

Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin der Universität  
Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Massenspektrometrische Untersuchung von  
Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Ernst, Katja

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. C. Wolz

2. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Maier

Tag der Disputation: 06.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	9
1.1	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.1.1	Erreger .....	9
1.1.2	Vorkommen .....	11
1.1.3	Infektionsweg.....	12
1.1.3.1	Healthcare-associated MRSA .....	12
1.1.3.2	Community-acquired MRSA .....	13
1.1.3.3	Livestock-associated MRSA.....	13
1.1.4	Klinik und Therapie.....	14
1.2	Feintypisierung .....	15
1.2.1	Multilokus Sequenztypisierung.....	15
1.2.2	<i>spa</i> -Typisierung .....	16
1.2.3	Häufigkeit klonaler Linien in Deutschland .....	17
1.3	MALDI-TOF Massenspektrometer in der klinischen Routine .....	19
1.3.1	Technische Beschreibung des MALDI-TOF Massenspektrometer .....	20
1.3.2	Datenanalyse und Identifikation spezifischer Biomarker mit MALDI-TOF....	22
1.3.3	Publikationen zu bekannten Peaks .....	22
1.4	Frühwarnsystem für Ausbrüche nosokomialer Infektionen .....	24
1.5	Ziel der Arbeit.....	26
2.	Material und Methoden .....	27
2.1	Material.....	27
2.1.1	Laborgeräte .....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterial .....	28
2.1.3	Spezielle Chemikalien .....	29
2.1.4	Computersoftware .....	29
2.1.5	Die Bakterienstämme des Versuchskollektivs .....	29
2.2	Methoden .....	34

2.2.1	Vorbereitung der <i>S. aureus</i> -Isolate .....	34
2.2.2	Durchführung der Messung mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer .....	34
2.2.2.1	„Direct Colony“ Methode.....	34
2.2.2.2	Extraktionsmethode .....	35
2.2.2.3	Der Standard <i>E. coli</i> .....	35
2.2.3	Anzahl der durchgeführten Messreihen .....	36
2.2.3.1	Vormessungen.....	36
2.2.3.2	Hauptmessungen.....	36
2.2.4	Auswertung mit der SARAMIS Software .....	37
2.2.5	Bereinigung der Daten von Ausreißern .....	37
2.2.6	Erstellung der Datenbank (BIONUMERICS Software) .....	38
2.2.7	Vorverarbeitung der Rohdaten .....	39
2.2.8	Berechnung von Kompositspektren .....	39
3.	Ergebnisse .....	41
3.1	Clusteranalyse als Dendrogramm mit BIONUMERICS .....	41
3.1.1	Dendrogramm auf Replikatebene .....	41
3.1.2	Dendrogramm auf Stammebene .....	44
3.2	Visualisierung der Kompositspektren und Komponentenspektren.....	45
3.2.1	Sortierung nach Gruppen .....	46
3.2.2	Sortierung nach <i>spa</i> -Typ .....	48
3.2.3	Sortierung nach SCCmec-Typ .....	50
3.3	Peak Matching.....	52
3.4	Matrix Mining .....	53
3.4.1	Matrix Mining nach Gruppen .....	53
3.4.2	Matrix Mining nach <i>spa</i> -Typen .....	54
3.4.3	Matrix Mining nach mec-Klasse .....	55
3.4.4	Diskriminative Peakliste.....	56
3.5	Sensitivität und Spezifität der Biomarker .....	57
4.	Diskussion .....	60

4.1	Einordnung der Ergebnisse .....	60
4.2	Vergleich mit Peaks anderer Publikationen .....	60
4.3	Begrenzte Repräsentativität der <i>S. aureus</i> Stämme .....	61
4.4	Anzahl an Stämmen im Versuchskollektiv .....	61
4.5	Auswirkung von Wachstum, Temperatur und Matrix .....	62
4.6	Begrenzte Reproduzierbarkeit .....	62
4.7	Ausblick .....	63
5.	Zusammenfassung .....	64
6.	Literaturverzeichnis .....	66
7.	Erklärung zum Eigenanteil .....	72
8.	Anhang .....	73
8.1	Darstellung von Phänotyp und Hämolyseverhalten .....	73
8.2	Dendrogramm der Kompositspektren .....	77
8.3	Peaktabelle .....	78
9.	Lebenslauf .....	90

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit vorkommende spa-Typen.....	17
Tabelle 2: Übersicht der MLST, spa-Typ und CC weitverbreiteter MRSA in Deutschland und auf der Welt .....	18
Tabelle 3: Für die Messungen verwendete Laborgeräte .....	27
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial für die durchgeführten Messreihen.....	28
Tabelle 5: Weitere Chemikalien, die für die Versuchsreihe verwendet wurden .....	29
Tabelle 6: Gruppeneinteilung nach spa-Typ und mec-Klasse des Versuchskollektivs .....	30
Tabelle 7: Auszug aus der Ähnlichkeitsmatrix der Komponentenspektren in % .....	42
Tabelle 8: Mögliche diskriminative Peaks mit dem Peak-Klassen-Manager von Bionumerics erstellt, jeweils +/-5.....	52
Tabelle 9: Zusammenfassung der signifikanten Peaks nach den Ergebnissen der Matrixmining .....	56
Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität der Biomarker .....	58
Tabelle 11: Phänotyp und Hämolyseverhalten der verwendeten Isolate .....	73
Tabelle 12: Vorhandensein von Peaks in m/z (0 oder 1) in den Kompositspektren der Stämme .....	78

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteil von MRSA Isolaten an <i>S. aureus</i> -Nachweisen in Prozent in 2021 .....	11
Abbildung 2: Jahresverlauf der Rate an MRSA in Prozent in Deutschland.....	12
Abbildung 3: Technische Beschreibung des MALDI-TOF Massenspektrometer .....	21
Abbildung 4: Verbesserung der Datenqualität mit Dendrogramm nach Pearson-Korrelation am Beispiel des Stamms BS1 .....	38
Abbildung 5: Exemplarisch: Kompositspektrum MRSA 636 auf Stammebene .....	39
Abbildung 6: Kompositspektrum für VA13494 .....	40
Abbildung 7: Verteilung der Ähnlichkeiten der technischen und biologischen Replikate ....	43
Abbildung 8: Dendrogramm und Ähnlichkeitsmatrix auf Ebene der Kompositspektren .....	45
Abbildung 9: Visualisierung nach t-SNE, Komponentenspektren nach Gruppen .....	46
Abbildung 10: Visualisierung nach t-SNE, Kompositspektren nach Gruppen .....	47
Abbildung 11: Visualisierung nach t-SNE, Komponentenspektren nach spa-Typ .....	48
Abbildung 12: Visualisierung nach t-SNE, Kompositspektren nach spa-Typ .....	49
Abbildung 13: Visualisierung nach t-SNE, Komponentenspektren nach mec-Klasse.....	50
Abbildung 14: Visualisierung nach t-SNE, Kompositspektren nach mec-Klasse .....	51
Abbildung 15: Exemplarisch: Matrixmining Gruppe 1 gegen alle anderen Gruppen .....	53
Abbildung 16: Exemplarisch: Matrixmining t002 gegen restliche spa-Typen .....	54
Abbildung 17: Exemplarisch: Matrixmining mec II gegen restliche mec-Klassen .....	55
Abbildung 18: Dendrogramm und Ähnlichkeitsmatrix auf Ebene der Kompositspektren....	77

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ARS	Antibiotika-Resistenz-Surveillance
CA-MRSA	community-acquired MRSA
CC	Clonal Complex/klonaler Komplex
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HA-MRSA	healthcare-associated MRSA
LA-MRSA	livestock-associated MRSA
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionisation Time of flight Massenspektrometer
MLST	Multilokus Sequenztypisierung
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
PCA	Principle Component Analysis/ Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RKI	Robert-Koch Institut
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome mec
ST	Sequenz Typ
t-SNE	t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding
WGS	Whole Genome Sequencing



## 1. Einleitung

Die Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH) geht bei etwa 19 Millionen stationären Patienten pro Jahr von über einer Million Infektionen durch Krankenhauskeime und mindestens 30.000 Todesfällen aus (Zastrow, 2016). Nosokomiale Infektionen und Krankenhauskeime sind ein großes Problem in Deutschland. Der wohl bekannteste Keim ist der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*. Aufgrund intensiver Forschung und Prävention auf diesem Gebiet konnte in den letzten Jahren glücklicherweise ein deutlicher Rückgang der Infektionen erzielt werden. So war die Methicillinresistenzrate in *S. aureus* Blutkulturen 2010 noch bei 20,8%. Laut aktueller Zahlen liegt sie im Jahr 2020 nur noch bei 5,5% (*Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2020 data - Executive summary, 2021; Krankenhauskeim MRSA, 2022*). Daten zu Resistenz und Vorkommen werden sowohl landesweit (ARS-Projekt des RKI) als auch europaweit (EARS-Net des ECDC) gesammelt und veröffentlicht.

### 1.1 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind weit verbreitete Bakterien, die Haut und Schleimhäute von Menschen und Tieren besiedeln (Mairi *et al.*, 2020). Als Infektionserreger sind sie fakultativ pathogen. Die stärkste Pathogenität unter den bekannten Staphylokokkenspezies besitzt *Staphylococcus (S.) aureus* (Kwiecinski and Horswill, 2020).

#### 1.1.1 Erreger

Staphylokokken sind nicht sporenbildende, grampositive Kokken, die unter dem Mikroskop entweder einzeln, als Paare oder als unregelmäßige Haufen auftreten. Sie sind anspruchslose Keime, können aber am besten bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C wachsen.

Auf der Zellwand des Erregers sind einige Proteine aufgelagert: Protein A bindet an den Fc-Teil von Immunglobulinen und verhindert dadurch die Phagozytose durch Makrophagen. Durch die Bildung von Clumpingfaktor bindet *S. aureus* an

Fibrinogen und induziert die Bildung von Fibrinmonomeren. Der Erreger kann auch eine Polysaccharidkapsel ausbilden (Groß, 2009).

Extrazelluläre Produkte des Erregers beeinflussen die Pathogenität. Diese sind z.B.: Plasmakoagulase, hitzebeständige DNase, Hyaluronidase, Hämolytine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\chi$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), Fibrinolysin und Leukozidine (z.B. Leukozidin Luk F/S [Panton-Valentine]) (*RKI - RKI-Ratgeber - Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*, 2016).

Weiterhin können einige *S. aureus*-Stämme auch Toxine bilden: das Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1; 5-20% aller Isolate), Staphylokokken-Enterotoxine (SEs; 30-40% aller Isolate) und seltener auch Exfoliativtoxine (Ross and Onderdonk, 2000; Groß, 2009).

Nach Daten der Antibiotika Resistenz Surveillance des RKI waren 2021 75,2% der *S. aureus*-Isolate (aus Deutschland) resistent gegen  $\beta$ -Laktamase-empfindliche Penicilline. Weitere Resistenzen sind z.B. 17,6% gegen Ciprofloxacin (als Vertreter der Fluorchinolone) und 18,2% gegen Azithromycin (als Vertreter der Makrolide) (*Robert Koch-Institut: ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 20.03.2023*, 2023).

Die Methicillin-Resistenz (bzw. Resistenz gegen  $\beta$ -Laktamase-feste Penicilline) beruht auf der Bildung des zusätzlichen Penicillinbindepoteins PBP2a, einer Transpeptidase, die an der Synthese der bakteriellen Zellwand mitwirkt. Diese hat eine geringere Affinität für  $\beta$ -Laktamantibiotika, weshalb die Zellwandsynthese bei Einsatz von  $\beta$ -Laktamantibiotika kaum eingeschränkt ist (Chambers, 1988).

Bei MRSA-Stämmen wird PBP2a durch die Methicillin-Resistenzdeterminante *mec*, bestehend aus dem *mecA*-Gen und weiteren regulatorischen Elementen, gebildet. Es handelt sich um ein mobiles genetisches Element, die sogenannte „*Staphylococcus cassette chromosome mec (SCCmec)*“, von der derzeit min. 13 Typen bekannt sind (Urushibara *et al.*, 2020). Diese zusätzliche chromosomale DNA fehlt in Methicillin-sensiblen Stämmen.

### 1.1.2 Vorkommen

Etwa 30% der Menschen sind asymptomatisch mit *S. aureus* kolonisiert, meist im Nasenvorhof (Wertheim *et al.*, 2005; Kwiecinski and Horswill, 2020). Dabei sind etwa 1-2% der gesunden Menschen in Deutschland Träger von MRSA. Höhere Besiedlungsraten finden sich bei hospitalisierten Patienten, Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen, sowie bei Tierärzten und Landwirten, die insbesondere Kontakt zu Schweinen haben. Laut einer Studie in Mecklenburg-Vorpommern waren etwa 25 % der Personen, die Nutztierkontakt hatten, mit MRSA besiedelt (Dahms *et al.*, 2014).

Laut dem jährlichen epidemiologischen Bericht des ECDC (European Center For Disease Prevention And Control) stabilisiert sich, bzw. verringert sich die Rate an resistenten *S. aureus* in den letzten Jahren in den meisten europäischen Ländern. Dies dürfte Folge dessen sein, dass viele Länder nationale Maßnahmenpläne zur Reduzierung resistenter Keime eingeführt haben (Albu, *et al.*, 2016).

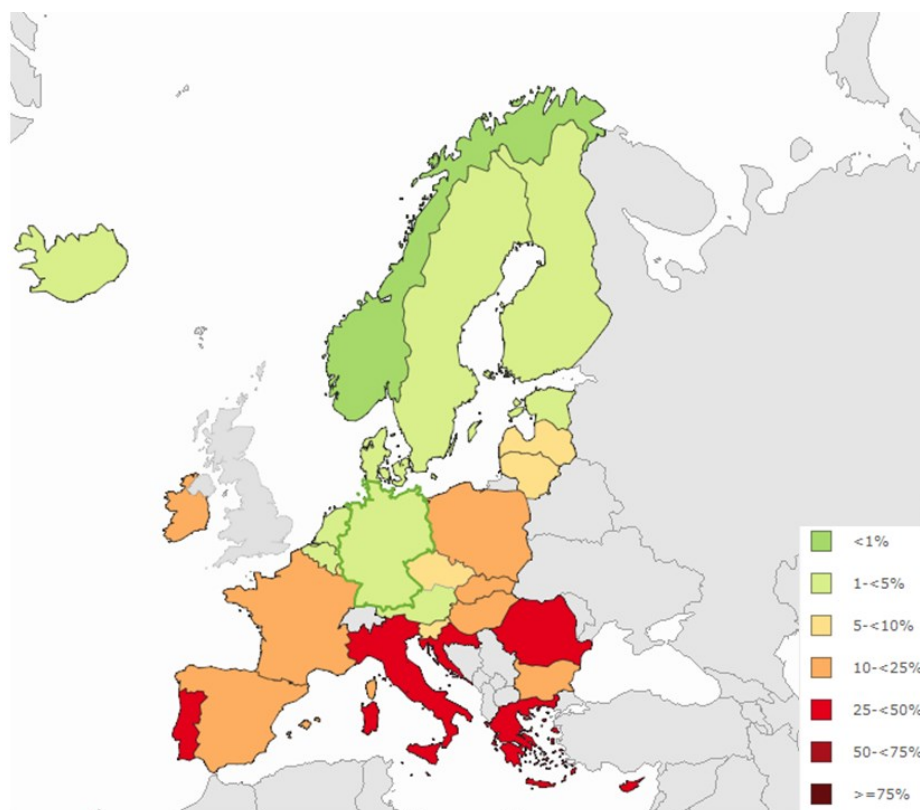


Abbildung 1: Anteil von MRSA Isolaten an *S. aureus*-Nachweisen in Prozent in 2021

In dieser Grafik (Abb. 1) stellt das ECDC aktuelle Daten von 2021 (abgerufen am 04.03.2023) zur Verfügung, die den Prozentanteil von MRSA an getesteten Isolaten in europäischen Ländern und Skandinavien darstellt. Die Rate liegt in Deutschland aktuell unter 5%, vor allem in Südeuropa ist sie jedoch noch deutlich höher.

Die Rate von MRSA an getesteten Isolaten in Deutschland verringerte sich in den letzten Jahren deutlich. Dies ist ebenfalls den Daten des ECDC (abgerufen am 04.03.2023) in Abb. 2 zu entnehmen:

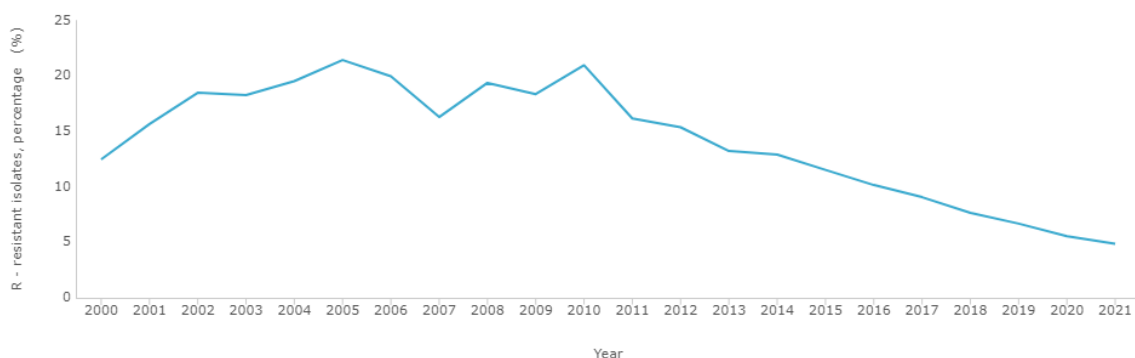


Abbildung 2: Jahresverlauf der Rate an MRSA in Prozent in Deutschland

### 1.1.3 Infektionsweg

Die Übertragung erfolgt durch direkten Kontakt, z.B. als Schmierinfektion von infizierten oder besiedelten Personen und Tieren oder durch endogene Infektion (Autoinokulation) aus dem Nasenrachenraum (Schöfer *et al.*, 2011). Je nach Übertragungsart werden die Infektionen in verschiedene Gruppen eingeteilt: Krankenhaus-assoziierte Infektion, Gesellschaft- oder Landwirtschafts-erworbene Infektion (Mairi *et al.*, 2020).

#### 1.1.3.1 Healthcare-associated MRSA

Der HA-MRSA wird typischerweise in Krankenhäusern oder Gesundheitseinrichtungen, wie Arztpraxen und Altenpflegeheimen, übertragen und betrifft vorwiegend ältere, immungeschwächte Patienten, sowie postoperative Patienten mit Fremdmaterial (Prothesen, Katheter, Tracheostoma)

im Körper (Ärzteblatt, 2015). Der Hauptübertragungsweg ist über die Hände des Personals. HA-MRSA haben oft große SCCmec vom Typ I, II und III und sind oft gegen zahlreiche Antibiotikagruppen resistent (Mairi *et al.*, 2020).

#### 1.1.3.2 **Community-acquired MRSA**

Seit den 1990er Jahren treten auch MRSA Infektionen auf, die keinen Zusammenhang zu Gesundheitseinrichtungen zeigen. In Europa sind diese Infektionen noch selten, in den USA dagegen ein zunehmendes Problem. Dort sind sie z.B. der häufigste Erreger von ambulant erworbenen Haut- und Weichgewebeeinfektionen (Lakhundi and Zhang, 2018). Die CA-MRSA unterscheiden sich deutlich von den älteren HA-MRSA: Sie infizieren oft junge, immunkompetente Menschen. Außerdem verbreiten sie sich schnell unter der gesunden Bevölkerung und zeigen andere Antibiotikaresistenzen. Die CA-MRSA tragen kleinere SCCmec Elemente, viele tragen SCCmec Typ IV und V (Khan *et al.*, 2018). Zusätzlich können einige das Panton-Valentine Leukozidin (PVL) bilden, das die Virulenz des Erregers erhöht (Gillet *et al.*, 2002; Shallcross *et al.*, 2013). Die meisten CA-MRSA gehören dem klonalen Komplex CC80 und zwei subklonalen MRSA-Stämmen an: USA300/ST8 und USA400/ST1 (Stegger *et al.*, 2014; Glaser *et al.*, 2016). Das Spektrum der Infektionen geht von oberflächlichen Haut- und Weichgewebeeinfektionen bis zu nekrotisierenden Pneumonien und schwerer Sepsis (David and Daum, 2010).

#### 1.1.3.3 **Livestock-associated MRSA**

Seit 2004 tritt eine neue Infektionsquelle für MRSA zunehmend in den Fokus: Viele Schweine und Rinder sind mit MRSA besiedelt. In Europa und Nordamerika gehört der überwiegende Anteil der LA-MRSA zum MRSA-Klon CC398 (Graveland *et al.*, 2011). Dieser besiedelt Personen mit viel Tierkontakt (Landwirte, Tierärzte). Der LA-MRSA ist grundsätzlich aber auch von Mensch zu Mensch übertragbar. Nach derzeitigem Kenntnisstand wird der LA-MRSA jedoch seltener zwischen Menschen übertragen, als dies für andere MRSA beschrieben ist (Cuny *et al.*, 2013; Chen and Wu, 2020).

### 1.1.4 Klinik und Therapie

Der überwiegende Anteil an MRSA-Trägern ist nur besiedelt von diesen Staphylokokken ohne Symptome einer Infektion. Bei Risikopatienten (ältere, immungeschwächte oder postoperative Patienten) können jedoch auch schwerwiegende Infektionen auftreten.

Schon die Besiedlung mit MRSA sollte behandelt werden. Laut einer Cochrane Metaanalyse halbiert sich etwa die Zahl der postoperativen Wundinfektionen, wenn präoperativ eine nasale Eradikation mit Mupirocin Salbe durchgeführt wurde (Rijen *et al.*, 2008).

Oberflächliche Staphylokokkeninfektionen (MRSA und MSSA) werden topisch mit Antiseptika und Antibiotika therapiert. Eine systemische Therapie ist meist nur bei ausgedehntem Befund oder Risikofaktoren erforderlich (Bodmann, 2019).

Tiefe Infektionen (kutane Abszesse, Phlegmonen und schwere Weichgewebeinfektionen) sollten je nach Schweregrad sofort gespalten bzw. debridiert werden und eine dem klinischen Bild angepasste Antibiose durchgeführt werden. Nach Resistenztestung des Erregers sollte auf eine antibiogrammgerechte Antibiose umgestellt werden (Schöfer *et al.*, 2011).

Des Weiteren werden zwei schwere Krankheitsbilder durch *S. aureus* Toxine vermittelt. Das Staphylococcal-scaled-skin Syndrom (SSSS) ist eine seltene Erkrankung im Kindesalter, die durch eine Exfoliatin Ausschüttung (Toxin, das zur Aufspaltung des Haftproteins Desmoglein 1 führt) zu einer akantholytischen subkornealen Spaltbildung führt (Bukowski *et al.*, 2010). Das Staphylococcal-toxic-shock Syndrom (TSS) wird fast immer durch das Exotoxin TSST-1 verursacht, das von einigen *S. aureus* Linien produziert wird. Es ist eine seltene Erkrankung, deren Symptome von Fieber, Exanthemen, Diarrhoe bis hin zum Multiorganversagen und kompletten Hautablösung führen können. Es besteht eine Letalität von 3-5% (Ross and Onderdonk, 2000).

## 1.2 Feintypisierung

Die *S. aureus*-Population wird anhand molekularer Typisierungsmethoden in klonale Linien und davon abgeleitet in Subklone unterschieden. Diese Methode erleichtert das Erkennen und Erforschen epidemiologischer und evolutionärer Zusammenhänge. Es gibt verschiedene Methoden zur Typisierung und Charakterisierung der verschiedenen Klone, die sich in Kosten, Sensitivität und Spezifität unterscheiden. Grundsätzlich gibt es die Möglichkeit der Typisierung nach Phäno- oder Genotyp (Lakhundi and Zhang, 2018).

Die Typisierung von MRSA-Klonen hat sich dabei im Laufe der Jahre sehr gewandelt: In den 1940er Jahren etablierte sich eine Typisierung mittels Bakteriophagen. In den 1980er Jahren setzte sich die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), eine teure und aufwändige Methode, durch. Weitere mögliche Methoden sind die PCR-basierte Typisierung (amplified fragment length polymorphism (AFLP), repetitive element PCR), Multilokus-Sequenztypisierung (MLST), das „*spa*-Typing“, die „Whole-Genome Sequencing“ sowie die in dieser Arbeit untersuchte Typisierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometer (van Belkum and Rochas, 2018).

Im Folgenden wird die MLST und *spa*-Typisierung, sowie die Massenspektrometrie beschrieben, da diese Methoden auf das Versuchskollektiv angewendet wurden.

### 1.2.1 Multilokus Sequenztypisierung

Bei der Multilokus Sequenztypisierung (MLST) werden DNA-Sequenzen von 7 *housekeeping* Genen (Gene, die unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert werden) ermittelt, mit der PubMLST Datenbank verglichen und präzise vordefinierten Stämmen zugeordnet. Die PubMLST Datenbank ist frei zugänglich. (<https://pubmlst.org/organisms/staphylococcus-aureus>)

Die MLST bietet die Grundlage des Nomenklatorsystems für *S. aureus* Stämme: jedem Isolat wird eine fortlaufende ST-Nummer (Sequenztyp) zugeordnet. Aus den Nummern ist keine Aussage bezüglich eines Verwandtheitsgrades einzelner

Sequenztypen möglich. Daher werden genetisch ähnliche Sequenztypen (ST) in klonalen Clustern bzw. „Clonal Complex“ (CC) zusammengefasst (Jolley *et al.*, 2018).

Der Nachteil der MLST ist allerdings, dass sie relativ teuer und arbeitsaufwändig ist (Lakhundi and Zhang, 2018).

### **1.2.2 *spa*-Typisierung**

Bei der *spa*-Typisierung handelt es sich um ein DNA-Fragment-basiertes Verfahren, das speziell für den *S. aureus* entwickelt wurde. Das *spa*-Gen codiert für das Protein A und besteht aus einem Fc-Bindungsabschnitt, dem X-Abschnitt und dem C-terminalen Abschnitt. Der X-Abschnitt enthält dabei eine variable Anzahl an Wiederholungen. Aufgrund der Anzahl und der Anordnung entsteht ein Polymorphismus, der einem bestimmten *spa*-Typ zugeordnet werden kann.

Auch hierfür gibt es eine frei zugängliche Datenbank unter <http://www.spaserver.ridom.de>. Diese Datenbank wird von der Seqnet.org Initiative betrieben und ermöglicht eine sehr genaue Reproduzierbarkeit der Nomenklatur.

Die *spa*-Typisierung ist günstiger, einfacher und schneller als die MLST und PFGE. Daher wird es derzeit als Methode der ersten Wahl verwendet (Lakhundi and Zhang, 2018).

Tabelle 1 zeigt exemplarisch eine Übersicht der in dieser Arbeit vorkommenden *spa*-Typen in dem Versuchskollektiv und wurde mit Daten des SpaServers (nach <http://spaserver.ridom.de/spatypes.shtml> aufgerufen 03/2023) erstellt.



Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit vorkommende spa-Typen

spa-Typ	Wiederholungsabfolgen	MLST	Klon/Subklon
t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	ST5, ST231	CC5, Rheinhessen MRSA (Prototyp), EMRSA-3, New York Klon, Japan Klon, Pediatric, USA100 ORSA II, USA800 ORSA IV, ST 5 ORSA I
t003	26-17-20-17-12-17-17-16	ST5, ST225	CC5, Rheinhessen MRSA (Subklon), EMRSA-3, New York Klon
t045	26-17-20-17-12-17-16	ST5, ST225	
t105	26-23-17-34-17-20-17-17-16	ST5	
t264	26-17-20-17-17-17-16		
t535	26-17-16		
t1305	26-23-17-34-17-20-16		
t1486	26-17-20-23-17-12-17-17-16		
t2597	26-23-17-13-17-16		

### 1.2.3 Häufigkeit klonaler Linien in Deutschland

Seit dem 01.07.2009 besteht in Deutschland eine Meldepflicht nach §7 Infektionsschutzgesetz für den Nachweis von MRSA in Blut oder Liquor von Patienten (Siegmund-Schultze, 2009). Das Nationale Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken (NRZ) des RKI überwacht die Verbreitung

und die Resistenz- und Virulenzeigenschaften von Staphylokokken in Deutschland.

Aufgrund dieser Daten ist ersichtlich, dass es zwei Hauptklone in Deutschland gibt: CC22 (Barnim-Epidemiestamm) und CC5 (Süddeutscher- und Rheinhessen-Epidemiestamm) wurden am häufigsten in deutschen Krankenhäusern als Epidemiestamm gemeldet (*RKI - Archiv 2011 - Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010*, 2011). Die 10 am häufigsten vorkommenden klonalen Linien weltweit sind aktuell CC1, CC5, CC8, CC15, CC22, CC30, CC45, CC93, CC97 und CC121 (Jolley *et al.*, 2018).

Tabelle 2 zeigt die Auflistung des Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken (NRZ) der häufigen klonalen Linien in Deutschland und weltweit (nach Dr. Strommenger, NRZ des RKI, 08/2019).

*Tabelle 2: Übersicht der MLST, spa-Typ und CC weitverbreiteter MRSA in Deutschland und auf der Welt*

<b>Epidemiestämme/Bezeichnung nach Region der Verbreitung</b>	<b>MLST</b>	<b>CC</b>	<b>spa</b>
<b>Community-acquired MRSA:</b>			
weitverbreiteter Stamm in Europa	ST80	CC80	<i>t044</i>
verbreitet in USA (USA300, USA400)	ST8 ST1	CC8	<i>t008</i> <i>t175</i>
in Mittel- und Südeuropa	ST5	CC5	<i>t002</i>
in Europa	ST22	CC22	<i>t310</i>
in USA, Südostasien, Europa	ST30	CC30	<i>t019</i>
„Bengal Bay“ Klon; indischer Subkontinent	ST772	CC1	<i>t657</i>

<b>Healthcare-associated MRSA:</b>			
Süddeutscher Epidemiestamm	ST228	CC5	t001
Rhein Hessen Epidemiestamm	ST5	CC5	t002, t045
Epidemiestamm im Großraum Köln (Suptyp des Rhein Hessen Epidemiestamm)	ST225	CC5	t003
Hannoverscher Epidemiestamm	ST254	CC8	t009
Wiener Epidemiestamm	ST239	CC8	t037, t030
Norddeutscher Epidemiestamm	ST247	CC8	t051
Barnim Epidemiestamm (EMRSA-15 in Großbritannien)	ST22	CC22	t032, t022, t005
Berliner Epidemiestamm	ST45	CC45	t004, t038, t065
Epidemiestamm EMRSA-16 in Großbritannien	ST36	CC30	t018

### 1.3 MALDI-TOF Massenspektrometer in der klinischen Routine

Die Massenspektrometrie wird seit Jahrzehnten als Analysemethode in der Chemie verwendet. Die Forscher Anhalt und Fenselau schlugen 1975 vor, diese Methode auch zur Bakterienidentifizierung heranzuziehen. Sie zeigten, dass verschiedene Bakterien unterschiedliche Massenspektren erzeugen und ordneten bestimmten Peaks verschiedene Bakterien zu (Anhalt and Fenselau, 1975). Seitdem wurde die Technik stetig weiterentwickelt. Holland et al. stellten 1996 eine Methode vor, die aus ganzen Bakterienzellen einen spektralen Fingerabdruck erstellt und damit eine Vorbehandlung der Bakterien unnötig macht (Holland *et al.*, 1996; Carolis *et al.*, 2014).

Heutzutage hat das MALDI-TOF Massenspektrometer die Identifizierung von Pathogenen in klinischen mikrobiologischen Laboren revolutioniert (Bizzini *et al.*, 2010; Tsuchida *et al.*, 2020). Im Gegensatz zu herkömmlichen phänotypischen und Gensequenzierungsmethoden besticht es durch einfache, günstige, schnelle und effiziente Technik, die einen hohen Durchsatz erlaubt (Croxatto *et al.*, 2012). In der klinischen Routinediagnostik wird diese Methode auch zur Identifizierung von *S. aureus* verwendet (Szabados *et al.*, 2010).

### **1.3.1 Technische Beschreibung des MALDI-TOF Massenspektrometer**

Jeder Massenspektrometer besteht aus drei funktionellen Einheiten: Die Ionenquelle (um die Analyte in die Gasphase zu überführen), den eigentlichen Massenspektrometer (um die Ionen in ihre spezifischen Masse-zu-Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ) aufzuteilen) und ein Instrument zur Erfassung der Ionen (Sauer and Kliem, 2010).

Es gibt verschiedene Methoden der Ionisation der Analyte. In der Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Analyse (MALDI) werden die Analyte in Kristalle mit kleinen, sauren Molekülen (die sogenannte Matrix) eingebettet, die die Laserenergie desorbieren. Diese Methode zählt zu den „weicheren“ Techniken, die es erlauben große, nicht volatile Biomoleküle (wie intakte Proteine oder Bakterien) zu ionisieren und vaporisieren (Emonet *et al.*, 2010). Hierfür wird z.B. Alpha-cyano-4-Hydroxycimtsäure oder 3-Hydroxypicolinsäure, bzw. 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix verwendet.

Die zu untersuchende Probe wird mit der Matrix auf einer leitfähigen Metallplatte gemischt. Nach der Kristallisation von Matrix und Analyt wird die Metallplatte in das Massenspektrometer eingelegt. Dort wird es mit kurzen Laserimpulsen (3-4 ns) eines Stickstofflasers mit einer Wellenlänge von 337 nm beschossen (Sauer and Kliem, 2010; *Principle of MALDI/TOFMS*, 2023). Die Matrix absorbiert die Energie des ultravioletten Lichts, dies führt zur Desorption der Analyte. Diese werden vaporisiert und ionisiert zu überwiegend einfach positiv geladenen Ionen in der Gasphase. Diese Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt.

In der anschließenden Flugröhre, in der Vakuum herrscht, teilen sich die Ionen nach Ladung und Gewicht auf, bis sie den Detektor erreichen. Da außer der Masse, der Ladung und der Zeit hier alle Parameter konstant sind, ist die Flugzeit eines Ions (Time of Flight, TOF) proportional zu  $m/z$  ( $m$  entspricht Masse,  $z$  entspricht der Ladung). Bioanalyte mit verschiedenen  $m/z$  Werten werden demzufolge nach ihrer Flugzeit aufgetrennt. Dabei entsteht ein Massenspektrum, das einerseits durch die  $m/z$  Werte und andererseits durch die Intensität der Ionen, also die Zahl der Ionen mit der gleichen  $m/z$ , charakterisiert wird. Da MALDI überwiegend einfach geladene Ionen produziert ( $z = 1$ ), korreliert das  $m/z$  Verhältnis mit der Masse. Zur Identifikation des Bakteriums wird das entstandene Spektrum mit den Einträgen einer Datenbank verglichen (Croxatto *et al.*, 2012).

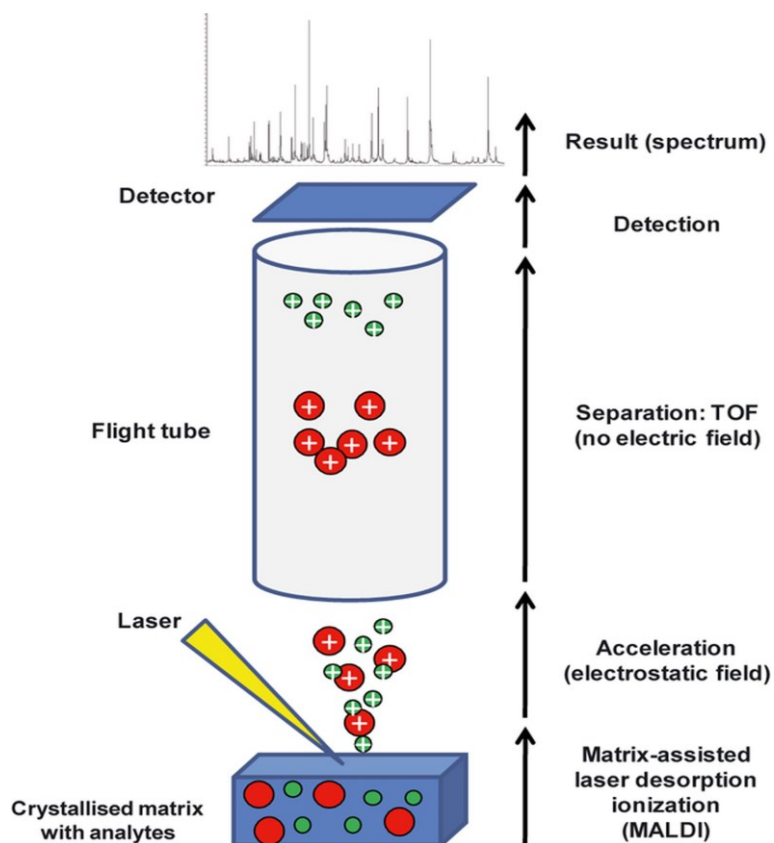


Abbildung 3: Technische Beschreibung des MALDI-TOF Massenspektrometers; Grafik nach Croxatto *et al.*, 2012

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie wird in vielen Laboren zur Identifikation von Bakterien, Viren, Parasiten, Toxinen und Hefen erfolgreich eingesetzt (Kassim *et al.*, 2017; Alizadeh *et al.*, 2021).

### **1.3.2 Datenanalyse und Identifikation spezifischer Biomarker mit MALDI-TOF**

Massenspektren können sich auf drei mögliche Weisen unterscheiden:

1. in der Signalintensität,
  2. Verlust eines Peaks oder
  3. in der Verschiebung eines Peaks (sogenannter Peak-Shift)
- (Østergaard *et al.*, 2015).

Eine Veränderung der Signalintensität zeigt entweder eine veränderte Protein-Expression infolge von genetischen Veränderungen an Regulatoren oder eine Anpassung der Bakterien auf veränderte Wachstumsbedingungen.

Zum Verlust eines Peaks führt zum Beispiel ein neuer und früherer Stopp-Codon oder ein Frame-Shift, also eine Leserasterverschiebung eines Gens. Dies kann auch Ursache von veränderten Wachstumsbedingungen bzw. Vorbereitung der Proben sein. Durch äußere Umstände (Agarplatte, pH-Wert, Temperatur) kann es also zu diesen Veränderungen kommen (Złoch *et al.*, 2020).

Eine Verschiebung des Peaks, also ein Peak-Shift, resultiert aus kleinen Gewichtsunterschieden an Proteinen, an denen z.B. einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden. Daher kann diese Veränderung eines Massenspektrums gut als Biomarker verwendet werden (Østergaard *et al.*, 2015; Sauget *et al.*, 2017).

### **1.3.3 Publikationen zu bekannten Peaks**

Seit 2002 gibt es bereits erste Forschungsansätze mittels Massenspektrometrie MRSA und MSSA zu unterscheiden (Bernardo *et al.*, 2002).

Es gibt aktuell 10 Studien, die versucht haben zwischen verschiedenen klonalen Linien von *S. aureus* mittels Massenspektrometrie zu unterscheiden. Bei drei dieser Studien wurden nur kleine endemische Stämme untersucht bzw. keine relevanten Biomarker gefunden. Bei 7 der Studien wurden häufige klonale Stämme untersucht: CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 und CC398 (Wolters *et al.*, 2011; Josten *et al.*, 2014). Als Ergebnis wurden für einzelne klonale Linien spezifische Peak-Shifts gefunden (Sauget *et al.*, 2017).

Einige Arbeitsgruppen (Wolters *et al.*, 2011; Böhme *et al.*, 2012; Josten *et al.*, 2013; Lasch *et al.*, 2014) verwendeten zur Untersuchung die Extraktionsmethode (siehe 2.2.2.2), einen zusätzlichen Arbeitsschritt in der Diagnostik.

Als Ergebnis dieser Peak-Studien ergibt sich ein „Standardspektrum“ für *S. aureus* mit einigen dominierenden Peaks: Der Peak m/z 6889 (bzw. 2-fach geladenes Peptid der Masse 3445) entspricht dem Protein SA0772. Der Peak m/z 5525 (bzw. 2-fach geladenes Peptid der Masse 2763), entspricht einem bisher nicht identifizierten Peptid. Das DNA-Bindeprotein HU (SA1305) lässt sich auf die Peaks m/z 9627 (bzw. 2-fach geladenes Peptid der Masse 4814) zurückführen (Josten *et al.*, 2014).

Mehrfach wurde publiziert, dass ein Peak-Shift für die klonale Linie CC5 spezifisch zu sein scheint: von m/z 3876 zu m/z 3891. Das korreliert mit einem F16Y Austausch an dem Protein SA2420 (Østergaard *et al.*, 2015).

Auch für andere klonale Linien gibt es Publikationen: Für CC8 zeigt sich ein spezifischer Peak-Shift von m/z 6533 zu m/z 6591. Hierfür ist ein Polymorphismus des Proteins SA1452 verantwortlich (Sauget *et al.*, 2017).

Ein weiterer Peak-Shift wurde als spezifisch für CC22 gefunden: von m/z 5033 zu m/z 5004, hierfür scheint ein E27V Austausch am Protein *GraF* verantwortlich zu sein, dies konnte jedoch nicht für alle *spa*-Typen dieser klonalen Linie gezeigt werden (Camoez *et al.*, 2016; Sauget *et al.*, 2017).

Für die klonale Linie CC30 wurden 2 Peak-Shifts identifiziert: von m/z 5527 zu m/z 5508 sowie von m/z 5439 zu m/z 5419. Dies korreliert mit dem

Polymorphismus des Proteins SAS049 und einem bisher undefinierten Protein (Østergaard *et al.*, 2015; Sauget *et al.*, 2017).

Für einzelne Peaks wurden weitere Studien erstellt. So konnte zum Beispiel das Team um Daniel Rhoads für den Peak  $m/z$  2415  $\pm$  2 eine Korrelation zum Auftreten des *mecA*-Gens treffen. Sie haben festgestellt, dass 37% der MRSA diesen Peak zeigen, jedoch 0% der MSSA. Es scheint das Produkt des *psm-mec* Gens (Teil des Klasse A *mec* Genkomplexes) zu sein (Rhoads *et al.*, 2016).

Ein weiterer detektierter Peak ist bei  $m/z$  3005  $\pm$  5. Dieser Peak ist das Korrelat zu von *S. aureus* produziertem Delta Toxin (Gagnaire *et al.*, 2012).

Auch die koreanische Forschungsgruppe um Jung-Min Kim identifizierten 21 Peaks, anhand derer sie mithilfe eines Entscheidungsbaumes signifikant zwischen MRSA und MSSA unterscheiden können (Kim *et al.*, 2019).

Obige Studien zeigten jedoch trotz vieler übereinstimmender Peaks auch einige, die nur in einzelnen Laboren bestimmt wurden und in anderen Studien nicht reproduziert werden konnten (Sauget *et al.*, 2017).

#### **1.4 Frühwarnsystem für Ausbrüche nosokomialer Infektionen**

Eine unverzügliche Identifikation einer MRSA-Epidemie ist ausschlaggebend für die Kontrolle des Ausbruchs. 2004 hat Alexander Mellmann in einer Studie festgestellt, dass eine Kombination aus *spa*-Typisierung und Vergleich epidemiologischer Daten die damals effizienteste und zuverlässigste Methode war, um Cluster von MRSA-Infektionen zu erkennen. Somit konnte frühzeitig zwischen einem Pseudoausbruch und einem richtigen Ausbruch aufgrund ungenügender Hygiene in einem Krankenhaus unterschieden werden (Mellmann *et al.*, 2006). Diese Studie ist schon einige Jahre alt und die mikrobiologische Diagnostik entwickelt sich stetig.

Auch 2018 nutzten Baier *et al.* jedoch PFGE und *spa*-Typisierung zur MRSA Ausbruchskontrolle in einem Verbrennungszentrum (Baier *et al.*, 2018).



Ein japanisches Team empfiehlt eine wöchentliche bis monatliche Überwachung aller stationärer Patienten. So sollte möglichst schnell ein Ausbruch erkannt werden. Da so ein hohes Arbeitspensum für die mikrobiologische Diagnostik anfällt, wird die Empfehlung zu einer PCR basierten Typisierung ausgesprochen (Kanemitsu and Nakamura, 2016).

Auch die „Whole Genome Sequencing“ (WGS) Methode ist aufgrund besserer Verfügbarkeit heutzutage eine gute Methode zur Ausbruchskontrolle. Es werden sehr präzise Charakteristika zu den untersuchten Isolaten erstellt (Ugolotti *et al.*, 2018; Humphreys and Coleman, 2019). Aktuell ist WGS noch eine eher teure Methode. Sollten die Kosten aufgrund neuer Technik zukünftig jedoch vergleichbar mit konventionellen Methoden sein, wird sich die WGS auch in der Ausbruchskontrolle etablieren (Price *et al.*, 2013).

Da sich die MALDI-TOF Massenspektrometrie zu einer wichtigen Säule in der mikrobiologischen Routinediagnostik entwickelt hat, stellt sich die Frage, ob sie auch eine valide Methode zur Ausbruchdiagnostik darstellt.

Diese Fragestellung wurde auch von der Forschungsgruppe um Michael Josten aus Bonn gestellt. Deren Schlussfolgerung war, dass mittels MALDI-TOF gut zwischen verschiedenen klonalen Linien unterschieden werden kann. Sollten die Isolate jedoch der gleichen Linie angehören, muss eine sensitivere Methode (PCR, *spa*-Typisierung oder PFGE) ergänzt werden um zwischen einem Ausbruch und Pseudoausbruch unterscheiden zu können (Josten *et al.*, 2013).

Dagegen veröffentlichte das RKI eine Studie, die schlussfolgerte, dass eine Unterscheidung auf Ebene der klonalen Linien bzw. einzelner Isolate mit dem MALDI-TOF nicht zuverlässig möglich ist (Lasch *et al.*, 2014).

Ein belgisches Team befürwortet den Einsatz von MALDI-TOF in der Ausbruchdiagnostik auf einer neonatologischen Intensivstation, bemängelt allerdings die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Steensels *et al.*, 2017).

Auch die japanische Forschungsgruppe um O. Ueda bestätigt eine schlechte Reproduzierbarkeit der Spektren, vor allem zwischen verschiedenen Laboren.

Sie begründen dies unter anderem damit, dass schon kleine Unterschiede der Messmethodik bzw. Umweltbedingungen großen Einfluss auf die Proteinexpression von *S. aureus* haben können (Ueda *et al.*, 2015).

Eine Schweizer Studie beschäftigte sich mit dieser Frage und verglich MALDI-TOF Daten verschiedener Zentren untereinander. Die Autoren schlussfolgerten, dass ein Vergleich der Daten möglich ist, aber weiterer Forschungsbedarf (z.B. zur Vereinheitlichung der Handlungsanweisungen) für eine zuverlässigere Analyse nötig ist (Oberle *et al.*, 2016).

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit untersucht, ob es mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ebenso möglich ist, zwischen verschiedenen Isolaten zu unterscheiden, da es die Methode der *spa*-Typisierung in Effizienz, Schnelligkeit und Kosten noch übertrifft.

Untersucht wird dabei ein Kollektiv an 80 *S. aureus* Isolaten des Rheinessen Epidemiestammes vom CC5, die unter anderem am Universitätsklinikum Tübingen gesammelt wurden und die bereits mittels *spa*-Typisierung identifiziert wurden.

Die Fragestellung wird in mehrere Teilaspekte gegliedert:

Ist es möglich, in dem vorgegebenen Kollektiv mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in verschiedene *spa*-Typen zu klassifizieren?

Ist es möglich, in dem vorgegebenen Kollektiv mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in verschiedene *mec*-Klassen zu klassifizieren?

Ist es möglich, in dem vorgegebenen Kollektiv mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in MRSA und MSSA zu klassifizieren?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die in der Arbeit verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien und Software. Die Versuche wurden allesamt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum Tübingen (Elfriede-Aulhorn-Straße 6, 72076 Tübingen) durchgeführt.

#### 2.1.1 Laborgeräte

*Tabelle 3: Für die Messungen verwendete Laborgeräte*

Gerätebezeichnung	Hersteller	Ort
AXIMA Assurance Linear MALDI-TOF Mass Spectrometer	Shimadzu Biotech, Kyoto	Elfriede-Aulhorn-Straße 6, 72076 Tübingen
Brutraum 35°C (Raum 1.2.22 des Instituts für klin. Mikrobiologie und Virologie, Tübingen)	-	dito
Centrifuge 5415 R	Eppendorf SE, Hamburg	dito
Eismaschine AF 100	Scotsman Ice Srl, Mailand	dito
Kühlraum 4° / - 20° C (Raum 1.2.20 des Instituts für klin. Mikrobiologie und Virologie, Tübingen)	-	dito
Kühlschränke	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen	dito
Kühltruhe	dito	dito

Pipetten (10-100µl; 1000µl)	Eppendorf SE, Hamburg	dito
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt	dito
Vibrofix VF1 Electronic Vortexer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen	dito

## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

*Tabelle 4: Verbrauchsmaterial für die durchgeführten Messreihen*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
500ml Glasflasche	Biochrom AG, Schaffhausen
15 ml Falcon	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen
50 ml Falcon	BD, Schaffhausen
Columbia-Agar mit Schafsblut Plus	Oxoid GmbH, Wesel
Peha-soft nitrile white Untersuchungshandschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Pipettenspitzen	Eppendorf SE, Hamburg
Safe-lock Tubes in 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf SE, Hamburg
Sterile Einmalpipetten Inoculation Loop	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen

### 2.1.3 Spezielle Chemikalien

Tabelle 5: Weitere Chemikalien, die für die Versuchsreihe verwendet wurden

Chemikalie
Acetonitril
Alpha-cyano-4-Hydroxycimtsäure (Matrix)
Ameisensäure (70%)
Aqua dest.
Ethanol absolut

### 2.1.4 Computersoftware

- BIONUMERICS 7.6 (Applied Math NV, Belgien)
- SARAMIS Target Manager (bioMérieux, Frankreich)
- SARAMIS (bioMérieux, Frankreich)
- R 3.6.1 <https://cran.r-project.org/package=MALDIquant>

### 2.1.5 Die Bakterienstämme des Versuchskollektivs

Die Gruppe der 80 MRSA und MSSA Stämme stammt aus einer Arbeit von Dr. Berit Schulte von 2013 (Schulte *et al.*, 2013). Sie besteht aus 49 Isolaten (41 MRSA und 8 MSSA) einer Sammlung von insgesamt 251 Rheinhessen *S. aureus* Isolaten, die im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen besteht. Diese Sammlung entstand aus verschiedenen vorherigen Studien und wurde bei sowohl stationären als auch ambulanten Patienten von zwei Kliniken in Süddeutschland gesammelt. Die 49 wurden aufgrund minimaler Unterschiede in den PFGE Banden als repräsentativ ausgesucht. Weiter 27 Rheinhessen *S. aureus* Isolate (BS1-BS27) kommen aus dem ehemaligen Referenzlabor für Staphylokokken in Bonn und wurden aus demselben Grund ausgesucht. Sie wurden von Patienten in Kliniken aus Nordrhein-Westfalen gesammelt. Drei gut untersuchte Isolate wurden von NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in

Staphylococcus aureus) bereitgestellt: N315, New York clone/USA100/NRS382 and Pediatric Clone/NRS387. Des Weiteren wurde der Rheinhessen Referenzstamm 3391/02 untersucht.

Im Folgenden wurden Stämme mit gleichen Charakteristika (*spa*-Typ und SCCmec-Klasse) zu Gruppen zusammengefasst, um sie gegeneinander vergleichen zu können. Die Reihenfolge der Gruppen ist dabei zufällig.

*Tabelle 6: Gruppeneinteilung nach spa-Typ und mec-Klasse des Versuchskollektivs*

<b>Stamm</b>	<b>Anzahl verwendeter Spektren</b>	<b><i>spa</i>-Typ</b>	<b>SCCmec</b>	<b>Gruppe</b>
BS6	24	t002	II	1
mg34a	23	t002	II	1
mg77c	20	t002	II	1
MRSA539	24	t002	II	1
NRS382	12	t002	II	1
VA10043	17	t002	II	1
W593	22	t002	II	1
mg72a	24	t002	II	1
MRSA442	23	t002	II	1
MRSA623	19	t002	II	1
MRSA718	24	t002	II	1
N315	24	t002	II	1
AS271b	14	t002	II	1
BS17	24	t002	II	1

BS18	20	t002	II	1
BS24	20	t002	II	1
BS8	21	t002	II	1
mg72c	24	t002	II	1
MRSA148	22	t002	II	1
MRSA263	24	t002	II	1
MRSA354	24	t002	II	1
MRSA636	24	t002	II	1
MRSA685	24	t002	II	1
MRSA758	24	t002	II	1
MRSA795	23	t002	II	1
VA10344	24	t002	II	1
VA1708	21	t002	II	1
VA2434	14	t002	II	1
VA5237	23	t002	II	1
W589	21	t002	II	1
W602	22	t002	II	1
AN2374	22	t002	II	1
mg11c	20	t002	II	1
mg1a	24	t002	IV	2
mg4n	24	t002	IV	2
MRSA95	21	t002	IV	2
NRS387	24	t002	IV	2
W648b	24	t002	neg	3

GN671	18	t002	neg	3
K35	24	t002	neg	3
K36	19	t002	neg	3
mg24r	19	t002	neg	3
mg24sa	21	t002	neg	3
mg27n	15	t002	neg	3
W709a	24	t002	neg	3
BS14	13	t003	II	4
BS1	18	t003	II	4
BS10	22	t003	II	4
BS21	21	t003	II	4
BS22	16	t003	II	4
BS25	17	t003	II	4
BS27	19	t003	II	4
MRSA815	12	t003	II	4
MRSA852	13	t003	II	4
MRSA816	15	t003	II	4
BS2	22	t003	II	4
BS3	22	t003	II	4
mg32b	24	t003	II	4
mg53a	24	t003	II	4
MRSA828	24	t003	II	4
MRSA847	16	t003	II	4
MRSA849	15	t003	II	4



BS12	24	t003	II	4
BS15	17	t003	II	4
BS19	21	t003	II	4
BS23	18	t003	II	4
BS26	21	t003	II	4
BS4	23	t003	II	4
BS7	21	t003	II	4
BS9	15	t003	II	4
MRSA823	23	t003	II	4
MRSA848	21	t003	II	4
VA13494	17	t045	II	5
BS13	23	t045	II	5
VA12977	23	t105	n.t.	6
BS20	18	t1305	IV	7
BS11	17	t1486	II	8
Rheinhessen	24	t2597	II	9
BS16	18	t264	II	10
BS5	16	t535	II	11

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Vorbereitung der *S. aureus*-Isolate**

Die 80 Stämme wurden bis dato bei -80°C gelagert. Sie wurden nacheinander bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einer Einmal-Plastiköse mäanderförmig auf eine Columbia-Blutagar Platte (mit 5% Schafblut) ausgestrichen. Anschließend wurden diese bei 35°C im Brutraum inkubiert. Nach 24 Stunden wurden sie überimpft und weitere 24 Stunden im Brutraum inkubiert. Eine Tabelle des Hämolyseverhalten und dem Phänotyp wurde erstellt und lässt sich dem Anhang (Tabelle 11) entnehmen.

### **2.2.2 Durchführung der Messung mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer**

Es gibt zwei Möglichkeiten der Bakteriendiagnostik am Massenspektrometer. Der grundsätzliche Unterschied ist, dass die Bakterien entweder direkt („Direct Colony“ Methode) von der Blutagarplatte weiterverwendet werden oder eine Vorbehandlung (Extraktionsmethode) stattfindet.

#### **2.2.2.1 „Direct Colony“ Methode**

Bei der „Direct Colony“ Methode (auch „Whole-Cell“ Methode genannt) wird eine Kolonie des zu untersuchenden Bakteriums direkt auf die Metallplatte (Target) des Massenspektrometers aufgebracht. Auf ein Target passen bis zu 46 verschiedene Proben (4 [1-4] x 12 [A-L], abzüglich 2 Felder für den Standard *E. coli*). Dieses wird bei Raumtemperatur etwa 10 Minuten getrocknet. Auf jedes Feld des Targets wird dann 1 µl der Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) aufgetragen und mit der Bakterienprobe vermischt. Nach diesem Schritt wird das Target erneut etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 2.2.2.2 Extraktionsmethode

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Bakterienproben vorher mit der Extraktionsmethode analog zu der Beschreibung bei Alatoon *et al.*, 2011, vorbereitet. Hierfür werden 1-3 Kolonien in 300 µl destilliertem Wasser mit Hilfe des Vortexer gelöst. Es werden 900 µl Ethanol hinzugefügt und wieder mittels Vortexer homogenisiert. Daraufhin wird die Lösung 2 Minuten bei 13,2g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das übriggebliebene Pellet getrocknet. Anschließend werden 50 µl Ameisensäure (70%) zugefügt, mit Hilfe des Vortexer geschüttelt und mit 50 µl Acetonitril durch pipettieren vermischt. Diese Lösung wird erneut 2 Minuten bei 13,2g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend werden 70 µl des Überstandes in einen neuen Eppendorf-Cup pipettiert. Von diesem wird wieder 1 µl auf je ein Feld des Targets verteilt. Nach 10 Minuten Trocknungszeit bei Raumtemperatur wird 1 µl der Matrix darüber gesetzt und wieder bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lösung der extrahierten Bakterien hält sich tiefgefroren für spätere Messungen.

#### 2.2.2.3 Der Standard *E. coli*

Zur Kalibrierung des MALDI-TOF Massenspektrometer wird auf jedes Target auf den Feldern „G3“ und „G4“ ein Teil einer *E. coli*-ATCC Kolonie aufgetragen und, wie auch auf den anderen Feldern, mit Matrix überdeckt. Am Anfang jeder Messreihe (jedes Targets) wird das Feld „G3“ ausgelesen. Der Massenspektrometer nimmt eine Kalibrierung vor und liest es erneut aus. Am Ende der Messreihe wird diese mit der Messung des Feldes „G4“ kontrolliert. Analog zu dem Routinestandard der mikrobiologischen Routinediagnostik am Universitätsklinikum Tübingen, wurden auch im Rahmen dieser Arbeit Messungen zur Auswertung zugelassen, bei denen der Standard *E. coli* in der SARAMIS-Auswertungssoftware bei >80% Übereinstimmung mit dem Superspektrum lag. Außerdem darf sich der Wert der ersten Messung vom Feld „G3“ nicht stark von der zweiten Messung unterscheiden. Der zur Verfügung gestellte Standard *E. coli* des Instituts wird täglich überimpft und bei Raumtemperatur inkubiert.

### **2.2.3 Anzahl der durchgeführten Messreihen**

Die Versuchsdurchführung gliedert sich in Vor- und Hauptmessungen. Die Ergebnisse der Vormessungen dienen der Qualitätssteigerung der Hauptmessung. Zur Auswertung der Arbeit wurden die Ergebnisse (unter 3. aufgeführt) der Hauptmessungen verwendet.

#### **2.2.3.1 Vormessungen**

Es wurden Vormessungen durchgeführt, um eine Routine zu erarbeiten und eine möglichst genaue Hauptmessung zu garantieren. Insbesondere wurde die Reproduzierbarkeit der Messungen überprüft. Die Inkubationsdauer wurde zunächst variiert: Eine Inkubationsdauer von >24 Stunden (z.B. 3 oder 5 Tage) resultierte in einer niedrigeren Quote im Vergleich zur SARAMIS Datenbank. Des Weiteren wurde die Materialmenge, die auf das Target aufgebracht wird, variiert. Hier zeigte sich kein Unterschied im Vergleich von wenig (1 Kolonie) und viel (3 Kolonien) Material. So dass als Standard für die Hauptmessung eine Inkubationszeit von 24 Stunden und 1 Kolonie als Materialmenge festgelegt wurde.

Es wurden zudem Messreihen mit den Bakterienextrakten durchgeführt. Allerdings zeigte sich, dass hier deutlich weniger und untereinander ähnlichere Peaks zustande kamen. Da zum Vergleich und zum Herausarbeiten von Unterschieden jedoch mehr und verschiedene Peaks hilfreicher erschienen, wurde auf die Fortführung dieser Versuchsreihe verzichtet. Zudem wird bei der Extraktionsmethode ein zusätzlicher Arbeitsschritt benötigt. Auf diesen wird zugunsten der Schnelligkeit dieser Diagnostikmethode verzichtet (siehe 1.3.3).

#### **2.2.3.2 Hauptmessungen**

Es wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen die Stämme jeweils neu auf eine Agarplatte beimpft und nach 24 Stunden eine Messung im Massenspektrometer durchgeführt. So entstehen 3 biologische Replikate pro Stamm. Die Messpunkte wurden je achtmal mit einem Isolat (technische Replikate) beimpft um eine

bessere Reproduzierbarkeit zu generieren. Theoretisch resultiert dies in  $3 \times 8 \times 80 = 1920$  Massenspektren. Es wurden nur 1895 Spektren generiert, die übrigen 25 Spektren erfüllten nicht den Routinestandard der Diagnostik und wurden als fehlerhaft gewertet.

#### **2.2.4 Auswertung mit der SARAMIS Software**

Die SARAMIS Software wird im diagnostischen Alltag der medizinischen Mikrobiologie zur Identifizierung der Bakterienproben verwendet. Sie vergleicht die gemessenen Peaks mit den Einträgen einer hinterlegten Datenbank und gibt einen Prozentwert der Übereinstimmung zu einer Bakterienspezies an. Da diese Arbeit allerdings nicht unterschiedliche Spezies untersucht, sondern versucht Unterschiede innerhalb einer Spezies zu detektieren, wurde die Auswertung mit der BIONUMERICS Software fortgeführt.

Zur Qualitätskontrolle der Messung wurde der Standard der medizinischen Diagnostik der Mikrobiologie Tübingen angewendet (Verfahrensanweisung des Instituts für Mikrobiologie und Virologie). Dabei soll darauf geachtet werden, dass der Standard *E. coli* in der SARAMIS Software zu mindestens 80% mit der Datenbank übereinstimmt. Zudem sollten nicht mehr als 300 Peaks detektiert werden. Wurde der Wert des *E. coli*-Standards nicht erreicht, wurden neue Felder des Standards gemessen, bis die gewünschte Qualität der Messung gegeben war.

#### **2.2.5 Bereinigung der Daten von Ausreißern**

Zur Verbesserung der Datenqualität erfolgte eine Entfernung der Ausreißer. Dazu wurde aus den 24 Messungen (8 technische Replikat von 3 biologischen Replikaten) pro Stamm mittels Pearson-Korrelation ein Dendrogramm mit Ähnlichkeitsmatrix erstellt. Die Spektren mit >80% Ähnlichkeit wurden zur weiteren Auswertung behalten. Die restlichen Spektren wurden aus den Berechnungen ausgespart. So entsteht eine Datenbank aus 1641 Spektren.

Abb. 4 zeigt als Beispiel den Stamm BS1: Auf der linken Seite wird das Dendrogramm mit den Prozentzahlen an Knotenpunkten angezeigt. In der Mitte ist die Bezeichnung der entsprechenden Replikatspektren aufgeführt. Auf der rechten Bildseite wird die Ähnlichkeitsmatrix in Farbschattierungen dargestellt. Aus diesem Beispiel werden die oberen 18 Spektren weiterverwendet.

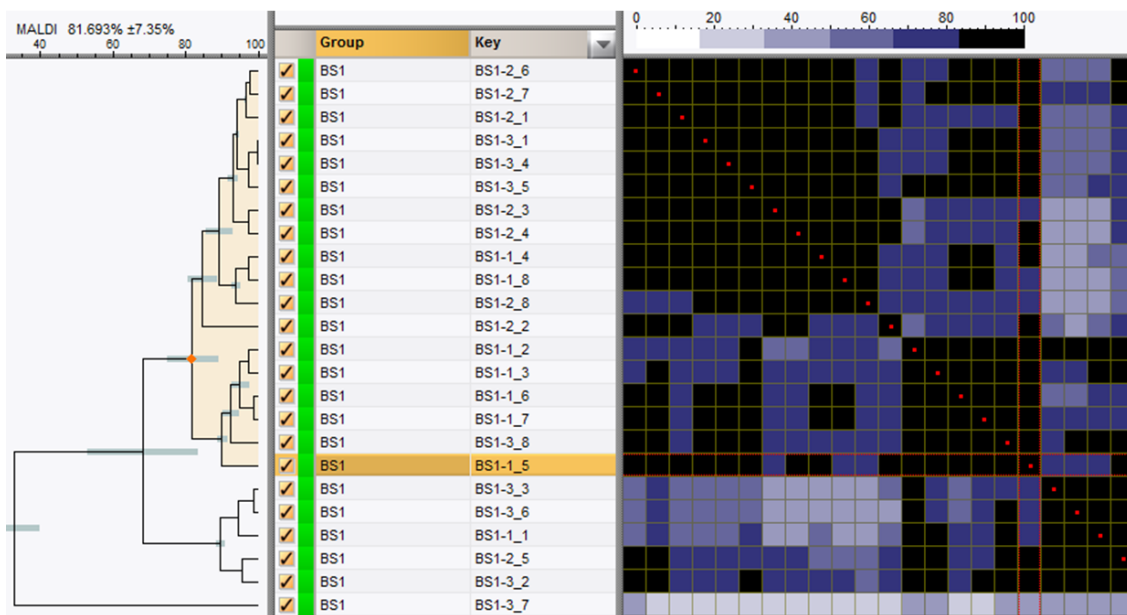


Abbildung 4: Verbesserung der Datenqualität mit Dendrogramm nach Pearson-Korrelation am Beispiel des Stamms BS1

Wie viele Spektren pro Stamm in die weiteren Berechnungen eingehen, ist aus Spalte 2 der Tabelle 6 zu entnehmen.

## 2.2.6 Erstellung der Datenbank (BIONUMERICS Software)

Zunächst wurde eine Datenbank der 1641 Messungen erstellt. Diese Datenbank wurde in 3 Ebenen aufgeteilt: Die 80 untersuchten Stämme (Stammebene), die an verschiedenen Tagen entstandenen Isolate/biologischen Replikate (Isolatebene) und die jeweils 8 durchgeführten technischen Replikate (Replikatebene).

Zu jedem Stamm wurde zudem die mec-Klasse und der *spa*-Typ aufgeführt.

## 2.2.7 Vorverarbeitung der Rohdaten

Zur Aufbereitung und Weiterverarbeitung der Rohdaten (Textdateien mit den Koordinaten des Spektrums pro Messung) wurde die Vorverarbeitung mit den Default-Einstellungen von BIONUMERICS als Best-Practice Methode (analog auch zu Zhang *et al.*, 2015) verwendet. Hierfür wurden die einzelnen Textdateien zunächst in die Datenbank in der Ebene der technischen Replikat geladen. Es erfolgte daraufhin ein Abzug der Referenz (*baseline subtraction*) mittels der *Rolling disc* mit 50 Punkten. Als nächstes erfolgte die Berechnung des „Rauschens“ (*Noise Computation*) mittels *Continuous Wavelet Transformation (CWT)*, ein „Glätten“ (*smoothing*) mittels *Kaiser Window* mit einer Fenstergröße von 20 Punkten und beta von 10 Punkten. Es erfolgte im Anschluss ein weiterer Abzug der Basislinie (*second baseline subtraction*) mit der *Rolling disc* mit 200 Punkten.

Als letzter Schritt der Datenvorbereitung erfolgt die Peak-Erkennung mittels CWT mit einem Minimum Signal/Rauschen-Verhältnis (S/R) von 10.

## 2.2.8 Berechnung von Kompositspektren

Aus den Spektren der technischen Replikat wurde mittels der BIONUMERICS Software ein *Summary Spectrum*, im folgenden Kompositspektrum genannt, für die jeweiligen Isolate erstellt. Dies wird in der Datenbank auf der Ebene der Isolate gespeichert. Des Weiteren wird je ein Kompositspektrum der 80 Stämme berechnet und auf der Stammebene gespeichert.

Die einzelnen Spektren können bei Bedarf eingesehen werden. Exemplarisch zeigt Abb. 5 das Kompositspektrum des Stamms MRSA636.

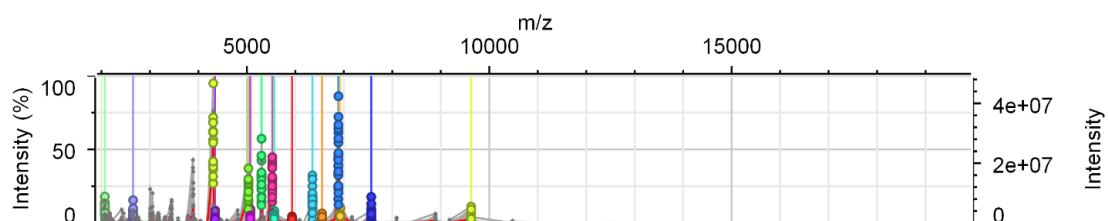
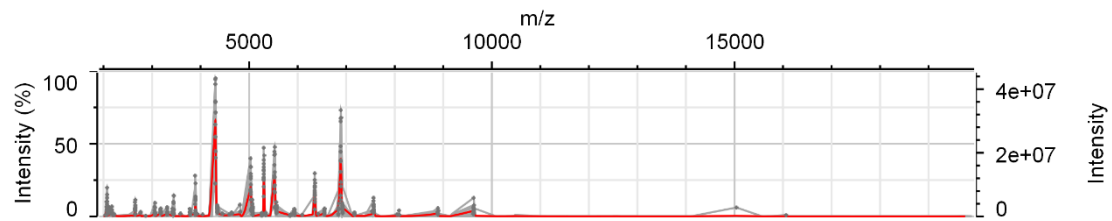


Abbildung 5: Exemplarisch: Kompositspektrum MRSA 636 auf Stammebene

Bei der Erstellung der Kompositspektren mit BIONUMERICS konnte für den Stamm VA13494 kein Kompositspektrum erstellt werden. Die zur Berechnung zugrunde liegenden 17 Komponentenspektren konnten nicht auf Stammebene zusammengestellt werden, da keine Peaktabelle berechnet werden konnte.



*Abbildung 6: Kompositspektrum für VA13494*

Bei Auswertungen, die auf Ebene der Kompositspektren erfolgten, wurde dieses fehlerhafte Spektrum daher nicht weiter mit einbezogen.



### **3. Ergebnisse**

Die 1895 gemessenen Spektren wurden mittels Homogenitätstest um Ausreißer bereinigt (siehe 2.2.5) und im Folgenden eine Auswertung der verbliebenen 1641 Spektren durchgeführt. Es erfolgten Clusteranalysen, Visualisierung mittels t-SNE und das Erstellen einer Peakliste zur Ermittlung von Biomarkern.

#### **3.1 Clusteranalyse als Dendrogramm mit BIONUMERICS**

Zunächst wurde eine Clusteranalyse aller Komponentenspektren erstellt. Ziel dieser Analyse ist die Bewertung, ob Unterschiede zwischen den Isolaten größer sind als die Unterschiede innerhalb eines Isolates. So müssten in dieser Analyse alle Replikate eines Isolates zusammen clustern um eine Auswertung zwischen den Isolaten zu erlauben. Sollten die Replikatspektren bereits eine breite Streuung in diesem Cluster aufweisen, ist anzunehmen, dass Unterschiede zwischen den Isolaten nicht deutlich über dem statistischen Rauschen liegen.

##### **3.1.1 Dendrogramm auf Replikatebene**

Mit Hilfe der Software BIONUMERICS wurde ein Dendrogramm aller Spektren, die zur Auswertung in die Datenbank geladen wurden, erstellt. Dies beinhaltet ein Clustering nach Ähnlichkeit aller 1641 Replikatspektren. Zudem wird eine Ähnlichkeitsmatrix aller Spektren zu den jeweils anderen erstellt. Die Bezeichnung ist „Stamm-biologisches Replikat [1-3]\_technisches Replikat [1-8]“.

Es folgt eine Beschreibung sowie ein beispielhafter Auszug der Ähnlichkeitsmatrix. Der Auszug (Tabelle 7) beschreibt die obersten 20 Einträge, die Matrix ist insgesamt analog zur Matrix aus Abb. 8 (Dendrogramm auf Ebene der Kompositspektren) aufgebaut.

Tabelle 7: Auszug aus der Ähnlichkeitsmatrix der Komponentenspektren in %

Isolat	NRS387-1_1	NRS387-1_7	mg24sa-2_5	mg24sa-2_2	GN671-2_8	NRS387-1_6	mg72c-1_5	VA13494-2_5	mg72c-1_4	mg72c-1_6	VA2434-2_5	VA10043-2_7	mg72c-1_7	VA2434-2_1	mg32b-1_3	mg53a-1_1	mg32b-1_2	mg32b-1_1	mg32b-1_4	mg24sa-1_2	
NRS387-1_1	100																				
NRS387-1_7	96,3	100																			
mg24sa-2_5	90,6	94,1	100																		
mg24sa-2_2	89,6	92,2	90,5	100																	
GN671-2_8	91,9	90,7	77,4	87,1	100																
NRS387-1_6	90,9	93,0	82,3	92,3	94,1	100															
mg72c-1_5	93,2	88,4	85,9	85,0	84,7	83,2	100														
VA13494-2_5	93,3	90,1	88,5	85,4	85,0	83,1	97,3	100													
mg72c-1_4	93,0	86,9	84,9	84,0	83,9	80,4	96,9	96,6	100												
mg72c-1_6	93,1	87,5	87,2	85,4	82,6	81,5	97,1	97,2	98,0	100											
VA2434-2_5	90,4	91,0	90,4	85,5	84,2	81,5	94,8	95,4	92,9	92,9	100										
VA10043-2_7	94,0	93,1	90,0	84,9	86,6	84,4	96,7	97,3	94,6	94,1	97,7	100									
mg72c-1_7	88,1	85,1	86,5	85,8	77,0	75,6	93,9	91,6	94,6	94,5	92,7	91,4	100								
VA2434-2_1	86,4	87,1	88,6	85,2	76,1	77,3	93,8	93,2	92,1	92,7	95,1	93,2	96,1	100							
mg32b-1_3	92,5	89,4	83,8	80,9	84,4	80,1	94,1	92,4	90,6	89,8	91,0	93,4	88,9	88,7	100						
mg53a-1_1	94,1	92,1	89,3	84,7	84,4	81,3	94,5	92,9	91,7	91,9	94,6	95,3	92,9	92,9	97,8	100					
mg32b-1_2	92,2	88,8	87,9	84,4	82,7	79,9	95,9	94,3	94,0	94,6	94,4	94,3	94,3	92,9	96,4	97,6	100				
mg32b-1_1	92,9	88,3	81,1	78,0	86,5	80,7	92,9	92,8	91,6	91,2	89,5	93,6	85,3	85,1	96,4	94,8	94,0	100			
mg32b-1_4	90,5	89,1	83,7	79,9	86,6	80,6	90,0	89,2	85,4	84,1	91,4	92,2	81,9	84,0	95,8	94,6	92,1	92,8	100		
mg24sa-1_2	85,9	86,6	82,8	91,1	83,7	87,8	87,9	84,4	84,1	86,5	86,6	84,2	89,1	88,8	82,4	87,2	88,2	80,3	78,4	100	

Auffällig ist zunächst, dass Replikate nicht vollständig als Cluster erkannt werden. Wie auch im folgenden exemplarischen Auszug zu sehen, sind z.B. mg72c-1\_5, mg72c-1\_4, mg72c-1\_6 und mg72-1\_7 nah geclustert. Insgesamt sind sie jedoch ähnlicher zu Isolaten anderer Stämme als zu eigenen biologischen Replikaten.

Beispielhaft ist mg24sa-2\_2 zu 90,5% ähnlich dem Spektrum von mg24sa-2\_5, aber 92,2% ähnlich zu NRS387-1\_7 (vergleiche oberste Zeilen der Tabelle 7).

Auf Basis dieser Ähnlichkeitsmatrix wurde die durchschnittliche Ähnlichkeit der technischen Replikate auf Ebene der biologischen Replikate berechnet.

Diese beträgt 81,37% mit einer Standardabweichung von 8,40.

In nächsten Schritt wurde die durchschnittliche Ähnlichkeit der biologischen Replikate auf Stammebene berechnet: Diese beträgt 64,16% bei einer Standardabweichung von 13,36.

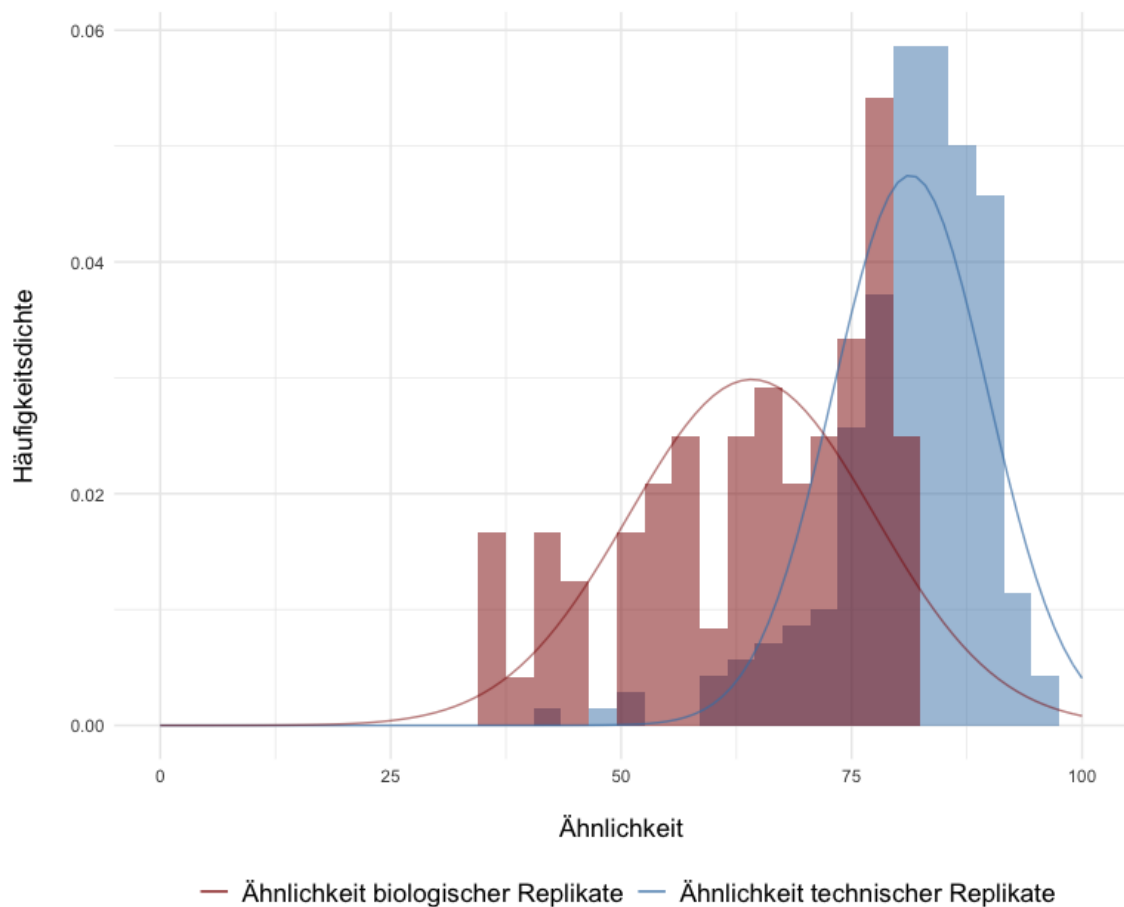


Abbildung 7: Verteilung der Ähnlichkeiten der technischen und biologischen Replikate

Abb. 7 stellt diese durchschnittlichen Ähnlichkeiten grafisch in Form von roten (biol. Replikate) und blauen (techn. Replikate) Balken dar. Zur besseren Darstellung der Standardabweichung und als Referenz wurde eine Normalverteilung angenommen und als Funktion über die Balken gelegt.

Die beiden Verteilungen liegen nah beieinander und haben vor allem auch eine große Überschneidung. In diesem Bereich liegen rote und blaue Balken übereinander. Im Bereich der Überschneidung können biologische Replikate sich ähnlicher sein als technische. Diese Erkenntnis schränkt die Aussagekraft der Spektren deutlich ein.

Die Auswertung der Ähnlichkeitsmatrix zeigt, dass Replikate innerhalb eines Stamms bereits eine breite Streuung aufweisen. Eine Auswertung der Unterschiede zwischen Isolaten auf Stammebene sind daher nur eingeschränkt zu bewerten. Insbesondere muss hier auf eine gute Sensitivität und Spezifität geachtet werden, um tatsächliche Unterschiede von statistischem Rauschen abzugrenzen.

### **3.1.2 Dendrogramm auf Stammebene**

Es wurde ein weiteres Dendrogramm auf Ebene der Kompositspektren erstellt, das im linken Bereich von Abb. 8 dargestellt wird. Im mittleren Bereich sind die einzelnen Äste benannt, farblich dargestellt sind die unterschiedlichen *spa*-Typen. Auf der rechten Seite ist die berechnete Ähnlichkeitsmatrix nach Farbschattierung. Eine größere Version dieser Abbildung ist im Anhang (Abb. 18).

Das Dendrogramm zeigt hier am unteren Rand das fehlerhafte Spektrum von VA13494. Dieses weist auch in der Ähnlichkeitsmatrix die größten Unterschiede zu den anderen Spektren auf.

Der gelbmarkierte *spa*-Typ t002 lässt sich mittels Clustergruppierung nicht vom blau markierten t003 differenzieren. Auch die verschiedenen *mec*-Klassen (Spalte rechts neben *spa*-Typ) bilden keine Clustergruppe.

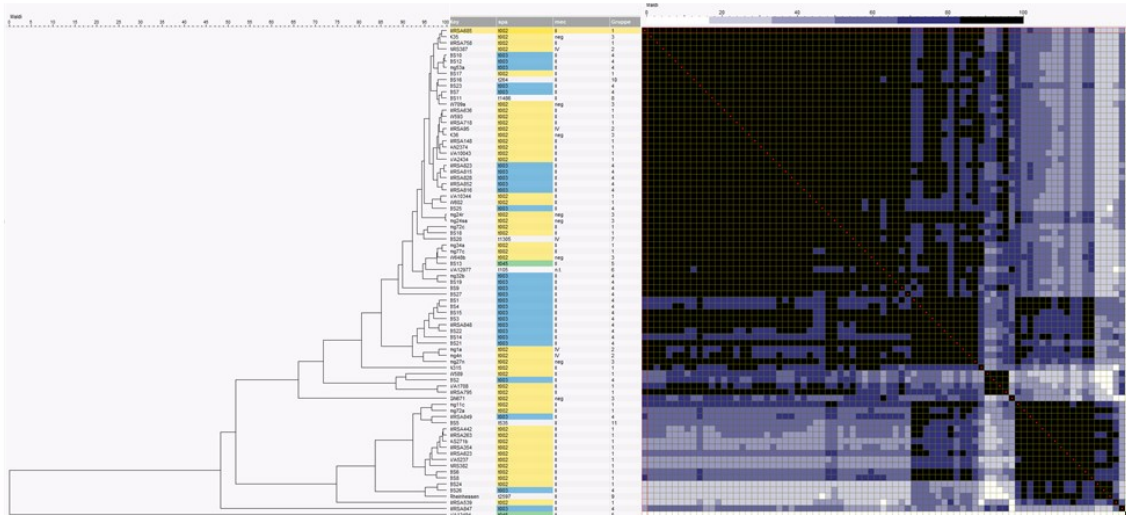


Abbildung 8: Dendrogramm und Ähnlichkeitsmatrix nach BIONUMERICS auf Ebene der Kompositspektren

### 3.2 Visualisierung der Kompositspektren und Komponentenspektren

Im Rahmen der Auswertung erfolgt eine Visualisierung mittels t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE). Ziel dieser Visualisierung ist die Darstellung möglicher Diskrimination zwischen Gruppen der einzelnen Bakterienstämme.

Der t-SNE Algorithmus bildet dabei Ähnlichkeiten von Nachbarn aus einem hochdimensionalen Raum auf einem kleineren Raum (hier 2D) ab, ähnlich auch einer Principle Component Analyse (PCA).

Im Vergleich zur PCA ist die Visualisierung jedoch offensichtlicher, da ähnliche Daten zusammen gruppiert und unähnliche voneinander entfernt werden.

Diese Visualisierung wurde als Analysesemethode für MALDI-TOF Spektren bereits mehrfach publiziert (Abdelmoula *et al.*, 2018; Rossel and Martínez Arbizu, 2018).

Die Spektren wurden hierfür nach Gruppen, *spa*-Typ und *mec*-Klasse separat mittels t-SNE Algorithmus visualisiert und im Folgenden dargestellt.

### 3.2.1 Sortierung nach Gruppen

Es wurde zunächst eine Visualisierung aller Spektren (im folgenden Komponentenspektren), eingefärbt nach Zugehörigkeit zu den oben definierten Gruppen (Tabelle 6), erstellt.

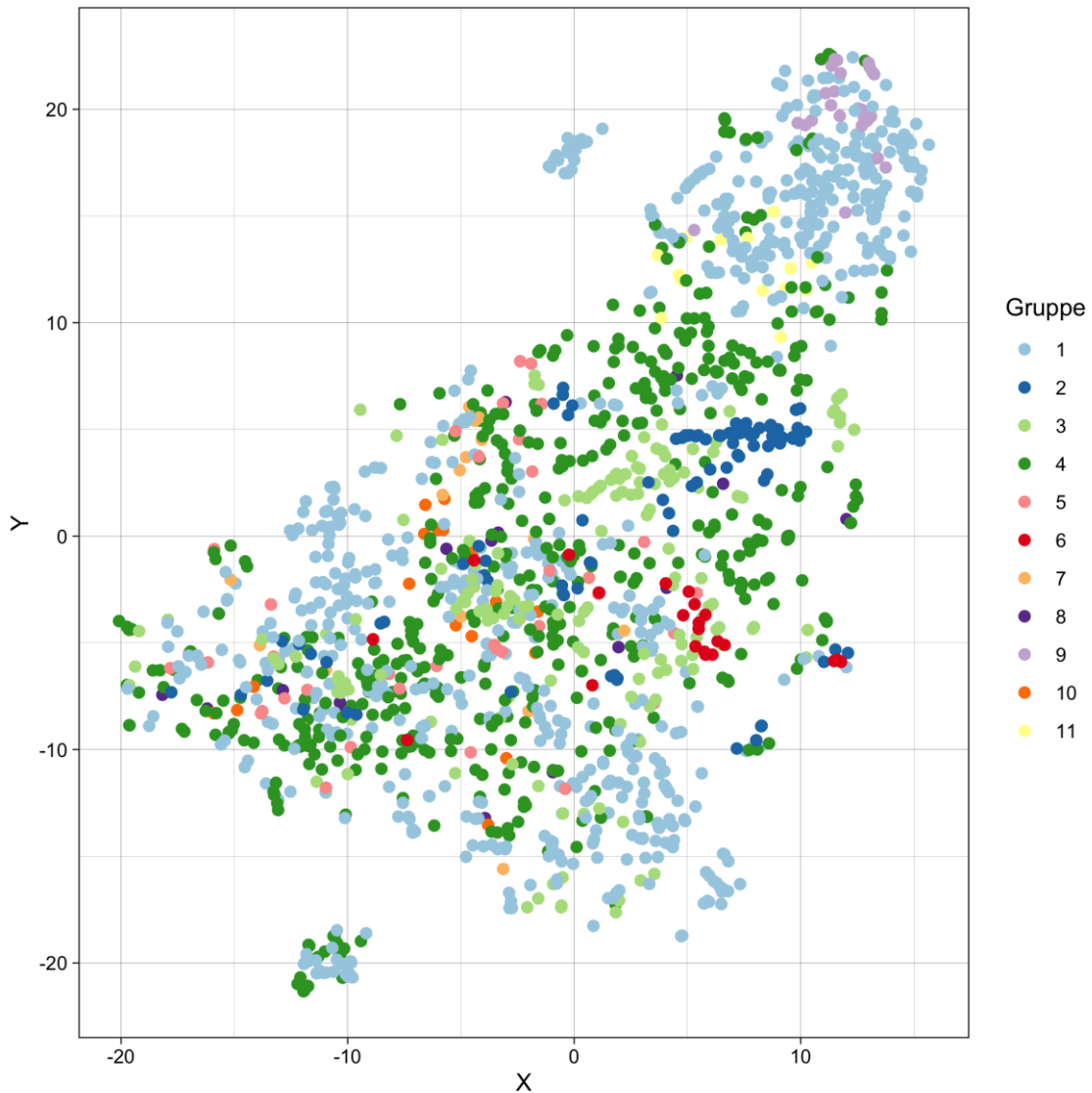


Abbildung 9: Visualisierung nach t-SNE, Komponentenspektren nach Gruppen

Außerdem wurde nach t-SNE eine Visualisierung mit allen Kompositspektren auf der Stammebene erstellt.

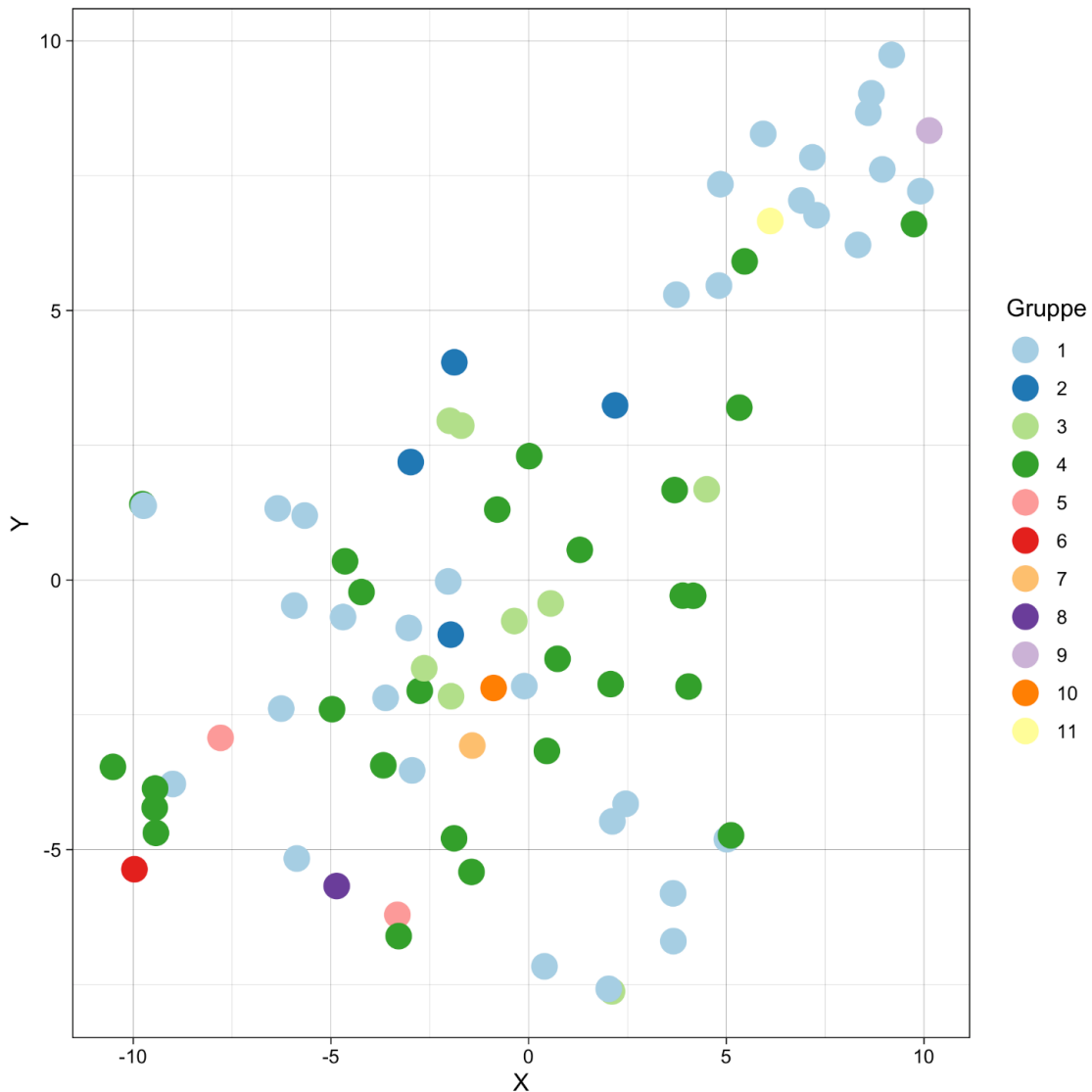


Abbildung 10: Visualisierung nach t-SNE, Kompositspektren nach Gruppen

Es konnte weder nach optischer Analyse der Komponentenspektren (Abb. 9) noch nach Betrachtung der Kompositspektren (Abb. 10) eine definierte Gruppe („Wolken“ gleicher Farbe) abgegrenzt werden. Es zeigt sich vielmehr eine sehr heterogene Verteilung. Mittels t-SNE, analog auch zur Clusteranalyse, können keine Ähnlichkeiten festgestellt bzw. einzelne Gruppen voneinander abgegrenzt werden.

Gruppe 9 und 11 clustern eher oben rechts, Gruppe 8 und 6 eher unten links, wobei diese Gruppen auch nur einzelne Stämme beinhalten.

### 3.2.2 Sortierung nach *spa*-Typ

Die Stämme weisen unterschiedliche vorbekannte *spa*-Typen auf:

Aus Tabelle 6 wird ersichtlich, dass im Versuchskollektiv hauptsächlich t002 und t003 vertreten sind. Andere *spa*-Typen treten nur einzeln auf.

Es wurde je eine t-SNE basierte Visualisierung der Komponentenspektren (Abb. 11) sowie der Kompositspektren (Abb. 12) nach Unterscheidung in die jeweiligen *spa*-Typen erstellt.

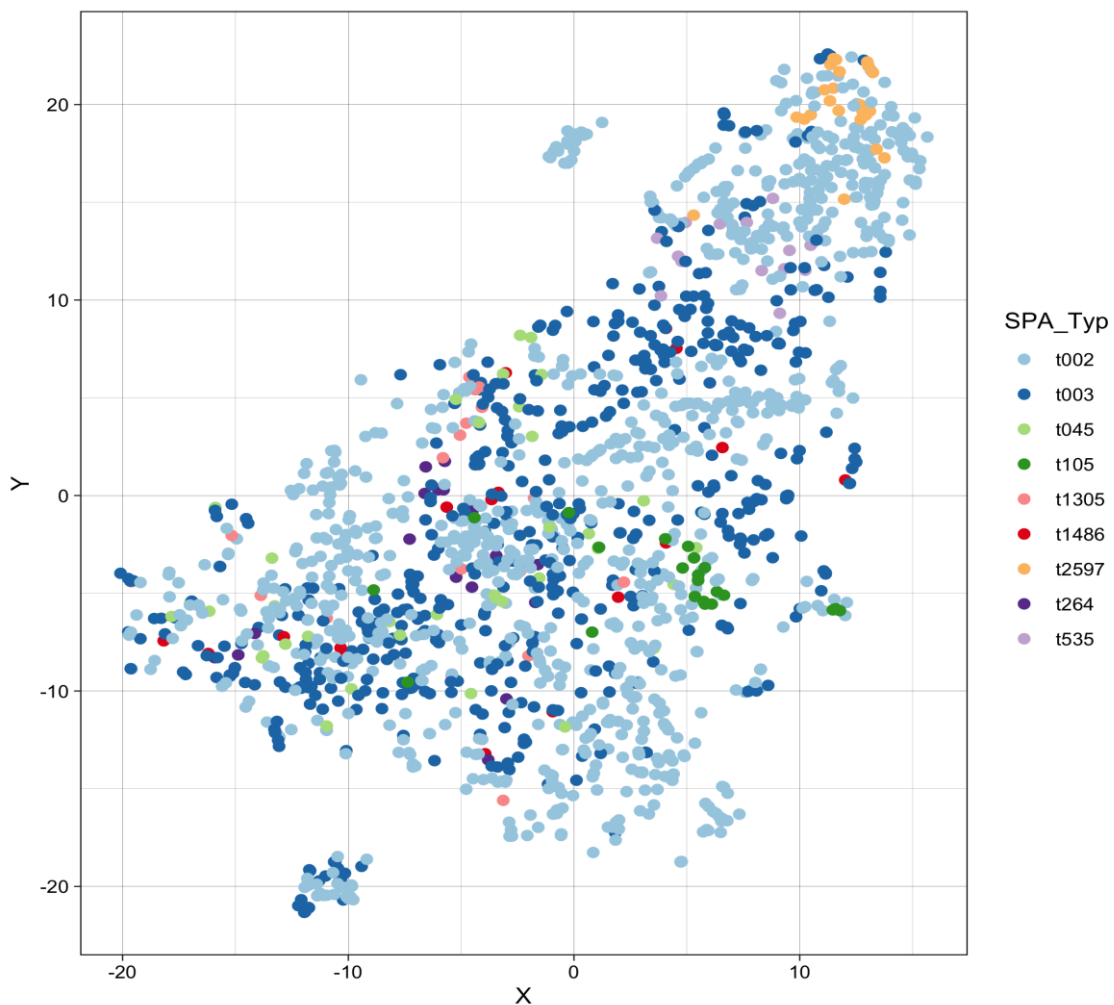


Abbildung 11: Visualisierung nach t-SNE, Komponentenspektren nach *spa*-Typ



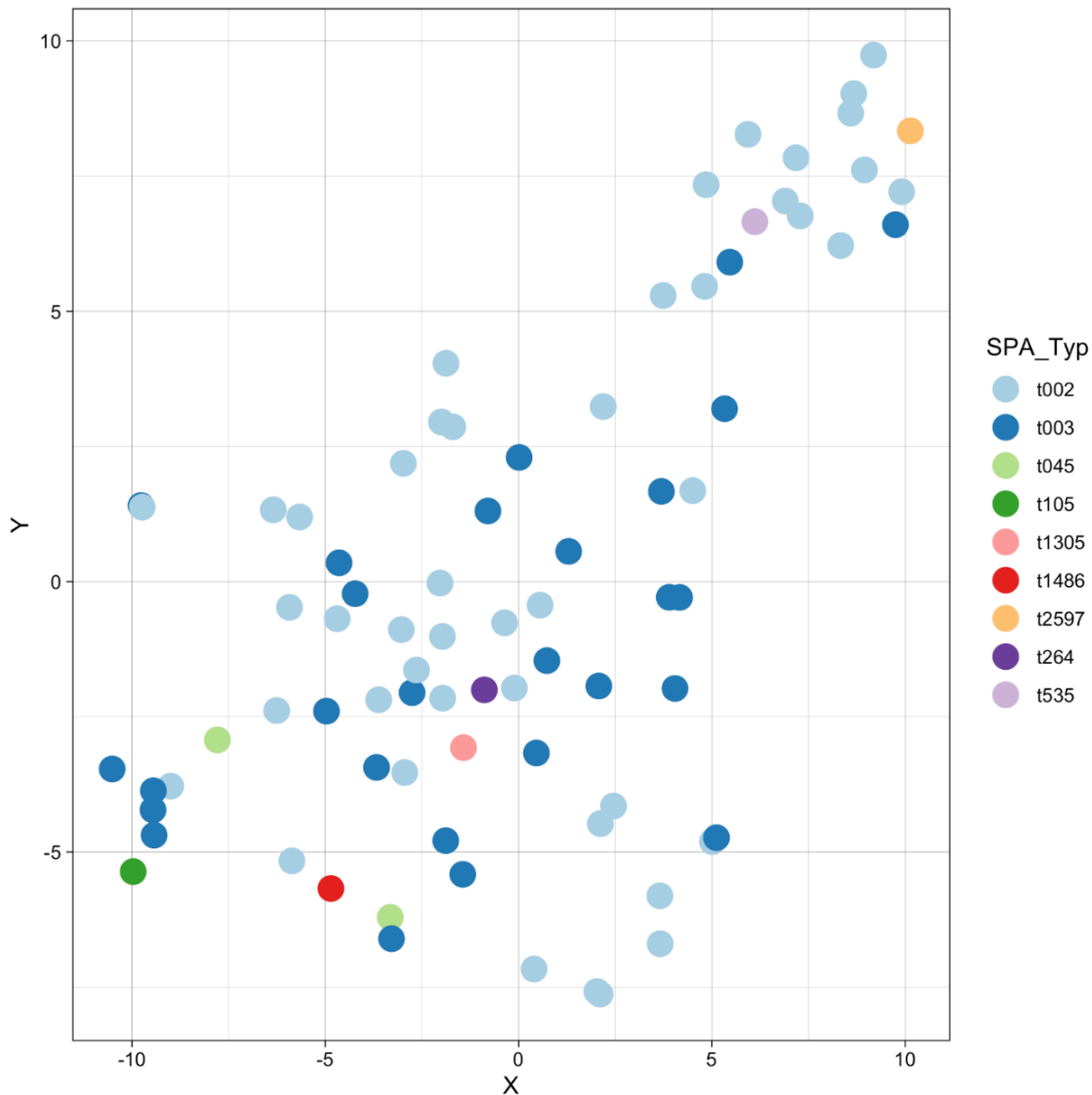


Abbildung 12: Visualisierung nach t-SNE, Kompositspektren nach spa-Typ

In diesen Darstellungen (Abb. 11 und 12) kann man erkennen, dass die spa-Typen t2597 und auch t535 eher rechts oben clustern, t105 und t1486 eher links unten, wobei einige auch nur einzeln vertreten sind. Bei den oft vertretenen t002 und t003 lässt sich kein spa-Typ als definierte Wolke abgrenzen. Analog zur Visualisierung der Gruppen zeigt sich auch hier eine heterogene Wolke.

Der spa-Typ t002 steht für die Linie ST5 (siehe Tabelle 2), t003 ist der spa-Typ der Linie ST225. Somit kann diese Visualisierung so interpretiert werden, dass Isolate der Linien ST5 und ST225 mittels Massenspektrometrie so ähnlich diagnostiziert werden, dass sie mittels Clustering nicht unterschieden werden können.

### 3.2.3 Sortierung nach SCCmec-Typ

Die Stämme weisen unterschiedliche vorbekannte SCCmec-Typen (siehe Tabelle 6) auf. Insbesondere kann hier eine Unterteilung in MRSA (SCCmec II und IV) und MSSA (mec negativ) getroffen werden.

Es wurde je ein t-SNE Plot zur Visualisierung der Komponentenspektren (Abb. 13) sowie der Kompositspektren (Abb. 14) nach Unterscheidung in die jeweiligen SCCmec-Klassen erstellt, wobei insbesondere auf die Unterscheidung MSSA (SCCmec negativ) und MRSA (alle anderen) geachtet wurde.

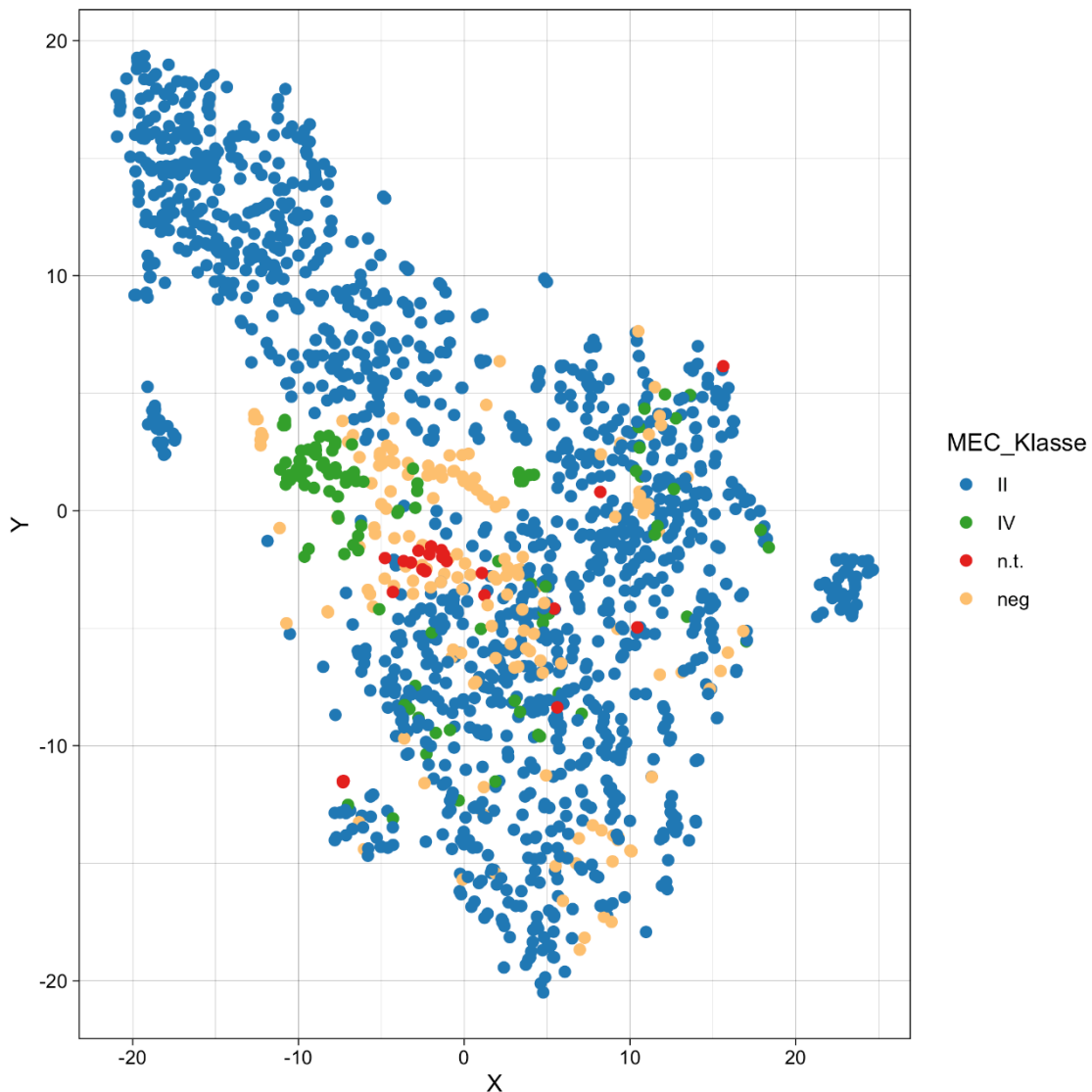


Abbildung 13: Visualisierung nach t-SNE, Komponentenspektren nach mec-Klasse

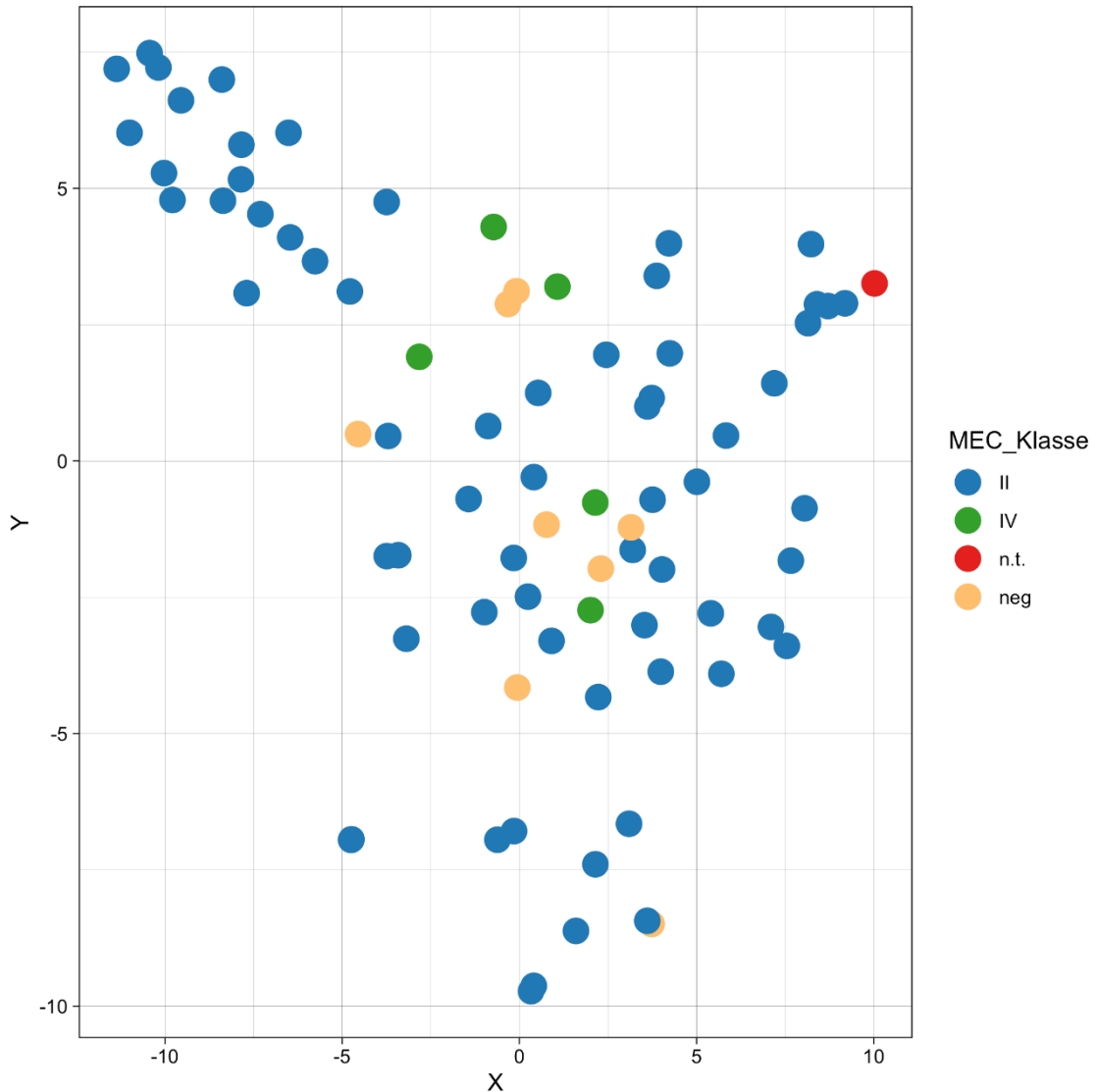


Abbildung 14: Visualisierung nach t-SNE, Kompositspektren nach mec-Klasse

Auch in dieser Darstellung (Komponenten- und Kompositspektren nach t-SNE; Abb. 13 und 14) lässt sich objektiv keine mec-Klasse abgrenzen. Es lässt sich insbesondere nach diesen Daten auch kein Cluster der MSSA (gelbe Punkte) abgrenzen. Diese sind über die gesamte Punktwolke verteilt.

Ziel der Visualisierung der Spektren war das mögliche Abgrenzen von ähnlichen Stämmen (nach Gruppe/*spa*/mec). Diese Abgrenzung ist wie oben dargelegt nur begrenzt möglich. Eine Visualisierung aufgrund MALDI-TOF Spektren konnte daher die Unterscheidung der Isolate nicht suffizient darstellen.

### 3.3 Peak Matching

Um die Spektren weiter untereinander vergleichen zu können und mögliche Biomarker zu identifizieren, wurde ein Peak-Matching durchgeführt. Hierfür wurden die BIONUMERICS Default-Einstellungen verwendet (konstante Toleranz 5, lineare Toleranz 300). So werden Peaks, die in den Messungen +/- 5 m/z unterschiedlich detektiert wurden, zusammengefasst und ein Mittelwert erstellt. Da diese mit einer Messtoleranz sehr wahrscheinlich die gleichen Proteine detektieren.

Es wurde daraufhin eine Peaktabelle (Tabelle 12) erstellt, die abbildet, ob ein Peak im Summenspektrum der 79 Stämme vorkommt (markiert durch „1“) oder nicht („0“). Diese ist im Anhang dargestellt.

In der BIONUMERICS Software gibt es fortführend die Möglichkeit eine Liste möglicher diskriminativer Peaks zu erstellen. Diese wurden in der zugrundeliegenden Spektrendatenbank ermittelt. Es wurde eine Detektionsrate von 10% gewählt. Die Tabelle (Tabelle 8) wird im Folgenden aufgeführt. In der Peaktabelle im Anhang (Tabelle 12) wurden die folgenden Peaks ebenfalls markiert.

*Tabelle 8: Mögliche diskriminative Peaks mit dem Peak-Klassen-Manager von Bionumerics erstellt, jeweils +/-5*

m/z 2070	m/z 4345	m/z 6354
m/z 2109	m/z 5033	m/z 6553
m/z 2652	m/z 5071	m/z 6890
m/z 3178	m/z 5304	m/z 6927
m/z 3445	m/z 5526	m/z 7568
m/z 4307	m/z 5564	

Diese Peaks werden daraufhin weiter untersucht, ob sie sich als Biomarker für das Vorliegen eines *spa*-Typs/einer *mec*-Klasse eignen.

### 3.4 Matrix Mining

Die BIONUMERICS Software ermöglicht zur weiteren Analyse diverse 2-Wege Clustering. Hier wird die Intensität der Peaks mit den Peak-Klassen abgestimmt und in Form einer Heatmap repräsentiert. So können spezifische Peaks als potentielle Biomarker dargestellt werden.

#### 3.4.1 Matrix Mining nach Gruppen

Es wurde unter Verwendung der BIONUMERICS Matrixmining-Default-Einstellung als Best-Practice-Modell eine hierarchische Clusteranalyse mit dem Mann-Whitney-Test nach UPGMA durchgeführt. Hier wurde zunächst jede vordefinierte Gruppe (siehe Tabelle 6) im Vergleich zu den restlichen Gruppen betrachtet. Es wurden Peaks aus der oben bestimmten Liste (Tabelle 8) mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  identifiziert, die in der jeweiligen Gruppe vorkommen und deshalb zur möglichen Diskrimination herangezogen werden können.

Im Folgenden werden die Ergebnisse fortlaufend nach Gruppen sortiert mit einer exemplarischen Darstellung der Heatmap aufgelistet.

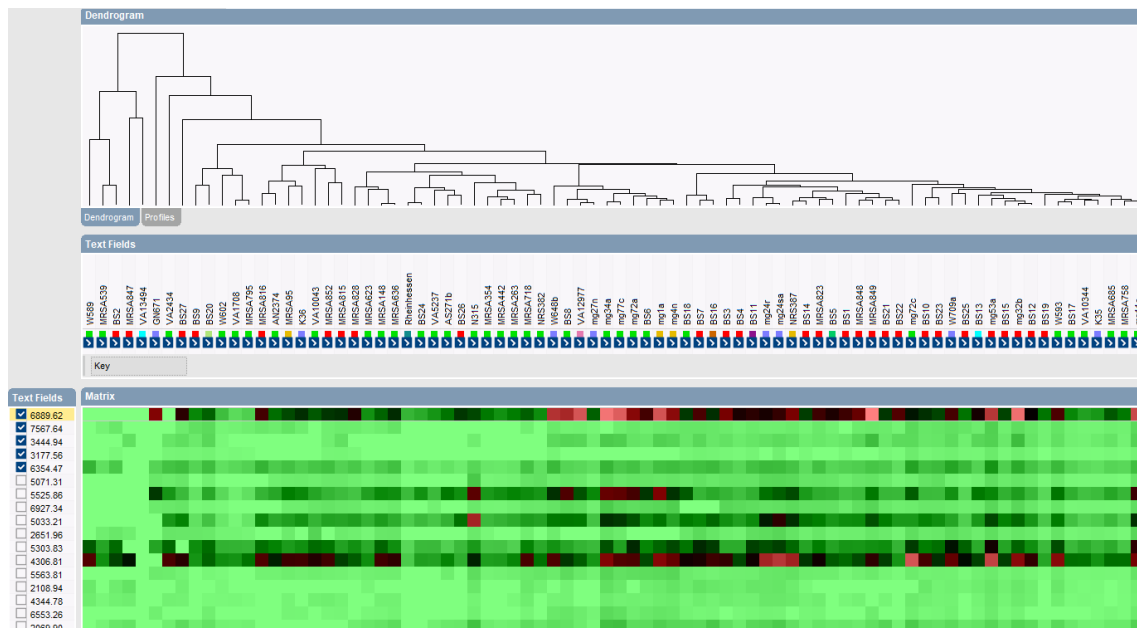


Abbildung 15: Exemplarisch: Matrixmining Gruppe 1 gegen alle anderen Gruppen

Unter Verwendung der BIONUMERICS Default-Einstellung zeigen sich bei Gruppe 1 (siehe Abb. 15) fünf Peaks mit  $p < 0,05$ : **6890, 7568, 3445, 3178, 6354**.

Bei Gruppe 2 zeigen sich ebenfalls fünf Peaks mit  $p < 0,05$ : **5564, 5526, 4307, 4345, 6927**. Gruppe 3 zeigt zwei Peaks mit  $p < 0,05$ : **6553, 5526**.

Bei Gruppe 4 sind vier Peaks mit  $p < 0,05$ : **5526, 3178, 7568, 5564**.

Unter Verwendung der BIONUMERICS Default-Einstellung zeigt sich bei den Gruppe 5-11 kein signifikanter Peak.

Somit konnten bei den Gruppen 1 und 2 je fünf, Gruppe 3 zwei und Gruppe 4 vier Peaks gefunden werden.

### 3.4.2 Matrix Mining nach spa-Typen

Im nächsten Schritt wurde jeder im Versuchskollektiv vorkommende spa-Typ mit den restlichen verglichen und überprüft, ob in diesen Klassen ein Peak aus der oben bestimmten Liste (Tabelle 8) signifikant ( $p < 0,05$ ) vorhanden ist.

Im Folgenden werden die Ergebnisse fortlaufend nach spa-Typ sortiert mit einer exemplarischen Darstellung der Heatmap aufgelistet.

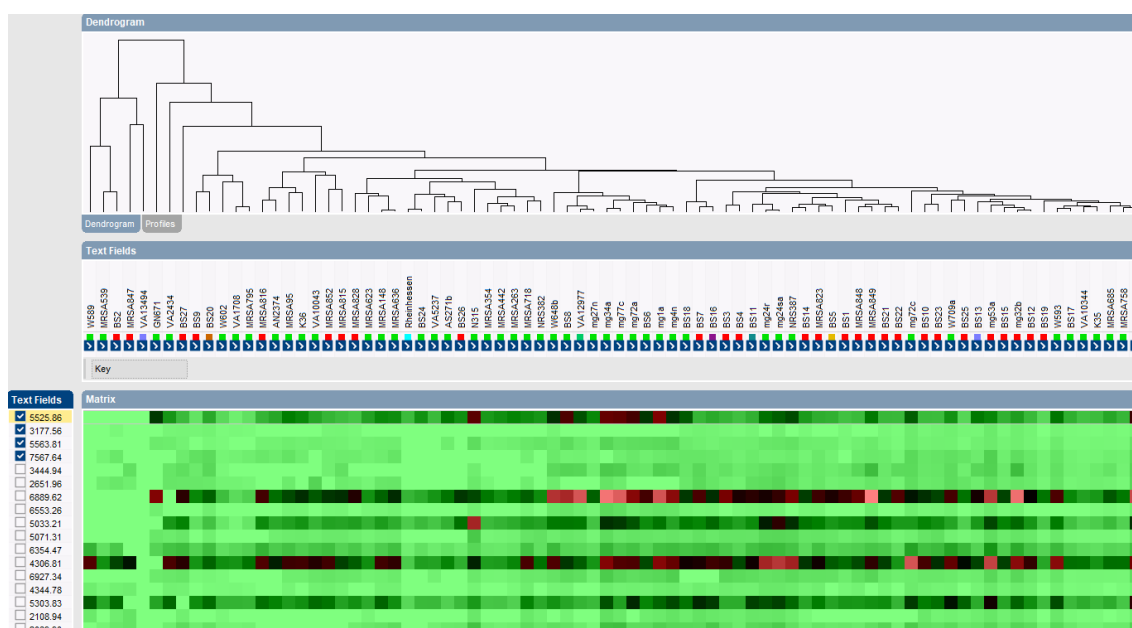


Abbildung 16: Exemplarisch: Matrixmining t002 gegen restliche spa-Typen

Unter Verwendung der BIONUMERICS Default-Einstellung zeigen sich bei t002 (siehe Abb. 16) vier Peaks mit  $p < 0,05$ : **5526, 3178, 5564, 7568**.

Bei spa-Typ t003 sind ebenfalls vier Peaks mit  $p < 0,05$ : **5526, 3178, 7568, 5564**.

Bei t045, t535, t2597, t1486, t1305, t264 und t105 sind keine signifikanten Peaks.

Zusammenfassend haben sich bei spa-Typ t002 und t003 je vier signifikante Peaks darstellen lassen. Weitere spa-Typen zeigten keine signifikanten Peaks.

### 3.4.3 Matrix Mining nach mec-Klasse

Im letzten Auswertungsschritt wurde jede im Versuchskollektiv vorkommende mec-Klasse mit den jeweils anderen mec-Klassen in Vergleich gesetzt. Auch hier wurde untersucht, ob ein Peak aus der oben bestimmten Liste (Tabelle 8) mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  identifiziert wird.

Im Folgenden werden die Ergebnisse fortlaufend nach mec-Klasse sortiert mit einer exemplarischen Darstellung der Heatmap aufgelistet.

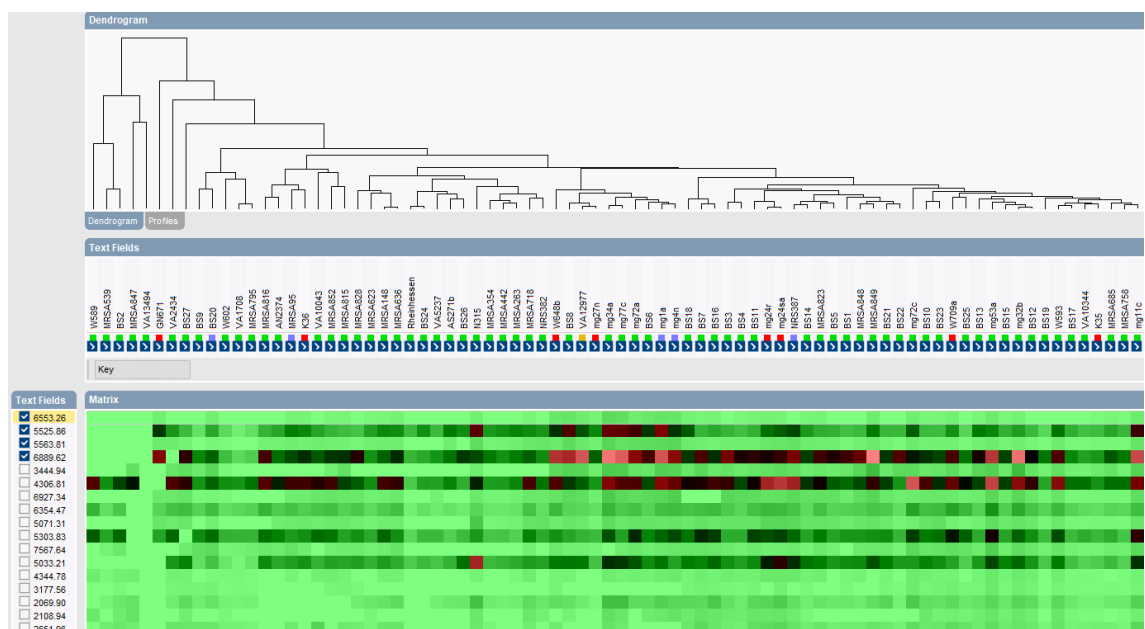


Abbildung 17: Exemplarisch: Matrixmining mec II gegen restliche mec-Klassen

Unter Verwendung der BIONUMERICS Default-Einstellung zeigen sich bei mec II (siehe Abb. 17) vier Peaks mit  $p < 0,05$ : **6553, 5526, 5564, 6890**.

Bei MSSA (mec negativ) sind zwei Peaks mit  $p < 0,05$ : **6553, 5526**.

Bei mec-Klasse IV sind drei Peaks mit  $p < 0,05$ : **7568**, **5526**, **4307**.

Bei mec n.t. ist kein signifikanter Peak.

Zusammenfassend haben sich bei mec-Klasse II vier signifikante Peaks, bei mec-Klasse IV drei signifikante Peaks und bei negativem mec (MSSA) zwei signifikante Peaks darstellen lassen.

### 3.4.4 Diskriminative Peakliste

Obige Ergebnisse sind in dieser Peakliste (Tabelle 9) dargestellt.

*Tabelle 9: Zusammenfassung der signifikanten Peaks nach den Ergebnissen der Matrixmining*

Peak in m/z +/- 5	Gruppe	spa	mec
<b>2070</b>	-	-	-
<b>2109</b>	-	-	-
<b>2652</b>	-	-	-
<b>3178</b>	1; 4	<i>t002; t003</i>	-
<b>3445</b>	1	-	-
<b>4307</b>	2	-	mec IV
<b>4345</b>	2	-	-
<b>5033</b>	-	-	-
<b>5071</b>	-	-	-
<b>5304</b>	-	-	-
<b>5526</b>	2; 3; 4	<i>t002; t003</i>	mec II; mec neg; mec IV
<b>5564</b>	2; 4	<i>t002; t003</i>	mec II
<b>6354</b>	1	-	-
<b>6553</b>	3	-	mec II; mec neg
<b>6890</b>	1	-	mec II
<b>6927</b>	2	-	-
<b>7568</b>	1; 4	<i>t002; t003</i>	mec IV



Alle aufgelisteten Peaks sind jeweils mit +/- 5 m/z zu interpretieren.

Mit dem Peak-Klassen-Manager von BIONUMERICS wurden im Vorfeld 17 Peaks als möglicherweise diskriminativ interpretiert (siehe Tabelle 8). Mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  wurden jedoch nur 11 dieser Peaks in den oben eingeführten Gruppen identifiziert.

Die Peaks m/z 3445 und 6354 wurden nur in Gruppe 1 (t002, mec II) als signifikant berechnet. Die Peaks m/z 4345 und 6927 wurden nur in Gruppe 2 (t002, mec IV) als signifikant berechnet. Der Peak m/z 4307 wurde in Gruppe 2 (t002, mec IV) und einzeln mec-Klasse IV als signifikant berechnet. Der Peak 6890 wurde in Gruppe 1 (t002, mec II) und auch einzeln mec-Klasse II als signifikant berechnet, was ebenfalls gut korreliert. Weitere Peaks (m/z 3178, 5526, 5564, 6553, 7568) kamen in mehreren Gruppen signifikant vor.

Als Ergebnis der diskriminativen Peakliste, können die Peaks m/z 3445, 6354 und 6890 im Rahmen der obigen Messungen für t002 mit mec II als mögliche Biomarker herausgestellt werden.

Ebenso stehen die Peaks m/z 4345, 6927 und 4307 für die Isolate mit t002 und mec IV als mögliche Biomarker.

### **3.5 Sensitivität und Spezifität der Biomarker**

Einzelne Peaks kommen in mehreren Gruppen signifikant vor. Um die Qualität dieser Peaks und Leistungsfähigkeit als Biomarker beurteilen zu können, wird daher die Sensitivität und Spezifität der Biomarker berechnet.

Als Grenzwert für einen „guten“ Biomarker wird eine Sensitivität von mindestens 30% und eine Spezifität von mindestens 80% definiert. Als Datengrundlage wird hier die Peaktabelle (Tabelle 12) verwendet. Die Berechnung erfolgt mit der Vierfeldermethode.

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität der Biomarker

Peak in m/z	Signifikant in	Sensitivität	Spezifität
<b>3178</b>	Gruppe 1	30,0%	46,1%
	Gruppe 4	50,0%	82,1%
	Gruppen 1 und 4	80,0%	28,2%
	t002	40,0%	25,6%
	t003 (entspricht Gr. 4)	50,0%	82,1%
<b>3445</b>	Gruppe 1	29,6%	32,0%
<b>4307</b>	Gruppe 2	5,1%	100%
	mec IV	6,4%	100%
<b>4345</b>	Gruppe 2	7,1%	100%
<b>5526</b>	Gruppe 2	5,3%	100%
	Gruppe 3	10,7%	100%
	Gruppe 4	33,3%	50,0%
	Gruppen 2,3 und 4	49,3%	50,0%
	t002	57,3%	50,0%
	t003 (entspricht Gr. 4)	33,3%	50,0%
<b>5564</b>	Gruppe 2	5,9%	100%
	Gruppe 4	33,8%	63,6%
	Gruppen 2 und 4	39,7%	63,6%
	t002	57,4%	45,5%

	t003	33,8%	63,6%
	mec II	78,0%	0,0%
<b>6354</b>	Gruppe1	42,3%	100%
<b>6553</b>	Gruppe 3	18,6%	100%
	mec II	67,4%	2,8%
	mec neg	18,6%	100%
<b>6890</b>	Gruppe 1	41,3%	50%
	mec II	80,0%	0,0%
<b>6927</b>	Gruppe 2	6,3%	100%
<b>7568</b>	Gruppe 1	34,9%	31,3%
	Gruppe 4	38,1%	81,3%
	Gruppen 1 und 4	73,0%	12,5%
	t002	52,4%	25,0%
	t003 (entspricht Gr. 4)	38,1%	81,3%
	mec IV	7,9%	100%

Als einzig „gute“ Biomarker wurden für *spa*-Typ t003 der Peak m/z 7568 mit einer Sensitivität von 38,1% und einer Spezifität von 81,3% und der Peak m/z 3178 mit einer Sensitivität von 50% und einer Spezifität von 82,1% dargestellt.

Weitere Peaks können aufgrund der berechneten Sensitivität und Spezifität (Tabelle 10) nicht als leistungsfähige Biomarker beschrieben werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einordnung der Ergebnisse

Um die eingangs gestellten Fragen zu beantworten, ließen sich zunächst durch verschiedene Visualisierungsverfahren keine Unterschiede im Versuchskollektiv erkennen.

Bei der Untersuchung von Peaks als potentielle Biomarker in der Gruppe der Rheinhessen MRSA Stämme des CC5 ließen sich Peaks wie folgt signifikant darstellen. Die Peaks  $m/z$  3445 und 6354 wurden nur in Gruppe 1 (t002, mec II) als signifikant berechnet. Die Peaks  $m/z$  4345 und 6927 wurden nur in Gruppe 2 (t002, mec IV) signifikant berechnet. Für diese Peaks wurden, wie in Tabelle 10 dargestellt, jeweils Sensitivität und Spezifität berechnet. Hier zeigen sich Werte unterhalb des Annahmekriteriums, was die Leistungsfähigkeit als Biomarker erheblich einschränkt.

Für *spa*-Typ t003 konnte der Peak  $m/z$  7568 mit einer Sensitivität von 38,1% und einer Spezifität von 81,3% und der Peak  $m/z$  3178 mit einer Sensitivität von 50% und einer Spezifität von 82,1% als möglicher Biomarker identifiziert werden.

Es konnte keine Gruppe der untersuchten mec-Klassen II, IV und negativ (MSSA) unterschieden werden. Nach oben aufgeführten Ergebnissen konnte kein Peak als Biomarker signifikant zwischen den MRSA und MSSA des Versuchskollektivs klassifizieren.

Die Methode der Bakterienidentifizierung mittels MALDI-TOF hat mittlerweile einen hohen Stellenwert im Rahmen der mikrobiologischen Routine. Sie ermöglicht eine schnelle Identifikation bei gleichzeitig geringe Laborkosten. Nach Untersuchungen und Messungen an sich stark ähnelnden Bakterien zeigt sich hier jedoch eine mangelnde Reproduzierbarkeit und Unterscheidungsfähigkeit.

### 4.2 Vergleich mit Peaks anderer Publikationen

Die in der Einleitung beschriebenen Peaks anderer Forschungsgruppen konnten in dieser Messreihe nicht als Biomarker berechnet werden. Viele für *S. aureus* beschriebene Peaks z.B. aus der Arbeitsgruppe um M. Josten (Josten *et al.*, 2013) konnten jedoch in der Messreihe reproduziert werden (siehe Tabelle 12).

Dominierende Peaks für das *S. aureus* Spektrum zeigten sich auch in vielen der hier vorliegenden Spektren: Der Peak m/z 6889 (bzw. 2-fach geladenes Peptid der Masse 3445), der Peak m/z 5525 (bzw. 2-fach geladenes Peptid der Masse 2763) und der Peak m/z 9627 (bzw. 2-fach geladenes Peptid der Masse 4814) waren bei je 95% aller Kompositspektren für 6889 und 5525 bzw 30% für 9627 vorhanden (Josten *et al.*, 2013).

Der Peak m/z 3007, der dem Delta Toxin entspricht, fand sich in 42% der untersuchten Kompositspektren.

Der für CC5 geführte Biomarker m/z 3891 fand sich in 46% der Kompositspektren.

Der von Rhoads *et al.* als Biomarker für MRSA beschriebene Peak m/z 2415 +/- 2 (Rhoads *et al.*, 2016), trat bei 31% der hier untersuchten MRSA auf, jedoch bei keinem MSSA. Dieses Ergebnis passt gut zu der beschriebenen Sensitivität von 37%.

### **4.3 Begrenzte Repräsentativität der *S. aureus* Stämme**

In dieser Arbeit wurden nur sehr ähnliche Stämme, also nur Stämme des CC5, miteinander verglichen. Diese stammen aus einer vorhergehenden Forschungsarbeit von Dr. Schulte (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen) und wurden über mehrere Jahre bei Patienten sowohl am Universitätsklinikum Tübingen als auch an Kliniken in Nordrhein-Westfalen gesammelt. In anderen Arbeiten konnten schon nur geringe Differenzen zwischen den verschiedenen CC-Klassen erarbeitet werden (Florio *et al.*, 2018), daher ist die Möglichkeit, dass innerhalb einer klonalen Linie Unterschiede gefunden werden, noch geringer.

### **4.4 Anzahl an Stämmen im Versuchskollektiv**

Die Zahl der zu untersuchenden Stämme war im Studiendesign auf 80 begrenzt. Das Versuchskollektiv war aufgrund vorhergehender Forschungsarbeit von Frau Dr. Schulte bereits klassifiziert. Mit dieser Anzahl sind statistische Testverfahren mit signifikantem Ergebnis nur eingeschränkt durchzuführen. Im Kollektiv war nur jeweils einmal der *spa*-Typ t105, t1305, t1486, t2597, t264 und t535 vertreten.

Ein größeres Versuchskollektiv könnte hier mehr signifikante Peaks in der statistischen Auswertung ermöglichen. Jedoch stehen z.B. in der Ausbruchskontrolle auch nur einzelne Isolate zur Diagnostik zur Verfügung.

#### **4.5 Auswirkung von Wachstum, Temperatur und Matrix**

Nach einer Studie, die im November 2020 in der Zeitschrift *Molecules* von Zloch et al. veröffentlicht wurde, haben die Probenvorbereitung und die Konditionen der Analyse einen hohen Einfluss auf das molekulare Profil und die Klassifikation der klonalen Komplexe. Die äußeren Umstände der Testung (Art der Matrix, Inkubationszeit, Agarplatte, pH-Wert) hatten zwar keinen großen Einfluss für die Identifikation auf Speziesebene. Die Zusammensetzung der nicht-ribosomalen Proteine, die stark vom metabolischen Status abhängen, scheinen jedoch eine signifikante Rolle zur Differenzierung nahverwandter Bakterienstämme zu spielen (Zloch et al., 2020). In der durchgeführten Messreihe wurden daher biologische und technische Replikate verwendet. Die äußeren Umstände der Testung wie Temperatur im Inkubationsraum, Agarplatte, Inkubationszeit und verwendete Matrix wurden konstant gehalten.

#### **4.6 Begrenzte Reproduzierbarkeit**

In der Clusteranalyse der einzelnen Messung zeigte sich (siehe 3.1), dass technische und biologische Replikate von einem Bakterienstamm nicht konstant zusammen geclustert wurden. Bekannt ist z.B., dass Peaks bei einzelnen MALDI-TOF Massenspektrometer Messungen sehr unterschiedlich hoch ausfallen können, je nachdem wie oft und wo der Laserstrahl absorbiert wird. Um trotzdem Auswertungen auf Stammebene durchzuführen, wurden die Replikate zu Kompositspektren zusammengefasst und im Folgenden mit diesen gearbeitet. Eine Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse zeigt die Defizite.

Um Spektrendaten anderer Labore zuverlässig reproduzieren zu können, wäre eine allgemeine Verfahrensanweisung zu Inkubationsdauer, Vorbehandlung der Bakterien und Art der Matrix sinnvoll.

## 4.7 Ausblick

Es werden aktuell neue Methoden erforscht, die MALDI-TOF Massenspektrometrie und rechnergestützte Algorithmen kombinieren, um die Schnelligkeit zu nutzen und die Ergebnisse zu verbessern.

So veröffentlichte eine Forschungsgruppe um Jiaxin Yu (Taiwan) im Journal der American Society for Microbiology im April 2022 eine vielversprechende Arbeit zur Kombination von Künstlicher Intelligenz mit MALDI-TOF. Sie bearbeiteten über 20.000 Fälle und entwickelten ein Modell zur Klassifizierung, ob es sich um MRSA oder MSSA handelt (Yu *et al.*, 2022).

Größere Datenmengen und Machine Learning bieten sehr gute Ansätze für weitere Erforschung der Unterscheidbarkeit von MRSA-Klonen mittels Massenspektrometrie (Liu *et al.*, 2021). Eine Herausforderung wird sein, ein Modell zu entwickeln, das eine zuverlässige Klassifizierung trotz begrenzter Reproduzierbarkeit gewährleisten kann.

## 5. Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein weitverbreiteter Keim und der bedeutendste Verursacher nosokomialer Infektionen. Zur Prävention von MRSA-Ausbrüchen ist ein gutes Diagnostikkonzept erforderlich. Es gibt verschiedene Ansätze (WGS, *spa*-Typisierung und MALDI-TOF), die sich in Kosten, Schnelligkeit, Sensitivität und Aufwand unterscheiden.

Um MALDI-TOF für diesen Zweck einsetzen zu können ist es essenziell, mit dieser Methode unterschiedliche Isolate, möglichst auf Subklonebene voneinander unterscheiden zu können.

Diese Arbeit untersucht in einem vorgegeben Versuchskollektiv von *S. aureus* der klonalen Linie CC5, ob Unterschiede signifikant und reproduzierbar mittels Massenspektrometrie herauszuarbeiten sind.

Es erfolgten Messreihen mit biologischen und technischen Replikaten und eine Auswertung der Spektren mittels Clusteranalyse/Visualisierung unter Verwendung der BIONUMERICS Software. Zur Auswertung wurden Kompositspektren der einzelnen Komponentenspektren berechnet.

In der Visualisierung mittels t-SNE sowie Ähnlichkeitsmatrix mit BIONUMERICS ließ sich kein Cluster nach *spa*-Typ oder mec-Klasse abgrenzen.

Das Versuchskollektiv wurde in Gruppen unterteilt, die sich in *spa*-Typ und mec-Klasse unterschieden. Ziel dieser Aufteilung war die Bestimmung signifikanter Peaks als mögliche Biomarker für ähnliche Isolate. So gelang es die Peaks 3445, 6354 und 6890 jeweils +/-5 m/z signifikant in der Gruppe der Isolate mit *spa*-Typ t002 und mec-Klasse II zu identifizieren. Die Peaks 4345, 6927 und 4307 jeweils +/-5 m/z waren signifikant in der Gruppe der Isolate mit *spa*-Typ t002 und mec-Klasse IV und können somit als mögliche Biomarker zur Diskrimination herangezogen werden. Eine Einschränkung der Leistungsfähigkeit dieser potentiellen Biomarker ist die geringe Sensitivität bzw. Spezifität. Für *spa*-Typ t003 konnte der Peak m/z 7568 mit einer Sensitivität von 38,1% und einer Spezifität von 81,3% und der Peak m/z 3178 mit einer Sensitivität von 50% und einer Spezifität von 82,1% als möglicher Biomarker identifiziert werden.

Eine signifikante Unterscheidung aller Isolate konnte diese Arbeit nicht zeigen.



Aufgrund der hohen Verwandtheit und Ähnlichkeit der Isolate (alle CC5), die in der klinischen Anwendung aber realistisch ist, muss zur Identifikation eine weitere Trennmethode eingesetzt werden.

Das Ziel, eine ausreichend genaue Analysemethode zu entwickeln, konnte aus o.g. Gründen nicht realisiert werden. Die im Rahmen der messtechnischen Arbeiten gewonnenen Erkenntnisse über Fehlerquellen und Einflussfaktoren sind jedoch für weitere Schritte zur Definition eines erforderlichen Analysestandards nutzbar. Wesentlich war hierfür die systematische Isolation von Ausreißern unter Anwendung der Kompositspektren, die dem bekannten Nachteil der MALDI-TOF Massenspektrometrie - der begrenzten Reproduzierbarkeit - entgegen wirken.

Neue vielversprechende Forschungsansätze kombinieren Spektren des MALDI-TOF mit Methoden des Maschinellen Lernen (Machine Learning). Hierfür wird jedoch eine deutliche größere Datenmenge zum Anlernen und Validieren der Methode benötigt.

## 6. Literaturverzeichnis

Abdelmoula, W.M. *et al.* (2018) 'Interactive Visual Exploration of 3D Mass Spectrometry Imaging Data Using Hierarchical Stochastic Neighbor Embedding Reveals Spatiomolecular Structures at Full Data Resolution', *Journal of Proteome Research*, 17(3), pp. 1054–1064. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00725>.

Alatoom, A.A. *et al.* (2011) 'Comparison of Direct Colony Method versus Extraction Method for Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry', *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), pp. 2868–2873. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00506-11>.

Albu, C., Brusin, S. and Ciancio, B. (2016) 'Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections', *Journal of Hospital Infection*, 94(4), p. 412. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.10.014>.

Alizadeh, M. *et al.* (2021) 'MALDI-TOF Mass Spectroscopy Applications in Clinical Microbiology', *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2021, p. 9928238. Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/9928238>.

Anhalt, J.P. and Fenselau, C. (1975) 'Identification of bacteria using mass spectrometry', *Anal. Chem.*, 47(2), pp. 219–225. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac60352a007>.

Ärzteblatt, D.Ä.G., Redaktion Deutsches (2015) *MRSA: Dekolonisierung vermeidet postoperative Wundinfektionen*, *Deutsches Ärzteblatt*. Available at: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/63012/MRSA-Dekolonisierung-vermeidet-postoperative-Wundinfektionen> (Accessed: 4 March 2023).

Baier, C. *et al.* (2018) 'A multimodal infection control concept in a burn intensive care unit - lessons learnt from a meticillin-resistant Staphylococcus aureus outbreak', *The Journal of Hospital Infection*, 98(2), pp. 127–133. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.07.023>.

van Belkum, A. and Rochas, O. (2018) 'Laboratory-Based and Point-of-Care Testing for MSSA/MRSA Detection in the Age of Whole Genome Sequencing', *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 1437. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01437>.

Bernardo, K. *et al.* (2002) 'Identification and discrimination of Staphylococcus aureus strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry', *Proteomics*, 2(6), pp. 747–753. Available at: [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200206\)2:6<747::AID-PROT747>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:6<747::AID-PROT747>3.0.CO;2-V).

Bizzini, A. *et al.* (2010) 'Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), pp. 1549–1554. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01794-09>.

Bodmann, K.-F. (2019) 'Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2018: Intensivmedizinisch relevante Veränderungen in der S2k-Leitlinie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V.', *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 144(11), pp. 729–733. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0043-114874>.

Böhme, K. *et al.* (2012) 'Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting', *Electrophoresis*, 33(15), pp. 2355–2364. Available at: <https://doi.org/10.1002/elps.201100480>.

- Bukowski, M., Wladyka, B. and Dubin, G. (2010) 'Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*', *Toxins*, 2(5), pp. 1148–1165. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins2051148>.
- Camoez, M. *et al.* (2016) 'Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry', *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), p. 161.e1-161.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.009>.
- Carolis, E.D. *et al.* (2014) 'Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology', *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(09), pp. 1081–1088. Available at: <https://doi.org/10.3855/jidc.3623>.
- Chambers, H.F. (1988) 'Methicillin-resistant staphylococci', *Clinical Microbiology Reviews*, 1(2), pp. 173–186. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.173>.
- Chen, C. and Wu, F. (2020) 'Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) colonisation and infection among livestock workers and veterinarians: a systematic review and meta-analysis', *Occupational and Environmental Medicine*, p. oemed-2020-106418. Available at: <https://doi.org/10.1136/oemed-2020-106418>.
- Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G. (2012) 'Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology', *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pp. 380–407. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.
- Cuny, C., Köck, R. and Witte, W. (2013) 'Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany', *International journal of medical microbiology: IJMM*, 303(6–7), pp. 331–337. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.010>.
- Dahms, C. *et al.* (2014) 'Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in farm workers and the livestock environment in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), p. 53. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0053-3>.
- David, M. and Daum, R. (2010) 'Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic | *Clinical Microbiology Reviews*', 3(Volume 23), pp. 616–687.
- Emonet, S. *et al.* (2010) 'Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology', *Clinical Microbiology and Infection*, 16(11), pp. 1604–1613. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03368.x>.
- Florio, W. *et al.* (2018) 'Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry', *Frontiers in Microbiology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01097>.
- Gagnaire, J. *et al.* (2012) 'Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry', *PloS One*, 7(7), p. e40660. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040660>.
- Gillet, Y. *et al.* (2002) 'Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients', *The Lancet*, 359(9308), pp. 753–759. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07877-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07877-7).
- Glaser, P. *et al.* (2016) 'Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage', *mBio*, 7(1), pp. e02183-02115. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.02183-15>.

Graveland, H. *et al.* (2011) 'Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans', *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), pp. 630–634. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.004>.

Groß, U. (2009) *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2. Auflage. Seite 33-38. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Holland, R.D. *et al.* (1996) 'Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(10), pp. 1227–1232. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960731\)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960731)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6).

Humphreys, H. and Coleman, D.C. (2019) 'Contribution of whole-genome sequencing to understanding of the epidemiology and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *The Journal of Hospital Infection*, 102(2), pp. 189–199. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.01.025>.

Jolley, K.A., Bray, J.E. and Maiden, M.C.J. (2018) 'Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications', *Wellcome Open Research*, 3, p. 124. Available at: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>.

Josten, M. *et al.* (2013) 'Analysis of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum of *Staphylococcus aureus* Identifies Mutations That Allow Differentiation of the Main Clonal Lineages', *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), pp. 1809–1817. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00518-13>.

Josten, M. *et al.* (2014) 'Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry', *International journal of medical microbiology: IJMM*, 304(8), pp. 1018–1023. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>.

Kanemitsu, K. and Nakamura, K. (2016) '[Importance of Clinical Laboratory and Molecular Epidemiology for Investigation of MRSA Outbreak]', *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 64(11), pp. 1263–1270.

Kassim, A. *et al.* (2017) 'Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast', *BMC microbiology*, 17(1), p. 128. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1037-z>.

Khan, A., Wilson, B. and Gould, I.M. (2018) 'Current and future treatment options for community-associated MRSA infection', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(5), pp. 457–470. Available at: <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1442826>.

Kim, J.-M. *et al.* (2019) 'Rapid Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS', *Pathogens*, 8(4), p. 214. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens8040214>.

*Krankenhauskeim MRSA* (2022). Available at: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/infektionskrankheiten/mrsa.html> (Accessed: 4 March 2023).

Kwieceński, J.M. and Horswill, A.R. (2020) 'Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms', *Current opinion in microbiology*, 53, pp. 51–60. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005>.

Lakhundi, S. and Zhang, K. (2018) 'Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology', *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>.

Lasch, P. *et al.* (2014) 'Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates', *Journal of Microbiological Methods*, 100, pp. 58–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.015>.

Liu, X. *et al.* (2021) 'Rapid identification and discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry', *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 35(2), p. e8972. Available at: <https://doi.org/10.1002/rcm.8972>.

Mairi, A., Touati, A. and Lavigne, J.-P. (2020) 'Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST80 Clone: A Systematic Review', *Toxins*, 12(2), p. 119. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins12020119>.

Mellmann, A. *et al.* (2006) 'Automated DNA Sequence-Based Early Warning System for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreaks', *PLOS Medicine*, 3(3), p. e33. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030033>.

Oberle, M. *et al.* (2016) 'The Technical and Biological Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing: Employment of Bioinformatics in a Multicenter Study', *PLoS ONE*, 11(10). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164260>.

Østergaard, C., Hansen, S.G.K. and Møller, J.K. (2015) 'Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS', *International Journal of Medical Microbiology*, 305(8), pp. 838–847. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.002>.

Price, J. *et al.* (2013) 'The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections', *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(9), pp. 784–789. Available at: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12109>.

*Principle of MALDI/TOFMS* (2023). Available at: [https://www.shimadzu.com/an/products/maldi/ms-applications/principle-of-malditofms/index.html](https://www.shimadzu.com/an/products/maldi/ms-applications/principle-of-malдитofms/index.html) (Accessed: 6 March 2023).

Rhoads, D.D. *et al.* (2016) 'The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(3), pp. 257–261. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.001>.

Rijen, M. van *et al.* (2008) 'Mupirocin ointment for preventing *Staphylococcus aureus* infections in nasal carriers', *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Preprint], (4). Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006216.pub2>.

*RKI - Archiv 2011 - Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010* (2011). Available at: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/26/Art\\_01.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/26/Art_01.html) (Accessed: 5 May 2020).

*RKI - RKI-Ratgeber - Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA* (2016). Available at: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Staphylokokken\\_MRSA.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.html) (Accessed: 4 March 2023).

Robert Koch-Institut: ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 20.03.2023 (2023). Robert Koch-Institut: ARS. Available at: <https://ars.rki.de>.

Ross, R.A. and Onderdonk, A.B. (2000) 'Production of Toxic Shock Syndrome Toxin 1 by *Staphylococcus aureus* Requires Both Oxygen and Carbon Dioxide', *Infection and Immunity*, 68(9), pp. 5205–5209.

Rossel, S. and Martínez Arbizu, P. (2018) 'Effects of Sample Fixation on Specimen Identification in Biodiversity Assemblies Based on Proteomic Data (MALDI-TOF)', *Frontiers in Marine Science*, 5. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2018.00149> (Accessed: 24 March 2023).

Sauer, S. and Kliem, M. (2010) 'Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria', *Nature Reviews. Microbiology*, 8(1), pp. 74–82. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2243>.

Sauget, M. *et al.* (2017) 'Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?', *Trends in Microbiology*, 25(6), pp. 447–455. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>.

Schöfer, H., Bruns, R. and Effendy, I. (2011) 'S2k + IDA Leitlinie: Diagnostik und Therapie *Staphylococcus aureus* bedingter Infektionen der Haut und Schleimhäute'. AWMF online. Available at: [https://dgpi.de/wp-content/uploads/2013/04/013-038l\\_S2k\\_Staphyococcus\\_aureus\\_2011-09.pdf](https://dgpi.de/wp-content/uploads/2013/04/013-038l_S2k_Staphyococcus_aureus_2011-09.pdf).

Schulte, B. *et al.* (2013) 'Diversification of clonal complex 5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (Rhine-Hesse clone) within Germany', *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), pp. 212–216. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.01967-12>.

Shallcross, L.J. *et al.* (2013) 'The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis', *The Lancet Infectious Diseases*, 13(1), pp. 43–54. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4).

Siegmund-Schultze, N. (2009) *Meldepflicht für MRSA-Infektionen*, *Deutsches Ärzteblatt*. Available at: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/65093/Meldepflicht-fuer-MRSA-Infektionen> (Accessed: 4 March 2023).

Steensels, D. *et al.* (2017) 'MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit', *Acta Clinica Belgica*, 72(4), pp. 219–225. Available at: <https://doi.org/10.1080/17843286.2016.1198521>.

Stegger, M. *et al.* (2014) 'Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *mBio*, 5(5), pp. e01044-01014. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.01044-14>.

*Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2020 data - Executive summary* (2021). Copenhagen: WHO Regional Office for Europe: WHO Regional Office for Europe and European Centre for Disease Prevention and Control. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Surveillance-antimicrobial-resistance-in-Europe-2020%20data%20Exec%20summ.pdf> (Accessed: 20 March 2023).

Szabados, F. *et al.* (2010) 'Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database', *Journal of Medical Microbiology*, 59(7), pp. 787–790. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.016733-0>.

Tsuchida, S., Umemura, H. and Nakayama, T. (2020) 'Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical

Diagnostic Microbiology', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(20), p. 4775. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>.

Ueda, O. *et al.* (2015) 'Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones', *The Journal of Hospital Infection*, 90(2), pp. 147–155. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.025>.

Ugolotti, E. *et al.* (2018) 'Genomic characterization of a paediatric MRSA outbreak by next-generation sequencing', *The Journal of Hospital Infection*, 98(2), pp. 155–160. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.08.009>.

Urushibara, N. *et al.* (2020) 'Novel staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type XIV (5A) and a truncated SCCmec element in SCC composite islands carrying speG in ST5 MRSA in Japan', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(1), pp. 46–50. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz406>.

Wertheim, H.F.L. *et al.* (2005) 'The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections', *The Lancet. Infectious Diseases*, 5(12), pp. 751–762. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4).

Wolters, M. *et al.* (2011) 'MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages', *International Journal of Medical Microbiology*, 301(1), pp. 64–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.06.002>.

Yu, J. *et al.* (2022) 'Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using MALDI-TOF MS and Machine Learning from over 20,000 Clinical Isolates', *Microbiology Spectrum*, 10(2), pp. e00483-22. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00483-22>.

Zastrow, K.-D. (2016) *Krankenhausinfektionen – ein medizinisches, soziales und ökonomisches Problem.*, Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene e.V. Available at: <https://www.krankenhaushygiene.de/informationen/hygiene-tipp/hygienetipp-archiv/> (Accessed: 4 March 2023).

Zhang, L. *et al.* (2015) 'Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry and a Custom Database to Characterize Bacteria Indigenous to a Unique Cave Environment (Kartchner Caverns, AZ, USA)', *Journal of Visualized Experiments : JoVE* [Preprint], (95). Available at: <https://doi.org/10.3791/52064>.

Złoch, M. *et al.* (2020) 'Study on Molecular Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains: Spectrometric Approach', *Molecules*, 25(21), p. 4894. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25214894>.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Hygiene unter der Betreuung von Prof. C. Wolz und der Aufsicht von Dr. J. Liese durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Liese (Leiter der Krankenhaushygiene) und Dr. Berit Schulte (Oberärztin in der Medizinischen Mikrobiologie).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder des Instituts und Dr. Liese sowie Dr. Schulte eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Die Visualisierung mit „R“ (t-SNE Plots) erfolgte unter Anleitung durch Benjamin Scheer durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.



## 8. Anhang

### 8.1 Darstellung von Phänotyp und Hämolyierungsverhalten

Tabelle 11: Phänotyp und Hämolyierungsverhalten der verwendeten Isolate

Stamm	Phänotyp	Hämolyierungsverhalten (0/+ /++)
BS6	grau	0
mg34a	grau	0
mg77c	grau	0
MRSA539	gelb	0
NRS382 (USA 100)	gelb	0
VA10043	grau	0
W593	grau	0
mg72a	gelb	++
MRSA442	grau	0
MRSA623	gelb	0
MRSA718	grau	0
N315	gelb	0
AS271b	gelb	0
BS17	grau	0
BS18	weiß	0
BS24	weiß	0
BS8	weiß	+
mg72c	grau	0

MRSA148	grau	0
MRSA263	gelb	0
MRSA354	gelb	0
MRSA636	grau	0
MRSA685	grau	0
MRSA758	grau	0
MRSA795	grau	0
VA10344	grau	0
VA1708	grau	0
VA2434	grau	0
VA5237	grau	+
W589	grau	0
W602	grau	0
AN2374	grau	0
mg11c	gelb	++
mg1a	gelb	++
mg4n	grau	++
MRSA95	gelb	+
NRS387 ( <i>Pediatric</i> )	gelb	++
W648b	gelb	0
GN671	gelb	++
K35	gelb	++

K36	gelb	++
mg24r	grau	0
mg24sa	grau	0
mg27n	gelb	0
W709a	grau	0
BS14	grau	0
BS1	weiß	0
BS10	grau	+
BS21	weiß	0
BS22	grau	0
BS25	grau	+
BS27	grau	0
MRSA815	grau	0
MRSA852	gelb	0
MRSA816	gelb	+
BS2	grau	++
BS3	grau	+
mg32b	grau	0
mg53a	gelb	0
MRSA828	gelb	0
MRSA847	gelb	0
MRSA849	grau	0

BS12	grau	0
BS15	grau	0
BS19	gelb	0
BS23	grau	0
BS26	gelb	++
BS4	grau	0
BS7	grau	0
BS9	grau	+
MRSA823	gelb	0
MRSA848	grau	0
VA13494	grau	0
BS13	grau	++
VA12977	grau	0
BS20	grau	0
BS11	grau	0
Rheinhessen	gelb	0
BS16	grau	0
BS5	grau	0

## 8.2 Dendrogramm der Kompositspektren

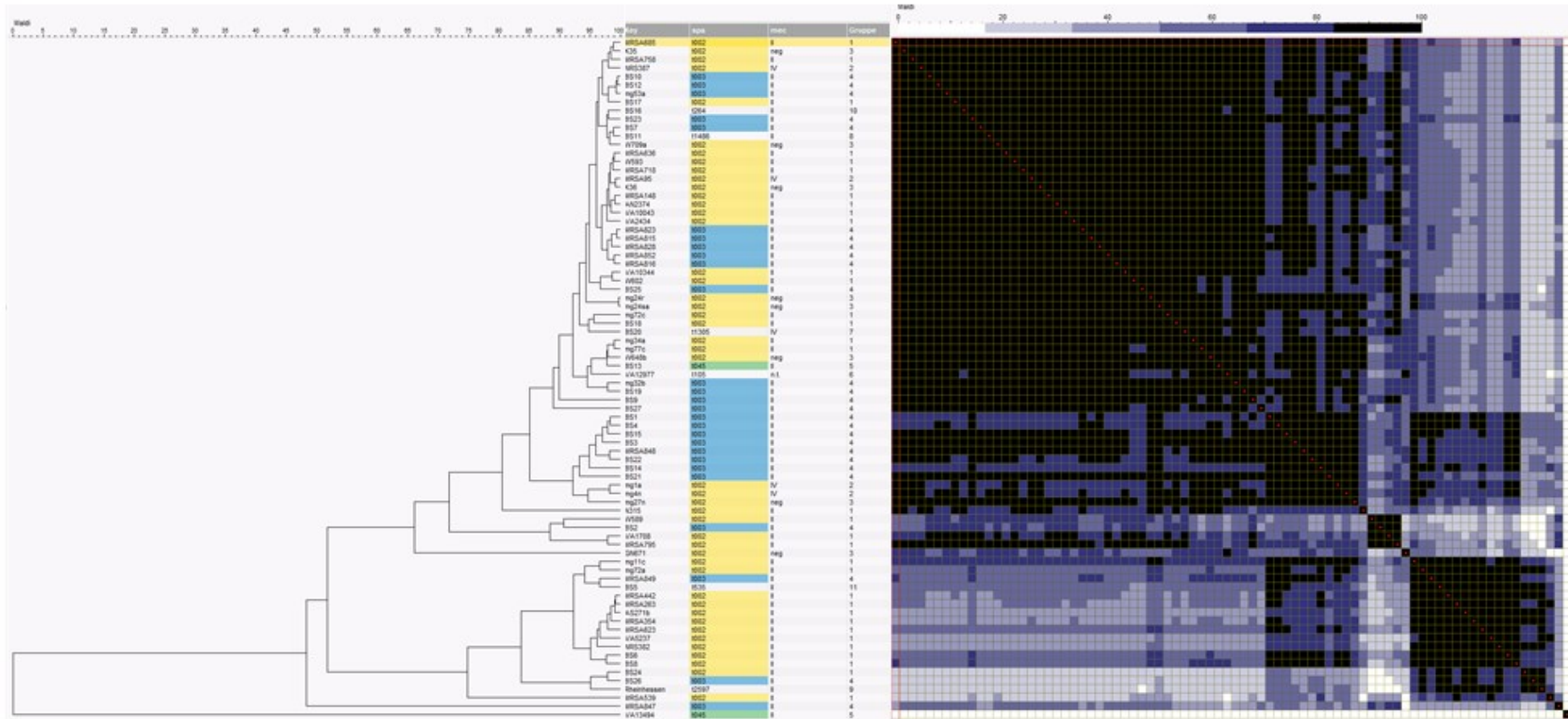


Abbildung 18: Dendrogramm und Ähnlichkeitsmatrix nach BIONUMERICS auf Ebene der Kompositspektren

### 8.3 Peaktabelle

Tabelle 12: Vorhandensein von Peaks in m/z (0 oder 1) in den Kompositspektren der Stämme

Stamm/ Peak	Gruppe	2070	2109	2168	2306	2347	2415	2454	2493	2652	2806	2879	3007	3050	3178	3311	3421	3445	3639
AN2374	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AS271b	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
BS1	4	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
BS2	4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
BS3	4	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
BS4	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
BS5	11	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
BS6	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
BS7	4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BS8	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
BS9	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
BS10	4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BS11	8	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BS12	4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BS13	5	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
BS14	4	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
BS15	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
BS16	10	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BS17	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BS18	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
BS19	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Stamm/ Peak	Gruppe	2070	2109	2168	2306	2347	2415	2454	2493	2652	2806	2879	3007	3050	3178	3311	3421	3445	3639
BS20	7	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
BS21	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
BS22	4	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
BS23	4	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
BS24	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
BS25	4	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
BS26	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
BS27	4	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
GN671	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K35	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
K36	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mg1a	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
mg4n	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
mg11c	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
mg24r	3	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
mg24sa	3	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
mg27n	3	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
mg32b	4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
mg34a	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
mg53a	4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
mg72a	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
mg27c	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
mg77c	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
MRSA95	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Stamm/ Peak	Gruppe	2070	2109	2168	2306	2347	2415	2454	2493	2652	2806	2879	3007	3050	3178	3311	3421	3445	3639
MRSA148	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA263	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
MRSA354	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
MRSA442	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
MRSA539	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
MRSA623	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
MRSA636	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA685	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
MRSA718	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA758	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
MRSA795	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
MRSA815	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
MRSA816	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA823	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MRSA828	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MRSA847	4	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
MRSA848	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
MRSA849	4	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
MRSA852	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
N315	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
NRS382	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
NRS387	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Rheinhes- sen	9	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0



Stamm/ Peak	Gruppe	2070	2109	2168	2306	2347	2415	2454	2493	2652	2806	2879	3007	3050	3178	3311	3421	3445	3639
VA1708	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
VA2434	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
VA5237	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
VA10043	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VA10344	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
VA12977	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
W589	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
W593	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
W602	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
W648b	3	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
W709a	3	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0

Stamm/ Peak	Gruppe	3712	3784	3893	4307	4345	4448	4487	4643	4813	5033	5071	5261	5304	5341	5526	5564	5875	5932
AN2374	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
AS271b	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
BS1	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS2	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
BS3	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS4	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS5	11	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS6	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS7	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
BS8	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS9	4	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
BS10	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
BS11	8	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
BS12	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
BS13	5	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
BS14	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS15	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS16	10	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS17	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
BS18	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
BS19	4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS20	7	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
BS21	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
BS22	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0

Stamm/ Peak	Gruppe	3712	3784	3893	4307	4345	4448	4487	4643	4813	5033	5071	5261	5304	5341	5526	5564	5875	5932
BS23	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
BS24	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
BS25	4	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
BS26	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
BS27	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
GN671	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
K35	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
K36	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
mg1a	2	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
mg4n	2	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
mg11c	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
mg24r	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
mg24sa	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
mg27n	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
mg32b	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
mg34a	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
mg53a	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
mg72a	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
mg27c	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
mg77c	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA95	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
MRSA148	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
MRSA263	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA354	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0

Stamm/ Peak	Gruppe	3712	3784	3893	4307	4345	4448	4487	4643	4813	5033	5071	5261	5304	5341	5526	5564	5875	5932
MRSA442	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA539	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
MRSA623	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA636	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
MRSA685	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
MRSA718	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA758	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
MRSA795	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
MRSA815	4	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA816	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
MRSA823	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA828	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA847	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA848	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA849	4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
MRSA852	4	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
N315	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
NRS382	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
NRS387	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Rheinhes- sen	9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
VA1708	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
VA2434	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
VA5237	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0

Stamm/ Peak	Gruppe	3712	3784	3893	<b>4307</b>	<b>4345</b>	4448	4487	4643	4813	<b>5033</b>	<b>5071</b>	5261	<b>5304</b>	5341	<b>5526</b>	<b>5564</b>	5875	5932
VA10043	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
VA10344	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
VA12977	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
W589	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
W593	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
W602	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
W648b	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
W709a	3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1

Stamm/ Peak	Gruppe	6354	6553	6574	6821	6842	6890	6927	7274	7421	7568	7732	8892	9626
AN2374	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
AS271b	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
BS1	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
BS2	4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
BS3	4	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS4	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS5	11	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS6	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS7	4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
BS8	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS9	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS10	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS11	8	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS12	4	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
BS13	5	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS14	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS15	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS16	10	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
BS17	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS18	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
BS19	4	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
BS20	7	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
BS21	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS22	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0

Stamm/ Peak	Gruppe	6354	6553	6574	6821	6842	6890	6927	7274	7421	7568	7732	8892	9626
BS23	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS24	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
BS25	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
BS26	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
BS27	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
GN671	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
K35	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
K36	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
mg1a	2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
mg4n	2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
mg11c	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
mg24r	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
mg24sa	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
mg27n	3	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
mg32b	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
mg34a	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
mg53a	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
mg72a	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
mg27c	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
mg77c	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
MRSA95	2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA148	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA263	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
MRSA354	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0

Stamm/ Peak	Gruppe	6354	6553	6574	6821	6842	6890	6927	7274	7421	7568	7732	8892	9626
MRSA442	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
MRSA539	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MRSA623	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA636	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
MRSA685	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA718	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA758	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA795	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
MRSA815	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA816	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
MRSA823	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA828	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA847	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA848	4	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MRSA849	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
MRSA852	4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
N315	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
NRS382	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
NRS387	2	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
Rheinhes- sen	9	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
VA1708	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
VA2434	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
VA5237	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0



Stamm/ Peak	Gruppe	<b>6354</b>	<b>6553</b>	6574	6821	6842	<b>6890</b>	<b>6927</b>	7274	7421	<b>7568</b>	7732	8892	9626
VA10043	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
VA10344	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
VA12977	6	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
W589	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
W593	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
W602	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
W648b	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
W709a	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0

## **9. Lebenslauf**

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.