

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität  
Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Massenspektrometrische  
Differenzierung bakterieller  
Infektionserreger mit dem Vitek  
MS-Routinetest-System (IVD)**

vorgelegt von

**Alexander Menzer**

aus Darmstadt

Köln, März 2017



Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. Christoph Schoen

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2017

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Prinzip des MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Diagnostik . .	1
1.2	Methodik der Keimidentifikation . . . . .	5
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>7</b>
2.1	Bakterienkulturen . . . . .	7
2.2	Massenspektrometrie . . . . .	10
2.2.1	Präparation der Proben und Messvorgang . . . . .	10
2.2.2	Erweiterung des Messprotokolls . . . . .	10
2.2.3	Auslesen und Darstellung der massenspektrometrischen Roh- daten . . . . .	12
2.2.4	Auswertung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Un- tersuchungen . . . . .	12
2.2.5	Zusammenführung der Messdaten . . . . .	13
2.3	Bestätigungsmethoden . . . . .	14
2.3.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	14
2.3.2	Gramfärbung . . . . .	20
2.3.3	Biochemische Methoden . . . . .	21
2.3.4	Identifikation von <i>Neisseria</i> und <i>Haemophilus</i> Stämmen durch das NRZMHi . . . . .	23
2.4	Teilautomatisierter Taxonomieabgleich . . . . .	23
2.5	Taxonomische Einordnung . . . . .	24
2.6	Auswertung der Untersuchungsergebnisse . . . . .	24
2.7	Statistische Tests . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Überblick über das untersuchte Kollektiv . . . . .	26

## *Inhaltsverzeichnis*

3.2	Widersprüchliche Ergebnisse der Referenzmethoden . . . . .	32
3.3	Auswertung der Identifikationsergebnisse durch das Vitek MS-System	33
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse innerhalb der Ordnungen . . . . .	33
3.5	Typstämme / Identifikation durch das Nationale Referenzzentrum . .	38
3.6	Identifikationen von nicht in der Vitek MS-Datenbank hinterlegten Bakterienstämmen . . . . .	40
3.7	Vergleich der Performance mit anderen Studien zum Vitek MS-System	43
3.8	Erweiterung des Standardprotokolls der massenspektrometrischen Un- tersuchung . . . . .	49
3.8.1	Vergleich der Identifikation auf Genusebene . . . . .	53
3.8.2	Vergleich der Differenzierung auf Speziesebene . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>78</b>
6.1	Abkürzungen . . . . .	78
6.2	Überblick über die getesteten Stämme . . . . .	80
6.2.1	Typstämme . . . . .	80
6.2.2	Stämme und Differenzierungsmethoden . . . . .	83
6.3	Kreuztabellen mit den Ergebnissen der einzelnen Ordnungen . . . . .	93
6.4	Vergleich der massenspektrometrischen Protokolle . . . . .	115
6.4.1	Vergleich der Identifikation auf Genusebene . . . . .	115
6.4.2	Vergleich der Differenzierung auf Speziesebene . . . . .	117
6.5	Übereinstimmungsebenen der Referenzstämmen mit dem Vitek MS- System, Vergleichsdaten mit anderen Studien . . . . .	119
6.6	Quellcode . . . . .	126
6.6.1	Parsen der massenspektrometrischen Protokolle aus dem MZML- Dateinamen . . . . .	126
6.6.2	Teilautomatisierter Vergleich der Ergebnisse von Massenspek- trometrie und Referenzbezeichnung . . . . .	127
6.6.3	Berechnung der euklidischen Distanz zwischen Referenz- und Vergleichsmassenvektor . . . . .	129
6.6.4	Dynamische Berechnung des Supervektors . . . . .	130

*Inhaltsverzeichnis*

**7 Abbildungsverzeichnis**

**134**

# 1 Einleitung

Seit einigen Jahren ergänzt die massenspektrometrische Keimidentifikation zunehmend bereits etablierte biochemische und molekulargenetische Identifikationsmethoden in der klinisch-mikrobiologischen Routinediagnostik. Gründe hierfür sind im Vergleich der Massenspektrometrie zu automatisierten biochemischen Identifikationssystemen oder klassisch-mikrobiologischen Verfahren wie der „Bunten Reihe“ die schnellere Ergebnisermittlung und im Vergleich zu molekularbiologischen Verfahren eine einfachere Handhabung. Einige Autoren sehen neben der Kosteneffizienz – trotz relativ hoher Anschaffungskosten und noch nicht gänzlich überschaubarer Wartungskosten – auch einen Vorteil in der Robustheit der Methode<sup>21;61;86;91</sup>.

Zur Zeit sind in Deutschland zwei Systeme verbreitet: Zum einen existiert das Biotyper-System von Bruker Daltonics, einem Unternehmen der Bruker Corporation mit Sitz in Billerica, USA, und zum anderen das Vitek® System der Firma bioMérieux aus Marcy-l'Étoile, Frankreich. Beide Systeme bestehen im Wesentlichen aus zwei Komponenten: der Messapparatur, dem eigentlichen Massenspektrometer, und der Analysesoftware zur Interpretation der Messdaten und endgültigen Keimidentifikation. Verwendet werden hier unterschiedliche Massenspektrometer: Das Biotyper-System nutzt hierzu die hauseigene AutoFlex-Serie, bioMérieux verwendet ein Massenspektrometer der Axima-Serie, ein lineares MALDI-TOF MS-Gerät aus dem Hause Shimadzu (Kyōto, Japan).

## 1.1 Prinzip des MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Diagnostik

Die Grundidee, Bakterien anhand deren spezifischen massenspektrometrischen Profils zu identifizieren, hatten Anhalt und Fenselau bereits 1975. Sie konnten zeigen,

## 1 Einleitung

dass Bakterienbestandteile, wie z.B. die Lipidmembran, charakteristische, spezie-spezifische Muster aufwiesen und somit eine Identifikation ermöglichten<sup>4</sup>.

Da Ribosomen in der Wachstumsphase etwa 45 % der Bakterienmasse ausmachen können<sup>102</sup>, erwiesen sich Teile ribosomaler Proteine neben anderen Proteinen wie Hitze- oder Kälteschockproteine<sup>41;42;53;82;92;93</sup> als zuverlässige Biomarker zur massenspektrometrischen Identifikation von Bakterienisolaten. Als Technologie zur Erfassung größerer, nicht flüchtiger Proteine eigneten sich zwei massenspektrometrische Prinzipien: einerseits die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (englisch *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI), in der ein Proben-Matrix-Gemisch auskristallisiert, elektrisch geladen und durch einen Laser verdampft wird<sup>35;59</sup> und zum anderen die Elektrospray-Ionisation (ESI), in der die Probe durch eine feine Metallkapillare geleitet und an deren Spitze es aufgrund der anliegenden Spannung zu einer Ladung des Probentröpfchen kommt. Ein Vorteil des MALDI-Prinzips gegenüber der ESI liegt sowohl in der Geschwindigkeit als auch in der einfacheren Handhabbarkeit der Methode<sup>23</sup>, sodass sich dieses schließlich in der Breitenanwendung durchsetzte.

Bei der „sanften“ Ionisation handelt es sich um einen Vorgang, bei der Zielproteine möglichst unfraktioniert und einfach geladen untersucht werden. Dies gelingt im wesentlichen dadurch, dass ein Großteil der Energie des Laserpulses durch die Matrix absorbiert wird. In der bakteriologischen Diagnostik eigneten sich hierfür besonders Derivate der Zimt- oder Sinapinsäure, durch die ein optimales Ergebnis in der Messung nicht flüchtiger Proteine mit einem Molekulargewicht unter 25 kDa erreicht werden konnte<sup>34;71</sup>. Aufgrund der unerwünschten Wechselwirkung zwischen Cystein-haltigen Proteinen und der Sinapinsäure, welche durch eine kovalente Bindung an Cystein zu einer Ladungsveränderung des Zielproteins führen kann<sup>44</sup>, hat sich schließlich der Einsatz der  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsinapinsäure als geeignete Matrix in der Diagnostik bakterieller Erreger durchgesetzt<sup>25</sup>.

Um jedoch die Zielproteine der noch intakten Bakterienzellen in ausreichender Menge freizusetzen, ist es notwendig, deren Zellwand zu lysieren. In frühen Arbeiten zum Einsatz des MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Diagnostik wurde dies mit Hilfe der Ameisensäure erreicht. Nach der Lufttrocknung wurden die Pro-

## 1 Einleitung

ben schließlich an eine Matrix – meist  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure – konjugiert, bis diese auskristallisierten<sup>10;54</sup>.

Laut aktuellem Stand ist es üblicherweise jedoch nicht mehr notwendig, diesen Zwischenschritt in der Proteinextraktion mit Ameisensäure durchzuführen. Allerdings gewährleistet dieses zweistufige Verfahren eine bessere Phasenstabilität in der Detektion insbesondere größerer Proteine ab 15kDa<sup>20;41;67;100</sup>.

Eine ausreichende Proteinextraktion wird zumeist durch die Additive Acetonitril und Trifluoressigsäure erlangt. Eine Ausnahme bildet hier nach gängiger Praxis die Analyse von Hefepilzen, die diesen zusätzlichen Extraktionsschritt mit einer starken organischen Säure wie der genannten Ameisensäure benötigen. Jedoch gibt es Hinweise, dass dieser zusätzliche Extraktionsschritt auch bessere Ergebnisse in der Untersuchung Gram-positiver Stäbchen wie Kokken erbringt<sup>1;63;85;94;96</sup>.

Neben der günstigen Eigenschaft von Acetonitril hinsichtlich der Proteinextraktion ergibt sich auch aus der Kombination von Acetonitril und  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure ein weiterer Synergieeffekt. Acetonitril ist nicht nur ein gutes Lösungsmittel der nur schlecht wasserlöslichen  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, sondern ermöglicht bei Lufttrocknung auch die Bildung kleinster Kristalle. Dieser Eigenschaft ist es zu verdanken, dass das Homogenitätsproblem des Proben-Matrix-Gemischs reduziert und ein in der späteren Messung relevantes Überlagern der entstehenden Kristalle durch die restlichen, meist aufschwämmenden Zellbestandteile verhindert wird.

Nach der Präparation wird die luftgetrocknete Probe in das Massenspektrometer eingebracht und ein Vakuum in der Ionisationskammer, in der sich die Probe befindet, dem einen Meter langen Flugrohr und dazu assoziierten Bereichen wie Laserauslass und Ionenfalle erzeugt (vgl. Abbildung 1.1).

Da die Probe danach in der Ionisationskammer durch kurze Laserimpulse verdampft und die entstandenen, geladenen Partikel im elektrischen Feld beschleunigt und durch eine Ionenfalle detektiert wurden, ist es in einem nächsten Schritt notwendig, die Aufzeichnung der Spannungsänderungen über die Dauer der Flugzeit (englisch *time-of-flight*, TOF) zur maschinellen Analyse aufzubereiten. In einem ers-



## 1 Einleitung

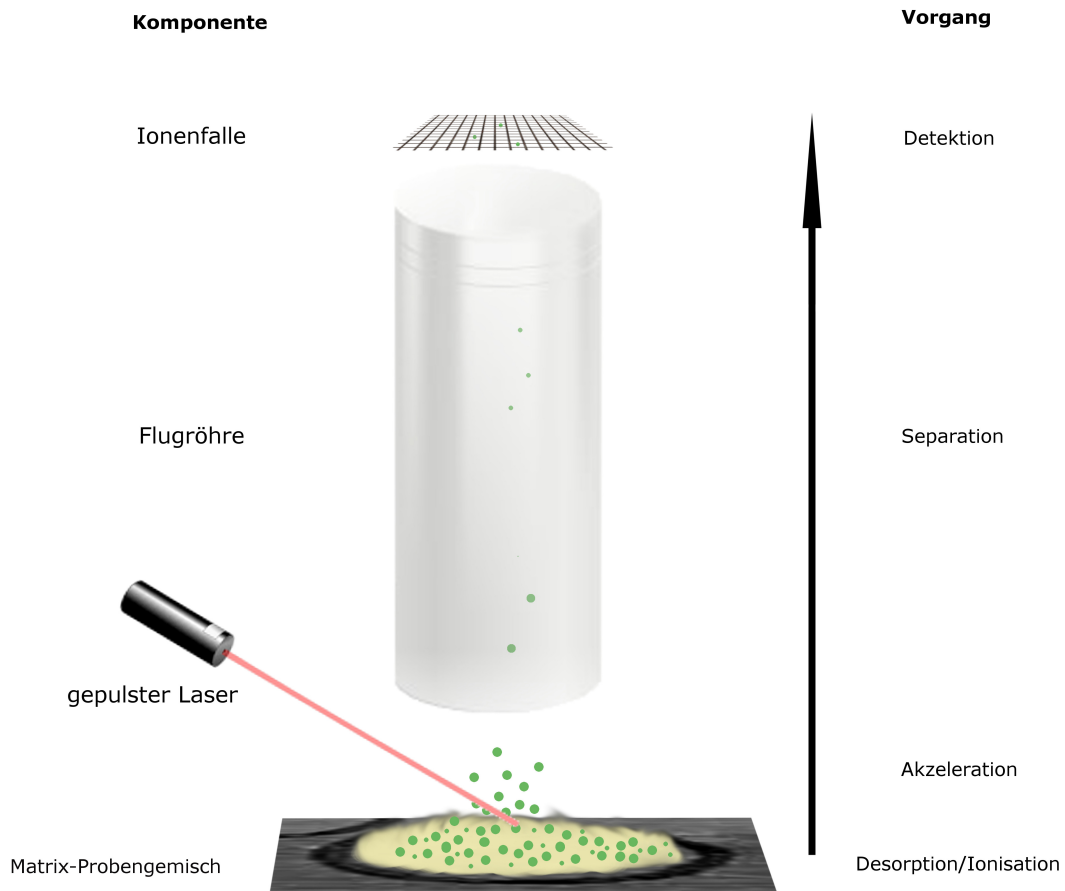


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des MALDI-TOF MS-Prinzips

ten Schritt wird die Grundlinie des Signalmusters berechnet. Dies geschieht zur Laufzeit der Messung einzelner Messpunkte eines Probenspots. Zur Optimierung des Messerfolgs werden durch die Vitek MS-Steuerungssoftware Messpunkte mit guter Signalqualität, sogenannte *best spots*, ermittelt.<sup>21</sup>

Aus hundert Einzelmessungen je Probenspot wird aus dem gewonnenen Spektrum ein *Peak*-Muster ermittelt und an das Keimidentifikationsmodul übertragen.

## 1.2 Methodik der Keimidentifikation

Als Grundlage für die automatisierte Auswertung des gemessenen Massenspektrums dient das ermittelte *Peak*-Muster der entsprechenden Probe. Dazu müssen nicht nur die möglichst exakte Massen- / Ladungszahl ermittelt werden, sondern auch zwei weitere für die Analyse wichtige Parameter: die Signalintensität und das Signal-Rausch-Verhältnis. Durch die entsprechende Analysesoftware zur Identifikation von mikrobiellen Erregern werden *Peaks* im Massenbereich von 3 bis 17 kDa und einem Signal-Rausch-Abstand  $\geq 3$  ermittelt<sup>21;62</sup>.

In der Prozessierung des Massenspektrogramms werden das Masse-Ladungsverhältnis sowie die Signalintensität unter Berücksichtigung der Halbwertsbreite (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) berechnet.

Zum Abgleich des berechneten Peptid- bzw. Protein-(Massen-)Fingerabdrucks dient eine Datenbank, in der Spektren und Superspektren eingepflegter Referenzstämme hinterlegt sind. Als Superspektrum bezeichnet werden Teile von Spektren, die innerhalb eines Bakterienkomplexes oder unterschiedlicher Spezies eines Genus gleich sind. Voraussetzung für die Keimidentifikation ist, dass die hinterlegten Muster reproduzierbar sind<sup>64</sup> und eine ausreichende Repräsentativität unterschiedlicher Arten aufweisen. Manche Autoren fordern mindestens zehn repräsentative Spezies je Gattung<sup>86</sup>. Hinweise, dass auch geographisch betrachtet lokale Stämme ein spezifisches Muster aufweisen können, wurde anhand der Gattung *Haemophilus* gezeigt<sup>103</sup>. Die Konfidenz des Identifikationsergebnisses wird dem Benutzer letztendlich durch Angabe eines Scores dargestellt.

## 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Inzwischen sind einige Arbeiten zur Performance des Vitek MS-Systems (IVD) in der Differenzierung eines breiten Keimspektrums erschienen, auch im Vergleich zu anderen MS-Systemen, Saramis der Firma Anagnostec (mittlerweile bioMérieux, Vorgänger des Vitek MS-Systems) und Biotyper der Firma Bruker Daltonics<sup>21;61</sup>.

Aufgrund der Ausrichtung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Uni-

## 1 Einleitung

versität Würzburg war es möglich, Schwerpunkte bislang noch nicht gesonderter Keimgruppen zu betrachten. Das Varialabor des Instituts ist für die mikrobiologische Erregerdiagnostik des Universitätsklinikums Würzburg zuständig. Ein weiteres, zentrales Labor ist das Hygienelabor. Hieraus wurden Bakterien aus Untersuchungen der unmittelbaren Patientenumgebung akquiriert. Im Auftrag des Robert-Koch-Instituts stellt das Institut für Hygiene und Mikrobiologie auch das Nationale Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* (NRZMHi).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Identifikation von bakteriellen Erregern anhand dieses breiten Keimspektrums zu untersuchen und mit bereits publizierten Daten zur Performance des Vitek MS-Systems zu vergleichen.

Aufgrund der variablen Spezifität von Peaks oder Peakmustern in der Identifikation von Bakterien beschäftigt sich diese Arbeit auch in einem Teilaspekt mit der Optimierung der massenspektrometrischen Untersuchung.

Wie bereits erwähnt, ist die Frage, ob und wie sich ein zweistufiges Verfahren aus Säureextraktion mit Ameisensäure oder eine Anpassung der Matrixmenge an ein günstigeres Proben-Matrix-Gemisch auf die Performance der Keimerkennung auswirkt, noch nicht abschließend geklärt.

Diese Arbeit verfolgt somit als zweite Fragestellung, ob und in welchem Rahmen es sinnvoll erscheint, ein aufwendigeres Procedere in der Proteinextraktion im Rahmen der mikrobiologischen Routinediagnostik durchzuführen und ermittelt somit auch den noch nicht zuvor systematisch untersuchten Einfluss eines optimalen Keim-Matrix-Gemischs auf die Übereinstimmung der Identifikation des Vitek MS-Systems bakterieller Infektionserreger mit den etablierten molekularbiologischen und biochemischen Differenzierungsmethoden.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Bakterienkulturen

Im Zeitraum von Oktober 2011 bis April 2014 wurden folgende Isolate bzw. Stammsammlungen untersucht:

- Bakterienkulturen aus der mikrobiologischen Routinediagnostik des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (n=1247)
- Isolate aus Umgebungsuntersuchungen patientenversorgender Bereiche (n=10)
- Kulturen der Stammsammlungen pathogener wie apathogener Neisserien des Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* (NRZMHi) (n=9)
- *Haemophilus*-Stämme des NRZMHi (n=5)
- *Burkholderia*-Isolate der Stammsammlung für zystische Fibrose des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg in Kooperation mit der Kinderklinik der Universitätsklinik Würzburg und des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg (n=30)
- Typstämme der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, Virginia, USA) (n=37)
- Kulturen der Stammsammlung des Labors für Mikrobiologie (LM-UGent, Universität Gent, Belgien, kurz LMG) (n=8)
- ein Isolat des NCO (National Coordination Office, National Science Foundation) (n=1)
- ein Typstamm der *National Collection of Type Cultures* (Public Health England, UK, kurz NCTC) (n=1)
- Typstämme der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Leibniz Institut - Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig, Deutschland, kurz DSMZ) (n=7)
- Stämme der Sammlungen von Mark Achtmann (Irland) und E.C. Gottschlich

## 2 Material und Methodik

(jeweils n=1)

Als Referenzstämme bezeichnet wurden die Gesamtheit aller Typstämme und Referenzstämme des NRZMHi. Die Mehrzahl der Referenzstämme waren Isolate der Genera *Haemophilus* (n = 48) und *Neisseria* (n = 30). (vgl. Tabelle 2.1)

Die Kulturanzüchtung erfolgte aufgrund des Einflusses des Nährmediums auf das Proteom der Isolate und somit auch auf das Untersuchungsergebnis<sup>61</sup> primär auf Columbia Blut-Agar (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich). Hiervon ausgenommen wurden anspruchsvoll wachsende Keime; *Haemophilus spp.* wurden auf Kochblut-Agar (bioMérieux), anaerob wachsende Keime auf Schaedler-Agar (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) in anoxischem Milieu kultiviert, zur Anzucht von Clostridien wurde ein *Clostridium difficile*-Agar (bioMérieux) verwendet. Aerob wachsende Keime wurden 24h ± 2h bei 36 °C ± 1 °C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank bebrütet. Langsam wachsende Keime wurden weitere 24h bis zu einer makroskopisch sichtbaren Koloniemorphologie bebrütet oder bei keinem Wachstum nicht in die Studie einbezogen. Anaerobe Keime wurden in gasdichten Bruttöpfen mit Sauerstoffbinder (Anaerocult A, Merck Millipore, Billerica, USA) bei 36 °C ± 1 °C in Sauerstoff abgereicherter Atmosphäre kultiviert und innerhalb von 48h untersucht. Umweltisolate wuchsen ohne erhöhte CO<sub>2</sub>-Spannung bei 36 °C ± 1 °C im Brutschrank bis zu weiteren Untersuchungen.

Nach Ausschluss von 25 nicht zumindest auf Genusebene differenzierter Wildstämme wurden insgesamt 1332 Bakterienstämme erfasst. Darunter befanden sich 384 Gram-positive Kokken, 56 Gram-negative Kokken, 190 Gram-positive Stäbchen, 692 Gram-negative Stäbchen (einschließlich 244 Anaerobier) und zehn *Gardnerella*-Isolate.

Bei der Auswahl der Bakterienisolate wurden insbesondere auch solche Keime berücksichtigt, die in der Routinediagnostik entweder nicht häufig isoliert werden oder solche, deren Differenzierung nur unter Einsatz weiterer Untersuchungsmethoden lediglich teilweise eindeutig gelang. Die Liste der in die Vitek MS-Datenbank eingepflegten Stämme wurde in der Auswahl nicht berücksichtigt.

Zur Kalibrierung des Massenspektrometers wurden Isolate des ATCC-Stamms

## 2 Material und Methodik

Tabelle 2.1: Überblick über die Genera der Referenzstämme und Anzahl der getesteten Stämme

Genus	Anzahl der Referenzstämme
<i>Acinetobacter</i>	1
<i>Actinomyces</i>	1
<i>Aerococcus</i>	1
<i>Aggregatibacter</i>	5
<i>Bacillus</i>	2
<i>Bacteroides</i>	1
<i>Bordetella</i>	1
<i>Burkholderia</i>	1
<i>Capnocytophaga</i>	1
<i>Cardiobacterium</i>	1
<i>Citrobacter</i>	1
<i>Clostridium</i>	3
<i>Corynebacterium</i>	1
<i>Enterobacter</i>	2
<i>Enterococcus</i>	3
<i>Escherichia</i>	1
<i>Fusobacterium</i>	1
<i>Gardnerella</i>	1
<i>Haemophilus</i>	48
<i>Klebsiella</i>	2
<i>Listeria</i>	1
<i>Micrococcus</i>	1
<i>Neisseria</i>	30
<i>Porphyromonas</i>	1
<i>Proteus</i>	2
<i>Pseudomonas</i>	2
<i>Salmonella</i>	2
<i>Shigella</i>	2
<i>Staphylococcus</i>	3
<i>Stenotrophomonas</i>	1
<i>Streptococcus</i>	4

8739 (*Escherichia coli*) – entsprechend den Herstellervorgaben nicht älter als 24h – verwendet.

## 2.2 Massenspektrometrie

### 2.2.1 Präparation der Proben und Messvorgang

Zur massenspektrometrischen Messung wurden der Agarplatte einzelne Bakterienkolonien mit einem sterilen Holzstäbchen entnommen und direct auf Einweg-Bestimmungsplatten (VITEK MS-DS target slide, bioMérieux) aufgetragen. Eine Bestimmungsplatte bestand aus 48 Probenspots und drei Kalibrierspots, davon jeweils ein Kalibrierspot pro 16-er Feld (sogenannte Erfassungsgruppe). Zeilen wurden unterteilt durch die Buchstaben A bis K und Reihen werden von 1 bis 4 durchnummeriert.

Alle untersuchten Isolate wurden nach dem Standardprotokoll des Herstellers gemessen: Nach Auftragen des Untersuchungsmaterials auf den jeweiligen Spot wurde dieses direkt mit  $1\ \mu\text{l}$  Matrix (VITEK MS-CHCA, bioMérieux) – bestehend aus gesättigter  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in 50 % Acetonitril und 2,5 % Trifluoressigsäure – versetzt und luftgetrocknet. Dadurch kristallisierte das Gemisch aus Probe und Matrix innerhalb weniger Minuten aus.

Als Voraussetzung für eine zuverlässige Analyse stellte Hsieh 2008 die Forderung auf, mindestens  $10^4$  Bakterienzellen zu messen<sup>44</sup>, andere Autoren wie Sauer fordern zwischen  $10^5$  und  $10^7$  Bakterienzellen<sup>84</sup>.

### 2.2.2 Erweiterung des Messprotokolls

Im Verlauf der Studie wurde das massenspektrometrische Messprotokoll erweitert. Dazu wurden die letzten 316 Isolate zusätzlich in einem zweistufigen Verfahren nach Auftragen der Probe auf den *Slide* zunächst mit  $0,5\ \mu\text{l}$  Ameisensäure (VITEK MS-FA, bioMérieux) versetzt. Nach der Lufttrocknung innerhalb von zehn Minuten erfolgte in einem zweiten Schritt die Kristallisation des Lysats mit  $1\ \mu\text{l}$  Matrix.

Zum Ausschluss eines ungünstigen Proben-Matrix-Verhältnisses und aufgrund der Überlegung, dass der Referenzspot bei einem Durchmesser von 2,0 mm im Vergleich zum Probenspot von 2,5 mm Durchmesser auf das 1,56-fache der Matrixmenge pro Fläche kommt, wurden die genannten Isolate zusätzlich mit der doppelten Matrix-

## 2 Material und Methodik

menge gemessen, auch in Anlehnung an Arbeiten z.B. von Seng und Croxatto<sup>14;86</sup>.

Gesammelt wurden hierzu Stämme mit dem Schwerpunkt auf den Genera *Haemophilus*<sup>103</sup>, *Streptococcus* (vergrünende Streptokokken)<sup>46</sup>, *Bacillus*<sup>31;52;87</sup>, *Burkholderia*<sup>30;60</sup> und *Citrobacter*<sup>80</sup>.



### 2.2.3 Auslesen und Darstellung der massenspektrometrischen Rohdaten

Sobald die Proben im Laborinformationssystem registriert und ausreichend getrocknet waren, wurde die präparierte Bestimmungsplatte in das Massenspektrometer – ein lineares MALDI TOF MS (AXIMA Assurance, *Shimadzu Corporation*, Nakagyo-ku, Kyōto, Japan) – eingesetzt. Nach Aufbau und Erreichen des benötigten Vakuums innerhalb der Ionisationskammer, Laserquelle und der Flugzeitröhre erfolgte zunächst die Messung des Kalibrierungsspots für bis zu 16 konzentrisch angeordnete Probenspots. Abhängig vom Ergebnis der Kalibrationsmessung wurde schließlich die Analyse durch das Vitek MS-System durchgeführt. Hierzu wurde durch das System das gemessene Spektrum als Peakmuster prozessiert und in einen vom Standard-XML(*Extended-markup-language*)-Dateiformat abgeleiteten MZML-Format abgespeichert. Zur Interpretation der Daten unterteilt das System (Vitek MS-System IVD, bioMérieux) Massenpeaks im Spektralbereich von 3 bis 17 kDa in 1300 *bins*. Über einen Algorithmus des Systems wurden die Messdaten unter unterschiedlicher Gewichtung der Peaks mit Mustern von Spektren und Superspektren der Auswertungsdatenbank verglichen. Bei Übereinstimmung mit einem oder mehreren Mustern der Vitek MS-Knowledgebase (bioMérieux) Version 2.0 wurde durch das System ein Konfidenzwert berechnet und ein Konfidenzsymbol über ein auf einem *Webbrowser* basierendes *Frontend* ausgegeben.

### 2.2.4 Auswertung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen

Alle Isolate wurden zumindest einmalig in der Massenspektrometrie gemessen. Bei einem Konfidenzwert  $< 99,9\%$ , keinem oder mehr als einem Ergebnis erfolgte eine einmalige Nachmessung entsprechend der Empfehlung des Herstellers. Identifizierungsergebnisse auf Speziesebene wurden bei einem Konfidenzwert  $\geq 90\%$ , auf Genusebene bei  $\geq 60,0\%$  akzeptiert<sup>21</sup>.

Eine Ausnahme galt für die Spezies *Streptococcus dysgalactiae*, wenn das Vitek MS-System für die Subspezies *Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae* und *Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis* jeweils beide Subspezies optional mit einem Konfidenzwert von 50 % angab.

## 2 Material und Methodik

Standen nach zwei Messungen mehrere Genera zur Auswahl, wurde die Messung als ergebnislos gewertet<sup>21</sup>. Ebenso wurden Messungen wiederholt, die mit den Hinweisen „not enough peaks“, „bad spectrum“, „too much background noise“ oder „too many peaks“ gekennzeichnet waren. War lediglich die Spezies unterschiedlich, so galt das Genus, nicht jedoch die Spezies als identifiziert.

### 2.2.5 Zusammenführung der Messdaten

Zum eigenständigen Vergleich der Messdaten wurden Dateien mit den Peakmustern aus einem vorkonfigurierten Verzeichnis des Middleware-Servers kopiert, decodiert und in eine PostgreSQL-Datenbank (PostgreSQL Global Development Group, <http://www.postgresql.org>) eingelesen.

Die verwendeten Daten wurden zuvor bereits durch die Steuerungssoftware des Vitek MS-Systems prozessiert – das ursprünglich gemessene massenspektrometrische Spektrum in ein Peakmuster konvertiert – und im MZML-Dateiformat nach Konvention der HUPO (*Human Proteome Organization*, Santa Fe, New Mexico, USA) gespeichert. Die Zuordnung der Probe erfolgte anhand des Dateinamens, welcher Informationen zu Messposition, Probenbezeichnung, Bezeichnung des Messspots, eine Zuordnung zum Referenzpunkt, das Messdatum und die Position in der Messserie (in der Studie nicht verwendet, die Serie bestand somit aus einem Spot) enthielt.

Aus der Probenbezeichnung konnte auch das verwendete massenspektrometrische Protokoll ausgelesen werden. Die Kennzeichnung erfolgte über die Infixe ‚FA‘ für Säureextraktion mit  $0,5\ \mu\text{l}$  Ameisensäure, ‚my2‘ für  $2\ \mu\text{l}$  Matrix. Das Fehlen eines solchen Infixes kennzeichnete standardmäßig das Standardprotokoll mit  $1\ \mu\text{l}$  Matrix ohne Säureextraktion. Der vollständige Algorithmus, der auch die Möglichkeiten beinhaltet, einige Nährmedien zu decodieren (in dieser Arbeit nicht verwendet) und Kalibrationsdaten zuzuordnen, ist im Anhang, Abschnitt 6.6.1 dargestellt.

Die Messdaten lagen in der Datei in komprimiertem Iso-normierten Format vor (*little endian 64bit*-Fließkommazahl). Die Daten wurden decodiert und in die Datenbank geschrieben. Mit den Referenzdaten der Kalibrierungsspot wurde ebenso

verfahren.

Der Aufbau der PostgreSQL-Datenbank ist im Abschnitt 2.6 ausführlich dargestellt.

### 2.3 Bestätigungsmethoden

Eine gesonderte Aufstellung der Bestätigungsmethoden findet sich für die einzelnen Isolate im Anhang, Tabelle 6.3. Die folgenden Absätze beschreiben die grundlegenden Prinzipien der Differenzierungsmethodik der Bestätigungstests.

#### 2.3.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologische Differenzierung der Bakterienstämme erfolgte durch Sequenzierung eines im Durchschnitt 713,3 bp (Median 729 bp, Standardabweichung 92 bp) umfassenden Teilabschnitts des 16S rRNA-Gens (Region V1 bis V3)<sup>40;58;68</sup>, im Folgenden als eubakterielle PCR abgekürzt, oder Fragmente anderer Haushaltsgene: ein im Durchschnitt 366,3 bp (Median 378 bp, Standardabweichung 22,3 bp) umfassendes Fragment des Superoxiddismutase A-Gens (*sodA*) für Streptokokken<sup>77</sup> und Staphylokokken<sup>76</sup>, und ein 869 bp umfassendes Fragment des Rekombinationsprotein A-Gens (*recA*) zur Differenzierung von *Burkholderia*-Isolaten<sup>74;101</sup>.

##### 2.3.1.1 DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion wurde von dem entsprechenden Festnährmedium eine koloniebildende Einheit (KBE) mittels Impfnadel in ein mit *Glasbeads* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 100 µl HPLC- (*high performance liquid chromatography*) Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beschicktes Reaktionsgefäß eingebracht. Es folgte die thermische Lyse im Reaktionsgefäß für zehn Minuten bei etwa 100°C in einem Heizblock (Liebisch, Bielefeld, Deutschland). Nach dem Abkühlen der Proben wurden diese im Anschluss für zehn Minuten in einem Vortexmischer (IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland) durchmischt. Das Gemisch wurde danach für fünf Minuten bei 10.000 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich, Tuttlingen, Deutschland), der flüssige Überstand unter Belassen des Sediments entnommen und in ein beschriftetes und vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt.

### 2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung

Zur Amplifikation wurde 1  $\mu\text{l}$  des zuvor gewonnenen DNA-Extraktes nach oben genannter Methode in einem Reaktionsgefäß mit

- 5  $\mu\text{l}$  PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3 , Qiagen),
- 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM),
- 0,4  $\mu\text{l}$  DNA-Polymerase (AmpliTaq<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase with Buffer II and  $\text{MgCl}_2$ , Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA),
- 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (dNTP Set 100 mM Solutions GE Healthcare, Little Chalfont, UK, aliquotiert 20  $\mu\text{l}$  auf 720  $\mu\text{l}$  Water PCR grade (Roche, Basel, Schweiz)),
- Primerpaare 16S-rRNA-PCR (Konzentration je 10  $\mu\text{M}$  pro  $\mu\text{l}$ )
  - 1  $\mu\text{l}$  27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Sigma-Aldrich),
  - 1  $\mu\text{l}$  519R 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3' (Sigma-Aldrich)oder
- Primerpaare *sodA*-PCR (Konzentration je 20  $\mu\text{M}$  pro  $\mu\text{l}$ )
  - 1  $\mu\text{l}$  *d1* 5-CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC-3 (Sigma-Aldrich),
  - 1  $\mu\text{l}$  *d2* 5-ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC-3 (Sigma-Aldrich)oder
- Primerpaare *recA*-PCR (Konzentration je 20  $\mu\text{M}$  pro  $\mu\text{l}$ )
  - 1  $\mu\text{l}$  BUR1 5'-GATCGAGCTCCCGAGAAATCAGCCGTTGG-3' (Sigma-Aldrich),
  - 1  $\mu\text{l}$  BUR2 5'-CTAGGGATCCATATAGATCTGCAATATCACTATTTTGG-3' (Sigma-Aldrich)

und HPLC-Wasser auf 50  $\mu\text{l}$  aliquotiert. Das Gemisch wurde anschließend mit dem Vortexmischer kurz durchmengt.

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (T3 und T3000, Biometra, Göttingen, Deutschland), siehe Tabelle 2.2.

## 2 Material und Methodik

Tabelle 2.2: PCR-Programme 16S rRNA-Gen, *sodA*, *recA*

Phase	16S rRNA-PCR	<i>sodA</i> -PCR	<i>recA</i> -PCR
Initiale Denaturierung	10 min bei 95 °C		
Denaturierung	30 sec bei 94 °C	30 sec bei 94 °C	30 sec bei 94 °C
Hybridisierung	90 sec bei 52 °C	90 sec bei 37 °C	30 sec bei 60 °C
Elongation	180 sec bei 72 °C	90 sec bei 72 °C	45 sec bei 72 °C
Anzahl Zyklen	33	35	30
Inkubation	10 min bei 72 °C	10 min bei 72 °C	5 min bei 72 °C
Abkühlung	4 °C		

### 2.3.1.3 Aufreinigung des PCR-Produkts

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande).

Zunächst wurde eine 90 %-ige 2-Propanol-Lösung (Waschpuffer) hergestellt.

Zur Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgten folgende Schritte:

Das PCR-Produkt wurde in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200  $\mu$ l gebrauchsfertigen *Binding*-Puffer (PB) des Purification Kits gemischt und anschließend gevortext.

Dieser Ansatz wurde auf die QIAquick Spin Column (Säule) pipettiert und danach eine Minute bei  $\geq 10.000$  g zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5436) und das entstandene Eluat verworfen.

In einem nächsten Schritt wurden 750  $\mu$ l Waschpuffer auf die Säule pipettiert und zweimal jeweils eine Minute bei  $\geq 10.000$  g zentrifugiert und das Eluat verworfen.

Nach Austausch des Auffanggefäßes wurde zur Lösung des aufgereinigten PCR-Produkts aus der Membran der Säule 30  $\mu$ l des gebrauchsfertigen Elutions-Puffers (auf die Mitte der Säule) aufpipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

## 2 Material und Methodik

Das Gemisch wurde noch einmal bei  $\geq 10.000$  g zentrifugiert und die Säule verworfen.

### 2.3.1.4 PCR-Produktkontrolle

Die anschließende Produktkontrolle erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurden Gelplatten, 2%-ige Agarosegele in TBE-Puffer hergestellt (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland).

Der eingesetzte TBE-Puffer bestand aus:

- 108 g Tris ultrapure (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- 9,3 g EDTA-disodium (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- 55 g Borsäure z.A. (Merck KGaA) sowie SEAKEM ME Agarose (Biozym Scientific GmbH) auf 1 l Aqua dest.

Der GEBS-Probenmarker:

- 20% Glycerin
- 50mM EDTA
- 0,05% Bromphenolblau
- 0,5% N-Lauroylsarkosine (Sigma Chemical St. Louis, USA)

Das Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer eingelegt, mit Puffer umspült und danach 8  $\mu$ l Probe mit 2  $\mu$ l Probenmarker in die Kammern des Gels eingebracht.

Die Elektrophorese erfolgte mit einer monopolen Spannung von 10  $\frac{V}{cm}$  für zehn Minuten.

Zur photochemischen Entwicklung wurde danach das Gel für zehn Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (Merck KGaA) inkubiert und anschließend mit UV-Licht Transluminator durchleuchtet<sup>88</sup>.

### 2.3.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung des amplifizierten Produkts erfolgte nach der Methode von Sanger<sup>83</sup> zum Teil durch die Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz) in Auftrags-

## 2 Material und Methodik

leistung. Dazu wurden abhängig von der Stärke der Bande in der Gelelektrophorese – um eine DNA Konzentration von etwa  $10 - 40 \frac{ng}{\mu l}$  zu erreichen –  $1 \mu l$ ,  $5 \mu l$  oder  $9 \mu l$  des aufgereinigten PCR-Produkts mit  $1 \mu l$  reversen *Primer* (eubakterielle PCR: 519R, *sodA*-PCR: d2, *recA*-PCR: B2) und gegebenenfalls mit HPLC auf insgesamt  $10 \mu l$  aliquotiert.

Ein Teil der Proben der eubakteriellen PCR wurde in domo mit Hilfe des Hitachi / Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzers inklusive GeneMapper Software (ABI, Applied Biosystems, Incorporation, mittlerweile integriert in Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) sequenziert.

Zur Durchführung wurde ein Gesamtansatz auf  $10 \mu l$  erstellt und beinhaltete:

- $2-7 \mu l$  Eluat (abhängig von der Stärke der Bande im Agarosegel),
- $1 \mu l$  Primer 519R (Konzentration,  $10 \text{ pmol}/\mu l$ ),
- $2 \mu l$  Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (ABI),
- aliquotiert mit HPLC-Wasser auf  $10 \mu l$ .

Die Sequenzier-PCR erfolgte im Thermocycler (T3 und T3000, Biometra), siehe Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3: Programm der Sequenzier-PCR

<b>Phase</b>	<b>Sequenzier-PCR</b>
Initiale Denaturierung	1 min bei $96^\circ\text{C}$
Denaturierung	10 sec bei $96^\circ\text{C}$
Hybridisierung	5 sec bei $55^\circ\text{C}$
Elongation	240 sec bei $60^\circ\text{C}$
Anzahl Zyklen	25
Inkubation	10 min bei $72^\circ\text{C}$
Abkühlung	$4^\circ\text{C}$

Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der Sequenzierprodukte durch Centri-sep Spin Columns (ABI). Diese Columns wurden zunächst mit  $800 \mu l$  HPLC-Wasser versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis ein homogenes Gel entstanden ist. Um das überschüssige HPLC-Wasser zu entfernen, wurden die präparierten Centri-Sep Spin Columns 2 min bei  $750 \text{ g}$  ( $3000 \text{ RPM}$ ) zentrifugiert.

## 2 Material und Methodik

Das Sequenzierprodukt wurde anschließend auf die Mitte des Gels in der Säule aufgetragen und 2 min bei 750 g in ein Auffanggefäß zentrifugiert, das entstandene Eluat in eine SpeedVac-Sequenzierplatte (ABI) pipettiert und mit Hi-Di Formamide (ABI) versetzt und anschließend mit dem Sequencer (3130XL Genetic Analyzers) analysiert.

### 2.3.1.6 Auswertung der Sequenzen

Zur Darstellung der Sequenzen wurde das lizenzfreie Programm TraceEdit (Ridom) zur Überprüfung der Sequenzqualität (Länge, Intensität, Reinheit) verwendet. Bei unzureichender Qualität wurde der entsprechende Sequenzvorgang wiederholt oder die Sequenz getrimmt, in dem Anfang und / oder Ende der Sequenz um Nukleotide gekürzt wurden, welche eine Signalintensität unter 40 % aufwiesen. Die nun modifizierte Sequenz wurde analysiert.

Die Ergebnisse der eubakteriellen PCR wurden mit der jeweiligen BLAST-Software der Datenbanken LeBibi (Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Universität Lyon, Frankreich), Greengenes (Center for Environmental Biotechnology Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, USA), GenBank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Untereinrichtung des National Institutes of Health (NIH), USA), und Ridom<sup>7;12;16;17</sup> abgeglichen. Bei einer Übereinstimmung der Sequenz mit Einträgen der Datenbank von  $\geq 98,6\%$  entsprechend Drancourt<sup>18;47</sup> oder hohem Identifikationsscore galt das Isolat bei Übereinstimmung der Ergebnisse auf Speziesebene eindeutig identifiziert. Niedrigere Scores wurden zur Identifikation auf Genusebene zugelassen, wenn alle übereinstimmenden Ergebnisse dem gleichen Genus angehörten, die Übereinstimmung  $\geq 85\%$  und der ermittelte Scorewert einen deutlichen Abstand zu Referenzstämmen anderer Genera aufwies. Eine zusätzliche Hilfe zur Auswertung bot das BLAST-Webinterface der Datenbank LeBibi durch die Darstellung eines Dendrogramms. Abweichende Ergebnisse einzelner Datenbanken mit geringeren Scorewerten wurden nicht gewertet, ebenso Übereinstimmungen mit nicht eindeutig auf Speziesebene differenzierten, nicht kultivierten oder durch die Datenbank gesondert markierten Bakterienstämmen.

Konnte durch die eubakterielle PCR kein Ergebnis erzielt werden, so erfolgte in



## 2 Material und Methodik

Ausnahmefällen eine weitere, spezifische PCR.

*Burkholderia*-Stämme der Stammsammlung wurden einzig durch *recA*-PCR identifiziert, Wildstämme des Genus – falls notwendig – weiter differenziert. Isolate der Genera *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Corynebacterium* wurden bei nicht eindeutiger Identifikation durch die eubakterielle PCR durch eine zusätzliche *sodA*-PCR ergänzend untersucht.

Die Auswertung der Sequenzen der Haushaltsgene Superoxiddismutase A (*sodA*) oder Rekombinationsprotein A (*recA*) erfolgte durch die BLAST-Programme der Datenbanken GreenGene, LeBibi und NCBI Blast.

### 2.3.2 Gramfärbung

Vor Anwendung von biochemischen Methoden oder bei widersprüchlichen Ergebnissen der Untersuchungsmethoden wurde das Gramverhalten des Isolats bestimmt.

Zusammensetzung der Reagenzien:

Kristallviolett:

- Herstellung der Stammlösung aus
  - 100 g Kristallviolett (Merck KGaA) gelöst in 2,5 l 96 %-igem Ethanol (Brüggemann, Heilbronn, Deutschland),
  - 100 ml Phenol (Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze, Deutschland) gelöst in 2,5 l 96 %-igem Ethanol
- Ein Teil der Stammlösung wurde mit acht Teilen demineralisiertem Wasser zur gebrauchsfertigen Lösung verdünnt

Lugolsche Lösung:

- 40 g Kaliumiodid (Merck KGaA)
- 20 g Iod (Merck KGaA)
- 6 l demineralisiertes Wasser. Die Lösung wurde kurz aufgekocht.

Safraninlösung:

- Herstellung der Stammlösung aus 150 g Safranin (Merck KGaA) gelöst in 5 l demineralisiertem Wasser

## 2 Material und Methodik

- Ein Teil Stammlösung wurde mit fünf Teilen demineralisiertem Wasser zur gebrauchsfertigen Lösung verdünnt

Vorgehensweise:

- Entnahme einer KBE, Lösen und Verteilen der Probe mit einem Tropfen 0,9%iger NaCl-Lösung auf einem Objektträger, Hitzefixation
- Färbung mit Kristallviolett, Einwirkzeit 15 Sekunden
- Bildung von Farbstoff-Komplexen mit Lugolscher Lösung, Einwirkzeit 15 Sekunden
- Entfärben Gram-negativer Bakterien mit 96 %igem Ethanol bis keine violetten Schlieren zu sehen sind
- Gegenfärbung mit verdünnter Safraninlösung, Einwirkzeit 15 Sekunden
- Abwaschen der Farbreste mit Leitungswasser
- Trocknung des Präparats
- Mikroskopie in 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl

### 2.3.3 Biochemische Methoden

#### 2.3.3.1 Vitek 2-System

Falls eine eubakterielle PCR nicht ausreichend diskriminierend war – gefordert wurde eine gute Speziesdifferenzierung –, initial bei *Enterobacteriaceae* oder es zwischen eubakterieller PCR- und Vitek-MS-Identifikation Widersprüche gab, erfolgte die phänotypische Keimidentifikation mit dem Vitek 2-System (bioMérieux).

Nach mikroskopischer Beurteilung des Gramverhaltens und der Morphologie der Isolate erfolgte die Analyse Gram-negativer Erreger mit der Testkarte VITEK 2 ID-GNB (bioMérieux). Zur Identifikation Gram-positiver Kokken wurde die Testkarte VITEK 2 ID-GPC (bioMérieux)<sup>37;55;56</sup> verwendet.

Die Proben wurden hierzu entsprechend der Herstellerempfehlung in einem Reagenzgefäß mit etwa 4,5 ml 0,45 %-iger NaCl-Lösung auf eine optische Dichte von 0,5-0,63 McFarland eingestellt.

Isolate im Vitek 2-System galten als identifiziert, wenn das System die Identifikation als „ausgezeichnet“, „sehr gut“, „gut“ oder „akzeptabel“ klassifizierte. Dies

## 2 Material und Methodik

entsprach einem Konfidenzwert von  $\geq 85\%$ <sup>72</sup>. Bei Angabe einer „geringen Selektivität“ erfolgte, falls möglich, eine Leitreaktion (vgl. Absatz 2.3.3.3) oder eine molekularbiologische Differenzierung (vgl. Absatz 2.3.1).

### 2.3.3.2 Analytical Profile Index-System

Mit dem *Analytical Profile Index*-System (kurz API, bioMérieux) konnten Corynebakterien, Neisserien, *Bacillus*, *Haemophilus* Spezies und anaerobe Isolate differenziert werden; die angebotenen Vitek 2-ID-Karten wurden für diese Bakterien nicht eingesetzt, da diese weder in der Routinediagnostik angewendet werden, noch intern validiert sind. Zur Identifikation kamen daher folgende API-Systeme zum Einsatz: API Coryne für Corynebakterien, API 20 E für *Yersinia enterocolitica*-Isolate, API 20 A für anaerobe Keime, API 20 NE für Gram-negative Non-Fermenter und API NH für Neisserien- und *Haemophilus*-Stämme entsprechend Herstellervorgaben<sup>6;36</sup>. Die Proben wurden in 0,45 %-iger NaCl-Lösung bei einer optischen Dichte von 0,5 oder 6 bis 8 McFarland (je nach API-System) eingestellt, für 24h (API 20 E, API Coryne, API NH, API 20 NE) bis 48h (API 20 A) inkubiert und die Reaktionen der einzelnen Reaktionskammern nach Herstellerangaben ausgewertet. Zur Auswertung wurde das Webinterface des Herstellers (apiweb, bioMérieux) verwendet. Identifikationen mit Wahrscheinlichkeiten über 85 % ohne Widerspruch wurden akzeptiert.

### 2.3.3.3 Weitere biochemische Methoden

Zur Differenzierung von *Shigella* Isolaten erfolgte zusätzlich die Anlage auf einem Lysin-Indol-Motilitäts-Agar:

- 1000 ml Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen),
- 5 g Bacto Pepton (BD),
- 3 g Hefeextrakt (BD),
- 15 g Pepton aus Casein tryptisch (Merck KGaA),
- 1 g Glucose (Merck KGaA),
- 5 g L-Lysinhydrochlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe),
- 5 g NaCl (Roth),
- 2 g Agar-Agar (BD),
- Bromkresolpurpur, 1 ml einer 1,6%igen Lsg. (Merck KGaA)

Das Nährmedium wurde nach Zusammensetzung auf einen pH-Wert von  $6,6 \pm 0,2$

## 2 Material und Methodik

eingestellt und anschließend 15 min bei 121 °C autoklaviert. Die Bebrütung erfolgte über  $24\text{h} \pm 2\text{h}$  bei  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

Zur Differenzierung von Salmonellen wurde ein Salmonellen-Agglutinationskit SI-FIN (Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin) verwendet.

Die Einteilung  $\beta$ -hämolyzierender Streptokokken in Lancefield-Gruppen geschah mittels Streptex (Oxoid, Basingstoke, Hants, United Kingdom).

Um innerhalb der *Streptococcus-mitis*-Gruppe Pneumokokken von anderen vergärenden Streptokokken zu differenzieren wurde zusätzlich zu eubakterieller PCR die Sensitivität gegenüber Optochin auf Columbia-Blutagar mittels Plättchen-Agardiffusionstest geprüft. Dazu wurden Kulturen auf Blutagar im 3-Ösen-Ausstrich angelegt und in die Mitte der ersten Fraktion ein Plättchen mit  $5\mu\text{g}$  Optochin (IFFMEDIC GmbH, Herford, Deutschland) gelegt und Plättchen nahes Wachstum nach  $24\text{h} \pm 2\text{h}$  Bebrütung bei  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  in 5%iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre beurteilt. Bei einem Durchmesser des Hemmhofs  $\geq 14\text{ mm}$  galt das Isolat als sensibel gegenüber Optochin<sup>75</sup>.

Zur Überprüfung divergenter Ergebnisse oder Abklärung zweier optionaler Identifikationen wurden mikrobiologische Leitreaktionen durchgeführt. Dies betraf nicht die massenspektrometrischen Ergebnisse.

### 2.3.4 Identifikation von *Neisseria* und *Haemophilus* Stämmen durch das NRZMHi

Die Differenzierung von *Haemophilus* und *Neisseria* Stämmen erfolgte bei nicht eindeutigen Ergebnissen durch das Nationale Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae*.

## 2.4 Teilautomatisierter Taxonomieabgleich

Die Nomenklatur zur Bezeichnung der Bakterienstämme wurde an die Definitionen des *International Committee on Systematic Bacteriology* (ICSB)<sup>51</sup> in der Fassung

von September 2013 angepasst, abweichende Ergebnisse wurden angeglichen. Dazu wurden Bakterienamen mittels Software-Interface zum Internet Explorer (Microsoft, Seattle, USA) über Suchmaschinen abgefragt und verglichen, sowie Rechtschreibfehler oder überholte Bakterienbezeichnungen behoben. Genutzte Quellen waren die NCBI *taxonomy database*<sup>29</sup> und die Datenbank Bacterio (<http://www.bacterio.net/>)<sup>24</sup>.

### 2.5 Taxonomische Einordnung

In Analogie zur Eigenschaft der ribosomalen RNA-Untereinheiten als taxonomischer Marker in der Systematik der Bakterien wurden die Isolate in Bakterienordnungen klassifiziert und zusammengefasst. Dies diente u.a. dazu, abweichende Identifikation hinsichtlich der Spezifität der Peaks zu untersuchen und zu vergleichen. Als Grundlage der Einordnung diente das Ergebnis, welches durch die Anwendung der Referenzmethoden ermittelt wurde oder – falls vorhanden – auch die Stammbezeichnung von Typstämmen oder den oben genannten Stammsammlungen. Eine gesonderte Auswertung erfolgte bei Ordnungen, die durch mindestens 20 Isolate repräsentiert wurde.

### 2.6 Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Untersuchungen ohne eindeutige Genus- und Speziesdifferenzierung oder ohne Ergebnis wurden einmal wiederholt. Die endgültigen Untersuchungsergebnisse aus Keimname und Konfidenzwert wurden in eine separate PostgreSQL-Datenbank eingepflegt. Dies diente auch dazu, die Daten mit den Rohdaten der massenspektrometrischen Untersuchung zusammenzuführen oder Teilergebnisse abfragen zu können (vgl. 2.2.3).

Zum Vergleich der Übereinstimmungen zwischen Typstammbezeichnung und den Ergebnissen sowohl der Referenzmethoden als auch der massenspektrometrischen Untersuchungen wurde eine Software erstellt. Diese diente neben der Darstellung aller Ergebnisse eines Isolats auch der Beurteilung der Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Vitek MS und den übrigen Ergebnissen.

## 2 Material und Methodik

Der Algorithmus überprüfte Vorhandensein und Eindeutigkeit der Identifikation je Methode anhand der Anzahl der Ergebnisse sowohl auf Genus- als auch auf Speziesebene. Die massenspektrometrischen Untersuchungsergebnisse wurde mit einer etwaig vorhandenen Stammbezeichnung oder den Ergebnissen der Referenzmethoden verglichen.

In Einzelfällen gab es Unterschiede zwischen eindeutigen Ergebnissen unterschiedlicher Referenzmethoden. In diesen Fällen war eine manuelle Bewertung der Ergebnisse notwendig. Diese Fälle und deren Bewertung sind in Abschnitt 3.2 dargestellt.

Manuelle Korrekturen wie z.B. Rechtschreibfehler und die damit zusammenhängenden Fehlinterpretationen bedingt durch die falsche Anzahl unterschiedlicher Genera oder Spezies und deren Übereinstimmung konnten über die Software erfolgen.

Zur Vereinfachung der Datenbankabfrage wurde durch die Software eine Kreuztabelle aus Vitek MS und den verglichenen Referenzergebnissen erstellt. Die Darstellung des Algorithmus findet sich im Anhang, Abschnitt 6.6.2 und ist Teil eines erstellten grafischen Überbaus (*Front-End*) mit Datenbankanbindung an oben genannte PostgreSQL-Datenbank (siehe Abschnitt 2.2.5).

### 2.7 Statistische Tests

Die statistische Signifikanz zwischen zwei Verfahrensweisen wurde mit dem McNemar-Test mit Edwards-Korrektur im 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Für Hypothesentests wurden Chi-Quadrat-Test und exakter Fisher-Test, bei kleinen Zahlen nur letzterer eingesetzt. Die Konvergenz wurde durch die Berechnung des ungewichteten Cohens Kappa geprüft.

Die Berechnung erfolgte Computer gestützt mit dem quelloffenen Programm R (Version 3.1.1, Cran-Project). Zur Berechnung des exakten Fisher-Tests wurde zusätzlich die Bibliothek „exact2x2“<sup>26;27;28</sup>, zur Berechnung des ungewichteten Cohens Kappa die Bibliothek „psych“<sup>98</sup> verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Überblick über das untersuchte Kollektiv

Insgesamt wurden 1357 Bakterienisolate untersucht. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde – falls notwendig – die Nomenklatur an die Definitionen des *International Committee on Systematic Bacteriology* (ICSB)<sup>51</sup> in der Fassung von September 2013 angeglichen.

Alle Isolate wurden mit dem gängigen Standardprotokoll entsprechend den Herstellervorgaben, einer direkten Inokulation von 1  $\mu$ l *Ready-to-use* Matrix und der Bakterienprobe auf der Bestimmungsplatte, massenspektrometrisch mit dem Vitek MS-System untersucht. Die Ergebnisse wurden mit mindestens einer Referenzmethode oder im Falle von Typstämmen mit deren Bezeichnungen verglichen. Falls eine exakte Speziesdifferenzierung mit einer der universellen Identifikationsmethoden nicht gelang, wurden – soweit geeignete Methoden verfügbar waren – spezifischere oder ergänzende Tests durchgeführt. Divergente Ergebnisse zwischen den Referenzmethoden traten in zwei Fällen auf, eine Darstellung der Auswertung dieser Ergebnisse ist in Absatz 3.2 dargestellt.

57 Isolate entstammten der Stammsammlung der mikrobiologischen Routinediagnostik des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden zur Auswertung deren Isolate nicht der Gruppe der Typstammsammlungen oder fremddifferenzierten Ergebnisse zugeordnet.

101 Stammbezeichnungen waren vorbekannt und entstammten entweder offiziellen Typstammsammlungen oder Typstammsammlungen des Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae*.

### 3 Ergebnisse

25 *Haemophilus*-Stämme aus der Laborroutine wurden durch das Nationale Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* identifiziert und der gesonderten Auswertung der Typstämme zugeordnet.

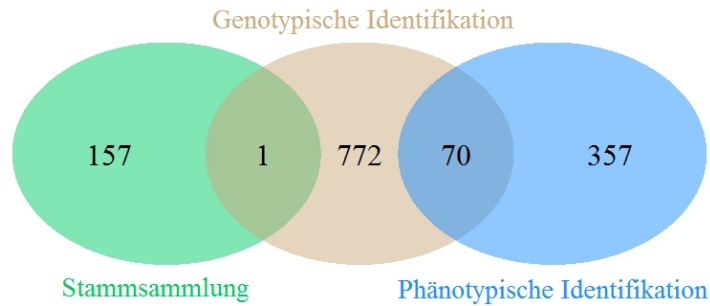
Bei 803 Isolaten wurde eine eubakterielle PCR durchgeführt. In neun Fällen war aufgrund nicht eindeutiger Differenzierung auf Speziesebene der Genera *Staphylococcus* oder *Streptococcus* eine Sequenzierung des Superoxiddismutase A-Gens (*sodA*) notwendig. Zur Differenzierung von 43 Isolaten des Genus *Burkholderia* wurden Sequenzierungen des *recA*-Gens durchgeführt.

Durch das Vitek 2-System wurden 382 Isolate differenziert. Außerdem wurden drei API Coryne-, vier API E- und 22 API NH-Tests durchgeführt. (siehe Abbildung 3.1)

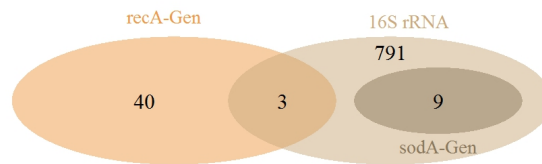


### 3 Ergebnisse

(a) Alle Identifikationsmethoden im Überblick



(b) Genotypische Identifikationsmethoden im Überblick



(c) Phänotypische Identifikationsmethoden im Überblick

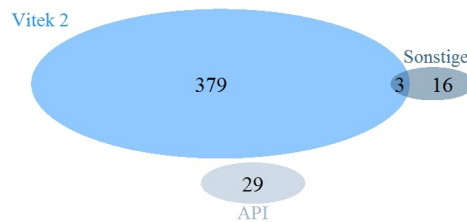


Abbildung 3.1: Stammsammlung: Typsammlungen, Stammsammlungen des NRZMHi. Genotypische Methoden (b): eubakterielle PCR, *sodA*, *recA*.

Phänotypische Methoden (c): Vitek 2, API Coryne, API E, API NH, Gramfärbung, LIM-Medium, Streptex, Optochin-Test, Salmonellen-Agglutination, Wachstum mit Pigment bei 36 °C und 42 °C auf Cetrimid-Agar.

### 3 Ergebnisse

Bei 70 Isolaten erfolgte die Differenzierung durch eubakterielle PCR und Vitek 2.

Von den genannten 1357 Isolaten mussten 25 ausgeschlossen werden ( $\approx 1,8\%$ ), da diese in neun Fällen weder massenspektrometrisch noch durch eine der Referenzmethoden (einschließlich der Sequenzierung des eubakteriellen 16S rRNA-Gens) differenziert werden konnten. 16 weitere Isolate konnten zwar massenspektrometrisch mindestens auf Genusebene differenziert werden, die Anwendung der oben genannten Referenzmethoden erbrachten jedoch kein Ergebnis, sodass ein Vergleich nicht möglich war. Eine detaillierte Darstellung findet sich in Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Übersicht über ausgeschlossene Isolate ohne Ergebnis in mindestens einer Referenzmethode, sowie Ergebnisse Vitek MS-System

Isolat-Nummer	Anzahl	Vitek MS-Ergebnis
221, 230, 243, 266, 1203, 1285, 1286, 1287, 1315	9	Kein Ergebnis
1231	1	<i>Achromobacter</i> species <sup>a</sup>
757	1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
1323	1	<i>Corynebacterium</i> species <sup>a</sup>
1334	1	<i>Corynebacterium coyleae</i>
131	1	<i>Haemophilus</i> species <sup>a</sup>
1318	1	<i>Empedobacter brevis</i>
963	1	<i>Moraxella</i> species <sup>a</sup>
101	1	<i>Moraxella catarrhalis</i>
446, 953	2	<i>Moraxella osloensis</i>
29	1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
1298	1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
1312	1	<i>Pantoea agglomerans</i>
1237, 1238	2	<i>Serratia marcescens</i>
1311	1	<i>Yersinia kristensenii</i>

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich.

Die verbliebenen Teststämme gliederten sich in 29 Bakterienordnungen, die sich in 59 unterschiedliche Familien, 109 Genera und 260 Bakterienspezies unterteilen ließen. Die Gruppierung erfolgte auf Grundlage der phylogenetischen Taxonomie aus Untersuchungen der 16S Untereinheit der ribosomalen rRNA kodierenden rDNA<sup>97</sup>. Dies bot die Möglichkeit, Korrelationen oder Limitationen zwischen Stammbezeichnung und Massenspektrometrie auf unterschiedlichen Differenzierungsgraduierungen zu

### 3 Ergebnisse

untersuchen.

Einen Überblick über die Isolate einer Ordnung an der Gesamtheit der Isolate gibt Tabelle 3.2.

Bei 152 Isolaten konnte deren Spezies durch die angewandten Referenzmethoden nicht ermittelt werden und wurden zur Beurteilung der Performance des Vitek MS-Systems ausgeschlossen. Zur Auswertung verblieben 1180 Isolate ( $\approx 88,6\%$  der Grundgesamtheit aller getesteter Stämme) (vgl. Abbildung 3.2).

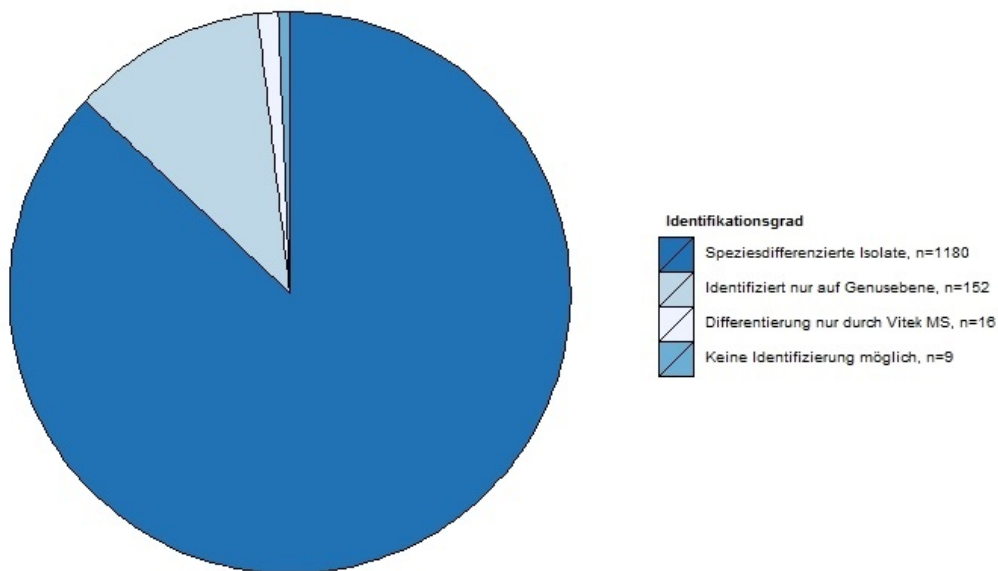


Abbildung 3.2: Überblick über das Identifikationsniveau aller Isolate

Somit verblieben 18 von 152 Isolaten, deren massenspektrometrische Speziesdifferenzierungen bei übereinstimmendem Genus mit der Referenzbezeichnung nicht überprüft werden konnten.

### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.2: Überblick über die Isolate einer Ordnung an der Gesamtheit der Isolate

Ordnung	Anzahl der Isolate der Ordnung		Speziesdifferenzierung durch Referenzmethode	
	(n=)	relativer Anteil aller Isolate	(n=)	relativer Anteil des Genus
<i>Actinomycetales</i>	107	8.03 %	75	70.09 %
<i>Aeromonadales</i> <sup>a</sup>	9	0.68 %	8	88.89 %
<i>Alteromonadales</i> <sup>a</sup>	1	0.08 %	1	100.00 %
<i>Bacillales</i>	183	13.74 %	160	87.43 %
<i>Bacteroidales</i>	95	7.13 %	85	89.47 %
<i>Bifidobacteriales</i> <sup>a</sup>	12	0.90 %	11	91.67 %
<i>Burkholderiales</i>	82	6.16 %	71	86.59 %
<i>Campylobacterales</i> <sup>a</sup>	16	1.20 %	16	100.00 %
<i>Cardiobacteriales</i> <sup>a</sup>	1	0.08 %	1	100.00 %
<i>Caulobacterales</i> <sup>a</sup>	2	0.15 %	2	100.00 %
<i>Clostridiales</i>	81	6.08 %	70	86.42 %
<i>Coriobacteriales</i> <sup>a</sup>	2	0.15 %	2	100.00 %
<i>Enterobacteriales</i>	208	15.62 %	201	96.63 %
<i>Erysipelotrichales</i> <sup>a</sup>	3	0.23 %	3	100.00 %
<i>Flavobacteriales</i> <sup>a</sup>	12	0.90 %	10	83.33 %
<i>Fusobacteriales</i> <sup>a</sup>	14	1.05 %	14	100.00 %
<i>Lactobacillales</i>	196	14.71 %	171	87.24 %
<i>Legionellales</i> <sup>a</sup>	10	0.75 %	10	100.00 %
<i>Neisseriales</i>	47	3.53 %	42	89.36 %
<i>Pasteurellales</i>	101	7.58 %	94	93.07 %
<i>Pseudomonadales</i>	110	8.26 %	102	92.73 %
<i>Rhizobiales</i> <sup>a</sup>	6	0.45 %	6	100.00 %
<i>Rhodobacteriales</i> <sup>a</sup>	2	0.15 %	2	100.00 %
<i>Rhodospirillales</i> <sup>a</sup>	1	0.08 %	1	100.00 %
<i>Selenomonadales</i> <sup>a</sup>	8	0.60 %	0	0.00 %
<i>Sphingobacteriales</i> <sup>a</sup>	3	0.23 %	3	100.00 %
<i>Sphingomonadales</i> <sup>a</sup>	8	0.60 %	7	87.50 %
<i>Xanthomonadales</i> <sup>a</sup>	12	0.90 %	12	100.00 %
Summa	1332	100,00 %	1180	88,59 %

<sup>a</sup> In der weiteren Betrachtung wurde diese Ordnung im Absatz **Weitere Ordnungen** zusammengefasst.

## 3.2 Widersprüchliche Ergebnisse der Referenzmethoden

Wurde ein eindeutiges massenspektrometrisches Differenzierungsergebnis durch mindestens eine der Referenzmethoden bestätigt, wurde dies unabhängig von etwaigen weiteren Differenzierungsergebnissen anderer Referenzmethoden als übereinstimmend gewertet.

Solche Widersprüche gab es auf Genusebene bei zwei Isolaten:

- Vitek MS (Konfidenzwert 99,9%), eubakterielle PCR: *Bifidobacterium species*, Vitek 2 (Konfidenzwert 92%): *Streptococcus alactolyticus* und
- Vitek MS (Konfidenzwert 99,9%): *Weissella confusa*, eubakterielle PCR: *Weissella species*, Vitek 2 (Konfidenzwert 93%): *Pediococcus pentosaceus*.

Die zur Identifikation eingesetzte Vitek 2 GP ID Card kann weder Spezies des Genus *Bifidobacterium* noch des Genus *Weissella* identifizieren, so dass dieses Ergebnis ignoriert wurde.

Auf Speziesebene traten Unterschiede bei einem weiteren Isolat auf. Das Vitek MS-System und die eubakterielle PCR identifizierten einen *Enterococcus faecium*, Vitek 2 gab diesen Keim als *Enterococcus hirae* (Konfidenzwert: 85%) aus. Hier wurde das Differenzierungsergebnis des Vitek 2 nicht gewertet, da eine Schwäche in der Identifikation von Enterokokken bereits beschrieben wurde und der Konfidenzwert in diesem Fall sehr niedrig liegt<sup>38</sup>.

### 3.3 Auswertung der Identifikationsergebnisse durch das Vitek MS-System

Nach oben genannten Kriterien gab es bei 1332 berücksichtigten Resultaten 1157 (86,9 %,  $r = 0,2 \pm 0,06$  im 95 %-Intervall) Übereinstimmungen auf Genusebene und 16 korrekte Nichtidentifikationen von Stämmen oder Genera, die nicht in die Vitek MS-Datenbank eingepflegt wurden. Unter Berücksichtigung der korrekten Nichtidentifikationen, stimmte das Ergebnis bei 1173 gemessenen Stämmen (88,1 %,  $r = 0,21 \pm 0,07$  im 95 %-Intervall).

Auf Speziesebene gab es 944 Übereinstimmungen von 1180 speziesdifferenzierten Keimen (80 %,  $r = 0,51 \pm 0,05$  im 95 %-Intervall). Acht Isolate ohne entsprechende Referenzstämmen in der Vitek MS-Datenbank wurden nicht identifiziert. Daraus resultieren 952 korrekte Aussagen durch das Vitek MS-System (80,6 %) und eine gute Korrelation der Differenzierungsergebnisse auf Speziesebene ( $r = 0,52 \pm 0,05$  im 95 %-Intervall).

Aufgrund der geringen Anzahl an Gram-negativen Kokken ( $n = 3$ , alle *Neisseria* species), die mit allen drei Methoden untersucht wurden, wurden diese in der speziellen Auswertung nicht mit erfasst.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse innerhalb der Ordnungen

Signifikante Abweichungen der Ergebnisse des Vitek MS-Systems zur Referenzbezeichnung zeigten sich nach Gruppierung der getesteten, speziesdifferenzierten Stämme in deren Ordnungen (vgl. Tabelle 3.3).

### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: Abweichungen des Vitek MS-Ergebnisses von der Referenzbezeichnung speziesdifferenzierter Stämme

Ordnung	Anzahl der Isolate	Spezies-differenzierte Isolate	Übereinstimmung mit Vitek MS <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>
<i>Actinomycetales</i>	107	75	64	0,152
<i>Aeromonadales</i>	9	8	2	<b>0,015</b> <sup>c</sup>
<i>Alteromonadales</i>	1	1	1	1
<i>Bacillales</i>	183	160	152	0,302
<i>Bacteroidales</i>	95	85	70	0,805
<i>Bifidobacteriales</i>	12	11	8	0,317
<i>Burkholderiales</i>	82	71	61	0,075
<i>Campylobacterales</i>	16	16	13	0,226
<i>Cardiobacteriales</i>	1	1	1	1
<i>Caulobacterales</i>	2	2	1	1
<i>Clostridiales</i>	81	70	63	< <b>0,001</b> <sup>c</sup>
<i>Coriobacteriales</i>	2	2	1	1
<i>Enterobacteriales</i>	208	201	145	< <b>0,001</b> <sup>c</sup>
<i>Erysipelotrichales</i>	3	3	3	1
<i>Flavobacteriales</i>	12	10	10	1
<i>Fusobacteriales</i>	14	14	14	1
<i>Lactobacillales</i>	196	171	164	0,39
<i>Legionellales</i>	10	10	5	<b>0,0325</b> <sup>c</sup>
<i>Neisseriales</i>	47	42	38	0,386
<i>Pasteurellales</i>	101	94	92	0,796
<i>Pseudomonadales</i>	110	103	92	0,059
<i>Rhizobiales</i>	6	6	6	1
<i>Rhodobacterales</i>	2	2	2	1
<i>Rhodospirillales</i>	1	1	0	1
<i>Selenomonadales</i>	8	0	0	< <b>0,001</b> <sup>c</sup>
<i>Sphingobacteriales</i>	3	3	1	0,4
<i>Sphingomonadales</i>	8	7	1	<b>0,01</b> <sup>c</sup>
<i>Xanthomonadales</i>	12	12	12	1

<sup>a</sup> Im Vergleich zu Spezies-differenzierten Isolaten.

<sup>b</sup> Exakter Test nach Fisher.

<sup>c</sup> Signifikante Werte in Fettdruck.

### 3 Ergebnisse

Speziesdifferenzierungen des Genus *Aeromonas* der Ordnung *Aeromonadales* gelangen signifikant seltener durch das Vitek MS-System als durch eubakterielle PCR.

Die Ordnung *Sphingomonadales* mit Isolaten der Genera *Blastomonas* und *Sphingomonas* konnten durch das Vitek MS-System im Gegensatz zur eubakteriellen PCR nicht auf Genus- oder Speziesebene differenziert werden.

Andererseits konnten Stämme des Genus *Veillonella* (Ordnung *Selenomonadales*) zwar durch Vitek MS-System speziesdifferenziert, aber durch die eubakterielle PCR nicht bestätigt werden.

In der Speziesdifferenzierung der Ordnung *Enterobacteriales* war das Vitek 2 gegenüber dem Vitek MS-System signifikant überlegen. Nicht signifikant zeigte sich auch ein kleiner Vorsprung in der Speziesdifferenzierung der durch das Vitek 2 untersuchten Isolate der Ordnungen *Pseudomonadales* und *Burkholderiales*.

Signifikant unterlegen war das Vitek MS-System auch bei Keimen der Ordnung *Legionellales* im Vergleich mit der eubakteriellen PCR.

Für die Ordnung *Actinomycetales* zeigte sich, dass sich das Vitek MS-System schwer tat, diverse Spezies des Genus *Actinomyces* (fünf von neun) zu identifizieren. Das gleiche Problem betraf zwei der drei *Brevibacterium*-Stämme. Neben der bekannten Schwäche in der Differenzierung der Spezies innerhalb des *Micrococcus luteus*-Komplexes gelang dies auch in zwei von 27 Untersuchungen von Corynebakterien nicht.

In der Ordnung *Bacillales* gab es neben der bekannten Schwäche, Spezies mit den gängigen kommerziellen Systemen innerhalb der *Bacillus cereus*-Gruppe zu differenzieren, auch Abweichungen der Vitek MS-Identifikationen von der Referenz in der Speziesdifferenzierung Koagulase-negativer Staphylokokken.

In der Ordnung *Bacteroidales* stellte sich eine Schwäche in der Identifikation des Vitek MS-Systems von *Prevotella*-Isolaten heraus.



### 3 Ergebnisse

Ebenso offenbarte sich auch in dieser Arbeit ein bekanntes Problem, *Burkholderia cenocepacia*-Isolate von anderen Spezies des *Burkholderia cepacia*-Komplexes in der Ordnung *Burkholderiales* zu unterscheiden. Auch ist eine Unterscheidung zwischen *Achromobacter denitrificans* von *Achromobacter xylosoxidans* massenspektrometrisch nicht möglich.

Ein weiteres Defizit betraf Isolate der Genera *Clostridium* (sechs von 48) und *Peptoniphilus* (drei von fünf) der Ordnung *Clostridiales*, welche leider nicht identifiziert werden konnten.

Abweichungen oder Nichtidentifikationen apathogener Neisserien führten ebenso zu einer geringeren Performance der Ordnung *Neisserales*.

Auffallend innerhalb der Ordnung *Pasteurellales* war eine Nichtidentifikation von drei *Aggregatibacter*-Stämmen und der Schwierigkeit, in einigen Fällen zwischen *Haemophilus influenzae* und *Haemophilus haemolyticus* zu unterscheiden.

Innerhalb der Ordnung *Pseudomonadales* gab es Probleme mit der zuverlässigen Identifikation oder Differenzierung von *Pseudomonas*-Stämmen, darunter zwei von 45 *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate.

Ein Überblick über die Übereinstimmungsgrade und Abweichungen der Vitek MS-Resultate im Vergleich zur Referenzbezeichnung sind für die betreffenden Ordnungen im Überblick in Tabelle 3.4 dargestellt. Die detaillierten Ergebnisse innerhalb der Ordnungen finden sich im Anhang, Abschnitt 6.3.

Tabelle 3.4: Übereinstimmungsgrad Vitek MS-Identifikation mit Referenzbezeichnung

Ordnung	Anzahl	Übereinstimmung			Andere Ordnung	Kein Ergebnis
		Spezies	nur Genus ( <sup>a</sup> / <sup>b</sup> )	nur Familie nur Ordnung		
<i>Actinomycetales</i>	75	50	8 (4 / 4)	2	3	12
<i>Aeromonadales</i>	8	2	5 (0 / 5)			1
<i>Alteromonadales</i>	1	1				
<i>Bacillales</i>	160	140	10 (2 / 8)			10
<i>Bacteroidales</i>	85	73	7 (5 / 2)	1		4
<i>Bifidobacteriales</i>	11	8	1 (0 / 1)	2		
<i>Burkholderiales</i>	71	52	11 (4 / 7)		1	7
<i>Campylobacterales</i>	16	12			1	3
<i>Cardiobacteriales</i>	1	1				
<i>Caulobacteriales</i>	2	1				1
<i>Clostridiales</i>	70	63			2	5
<i>Coriobacteriales</i>	2	1				1
<i>Enterobacteriales</i>	201	134	48 (1 / 47)	6		13
<i>Erysipelotrichales</i>	3	1			2	
<i>Flavobacteriales</i>	10	8	2 (1 / 1)			
<i>Fusobacteriales</i>	14	14				
<i>Lactobacillales</i>	171	138	19 (5 / 14)	2	2	10
<i>Legionellales</i>	10	5				5
<i>Neisseriales</i>	42	25	9 (7 / 2)		1	7
<i>Pasteurellales</i>	94	81	8 (4 / 4)		1	4
<i>Pseudomonadales</i>	102	82	7 (4 / 3)		1	12
<i>Rhizobiales</i>	6	6				
<i>Rhodobacteriales</i>	2	2				
<i>Rhodospirillales</i>	1					1
<i>Sphingobacteriales</i>	3	1				2
<i>Sphingomonadales</i>	7				1	6
<i>Xanthomonadales</i>	12	12				

<sup>a</sup> Differenzierung einer abweichenden Spezies

<sup>b</sup> Keine eindeutige Differenzierung möglich

### 3.5 Typstämme / Identifikation durch das Nationale Referenzzentrum

Von 1357 untersuchten Bakterienisolaten entstammten 100 (7,4 %) aus den zuvor genannten Typstammsammlungen, 25 *Haemophilus*-Stämme wurden darüber hinaus durch das Nationale Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* identifiziert.

Auf Genusebene durch das Vitek MS-System korrekt identifiziert wurden 116 von 125 Isolaten (92,8 %); nicht identifiziert werden konnten zwei Isolate des Genus *Shigella* und sieben Isolate des Genus *Neisseria*: *Neisseria cinerea* (DSM 4630), *Neisseria canis* (LMG 8383), *Neisseria weaveri* (ATCC 51223), *Neisseria elongata* (LMG 5124), *Neisseria sicca* (LMG 5290), *Neisseria animalis* (NCTC 10212), *Neisseria weaveri* (NRZMHi, Stamm 2506) und ein *Aggregatibacter segnis* (NRZMHi H 702). *Neisseria iguanae* (ATCC 51483) wurde durch das Vitek MS-System als *Staphylococcus capitis* identifiziert.

Die Identifikation auf Speziesebene gelang in 97 von 125 Fällen (77,6 %). Details der abweichenden Speziesdifferenzierung sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.5: Unterschiede der Speziesdifferenzierung von Referenzstämmen durch das Vitek MS-System

Referenzstamm	Stammbezeichnung	Ergebnis Vitek MS
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	NRZMHi Stamm H 933	<i>Aggregatibacter segnis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	<i>Bacillus</i> species <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	<i>Bacillus</i> species <sup>a</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	<i>Enterobacter</i> species <sup>a</sup>
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	NRZMHi Stamm H 867	<i>Haemophilus</i> species <sup>a</sup>
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	NRZMHi Stamm H 913	<i>Haemophilus</i> species <sup>a</sup>
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	NRZMHi Stamm H 956	<i>Haemophilus</i> species <sup>a</sup>
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 20030	<i>Micrococcus</i> species <sup>a</sup>
<i>Neisseria animalis</i>	NRZMHi Stamm 2501	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Neisseria flavescens</i>	NRZMHi Stamm 2504	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Neisseria mucosa</i>	NRZMHi Stamm 2540	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria perflava</i>	LMG 5284	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Neisseria weaveri</i>	LMG 5135	<i>Neisseria</i> species <sup>a</sup>
<i>Neisseria macacae</i>	ATCC 33926	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Neisseria flavescens</i>	LMG 5297	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380	<i>Proteus</i> species <sup>a</sup>
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 39184	<i>Salmonella</i> Group <sup>a</sup>
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 14028	<i>Salmonella</i> Group <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich.



### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.6: Fortsetzung

Ergebnis der Referenzmethode oder Stammbezeichnung	Ergebnis des Vitek MS
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>Burkholderia</i> species <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
<i>Citrobacter gillenii</i>	Kein Ergebnis
<i>Citrobacter rodentium</i>	Kein Ergebnis
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	Kein Ergebnis
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Kein Ergebnis
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Enterobacter</i> species <sup>a</sup>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Kein Ergebnis
<i>Fastidiosipila sanguinis</i>	<i>Propionibacterium avidum</i>
<i>Fluoribacter bozemanae</i>	Kein Ergebnis
<i>Fluoribacter gormanii</i>	Kein Ergebnis
<i>Inquilinus limosus</i>	Kein Ergebnis
<i>Lactobacillus catenaformis</i>	Kein Ergebnis
<i>Legionella jordanis</i>	Kein Ergebnis
<i>Legionella longbeachae</i>	Kein Ergebnis
<i>Microbacterium lacticum</i>	<i>Paenibacillus durus</i>
<i>Neisseria animalis</i>	Kein Ergebnis
<i>Neisseria animalis</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Neisseria iguanae</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>Neisseria macacae</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Neisseria perflava</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Neisseria sicca</i>	Kein Ergebnis
<i>Neisseria weaveri</i>	<i>Neisseria</i> species <sup>a</sup>
<i>Neisseria weaveri</i>	Kein Ergebnis
<i>Neisseria weaveri</i>	Kein Ergebnis
<i>Nocardia farcinica</i>	Kein Ergebnis
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	Kein Ergebnis
<i>Paenibacillus provencensis</i>	<i>Paenibacillus</i> species <sup>a</sup>
<i>Prevotella baroniae</i>	<i>Prevotella</i> species <sup>a</sup>
<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Prevotella disiens</i>

### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.6: Fortsetzung

Ergebnis der Referenzmethode oder Stammbezeichnung	Ergebnis des Vitek MS
<i>Prevotella timonensis</i>	Kein Ergebnis
<i>Prevotella timonensis</i>	Kein Ergebnis
<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Pseudomonas kuykendallii</i>	Kein Ergebnis
<i>Pseudomonas toyotomiensis</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>Pseudomonas toyotomiensis</i>	<i>Pseudomonas</i> species <sup>a</sup>
<i>Psychrobacter pulmonis</i>	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>
<i>Rhizobium agrobacterium</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
<i>Solobacterium moorei</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Solobacterium moorei</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Sphingobacterium iritivorum</i>	Kein Ergebnis
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	Kein Ergebnis
<i>Tatlockia micdadei</i>	Kein Ergebnis
<i>Varibaculum cambriense</i>	Kein Ergebnis

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich.

### 3.7 Vergleich der Performance mit anderen Studien zum Vitek MS-System

Zum Vergleich der eigenen Performance wurden bereits veröffentlichte Daten von Studien eines breiten Bakterienkollektivs von Dubois et al. (2012) und Martiny et al.<sup>21;61</sup> herangezogen.

Aufgrund der Schwerpunkte dieser Arbeit wurden zusätzlich auch Auswertungen der Untersuchungen von Rychert et al. zur Identifikation Gram-positiver Erreger<sup>81</sup>, Moon et al. zur Identifikation Gram-positiver Kokken<sup>66</sup>, Dubois et al. (2013) zur Identifikation von Pneumokokken und anderer Streptokokken<sup>22</sup>, Garner et al. zur Identifikation von Anaerobiern<sup>39</sup> und Marko et al. zur Identifikation von Isolaten aus Patienten mit zystischer Fibrose<sup>60</sup> verglichen.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Studien wurden in allen Arbeiten nur speziesdifferenzierte Stämme berücksichtigt und die Einteilung der untersuchten Stämme aller Arbeiten an die taxonomische Grundstruktur dieser Arbeit angepasst. Ausgewertet und dargestellt wurden nur Ordnungen mit mindestens 10 Isolaten in der jeweiligen Studie.

In der Betrachtung der Gesamtperformance über alle speziesdifferenzierten Stämme dieser Arbeit (n=1180, Sensitivität=0,774. 95 %-Konfidenzintervall: 0,75 bis 0,798) gibt es im Vergleich zu den Arbeiten von Dubois (n=767, Sensitivität=0,867. 95 %-Konfidenzintervall: 0,843 bis 0,891) und Martiny (2012) (n=1112, Sensitivität=0,907. 95 %-Konfidenzintervall: 0,89 bis 0,924) signifikante Unterschiede (Dubois:  $p = 0,3$ ; Martiny:  $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$ ) in der Performance des Vitek MS-Systems (siehe Abbildung 3.3).



### 3 Ergebnisse

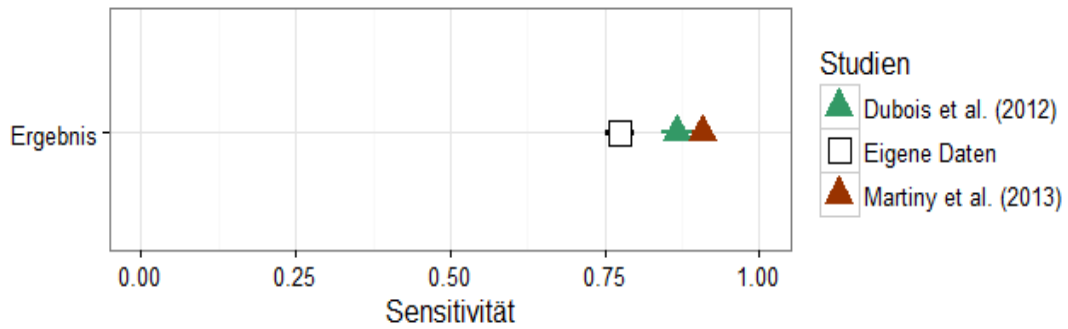


Abbildung 3.3: Überblick über die Gesamtperformance speziesdifferenzierter Isolate im Vergleich zu Arbeiten von Dubois (2012) und Martiny<sup>21;61</sup>

Unterschiede sind allerdings im Umfang und der Heterogenität der Zusammensetzung der Stichprobe dieser Arbeit im Vergleich zu beiden anderen Vergleichsstudien zu sehen. Als Maß der Dominanz einzelner Spezies innerhalb des entsprechenden Kollektivs diente die Berechnung des Simpson-Index. Artenvielfalt und -verteilung wurde durch den Shannon-Index dargestellt (siehe Abbildung 3.4).

### 3 Ergebnisse

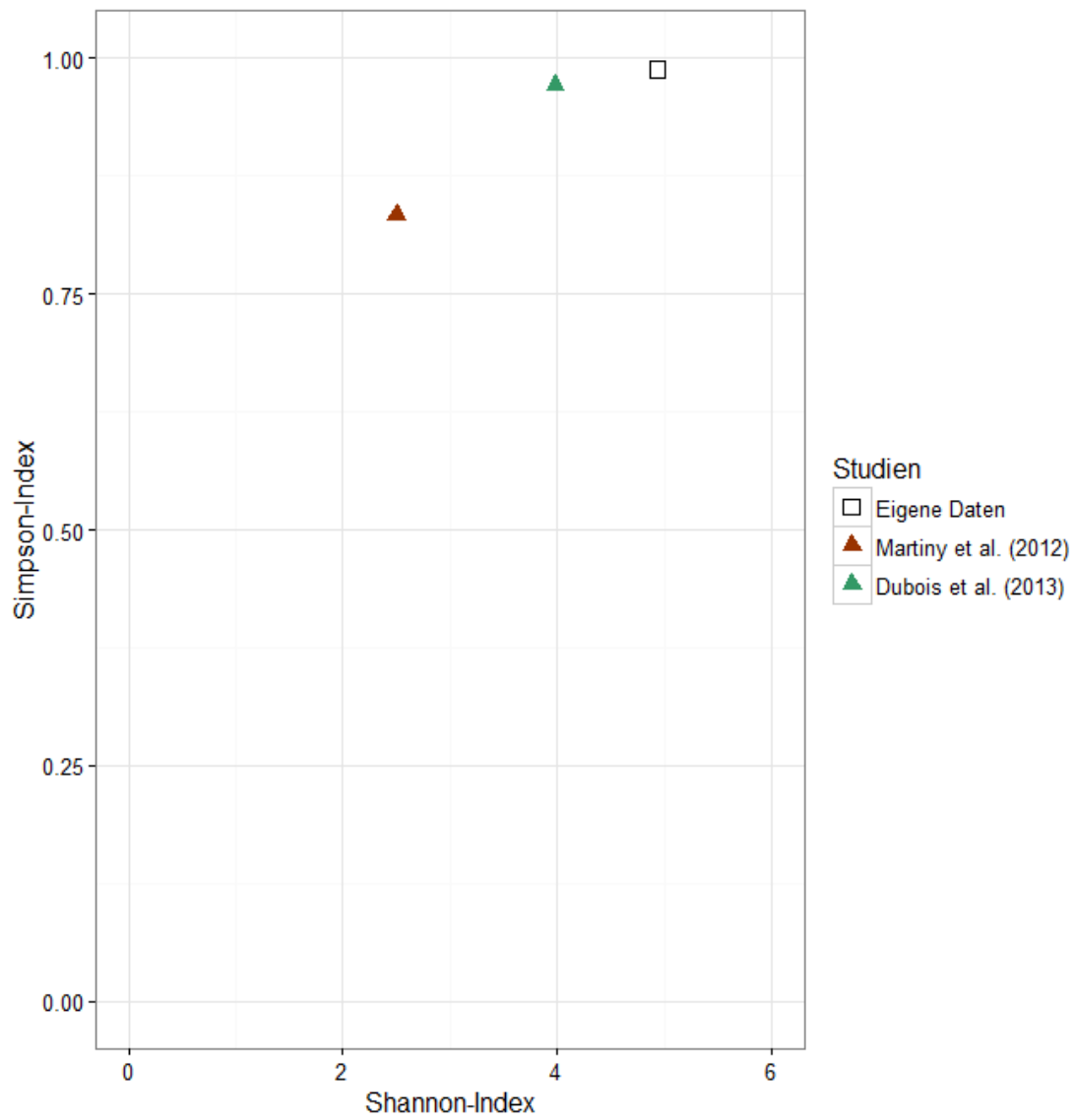


Abbildung 3.4: Stichprobenzusammensetzung aller Isolate der eigenen Arbeit im Vergleich zu den Studien von Dubois und Martiny (2012)<sup>21;61</sup>

### 3 Ergebnisse

In der differenzierten Betrachtung der Bakterienordnungen aller oben genannter, einbezogener Performance-Studien zeigt sich, dass in dieser Arbeit erstmals Isolate der Ordnungen *Flavobacteriales*, *Legionellales* und *Neisserales* mit dem Vitek MS-System untersucht wurden. Im Falle der letzten beiden Ordnungen lag der Grund einer nicht zuverlässigen Identifikation an Defiziten vor allem apathogener Neisserien (Ordnung *Neisserales*), die nicht in der Datenbank des Systems hinterlegt waren und Bakterien der Ordnung *Legionellales* mit Ausnahme der zuverlässigen Identifikation der medizinisch-mikrobiologisch relevantesten Spezies *Legionella pneumophila* (siehe Abbildung 3.5).

Vergleichbar gute Ergebnisse wurden in dieser Arbeit in der Performance von Isolaten der Ordnungen *Actinomycetales*, *Bacillales*, *Bacteroidales*, *Campylobacteriales*, *Clostridiales*, *Pasteurellales* und *Xantomonadales* gefunden. Auffällig ist ein deutlicher Performance-Unterschied jedoch in der Ordnung *Actinomycetales* in der Studie von Rychert et al. im Vergleich zu dieser Arbeit und Dubois et al. (2012). Ein Grund hierfür ist der hohe Anteil an *Micrococcus luteus/lylae*-Stämmen (35 von 39 Isolaten).

Deutliche Unterschiede in der Performance fielen in den Ordnungen *Bifidobacteriales*, *Burkholderiales*, *Enterobacteriales*, *Fusobacteriales*, *Lactobacillales* und *Pseudomonadales* auf.

Eine bessere Performance wurde in dieser Arbeit für die Ordnungen *Burkholderiales* und *Fusobacteriales* gezeigt. Die erstgenannte Ordnung betreffend hatten Dubois et al. im untersuchten Kollektiv einen großen Anteil (sechs von 14) *Achromobacter* species untersucht, bei denen es – auch in dieser Arbeit – nicht möglich war, diese auf Speziesebene eindeutig zu differenzieren. Als ursächlich für die Abweichung der Performance dieser Arbeit von Marko et al. liegt zum Teil in der Nichtidentifikation einiger in der Routinediagnostik seltenerer Spezies (fünf von 24). Garner et al. gelang bei vier von sieben (von insgesamt 34 Stämmen des Genus *Fusobacterium*) *Fusobacterium necrophorum*-Stämmen in drei Fällen keine korrekte Speziesidentifikation und eine Abweichung auf Genusebene.

Schlechter hingegen war die Performance der Identifikation der Stämme dieser Arbeit von Isolaten der Ordnungen *Bifidobacteriales*, *Enterobacteriales*, *Lactobacillales*

### 3 Ergebnisse

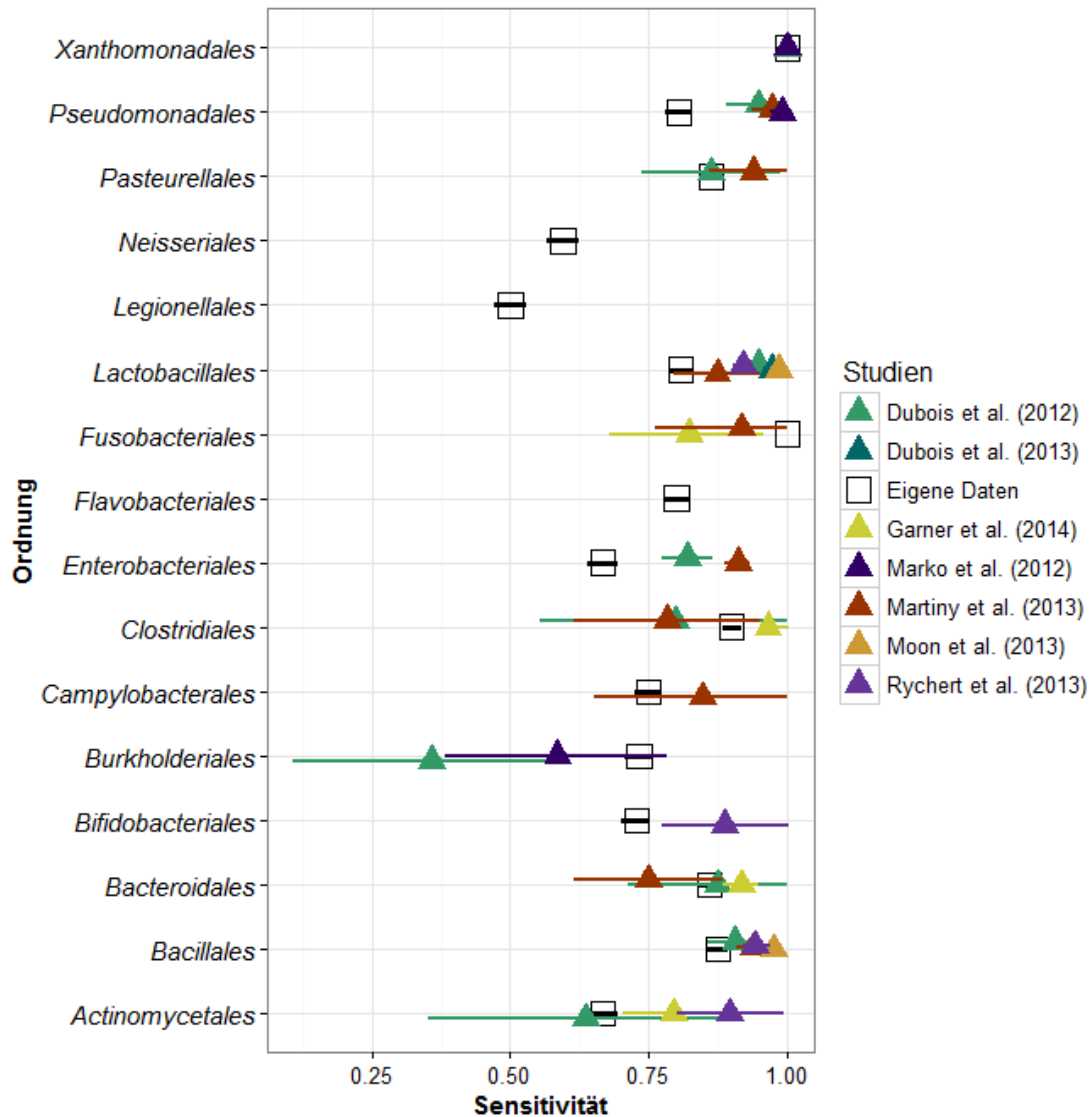


Abbildung 3.5: Vergleich der Sensitivität unterteilt nach Bakterienordnungen der eigenen Daten zu den Studien von Dubois et al. (2012, 2013), Garner et al., Marko et al., Martiny et al., Moon et al. und Rychert et al. <sup>21;22;39;60;61;66;81</sup>

und *Pseudomonadales*.

Im Falle der Ordnung *Bifidobacteriales* lag ein Grund der schlechteren Performance in der falschen oder Nichtidentifikation von Bifidobakterien, sowie der Identifikation zweier (von acht) *Gardnerella vaginalis*-Isolaten. Dazu vergleichend wurden in der Studie von Rychert et al. 24 von 27 *Gardnerella vaginales*-Isolaten erfolgreich

### 3 Ergebnisse

erkannt.

In der Ordnung *Enterobacteriales* gibt es Unterschiede in der Heterogenität der Stichproben im Vergleich zu den Studien von Martiny und Dubois. So dominieren sowohl bei Martiny *E. coli*-Stämme (338 von 579) als auch bei Dubois *E. coli*- (31 von 282) und *Proteus mirabilis*-Isolate (30 von 282) im Vergleich der Keimverhältnisse innerhalb der Ordnung zu den Anteilen der in dieser Arbeit untersuchten *Enterobacteriales*-Stämme.

Als schlechter sind auch die Ergebnisse der Performance der Ordnung *Lactobacillales* der eigenen Messungen im Vergleich zu den Referenzstudien zu bewerten. Die Ursache lag in der falschen oder nicht eindeutigen Identifikation einiger *Streptococcus*-Stämme, hingegen konnte jedoch die Häufung nicht eindeutig auf Spezialebene identifizierter *Streptococcus dysgalactiae*-Isolate – wie sie in der Studie von Rychert et al. zu sehen ist – hier nicht gezeigt werden.

Im Vergleich dieser Arbeit zu Dubois<sup>21</sup>, Marko<sup>60</sup> und Martiny<sup>61</sup> war die Erfolgsquote in der Identifikation von Isolaten der Ordnung *Pseudomonadales* deutlich geringer. Häufig konnte in der Untersuchung der Isolate unterschiedlicher Genera dieser Ordnung kein Ergebnis ermittelt werden.

In der Zusammenfassung zeigt sich eine zuverlässige und überdurchschnittlich gute Identifikation von Keimen der Ordnungen *Bacillales*, *Lactobacillales*, *Pseudomonadales* und *Xanthomonadales*.

Die Daten zum Umfang der eingeschlossenen Stichproben und deren Identifikationsraten innerhalb der ausgewählten Ordnungen finden sich im Anhang 6.5 in Tabelle 6.33.

### 3.8 Erweiterung des Standardprotokolls der massenspektrometrischen Untersuchung

Die Erweiterung des Protokolls diente dem Vergleich zweier diskutierter Protokolle in der massenspektrometrischen Bakteriendiagnostik: einem zweistufigen Verfahren aus Säureextraktion und anschließender Inkubation mit Matrixlösung oder der direkten Matrixapplikation, deren Bestandteile ebenso eine ausreichende Säureextraktion gewährleisten sollen. Jüngere Studien konnten zeigen, dass eine zusätzliche Säureextraktion mit einer starken organischen Säure des zu untersuchenden Isolats zu einer zuverlässigeren Identifikation von Anaerobiern<sup>33</sup>, Gram-positiven Kokken<sup>2</sup> und Gram-positiven Stäbchen<sup>63;85;94;96</sup> führen. Widersprüchlich sind hierzu die experimentellen Ergebnisse in der Untersuchung der Optimierung der Massenpeaks eines *Escherichia coli*-Isolats von Williams et al.<sup>99</sup>.

Da neben der Proteinextraktion auch das Verhältnis von Probe zu Matrix eine Rolle spielt<sup>78</sup>, wurde zusätzlich neben den beiden gängigen Verfahren auch die Matrixmenge variiert und die Probe mit der doppelten Matrixmenge inkubiert.

Der Vergleich von drei unterschiedlichen massenspektrometrischen Protokollen erfolgte mit den letzten 316 in die Studie aufgenommenen Keimen, gänzlich Wildstämme aus der Routinediagnostik. Das Keimspektrum fokusierte sich auf Isolate, die entweder noch nicht oder nicht in ausreichender Anzahl (Zielgröße  $n \geq 3$ ) erfasst worden waren. Ein besonderes Augenmerk in der Keimauswahl lag zudem auch auf Stämmen, deren Speziesdifferenzierung in der Diagnostik als schwierig beschrieben wurde oder in der Routinediagnostik nicht mit den konventionellen Methoden gelang.

14 Isolate von diesen 316 Isolaten konnten durch die angewandten Referenzmethoden nicht identifiziert werden. Von den verbliebenen 301 bzw. 302 Isolaten – ein *Haemophilus influenzae*-Isolat konnte nicht mehr mit der doppelten Matrixmenge gemessen werden, da es kulturell nicht mehr anzüchtbar war – gelang in 277 Fällen eine Speziesdifferenzierung (92 %).

### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.7: Genera und Anzahl der Isolate, die mit erweitertem Vitek MS Protokoll gemessen wurden

<b>Morphologie</b>	<b>Genus</b>	<b>Anzahl der Isolate</b>
Gram-negative Stäbchen	<i>Achromobacter</i>	3
Gram-negative Stäbchen	<i>Acinetobacter</i>	8
Gram-negative Stäbchen	<i>Aggregatibacter</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Alcaligenes</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Arcobacter</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Blastomonas</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Bordetella</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Burkholderia</i>	53
Gram-negative Stäbchen	<i>Buttiauxella</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Capnocytophaga</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Chryseobacterium</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Citrobacter</i>	7
Gram-negative Stäbchen	<i>Comamonas</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Cronobacter</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Cupriavidus</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Delftia</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Elizabethkingia</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Enterobacter</i>	5
Gram-negative Stäbchen	<i>Escherichia</i>	5
Gram-negative Stäbchen	<i>Haemophilus</i>	29
Gram-negative Stäbchen	<i>Hafnia</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Kerstersia</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Klebsiella</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Kluyvera</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Leclercia</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Ochrobactrum</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Pantoea</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Paracoccus</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Proteus</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Providencia</i>	1

### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.7: Fortsetzung

<b>Morphologie</b>	<b>Genus</b>	<b>Anzahl der Isolate</b>
Gram-negative Stäbchen	<i>Pseudomonas</i>	25
Gram-negative Stäbchen	<i>Psychrobacter</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Rahnella</i>	3
Gram-negative Stäbchen	<i>Rhizobium</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Serratia</i>	2
Gram-negative Stäbchen	<i>Shewanella</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Sphingobacterium</i>	3
Gram-negative Stäbchen	<i>Sphingomonas</i>	1
Gram-negative Stäbchen	<i>Stenotrophomonas</i>	3
Gram-negative Kokken	<i>Neisseria</i>	3
Gram-positive Stäbchen	<i>Actinobaculum</i>	1
Gram-positive Stäbchen	<i>Actinomyces</i>	3
Gram-positive Stäbchen	<i>Bacillus</i>	9
Gram-positive Stäbchen	<i>Brevibacterium</i>	1
Gram-positive Stäbchen	<i>Corynebacterium</i>	4
Gram-positive Stäbchen	<i>Curtobacterium</i>	1
Gram-positive Stäbchen	<i>Dietzia</i>	1
Gram-positive Stäbchen	<i>Erysipelothrix</i>	1
Gram-positive Stäbchen	<i>Lactobacillus</i>	3
Gram-positive Stäbchen	<i>Listeria</i>	2
Gram-positive Stäbchen	<i>Microbacterium</i>	1
Gram-positive Stäbchen	<i>Nocardia</i>	1
Gram-positive Stäbchen	<i>Paenibacillus</i>	2
Gram-positive Kokken	<i>Aerococcus</i>	2
Gram-positive Kokken	<i>Arthrobacter</i>	1
Gram-positive Kokken	<i>Enterococcus</i>	10
Gram-positive Kokken	<i>Gemella</i>	2
Gram-positive Kokken	<i>Granulicatella</i>	2
Gram-positive Kokken	<i>Lactococcus</i>	1
Gram-positive Kokken	<i>Leuconostoc</i>	1



### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.7: Fortsetzung

<b>Morphologie</b>	<b>Genus</b>	<b>Anzahl der Isolate</b>
Gram-positive Kokken	<i>Micrococcus</i>	1
Gram-positive Kokken	<i>Pediococcus</i>	1
Gram-positive Kokken	<i>Rothia</i>	1
Gram-positive Kokken	<i>Staphylococcus</i>	22
Gram-positive Kokken	<i>Streptococcus</i>	40
Summa		301

Die Überprüfung der Übereinstimmung zwischen jeweils zwei unterschiedlichen Verfahren im Vergleich zu der Referenzbezeichnung erfolgte auf Genus- und Spezies-ebene ist in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

### 3 Ergebnisse

Tabelle 3.8: Vergleich der massenspektrometrischen Protokolle

Vergleich	Genusebene				Speziesebene		
	n	p	r	OR	p	r	OR
<b>Alle</b>							
1 $\mu$ l versus 2 $\mu$ l Matrix	301	0,03	0,58	0,31	0,01	0,84	0,26
1 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	302	0,07	0,55	0,52	0,04	0,77	0,43
2 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	301	0,35	0,61	1,55	1	0,83	1
<b>Gram-positive Stäbchen</b>							
1 $\mu$ l versus 2 $\mu$ l Matrix	30	0,22	0,53	0,2	0,5	0,86	0
1 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	30	0,69	0,55	0,5	0,25	0,79	0
2 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	30	0,63	0,69	3	1	0,93	0
<b>Gram-negative Stäbchen</b>							
1 $\mu$ l versus 2 $\mu$ l Matrix	184	0,003	0,6	0,18	0,0002	0,85	0
1 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	185	0,12	0,62	0,43	0,03	0,76	0,31
2 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	184	0,11	0,77	4	0,79	0,76	1,33
<b>Gram-positive Kokken</b>							
1 $\mu$ l versus 2 $\mu$ l Matrix	84	1	0,55	2,25	0,73	0,76	1,67
1 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	84	0,34	0,31	0,43	1	0,76	1,25
2 $\mu$ l Matrix versus Säureextraktion	84	0,39	0,18	0,5	1	0,73	1,67

#### 3.8.1 Vergleich der Identifikation auf Genusebene

Im Vergleich zum Standardprotokoll konnte durch die doppelte Matrixmenge ein signifikant besseres Ergebnis erzielt werden ( $n = 301$ ,  $p = 0,003$ ,  $r = 0,58 \pm 0,12$ ,  $OR = 0,31 \pm 0,88$ ). Auch das zweistufige Verfahren mit der vorausgehenden Säureextraktion war dem Standardprotokoll überlegen, verfehlte aber knapp das 95%ige Signifikanzniveau ( $n = 302$ ,  $p = 0,073$ ,  $r = 0,55 \pm 0,12$ ,  $OR = 0,52 \pm 0,77$ ).

Im Vergleich der doppelten Matrixmenge mit dem Säureextraktionsverfahren war somit erstere überlegen, wenn auch nicht signifikant ( $n = 301$ ,  $p = 0,345$ ,  $r = 0,61 \pm 0,13$ ,  $OR = 1,55 \pm 0,85$ ) (vgl. Tabelle 6.4.1).

### 3.8.1.1 Genusidentifikation Gram-positiver Stäbchen

In der Subgruppe der Gram-positiven Stäbchen ist die Konjugation der Probe mit  $2\ \mu\text{l}$  Matrix besser als das Standardprotokoll, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ( $n = 30$ ,  $p = 0,219$ ,  $r = 0,53 \pm 0,31$ ,  $\text{OR} = 0,2 \pm 2,34$ ). Auch die vorausgehende Säureextraktion ist der Standardmethode überlegen, jedoch auch nicht signifikant ( $n = 30$ ,  $p = 0,688$ ,  $r = 0,55 \pm 0,31$ ,  $\text{OR} = 0,5 \pm 1,91$ ).

Die doppelte Matrixmenge war dem Säureextraktionsverfahren etwas überlegen ( $n = 30$ ,  $p = 0,625$ ,  $r = 0,69 \pm 0,28$ ,  $\text{OR} = 3 \pm 2,44$ ) (vgl. Tabelle 6.4.1.1).

### 3.8.1.2 Genusidentifikation Gram-negativer Stäbchen

In einer zweiten Subgruppe – Gram-negative Stäbchen – gab es einen signifikanten Unterschied in der Anwendung der doppelten im Vergleich zur einfachen Matrixmenge ( $n = 184$ ,  $p = 0,003$ ,  $r = 0,6 \pm 0,15$ ,  $\text{OR} = 0,18 \pm 1,32$ ). Keinen signifikanten Unterschied ergab sich im Vergleich der einfachen Matrixmenge mit und ohne vorherige Säureextraktion, wobei letztere ein wenig erfolgreicher war ( $n = 185$ ,  $p = 0,115$ ,  $r = 0,62 \pm 0,15$ ,  $\text{OR} = 0,43 \pm 1,06$ ).

Der Vergleich zwischen doppelter Matrixmenge und forcierter Säureextraktion wies keinen signifikanten Unterschied auf, jedoch zeigte sich im Vergleich ein kleiner Nachteil zu Ungunsten der Säureextraktion ( $n = 184$ ,  $p = 0,109$ ,  $r = 0,77 \pm 0,14$ ,  $\text{OR} = 4 \pm 1,62$ ) (vgl. Tabelle 6.4.1.2).

### 3.8.1.3 Genusidentifikation Gram-positiver Kokken

Als letzte Subkohorte wurden die Gram-positiven Kokken analysiert. Auf Genusebene gab es keinen Unterschied zwischen der einfachen und doppelten Matrixmenge ( $n = 84$ ,  $p = 1$ ,  $r = 0,55 \pm 0,25$ ,  $\text{OR} = 1 \pm 1,62$ ). Nicht signifikant, aber dennoch überlegen ist die Säureextraktion gegenüber dem Standardprotokoll ( $n = 84$ ,  $p = 0,344$ ,  $r = 0,31 \pm 0,31$ ,  $\text{OR} = 0,43 \pm 185$ ).

Der Vorteil der Säureextraktion auch gegenüber der doppelten Matrixmenge war

### 3 Ergebnisse

deutlich, jedoch nicht signifikant ( $n = 84$ ,  $p = 0,388$ ,  $r = 0,18 \pm 0,29$ ,  $OR = 0,5 \pm 1,78$ ) (vgl. Tabelle 6.4.1.3).

#### 3.8.2 Vergleich der Differenzierung auf Speziesebene

Auf Speziesebene war die Differenzierung der untersuchten Stämme mit der doppelten Matrixmenge im Vergleich zur Standardmethode signifikant besser ( $n = 301$ ,  $p = 0,011$ ,  $r = 0,84 \pm 0,06$ ,  $OR = 0,28 \pm 1,02$ ). Einen signifikanten Vorteil hatte auch die Säureextraktion gegenüber dem Standardverfahren ( $n = 302$ ,  $p = 0,035$ ,  $r = 0,77 \pm 0,07$ ,  $OR = 0,43 \pm 0,78$ ).

Keinen Unterschied gab es zwischen der Anwendung der doppelten Matrixmenge und der zweistufigen Säureextraktionsmethode ( $n = 301$ ,  $p = 1$ ,  $r = 0,83 \pm 0,06$ ,  $OR = 1 \pm 0,84$ ) (vgl. Tabelle 6.4.2).

##### 3.8.2.1 Speziesdifferenzierung Gram-positiver Stäbchen

In der Speziesdifferenzierung Gram-positiver Stäbchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Konjugation der Probe mit 1 oder 2  $\mu\text{l}$  Matrix ( $n = 30$ ,  $p = 0,5$ ,  $r = 0,86 \pm 0,19$ ,  $OR = 0$ ). Einen nicht signifikanten Vorteil hatte die Säureextraktion gegenüber der einfachen Matrixmenge ( $n = 30$ ,  $p = 0,25$ ,  $r = 0,79 \pm 0,22$ ,  $OR = 0$ ).

Ausgezeichnet korrelierten die Ergebnisse hier auch zwischen der direkten Applikation von 2  $\mu\text{l}$  Matrix und dem zweistufigen Verfahren aus Säureextraktion und der anschließenden Konjugation mit 1  $\mu\text{l}$  Matrixlösung ( $n = 30$ ,  $p = 1$ ,  $r = 0,93 \pm 0,13$ ,  $OR = 0$ ) (vgl. Tabelle 6.4.2.1).

##### 3.8.2.2 Speziesdifferenzierung Gram-negativer Stäbchen

In der zweiten Subgruppe waren die Ergebnisse nach Konjugation der doppelten Matrixmenge signifikant besser gegenüber der Anwendung des Standardprotokolls

### 3 Ergebnisse

( $n = 184$ ,  $p = 0,0002$ ,  $r = 0,85 \pm 0,08$ ,  $OR = 0$ ). Im Vergleich der einfachen Matrixmenge zur vorausgehenden forcierten Säureextraktion ergab sich auch eine deutliche, signifikante Überlegenheit der letztgenannten Methode ( $n = 185$ ,  $p = 0,027$ ,  $r = 0,76 \pm 0,1$ ,  $OR = 0,31 \pm 1,05$ ).

Ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Vorteil ergab sich durch die doppelte Matrixmenge gegenüber der Säureextraktion ( $n = 185$ ,  $p = 0,79$ ,  $r = 0,76 \pm 0,09$ ,  $OR = 1,33 \pm 1,11$ ) (vgl. Tabelle 6.4.2.2).

#### 3.8.2.3 Speziesdifferenzierung Gram-positiver Kokken

Die Ergebnisse der Speziesdifferenzierungen Gram-positiver Kokken waren zwischen allen Verfahren ziemlich übereinstimmend. Einen leichten, nicht signifikanten Vorteil hatte hier die Applikation der doppelten gegenüber der einfachen Matrixmenge ( $n = 84$ ,  $p = 0,727$ ,  $r = 0,76 \pm 0,16$ ,  $OR = 1,67 \pm 1,52$ ). Keinen signifikanten Unterschied gab es zwischen der Säureextraktion und dem Standardprotokoll ( $n = 84$ ,  $p = 1$ ,  $r = 0,76 \pm 0,16$ ,  $OR = 1,25 \pm 1,42$ ).

Im Vergleich der forcierten Säureextraktion zur doppelten Matrixmenge ( $n = 84$ ,  $p = 1$ ,  $r = 0,73 \pm 0,16$ ,  $OR = 1,67 \pm 1,41$ ) gab es keinen Unterschied (vgl. Tabelle 6.4.2.3).

Auffällig war außerdem die Ähnlichkeit des massenspektrometrischen Profils zweier Isolate der Spezies *Enterococcus gallinarum* und *Leuconostoc mesenteroides* in der Berechnung der euklidischen Distanz unabhängig von der Anwendung der unterschiedlichen massenspektrometrischen Protokolle (der verwendete Algorithmus befindet sich im Anhang, Abschnitt 6.6.3).

## 4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Leistungen des Vitek MS-Systems anhand von Differenzierungen eines breiten Keimspektrums, zusammengesetzt aus Typstämmen von Stammsammlungen und Stämmen der Routinediagnostik zu untersuchen und mit bereits publizierten Arbeiten zu vergleichen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Vitek MS-System eine gute Identifikationsrate – auf Genusebene (86,9 %) und auf Speziesebene (80 %) – aufwies.

Auffällig war, dass neben der Schwäche in der Identifikation von Isolaten apathogener Neisserien und der Ordnung Legionellales auch ein Defizit in der Speziesdifferenzierung von Keimen der Ordnung *Enterobacteriales* bestand. Dies betraf vornehmlich die Genera *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Proteus*. Jedoch gab es in der Genusbestimmung der Isolate eine überdurchschnittliche Performance (90,3 %).

Für Keime des *Enterobacter cloacae*-Komplexes ergibt sich somit kein Vorteil hinsichtlich des Differenzierungsvermögens des Vitek MS-Systems im Vergleich zu automatisierten, biochemischen Verfahren wie dem Vitek 2 oder konventionellen, hochauflösenden, molekularbiologischen Verfahren wie der eubakteriellen PCR. Gleiches galt für Differenzierungen der Spezies *Gemella haemolysans* und *Gemella morbillorum*, *Micrococcus luteus* und *Micrococcus lylae*, sowie innerhalb der *Moraxella*-Gruppe<sup>61</sup>.

Alle Isolate der Spezies *Salmonella enterica* wurden durch das Vitek MS-System als „Salmonella group“ ausgegeben, eine Differenzierung zwischen den einzelnen Serovaren ist methodisch nicht möglich<sup>61</sup>.

Des Weiteren bekannt ist eine, klinisch durchaus relevante Schwäche des Vitek

#### 4 Diskussion

MS-Systems, einige *Shigella* Spezies von *Escherichia coli* zu unterscheiden<sup>49</sup>.

Als weitere Ursachen uneindeutiger oder abweichender Speziesdifferenzierungen des Vitek MS-Systems erklären sich zum Teil auch durch fehlende Einträge in der Keimspektrum-Datenbank des Systems. Schwierigkeiten einer korrekten Identifikation können sich auch durch Ähnlichkeiten massenspektrometrischer Profile zwischen unterschiedlichen Spezies (meist Stämme des gleichen Genus, in dieser Arbeit nicht gezeigt) ergeben.

Zu Grunde liegend ist ein Dilemma der bakteriologischen Taxonomie. Die klassische Einordnung erfolgte nach phänotypischen und ökologischen Kriterien. Neuere Methoden versuchen eine Zuordnung durch den molekularbiologischen Vergleich von Genomhomologien und einer Einordnung in eine phylogenetische Struktur<sup>79;90</sup>. Diese Ansätze zur Definition der taxonomischen Grundeinheiten wie Genus und Spezies führten zum aktuellen Konsensus der sogenannten polyphasischen Taxonomie<sup>15;95</sup>. Widersprüche und die Unterschiedlichkeit der Methoden waren in der Vergangenheit nicht selten Anlass zu Reklassifikationen diverser Spezies<sup>13;19;73</sup>.

Die Grenzen des Differenzierungsvermögen einzelner Spezies durch das Vitek MS-System ähneln jenen der Sequenzierung von Teilabschnitten der ribosomalen 16S-Untereinheit<sup>5;8;9;48;57</sup>. Hingegen ist die Performance einzelner Keimgruppen besser. So schneidet das Vitek MS-System in der Identifikation einzelner Spezies der *Streptococcus anginosus*-Gruppe im Vergleich zur konventionellen eubakteriellen PCR besser ab<sup>22;70</sup>.

Abgesehen von den bereits erwähnten Problemen in der Auflösung vieler Komplex-definierter Keimgruppen ist auch eine Differenzierung zwischen den Spezies *Haemophilus influenzae* / *Haemophilus haemolyticus* nicht immer sicher möglich, auch andere MALDI-TOF MS-Systeme und die konventionelle eubakterielle PCR haben hier ihre Grenzen<sup>103</sup>.

In der Arbeit dargestellt werden konnte, dass die Identifikation der Spezies des Genus *Haemophilus* durch das Vitek MS-System meistens zuverlässig ist. Grenzfälle, in denen optional nicht zwischen den Spezies *Haemophilus influenzae* und *Haemophilus*

#### 4 Diskussion

*haemolyticus* unterschieden werden konnte, konnten auch durch eine Präparation der Probe durch eine forcierte Extraktion mit Ameisensäure nicht gelöst werden. Möglich ist, dass das Differenzierungsproblem primär kein präanalytisches, sondern eher darin in der Auswahl geeigneter Referenzstämmen zur Erstellung des Populationsmodells der Vitek MS-Datenbank begründet ist. Eventuell sind hier entsprechende Anpassungen oder Ergänzungen – wie sie auch bereits für das Biotyper-System gefordert wurde<sup>103</sup> – notwendig.

Ebenso schwierig stellte sich die Differenzierung phylogenetisch eng verwandter Pseudomonaden wie *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* und *Pseudomonas balearica*<sup>50</sup> dar. Hier wichen auch die Ergebnisse zwischen den unterschiedlichen massenspektrometrischen Protokollen deutlich voneinander ab. Aus den Daten lässt sich jedoch nicht ableiten, ob es sich dabei primär um ein Extraktions- oder Matrix-Proben-Verhältnis-Problem handelt und welchen Einfluß extrazelluläre Bestandteile auf das Ergebnis haben. Argumente für beide Ansätze sind zu erkennen, weitere Untersuchungen hierzu sind jedoch noch erforderlich.

Eine Differenzierung zwischen Stämmen der Spezies des *Burkholderia cepacia*-Komplexes – dies gilt insbesondere für *Burkholderia cenocepacia* – ist praktisch möglich und bereits in das Biotyper-System von Bruker integriert<sup>30;65</sup>. Hier sollte die Datenbank des Vitek MS-Systems ergänzt werden. Auch scheint eine Abgrenzung einer weiteren Spezies des *Burkholderia cepacia*-Komplexes – *Burkholderia vietnamsis* – für das Vitek MS-System schwierig zu sein und erschien als optionales Ergebnis bei allen getesteten Isolaten der Spezies *Burkholderia cenocepacia*. Dieses Manko wurde bereits von Alby beschrieben und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden<sup>3</sup>.

Im Vergleich zu anderen bereits publizierten Studien schnitt die Performance des Vitek MS-Systems in dieser Arbeit insgesamt etwas schlechter ab. Nach Unterteilung der Daten in Ordnungen konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt darauf beruht, dass in dieser Arbeit ein breiteres und heterogeneres Keimspektrum getestet wurde als in den beiden großen Übersichtsarbeiten von Dubois und Martiny<sup>21;61</sup>. Erstmals mit dem Vitek MS-System in größerer Anzahl getestet wurden Isolate der Ordnun-



## 4 Diskussion

gen *Flavobacteriales*, *Legionellales* und *Neisserales*, deren Erkennungsraten deutlich schlechter ausfielen als die durchschnittliche Performance innerhalb der anderen Ordnungen.

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand im Vergleich der derzeitigen Standardmethode in der Probenpräparation, zwischen dem direkten Auftragen der Probe und der Inokulation mit einem Matrix-/ Extraktionsgemisch mit dem in der Anfangszeit der Entwicklung häufig angewandten zweistufigen Verfahren aus Extraktion und anschließender Matrixkonjugation. Um einen Effekt eines ungünstigen Proben-Matrix-Verhältnisses auszuschließen, erfolgte die Inokulation einer weiteren Probe des gleichen Bakterienstammes zusätzlich noch mit der doppelten Matrixmenge.

Einen positiven Effekt auf die Identifikation Gram-positiver Kokken sowohl auf Genus- wie Speziesebene durch ein solches, zweistufiges Verfahren wurde für das Biotyper-System bereits 2011 durch Alatoom et al. gezeigt<sup>2</sup>. Ein ähnlich signifikantes Ergebnis konnte zumindest auf Genusebene mit dem Vitek MS-System bestätigt werden. Eine Änderung des Proben-/Matrix-Verhältnisses hatte hierbei im Vergleich zur Standardmethode keinen Einfluss auf das Ergebnis. Im Gegensatz zu Alatoom konnte die Überlegenheit des zweistufigen Verfahrens auf Speziesebene nicht bestätigt werden, jedoch war der Probenumfang Gram-positiver Kokken dieser Arbeit, die mit beiden Verfahren gemessen wurden, im Vergleich zu Alatoom et al. (n = 305) deutlich geringer (vgl. Abschnitt 3.8).

Dass ein zweistufiges Verfahren einen Vorteil in der Identifikation Gram-positiver Stäbchen hat, wurde von Schulthess et al. 2014 mit dem Biotyper-System gezeigt<sup>85</sup>. Die Identifikationsrate von 72 % auf Genusebene konnte darin auf 84,7 % gesteigert werden, dies galt insbesondere für *Nocardia* Spezies und zwei Spezies der Gattung *Corynebacterium* (*C. mucifaciens* und *C. pyruviciproducens*). Die Erkennungsrate Gram-positiver Stäbchen dieser Arbeit befindet sich auf ähnlichem Niveau, liegt allerdings mit 74 % auf Genusebene unter den von Navas et. al publizierten Werten mit einer Identifikation von 85 %<sup>69</sup>. In der Darstellung des der Identifikation zugrunde liegenden Peakmusters nicht identifizierter Isolate waren nach Konjugation der einfachen Matrixmenge im Gegensatz zum angewandten zweistufigen Extraktionsverfahren keine Peaks zu sehen, die sich vom Hintergrundrauschen unterscheiden

#### 4 Diskussion

ließen (notwendig hierfür ist ein Signal-Rauschabstandsverhältnis (SNR)  $\geq 3$ )<sup>21;62</sup>. Im Gegensatz zur Publikation von Schulthess konnte in dieser Arbeit jedoch weder auf Genus- noch auf Speziesebene ein signifikanter Unterschied durch das zweistufige Säureextraktionsverfahren bestätigt werden. Zu beachten ist jedoch, dass nur ein Teil der in hier untersuchten Gram-positiven Stäbchen mit beiden Verfahren vergleichend untersucht wurde und die Menge der untersuchten Isolate beider als problematisch dargestellter Genera, *Corynebacterium* und *Nocardia*, mit  $n = 4$  (von 27) bzw.  $n = 1$  (von 3) nicht ausreichen, um hier einen entscheidenden Effekt zu sehen.

Keinen Vorteil des zweistufigen Verfahrens konnte in der Untersuchung Gram-negativer Stäbchen gesehen werden.

Aufgrund des höheren Aufwands des zweistufigen Extraktionsverfahrens ist eine Abweichung vom massenspektrometrischen Standardprotokoll in der orientierenden Untersuchung von Proben nicht zu empfehlen. Zur Bestätigung der Identifikation coryneformer Stäbchen oder Gram-positiver Kokken kann jedoch die forcierte Säureextraktion empfohlen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich für einen Teil der Isolate, die mit dem erweiterten massenspektrometrischen Protokoll gemessen wurden, dass Fehl- oder Nichtidentifikationen teilweise durch das Fehlen eines Peakmusters oberhalb des angestrebten Signal-Rauschabstandes bedingt waren. In vielen dieser Fälle konnte durch ein günstigeres Proben-/Matrixverhältnis ein für die Identifikation ausreichendes Massenprofil erzeugt werden. Die Frage, ob dieser Effekt durch eine effizientere Extraktion oder bessere Konjugation der Zimtsäure an die Zielproteine zu erklären ist, bleibt offen. Da beobachtet wurde, dass in einigen Fällen lediglich das zweistufige Extraktionsverfahren ein ausreichendes Proteinprofil erzeugte, in anderen Fällen das zweistufige Verfahren der solitären Matrixkonjugation unterlegen war und diese Effekte auch innerhalb eines Genus auftraten, ist eine weitere, umfassende Klärung, in welchem Fall eine vorausgehende Säureextraktion mit einer stärkeren Säure erforderlich ist, notwendig.

Im Vergleich der drei angewandten massenspektrometrischen Protokolle scheint

#### 4 Diskussion

die Nichtidentifikation von in die Vitek MS-Datenbank eingepflegten Keime somit nicht ausschließlich das Problem einer nicht ausreichenden Extraktion von Proteinen der Bakterienzellen zu sein, sondern auch ein ungünstiges Probe/Matrixverhältnis.

Der derzeitige Stellenwert der massenspektrometrischen Erregerdiagnostik ergibt sich aus der Robustheit, Kosteneffizienz und der Geschwindigkeit der Probenanalyse<sup>91</sup>. Nicht zuletzt auch der Direktnachweis aus Blut oder Urin unterstreicht den Stellenwert der Methode in der mikrobiologischen Routinediagnostik<sup>11;32;45;89</sup>. Eine wesentliche Einschränkung ist die nur sehr eingeschränkte Möglichkeit, Antibiotikaresistenzen nachzuweisen, sodass langfristig durch die Etablierung des sogenannten *next generation sequencing*, der Möglichkeit der Sequenzierung des kompletten Bakteriengenoms, in einer adäquaten Zeit und zu moderaten Kosten die Zukunft der massenspektrometrischen Keimidentifikation fraglich sein wird. Jedoch verbleibt der Massenspektrometrie der Vorteil der Untersuchung phänotypischer Merkmale, sodass dieses Verfahren voraussichtlich als ergänzende Methode bestehen bleiben wird<sup>43</sup>.

Einen unbestrittenen Stellenwert wird die Massenspektrometrie in der Bakteriologie auf absehbare Zeit jedoch in der Identifikation von Keimen aus (Fest-)Nährmedien aufgrund der Einfachheit der Handhabung und der Geschwindigkeit der Methode haben.

Eine Erweiterung des Einsatzgebiets des linearen MALDI-TOF MS in der Sequenzierung von bakteriellen oder mikrobiologischen Nukleinsäureabschnitten nach der Methode von Sanger – bezeichnet als SEQUENOM MALDI-TOF MS – ist aufgrund der hohen Akkuranz und Geschwindigkeit möglich, jedoch in der Routinediagnostik bislang nicht etabliert<sup>23</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Untersucht wurde die Performance des Vitek MS-Systems anhand eines Keimspektrums von 1357 Isolaten im Zeitraum von Oktober 2011 bis April 2014. Das untersuchte Kollektiv bestand aus Isolaten der mikrobiologischen Routinediagnostik (n = 1173), aus Stammsammlungen des Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* (n = 128), sowie offizieller Stammsammlungen wie ATCC, DSMZ, LSM und anderen (n = 56).

Die Ergebnisse wurden entweder mit einer bereits vorhandenen Stammbezeichnung oder durch eine bzw. Kombinationen mehrerer molekularbiologischer (PCR der Teilabschnitte von Haushaltsgenen: 16S-rRNA-Untereinheit, *sodA*, *recA*) oder biochemischen Differenzierungsmethoden (Vitek 2, API-Systeme) verglichen.

Mangels Referenzergebnisses wurden 25 Isolate (etwa 1,8 %) aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen. Die verbliebenen 1332 Isolate wurden in 28 Bakterienordnungen, 109 Genera und 269 Spezies unterteilt.

Auf Speziesebene konnten 1180 (etwa 88,6 %) zum Vergleich herangezogen werden, da durch die Referenzmethoden nicht immer eine zuverlässige Speziesdifferenzierung gelang.

Diese Referenzergebnisse wurden mit den Ergebnissen des Vitek MS-Systems verglichen. Eine Übereinstimmung zeigte sich auf Genusebene bei 86 % (1157 von 1332 Isolaten) und auf Speziesebene bei 80 % (944 von 1180 speziesdifferenzierten Keimen) der ausgewählten Stämme.

Im Vergleich der Korrelationen der Vitek MS-Identifikationen und den Referenzergebnissen zeigte sich eine durchgehend gute Korrelation innerhalb der unterteilten

## 5 Zusammenfassung

Bakterienordnungen. Davon abweichend war die Speziesdifferenzierung von Keimen der Ordnung *Enterobacteriales*. Die beste Korrelation erreichte die Ordnung *Clostridiales*.

Stämme ohne entsprechendes, dokumentiertes Korrelat in der Vitek MS-Datenbank (n = 62) wurden ebenfalls in die Betrachtung mit eingeschlossen. Bei 31 Isolaten konnte kein Ergebnis ermittelt werden, 21 wurden massenspektrometrisch dem gleichen Genus zugeordnet, 10 Genusdifferenzierungen wichen ab.

315 Stämme wurden sowohl im Standardverfahren durch Konjugation von 1  $\mu$ l Ready-to-use Matrix als auch mit einem zweistufigen Säureextraktions- und Matrixkonjugationsverfahren gemessen und mit der solitären Konjugation der doppelten Matrixmenge verglichen. Die Abweichungen auf Genus- wie Speziesebene zwischen dem angewandten Standardprotokoll und den beiden anderen Verfahren waren deutlich signifikant. Im Vergleich der zweifachen Matrixmenge und dem zweistufigen Verfahren zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Aufgrund der Ergebnisse scheint jedoch die Säureextraktion Gram-positiver Kokken in der Genusdifferenzierung von Vorteil zu sein, sie erreichte jedoch kein ausreichendes Signifikanzniveau. Die Daten sprechen eher dafür, eine Optimierung des Probe-Matrix-Verhältnisses anzustreben, zum Beispiel im Rahmen eines ausgedehnten Anwendertrainings.

# Literaturverzeichnis

- [1] Alatoom, A. A., Cazanave, C. J., Cunningham, S. A., Ihde, S. M., and Patel, R. (2012). Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50(1):160–163.
- [2] Alatoom, A. A., Cunningham, S. A., Ihde, S. M., Mandrekar, J., and Patel, R. (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. *J Clin Microbiol*, 49(8):2868–2873.
- [3] Alby, K., Gilligan, P. H., and Miller, M. B. (2013). Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms for the identification of gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 51(11):3852–3854.
- [4] Anhalt, J. P. and Fenselau, C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*, 47(2):219–225.
- [5] Ash, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., Stackebrandt, E., and Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*, 41(3):343–346.
- [6] Barbé, G., Babolat, M., Boeufgras, J. M., Monget, D., and Freney, J. (1994). Evaluation of API NH, a new 2-hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* in a routine clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, 32(1):187–189.
- [7] Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., and von Eiff, C. (2004). Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal

## Literaturverzeichnis

- sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*, 42(11):4988–4995.
- [8] Bishop, C. J., Aanensen, D. M., Jordan, G. E., Kilian, M., Hanage, W. P., and Spratt, B. G. (2009). Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol*, 7:3.
- [9] Bosshard, P. P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M., and Böttger, E. C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, 44(4):1359–1366.
- [10] Cain, T. C., Lubman, D. M., Weber, W. J., and Vertes, A. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 8(12):1026–1030.
- [11] Chen, J. H. K., Ho, P.-L., Kwan, G. S. W., She, K. K. K., Siu, G. K. H., Cheng, V. C. C., Yuen, K.-Y., and Yam, W.-C. (2013). Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol*, 51(6):1733–1739.
- [12] Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17(4):840–862.
- [13] Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R., and LiPuma, J. J. (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*, 39(10):3427–3436.
- [14] Croxatto, A., Prod’hom, G., and Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 36(2):380–407.
- [15] Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., and Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for

## Literaturverzeichnis

- genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods*, 103:80–100.
- [16] DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Keller, K., Brodie, E. L., Larsen, N., Piceno, Y. M., Phan, R., and Andersen, G. L. (2006). NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue):W394–9.
- [17] Devulder, G., Perriere, G., Baty, F., and Flandrois, J. P. (2003). BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J Clin Microbiol*, 41(4):1785–1787.
- [18] Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., and Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*, 38(10):3623–3630.
- [19] Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., and Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 3):925–932.
- [20] Drevinek, M., Dresler, J., Klimentova, J., Pisa, L., and Hubalek, M. (2012). Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 55(1):40–46.
- [21] Dubois, D., Grare, M., Prere, M. F., Segonds, C., Marty, N., and Oswald, E. (2012). Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol*, 50(8):2568–2576.
- [22] Dubois, D., Segonds, C., Prere, M.-F., Marty, N., and Oswald, E. (2013). Identification of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates among other alpha and nonhemolytic streptococci by use of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol*, 51(6):1861–1867.
- [23] Emonet, S., Shah, H. N., Cherkaoui, A., and Schrenzel, J. (2010). Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infec*, 16(11):1604–1613.



## Literaturverzeichnis

- [24] Euzeby, J. P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int J Syst Bacteriol*, 47(2):590–592.
- [25] Fagerquist, C. K., Garbus, B. R., Williams, K. E., Bates, A. H., and Harden, L. A. (2010). Covalent attachment and dissociative loss of sinapinic acid to/from cysteine-containing proteins from bacterial cell lysates analyzed by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 21(5):819–832.
- [26] Fay, M. P. (2010a). Confidence intervals that match Fisher’s exact or Blaker’s exact tests. *Biostatistics*, 11(2):373–374.
- [27] Fay, M. P. (2010b). Two-sided exact tests and matching confidence intervals for discrete data. *R Journal*, 2(1):53–58.
- [28] Fay, M. P., Proschan, M. A., and Brittain, E. (2015). Combining one-sample confidence procedures for inference in the two-sample case. *Biometrics*, 71(1):146–156.
- [29] Federhen, S. (2011). The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Res*, 40(D1):D136–D143.
- [30] Fehlberg, L. C. C., Andrade, L. H. S., Assis, D. M., Pereira, R. H. V., Gales, A. C., and Marques, E. A. (2013). Performance of MALDI-ToF MS for species identification of Burkholderia cepacia complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77(2):126–128.
- [31] Fernández-No, I. C., Böhme, K., Díaz-Bao, M., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., and Calo-Mata, P. (2013). Characterisation and profiling of Bacillus subtilis, Bacillus cereus and Bacillus licheniformis by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiol*, 33(2):235–242.
- [32] Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Avila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J. M., and Muñoz-Bellido, J. L. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 48(6):2110–2115.

## Literaturverzeichnis

- [33] Fournier, R., Wallet, F., Grandbastien, B., Dubreuil, L., Courcol, R., Neut, C., and Dessein, R. (2012). Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 18(3):294–297.
- [34] Franck, J., Longuespee, R., Wisztorski, M., van Remoortere, A., van Zeijl, R., Deelder, A., Salzet, M., McDonnell, L., and Fournier, I. (2010). MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. *Med Sci Monit*, 16(9):BR293–9.
- [35] Freiwald, A. and Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc*, 4(5):732–742.
- [36] Freney, J., Dupperon, M. T., Courtier, C., Hansen, W., Allard, F., Boeufgras, J M, Monget, D., and Fleurette J (1991). Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J Clin Microbiol*, 29(1):38–41.
- [37] Funke, G., Monnet, D., de Bernardis, C., Graevenitz, A. v., and Freney, J. (1998). Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *J Clin Microbiol*, 36(7):1948–1952.
- [38] Garcia-Garrote, F., Cercenado, E., and Bouza, E. (2000). Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J Clin Microbiol*, 38(6):2108–2111.
- [39] Garner, O., Mochon, A., Branda, J., Burnham, C.-A., Bythrow, M., Ferraro, M., Ginocchio, C., Jennemann, R., Manji, R., Procop, G. W., Richter, S., Rychert, J., Sercia, L., Westblade, L., and Lewinski, M. (2014). Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK® MS system. *Clin Microbiol Infec*, 20(4):335–339.
- [40] Goodfellow, M. and Stackebrandt, E. (1991). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. J. Wiley, Chichester — New York — Brisbane — Toronto — Singapore.
- [41] Holland, R. D., Duffy, C. R., Rafii, F., Sutherland, J. B., Heinze, T. M., Holder, C. L., Voorhees, K. J., and Lay Jr, Jackson O. (1999). Identification of bacterial

## Literaturverzeichnis

- proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Anal Chem*, 71(15):3226–3230.
- [42] Hotta, Y., Teramoto, K., Sato, H., Yoshikawa, H., Hosoda, A., and Tamura, H. (2010). Classification of genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS based on ribosomal protein coding in S10-spc-alpha operon at strain level. *J Proteome Res*, 9(12):6722–6728.
- [43] Hrabak, J., Studentova, V., Walkova, R., Zemlickova, H., Jakubu, V., Chudackova, E., Gniadkowski, M., Pfeifer, Y., Perry, J. D., Wilkinson, K., and Bergerova, T. (2012). Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50(7):2441–2443.
- [44] Hsieh, S.-Y., Tseng, C.-L., Lee, Y.-S., Kuo, A.-J., Sun, C.-F., Lin, Y.-H., and Chen, J.-K. (2008). Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics*, 7(2):448–456.
- [45] Idelevich, E. A., Schüle, I., Grünastel, B., Wüllenweber, J., Peters, G., and Becker, K. (2014). Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infec*, 20(10):1001–1006.
- [46] Ikryannikova, L. N., Filimonova, A. V., Malakhova, M. V., Savinova, T., Filimonova, O., Ilina, E. N., Dubovickaya, V. A., Sidorenko, S. V., and Govorun, V. M. (2013). Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin Microbiol Infec*, 19(11):1066–1071.
- [47] Keswani, J. and Whitman, W. B. (2001). Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Micr*, 51(2):667–678.
- [48] Keys, C. J., Dare, D. J., Sutton, H., Wells, G., Lunt, M., McKenna, T., McDowall, M., and Shah, H. N. (2004). Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol*, 4(3):221–242.

## Literaturverzeichnis

- [49] Khot, P. D. and Fisher, M. A. (2013). Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 51(11):3711–3716.
- [50] Lalucat, J., Bennisar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., and Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(2):510–547.
- [51] Lapage, S. P. and Sneath, P. H. A. (1992). *International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision. Bacteriological code*. Published for the International Union of Microbiological Societies by American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1990 revision edition.
- [52] Lasch, P., Beyer, W., Nattermann, H., Stammer, M., Siegbrecht, E., Grunow, R., and Naumann, D. (2009). Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl Environ Microb*, 75(22):7229–7242.
- [53] Lay, J. O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev*, 20(4):172–194.
- [54] Liang X, Zheng K, Qian MG, Lubman DM (1996). Determination of bacterial protein profiles by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with high-performance liquid chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom*, (10(10)):1219–1226.
- [55] Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., de Fatima, M., Zuliani, J., and Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol*, 40(5):1681–1686.
- [56] Ling, T. K. W., Liu, Z. K., and Cheng, A. F. B. (2003). Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*, 41(10):4705–4707.
- [57] Liu, L., Coenye, T., Burns, J. L., Whitby, P. W., Stull, T. L., and LiPuma, J. J. (2002). Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 40(4):1210–1213.

## Literaturverzeichnis

- [58] Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microb*, 63(11):4516–4522.
- [59] Maier, T., Klepel, S., Renner, U., and Kostrzewa, M. (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nat Meth*, 3(4).
- [60] Marko, D. C., Saffert, R. T., Cunningham, S. A., Hyman, J., Walsh, J., Arbefeville, S., Howard, W., Pruessner, J., Safwat, N., Cockerill, F. R., Bossler, A. D., Patel, R., and Richter, S. S. (2012). Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 50(6):2034–2039.
- [61] Martiny, D., Busson, L., Wybo, I., El Haj, R. A., Dediste, A., and Vandenberg, O. (2012). Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50(4):1313–1325.
- [62] Mather, C. A., Rivera, S. F., and Butler-Wu, S. M. (2014). Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol*, 52(1):130–138.
- [63] McElvania TeKippe, E., Shuey, S., Winkler, D. W., Butler, M. A., and Burnham, C.-A. D. (2013). Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol*, 51(5):1421–1427.
- [64] Meetani, M. A. and Voorhees, K. J. (2005). MALDI mass spectrometry analysis of high molecular weight proteins from whole bacterial cells: pretreatment of samples with surfactants. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16(9):1422–1426.
- [65] Miñán, A., Bosch, A., Lasch, P., Stämmeler, M., Serra, D. O., Degrossi, J., Gatti, B., Vay, C., D’aquino, M., Yantorno, O., and Naumann, D. (2009). Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-ToF mass spectrometry. *Analyst*, 134(6):1138–1148.

## Literaturverzeichnis

- [66] Moon, H.-W., Lee, S. H., Chung, H.-S., Lee, M., and Lee, K. (2013). Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *J Med Microbiol*, 62(Pt 9):1301–1306.
- [67] Murray, P. R. (2012). What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn*, 14(5):419–423.
- [68] Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., and Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology+*, 148(1):257–266.
- [69] Navas, M., Pincus, D. H., Wilkey, K., Sercia, L., Lasalvia, M., Wilson, D., Procop, G. W., and Richter, S. S. (2014). Identification of aerobic Gram-positive bacilli by use of Vitek MS. *J Clin Microbiol*, 52(4):1274–1277.
- [70] Neville, S. A., LeCordier, A., Ziochos, H., Chater, M. J., Gosbell, I. B., Mallely, M. W., and van Hal, S. J. (2011). Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J Clin Microbiol*, 49(8):2980–2984.
- [71] Nicklay, J. J., Harris, G. A., Schey, K. L., and Caprioli, R. M. (2013). MALDI imaging and in situ identification of integral membrane proteins from rat brain tissue sections. *Anal Chem*, 85(15):7191–7196.
- [72] O’Hara, C. M. and Miller, J. M. (2003). Evaluation of the Vitek 2 ID-GNB assay for identification of members of the family Enterobacteriaceae and other nonenteric gram-negative bacilli and comparison with the Vitek GNI+ card. *J Clin Microbiol*, 41(5):2096–2101.
- [73] Palleroni, N. J. and Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol*, 43(3):606–609.
- [74] Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., LiPuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., Jones, T. H., and Mahenthiralingam, E. (2005). Development of a

## Literaturverzeichnis

- recA gene-based identification approach for the entire Burkholderia genus. *Appl Environ Microb*, 71(7):3917–3927.
- [75] Pikis, A., Campos, J. M., Rodriguez, W. J., and Keith, J. M. (2001). Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications. *J Infect Dis*, 184(5):582–590.
- [76] Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C., and Trieu-Cuot, P. (2001). Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the sodA gene as a target. *J Clin Microbiol*, 39(12):4296–4301.
- [77] Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P., and Trieu-Cuot, P. (1998). Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol*, 36(1):41–47.
- [78] Rehm, H. and Letzel, T. (2009). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Der Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [79] Richter, M. and Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(45):19126–19131.
- [80] Richter, S. S., Sercia, L., Branda, J. A., Burnham, C.-A. D., Bythrow, M., Ferraro, M. J., Garner, O. B., Ginocchio, C. C., Jennemann, R., Lewinski, M. A., Manji, R., Mochon, A. B., Rychert, J. A., Westblade, L. F., and Procop, G. W. (2013). Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(12):1571–1578.
- [81] Rychert, J., Burnham, C.-A. D., Bythrow, M., Garner, O. B., Ginocchio, C. C., Jennemann, R., Lewinski, M. A., Manji, R., Mochon, A. B., Procop, G. W., Richter, S. S., Sercia, L., Westblade, L. F., Ferraro, M. J., and Branda, J. A. (2013). Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, 51(7):2225–2231.
- [82] Ryzhov, V. and Fenselau, C. (2001). Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem*, 73(4):746–750.

## Literaturverzeichnis

- [83] Sanger, F. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci Usa*, 74(12):5463–5467.
- [84] Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M., and Geider, K. (2008). Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE*, 3(7):e2843.
- [85] Schulthess, B., Bloemberg, G. V., Zbinden, R., Böttger, E. C., and Hombach, M. (2014). Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, 52(4):1089–1097.
- [86] Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., and Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49(4):543–551.
- [87] Shu, X., Liang, M., Yang, B., Li, Y., Liu, C., Wang, Y., and Shu, J. (2012). Lipid fingerprinting of *Bacillus* spp. using online MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Methods*, 4(10):3111.
- [88] Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, Stephen B. H., and Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071):674–679.
- [89] Spanu, T., Posteraro, B., Fiori, B., D’Inzeo, T., Campoli, S., Ruggeri, A., Tumbarello, M., Canu, G., Treccarichi, E. M., Parisi, G., Tronci, M., Sanguinetti, M., and Fadda, G. (2012). Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*, 50(1):176–179.
- [90] Staley, J. T. (2009). Universal species concept: pipe dream or a step toward unifying biology? *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(11):1331–1336.
- [91] Tan, K. E., Ellis, B. C., Lee, R., Stamper, P. D., Zhang, S. X., and Carroll, K. C. (2012). Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology labo-



## Literaturverzeichnis

- ratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol*, 50(10):3301–3308.
- [92] Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., and Tao, H. (2007a). A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences. *J Proteome Res*, 6(10):3899–3907.
- [93] Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., Tao, H., Yoshikawa, H., Hotta, Y., Hosoda, A., and Tamura, H. (2007b). Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Anal Chem*, 79(22):8712–8719.
- [94] Theel, E. S., Schmitt, B. H., Hall, L., Cunningham, S. A., Walchak, R. C., Patel, R., and Wengenack, N. L. (2012). Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50(9):3093–3095.
- [95] Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 60(2):407–438.
- [96] Vila, J., Juiz, P., Salas, C., Almela, M., de la Fuente, C. G., Zboromyrska, Y., Navas, J., Bosch, J., Agüero, J., de la Bellacasa, J. P., and Martínez-Martínez, L. (2012). Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 50(5):1745–1747.
- [97] Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173(2):697–703.
- [98] William Revelle (2015). psych: Procedures for psychological, psychometric, and personality research.
- [99] Williams, T. L., Andrzejewski, D., Lay, J. O., and Musser, S. M. (2003). Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass

## Literaturverzeichnis

- spectra obtained from whole bacteria cells. *J Am Soc Mass Spectrom*, 14(4):342–351.
- [100] Winkler, M. A., Uher, J., and Cepa, S. (1999). Direct analysis and identification of *Helicobacter* and *Campylobacter* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*, 71(16):3416–3419.
- [101] Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., and Yuen, K.-Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 14(10):908–934.
- [102] Yoshida, H., Maki, Y., Furuike, S., Sakai, A., Ueta, M., and Wada, A. (2012). YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 194(16):4178–4183.
- [103] Zhu, B., Di Xiao, Zhang, H., Zhang, Y., Gao, Y., Xu, L., Lv, J., Wang, Y., Zhang, J., and Shao, Z. (2013). MALDI-TOF MS distinctly differentiates nontypable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *PLoS ONE*, 8(2):e56139.

# 6 Anhang

## 6.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung / Erklärung
<b>1-9</b>	
16S rDNA	DNA der ribosomalen Ribonukleinsäure, Bestandteil von bakteriellen Ribosomen
<b>A</b>	
API	<i>Analytical Profile Index</i> , Analytischer-Profil-Index, „Bunte Reihe“
<b>B</b>	
<i>bins</i>	Wertebereich
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Programm zur Auswertung biologischer Sequenzdaten von DNA- oder Proteinsequenzen
bp	Basenpaare, Maß zur Beschreibung der Anzahl der Basenpaare eines Nukleinsäureabschnitts
<b>C</b>	
CHCA	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> , Zimtsäure. In der MALDI-TOF Massenspektrometrie der mikrobiologischen Diagnostik gängige Matrix
<b>D</b>	
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Fortsetzung nächste Seite

## 6 Anhang

Abkürzung	Bezeichnung / Erklärung
<b>F</b>	
FA	<i>formic acid</i> , deutsch Ameisensäure. Synonyme: Methansäure, Formylsäure, Formalinsäure, Hydrocarbonsäure
<b>G</b>	
g	Physikalische Einheit der Schwerebeschleunigung
<b>K</b>	
KBE	Kolonie bildende Einheit
KI	Konfidenzintervall
<b>M</b>	
M	Mol
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization-Time-of-Flight mass spectrometry</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisation Flugzeit Massenspektrometrie
min	Minuten
$\mu$ l	Mikroliter
mm	Millimeter
MZML	offener Standard eines Textdatei-Formats of Basis des XML-Standards (siehe dort), angepasst an die Datenerfassung der Massenspektrometrie
<b>N</b>	
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCO	National Coordination Office der National Science Foundation, USA
NIH	National Institutes of Health
<b>O</b>	

Fortsetzung nächste Seite

## 6 Anhang

Abkürzung	Bezeichnung / Erklärung
OR	<i>Odds ratio</i> , Quotenverhältnis
<b>P</b>	
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<b>R</b>	
<i>recA</i>	Gen des Rekombinationsproteins A
RNA	Ribonukleinsäure
<b>S</b>	
sec	Sekunden
<i>sodA</i>	Gen der Superoxiddismutase A
<b>X</b>	
XML	<i>Extensible Markup Language</i> , offener Standard eines Textdatei-Formats einer gängigen Auszeichnungssprache / Formatiersprache
<b>Z</b>	
z	Elementarladungszahl, Ladungszahl, Ladungsquantenzahl

## 6.2 Überblick über die getesteten Stämme

### 6.2.1 Typstämme

Tabelle 6.2: Typstämme aus Referenzlaboren und Stammsammlungen

Stammbezeichnung	Genus	Species
ATCC 15309	<i>Acinetobacter</i>	<i>woffii</i>
ATCC 10048	<i>Actinomyces</i>	<i>israelii</i>
ATCC 700406	<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>
Wue 2967	<i>Aggregatibacter</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>
ATCC 11778	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>

## 6 Anhang

Tabelle 6.2: Fortsetzung

ATCC 6051	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>
ATCC 25285	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>
DSM 4925	<i>Bordetella</i>	<i>pertussis</i>
ATCC 25416	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
DSM 7271	<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
ATCC 8339	<i>Cardiobacterium</i>	<i>hominis</i>
ATCC 8090	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>
ATCC 700056	<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>
ATCC 13124	<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>
IHM 40	<i>Clostridium</i>	<i>sporogenes</i>
ATCC 10700	<i>Corynebacterium</i>	<i>pseudodiphtheriticum</i>
ATCC 31048	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>
ATCC 13047	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>
ATCC 29212	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
ATCC 19434	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>
ATCC 25922	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
IHM 30	<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>
ATCC 14018	<i>Gardnerella</i>	<i>vaginalis</i>
IHM 53	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>
ATCC 33392	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>
KL 105/09	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>
KL 118/09	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>
ATCC 700324	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>
ATCC 13883	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>
ATCC 19118	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>
ATCC 20030	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>
NCTC 10212	<i>Neisseria</i>	<i>animalis</i>
LMG 8383	<i>Neisseria</i>	<i>canis</i>
DSM 4630	<i>Neisseria</i>	<i>cinerea</i>
LMG 8380	<i>Neisseria</i>	<i>cinerea</i>
LMG 5124	<i>Neisseria</i>	<i>elongata</i>
NCO 11050	<i>Neisseria</i>	<i>elongata</i>

## 6 Anhang

Tabelle 6.2: Fortsetzung

LMG 5297	<i>Neisseria</i>	<i>flavescens</i>
DSM 9188	<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>
FA 1090	<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>
MS 11	<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>
ATCC 51483	<i>Neisseria</i>	<i>iguanae</i>
DSM 4691	<i>Neisseria</i>	<i>lactamica</i>
ATCC 33926	<i>Neisseria</i>	<i>macacae</i>
B 2135 MC58	<i>Neisseria</i>	<i>meningitidis</i>
C 2120	<i>Neisseria</i>	<i>meningitidis</i>
Y IHM 14	<i>Neisseria</i>	<i>meningitidis</i>
DSM 4631	<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
LMG 5284	<i>Neisseria</i>	<i>perflava</i>
LMG 5290	<i>Neisseria</i>	<i>sicca</i>
LMG 5313	<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>
ATCC 51223	<i>Neisseria</i>	<i>weaveri</i>
LMG 5135	<i>Neisseria</i>	<i>weaveri</i>
DSM 20709	<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>
ATCC 14153	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>
ATCC 6380	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>
ATCC 27853	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
ATCC 9027	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
ATCC 39184	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin
ATCC 14028	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium
ATCC 29903	<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>
ATCC 25931	<i>Shigella</i>	<i>sonnei</i>
ATCC 25923	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
ATCC 12228	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
ATCC 15305	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>
ATCC 13637	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>
ATCC 12043	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>

## 6 Anhang

Tabelle 6.2: Fortsetzung

ATCC 46919	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
ATCC 19615	<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>
ATCC 700407	<i>Streptococcus</i>	<i>uberis</i>

### 6.2.2 Stämme und Differenzierungsmethoden

Tabelle 6.3: Überblick über alle getesteten Stämme und deren Referenzmethode(n)

	Genus	Species	Isolate	Bestätigungsmethode
1	<i>Abiotrophia</i>	<i>defectiva</i>	1	16S rDNA
2	<i>Achromobacter</i>	species	2	16S rDNA
3	<i>Achromobacter</i>	<i>xylooxidans</i>	3	16S rDNA
4	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	4	16S rDNA
6	<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	2	16S rDNA
7	<i>Acinetobacter</i>	<i>junii</i>	2	16S rDNA
8	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	4	16S rDNA
9	<i>Acinetobacter</i>	<i>septicus</i>	1	16S rDNA
10	<i>Acinetobacter</i>	species	2	16S rDNA
11	<i>Acinetobacter</i>	<i>ursingii</i>	1	16S rDNA
12	<i>Actinobaculum</i>	<i>schaalii</i>	2	16S rDNA
13	<i>Actinomyces</i>	<i>europaeus</i>	1	16S rDNA
14	<i>Actinomyces</i>	<i>graevenetzii</i>	1	16S rDNA
15	<i>Actinomyces</i>	<i>israelii</i>	1	16S rDNA
16	<i>Actinomyces</i>	<i>meyeri</i>	1	16S rDNA
17	<i>Actinomyces</i>	<i>naeslundii</i>	1	16S rDNA
18	<i>Actinomyces</i>	<i>neuui</i>	1	16S rDNA
19	<i>Actinomyces</i>	<i>radicidentis</i>	1	16S rDNA
20	<i>Aerococcus</i>	<i>urinae</i>	1	16S rDNA
21	<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>	1	16S rDNA
22	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	6	16S rDNA
23	<i>Aeromonas</i>	<i>sobria</i>	2	16S rDNA
24	<i>Aeromonas</i>	species	1	16S rDNA



## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

25	<i>Aggregatibacter</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>	1	16S rDNA
26	<i>Aggregatibacter</i>	<i>aphrophilus</i>	6	16S rDNA
27	<i>Aggregatibacter</i>	<i>segnis</i>	1	16S rDNA
28	<i>Aggregatibacter</i>	species	2	16S rDNA
29	<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	4	16S rDNA
30	<i>Alistipes</i>	<i>indistinctus</i>	1	16S rDNA
31	<i>Arthrobacter</i>	<i>cumminsii</i>	1	16S rDNA
32	<i>Atopobium</i>	<i>parvulum</i>	1	16S rDNA
33	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	1	16S rDNA
34	<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	1	16S rDNA
35	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	2	16S rDNA
36	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	1	16S rDNA
37	<i>Bacillus</i>	species	15	16S rDNA
38	<i>Bacteroides</i>	<i>caccae</i>	2	16S rDNA
39	<i>Bacteroides</i>	<i>dorei</i>	1	16S rDNA
40	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	13	16S rDNA
41	<i>Bacteroides</i>	<i>ovatus</i>	8	16S rDNA
42	<i>Bacteroides</i>	<i>thetaitaomicron</i>	8	16S rDNA
43	<i>Bacteroides</i>	species	3	16S rDNA
44	<i>Bacteroides</i>	<i>uniformis</i>	3	16S rDNA
45	<i>Bacteroides</i>	<i>vulgatus</i>	4	16S rDNA
46	<i>Bacteroides</i>	<i>xylanisolvens</i>	1	16S rDNA
47	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	1	16S rDNA
48	<i>Bifidobacterium</i>	species	1	16S rDNA
49	<i>Bordetella</i>	<i>pertussis</i>	1	16S rDNA
50	<i>Bordetella</i>	species	1	16S rDNA
51	<i>Brevibacterium</i>	<i>casei</i>	2	16S rDNA
52	<i>Brevibacterium</i>	<i>mcbrelleri</i>	1	16S rDNA
53	<i>Brevundimonas</i>	<i>diminuta</i>	2	16S rDNA
54	<i>Burkholderia</i>	<i>cenocepacia</i>	5	16S rDNA, <i>recA</i>
55	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>	5	16S rDNA, <i>recA</i>
56	<i>Burkholderia</i>	<i>ferrariae</i>	2	16S rDNA, <i>recA</i>

## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

57	<i>Burkholderia</i>	<i>gladioli</i>	17	16S rDNA, <i>recA</i>
58	<i>Burkholderia</i>	<i>multivorans</i>	29	16S rDNA, <i>recA</i>
59	<i>Burkholderia</i>	species	1	16S rDNA
60	<i>Buttiauxella</i>	species	1	16S rDNA, Vitek 2
61	<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	2	16S rDNA
62	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	7	16S rDNA
63	<i>Campylobacter</i>	<i>lari</i>	2	16S rDNA
64	<i>Campylobacter</i>	<i>ureolyticus</i>	3	16S rDNA
65	<i>Capnocytophaga</i>	<i>leadbetteri</i>	1	16S rDNA
66	<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>	2	16S rDNA
67	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>	3	16S rDNA
68	<i>Capnocytophaga</i>	species	1	16S rDNA
69	<i>Cardiobacterium</i>	<i>hominis</i>	1	16S rDNA
70	<i>Chryseobacterium</i>	<i>indologenes</i>	1	16S rDNA
71	<i>Chryseobacterium</i>	species	1	16S rDNA
72	<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>	3	16S rDNA, Vitek 2
73	<i>Citrobacter</i>	<i>braakii</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
74	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	9	16S rDNA, Vitek 2
75	<i>Citrobacter</i>	<i>koseri</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
76	<i>Citrobacter</i>	<i>sedlakii</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
77	<i>Citrobacter</i>	species	3	16S rDNA, Vitek 2
78	<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	2	16S rDNA
79	<i>Clostridium</i>	<i>clostridioforme</i>	1	16S rDNA
80	<i>Clostridium</i>	<i>difficile</i>	21	16S rDNA
81	<i>Clostridium</i>	<i>paraputrificum</i>	1	16S rDNA
82	<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	17	16S rDNA
83	<i>Clostridium</i>	<i>ramosum</i>	1	16S rDNA
84	<i>Clostridium</i>	<i>septicum</i>	3	16S rDNA
85	<i>Clostridium</i>	<i>sporogenes</i>	1	16S rDNA
86	<i>Clostridium</i>	species	1	16S rDNA
87	<i>Corynebacterium</i>	<i>confusum</i>	1	16S rDNA
88	<i>Corynebacterium</i>	<i>jeikeium</i>	2	16S rDNA

## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

89	<i>Corynebacterium</i>	<i>mucifaciens</i>	1	16S rDNA
90	<i>Corynebacterium</i>	<i>propinquum</i>	1	16S rDNA
91	<i>Corynebacterium</i>	<i>pseudodiphtheriticum</i>	2	16S rDNA
92	<i>Corynebacterium</i>	<i>striatum</i>	1	16S rDNA
93	<i>Corynebacterium</i>	<i>tuberculostearicum</i>	1	16S rDNA
94	<i>Corynebacterium</i>	species	13	16S rDNA
95	<i>Corynebacterium</i>	<i>urealyticum</i>	2	16S rDNA
96	<i>Cronobacter</i>	<i>sakazakii</i>	4	16S rDNA
97	<i>Cupriavidus</i>	<i>metallidurans</i>	1	16S rDNA
98	<i>Delftia</i>	<i>acidovorans</i>	4	16S rDNA, Vitek 2
99	<i>Delftia</i>	species	2	16S rDNA, Vitek 2
100	<i>Dermabacter</i>	<i>hominis</i>	1	16S rDNA
101	<i>Dietzia</i>	species	1	16S rDNA
102	<i>Eggerthella</i>	<i>lenta</i>	1	16S rDNA
103	<i>Eikenella</i>	<i>corrodens</i>	5	16S rDNA
104	<i>Elizabethkingia</i>	<i>meningoseptica</i>	3	16S rDNA
105	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	2	16S rDNA, Vitek 2
106	<i>Enterobacter</i>	<i>amnigenus</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
107	<i>Enterobacter</i>	<i>asburiae</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
108	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	23	16S rDNA, Vitek 2
109	<i>Enterobacter</i>	species	2	16S rDNA, Vitek 2
110	<i>Enterococcus</i>	<i>avium</i>	1	16S rDNA
111	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	2	16S rDNA
112	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	21	16S rDNA
113	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	14	16S rDNA
114	<i>Enterococcus</i>	<i>gallinarum</i>	2	16S rDNA
115	<i>Enterococcus</i>	species	2	16S rDNA
116	<i>Erysipelothrix</i>	<i>rhusiopathiae</i>	1	16S rDNA
117	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	20	16S rDNA, Vitek 2
118	<i>Escherichia</i>	<i>hermannii</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
119	<i>Escherichia</i>	<i>vulneris</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
120	<i>Eubacterium</i>	species	1	16S rDNA

## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

121	<i>Ewingella</i>	<i>americana</i>	1	16S rDNA
122	<i>Facklamia</i>	species	1	16S rDNA
123	<i>Fastidiosipila</i>	<i>sanguinis</i>	1	16S rDNA
124	<i>Finegoldia</i>	<i>magna</i>	3	16S rDNA
125	<i>Fluoribacter</i>	<i>bozemanae</i>	1	16S rDNA
126	<i>Fluoribacter</i>	<i>gormanii</i>	1	16S rDNA
127	<i>Fusobacterium</i>	<i>necrophorum</i>	8	16S rDNA
128	<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>	6	16S rDNA
129	<i>Gardnerella</i>	<i>vaginalis</i>	10	16S rDNA
130	<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>	5	16S rDNA
131	<i>Gemella</i>	<i>morbillosum</i>	3	16S rDNA
132	<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>	1	16S rDNA
133	<i>Granulicatella</i>	species	1	16S rDNA
134	<i>Haemophilus</i>	<i>haemolyticus</i>	4	16S rDNA, NRZMHi
135	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	22	16S rDNA, NRZMHi
136	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	28	16S rDNA, NRZMHi
137	<i>Haemophilus</i>	species	6	16S rDNA
138	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	5	16S rDNA, Vitek 2
139	<i>Inquilinus</i>	<i>limosus</i>	1	16S rDNA
140	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	8	16S rDNA, Vitek 2
141	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	16	16S rDNA, Vitek 2
142	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	1	16S rDNA
143	<i>Lactobacillus</i>	<i>catenaformis</i>	1	16S rDNA
144	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	1	16S rDNA
145	<i>Lactobacillus</i>	<i>jensenii</i>	1	16S rDNA
146	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	1	16S rDNA
147	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	2	16S rDNA
148	<i>Lactobacillus</i>	species	4	16S rDNA
149	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	1	16S rDNA
150	<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
151	<i>Leclercia</i>	species	1	16S rDNA, Vitek 2
152	<i>Legionella</i>	<i>jordanis</i>	1	16S rDNA

6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

153	<i>Legionella</i>	<i>longbeachae</i>	1	16S rDNA
154	<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>	5	16S rDNA
155	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	9	16S rDNA
156	<i>Microbacterium</i>	<i>lacticum</i>	1	16S rDNA
157	<i>Microbacterium</i>	species	1	16S rDNA
158	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	3	16S rDNA
159	<i>Micrococcus</i>	species	10	16S rDNA
160	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>	4	16S rDNA
161	<i>Moraxella</i>	<i>osloensis</i>	1	16S rDNA
162	<i>Moraxella</i>	species	1	16S rDNA
163	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	8	16S rDNA, Vitek 2
164	<i>Neisseria</i>	<i>animalis</i>	2	NRZMHi
165	<i>Neisseria</i>	<i>canis</i>	1	NRZMHi
166	<i>Neisseria</i>	<i>cinerea</i>	2	NRZMHi
167	<i>Neisseria</i>	<i>elongata</i>	4	NRZMHi
168	<i>Neisseria</i>	<i>flavescens</i>	4	NRZMHi
169	<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>	9	NRZMHi
170	<i>Neisseria</i>	<i>iguanae</i>	1	NRZMHi
171	<i>Neisseria</i>	<i>lactamica</i>	1	NRZMHi
172	<i>Neisseria</i>	<i>macacae</i>	1	NRZMHi
173	<i>Neisseria</i>	<i>meningitidis</i>	4	NRZMHi
174	<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>	2	16S rDNA, NRZMHi
175	<i>Neisseria</i>	<i>perflava</i>	1	NRZMHi
176	<i>Neisseria</i>	<i>sicca</i>	1	NRZMHi
177	<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	1	NRZMHi
178	<i>Neisseria</i>	species	5	16S rDNA, Api NH
179	<i>Neisseria</i>	<i>weaveri</i>	3	NRZMHi
180	<i>Nocardia</i>	<i>farcinica</i>	1	16S rDNA
181	<i>Nocardia</i>	species	2	16S rDNA
182	<i>Ochrobactrum</i>	<i>anthropi</i>	2	16S rDNA
183	<i>Ochrobactrum</i>	species	1	16S rDNA
184	<i>Paenibacillus</i>	<i>glucanolyticus</i>	1	16S rDNA

## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

185	<i>Paenibacillus</i>	<i>illinoisensis</i>	1	16S rDNA
186	<i>Paenibacillus</i>	<i>provencensis</i>	1	16S rDNA
187	<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	4	16S rDNA, Vitek 2
188	<i>Parabacteroides</i>	<i>distasonis</i>	3	16S rDNA
189	<i>Parabacteroides</i>	species	1	16S rDNA
190	<i>Paracoccus</i>	<i>yeei</i>	2	16S rDNA
191	<i>Parvimonas</i>	<i>micra</i>	17	16S rDNA
192	<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	3	16S rDNA
193	<i>Pasteurella</i>	species	1	16S rDNA
194	<i>Peptoniphilus</i>	species	5	16S rDNA
195	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius</i>	2	16S rDNA
196	<i>Peptostreptococcus</i>	species	4	16S rDNA
197	<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>	3	16S rDNA
198	<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>	3	16S rDNA
199	<i>Prevotella</i>	<i>baroniae</i>	1	16S rDNA
200	<i>Prevotella</i>	<i>bivia</i>	4	16S rDNA
201	<i>Prevotella</i>	<i>buccae</i>	6	16S rDNA
202	<i>Prevotella</i>	<i>denticola</i>	5	16S rDNA
203	<i>Prevotella</i>	<i>disiens</i>	3	16S rDNA
204	<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>	2	16S rDNA
205	<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	9	16S rDNA
206	<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>	1	16S rDNA
207	<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>	2	16S rDNA
208	<i>Prevotella</i>	<i>oris</i>	3	16S rDNA
209	<i>Prevotella</i>	<i>timonensis</i>	2	16S rDNA
210	<i>Prevotella</i>	species	6	16S rDNA
211	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	36	16S rDNA
212	<i>Propionibacterium</i>	<i>avidum</i>	1	16S rDNA
213	<i>Propionibacterium</i>	species	3	16S rDNA
214	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	20	16S rDNA, Vitek 2
215	<i>Proteus</i>	<i>penneri</i>	1	16S rDNA, Vitek 2, Indol
216	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>	7	16S rDNA, Vitek 2, Indol

## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

217	<i>Providencia</i>	<i>rettgeri</i>	1	16S rDNA
218	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	45	16S rDNA
219	<i>Pseudomonas</i>	<i>alcaligenes</i>	2	16S rDNA
220	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	6	16S rDNA
221	<i>Pseudomonas</i>	<i>kuykendallii</i>	1	16S rDNA
222	<i>Pseudomonas</i>	<i>oleovorans</i>	1	16S rDNA
223	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	2	16S rDNA
224	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	8	16S rDNA
225	<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>	10	16S rDNA
226	<i>Pseudomonas</i>	species	4	16S rDNA, Vitek 2
227	<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	2	16S rDNA
228	<i>Rahnella</i>	species	1	16S rDNA, Vitek 2
229	<i>Raoultella</i>	<i>planticola</i>	3	16S rDNA
230	<i>Rhizobium</i>	<i>radiobacter</i>	2	16S rDNA
231	<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	2	16S rDNA
232	<i>Rothia</i>	species	1	16S rDNA
233	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	1	Api E
234	<i>Serratia</i>	<i>liquefaciens</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
235	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	11	16S rDNA, Vitek 2
236	<i>Serratia</i>	<i>odorifera</i>	1	16S rDNA, Vitek 2
237	<i>Serratia</i>	species	1	16S rDNA, Vitek 2
238	<i>Shewanella</i>	species	1	16S rDNA
239	<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>	1	16S rDNA, Motilitätstest
240	<i>Shigella</i>	<i>sonnei</i>	4	16S rDNA, Motilitätstest
241	<i>Solobacterium</i>	<i>moorei</i>	2	16S rDNA
242	<i>Sphingobacterium</i>	<i>multivorum</i>	1	16S rDNA
243	<i>Sphingobacterium</i>	<i>spiritivorum</i>	2	16S rDNA
244	<i>Sphingomonas</i>	<i>paucimobilis</i>	6	16S rDNA
245	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	38	16S rDNA
246	<i>Staphylococcus</i>	<i>auricularis</i>	1	16S rDNA
247	<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis</i>	14	16S rDNA
248	<i>Staphylococcus</i>	<i>caprae</i>	2	16S rDNA

## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

249	<i>Staphylococcus</i>	<i>carnosus</i>	1	16S rDNA
250	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	26	16S rDNA
251	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	10	16S rDNA
252	<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>	12	16S rDNA, <i>sodA</i>
253	<i>Staphylococcus</i>	<i>lugdunensis</i>	8	16S rDNA, <i>sodA</i>
254	<i>Staphylococcus</i>	<i>pettenkoferi</i>	1	16S rDNA
255	<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	3	16S rDNA
256	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	2	16S rDNA
257	<i>Staphylococcus</i>	<i>schleiferi</i>	1	16S rDNA
258	<i>Staphylococcus</i>	<i>sciuri</i>	1	16S rDNA
259	<i>Staphylococcus</i>	<i>simulans</i>	6	16S rDNA
260	<i>Staphylococcus</i>	species	8	16S rDNA
261	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>	3	16S rDNA
262	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	12	16S rDNA
263	<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	14	16S rDNA
264	<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	11	16S rDNA
265	<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	6	16S rDNA, <i>sodA</i>
266	<i>Streptococcus</i>	<i>cristatus</i>	1	16S rDNA
267	<i>Streptococcus</i>	<i>dysgalactiae</i>	4	16S rDNA, <i>sodA</i>
268	<i>Streptococcus</i>	<i>gallolyticus</i>	2	16S rDNA
269	<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	1	16S rDNA
270	<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>	9	16S rDNA
271	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	6	16S rDNA, <i>sodA</i>
272	<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	1	16S rDNA
273	<i>Streptococcus</i>	<i>oralis</i>	2	16S rDNA, <i>sodA</i>
274	<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	2	16S rDNA, <i>sodA</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	15	16S rDNA
275	<i>Streptococcus</i>	<i>pseudopneumoniae</i>	1	16S rDNA
276	<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	10	16S rDNA, <i>sodA</i>
277	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	3	16S rDNA
278	<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	8	16S rDNA
279	<i>Streptococcus</i>	<i>uberis</i>	1	16S rDNA



## 6 Anhang

Tabelle 6.3: Fortsetzung

280	<i>Streptococcus</i>	species	28	16S rDNA
281	<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	1	16S rDNA
282	<i>Tatlockia</i>	<i>micdadei</i>	1	16S rDNA
283	<i>Varibaculum</i>	<i>camabriense</i>	1	16S rDNA
284	<i>Veillonella</i>	species	8	16S rDNA
285	<i>Weissella</i>	<i>hellenica</i>	1	16S rDNA
286	<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	5	16S rDNA
287	<i>Yokenella</i>	<i>regensburgeri</i>	1	16S rDNA



6 Anhang

Tabelle 6.5: *Aeromonadales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Aeromonas</i> species <sup>a</sup>	1 3 2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2
<i>Aeromonas sobria</i>	1
<b>Kein Ergebnis</b>	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

Tabelle 6.6: *Alteromonadales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1
<b>Kein Ergebnis</b>	
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

## 6 Anhang

Tabelle 6.7: *Bacillales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

Referenzbezeichnung										
<b>Vitek MS</b>										
<i>Bacillus species</i> <sup>a</sup>	6	1			1	1				
<i>Bacillus cereus</i>										
<i>Bacillus firmus</i>		1								
<i>Bacillus licheniformis</i>			1							
<i>Bacillus megaterium</i>	1									
<i>Bacillus pumilus</i>	1		1							
<i>Bacillus simplex</i>	2									
<i>Bacillus subtilis</i>										
<i>Gemella species</i> <sup>a</sup>					1	1				
<i>Gemella haemolysans</i>					4					
<i>Gemella morbillorum</i>					1					
<i>Listeria species</i> <sup>a</sup>						1				
<i>Listeria monocytogenes</i>						8				
<i>Paenibacillus species</i> <sup>a</sup>							1			1
<i>Paenibacillus durus</i>										1
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>										
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>										
<i>Paenibacillus provencensis</i>										
<i>Staphylococcus species</i> <sup>a</sup>								1		
<i>Staphylococcus aureus</i>							39			
<i>Staphylococcus auricularis</i>						1	1			
<i>Staphylococcus capitis</i>						1	12			1
<i>Staphylococcus caprae</i>								1		
<i>Staphylococcus carnosus</i>								1		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>						3		24	1	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>								10		
<i>Staphylococcus hominis</i>									12	
<i>Staphylococcus intermedius</i>										
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>									8	
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>										
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>									1	
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>										3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>										3
<i>Staphylococcus schleiferi</i>										1
<i>Staphylococcus sciuri</i>						1				1
<i>Staphylococcus simulans</i>										6
<i>Staphylococcus warneri</i>										2
<b>Kein Ergebnis</b>	6				1	1	1	1	1	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>										1

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

## 6 Anhang

Tabelle 6.8: *Bacteroidales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

<b>Referenzbezeichnung</b>										
<i>Alistipes indistinctus</i>										
<i>Bacteroides</i> species <sup>a</sup>	1									
<i>Bacteroides caccae</i>	2									
<i>Bacteroides dorei</i>										
<i>Bacteroides fragilis</i>	13									
<i>Bacteroides ovatus</i>	8								1	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7							1		
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	3								
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1		1		4					
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>										
<i>Parabacteroides</i> species <sup>a</sup>										
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	3								
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3									
<i>Prevotella</i> species <sup>a</sup>	1						1			
<i>Prevotella baroniae</i>										
<i>Prevotella bivia</i>	4				4					
<i>Prevotella buccae</i>	1		6		1					
<i>Prevotella denticola</i>	4									
<i>Prevotella disiens</i>	3							1		
<i>Prevotella intermedia</i>	2									
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1			9						
<i>Prevotella nigrescens</i>										
<i>Prevotella oralis</i>										
<i>Prevotella oris</i>	2									
<i>Prevotella timonensis</i>										
<b>Kein Ergebnis</b>	1	2								2
<b>Genus anderer Ordnung</b>										

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

## 6 Anhang

Tabelle 6.9: *Bifidobacteriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	<b>Referenzbezeichnung</b>			
	<i>Bifidobacterium species</i> <sup>a</sup>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<b>Genus anderer Ordnung</b>
<b>Vitek MS</b>				
<i>Bifidobacterium species</i> <sup>a</sup>	1	1	2	1
<i>Bifidobacterium longum</i>				
<i>Gardnerella vaginalis</i>			8	
<b>Kein Ergebnis</b>				
<b>Genus anderer Ordnung</b>				

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

6 Anhang

Tabelle 6.10: *Burkholderiales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

Referenzbezeichnung											
<i>Achromobacter</i> species <sup>a</sup>	2	3									1
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>											
<i>Alcaligenes faecalis</i>		3									
<i>Bordetella avium</i>			1								
<i>Bordetella hinzii</i>											
<i>Bordetella pertussis</i>				1							
<i>Bordetella trematum</i>					1						
<i>Burkholderia</i> species <sup>a</sup>					2	2	2				
<i>Burkholderia cenocepacia</i>											
<i>Burkholderia cepacia</i>					1	3	3				
<i>Burkholderia gladioli</i>					1		15				
<i>Burkholderia multivorans</i>					1		26				
<i>Comamonas testosteroni</i>											
<i>Cupriavidus metallidurans</i>											
<i>Delftia</i> species <sup>a</sup>											
<i>Delftia acidovorans</i>									1	3	
<i>Kerstersia gyjorum</i>											
<b>Kein Ergebnis</b>	1			2		1	1	1	1	1	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>									1		

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

## 6 Anhang

Tabelle 6.11: *Campylobacterales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

<b>Vitek MS</b>	<b>Referenzbezeichnung</b>	
<i>Arcobacter butzleri</i>		
<i>Campylobacter fetus</i>	2	
<i>Campylobacter jejuni</i>		7
<i>Campylobacter lari</i>		2
<i>Campylobacter ureolyticus</i>		1
<b>Kein Ergebnis</b>	1	2
<b>Genus anderer Ordnung</b>	1	

Tabelle 6.12: *Cardiobacteriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

<b>Vitek MS</b>	<b>Referenzbezeichnung</b>	
<i>Cardiobacterium hominis</i>		1
<b>Kein Ergebnis</b>		
<b>Genus anderer Ordnung</b>		



## 6 Anhang

Tabelle 6.13: *Caulobacterales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
	<i>Brevundimonas diminuta</i>
	Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1
<b>Kein Ergebnis</b>	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

## 6 Anhang

Tabelle 6.14: *Clostridiales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

Referenzbezeichnung				
<i>Clostridium species</i> <sup>a</sup>				
<i>Clostridium butyricum</i>	2			
<i>Clostridium clostridioforme</i>				
<i>Clostridium difficile</i>		19		
<i>Clostridium paraputrificum</i>			1	
<i>Clostridium perfringens</i>			15	
<i>Clostridium ramosum</i>				1
<i>Clostridium septicum</i>				3
<i>Clostridium sporogenes</i>				1
<i>Eubacterium species</i> <sup>a</sup>				
<i>Eubacterium limosum</i>				1
<i>Fastidiosipila sanguinis</i>				
<i>Finegoldia magna</i>				3
<i>Parvimonas micra</i>				16
<i>Peptoniphilus species</i> <sup>a</sup>				2
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>				3
<i>Peptostreptococcus species</i> <sup>a</sup>				1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>				2
<b>Kein Ergebnis</b>	1	1	2	2
<b>Genus anderer Ordnung</b>				3
				1
				1

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

6 Anhang

Tabelle 6.15: *Coriobacteriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Atopobium parvulum</i>	
<i>Eggerthella lenta</i>	1
<b>Kein Ergebnis</b>	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

## 6 Anhang

Tabelle 6.16: *Enterobacteriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

Referenzbezeichnung										
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1									
<i>Citrobacter species</i> <sup>a</sup>	1	1	2	1						
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1									
<i>Citrobacter braakii</i>										
<i>Citrobacter freundii</i>	1	6								
<i>Citrobacter gillenii</i>										
<i>Citrobacter koseri</i>				1						
<i>Citrobacter rodentium</i>										
<i>Citrobacter sedlakii</i>	1									
<i>Citrobacter werkmanii</i>		1								
<i>Cronobacter sakazakii</i>					3					
<i>Enterobacter species</i> <sup>a</sup>					1	1	1	20	1	
<i>Enterobacter aerogenes</i>					2					
<i>Enterobacter amnigenus</i>										
<i>Enterobacter asburiae</i>										
<i>Enterobacter cloacae</i>										
<i>Enterobacter hormaechei</i>										
<i>Escherichia coli</i>					22		1			1
<i>Escherichia fergusonii</i>					1					1
<i>Escherichia hermannii</i>					1					
<i>Escherichia vulneris</i>					1					
<i>Ewingella americana</i>							1			
<i>Hafnia alvei</i>							4			
<i>Klebsiella oxytoca</i>							7			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							15			
<i>Kluyvera ascorbata</i>							2			
<i>Leclercia species</i> <sup>a</sup>							1			
<i>Leclercia adecarboxylata</i>							2			
<i>Morganella morganii</i>							8			
<i>Pantoea species</i> <sup>a</sup>										
<i>Pantoea agglomerans</i>							4			
<i>Plesiomonas shigelloides</i>								3		
<i>Proteus species</i> <sup>a</sup>									1	7
<i>Proteus mirabilis</i>									20	
<i>Proteus penneri</i>										
<i>Proteus vulgaris</i>										
<i>Providencia rettgeri</i>									1	
<i>Providencia stuartii</i>									1	
<i>Rahnella aquatilis</i>									3	
<i>Raoultella planticola</i>									3	
<i>Salmonella species</i> <sup>a</sup>										12
<i>Salmonella enterica</i>										
<i>Serratia species</i> <sup>a</sup>										
<i>Serratia fonticola</i>									2	
<i>Serratia liquefaciens</i>									1	1
<i>Serratia marcescens</i>										11
<i>Serratia odorifera</i>										1
<i>Serratia plymuthica</i>										
<i>Shigella flexneri</i>										1
<i>Shigella sonnei</i>										
<i>Yersinia enterocolitica</i>										5
<i>Yersinia kristensenii</i>										
<i>Yokenella regensburgi</i>										1
<b>Kein Ergebnis</b>	1	2	1	2	1		3	1		
<b>Genus anderer Ordnung</b>										

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

## 6 Anhang

Tabelle 6.17: *Erysipelotrichales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <i>Solobacterium moorei</i> Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1
<i>Solobacterium moorei</i>	
<b>Kein Ergebnis</b>	
<b>Genus anderer Ordnung</b>	2

Tabelle 6.18: *Flavobacteriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung <i>Capnocytophaga species</i> <sup>a</sup> <i>Capnocytophaga leadbetteri</i> <i>Capnocytophaga ochracea</i> <i>Capnocytophaga sputigena</i> <i>Chryseobacterium species</i> <sup>a</sup> <i>Chryseobacterium indologenes</i> <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Capnocytophaga species</i> <sup>a</sup>	
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i>	
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1 2
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1 3
<i>Chryseobacterium species</i> <sup>a</sup>	1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	3
<b>Kein Ergebnis</b>	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

## 6 Anhang

Tabelle 6.19: *Fusobacteriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	8
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6
<b>Kein Ergebnis</b>	
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

## 6 Anhang

Tabelle 6.20: *Lactobacillales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

Referenzbezeichnung	Vitek MS									
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1									
<i>Aerococcus urinae</i>	2									
<i>Aerococcus viridans</i>	2									
<i>Enterococcus species</i> <sup>a</sup>										
<i>Enterococcus avium</i>	2									
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		1		1						
<i>Enterococcus faecalis</i>		2	21							
<i>Enterococcus faecium</i>	1		15							
<i>Enterococcus gallinarum</i>				1						
<i>Enterococcus hirae</i>				1						
<i>Enterococcus raffinosus</i>	1									
<i>Facklamia species</i> <sup>a</sup>										
<i>Facklamia hominis</i>				1						
<i>Granulicatella species</i> <sup>a</sup>										
<i>Granulicatella adiacens</i>		1	2							
<i>Lactobacillus species</i> <sup>a</sup>				1	1		2			
<i>Lactobacillus casei</i>										
<i>Lactobacillus catenaformis</i>					1					
<i>Lactobacillus crispatus</i>										
<i>Lactobacillus fermentum</i>						1				
<i>Lactobacillus jensenii</i>							1			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>			2							
<i>Lactobacillus salivarius</i>										
<i>Lactococcus lactis</i>							1			
<i>Leuconostoc lactis</i>								1		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1									
<i>Pediococcus pentosaceus</i>										
<i>Streptococcus species</i> <sup>a</sup>						2			5	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>						14		1	1	1
<i>Streptococcus atactolyticus</i>										
<i>Streptococcus anginosus</i>							6			
<i>Streptococcus bovis</i>						1				
<i>Streptococcus constellatus</i>						4		5		
<i>Streptococcus cristatus</i>										
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>								7		
<i>Streptococcus gallolyticus</i>									1	
<i>Streptococcus gordonii</i>										
<i>Streptococcus intermedius</i>						2			1	9
<i>Streptococcus mitis</i>										1
<i>Streptococcus mutans</i>										1
<i>Streptococcus oralis</i>										
<i>Streptococcus parasanguinis</i>										2
<i>Streptococcus parasanguis</i>									1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						2				13
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>										1
<i>Streptococcus pyogenes</i>										10
<i>Streptococcus salivarius</i>						2				3
<i>Streptococcus sanguinis</i>							2			8
<i>Streptococcus uberis</i>										1
<i>Streptococcus vestibularis</i>										1
<i>Weissella confusa</i>						1				
<i>Weissella hellenica</i>										
<b>Kein Ergebnis</b>						1		4	3	1
<b>Kein anderer Ordnung</b>							1			

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

6 Anhang

Tabelle 6.21: *Legionellales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	<b>Referenzbezeichnung</b>				
	<i>Fluoribacter bozemanac</i>	<i>Fluoribacter gormanii</i>	<i>Legionella jordanis</i>	<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
	<i>Tatlockia micdadei</i>				
	<b>Genus anderer Ordnung</b>				
<b>Vitek MS</b>					
<i>Fluoribacter bozemanac</i>					
<i>Fluoribacter gormanii</i>					
<i>Legionella jordanis</i>					
<i>Legionella longbeachae</i>					
<i>Legionella pneumophila</i>					5
<i>Tatlockia micdadei</i>					
<b>Kein Ergebnis</b>	1	1	1	1	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>					



## 6 Anhang

Tabelle 6.22: *Neisseriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

<b>Referenzbezeichnung</b>							
<i>Chromobacterium violaceum</i>							
<i>Eikenella corrodens</i>							
<i>Neisseria species</i> <sup>a</sup>							
<i>Neisseria animalis</i>							
<i>Neisseria canis</i>							
<i>Neisseria cinerea</i>							
<i>Neisseria elongata</i>							
<i>Neisseria flavescens</i>							
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>							
<i>Neisseria iguanae</i>							
<i>Neisseria lactamica</i>							
<i>Neisseria macacae</i>							
<i>Neisseria meningitidis</i>							
<i>Neisseria mucosa</i>							
<i>Neisseria perflava</i>							
<i>Neisseria sicca</i>							
<i>Neisseria subflava</i>							
<i>Neisseria weaveri</i>							
<b>Genus anderer Ordnung</b>							
<b>Vitek MS</b>							
<i>Chromobacterium violaceum</i>							1
<i>Eikenella corrodens</i>	5						
<i>Neisseria species</i> <sup>a</sup>				1			1
<i>Neisseria animalis</i>							
<i>Neisseria canis</i>							
<i>Neisseria cinerea</i>			1				
<i>Neisseria elongata</i>				3			
<i>Neisseria flavescens</i>							
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1				9		
<i>Neisseria iguanae</i>							
<i>Neisseria lactamica</i>					1		
<i>Neisseria macacae</i>							
<i>Neisseria meningitidis</i>						4	1
<i>Neisseria mucosa</i>						1	
<i>Neisseria perflava</i>							
<i>Neisseria sicca</i>							
<i>Neisseria subflava</i>		4	1		3	1	1
<i>Neisseria weaveri</i>							
<b>Kein Ergebnis</b>		1	1	1	1		1
<b>Genus anderer Ordnung</b>					1		2

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

## 6 Anhang

Tabelle 6.23: *Pasteurellales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

Referenzbezeichnung				
<i>Aggregatibacter species</i> <sup>a</sup>				
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>				
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>				
<i>Aggregatibacter segnis</i> <sup>a</sup>				
<i>Haemophilus species</i> <sup>a</sup>				
<i>Haemophilus haemolyticus</i>				
<i>Haemophilus influenzae</i>				
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>				
<i>Pasteurella species</i> <sup>a</sup>				
<i>Pasteurella canis</i>				
<i>Pasteurella multocida</i>				
<b>Genus anderer Ordnung</b>				
<b>Vitek MS</b>				
<i>Aggregatibacter species</i> <sup>a</sup>				
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1	1		
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	1	4		
<i>Aggregatibacter segnis</i>		1		
<i>Haemophilus species</i> <sup>a</sup>			1 3 1	
<i>Haemophilus haemolyticus</i>			3 14 1	
<i>Haemophilus influenzae</i>			2 31	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>			28	1
<i>Pasteurella species</i> <sup>a</sup>				
<i>Pasteurella canis</i>				1
<i>Pasteurella multocida</i>				3
<b>Kein Ergebnis</b>	2	1	1	
<b>Genus anderer Ordnung</b>			1	

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

## 6 Anhang

Tabelle 6.24: *Pseudomonadales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

Referenzbezeichnung										
<i>Acinetobacter</i> species <sup>a</sup>										
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4									
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1									
<i>Acinetobacter johnsonii</i>		1								
<i>Acinetobacter junii</i>			1							
<i>Acinetobacter lwoffii</i>			4							
<i>Acinetobacter radioresistens</i>				1						
<i>Acinetobacter septicus</i>										
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1			1						
<i>Moraxella</i> species <sup>a</sup>					1					
<i>Moraxella catarrhalis</i>					4					
<i>Moraxella osloensis</i>					1					
<i>Pseudomonas</i> species <sup>a</sup>						1			1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						43				
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>						1				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						4				
<i>Pseudomonas kuykendallii</i>										
<i>Pseudomonas mendocina</i>									1	1
<i>Pseudomonas oleovorans</i>								1		
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>						1			2	
<i>Pseudomonas putida</i>						2			8	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>									6	
<i>Pseudomonas toytomiensis</i>										
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>										1 1
<i>Psychrobacter pulmonis</i>										
<i>Psychrobacter sanguinis</i>										
<b>Kein Ergebnis</b>		1	1	1		2	2	2	2	3
<b>Genus anderer Ordnung</b>								1		

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

6 Anhang

Tabelle 6.25: *Rhizobiales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
	<i>Rhizobium radiobacter</i>
	Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	3
<i>Rhizobium radiobacter</i>	3
<b>Kein Ergebnis</b>	
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

Tabelle 6.26: *Rhodobacterales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
	<i>Paracoccus yeei</i>
	Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Paracoccus yeei</i>	2
<b>Kein Ergebnis</b>	
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

6 Anhang

Tabelle 6.27: *Rhodospirillales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung <i>Inquilinus limosus</i> Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Inquilinus limosus</i>	
<b>Kein Ergebnis</b>	1
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

Tabelle 6.28: *Selenomonadales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung <i>Veillonella species</i> <sup>a</sup> <i>Veillonella parvula</i> Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Veillonella species</i> <sup>a</sup>	
<i>Veillonella parvula</i>	8
<b>Kein Ergebnis</b>	
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

6 Anhang

Tabelle 6.29: *Sphingobacteriales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>
	Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	1
<b>Kein Ergebnis</b>	1 1
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

Tabelle 6.30: *Sphingomonadales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung
	<i>Blastomonas species</i> <sup>a</sup>
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
	Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Blastomonas species</i> <sup>a</sup>	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
<b>Kein Ergebnis</b>	1 6
<b>Genus anderer Ordnung</b>	1

<sup>a</sup> Eindeutige Differenzierung auf Speziesebene nicht möglich

6 Anhang

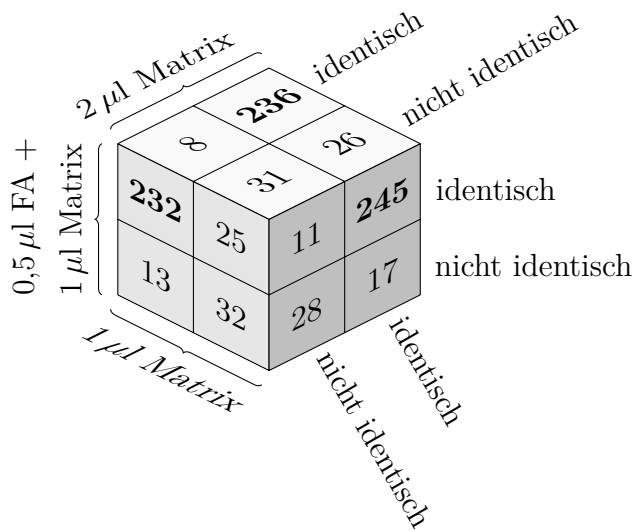
Tabelle 6.31: *Xanthomonadales*: Ergebnisse Vitek MS zu Referenzbezeichnung

	Referenzbezeichnung <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Genus anderer Ordnung
<b>Vitek MS</b>	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12
<b>Kein Ergebnis</b>	
<b>Genus anderer Ordnung</b>	

## 6.4 Vergleich der massenspektrometrischen Protokolle

### 6.4.1 Vergleich der Identifikation auf Genusebene

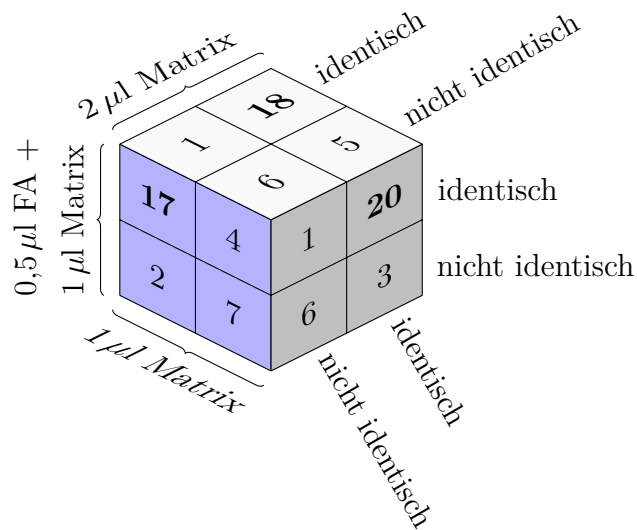
Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle auf Genusebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.



#### 6.4.1.1 Genusidentifikation Gram-positiver Stäbchen

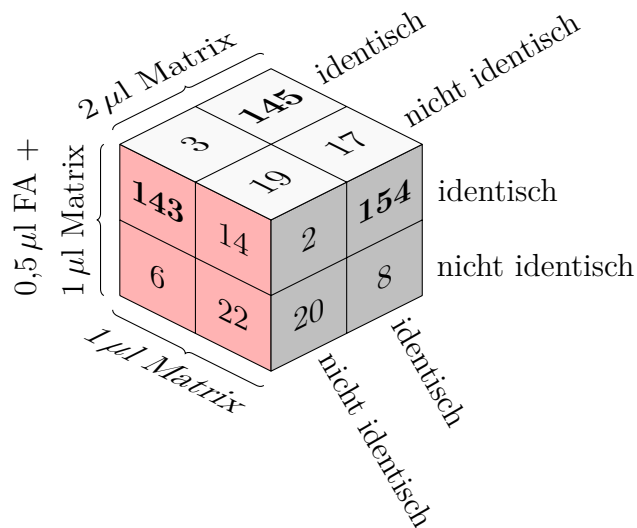
Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle Gram-positiver Stäbchen auf Genusebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.





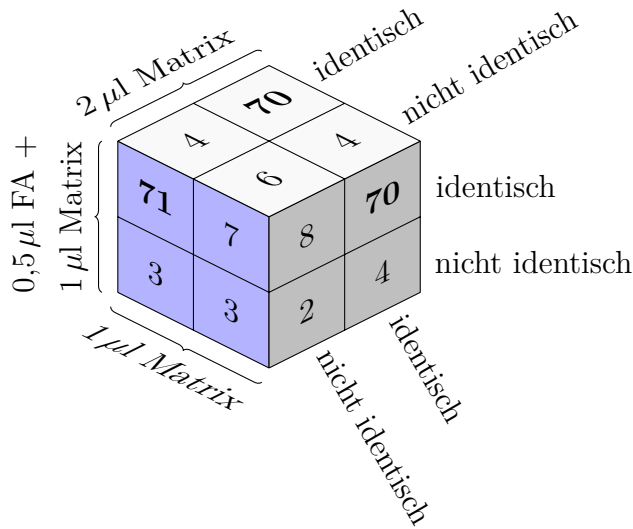
#### 6.4.1.2 Genusidentifikation Gram-negativer Stäbchen

Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle Gram-negativer Stäbchen auf Genusebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.



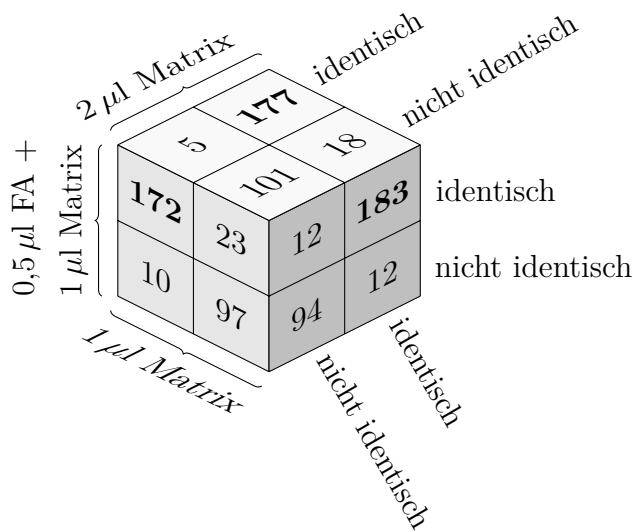
### 6.4.1.3 Genusidentifikation Gram-positiver Kokken

Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle Gram-positiver Kokken auf Genus-ebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.



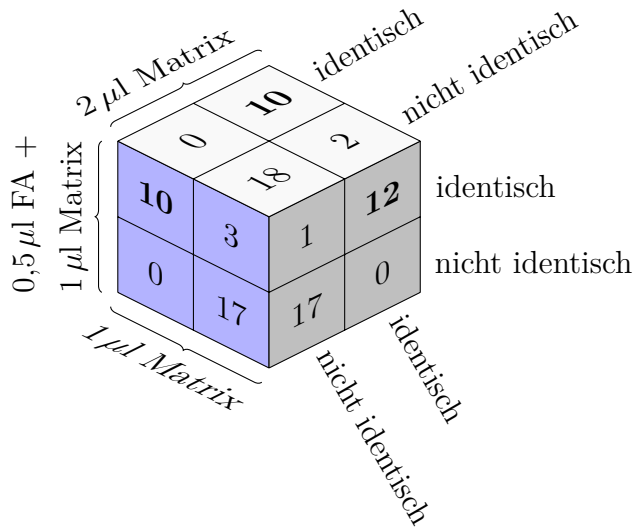
### 6.4.2 Vergleich der Differenzierung auf Speziesebene

Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle aller speziesdifferenzierter Isolate auf Speziesebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.



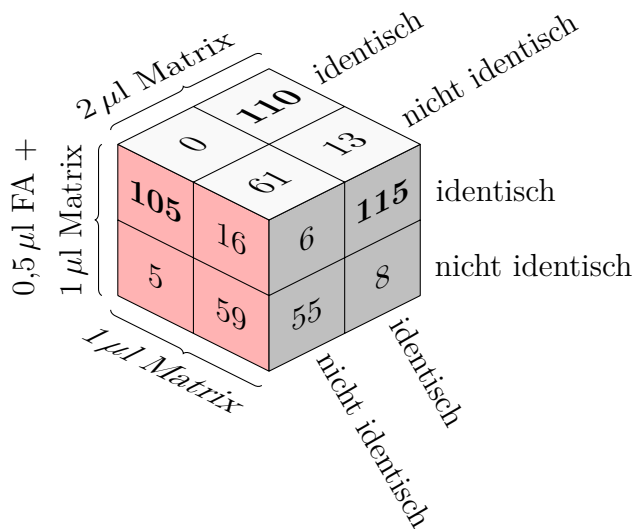
### 6.4.2.1 Speziesdifferenzierung Gram-positiver Stäbchen

Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle speziesdifferenzierter Gram-positiver Stäbchen auf Speziesebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.



### 6.4.2.2 Speziesdifferenzierung Gram-negativer Stäbchen

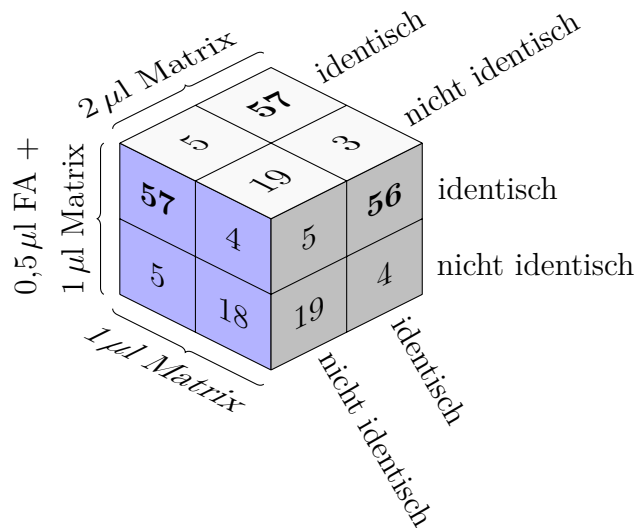
Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle speziesdifferenzierter Gram-negativer Stäbchen auf Speziesebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.



## 6 Anhang

### 6.4.2.3 Speziesdifferenzierung Gram-positiver Kokken

Vergleich der drei MALDI-TOF MS Protokolle speziesdifferenzierter Gram-positiver Kokken auf Speziesebene mit dem Ergebnis der Referenzbezeichnung.



## 6.5 Übereinstimmungsebenen der Referenzstämme mit dem Vitek MS-System, Vergleichsdaten mit anderen Studien

Tabelle 6.32: Bestmögliche Differenzierungsniveaus der getesteten Stämme

Genus/Species	Anzahl	Übereinstimmung			Andere	Kein
		Spezies	Genus (a/ b)	Familie		
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1	1				
<i>Achromobacter</i> species <sup>b</sup>	2	2				
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	3		3 ( 0 / 3 )			
<i>Acinetobacter</i> species <sup>b</sup>	2		2 ( 2 / 0 )			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	4				
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	1				1
<i>Acinetobacter junii</i>	2	1				1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4	4				
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	1				
<i>Acinetobacter septicus</i>	1					1
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1	1				
<i>Actinobaculum schaalii</i>	2				1	1
<i>Actinomyces europaeus</i>	2	1				1
<i>Actinomyces graevenetzii</i>	1					1
<i>Actinomyces israelii</i>	1	1				

<sup>a</sup> Differenzierung einer abweichenden Spezies.

<sup>b</sup> Keine eindeutige Differenzierung möglich.



## 6 Anhang

Tabelle 6.32: Fortsetzung

Genus/Species	Anzahl	Übereinstimmung				Andere Ordnung	Kein Ergebnis
		Spezies	Genus (a/ b)	Familie	Ordnung		
<i>Citrobacter braakii</i>	2		2 ( 0 / 2 )				
<i>Citrobacter freundii</i>	9	6	1 ( 0 / 1 )				2
<i>Citrobacter gillenii</i>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1					
<i>Citrobacter rodentium</i>	1						1
<i>Citrobacter sedlakii</i>	2						2
<i>Clostridium species</i> <sup>b</sup>	1						1
<i>Clostridium butyricum</i>	2	2					
<i>Clostridium clostridioforme</i>	1						1
<i>Clostridium difficile</i>	21	19					2
<i>Clostridium paraputrificum</i>	1	1					
<i>Clostridium perfringens</i>	17	15					2
<i>Clostridium ramosum</i>	1	1					
<i>Clostridium septicum</i>	3	3					
<i>Clostridium sporogenes</i>	1	1					
<i>Comamonas testosteroni</i>	1						1
<i>Corynebacterium species</i> <sup>b</sup>	14	1	2 ( 2 / 0 )				11
<i>Corynebacterium confusum</i>	1						1
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	2		1 ( 0 / 1 )				1
<i>Corynebacterium mastitidis</i>	1	1					
<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	2	1	1 ( 1 / 0 )				
<i>Corynebacterium propinquum</i>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	2	2					
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	1					
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	2	2					
<i>Cronobacter sakazakii</i>	4	3					1
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	1						1
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1						1
<i>Delftia species</i> <sup>b</sup>	2		1 ( 1 / 0 )				1
<i>Delftia acidovorans</i>	4	3					1
<i>Dermabacter hominis</i>	1	1					
<i>Dietzia species</i> <sup>b</sup>	1						1
<i>Eggerthella lenta</i>	1	1					
<i>Eikenella corrodens</i>	5	5					
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	3	3					
<i>Enterobacter species</i> <sup>b</sup>	1	1					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2					
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1		1 ( 0 / 1 )				
<i>Enterobacter asburiae</i>	1		1 ( 0 / 1 )				
<i>Enterobacter cloacae</i>	23		20 ( 0 / 20 )				3
<i>Enterobacter hormaechei</i>	2		1 ( 0 / 1 )				1
<i>Enterococcus species</i> <sup>b</sup>	2		2 ( 2 / 0 )				
<i>Enterococcus avium</i>	2	2					
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	1					
<i>Enterococcus durans</i>	2	2					
<i>Enterococcus faecalis</i>	21	21					
<i>Enterococcus faecium</i>	15	15					
<i>Enterococcus gallinarum</i>	3	1	1 ( 1 / 0 )		1		
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1					
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1	1					
<i>Escherichia coli</i>	22	22					
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	1					
<i>Escherichia hermannii</i>	1	1					
<i>Escherichia vulneris</i>	1	1					
<i>Eubacterium species</i> <sup>b</sup>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Ewingella americana</i>	1	1					
<i>Facklamia species</i> <sup>b</sup>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Fastidiosipila sanguinis</i>	1					1	
<i>Finegoldia magna</i>	3	3					
<i>Fluoribacter bozemanii</i>	1						1
<i>Fluoribacter gormanii</i>	1						1

<sup>a</sup> Differenzierung einer abweichenden Spezies.

<sup>b</sup> Keine eindeutige Differenzierung möglich.

## 6 Anhang

Tabelle 6.32: Fortsetzung

Genus/Species	Anzahl	Übereinstimmung				Andere Ordnung	Kein Ergebnis
		Spezies	Genus ( <sup>a/</sup> <sup>b</sup> )	Familie	Ordnung		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	8	8					
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6	6					
<i>Gardnerella vaginalis</i>	10	8		2			
<i>Gemella haemolysans</i>	5	4	1 (0 / 1)				
<i>Gemella morbillorum</i>	3	1	1 (0 / 1)				1
<i>Granulicatella species</i> <sup>b</sup>	1		1 (1 / 0)				
<i>Granulicatella adiacens</i>	2	2					
<i>Haemophilus species</i> <sup>b</sup>	4	1	3 (3 / 0)				
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	19	14	5 (2 / 3)				
<i>Haemophilus influenzae</i>	33	31	2 (1 / 1)				
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	30	28			1		1
<i>Hafnia alvei</i>	5	4					1
<i>Inquilinus limosus</i>	1						1
<i>Kerstersia gyiorum</i>	1						1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	7					1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	15		1			
<i>Kluyvera ascorbata</i>	2	2					
<i>Lactobacillus species</i> <sup>b</sup>	4	1	3 (3 / 0)				
<i>Lactobacillus casei</i>	1		1 (0 / 1)				
<i>Lactobacillus catenaformis</i>	1						1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1				1		
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1	1					
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	1					
<i>Lactobacillus salivarius</i>	2		2 (0 / 2)				
<i>Lactococcus lactis</i>	1	1					
<i>Leclercia species</i> <sup>b</sup>	1	1					
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2	2					
<i>Legionella jordanis</i>	1						1
<i>Legionella longbeachae</i>	1						1
<i>Legionella pneumophila</i>	5	5					
<i>Leuconostoc lactis</i>	1	1					
<i>Listeria monocytogenes</i>	9	8	1 (0 / 1)				
<i>Microbacterium species</i> <sup>b</sup>	1						1
<i>Microbacterium lacticum</i>	1				1		
<i>Micrococcus species</i> <sup>b</sup>	10	9					1
<i>Micrococcus luteus</i>	3		3 (0 / 3)				
<i>Moraxella species</i> <sup>b</sup>	1	1					
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4	4					
<i>Moraxella osloensis</i>	1	1					
<i>Morganella morganii</i>	8	8					
<i>Neisseria species</i> <sup>b</sup>	5		5 (5 / 0)				
<i>Neisseria animalis</i>	2		1 (1 / 0)				1
<i>Neisseria canis</i>	1						1
<i>Neisseria cinerea</i>	2	1					1
<i>Neisseria elongata</i>	4	3					1
<i>Neisseria flavescens</i>	4		4 (3 / 1)				
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	9	9					
<i>Neisseria iguanae</i>	1				1		
<i>Neisseria lactamica</i>	1	1					
<i>Neisseria macacae</i>	1		1 (1 / 0)				
<i>Neisseria meningitidis</i>	4	4					
<i>Neisseria mucosa</i>	2	1	1 (1 / 0)				
<i>Neisseria perflava</i>	1		1 (1 / 0)				
<i>Neisseria sicca</i>	1						1
<i>Neisseria subflava</i>	1	1					
<i>Neisseria weaveri</i>	3		1 (0 / 1)				2
<i>Nocardia species</i> <sup>b</sup>	2		2 (2 / 0)				
<i>Nocardia farcinica</i>	1						1
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	3	3					
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1						1
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	1						1
<i>Paenibacillus provencensis</i>	1		1 (0 / 1)				

<sup>a</sup> Differenzierung einer abweichenden Spezies.

<sup>b</sup> Keine eindeutige Differenzierung möglich.

## 6 Anhang

Tabelle 6.32: Fortsetzung

Genus/Species	Anzahl	Übereinstimmung				Andere Ordnung	Kein Ergebnis
		Spezies	Genus (a/ b)	Familie	Ordnung		
<i>Pantoea</i> species <sup>b</sup>	1			1			
<i>Pantoea agglomerans</i>	4	4					
<i>Parabacteroides</i> species <sup>b</sup>	1				1		
<i>Parabacteroides distasonis</i>	3	3					
<i>Paracoccus yeei</i>	2	2					
<i>Parvimonas micra</i>	17	16			1		
<i>Pasteurella</i> species <sup>b</sup>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Pasteurella multocida</i>	3	3					
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1				1		
<i>Peptoniphilus</i> species <sup>b</sup>	5		2 ( 2 / 0 )			3	
<i>Peptostreptococcus</i> species <sup>b</sup>	4		1 ( 1 / 0 )	3			
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2	2					
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3	3					
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3	3					
<i>Prevotella</i> species <sup>b</sup>	6		6 ( 6 / 0 )				
<i>Prevotella baroniae</i>	1		1 ( 0 / 1 )				
<i>Prevotella bivia</i>	4	4					
<i>Prevotella buccae</i>	6	6					
<i>Prevotella denticola</i>	5	4	1 ( 1 / 0 )				
<i>Prevotella disiens</i>	3	3					
<i>Prevotella intermedia</i>	2	2					
<i>Prevotella melaninogenica</i>	9	9					
<i>Prevotella nigrescens</i>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Prevotella oralis</i>	2					2	
<i>Prevotella oris</i>	3	2	1 ( 0 / 1 )				
<i>Prevotella timonensis</i>	2					2	
<i>Propionibacterium</i> species <sup>b</sup>	3		2 ( 2 / 0 )			1	
<i>Propionibacterium acnes</i>	36	34	1 ( 1 / 0 )			1	
<i>Propionibacterium avidum</i>	1	1					
<i>Proteus mirabilis</i>	20	20					
<i>Proteus penneri</i>	1		1 ( 0 / 1 )				
<i>Proteus vulgaris</i>	7		7 ( 0 / 7 )				
<i>Providencia rettgeri</i>	1	1					
<i>Providencia stuartii</i>	1	1					
<i>Pseudomonas</i> species <sup>b</sup>	5		3 ( 3 / 0 )			2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45	43				2	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2	1	1 ( 0 / 1 )				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7	4			1	2	
<i>Pseudomonas kuykendallii</i>	2					2	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1	1					
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	2	2					
<i>Pseudomonas putida</i>	8	8					
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	11	6	2 ( 1 / 1 )			3	
<i>Pseudomonas toytomiensis</i>	2		2 ( 1 / 1 )				
<i>Psychrobacter pulmonis</i>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Psychrobacter sanguinis</i>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Rahnella aquatilis</i>	3	3					
<i>Raoultella planticola</i>	3	3					
<i>Rhizobium radiobacter</i>	3	3					
<i>Rothia</i> species <sup>b</sup>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Rothia mucilaginoso</i>	2	2					
<i>Salmonella enterica</i>	12		12 ( 0 / 12 )				
<i>Serratia</i> species <sup>b</sup>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Serratia fonticola</i>	2	2					
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	1					
<i>Serratia marcescens</i>	11	11					
<i>Serratia odorifera</i>	1	1					
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	1					
<i>Shigella flexneri</i>	1			1			
<i>Shigella sonnei</i>	4			4			
<i>Solobacterium moorei</i>	2				2		
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1					1	

<sup>a</sup> Differenzierung einer abweichenden Spezies.

<sup>b</sup> Keine eindeutige Differenzierung möglich.



## 6 Anhang

Tabelle 6.32: Fortsetzung

Genus/Species	Anzahl	Übereinstimmung				Andere Ordnung	Kein Ergebnis
		Spezies	Genus ( <sup>a/</sup> <sup>b</sup> )	Familie	Ordnung		
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	2	1					1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	7					1	6
<i>Staphylococcus</i> species <sup>b</sup>	7		6 ( 6 / 0 )				1
<i>Staphylococcus aureus</i>	39	39					
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	1					
<i>Staphylococcus capitis</i>	14	12	1 ( 0 / 1 )				1
<i>Staphylococcus caprae</i>	2	1					1
<i>Staphylococcus carnosus</i>	1	1					
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	26	24					2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	10	10					
<i>Staphylococcus hominis</i>	13	12	1 ( 1 / 0 )				
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1		1 ( 1 / 0 )				
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	9	8					1
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	1						1
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	3	3					
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	3					
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	1					
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	1					
<i>Staphylococcus simulans</i>	6	6					
<i>Staphylococcus warneri</i>	3	2					1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12	12					
<i>Streptococcus</i> species <sup>b</sup>	17	2	11 ( 11 / 0 )				4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	14	14					
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1					1	
<i>Streptococcus anginosus</i>	11	6	2 ( 2 / 0 )				3
<i>Streptococcus constellatus</i>	7	5	1 ( 0 / 1 )				1
<i>Streptococcus cristatus</i>	1		1 ( 0 / 1 )				
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	9	7	1 ( 0 / 1 )				1
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2	1	1 ( 1 / 0 )				
<i>Streptococcus gordonii</i>	1	1					
<i>Streptococcus intermedius</i>	9	9					
<i>Streptococcus mitis</i>	7	1	6 ( 1 / 5 )				
<i>Streptococcus mutans</i>	1	1					
<i>Streptococcus oralis</i>	2		2 ( 0 / 2 )				
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	3	2	1 ( 0 / 1 )				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15	13					2
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	1	1					
<i>Streptococcus pyogenes</i>	11	10					1
<i>Streptococcus salivarius</i>	3	3					
<i>Streptococcus sanguinis</i>	8	8					
<i>Streptococcus uberis</i>	1	1					
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1	1					
<i>Tatlockia micdadei</i>	1						1
<i>Varibaculum cambriense</i>	1						1
<i>Veillonella</i> species <sup>b</sup>	8		8 ( 8 / 0 )				
<i>Weissella hellenica</i>	1						1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	5					
<i>Yokenella regensburgei</i>	1	1					

<sup>a</sup> Differenzierung einer abweichenden Spezies.

<sup>b</sup> Keine eindeutige Differenzierung möglich.

Tabelle 6.33: Übersicht über Anzahl der Isolate und deren Sensitivität der verglichenen Performancestudien unterteilt nach Ordnungen

Ordnung	Eigene Daten (n = ) (p = ) (95%-KI) *	Dubois et al. (2012) (n = ) (p = ) (95%-KI) *	Dubois et al. (2013) (n = ) (p = ) (95%-KI) *	Garner et al. (n = ) (p = ) (95%-KI) *	Marko et al. (n = ) (p = ) (95%-KI) *	Martiny et al. (n = ) (p = ) (95%-KI) *	Moon et al. (n = ) (p = ) (95%-KI) *	Rychert et al. (n = ) (p = ) (95%-KI) *
<i>Actinomycetales</i>	75 (0,64-0,69) 0,67	11 (0,35-0,92) 0,64		83 (0,71-0,88) 0,8	(1)	(2)		39 (0,8-1) 0,9
<i>Bacillales</i>	160 (0,86-0,89) 0,88	128 (0,86-0,96) 0,91				247 (0,91-0,97) 0,94	218 (0,95-0,99) 0,97	426 (0,92-0,97) 0,94
<i>Bacteroidales</i>	85 (0,84-0,88) 0,86	16 (0,71-1) 0,88		353 (0,89-0,95) 0,92		40 (0,62-0,88) 0,75		0,75
<i>Bifidobacteriales</i>	11 (0,70-0,75) 0,73					(1)		27 (0,77-1) 0,89
<i>Burkholderiales</i>	71 (0,71-0,76) 0,73	14 (0,11-0,61) 0,35			24 (0,39-0,78) 0,58	(2)		
<i>Campylobacteriales</i>	16 (0,73-0,77) 0,75	(7)				13		
<i>Clostridiales</i>	70 (0,88-0,92) 0,90	10 (0,55-1) 0,8		182 (0,95-1) 0,97		23 (0,61-0,95) 0,78		
<i>Enterobacteriales</i>	201 (0,64-0,69) 0,67	282 (0,77-0,86) 0,82			(1)	579 (0,89-0,93) 0,91		
<i>Flavobacteriales</i>	10 (0,78-0,82) 0,80	(3)			(5)			
<i>Fusobacteriales</i>	14 1,00			33 (0,69-0,95) 0,82		12		
<i>Lactobacillales</i>	171 (0,78-0,83) 0,81	178 (0,92-0,98) 0,94	553 (0,96-0,99) 0,97			71 (0,76-1) 0,87	193 (0,80-0,95) 0,98	653 (0,9-0,94) 0,92
<i>Legionellales</i>	10 (0,47-0,53) 0,50	(2)						
<i>Neisseriales</i>	42 (0,57-0,62) 0,60	(6)						
<i>Pasteurellales</i>	94 (0,84-0,88) 0,86	29 (0,74-0,9) 0,86				33 (0,86-1) 0,94		
<i>Pseudomonadales</i>	102 (0,78-0,83) 0,80	57 (0,89-1) 0,95		90 (0,97-1) 0,99		75 (0,94-1) 0,97		
<i>Xanthomonadales</i>	12 1,00	21 1		55 1		(4)		

## 6.6 Quellcode

### 6.6.1 Parsen der massenspektrometrischen Protokolle aus dem MZML-Dateinamen

Programmiersprache R (The R Foundation for Statistical Computing)

```

setClass("MZMLFileProcessor",
        representation(filename="character", calibFile = "logical",
                        filepath="character",
                        workingname="character", measuredate="character",
                        spotname="character", probeno="character",
                        protocol="character", medium="character",
                        mzdata="data.frame"),
        prototype=list(calibFile = FALSE))

setMethod("initialize", "MZMLFileProcessor",
        function(.Object, filepath) {

        .Object@filepath <- filepath

        .Object@filename <- basename(filepath)

        cursplitstr = strsplit(.Object@filename, "_")

        .Object@workingname = unlist(cursplitstr)[3]

        .Object@medium      = "blood"
        .Object@protocol    = ""

        if (grepl("FA", .Object@workingname))
        {
        .Object@protocol <- "FA"
        .Object@workingname <- unlist(strsplit(.Object@workingname, "FA"))
        .Object@workingname <- paste(.Object@workingname[1], .Object@workingname[2], sep="")
        }
        if (grepl("my2", .Object@workingname))
        {
        .Object@protocol <- paste(.Object@protocol, "2 mikrol", sep="")
        .Object@workingname <- unlist(strsplit(.Object@workingname, "my2"))
        .Object@workingname <- paste(.Object@workingname[1], .Object@workingname[2], sep="")
        }
        if (grepl("MC", .Object@workingname))
        {
        .Object@medium <- "MC"
        .Object@workingname <- unlist(strsplit(.Object@workingname, "MC"))
        .Object@workingname <- paste(.Object@workingname[1], .Object@workingname[2], sep="")
        }
        if (grepl("CNA", .Object@workingname))
        {
        .Object@medium <- "CNA"
        .Object@workingname <- unlist(strsplit(.Object@workingname, "CNA"))
        .Object@workingname <- paste(.Object@workingname[1], .Object@workingname[2], sep="")
        }
        if (grepl("liquid", .Object@workingname))
        {
        .Object@protocol <- paste(.Object@protocol, " liquid", sep="")
        .Object@workingname <- unlist(strsplit(.Object@workingname, " liquid"))
        .Object@workingname <- paste(.Object@workingname[1], .Object@workingname[2], sep="")
        }
        if (grepl("HPLC", .Object@workingname))
        {
        .Object@protocol <- paste(.Object@protocol, " washed", sep="")
        .Object@workingname <- unlist(strsplit(.Object@workingname, "HPLC"))
        .Object@workingname <- paste(.Object@workingname[1], .Object@workingname[2], sep="")
        }

        .Object@protocol <- ifelse(.Object@protocol=="", "1 mikrol", .Object@protocol)

```

## 6 Anhang

```
.Object@calibFile <- ifelse (.Object@workingname=="Ecal",TRUE,FALSE)
.Object@measuredate <- unlist(cursplitstr)[1]
.Object@spotname <- ifelse (.Object@workingname=="Ecal", unlist(cursplitstr)[5],
unlist(cursplitstr)[6])
.Object@probeno <- ifelse (.Object@workingname=="Ecal","", unlist(cursplitstr)[4])

.Object@mzdata <- parseXML(fileToTxt(filepath))

return (.Object)
}
)
```

### 6.6.2 Teilautomatisierter Vergleich der Ergebnisse von Massenspektrometrie und Referenzbezeichnung

Programmiersprache C# (Microsoft Foundation, Redmond, USA)

```
public class DataElem
{
    public String [] genus;
    public String [] species;
    public String table;
    public int noResultGenus;
    public int noResultSpecies;
    public Boolean idGenus;
    public Boolean idSpecies;
    public int inconsistentGenus;
    public int inconsistentSpecies;

    public String toString()
    {
        return(genus[0] + "," + species[0] + "," + table + "," + noResultGenus + "," +
            ↪ noResultSpecies + "," + idGenus + "," + idSpecies + "," + inconsistentGenus + "," +
            ↪ + inconsistentSpecies);
    }
}

//included database tables
public static String [] tables = {"malditofmsstandard", "malditofms2matrix", "malditofmsformicacid"
    ↪ ",
                                "seq16s", "seqsoda", "seqreca", "vitek2", "etcmethods", "
                                ↪ isolates",
                                "standardprotocol_v1", "standardprotocol_v1_confirm"};

private void evaluate(int curIsolateID, bool modeExtended)
{
    Dictionary<String, DataElem> curDict = allResults[curIsolateID];
    DataElem curElem;

    // MALDI TOF MS extended protocol? Tables: "malditofmsstandard", "malditofms2matrix", "
    ↪ malditofmsformicacid"
    if (modeExtended)
    {
        for (int idx = 0; idx < 3; ++idx)
        {
            if (curDict.ContainsKey(tables[idx]))
            {
                curElem = curDict[tables[idx]];

                if (curDict["isolates"].genus[0] == "")
                {
                    for (int idy = 3; idy < 8; ++idy)
                    {
                        if (curDict.ContainsKey(tables[idy]) && curDict[tables[idy]].noResultGenus
                            ↪ == 1 && curElem.noResultGenus == 1)
                    }
                }
            }
        }
    }
}
```

## 6 Anhang

```
{
    if (curElem.idGenus)
    {
        if (curElem.genus[0] != curDict[tables[idy]].genus[0])
        {
            curElem.inconsistentGenus++;
        }
    }
    else
    {
        curElem.idGenus = (curElem.genus[0] == curDict[tables[idy]].genus
            ↪ [0]);
    }
}
}
else
{
    curElem.idGenus = (curElem.noResultGenus == 1 && curElem.genus[0] == curDict["
    ↪ isolates"].genus[0]);
}

// species
if (curDict["isolates"].species[0] == "")
{
    for (int idy = 3; idy < 8; ++idy)
    {
        if (curDict.ContainsKey(tables[idy]) && curDict[tables[idy]].
            ↪ noResultSpecies == 1 && curElem.noResultSpecies == 1)
        {
            if (curElem.idSpecies)
            {
                if (curElem.species[0] != curDict[tables[idy]].species[0])
                {
                    curElem.inconsistentSpecies++;
                }
            }
            else
            {
                curElem.idSpecies = (curElem.species[0] == curDict[tables[idy]].
                    ↪ species[0]);
            }
        }
    }
}
else
{
    curElem.idSpecies = (curElem.noResultSpecies == 1 && curElem.species[0] ==
        ↪ curDict["isolates"].species[0]);
}
}

}
else // standardprotocol, 1 myl only, table: "standardprotocol_v1"
{
    for (int idx = 9; idx < 10; ++idx)
    {
        if (curDict.ContainsKey(tables[idx]))
        {
            curElem = curDict[tables[idx]];

            if (curDict["isolates"].genus[0] == "")
            {
                for (int idy = 10; idy < 11; ++idy)
                {
                    if (curDict.ContainsKey(tables[idy]) && curDict[tables[idy]].noResultGenus
```

## 6 Anhang

```
        ↪ == 1 && curElem.noResultGenus == 1)
    {
        if (curElem.idGenus)
        {
            if (curElem.genus[0] != curDict[tables[idy]].genus[0])
            {
                curElem.inconsistentGenus++;
            }
        }
        else
        {
            curElem.idGenus = (curElem.genus[0] == curDict[tables[idy]].genus
                ↪ [0]);
        }
    }
}
else
{
    curElem.idGenus = (curElem.noResultGenus == 1 && curElem.genus[0] == curDict["
        ↪ isolates"].genus[0]);
}

// species
if (curDict["isolates"].species[0] == "")
{
    for (int idy = 10; idy < 11; ++idy)
    {
        if (curDict.ContainsKey(tables[idy]) && curDict[tables[idy]].
            ↪ noResultSpecies == 1 && curElem.noResultSpecies == 1)
        {
            if (curElem.idSpecies)
            {
                if (curElem.species[0] != curDict[tables[idy]].species[0])
                {
                    curElem.inconsistentSpecies++;
                }
            }
            else
            {
                curElem.idSpecies = (curElem.species[0] == curDict[tables[idy]].
                    ↪ species[0]);
            }
        }
    }
}
else
{
    curElem.idSpecies = (curElem.noResultSpecies == 1 && curElem.species[0] ==
        ↪ curDict["isolates"].species[0]);
}
}
}
}
}
```

### 6.6.3 Berechnung der euklidischen Distanz zwischen Referenz- und Vergleichsmassenvektor

Programmiersprache R (The R Foundation for Statistical Computing)

```
massEuclideanDistance <- function(referencevec, comparevec, tolerance=7)
{
    referencepointer <- 1
    comparepointer <- 1
```

## 6 Anhang

```
referenceval <- 0
compareval <- 0
misses <- 0
euclideanSquare <- 0

while(referencepointer <= length(referencevec))
{
  referenceval <- referencevec[referencepointer]
  compareval <- comparevec[comparepointer]

  if((compareval >= referenceval - tolerance) && (compareval <= referenceval + tolerance))
  {
    euclideanSquare <- euclideanSquare + (referenceval - compareval)^2

    referencepointer <- referencepointer + 1

    if(comparepointer < length(comparevec))
    {
      comparepointer <- comparepointer + 1
    }
    else
    {
      misses <- misses + length(referencevec) - referencepointer
      break
    }
  }
  else if(compareval > referenceval)
  {
    misses <- misses + 1
    referencepointer <- referencepointer + 1
  }
  else
  {
    if(comparepointer < length(comparevec))
    {
      comparepointer <- comparepointer + 1
    }
    else
    {
      misses <- misses + length(referencevec) - referencepointer
      break
    }
  }
}
cat(paste0("Length reference vector: ", length(referencevec), "\n"))
cat(paste0("Euclidean Dist within tolerance: ",
          sqrt((length(referencevec)-misses)*tolerance^2), "\n"))
cat(paste0("Misses: ", misses, "\n"))

return(sqrt(euclideanSquare))
}
```

### 6.6.4 Dynamische Berechnung des Supervektors

Programmiersprache R (The R Foundation for Statistical Computing)

```
peak <- setClass("peak",
  representation(mzpeak="numeric", intensity = "numeric",
                 snratio="numeric", workingname="character"))

setMethod("initialize", "peak",
  function(.Object, mzpeak, intensity, signaltonoise, name) {
    .Object@mzpeak <- mzpeak
    .Object@intensity <- intensity
    .Object@snratio <- signaltonoise
    .Object@workingname <- name

    return(.Object)
  })
```

## 6 Anhang

```
    })

peaksbin <- setClass("peaksbin",
  representation(meanmass="numeric", meanintensity="numeric", meansignaltonoise="numeric"
    ↪ ", peaks = "list", doubleval = "numeric"))

setMethod("initialize", "peaksbin",
  function(.Object) {
    .Object@meanmass <- 0
    .Object@doubleval <- 0

    return(.Object)
  })

setGeneric("calcMeanMass", function(.Object){})

setMethod("calcMeanMass", "peaksbin",
  function(.Object) {

    result <- 0
    doubleval = 0

    for(curIdx in 1:length(.Object@peaks))
    {
      if((curIdx > 1) &&
        (.Object@peaks[[curIdx]]@workingname ==
          .Object@peaks[[curIdx-1]]@workingname))
      {
        doubleval = doubleval + 1
      }

      result <- .Object@peaks[[curIdx]]@mzpeak + result
    }

    result <- result / length(.Object@peaks)
    .Object@doubleval <- doubleval
    .Object@meanmass <- result

    return(.Object)
  })

setGeneric("calcMeanIntensity", function(.Object){})

setMethod("calcMeanIntensity", "peaksbin",
  function(.Object) {

    result <- 0

    for(curIdx in 1:length(.Object@peaks))
    {
      result <- .Object@peaks[[curIdx]]@intensity + result
    }

    result <- result / length(.Object@peaks)

    .Object@meanintensity <- result

    return(.Object)
  })

setGeneric("calcMeanSignalToNoise", function(.Object){})

setMethod("calcMeanSignalToNoise", "peaksbin",
  function(.Object) {

    result <- 0

    for(curIdx in 1:length(.Object@peaks))
    {
```



## 6 Anhang

```
    result <- .Object@peaks[[curIdx]]@snratio + result
  }

  result <- result / length(.Object@peaks)

  .Object@meansignaltonoise <- result

  return(.Object)
})

# master container, gets vector lists
setClass("fingerprintContainer",
  representation(peakbins="list", tolerance="numeric", amountVecs = "numeric"))

setGeneric("showResults", function(.Object, cutoff=1.0){})

setMethod("showResults", "fingerprintContainer",
  function(.Object, cutoff=1.0) {

    result <- list()

    for(curIdx in 1 : length(.Object@peakbins))
    {
      if(length(.Object@peakbins[[curIdx]]@peaks) >= .Object@amountVecs * cutoff)
      {
        result <- append(result, .Object@peakbins[[curIdx]]@meanmass)
      }
    }

    return(result)
  })

setGeneric("peakappend", function(.Object, curPeak, tolerance){})

setMethod("peakappend", "fingerprintContainer",
  function(.Object, curPeak, tolerance) {

    curMZ <- curPeak@mzpeak

    if(length(.Object@peakbins) > 0)
    {
      for(curIdx in 1:length(.Object@peakbins))
      {
        curReferenceMZ <- .Object@peakbins[[curIdx]]@meanmass

        # current mz peak = reference mz peak, append a new element
        if((curMZ >= curReferenceMZ - tolerance) && (curMZ <= curReferenceMZ + tolerance
            ↪ ))
        {
          .Object@peakbins[[curIdx]]@peaks <- append(.Object@peakbins[[curIdx]]@peaks,
            ↪ curPeak)

          .Object@peakbins[curIdx] <- calcMeanMass(.Object@peakbins[[curIdx]])
          .Object@peakbins[curIdx] <- calcMeanIntensity(as(.Object@peakbins[[curIdx]], "
            ↪ peaksbin"))
          .Object@peakbins[curIdx] <- calcMeanSignalToNoise(as(.Object@peakbins[[curIdx]
            ↪ ]], "peaksbin"))
          break;
        }
      }
      # case current mz peak < reference mz bin -> new entry
      else if(curMZ < curReferenceMZ - tolerance)
      {
        curPeakBin <- new("peaksbin")
        curPeakBin@peaks <- append(curPeakBin@peaks, curPeak)
        .Object@peakbins <- append(.Object@peakbins, curPeakBin, after = curIdx - 1)

        .Object@peakbins[curIdx] <- calcMeanMass(as(.Object@peakbins[[curIdx]], "
            ↪ peaksbin"))
        .Object@peakbins[curIdx] <- calcMeanIntensity(as(.Object@peakbins[[curIdx]], "
```

## 6 Anhang

```
        ↪ peaksbin"))
      .Object@peakbins[curIdx] <- calcMeanSignalToNoise(as(.Object@peakbins[[curIdx
        ↪ ]], "peaksbin"))
      break;
    }
    # case cur mz peak element at the end of the list
    # -> append new entry at the end
    else if((curMZ > curReferenceMZ - tolerance) && (curIdx == length(.
        ↪ Object@peakbins)))
    {
      curPeakBin      <- new("peaksbin")
      curPeakBin@peaks <- append(curPeakBin@peaks, curPeak)
      .Object@peakbins <- append(.Object@peakbins, curPeakBin)

      .Object@peakbins[curIdx+1] <- calcMeanMass(as(.Object@peakbins[[curIdx+1]], "
        ↪ peaksbin"))
      .Object@peakbins[curIdx+1] <- calcMeanIntensity(as(.Object@peakbins[[curIdx
        ↪ +1]], "peaksbin"))
      .Object@peakbins[curIdx+1] <- calcMeanSignalToNoise(as(.Object@peakbins[[
        ↪ curIdx+1]], "peaksbin"))
      break;
    }
  }
}
# list contains no elements
else
{
  curPeakBin      <- new("peaksbin")
  curPeakBin@peaks <- append(curPeakBin@peaks, curPeak)
  .Object@peakbins <- append(.Object@peakbins, curPeakBin)
  .Object@peakbins[1] <- as(calcMeanMass(.Object@peakbins[[1]]), "peaksbin")
  .Object@peakbins[1] <- as(calcMeanIntensity(.Object@peakbins[[1]]), "peaksbin")
  .Object@peakbins[1] <- as(calcMeanSignalToNoise(.Object@peakbins[[1]]), "peaksbin")
}
return(.Object)
})
```

# 7 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des MALDI-TOF MS-Prinzips . . . . .	4
3.1	Überblick über die Methoden der Identifikation aller Isolate . . . . .	28
3.2	Überblick über das Identifikationsniveau aller Isolate . . . . .	30
3.3	Überblick über die Gesamtperformance . . . . .	44
3.4	Diversität der Stichprobenzusammensetzungen . . . . .	45
3.5	Vergleich der Sensitivität unterteilt nach Ordnungen . . . . .	47

# Danksagung

An dieser Stelle ist es mir wichtig, die Personen zu ehren, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Ein besonderer Dank gilt Matthias Frosch und Christoph Schoen, die es erst ermöglicht haben mit dieser Arbeit an die Vorarbeit von Marianne Abele-Horn anzuknüpfen.

Vielen Dank auch an meine Kollegen Ines und Johannes für tatkräftige Unterstützung und interessante Diskussionen.

Nicht zu vergessen ist auch die Unterstützung des NRZMHi, vertreten durch Ulrich Vogel und Heike Claus, die neben der Bereitstellung von Typstämmen mich auch fachlich und emotional unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Varia-, Hygiene- und DNA-Labors für die tatkräftige Unterstützung, allen voran Theresa, die mich in die Künste der eubakteriellen PCR eingewiesen hat und den umfassenden Einsatz von Mai Lan.

Zuletzt danke ich auch den restlichen Mitarbeitern des IHM, meiner Familie und meinen Freunden für die emotionale Unterstützung.

# Lebenslauf

Alexander Menzer

## Schulausbildung

09/1987 – 08/1991

Friedrich-Ebert-Schule Griesheim

09/1991 – 08/2000

Ludwig-Georgs-Gymnasium Darmstadt, Abschluss Abitur

## Studium

04/2002 – 09/2002

Studium der Physik, Technischen Universität Darmstadt

10/2002 – 09/2004

Studium der Informatik, Technischen Universität Darmstadt

10/2004 – 11/2010

Studium der Medizin, Goethe-Universität zu Frankfurt am Main, Abschluss Staatsexamen Medizin

Köln, der 20.04.2017