3</sup>-Werten der drei Datensätze liegen. Aus den in den Tabellen 3.5, 3.6 und 3.7 aufgeführten MHK-Werten ist ersichtlich, daß die MHK-Werte für den Datensatz 1 um ein Vielfaches höher sind (zwischen 16 und 512  $\mu\text{l/ml}$ ) als die MHK-Werte für die Datensätze 2 und 3 (hier liegen die Werte zwischen 4 und 8  $\mu\text{l/ml}$ ). Daraus lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die hoch-resistenten MRSA Stämme, die einen hohen MHK-Wert aufweisen, offensichtlich auch einen stärker ausgeprägten Resistenzphänotyp ausbilden, der sich in den IR-Spektren widerspiegelt. Eine Verifizierung dieser Hypothese müsste durch weitere FTIR-spektroskopische Untersuchungen an größeren MRSA-Datensätzen erfolgen, da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Datensätze nicht als statistisch signifikant angesehen werden können.

Es konnte zwar eine Diskriminierung zwischen den MRSA- und MSSA-Stämmen des Datensatzes 1 mittels Cluster- und Faktoranalyse beobachtet werden (siehe Abbildung 5.23 auf Seite 103), jedoch ist das Resultat mit einer zu 74% korrekten Differenzierung als eher mäßig einzustufen, da vier resistente der insgesamt 15 Stämme fehlklassifiziert wurden. Diese „Fehlklassifizierungen“ könnten auf das Phänomen der so genannten heterogenen Ausprägung der Methicillinresistenz zurückgeführt werden, die bei diesen vier Stämmen (3.1.1, 5.2.16, 1.1.3., 2.2.3) vorliegen könnte. Heterogene Methicillinresistenz bedeutet im Gegensatz zu homogener Methicillinresistenz, dass nur eine Minderheit (etwa 1 von  $10^4$  -  $10^5$  Zellen) unter einer gegebenen Antibiotikakonzentration überleben kann, während die Zellen eines homogen resistenten Stammes ein einheitliches Resistenzverhalten aufweisen [30]. Dieses Phänomen ist nicht korreliert mit der Menge des gebildeten PBP2a [116]. Demzufolge könnte die bereits beschriebene höhere spektrale Ähnlichkeit zwischen den vier misklassifizierten sensitiven Stämmen und den resistenten Stämmen auf einer heterogen ausgeprägten Methicillinresistenz basieren (siehe Abbildung 5.22 auf Seite 102).

In einer weiteren Studie von Goodacre *et al.*, in der ein anderes spektrometrisches Verfahren, und zwar die Pyrolyse-Massenspektrometrie zur Diskriminierung von MRSA- und MSSA-Stämmen Anwendung fand, wurde die auf einer Clusteranalyse basierende Klassifizierung der dabei untersuchten 37 *S. aureus* Stämme darauf

<sup>2</sup>Dieser Wert ergibt sich, da von insgesamt 15 in dem Datensatz 1 enthaltenen Stämmen 4 misklassifiziert wurden (siehe Dendrogramm in Abbildung 5.23 auf Seite 103)

<sup>3</sup>MHK steht für die minimale Hemmkonzentration. Dabei handelt es sich um die Antibiotikakonzentration bei der das Bakterienwachstum gerade noch gehemmt wird (siehe Abschnitt 1.1.3.2 auf Seite 7).

zurückgeführt, dass die größten Unterschiede zwischen den Spektren aus den unterschiedlichen Phagentypen resultierten, die die Stämme aufwiesen, und nicht auf ihrer Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber Methicillin basierten [74]. Phagen bzw. Bakteriophagen sind Viren, die prokaryotische Zellen infizieren. Da an den in der vorliegenden Arbeit verwendeten *S. aureus* Stämmen keine Phagentypisierung durchgeführt wurde, lässt sich hier keine vergleichbare Korrelation zwischen den in der Clusteranalyse aufgetretenen Gruppierungen und den jeweiligen Phagentypen herstellen. Aber es scheint durchaus plausibel, dass das Resistenzverhalten von Mikroorganismen durch andere stärker ausgeprägte Eigenschaften der Zelle, wie z. B. die genannten unterschiedlichen Phagentypen, verdeckt wird.

Bei den ebenfalls zur Differenzierung zwischen sensitiven und resistenten Stämmen in der vorliegenden Arbeit eingesetzten künstlichen neuronalen Netzen handelt es sich im Gegensatz zur Cluster- und Faktoranalyse um eine überwachte Methode, bei der jedes Spektrum des Trainings- und des Validierungsdatensatzes entweder der Klasse „sensitiv“ (MSSA) oder „resistent“ (MRSA) zugewiesen wurde. Das Training wurde mit den ersten 16 Hauptkomponenten, für die zuvor überprüft wurde, ob sie sich in den beiden Spektrenklassen signifikant unterscheiden, durchgeführt. Durch die Verwendung von Hauptkomponenten für das Training, wurden alle Informationen, die für die Differenzierung der beiden Klassen nicht signifikant waren, ausgeschlossen.

Eine Verbesserung der Differenzierung zwischen MRSA- und MSSA-Stämmen konnte für den Datensatz 1 durch die Anwendung von künstlichen neuronalen Netzen erreicht werden, die erwartungsgemäß in einer 100%ig korrekten Klassifizierung des Trainingsdatensatzes, aber auch einer 96%ig korrekten Klassifizierung des Validierungsdatensatzes resultierte. Jedoch fiel die Diskriminierungsfähigkeit des mit dem Datensatz 1 trainierten neuronalen Netzes bei der Klassifizierung der beiden vollkommen unabhängigen Datensätze 2 und 3 mit nur zu 62,5 und 42,5% korrekt klassifizierten Stämmen beträchtlich ab. Dieses Ergebnis kann wiederum mit den bereits angeführten unterschiedlichen MHK-Werten korreliert werden, d. h. dass nur die hochresistenten Stämme differenziert werden können. Weiterhin sollte in Betracht gezogen werden, dass die Klassifizierungen der Datensätze 2 und 3 mittels des neuronalen Netzes vermutlich deswegen gescheitert sind, da der gesamte Datensatz eine hohe genotypische Heterogenität aufweist. Stämme unterschiedlicher Herkunft, wie die in dieser Arbeit untersuchten Stämme von *S. aureus*, zeigen deutliche Variabilitäten in ihrer genetischen Ausstattung, wovon in der Regel mehrere Faktoren betroffen sind, die im Zusammenhang mit der Wirkungsweise von  $\beta$ -Lactamantibiotika eine entscheidende Rolle spielen. Dazu gehören Variationen der PBPs [117], unterschiedliche Ausstattung mit autolytischen Enzymen [118] oder auch Unterschiede in der Feinstruktur der Zellwand [119]. Die Klassifizierungsergebnisse der neuronalen Netze belegen, dass diese stammspezifischen Eigenschaften des gesamten MRSA/MSSA-Datensatzes zu größeren Varianzen führen, die die demgegenüber offensichtlich wesentlich geringer ausgeprägten spektralen Varianzen, die aus dem Antibiotikaempfindlichkeitsverhalten resultieren, überdecken. Da die *mecA* vermittelte Resistenz konstitutiv vorliegt, sollten die Auswirkungen auf die molekulare Zusammensetzung der Zelle jedoch auch spektroskopisch detektierbar sein. Die Rolle die der *mecA*-Gen vermittelten Methicil-

linresistenz zukommt, die zur Expression von PBP2a mit drastisch verminderter Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactamantibiotika führt, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Es existieren Studien, die darauf hinweisen, dass das PBP2a auch unter normalen Wachstumsbedingungen, d. h. auch ohne den Einfluss von  $\beta$ -Lactamantibiotika aktiv an der Zellwandsynthese beteiligt ist, und damit die Produktion einer unterschiedlich aufgebauten Zellwand bedingt [120]. Diese Hypothese könnte wiederum eine Erklärung für die spektralen Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Stämmen liefern, die ausschließlich für den Datensatz 1 im Bereich von 1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$ , einem von Zellwandbestandteilen dominierten Bereich, beobachtet wurden.

Insgesamt zeigen sowohl die Ergebnisse an den drei MRSA/MSSA-Datensätzen, als auch an den zwei VRE/VSE-Datensätzen, dass die FTIR-Spektroskopie zur Überprüfung der Antibiotika-Empfindlichkeit *per se* nur bei Vorliegen einer konstitutiven Antibiotikaresistenz geeignet ist. Dies gilt jedoch auch nur mit den bereits in den vorangegangenen Abschnitten erwähnten Einschränkungen, da die spektrale Information, die aus dem Resistenzverhalten herrührt, nur bei genotypisch relativ homogenen Stämmen eine Differenzierung ermöglicht. Der Einsatz von künstlichen neuronalen Netzen führte zu keiner signifikant verbesserten Klassifizierung, da die Diskriminierungsfähigkeit auch dieser lernfähigen Klassifizierungssysteme durch die hohen stammspezifischen Unterschiede der gesamten Datensätze deutlich beeinträchtigt wurde.

### 6.6 Der Einfluss von Oxacillin auf die Mikrokoloniespektren von sensitiven und resistenten Zellen

Da die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Ergebnisse gezeigt hatten, dass eine Bestimmung der Antibiotikasensitivität von Mikroorganismen basierend auf ihren FTIR-Spektren *per se* nur sehr bedingt möglich ist, wurde der bereits in Abschnitt 5.4.3.1 beschriebene experimentelle Ansatz verfolgt, um resistente und sensitive *S. aureus* Stämme unter Einfluss eines typischen  $\beta$ -Lactamantibiotikums zu untersuchen. Die in der Literatur existierenden Studien an sensitiven und resistenten Mikroorganismen unter Zugabe eines Antibiotikums, wurden zumeist in Flüssigkultur durchgeführt. Zeroual *et al.* beispielsweise beobachtete spektrale Änderungen in den FTIR-Spektren von *E. coli* Stämmen, die mit verschiedenen Penicillin Konzentrationen behandelt worden waren [121]. Die Autoren spekulierten über eine Korrelation der beobachteten spektralen Änderungen und der bekannten Wirkungsweise von Penicillin auf die bakterielle Zelle. In einer Studie von Naumann *et al.* berichtet der Autor über FTIR-spektroskopische Untersuchungen, die an einem ebenfalls in flüssigen Nährmedium kultivierten *S. aureus* Stamm durchgeführt wurden. *S. aureus* Kulturen wurden mit zwei unterschiedlichen Antibiotika behandelt: mit Chloramphenicol, einem bakteriostatisch wirkenden Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese hemmt, indem es die Bildung der Peptidbindung blockiert und mit Penicillin G, dessen bakteriolytische Wirkungsweise bereits detailliert erläutert wurde [49, 98]. Anhand von

## 6.6 Der Einfluss von Oxacillin auf sensitive und resistente Zellen

spezifischen Markerbanden in der spektralen Region von 800 bis 1800  $\text{cm}^{-1}$  konnten die Wirkungsweisen der beiden Antibiotika durch den Vergleich mit den Spektren der Kontrollkulturen qualitativ und quantitativ verfolgt werden. Nelson *et al.* beobachtete mittels UV-Resonanz-RAMAN-Spektroskopie (UVRM) Änderungen in den Nukleinsäurebanden von mit Rifampin behandelten *E. coli* Zellen und führte diese auf den wachstumshemmenden Effekt des Antibiotikums zurück [122]. Das Antibiotikum Rifampin verhindert die DNA-Transkription und hat demzufolge eine Reduzierung von RNA in der Zelle zur Folge.

All diese Studien belegen, dass spektroskopische Techniken ein hohes Potenzial besitzen, Zell-Antibiotika-Wechselwirkungen spezifisch zu detektieren und zu verfolgen. Auch die in der vorliegenden Arbeit in dieser Art und Weise (siehe Abschnitt 5.4.3.1) erstmalig durchgeführten FTIR-mikrospektrometrischen Messungen an mit Oxacillin behandelten sensitiven und resistenten *S. aureus* Stämmen haben sich als geeignet erwiesen, die Wechselwirkung von mikrobiellen Zellen mit antibiotischen Wirkstoffen zu untersuchen. Dabei hat der in dieser Arbeit entwickelte experimentelle Ansatz gegenüber den in der Literatur beschriebenen Verfahren mehrere Vorteile: (1) Es können 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) verglichen werden, d. h. die Kontroll-Zellen und die mit Antibiotikum behandelten Zellen stammen aus einer Kultur. (2) Der Aufwand für die Probenpräparation ist sehr gering, da die Mikrokolonien nur entlang des Konzentrationsgradienten abgestempelt werden müssen. Die in der Literatur beschriebenen Studien hingegen basieren auf der Kultivierung der Zellen in Flüssigkultur, d. h. es sind mehrere zeitaufwendige Arbeitsschritte notwendig, um das Medium zu entfernen. (3) Des Weiteren werden die bei Flüssigkulturen notwendigen Kultivierungszeiten durch die Mikrokolonietechnik unterschritten, da man hierzu vor dem eigentlichen Wachstumsexperiment unter Antibiotikaeinfluss eine Flüssigkultur benötigt, die über Nacht kultiviert wurde. Die mittels des neuen experimentellen Ansatzes zur Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung gefundenen Ergebnisse (siehe Abschnitt 5.4.3) lassen zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen wird die Differenzierbarkeit zwischen MSSA- und MRSA-Zellen unter Einfluss des  $\beta$ -Lactamantibiotikums Oxacillin signifikant verbessert (vergleiche Abbildung 5.27 auf Seite 109). Dieser Sachverhalt resultiert aber nicht wie bei den Vancomycin-resistenten *E. faecium* Stämmen aus der Tatsache, dass der Resistenzmechanismus erst durch das Oxacillin angeschaltet wird<sup>4</sup>, sondern vielmehr daraus, dass das Vorhandensein des Oxacillins bei den sensitiven Zellen zu erheblichen strukturellen Änderungen führt, die sich in den FTIR-Spektren widerspiegeln. Diese Änderungen sind wie aus den Differenzspektren der mit Oxacillin behandelten sensitiven Zellen und der Kontrollzellen deutlich wird (vergleiche Abbildung 5.26) für den MSSA-Stamm erwartungsgemäß viel stärker ausgeprägt als für den MRSA-Stamm. Weiterhin lässt sich die Wirkungsweise des  $\beta$ -Lactamantibiotikums gut mit den gefundenen spektralen Veränderungen korrelieren. Die bakteriolytische Wirkung des

---

<sup>4</sup>Es handelt sich bei dem hier untersuchten MRSA-Stamm auch um eine konstitutiv vorliegende Resistenz.

Oxacillin basiert wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt wurde, auf der Hemmung der Transpeptidierungsreaktion. Infolgedessen werden die Peptidoglykanvorstufen nicht quervernetzt, aber trotzdem weitergebildet, so dass es zu einer Anhäufung dieser Zellwandvorstufen kommt. Dies lässt sich mit der beobachteten Intensitätszunahme in den Banden um  $1080\text{ cm}^{-1}$  und  $1060\text{ cm}^{-1}$  des mit Oxacillin behandelten MS-SA Stammes korrelieren (siehe Abbildung 5.26, A), die von C–O–C- und C–O–P-Streckschwingungen der verschiedenen Oligo- und Polysaccharide, also Vorstufen bzw. Bestandteilen der Zellwand herrühren. Hingegen sind die Veränderungen in den Spektren des mit Oxacillin behandelten MRSA-Stammes weitaus weniger ausgeprägt. Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls mit dem *mecA*-Gen vermittelten Resistenzmechanismus in Einklang bringen, der konstitutiv vorliegt, also auch ohne Antibiotikum aktiv ist. Das Differenzspektrum in Abbildung 5.26 B zeigt jedoch, daß der Antibiotikaeinfluss bei den resistenten Zellen zusätzlich eine Verstärkung des Resistenzverhaltens zu bewirken scheint, d. h. es wird vermehrt PB2a exprimiert. Insgesamt gesehen sind die Ergebnisse dieser neuen Technik zur Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung, die im Rahmen dieser Arbeit nur als eine Art Pilotstudie evaluiert werden konnten, sehr vielsprechend, so dass weiterführende Arbeiten auf diesem Gebiet durchgeführt werden sollten.