

CAROLIN KIRSCHNER

Charakterisierung und Differenzierung
humanpathogener Mikroorganismen mittels
schwingungsspektroskopischer Techniken

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

BERLIN 2003

Betreuer und Gutachter der Arbeit: PROF. DR. D. NAUMANN

Zweiter Gutachter der Arbeit: PROF. DR. F. HUCHO

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zusammensetzung und chemische Struktur von mikrobiellen Zellen . . .	1
1.1.1	Die prokaryotische Zelle	1
1.1.2	Die eukaryotische Zelle	3
1.1.3	Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen	4
1.2	Wirkungsweise von β -Lactam- und Glykopeptidantibiotika	11
1.3	Schwingungsspektroskopische Techniken	15
1.3.1	FTIR-FOURIER Transform Infrarot Spektroskopie	16
1.3.2	RAMAN-Spektroskopie	22
1.4	Auswerteverfahren zur Charakterisierung und Identifizierung	31
1.4.1	Clusteranalyse	32
1.4.2	Faktoranalyse	34
1.4.3	Künstliche Neuronale Netze (ANN's)	35
2	Zielsetzung der Arbeit	39
3	Material	41
3.1	Mikroorganismen	41
3.1.1	Bakterien	41
3.1.2	Vancomycin-resistente und Vancomycin-sensitive <i>E. faecium</i> Stämme	43
3.1.3	Methicillin-resistente und Methicillin-sensitive <i>S. aureus</i> Stämme	44
3.1.4	Hefen	46
3.1.5	Chemikalien	47
4	Methoden	49
4.1	FTIR-Spektroskopie	49
4.1.1	Probenpräparation der Bakterienfilme	49
4.2	FTIR-Mikrospektrometrie	50
4.2.1	Probenpräparation der mikrobiellen Mikrokolonien	53
4.2.2	Die Abstempelvorrichtung	54
4.3	FT-RAMAN Spektroskopie	55
4.3.1	Probenpräparation für die RAMAN-Messungen	55
4.4	Spektrenauswertung	56
4.4.1	Spektrenqualität	56

4.4.2	Ableitungen	56
4.4.3	Normierungen	57
4.4.4	Training und Validierung von künstlichen neuronalen Netzen	57
5	Ergebnisse	61
5.1	Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung <i>Enterococcus</i>	61
5.2	Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung <i>Candida</i>	75
5.3	FTIR-Mikrospektrometrie	79
5.3.1	Signal/Rausch-Verhältnis und Heterogenität von Mikrokolonien verschiedener Größen	79
5.3.2	Aufbau einer spektralen Datenbank auf der Basis von Mikrokoloniespektren	84
5.3.3	Training und Validierung der mikrobiellen Datenbank mit künstlichen neuronalen Netzen	90
5.3.4	Identifizierung von positiven Blutkulturen mit der FTIR-Mikrospektrometrie	94
5.4	Untersuchungen zum Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten	97
5.4.1	Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten von VRE/VSE-Stämmen <i>per se</i>	97
5.4.2	Antibiotika-Empfindlichkeitsverhalten von MRSA/MSSA-Stämmen <i>per se</i>	101
5.4.3	Das FTIR-spektroskopische Verhalten von sensitiven und resistenten Zellen unter Zugabe eines typischen β -Lactam-Antibiotikums	106
6	Diskussion	111
6.1	Korrelation der spektroskopischen, phänotypischen und genotypischen Ergebnisse	111
6.2	Vergleich der Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung <i>Candida</i>	114
6.3	Auswahl der optimalen Mikrokoloniegröße	116
6.4	Vergleich der mikrospektrometrischen Methode mit den konventionellen Methoden	117
6.5	Differenzierbarkeit zwischen sensitiven und resistenten Zellen	119
6.5.1	Differenzierbarkeit von VRE/VSE-Stämmen <i>per se</i> auf Basis ihrer FTIR-Spektren	119
6.5.2	Differenzierbarkeit von MRSA/MSSA-Stämmen <i>per se</i> auf Basis ihrer FTIR-Spektren	121
6.6	Der Einfluss von Oxacillin auf sensitive und resistente Zellen	124
7	Ausblick	127
8	Zusammenfassung	147

Tabellenverzeichnis

1.1	Zusammensetzung von Pro- und Eukaryoten	1
1.2	Zuordnung von einigen Banden, die häufig in den RAMAN-Spektren von biologischen Proben auftreten	28
1.3	Zuordnung von einigen Banden, die häufig in den FTIR-Spektren von biologischen Proben auftreten	29
3.1	Liste der verwendeten <i>Enterococcus</i> Spezies	41
3.2	Liste der verwendeten Bakterien Spezies	42
3.3	Liste der verwendeten VRE/VSE-Stämme aus Werningerode (Datensatz 1)	43
3.4	Liste der verwendeten VRE/VSE-Stämme aus Rotterdam (Datensatz 2)	43
3.5	Liste der verwendeten MRSA/MSSA-Stämme aus Les Chesnay (Datensatz 1)	44
3.6	Liste der verwendeten MRSA/MSSA-Stämme aus Les Chesnay (Datensatz 2)	44
3.7	Liste der verwendeten isogenen <i>S. aureus</i> Stämme (MRSA/MSSA) aus Werningerode (Datensatz 3)	45
3.8	Liste der verwendeten <i>Candida</i> Spezies	46
5.1	Identifizierung der fünf nicht eindeutig typisierten <i>Enterococcus</i> Stämme basierend auf phänotypischen, genotypischen und schwingungsspektroskopischen Daten	67
5.2	Trainingsparameter für die einzelnen Netze und die Klassifizierungsergebnisse der Daten im Validierungsdatensatz für die Identifizierung von Bakterien.	91
5.3	Trainingsparameter für die einzelnen Netze und die Klassifizierungsergebnisse der Daten im Validierungsdatensatz für die Identifizierung der <i>Candida</i> Spezies.	92
5.4	Ergebnisse der <i>leave-one-out</i> -Evaluierung des hierarchischen Netzes zur Identifizierung von Bakterien, basierend auf den Stämmen in der Referenzdatenbank.	93
5.5	Ergebnisse der <i>leave-one-out</i> -Evaluierung des hierarchischen Netzes zur Identifizierung der <i>Candida</i> Spezies, basierend auf den Stämmen in der Referenzdatenbank.	94

Tabellenverzeichnis

5.6	Vergleich der phänotypischen und der infrarot-mikrospektrometrischen-Identifizierungsergebnisse der Patientenproben, die in der prospektiven Studie enthalten sind.	96
5.7	Klassifizierungsergebnisse der in dem Trainings-, Validierungs- und Testdatensatz enthaltenen Spektren.	100
5.8	Klassifizierungsergebnisse der in dem Trainings-, Validierungs- und den beiden Testdatensätzen enthaltenen Spektren.	105

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Zellhülle von GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien	2
1.2	Strukturformel des Grundbausteins von Penicillinen.	14
1.3	Aufbau und Funktionsweise eines MICHELSON-Interferometers	20
1.4	FTIR- und FT-RAMAN-Spektren der makromolekularen Hauptbestandteile, die in biologischen Proben vorhanden sind.	26
1.5	Bandenzuordnung für die Hauptbestandteile, die in den FTIR- und FT-RAMAN-Spektren von intakten mikrobiellen Zellen (<i>E. faecalis</i>) auftreten.	27
4.1	Technische Zeichnung des (A) automatisierten Multiküvettenystems, das für die FTIR-Messungen an den Bakterienfilmen eingesetzt wurde und (B) der RAMAN-Messküvette, die aus einem Probencup aus Edelstahl, der mit einem CaF ₂ -Fenster und einem O-Ring verschlossen wird, besteht.	50
4.2	Aufbau der Stempelapparatur (a) mittels der ortsgetreue Stempelabdrücke von Mikrokolonien (50 - 80 µm) auf Infrarot-transparente ZnSe-Scheiben (b) übertragen werden können.	51
4.3	Lichtmikroskopische Aufnahmen von typischen Mikrokolonieabdrücken von <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> und <i>C. albicans</i>	52
4.4	Der optische Strahlengang im (a) Reflexions- und (b) Transmissionsmodus am IRscope II der Firma BRUKER.	53
4.5	Aufbau eines typischen 3-schichtigen <i>multilayer perceptrons</i>	58
5.1	Dendrogramm der Clusteranalyse nach WARD der FTIR Spektren der zwei <i>Enterococcus</i> Spezies <i>E. casseliflavus</i> und <i>E. gallinarum</i>	62
5.2	Mittelwertsspektren der vektornormierten ersten Ableitungen von zwei <i>Enterococcus</i> Spezies <i>E. faecium</i> und <i>E. faecalis</i>	63
5.3	Typische erste Ableitungen der FTIR Spektren der sechs verschiedenen <i>Enterococcus</i> Spezies	64
5.4	Klassifikationsschemata basierend auf den FTIR-Spektren der sechs verschiedenen <i>Enterococcus</i> Spezies	66
5.5	Typische RAMAN-Originalspektren der sechs verschiedenen <i>Enterococcus</i> Spezies	69

Abbildungsverzeichnis

5.6	Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der RAMAN-Spektren der sechs verschiedenen <i>Enterococcus</i> Spezies unter Einbeziehung des spektralen Bereichs von 400–1800 cm ⁻¹	70
5.7	Spektraler Vergleich der RAMAN-Spektren des <i>E. casseliflavus</i> Stamm 16 und des <i>E. faecalis</i> Stamm 11.	71
5.8	Spektraler Vergleich der RAMAN-Spektren der beiden <i>E. hirae</i> Stämme 2 und 6	72
5.9	Struktur von β -Carotin, einem typischen Carotinoid	73
5.10	Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der RAMAN-Spektren nach Durchführung der Wellenlängenselektion	74
5.11	Typische zweite Ableitungen der sieben verschiedenen <i>Candida</i> Spezies	76
5.12	Klassifikationsschemata der sieben verschiedenen <i>Candida</i> Spezies. . .	78
5.13	Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der FTIR Spektren, die durch das lineare (x,y-Richtung) Mappen einer 100 μ m (A) und einer 200 μ m (B) großen Mikrokolonie von <i>S. aureus</i> CIP 4,83 erhalten wurden.	81
5.14	Mittelwertsspektren der ersten Ableitungen einer 100 μ m und einer 200 μ m Kolonie von <i>S. aureus</i> CIP 4,83 gemessen im Zentrum und an der Peripherie der Kolonie.	82
5.15	Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren, die durch das lineare (x,y-Richtung) Mappen von zwei verschiedenen 100 μ m großen Mikrokolonien von <i>S. aureus</i> CIP 4,83 und ATCC 6538 erhalten wurden.	83
5.16	Typische FTIR-Spektren der Mikrokolonien von GRAM-positiven (<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>) und GRAM-negativen (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>) Bakterien.	85
5.17	Spektroskopischer GRAM-Test.	87
5.18	Dendrogramm der Clusteranalyse von sechs <i>Candida</i> Spezies.	88
5.19	Schematische Darstellung des hierarchisch organisierten neuronalen Netzes zur Identifizierung von Bakterien.	89
5.20	Schematische Darstellung des hierarchisch organisierten neuronalen Netzes zur Identifizierung von <i>Candida</i> Spezies.	90
5.21	Dendrogramme der Clusteranalysen der ersten Ableitungen der FTIR Spektren der zwei <i>Enterococcus</i> Datensätze (A: 1. Datensatz; B: 2. Datensatz), die jeweils 10 glykopeptidresistente <i>E. faecium</i> (VRE) Stämme und 10 glykopeptidsensitive <i>E. faecium</i> (VSE) Stämme umfassen. . . .	99
5.22	Typische zweite Ableitungen der 15 Methicillin-sensitiven und -resistenten <i>S. aureus</i> Stämme (Datensatz 1)	102
5.23	Dendrogramm der Clusteranalyse der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren des MRSA/MSSA-Datensatzes 1, der 10 Methicillin-resistente <i>S. aureus</i> (MRSA) Stämme und 5 Methicillin-sensitive <i>S. aureus</i> (MSSA) Stämme umfasst	103
5.24	Dendrogramme der Clusteranalysen der ersten Ableitungen der FTIR-Spektren der MRSA/MSSA-Datensätze 2 und 3 (isogene Stämme). . .	104

5.25	Schema des experimentellen Aufbaus, das zur Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung an Mikrokolonien entwickelt wurde.	107
5.26	Typische zweite Ableitungen von mit Oxacillin behandelten und unbehandelten MRSA- und MSSA-Stämmen und die entsprechenden Differenzspektren.	108
5.27	Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse der ersten Ableitungen von MRSA- und MSSA-Stämmen, die mit dem β -Lactam Antibiotikum Oxacillin behandelt wurden.	109
5.28	Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse der ersten Ableitungen von mit Oxacillin behandelten und unbehandelten MRSA- und MSSA-Stämmen.	110

Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AE	Absorptionseinheiten
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ANN	<i>artificial neural network</i>
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CIP	<i>Collection d' institute Pasteur</i>
C	Cytosin
CCD	<i>charge coupled device</i>
CM	Cytoplasmamembran
Da	Dalton (Einheit der relativen Molmasse, keine SI-Einheit)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DFT	Diskrete FOURIER-Transformation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTGS	<i>deuterated triglycine sulfate</i>
DR	<i>Diffuse Reflectance</i>
ϵ	Extinktionskoeffizient
<i>E</i>	Extinktion (synonym verwendet mit dem Begriff Absorption)
ELD	<i>elderly</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
<i>E. durans</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FIR	fernes Infrarot
FTIR	FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie

Abkürzungsverzeichnis

Ge	Germanium
G	Guanin
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
ICU	<i>intensive care unit</i>
LB	LURIA BERTANI
MCT	<i>mercury cadmium telluride</i>
MED	<i>medical</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIR	mittleres Infrarot
MIDAS	<i>microorganism identification and antibiotic/antifungal agent susceptibility testing</i>
MLP	<i>multilayer perceptron</i>
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitive <i>S. aureus</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MspA	<i>M. smegmatis</i> PorinA
NIR	nahes Infrarot
NSDA	neutraler-SABOURAUD-Dextrose-Agar
LPS	Lipopolysaccharid
OM	äußere Membran (<i>outer membrane</i>)
PBPs	Penicillinbindungsproteine
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i>
PED	<i>pediatric</i>
Phe	Phenylalanin
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PG	Peptidoglykan
PP	<i>peak to peak</i>
PS	Periplasma
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RAPD-PCR	<i>random amplification of polymorphic DNA-PCR</i>
R	resistent
RMS	<i>root mean square</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S	sensitiv
ST	Serotyp
SERS	<i>surface enhanced Raman scattering</i>
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis (<i>signal to noise ratio</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SSE	<i>sum squared error</i>
SUR	<i>surgery</i>

T	Thymin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
VIS	<i>visible</i>
VRE	Vancomycin-resistente <i>E. faecium</i>
VSE	Vancomycin-sensitive <i>E. faecium</i>
WTA	<i>winner takes all</i>
ZnSe	Zinkselenid

Abkürzungsverzeichnis