

Aus dem Bereich Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes,
Homburg/ Saar
Direktor: Prof. Dr. Dr. Sören Becker

**Klinische Bedeutung des Nachweises von *Staphylococcus sac-*
charolyticus und Analyse des humanpathogenen Potenzials**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2024

Vorgelegt von: Ricarda Michels
geb. am: 29.07.1997 in Mannheim

Tag der Promotion: 17.03.2025

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Sören L. Becker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Rupf

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Zusammenfassung	- 1 -
1.1 Deutsche Zusammenfassung.....	- 1 -
1.2 Abstract.....	- 2 -
2 Einleitung.....	- 3 -
2.1 Theoretische Grundlagen.....	- 3 -
2.1.1 Koagulase-negative Staphylokokken.....	- 3 -
2.1.2 Differenzierung zwischen Infektion und Kontamination.....	- 6 -
2.2 <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	- 7 -
2.2.1 Taxonomische Einordnung.....	- 7 -
2.2.2 Genetische Eigenschaften.....	- 8 -
2.2.3 Biochemisches Profil und Sekretom	- 11 -
2.2.4 Unterschiede zwischen den Subkladen 1 und 2	- 13 -
2.2.5 Wachstumsbedingungen und Schwierigkeiten der Identifikation.....	- 14 -
2.2.6 Antibiotische Therapie und Resistenzbestimmung	- 16 -
2.2.7 Einschätzung der klinischen Relevanz anhand der aktuellen Studienlage	- 17 -
2.3 Ziel der Arbeit/Fragestellung	- 23 -
3 Material und Methoden	- 24 -
3.1 Studiendesign	- 24 -
3.2 Einteilung in Infektion oder Kontamination	- 24 -
3.3 Ergänzende Untersuchung von 22 Proben.....	- 25 -
3.3.1 Anzucht und erneute Identifizierung	- 25 -
3.3.2 Antibiotikaresistenztestung.....	- 26 -
3.4 Whole-genome sequencing (WGS).....	- 26 -
3.5 Statistische Auswertung.....	- 28 -
4 Ergebnisse	- 29 -

4.1	Anzucht und Speziesidentifizierung.....	- 29 -
4.2	Antibiotikaresistenztestung	- 31 -
4.3	Beschreibung der Gesamtkohorte und Vergleich der Gruppen A und B.....	- 33 -
4.4	Ergebnisse der Regressionsanalyse	- 38 -
4.5	Whole-genome sequencing.....	- 39 -
4.6	Vergleich Klade A und B	- 41 -
5	Diskussion	- 44 -
5.1	Zusammenfassung der wesentlichen Erkenntnisse.....	- 44 -
5.2	Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur	- 45 -
5.3	Stärken und Schwächen der Studie	- 49 -
5.4	Bedeutung und Konsequenzen für den klinischen Alltag.....	- 51 -
5.5	Implikationen für zukünftige Studien.....	- 52 -
5.6	Schlussfolgerung	- 53 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 54 -
7	Danksagung	- 63 -
8	Publikationen	- 64 -
9	Lebenslauf.....	- 65 -
10	Eidesstattliche Erklärung.....	- 66 -
11	Anhang	VI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Systematische Einteilung der Bakterien.	- 4 -
Abbildung 2	Kriterien zur Differenzierung zwischen Kontamination und Infektion.....	- 7 -
Abbildung 3	Phylogenetische Verwandtschaft von Staphylokokken-Spezies	- 8 -
Abbildung 4	Inaktivierte Gene	- 10 -
Abbildung 5	Schwierigkeiten der korrekten Identifizierung von <i>S. saccharolyticus</i>	- 16 -
Abbildung 6	Alle jemals berichteten Fälle in Zusammenhang mit <i>S. saccharolyticus</i> ...	- 20 -
Abbildung 7	Wachstum von <i>S. saccharolyticus</i> nach 2 Tagen Inkubationszeit.....	- 29 -
Abbildung 8	Wachstum von <i>S. saccharolyticus</i> nach 4 Tagen Inkubationszeit.....	- 29 -
Abbildung 9	Übersicht über alle vorhandenen Proben.....	- 31 -
Abbildung 10	Exemplarische Darstellung der Antibiotikaresistenztestungen	- 32 -
Abbildung 11	Übersicht über die Gesamtkohorte	- 34 -
Abbildung 12	Minimum spanning tree	- 40 -
Abbildung 13	Verteilung des Kerngenoms zwischen den Kladen A und B	- 41 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Vergleich zwischen den beiden Subkladen 1 und 2.....	- 14 -
Tabelle 2	Überblick über alle Fallberichte	- 22 -
Tabelle 3	Übersichtstabelle der MALDI-TOF-Ergebnisse.....	- 30 -
Tabelle 4	Antibiotikaresistenztestung von 5 Isolaten.....	- 32 -
Tabelle 5	Darstellung der statistisch signifikanten Variablen	- 36 -
Tabelle 6	Überblick der sechs Kriterien, die in den Score eingegangen sind	- 37 -
Tabelle 7	Ergebnisse der univariaten Regressionsanalyse	- 38 -
Tabelle 8	Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse.....	- 39 -
Tabelle 9	Vergleich der beiden Kladen A und B miteinander	- 42 -

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

agr.....	accessory gene regulator
ANI.....	Average nucleotide identity
BHCY.....	brain-heart infusion yeast + Cystein
BHI.....	Brain heart infusion
BK.....	Blutkultur
BSI.....	Blutstrominfektion
CD.....	Coding Sequence
CF.....	Cystische Fibrose
CoNS.....	Koagulase-negative Staphylokokken
CoPS.....	Koagulase-positive Staphylokokken
CRP.....	C-reaktives Protein
EUCAST.....	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAA.....	Fastidious anaerobe Agar
ICU.....	intensive care unit
kb.....	Kilobasenpaare
MALDI-TOF.....	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung/time of flight
MHK.....	minimale Hemmkonzentration
MOTT.....	Mycobacteria Other Than Tuberculosis
MRSA.....	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NGS.....	Next Generation Sequencing
OLR.....	Offener Leserahmen
OR.....	Odds Ratio
PIA.....	polysaccharid intercellular adhesin
PJI.....	Prosthetic Joint Infection
PLT.....	platelet (=Thrombozyten)
PSM.....	Phenol-soluble-modulins
QS.....	Quorum Sensing
SNPs.....	Single Nucleotide Polymorphisms
TSY.....	Trypticase soy yeast
TTP.....	Time to positivity
WGS.....	Whole-genome sequencing

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

In dieser Studie geht es um die klinische Relevanz von *Staphylococcus (S.) saccharolyticus*, das humanpathogene Potenzial und die diagnostische Schwierigkeit, Nachweise von *S. saccharolyticus* sicher als Infektion oder Kontamination erkennen zu können. In einer retrospektiven Datenerhebung konnten 93 Patienten identifiziert werden, die im Zeitraum zwischen Juni 2009 und Juli 2021 im Universitätsklinikum des Saarlandes behandelt wurden und einen Nachweis von *S. saccharolyticus* hatten. Zu diesen Patienten wurden klinische Daten gesammelt und ausgewertet. Basierend auf sechs Kriterien wurde ein Score entwickelt, um die Patienten in zwei Gruppen einzuteilen, nämlich bei einer Punktzahl von 3-6 Punkten in die Gruppe A „Infektion wahrscheinlich“, was bedeutet, dass bei diesen Patienten von einer durch *S. saccharolyticus* hervorgerufenen Infektion ausgegangen wurde. Patienten mit einem Punktwert von 0 – 2 Punkten wurden in die Gruppe B „Infektion unwahrscheinlich“ eingeteilt. Die beiden Gruppen wurden miteinander verglichen und es wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um mögliche Faktoren zu identifizieren, die mit einer Infektion durch *S. saccharolyticus* einhergehen. Von den insgesamt 93 Patienten ließen sich 44 in Gruppe A einteilen, 49 Patienten in Gruppe B. Die Regressionsanalyse ergab statistisch signifikante Variablen, nämlich die Kriterien „Länge des Krankenhausaufenthaltes“, „maximale Körpertemperatur“, „erfolgte Antibiotikatherapie“ und „Länge des Aufenthaltes auf der Intensivstation“. In der multivariaten Regressionsanalyse hatte die Variable „maximale Körpertemperatur“ den größten prädiktiven Wert.

Ergänzend wurde eine Genomsequenzierung von 22 Isolaten durchgeführt. Es konnten zwei Untergruppen, Klade A und B, identifiziert werden. Anhand der klinischen Daten lässt sich für Stämme aus Klade A eine höhere Virulenz vermuten, wenngleich beide Kladen in gleicher Maße in der Lage sind, Infektionen hervorzurufen. Stämme, die Klade B zugehörig sind, besitzen ein instabileres Kerngenom, eine kürzere TTP und scheinen eher mit Fremdkörperinfektionen assoziiert zu sein.

Bei der Antibiotika-Empfindlichkeitstestung zeigte sich lediglich eine Resistenz gegenüber Metronidazol, für alle anderen getesteten Antibiotika konnte eine Sensibilität nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden mit den aktuellen Daten aus der Literatur verglichen und eingeordnet, sodass das Wissen über *S. saccharolyticus* erweitert werden konnte. Es kann davon ausgegangen werden, dass *S. saccharolyticus* in der Lage ist, klinisch relevante Infektionen hervorzurufen, die in den meisten Fällen jedoch gut auf eine antibiotische Therapie ansprechen. Die Unterscheidung zwischen einer Infektion und einer Kontamination bleibt weiterhin schwierig.

1.2 Abstract

Introduction

This study focuses on the clinical relevance of *Staphylococcus saccharolyticus*, its human pathogenic potential and the diagnostic difficulty of reliably recognizing evidence of *S. saccharolyticus* as an infection or contamination.

Methods

In a retrospective data collection, 93 patients with *S. saccharolyticus* detection were identified who were hospitalized at Saarland University Hospital between June 2009 and July 2021. Clinical data on these patients were collected and analysed. Based on six criteria, a score was developed to divide the patients into two groups. Patients with a score of 3 – 6 points were assigned to group A in which infection caused by *S. saccharolyticus* was considered likely. Patients with a score of 0 - 2 points were assigned to group B “infection unlikely”. The two groups were compared, and a logistic regression analysis was performed to identify possible factors associated with an infection caused by *S. saccharolyticus*. Furthermore, whole genome sequencing (WGS) of 22 isolates was performed. Antibiotic susceptibility was tested.

Results

Group A comprised 44 patients, group B contained 49 patients out of a total of 93 patients. The regression analysis revealed statistically significant variables, namely the criteria “length of hospital stay”, “maximum body temperature”, “antibiotic therapy” and “length of stay in the intensive care unit”. In the multivariate regression analysis the criteria “maximum body temperature during hospital stay” had the strongest predictive effect. In whole genome sequencing two subgroups, clades A and B, were identified. Based on the clinical data, it can be assumed that strains from clade A are more virulent, although both clades are equally capable of causing infections. Strains belonging to clade B have a more unstable nuclear genome, a shorter TTP and appear to be more often associated with foreign body infections. The antibiotic susceptibility test revealed resistance to metronidazole; sensitivity to all other antibiotics tested was demonstrated.

Discussion

The results of this study were compared with current data from the literature and categorized so that knowledge about *S. saccharolyticus* could be expanded. It can be assumed that *S. saccharolyticus* is capable of causing clinically relevant infections, which in most cases respond well to antibiotic therapy. The distinction between an infection and a contamination remains difficult.

2 Einleitung

Der medizinische Fortschritt der letzten Jahre eröffnet viele neue Möglichkeiten, sowohl in der Diagnostik als auch zu therapeutischen Zwecken. Doch trotz stetigem Fortschritt sieht sich die Medizin weiterhin mit neuen Problemen konfrontiert, die zukünftig eine große Rolle spielen werden. Seit Jahren steigt beispielsweise die Anzahl multiresistenter gramnegativer Bakterien (MRGN), deren Behandlung das Gesundheitssystem bereits jetzt vor große Herausforderungen stellt. Hinzu kommen eine immer älter werdende Gesellschaft und eine Zunahme weiterer vulnerabler Patientengruppen, die besonders anfällig für opportunistische Erreger sind. Es gilt daher, eine bessere Prävention zu etablieren, um beispielsweise Erregern der Hautflora keinen Eintritt in den Blutkreislauf zu ermöglichen. Falls es doch zu einer Besiedlung kommt, muss anhand sicherer Unterscheidungskriterien differenziert werden können, ob es sich um eine Infektion handelt oder ob eher eine Kontamination vorliegt. Handelt es sich um eine Kontamination, sollte eine Antibiotikatherapie vermieden werden, um die Entwicklung weiterer Resistenzen zu verhindern. Im Falle einer Infektion muss diese jedoch möglichst schnell und gezielt mit dem passenden Antibiotikum behandelt werden. Aus diesen Anforderungen ergibt sich die Frage, wie dies im klinischen Alltag umsetzbar ist, wie sich die Risiken einer bakteriellen Infektion minimieren lassen und welche Möglichkeiten zur sicheren Differenzierung, Diagnostik und Therapie bestehen.

In dieser Arbeit geht es um einen bis dato im Vergleich zu *Staphylococcus (S.) aureus* noch recht unerforschten Erreger, das Bakterium *Staphylococcus saccharolyticus*. Die aktuelle Datenlage zu *S. saccharolyticus* umfasst bisher wenige Studien, und das humanpathogene Potenzial ist aufgrund der dürftigen Datenlage nur eingeschränkt zu beurteilen. Diese Studie soll dazu beitragen, das Wissen über *S. saccharolyticus* zu erweitern und möglichst eine fundierte Einschätzung über die Signifikanz zu geben, damit die Relevanz eines Nachweises im klinischen Alltag besser eingeschätzt werden kann.

2.1 Theoretische Grundlagen

2.1.1 Koagulase-negative Staphylokokken

Das in dieser Arbeit betrachtete Bakterium *S. saccharolyticus* gehört zu der Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS). Die allgemein gültige Systematik der Bakterien unterteilt primär die Bakterien nach ihrer Gramfärbung. Diese Färbung nach dem dänischen Bakteriologen Hans Christian Gram (1853-1938) ermöglicht eine Differenzierung zwischen Gram-positiven Bakterien, die eine dicke, mehrschichtige Mureinhülle besitzen und Gram-negativen Bakterien, die lediglich eine dünne Mureinhülle besitzen. Daneben existieren Bakterien mit atypischem Gramverhalten. Anhand weiterer Kriterien, wie zum Beispiel Morphologie,

Einleitung

Wachstumsverhalten oder Enzymausstattung, werden die Bakterien jeweils in Subgruppen unterteilt (siehe Abbildung 1, linke Seite). In der Gruppe der grampositiven Kokken ermöglicht der Koagulase-Test eine weitere Differenzierung zwischen den Staphylokokken: Auf Koagulase positiv reagiert als wichtigster Vertreter *S. aureus*, alle Koagulase-negative Bakterien werden in der Gruppe der CoNS zusammengefasst. Diese Systematik umfasst unter dem Namen „CoNS“ eine ständig wachsende Gruppe sehr unterschiedlicher Bakterien, zu der mittlerweile über 50 Spezies hinzugezählt werden [15,67], zuletzt ergänzt durch *S. taiwanensis* und *S. shinii* (2022), *S. brunensis* (2023) und *S. hsinchuensis* (2024) [24,59,107,116] (Abbildung 1, rechte Seite).

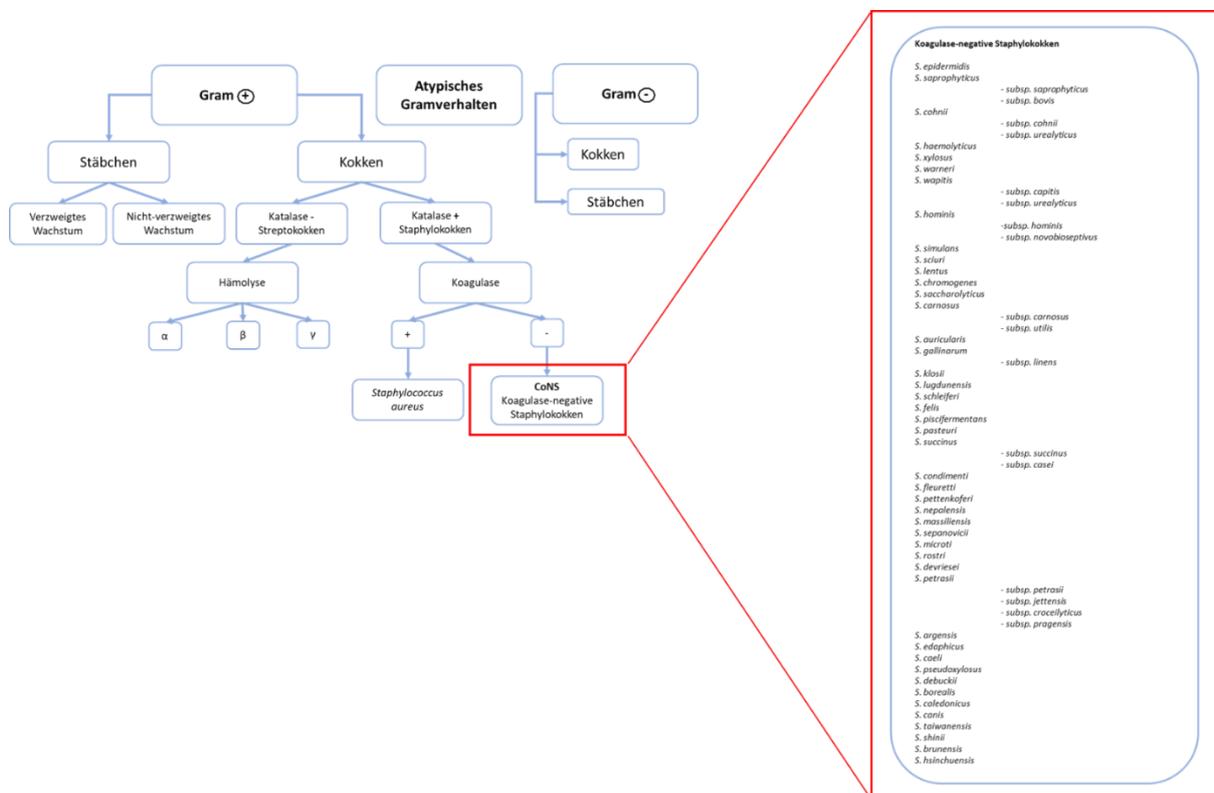


Abbildung 1 Systematische Einteilung der Bakterien und Überblick aller derzeit bekannten CoNS-Spezies, chronologisch nach Entdeckungsdatum sortiert.

Durch häufige Reklassifizierungen und Namensänderungen in der Entdeckungsgeschichte der Staphylokokken ist die systematische Einteilung nicht immer leicht. In den Jahren 1882 – 1884 etablierte sich der Name „*Staphylococcus*“, nachdem verschiedene dieser Keime im Zusammenhang mit eitrigen Abszessen festgestellt werden konnten [78,89]. Nach vielen verschiedenen Einordnungen schlug R.W. Fairbrother 1940 vor, die Koagulaseproduktion als Unterscheidungsmerkmal heranzuziehen, um dadurch zwischen nichtpathogenen CoNS und pathogenen Koagulase-positiven Staphylokokken (CoPS) zu differenzieren [37]. Heutzutage erfolgt die Speziesidentifikation über deutlich präzisere Möglichkeiten, wie DNA-Analysen oder

Massenspektrometrie. Trotzdem hat sich die Unterscheidung in CoNS und CoPS aufgrund klinischer und diagnostischer Praktikabilität bis heute durchgesetzt. Deswegen werden im Allgemeinen alle CoNS-Spezies in der Regel weniger pathogen angesehen als der wichtigste Vertreter der CoPS, *S. aureus*. Das erscheint auch nicht verwunderlich in Anbetracht der Tatsache, dass sich eine Vielzahl schwerer klinischer Verläufe findet, die mit *S. aureus* oder dem *S. aureus*-Komplex assoziiert sind [7,75], ebenso wie beispielsweise gefährliche Blutstrominfektionen, die mit einer hohen Mortalität einhergehen [13]. Hinzu kommt die zunehmende Resistenzentwicklung von *S. aureus* gegen Antibiotika, wodurch der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) zu einem gefürchteten Problemkeim geworden ist.

Darüber hinaus ist auch die klinische Relevanz der CoNS nicht zu unterschätzen. Diese heterogene Gruppe vereint in sich ein großes Spektrum verschiedener Keime mit ganz unterschiedlicher Pathogenität, angefangen bei Spezies mit ähnlichen Eigenschaften wie *S. aureus* (zum Beispiel *S. lugdunensis* [6,51]) über Spezies, die ein eigenes Krankheitsbild verursachen (*S. saprophyticus* [32]), bis hin zu weitestgehend nicht-pathogenen Keimen [16]. Neben *S. lugdunensis* und *S. saprophyticus* sind vier weitere Spezies mit einem größeren humanpathogenen Potenzial assoziiert, nämlich *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* und *S. hominis* [67]. Die Implantation von medizinischen Fremdkörpern ist in den letzten Jahren massiv gestiegen, was den Anteil an fremdkörperassoziierten Infektionen ebenfalls ansteigen lässt, von denen ein nicht unerheblicher Teil durch CoNS verursacht wird [74]. Viele CoNS-Spezies sind in der Lage, einen Biofilm zu produzieren, der es den Bakterien ermöglicht, besser an Oberflächen haften zu können und sie vor diversen Antibiotika schützt [15,54]. Typische Lokalisationen sind zum Beispiel Herzklappen, Gelenks- oder Gefäßprothesen [67].

Das vermehrte Auftreten und die zunehmende Wichtigkeit der CoNS hängt mit der Entwicklung unserer immer älter werdenden Gesellschaft und den medizinischen Möglichkeiten zusammen. Insbesondere vulnerable Patientengruppen scheinen durch Infektionen mit opportunistischen Keimen gefährdet zu sein, speziell Frühgeborene [33,84,85], ältere Patienten¹ mit Vorerkrankungen und immunsupprimierte Patienten. CoNS gehören zu den wichtigsten Ursachen für nosokomiale Infektionen, also Infektionen, die im Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt oder einem medizinischen Eingriff stehen [117]. Beispielsweise konnte eine Studie aus den USA über einen Zeitraum von 7 Jahren in 49 verschiedenen Krankenhäusern 31% aller nosokomialen Blutstrominfektionen einem Vertreter der CoNS zuordnen [110]. Andere Studien bestätigen den großen Einfluss von CoNS an nosokomialen Infektionen [11,35] und auch im internationalen Vergleich verursachen CoNS einen nicht unerheblichen Anteil der Infektionen [90].

¹ Alle in dieser Arbeit verwendeten Personalbegriffe beziehen sich grundsätzlich auf alle Geschlechter. Sie beinhalten keine Wertung.

2.1.2 Differenzierung zwischen Infektion und Kontamination

Nosokomiale Infektionen sind für einen großen Anteil von Komplikationen im Krankenhaus verantwortlich und somit ein nicht zu vernachlässigendes Problem im klinischen Alltag. Im Rahmen einer medizinischen Therapie wird regelhaft Fremdkörpermaterial, wie zum Beispiel ein zentraler Venenkatheter oder ein Tubus für eine endotracheale Beatmung, in den Körper eingelegt. Dieses Fremdmaterial bietet eine optimale Eintrittspforte für Bakterien, um in die Blutstrombahn zu gelangen und im schlimmsten Fall zu einer gefährlichen Sepsis zu führen [101]. Selbst mit sorgfältigster Desinfektion besteht dieses Risiko und wie oben erläutert, sind in diesem Fall bereits geschwächte Patienten besonders anfällig. Dabei ist es leider häufig kompliziert, eine eindeutige Blutstrominfektion nachzuweisen. CoNS tragen einen großen Teil zum menschlichen Mikrobiom der Haut bei [4,25]. Da das liegende Fremdmaterial in vielen Fällen über die Haut in Verbindung mit der Außenwelt steht oder, bei dauerhaft liegendem Fremdkörpermaterial, Hautkeime über andere Läsionen der Haut in die Blutbahn gelangen können, findet man in vielen Blutkulturen auch Keime, die zu dem regulären Mikrobiom der Haut gehören [25]. Dadurch lässt sich nicht immer mit Sicherheit sagen, ob es sich bei einem positiven Befund einer Blutkultur wirklich um den auslösenden Erreger der Infektion oder nur um eine Kontamination handelt [17,40,43,49]. Diese Unterscheidung ist unabdingbar für die weitere Therapie und im Besonderen die Auswahl des passenden Antibiotikums. Nicht auf das Erreger- und Resistenzspektrum abgestimmte Antibiotikagaben erhöhen nämlich wiederum die Entstehung von Multiresistenzen und führen zu einer immer komplizierteren und anspruchsvolleren Genese. Daraus ergibt sich der Anspruch an die Diagnostik, möglichst zuverlässig zwischen Kontamination und Infektion zu unterscheiden. Es bestehen bereits mögliche Kriterien (Abbildung 2), die als Indizien hinsichtlich einer Infektion oder Kontamination zu werten sind und in ihrer Gesamtheit dem Arzt oder der Ärztin eine Richtlinie für die weitere Behandlung bieten [50].

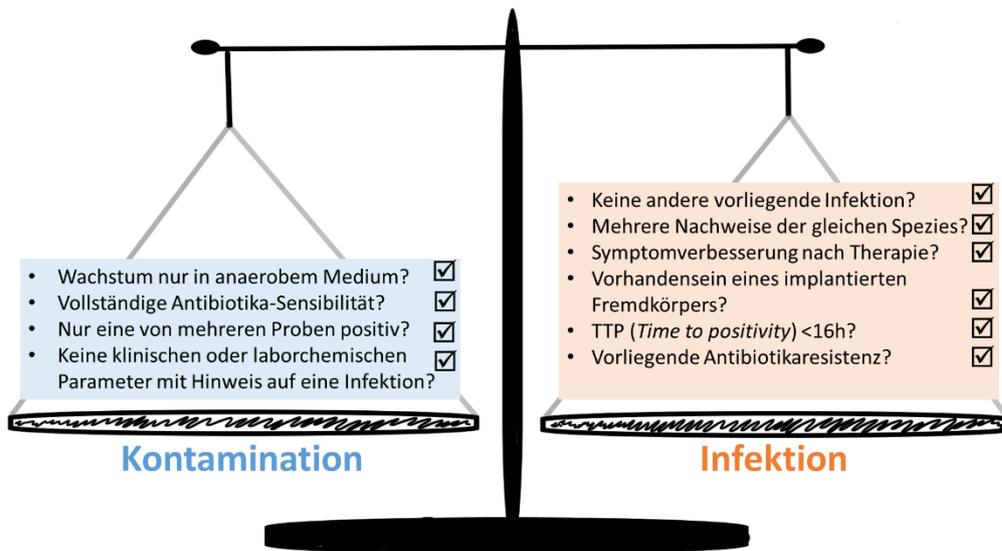


Abbildung 2 Kriterien zur Differenzierung zwischen Kontamination und Infektion; (Quelle: adaptiert nach Michels et al. Update on Coagulase-Negative Staphylococci – What the Clinician Should Know (2021) [67])

Erschwerend kommt hinzu, dass es über viele CoNS-Spezies, insbesondere über die erst kürzlich entdeckten, nur wenige Studien bezüglich ihrer klinischen Relevanz gibt. Oft existieren lediglich einzelne Fallberichte, sodass es in vielen Fällen keine konkreten Empfehlungen gibt, wie mit einem positiven Befund umgegangen, beziehungsweise ob und wie behandelt werden muss. Um hier den aktuellen Wissensstand zu erweitern, befasst sich diese Arbeit detaillierter mit einem Vertreter der CoNS, mit *S. saccharolyticus*.

2.2 *Staphylococcus saccharolyticus*

2.2.1 Taxonomische Einordnung

S. saccharolyticus wurde erstmalig 1978 beschrieben, zu diesem Zeitpunkt jedoch noch als *Peptococcus (P.) saccharolyticus* bezeichnet [36]. Drei Jahre später, 1981, wurde *P. saccharolyticus* von Kilpper-Bälz und Schleifer neu klassifiziert und konnte mit Hilfe weiterer Untersuchungen als *Staphylococcus* identifiziert werden [53]. Bis 2019 gab es allerdings keine korrekte Referenzgenom-Sequenz. Hinzu kamen 3 Referenz-Genome, die fälschlicherweise *S. saccharolyticus* zugeschrieben wurden, bei denen es sich aber tatsächlich um Stämme der Spezies *S. capitis* handelte. Dies wurde in einer aktuellen Studie von Brüggemann et al. korrigiert und *S. saccharolyticus* konnte anhand von Analysen der SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) und der 16S-rRNA Sequenzen als eigenständige Spezies bestätigt werden. Als nächste verwandte Spezies wurden *S. capitis* und *S. epidermidis* identifiziert, zu denen im Vergleich die *average nucleotide identity* (ANI) 80% beträgt. Eine ANI<95% gilt als guter Indikator für das Vorliegen einer eigenen Spezies [87]. Außerdem konnte die Forschungsgruppe

ihre insgesamt acht untersuchten *S. saccharolyticus*-Stämme in zwei Untergruppen, sogenannte Kladen, einteilen, Subklade 1 mit fünf Stämmen (05B0362, 12B0021, 13T0028, DVP3-16-6167, ATCC14953) und Subklade 2 mit drei Stämmen (DVP2-17-2406, DVP4-17-2404, DVP5-16-4677) [20]. Eine detaillierte phylogenetische Einordnung ist in Abbildung 3 zu sehen. Die Einteilung in zwei Subkladen wurde 2021 in zwei weiteren Studien bestätigt [1,97].

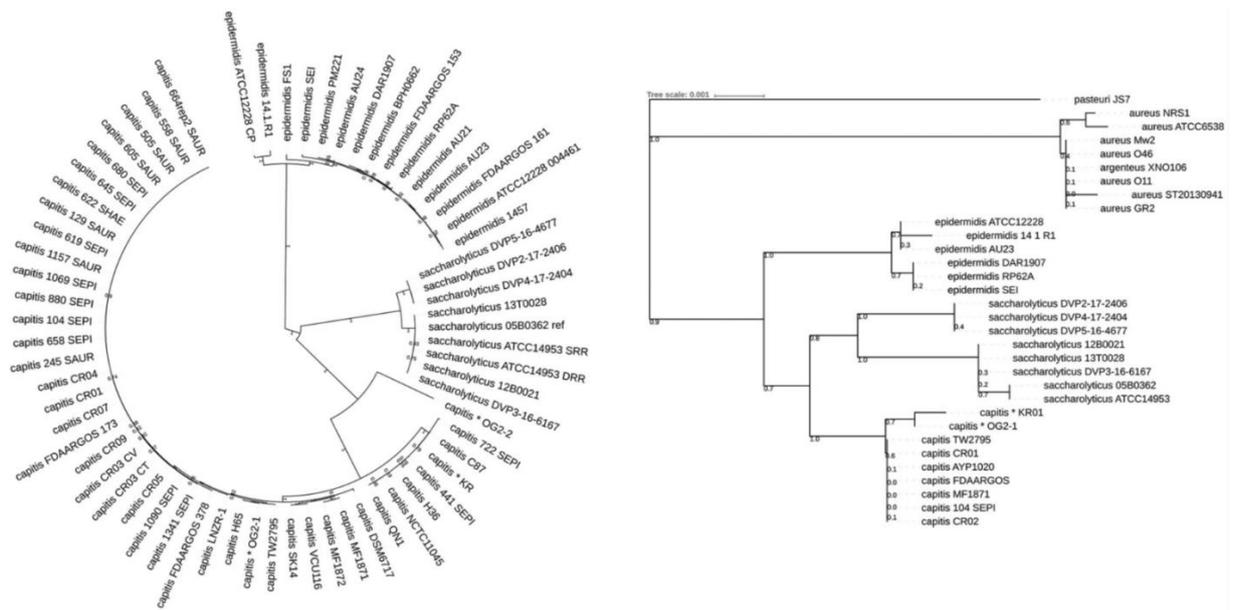


Abbildung 3 Phylogenetische Verwandtschaft von Staphylokokken-Spezies. Links: auf SNPs-basierende Analyse aller bisher sequenzierten *S. saccharolyticus*-Stämme. Rechts: Analyse basierend auf der 16S-rRNA-Sequenz. Mit „*“ markierte *S. capitis*-Stämme: Ursprünglich als *S. saccharolyticus* identifizierte Stämme, hier von Brüggemann et al. korrigiert. (Quelle: Brüggemann et al. *Staphylococcus saccharolyticus* Isolated From Blood Cultures and Prosthetic Joint Infections Exhibits Excessive Genome Decay (2019) [20], mit freundlicher Erlaubnis von „Frontiers in Microbiology“)

2.2.2 Genetische Eigenschaften

Neben der phylogenetischen Einordnung von *S. saccharolyticus* konnte die Forschungsgruppe Brüggemann et al. noch weitere Eigenschaften über das Genom herausfinden. Die durchschnittliche Genom-Größe aller bisher sequenzierten Stämme liegt durchschnittlich bei 2.357 Kilobasenpaaren (kb) und ist damit kleiner als das Genom der nächsten Verwandten *S. capitis* (2.487 kb) und *S. epidermidis* (2.548 kb). Der GC-Gehalt, also der Anteil von Guanin und Cytosin an allen Nukleinbasen, liegt bei 32% und ist damit vergleichbar mit dem GC-Gehalt von *S. epidermidis* (31,95%) und etwas niedriger als bei *S. capitis* (32,9%). Interessanterweise besitzt *S. saccharolyticus* ein kleineres Genom als seine Verwandten. Dieses enthält dafür aber mehr kodierende Sequenzen (CD = coding sequence). Insgesamt konnten 221 CDs identifiziert werden, die für ganz unterschiedliche Funktionen beziehungsweise Eigenschaften kodieren, zum Beispiel für modifizierende Oberflächenkomponenten (wie Adhesin) oder für diverse Transportsysteme, zum Beispiel für den ABC-Typ Transporter. Ein kleineres Genom mit

mehr CDs bedeutet, dass die Länge der einzelnen CDs kleiner sein muss als bei den Vergleichsgruppen. Diese These ließ sich von Brüggemann et al. auch bestätigen. Es konnten mindestens 301 Pseudogene entdeckt werden, bei denen es sich um fragmentierte Gene handelt, die beispielsweise durch Frameshift-Mutationen oder vorzeitige Stopp-Codons entstehen. Diese Ergebnisse konnten 2021 in einer weiteren Studie bestätigt werden, in der, Subklade-spezifisch, ebenfalls ein hoher Anteil an Frameshift-Mutationen nachgewiesen wurde (34% der Klade-spezifischen Gene aus Klade 1 und 40% aus Subklade 2), ebenso wie ein hoher Anteil an Pseudogenen (470 in Subklade 1 und 490 in Subklade 2), was dazu führt, dass ca. 20% aller Gene inaktiv sind [97]. Eine ähnliche Zahl findet man bei den Ergebnissen von Afshar et al., ebenso aus dem Jahr 2021. Die komplette Genomsequenzierung von zwei Stämmen (13T0028 und DVP5-16-4677) zeigte die Inaktivität von 21% aller kodierenden Sequenzen (2.221 bzw. 2215 CDs im gesamten Genom, davon jeweils 469 bzw. 493 CDs nicht funktionsfähig). Auch hier liegt die Ursache vor allem in Frameshift-Mutationen und vorzeitigen Stopp-Codons [1]. Ein konkretes Beispiel für eine Frameshift-Mutation und die daraus resultierenden Folgen ist das *ica* Gen, welches für die Bildung von interzellulärem Adhäsion verantwortlich ist, welches bei der Bildung eines Biofilms in *S. aureus* eine entscheidende Rolle spielt [26]. Die Forschungsgruppe um Brüggemann fand Frameshift-Mutationen bei *S. saccharolyticus* in diesem Gen, was darauf schließen lässt, dass *S. saccharolyticus* nicht zur Biofilmbildung befähigt ist. Zusätzlich konnten mehrere Mutationen in Genen nachgewiesen werden, die eine Rolle bei metabolischen Prozessen spielen, wie zum Beispiel im Aminosäure-Stoffwechsel. Das bedeutet, dass *S. saccharolyticus* gegenüber den meisten Aminosäuren auxotroph ist, diese also nicht selbst synthetisieren kann und darauf angewiesen ist, diese Substanzen aus der Umwelt aufzunehmen. Söderquist et al. haben von den beiden oben genannten Stämmen den metabolischen Pfad der Aminosäureproduktion analysiert, der durch den Genomzerfall beeinflusst wird. Sie konnten zeigen, dass der Stamm DVP5-16-4677 für alle Aminosäuren auxotroph ist, 13T028 für die meisten (siehe Abbildung 4) [97].

Einleitung

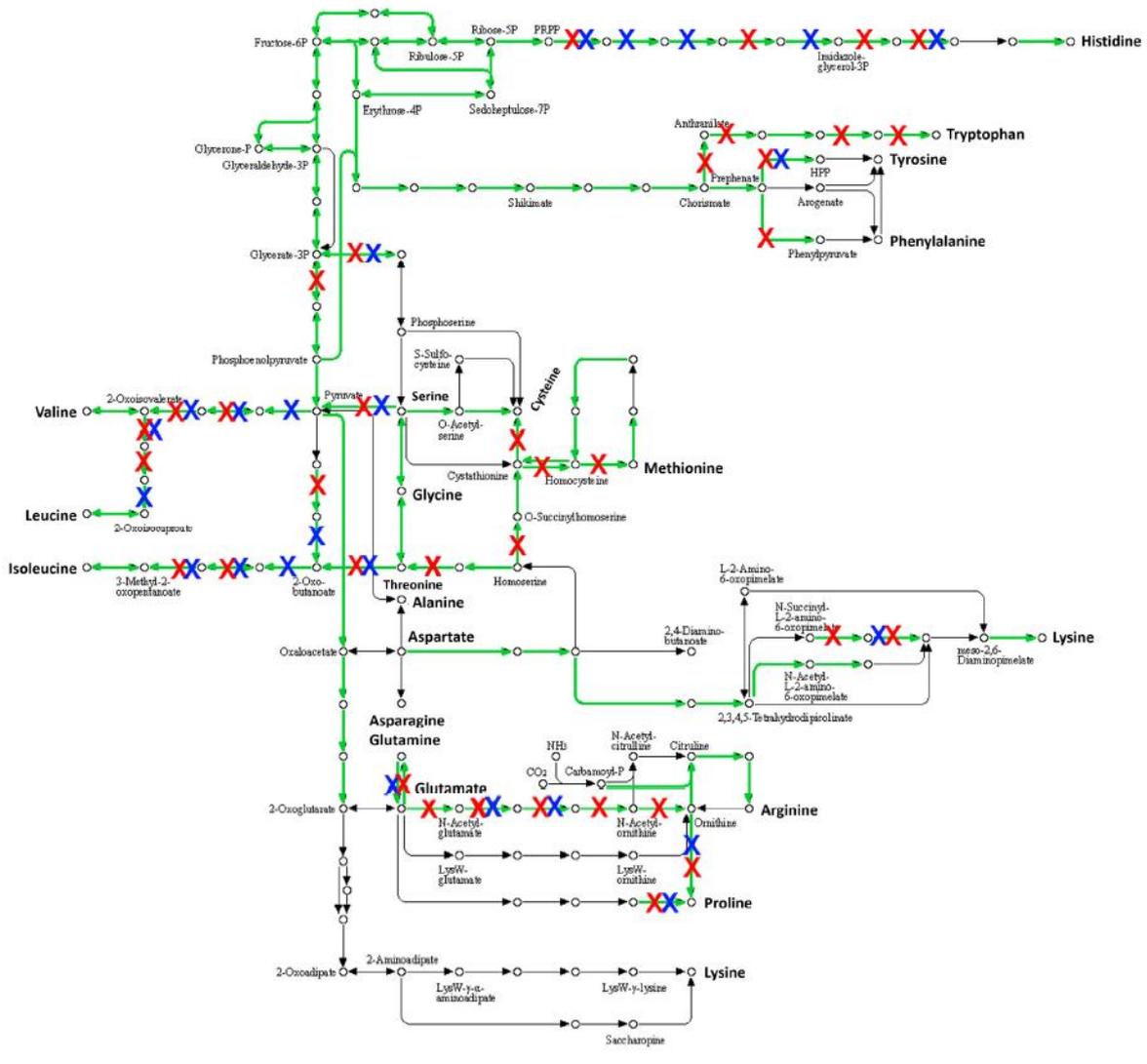


Abbildung 4 Inaktivierte Gene, die in den Aminosäurestoffwechsel von *S. saccharolyticus* (DVP5-16-4677 und 13T028) eingebunden sind. Rotes Kreuz: Frameshift-Mutation im entsprechenden Gen von DVP5-16-467. Blaues Kreuz: Frameshift-Mutation im entsprechenden Gen von 13T028. (Quelle: Söderquist et al. *Staphylococcus saccharolyticus* Associated with Prosthetic Joint Infections: Clinical Features and Genomic Characteristics (2021) [97], mit freundlicher Erlaubnis von „mdpi pathogens“)

Diese ausgeprägte Auxotrophie erklärt womöglich die anspruchsvollen Wachstumsbedingungen von *S. saccharolyticus* [20]. Eine weitere Frameshift-Mutation, die den Anspruch von *S. saccharolyticus* an anaerobe Bedingungen erklären könnte, liegt auf dem *mpsAB* Gen. Das *mpsAB*-System ist dafür zuständig, die intrazelluläre CO_2 -Konzentration zu erhöhen und ermöglicht damit Bakterien unter atmosphärischen CO_2 -Bedingungen zu wachsen [39]. Ein inaktives *mpsAB* Gen bewirkt somit einen erhöhten Bedarf an CO_2 für optimales Wachstum, was bei *S. saccharolyticus* auch nachgewiesen werden konnte [4,36]. In 2.2.5 wird auf die Wachstumsbedingungen detaillierter eingegangen.

Die hohe Anzahl an Pseudogenen kann als Anzeichen für eine sogenannte reduktive Evolution gewertet werden. Unter reduktiver Evolution versteht man den Verlust von Genen aus dem

Genom von Mikroorganismen, was im Rahmen einer Anpassung an eine neue Nische oder einen neuen Wirt vorkommen kann [9,60]. Das ist in anderen Spezies bereits gut belegt, zum Beispiel bei *Mycobacterium leprae* oder *Yersinia pestis*, die sich von einem freien Lebensstil an eine wirtsgebundene Lebensweise angepasst haben [83]. Bezüglich der Anpassung von *S. saccharolyticus* stellt Ahle et al. eine interessante Theorie auf: *S. saccharolyticus* besitzt als einziger CoNS, der mit Infektionen beim Menschen assoziiert ist, das Enzym Hyaluronat-Lyase/Hyaluronidase (siehe Kapitel 2.2.3.1). Möglicherweise hat ein horizontaler Gentransfer des *hya*-Gens stattgefunden, was den Lebenswandel von *S. saccharolyticus* begünstigt [4]. Der noch laufende Genzerfall lässt jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch keine abschließende Aussage über die bevorzugte Nische von *S. saccharolyticus* zu und muss sich erst in den nächsten Jahren zeigen.

2.2.3 Biochemisches Profil und Sekretom

Neben den auffällig vielen Pseudogenen besitzt *S. saccharolyticus* eine weitere Besonderheit, und zwar das signifikante Fehlen vieler Enzymaktivitäten. Zwei standardmäßige biochemische Tests wurden von Brüggemann et al. durchgeführt. Zum einen verwendeten sie das Testkit „API® 20A“, welches 21 Teststoffe enthält, 16 davon für Kohlenhydrate, die allesamt nicht verstoffwechselt wurden. Von den übrigen 5 Testsubstanzen war nur die Verflüssigung von Gelatine positiv, was dafürspricht, dass *S. saccharolyticus* das Protein Gelatinase besitzt. Mit Hilfe eines weiteren Test-Kits (RapID™ ANA II) wurden weitere 18 Enzyme getestet, von denen nur Reaktionen für Phosphatase und Urease positiv waren, Urease nur in Subklade 1 (weiteres: siehe Kapitel 2.2.4). Zusätzlich konnte, wie bereits oben erwähnt, eine Aktivität der Hyaluronidase festgestellt werden [20]. Zusätzlich wurden die sezernierten Proteine analysiert, darunter viele Stressproteine und Proteine der Glykolyse. Außerdem konnten Enzyme des Arginin-Deiminase-System identifiziert werden, ein Stoffwechselweg für Sauerstoff- und/oder Energiequellenmangelsituation [104], ebenso wie mehrere makromolekülabbauende Enzyme (darunter Hyaluronidase), immunodominante Oberflächenantigene (IsaA und IsaB) und Proteine des Quorum-Sensing-Systems (SarA und SrrA). Eine detaillierte Auflistung aller Enzyme ist bei Brüggemann et al. im Supplementary Part zu finden [20]. Interessant an dem Sekretom von *S. saccharolyticus* ist der ausgeprägte Anteil an Stress-Proteinen, die dafür zuständig sind, verschiedenen Gegebenheiten der Umgebung entgegenzuwirken, wie zum Beispiel einem sauren Milieu oder oxidativem Stress. Das kann als weiteres Anzeichen gewertet werden, dass *S. saccharolyticus* einer freien Lebensweise nicht mehr adäquat angepasst ist und dabei ist, sich an eine neue Nische zu adaptieren. Denkbar wäre die ausgeprägte Stressantwort auch als Folge des Genomzerfalls [20]. Hinsichtlich der Virulenz von *S. saccharolyticus* ist die Datenlage eher dürftig. Es konnten bisher keine „typischen“ Virulenzgene entdeckt werden, die beispielsweise gut bei *S. aureus* beschrieben sind. Einzelne Hinweise auf eine potenzielle

Virulenz von *S. saccharolyticus* gibt es dennoch. Zum einen ist hierbei die Aktivität von Urease zu nennen. Urease ist ein bekannter Virulenzfaktor aus *S. saprophyticus*, zuständig für einen pH-Anstieg im Rahmen von Harnwegsinfekten [29]. Ebenfalls wichtig zur pH-Regulation ist das bereits erwähnte Arginin-Deiminase-System, was Bakterien ermöglicht, in saurem Milieu zu überleben [45]. Zum anderen geben beispielsweise die immunodominanten Proteine Hinweise auf eine Pathogenität. Die identifizierten Oberflächenproteine IsaA und IsaB sind beide bekannt als Virulenzfaktoren von *S. aureus* [63,64], die es *S. aureus* ermöglichen, der Wirtsantwort zu entgehen [62]. Ebenfalls interessant ist das Vorhandensein mehrerer Quorum Sensing-Systeme (QS-System). Das Phänomen des Quorum Sensing wurde erstmalig 1970 beschrieben [73] und ermöglicht es Einzellern, untereinander über chemische Stoffe, sogenannte Autoinduktoren, zu kommunizieren und damit Prozesse zu koordinieren. Ab einem bestimmten Schwellenwert der Konzentration der Autoinduktoren (also einer bestimmten Anzahl an Bakterien), ändert sich die Genexpression der Bakterien und die gesamte Population ändert kollektiv den entsprechenden Phänotyp. So können die Bakterien ihre eigene Zelldichte messen, auf äußere Veränderungen reagieren und als Verbund beispielsweise einen Biofilm produzieren [70,92]. Bei *S. saccharolyticus* wurde zum einen das Agr-QS-System identifiziert (agr=accessory gene regulator), welches Proteine der sogenannten Phenol-soluble-modulins (PSMs) – Familie reguliert, die eine Rolle bei Wachstum, Biofilmbildung, Entzündungen, Zelltoxizität und vielem Weiteren spielen [18]. Außerdem wurde das SrrAB-System gefunden, welches das Überleben von *S. aureus* unter Bedingungen mit beispielsweise erhöhtem hypoxischen und oxidativem Stress im Rahmen einer Infektion sichert [102,109]. Da diese meist an *S. aureus* erforschten Virulenzfaktoren auch bei *S. saccharolyticus* zu finden sind, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass auch *S. saccharolyticus* aufgrund dieser Eigenschaften ein gewisses humanpathogenes Potenzial hat und in der Lage ist, in menschliches Gewebe einzudringen und möglicherweise Infektionen hervorzurufen. Welche Rolle die Virulenzgene von *S. saccharolyticus* spielen und wie groß der Einfluss auf die Krankheitsverläufe ist, bleibt noch zu erforschen.

2.2.3.1 Hyaluronidase

Ergänzend zu Kapitel 2.2.3 soll hier noch detaillierter auf die Hyaluronidase eingegangen werden. Hyaluronidasen spalten Hyaluronan, einen Bestandteil der im Bindegewebe vorkommenden extrazellulären Matrix und sind als Virulenzfaktor von *S. aureus* bekannt, was den Erreger umgebendes Bindegewebe zersetzen lässt [65]. Hyaluronan findet sich vor allem in tieferen Schichten der Epidermis [100]. Das Vorhandensein dieses Enzyms in *S. saccharolyticus* ist insofern besonders erwähnenswert, da es in den nächsten Verwandten von *S. saccharolyticus* nicht vorhanden ist und bisher vor allem mit *S. aureus* und diversen anderen grampositiven Bakterien assoziiert war [48,52]. Bislang gibt es keine Berichte über menschenassoziierte

CoNS gibt, die dieses Enzym besitzen. Nur bei den beiden tierbezogenen CoNS-Spezies *S. agnetis* [99] und *S. hyicus* [42] existieren ähnliche Enzyme mit jeweils 65% Übereinstimmung auf Proteinebene [20]. Der Fund des *hysA*-Gens revidiert die bisher geltende Annahme, dass Hyaluronidase nur bei tierassoziierten CoNS zu finden ist. Die Datenlage konnte überarbeitet werden und *S. saccharolyticus* ist damit die erste menschenassoziierte CoNS-Spezies, die das Enzym Hyaluronidase besitzt. Die Hyaluronidase würde es *S. saccharolyticus* ermöglichen, besser in tiefe Schichten der Epidermis vorzudringen und dort das größere Angebot an wirtseigenen Aminosäuren zu verstoffwechseln [4]. Das Vorhandensein der Hyaluronidase bestätigt zum einen erneut, dass *S. saccharolyticus* als eigene Spezies anzusehen ist und erleichtert womöglich in Zukunft die Differenzierung zwischen nahen Verwandten. Zum anderen besitzt *S. saccharolyticus* mit der Hyaluronidase einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor, der bei Infektionen eine große Rolle spielen könnte.

2.2.4 Unterschiede zwischen den Subkladen 1 und 2

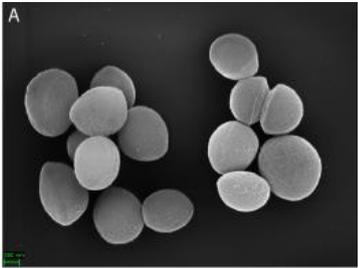
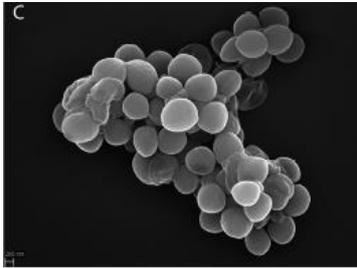
Wie bereits oben beschrieben, ließen sich die bisher analysierten Stämme in zwei Kladen einteilen. Es wurden mehrere Subklade-spezifische genomische Inseln entdeckt. Außerdem unterscheiden sich die beiden Kladen durch viele verschiedene SNPs und eine niedrige ANI (97,9%), was darauf hindeutet, dass es sich bei den beiden Kladen um zwei individuelle Subspezies handelt [1,20].

Der Vergleich der beiden Kladen zeigt interessante Unterschiede, sodass sich eine Hypothese hinsichtlich ihrer Virulenz aufstellen lässt. Die wichtigsten Unterschiede sind in Tabelle 1 aufgeführt. Bereits unter dem Elektronenmikroskop fallen morphologische Unterschiede der beiden Kladen auf. Während Stämme aus Subklade 1 größtenteils individuell angeordnet sind, präsentieren sich Stämme aus Subklade 2 mit einem traubenartigen Wachstum und zeigen außerdem mehr Zeichen von Oberflächenschädigungen [20]. Interessanterweise besitzt nur Subklade 1 Urease-Aktivität und im Vergleich zu Subklade 2 auch deutlich ausgeprägtere Hyaluronidase-Aktivität. Das könnte ein Hinweis auf eine mögliche stärkere Virulenz von Subklade 1 sein. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass Subklade 2 für alle Aminosäuren auxotroph ist und noch mehr Pseudogene aufweist, die als Ursache vieler fehlender Funktionen anzusehen sind. Ebenfalls bemerkenswert ist die Tatsache, dass alle zu Subklade 1 gehörenden Stämme aus infizierten Schultergelenksprothesen stammen und einen akuten Infektionsbeginn aufweisen (21 Tage und 5 Monate nach Prothesenimplantation). Im Gegensatz dazu stammen alle isolierten Stämme der Subklade 2 aus infizierten Prothesen des Hüftgelenks. Alle Infektionen traten erst mehrere Jahre nach Implantation auf (14 Monate – 16 Jahre) [97]. Da es sich hierbei jedoch um insgesamt nur sieben Fälle handelt, ist die daraus abgeleitete Hypothese noch mit etwas Zurückhaltung zu betrachten. Trotzdem lässt sich festhalten,

Einleitung

dass mehrere Hinweise eine größere Virulenz von Stämmen aus Subklade 1 signalisieren und damit ein größeres humanpathogenes Potenzial bergen als Stämme aus Subklade 2.

Tabelle 1 Vergleich zwischen den beiden Subkladen 1 und 2. *typische Infektionen: bisher nur bei 7 Fällen untersucht, davon waren 2 Stämme Subklade 1 zuzuordnen und stammten beide aus PJI der Schulter; fünf Stämme waren Subklade 2 zuzuordnen und stammten alle aus PJI der Hüfte [97]. ** Jeweils nur an einem Stamm getestet [97]; PJI = Prosthetic joint infection (Prothesengelenksinfektion); +++: stark ausgeprägt; +: gering ausgeprägt; (Quelle Bild A und C: Brüggemann et al. *Staphylococcus saccharolyticus* Isolated From Blood Cultures and Prosthetic Joint Infections Exhibits Excessive Genome Decay (2019) [20], mit freundlicher Erlaubnis von „Frontiers in Microbiology“)

	<u>Subklade 1</u>	<u>Subklade 2</u>
Morphologie	Anordnung vereinzelt/individuell 	traubenartige Anordnung 
Urease	ja	nein
Hyaluronidase	+++	+
typische Infektionen *	Schulter PJI Akuter Beginn	Hüfte PJI Später Beginn
Aminosäure-Synthese **	auxotroph für die meisten Aminosäuren	auxotroph für alle Aminosäuren
Pseudogene	470	490

2.2.5 Wachstumsbedingungen und Schwierigkeiten der Identifikation

S. saccharolyticus ist ein wichtiger Teil des menschlichen Hautmikrobioms und dort teilweise, zum Beispiel in Hautabstrichen vom Rücken, als dritthäufigster Vertreter zu finden (20,5%), wurde aber bereits ebenfalls in Hautabstrichen der Stirn und in der Ellenbeuge gefunden [4]. Trotz der Anzeichen, dass *S. saccharolyticus* einen nicht unbedeutenden Teil unseres Hautmikrobioms ausmacht, gibt es immer noch kaum Studien, die das Vorhandensein von *S. saccharolyticus* auf menschlicher Haut beschreiben.

Schon Evans et al. bemerkte 1978, es sei „rätselhaft, dass dieser Organismus nicht früher erkannt wurde in Anbetracht seiner Häufigkeit“ [36]. Außerdem stellten die Autoren vier Thesen auf, woran es liegen könnte, dass *S. saccharolyticus* oft übersehen wird. Eine mögliche

Ursache sahen sie in den anspruchsvollen Wachstumsbedingungen, die ein besonderes Kulturmedium und anaerobe Bedingungen nötig machen. Neben diesen beiden Ansprüchen benötigt *S. saccharolyticus* außerdem eine längere Inkubationszeit. Hinzu kommt noch die oftmals falsche Klassifizierung, die erst in den letzten Jahren durch moderne Möglichkeiten verbessert wurde [36]. An diesen Gründen hat sich bis heute nicht viel geändert und die Forschung steht immer noch vor ähnlichen Problemen.

S. saccharolyticus wächst nicht auf normalem Blutagar, sondern nur, laut aktueller Studienlage, auf „Trypticase soy yeast“ (TSY) - oder „Fastidious Anaerobe Agar“ (FAA) – Agar, beziehungsweise in „brain-heart infusion yeast“ – Medium, ergänzt mit Cystein (BHCY-Medium). Es besteht eine ausgesprochen lange Inkubationszeit, meist zwischen 48 und 96 Stunden bis hin zu sieben Tagen bei Temperaturen zwischen 36 und 37° Celsius [1,4,20,97]. Zusätzlich kommt der Anspruch an anaerobe Bedingungen hinzu. Ahle et al. [4] bestätigten, dass kein Wachstum unter aeroben Bedingungen stattfindet. Allerdings testete die Forschungsgruppe darüber hinaus das Wachstum unter atmosphärischen Bedingungen, dieses Mal jedoch ergänzt durch ca. 6% CO₂, was zu ähnlich gutem Wachstum führte wie unter anaeroben Bedingungen [4]. Dieses Phänomen lässt sich durch die bereits oben beschriebene Frameshift-Mutation im *mpsAB*-Gen erklären, was dazu führt, dass *S. saccharolyticus* unter atmosphärischen Bedingungen nicht wachsen kann, außer es bestehen erhöhte CO₂-Konzentrationen. Es kann angenommen werden, dass aufgrund dieser besonderen Ansprüche *S. saccharolyticus* zusätzlich verdrängt wird durch schneller wachsende Spezies, wie beispielsweise *S. epidermidis* [81].

Diese Charakteristika erklären, wieso *S. saccharolyticus* in Studien, die auf kultureller Anzucht basieren, oft übersehen wird. Wieso dieser Keim bisher auch in vielen Kultur-unabhängigen Studien nicht gefunden wurde, liegt vermutlich noch an zwei weiteren Faktoren. Zum einen besitzen die 16S-rRNA-Gene von *S. saccharolyticus* nur sehr wenige charakteristische SNPs, die es im Rahmen der Genomsequenzierung teilweise erschweren können, *S. saccharolyticus* sicher von Verwandten wie *S. capitis* zu unterscheiden [4,20]. Hinzu kommt eine außergewöhnlich schwere Standard-Genomsequenzierung, die ebenfalls besondere Ansprüche birgt. Es darf weiterhin nicht vergessen werden, dass bis 2019 noch kein Referenzgenom vorhanden war, zusätzlich erschwert durch die Tatsache, dass zwei *S. capitis*-Stämme fälschlicherweise als *S. saccharolyticus* dokumentiert waren [20]. Eine Übersicht aller Ursachen, die möglicherweise dazu beitragen, dass *S. saccharolyticus* trotz seines scheinbar häufigen Vorkommens auf der Haut nur selten detektiert wird, ist in Abbildung 5 zu sehen.

Einleitung

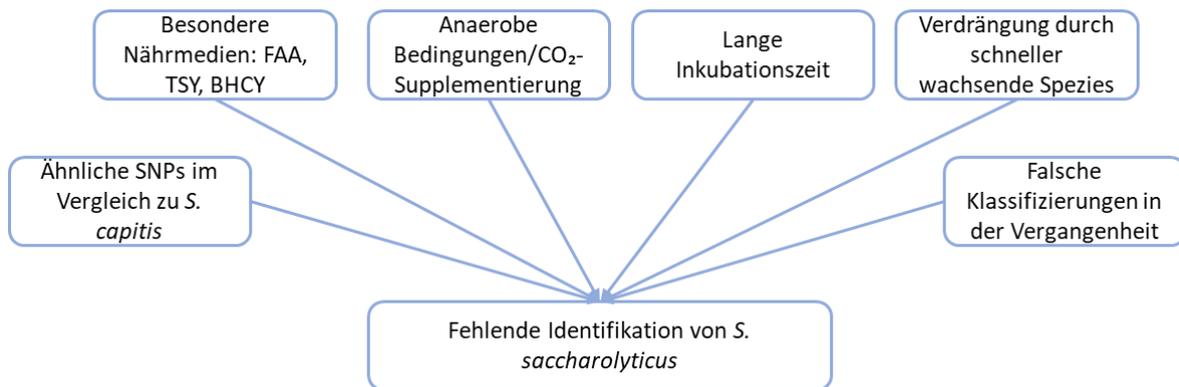


Abbildung 5 Schwierigkeiten der korrekten Identifizierung von *S. saccharolyticus*

2.2.6 Antibiotische Therapie und Resistenzbestimmung

Aktuell existieren keine konkreten Behandlungsrichtlinien für den Fall einer Detektion von *S. saccharolyticus*. In einer Studie von 2021 hat jedoch die Forschungsgruppe um Söderquist et al. an sieben verschiedenen Stämmen die Antibiotika-Sensibilität getestet. Unter den getesteten Antibiotika war Benzylpenicillin, Clindamycin, Metronidazol, Amoxicillin, Imipenem, Meropenem, Vancomycin und Chloramphenicol. Alle Stämme reagierten auf alle untersuchten Antibiotika sensibel, mit Ausnahme von Metronidazol, worauf sich in allen Stämmen eine Resistenz nachweisen ließ. Die klinischen Daten der Patienten, bei denen die Stämme isoliert wurden, zeigten ebenfalls gutes Ansprechen auf die antibiotische Behandlung: Von sieben Patienten wurden drei mit Amoxicillin behandelt, zwei mit Penicillin V und zwei erhielten kein Antibiotikum. Sechs Patient:innen zeigten ein gutes Ansprechen und einen positiven Verlauf, ein Patient, welcher für 4 Monate Penicillin V erhielt, wies ein Jahr später einen schlechten funktionellen Status auf [97].

Zwei weitere Forschungsgruppen werteten die Daten aus sieben retrospektiven und jeweils einem aktuellen Fallberichten aus [103,106]. Beide Gruppen kamen zu dem Ergebnis, dass *S. saccharolyticus* in allen Fällen mit verfügbaren Antibiogrammen resistent auf Metronidazol war und sensibel für Fluorchinolone, Clindamycin, Vancomycin, Teicoplanin, Chloramphenicol, Pristinamycin, Erythromycin und Rifampicin. Bei sieben Patienten, die laut Antibiogramm auf β -Lactame sensibel waren, zeigten fünf Patienten gutes Ansprechen, zwei jedoch nicht. Die Antibiotikatherapie variierte zwischen 6 - 14 Wochen, erfolgte intravenös oder oral und bestand in den meisten Fällen aus β -Lactamen und Fluorchinolonen. Trojani et al. [103] ergänzten die Daten durch einen weiteren Fallbericht. Dieser wird hier aber nicht mit einbezogen, da zu diesem Fall keine Daten verfügbar sind, bis auf die Tatsache, dass es sich um eine Prothesenklappen-Endokarditis handelt [19]. Die Forschungsgruppe um Wang et al. spricht außerdem noch eine Empfehlung zur Behandlung von *S. saccharolyticus*-Infektionen aus. Metronidazol

soll vermieden werden und eine Kombination aus β -Lactam-Antibiotika plus Fluorchinolonen oder aus Vancomycin plus Teicoplanin beziehungsweise Clindamycin wird empfohlen. Damit soll gewährleistet werden, dass β -Lactam-resistente Stämme ebenfalls mit abgedeckt werden [106].

Diese Daten sprechen in ihrer Gesamtheit dafür, dass sich *S. saccharolyticus* mit den gängigen Antibiotika gut behandeln lässt. Ausnahme hiervon sind β -Lactame, unter deren Behandlung es vereinzelt zu keinem adäquaten klinischen Ansprechen kam. Resistenz besteht ausnahmslos gegenüber Metronidazol.

2.2.7 Einschätzung der klinischen Relevanz anhand der aktuellen Studienlage

Eine PubMed-Recherche ergab unter dem Suchbegriff „*Staphylococcus saccharolyticus*“ insgesamt 34 bisher veröffentlichte Studien (Stand: 29.08.2024). Von den 34 Studien geht es in vier Studien um Infektionen/positive Proben bei Tieren, darunter zum Beispiel die Identifikation von *S. saccharolyticus* als zweithäufigste Ursache für eine Rinder-Mastitis [96], das Vorkommen bei Gorillas oder Hasen [57,66] oder der Fund von *S. saccharolyticus* in Kuhmilch, ohne dass die Relevanz dessen bezüglich möglicher Gesundheitsrisiken abschließend geklärt wäre [80]. Andere Studien beschäftigen sich eher mit allgemeinen Untersuchungen statt spezifisch mit *S. saccharolyticus*. Exemplarisch soll hier die Studie von Ahle et al. aus dem Jahr 2021 angeführt werden: Die Forschungsgruppe verglich drei verschiedene Amplikon – „Next Generation Sequencing“ (NGS) – Methoden miteinander, die auf drei unterschiedlichen Genen basieren. Im Rahmen der Untersuchung von insgesamt 254 Staphylokokken-Stämmen konnte gezeigt werden, dass alle drei Verfahren dafür geeignet sind, die Spezies sicher zu bestimmen. Ein Verfahren erwies sich jedoch als etwas besser, da es die zweifelfreie Unterscheidung zwischen verschiedenen Clustern von *S. epidermidis* zuließ und *S. saccharolyticus* eindeutig als eigene Spezies identifizierte [5]. Diese Studie ist selbstverständlich von Wichtigkeit, da sie dazu beisteuern könnte, *S. saccharolyticus* in Zukunft besser zu identifizieren. Allerdings trägt sie nicht im Konkreten dazu bei, die klinische Relevanz von *S. saccharolyticus* als potenziellen humanpathogenen Erreger besser abschätzen zu können. Unter diese Kategorie fallen noch ein paar weitere Studien, die eine andere Fragestellung begutachten und unter diesem Aspekt beispielsweise *S. saccharolyticus* als Probe für andere Untersuchungen verwandten [21,31,71] oder auch, wie Ahle et al., verschiedene Verfahren miteinander verglichen haben [10,86]. Damit bleiben 23 Studien übrig, die Hinweise auf die klinische Relevanz von *S. saccharolyticus* geben. Bei diesen Studien handelt es sich zum einen um spezifische Studien zu *S. saccharolyticus*, des Weiteren um sogenannte Case Reports (Fallberichte) und zum anderen um eher zufällige Funde von *S. saccharolyticus* im Rahmen diverser Infektionen. Zwei weitere Studien aus dem Jahr 2012 und 2014 wären in diesem Kontext zu nennen. In diesen geht es um die Kontaminierung von Thrombozyten (PLT)-konzentraten mit *S. saccharolyticus*

[88]. Da CoNS eine der häufigsten Kontaminationen für PLT-Konzentrate darstellen und auch *S. saccharolyticus* bereits als Kontamination in PLT-Konzentraten identifiziert wurde [105], wurde in der früheren Studie an vier Stämmen untersucht, ob *S. saccharolyticus* in der Lage ist, in PLT-Konzentraten unter den Bedingungen für die Lagerung (20-24°, unter Bewegung, fünf Tage) zu wachsen. Die Forscher fanden heraus, dass *S. saccharolyticus* unter diesen Bedingungen nicht wachsen kann, wiesen jedoch darauf hin, dass es zwar keine Berichte über Transfusionsreaktionen aufgrund von *S. saccharolyticus* gibt, man aber *S. saccharolyticus* als potenzielle Kontamination von PLT-Konzentraten nicht aus den Augen verlieren sollte [8]. Ein Jahr später veröffentlichte die Forschungsgruppe aus demselben Institut eine weitere Studie zu *S. saccharolyticus* in PLT-Konzentraten. In dieser ging es um die Befähigung zur Bildung eines Biofilms. Interessanterweise zeigte *S. saccharolyticus* unter den oben genannten Bedingungen die Fähigkeit, sich an Oberflächen anzuheften und im Zusammenschluss mit aktivierten Thrombozyten Zellaggregate zu bilden [56].

Neben diesen beiden Studien gibt es eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2022 von Afshar et al., die die Eigenschaften der Biofilmbildung von *S. saccharolyticus* erforschten [2]. Die Forschungsgruppe testete an sechs Stämmen, sowohl aus Klade 1 und 2, die bereits vorher aus Blutkulturen oder aus infiziertem implantierten Fremdkörpermaterial gewonnen wurden [97], die Befähigung zur Biofilmbildung und untersuchte die proinflammatorische Antwort auf *S. saccharolyticus*. Im *in vitro* Experiment waren alle sechs Stämme in der Lage einen Biofilm zu produzieren. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Kladen in der Dicke des Biofilms, allerdings war der Biofilm signifikant dicker nach Zugabe von Glukose (1%) und Natriumchlorid (1%), was zu bisher veröffentlichten Ergebnissen zu anderen *Staphylococcus*-Spezies passt [3,58]. Als Positivkontrolle wurde ein Stamm von *S. epidermidis* genutzt, welcher über das *polysaccharid intercellular adhesin* (PIA) verfügt und damit als starker Biofilmproduzent gilt. Interessant ist, dass *S. saccharolyticus* unter anaeroben Bedingungen in der Lage ist einen Biofilm zu bilden, der 1,5- bis 4-mal dicker war als der von *S. epidermidis*. Um die Mechanismen der Biofilmbildung zu untersuchen, wurde eine RNA-Sequenzierung des Stamms 13T0028 durchgeführt, einmal von in Biofilm eingebetteten Zellen und einmal mit planktonischen Zellen. Anschließend wurden sie hinsichtlich bekannter Biofilm-relevanter Gene untersucht. Es zeigte sich, dass *S. saccharolyticus* zwar über das *icaADBC* Gen verfügt, welches für die PIA-Produktion verantwortlich ist, allerdings werden die Gene nicht exprimiert und sind durch Frameshift-Mutationen inaktiviert. Daraus lässt sich schließen, dass die Biofilmbildung in *S. saccharolyticus* unabhängig von PIA ist. Dafür konnte die Forschungsgruppe jedoch andere Gene identifizieren, die wahrscheinlich an der Biofilmbildung beteiligt sind, beispielsweise Gene, die für in der Zellwand verankerte Proteine mit Domänen für Bindungen untereinander und mit Wirtszellen codieren. Weitere Gene, die die Biofilmbildung begünstigen könnten, waren in Zellen, die aus dem Biofilm isoliert wurden, hochreguliert. Neben der Biofilmbildung war

S. saccharolyticus zur Autoaggregation befähigt, was ebenfalls dazu beiträgt, der körpereigenen Immunabwehr zu entgehen. Im nächsten Schritt wurde von Afshar et al. der Frage nach der Immunantwort des Wirtes nachgegangen, um zu klären, wie das Immunsystem auf *S. saccharolyticus* reagiert mit Fokus auf die Reaktion der Makrophagen. Es zeigte sich ein starker Anstieg in der Produktion von IL-6, IL-8 und TNF-*alpha*, was dafürspricht, dass *S. saccharolyticus* eine pro-inflammatorische Wirkung auf den Wirt hat. Im Gegensatz zu *S. aureus* hatte *S. saccharolyticus* jedoch keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Zellen und besitzt damit keine oder eine deutlich geringere Zytotoxizität als *S. aureus*. Die beschriebenen Ergebnisse führen die Forschungsgruppe zu der Schlussfolgerung, dass *S. saccharolyticus* durch ein PIA-unabhängiges System zur Biofilmbildung befähigt ist sowie eine starke Immunantwort hervorruft, was die Annahme untermauert, dass *S. saccharolyticus* in der Lage ist fremdkörper-assoziierte Infektionen zu verursachen [2].

In Bezug auf den klinischen Kontext berichten die meisten Studien über durch *S. saccharolyticus* hervorgerufene Infektionen. Eine Studie fällt aus dieser Reihe und konnte *S. saccharolyticus* als beeinflussenden Organismus in der Entwicklung von Magenkarzinomen identifizieren. Im Rahmen von Vermittlungseffekten zwischen intratumoralen Mikroorganismen und Wirtszellen ist *S. saccharolyticus* in der Lage über die Regulierung der Genexpression des ZNF215-Gens die Proliferation und das Klonen von Magen­zellen zu beeinflussen [114]. Alle weiteren bisherigen Studien konnten *S. saccharolyticus* im Zusammenhang mit einer Infektion nachweisen, obwohl in manchen Fällen weiterhin nicht abschließend geklärt ist, ob *S. saccharolyticus* der Auslöser der Infektion ist, beziehungsweise welche Rolle *S. saccharolyticus* insgesamt in dem Verlauf spielt. So sind hierbei zum Beispiel die 37 Nachweise von *S. saccharolyticus* im Rahmen einer Studie an Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) zu nennen. Insgesamt 114 Sputumproben wurden hinsichtlich der Frage untersucht, ob obligat anaerobe Erreger eine Rolle in der Pathophysiologie von CF spielen und die Lungenfunktion beeinträchtigen. *S. saccharolyticus* wurde zwar als zweithäufigster Keim identifiziert, allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von obligat anaeroben Erregern und der Lungenfunktion hergestellt werden. Es konnte die Zahl der Erreger unter Antibiotika-Therapie gesenkt werden, die Lungenfunktion zeigte jedoch keine Verbesserung [111]. Wenn man alle bisherigen Berichte über gesicherte Infektionen im Zusammenhang mit *S. saccharolyticus* betrachtet, ergeben sich insgesamt 51 Fälle (Abbildung 6).

Einleitung

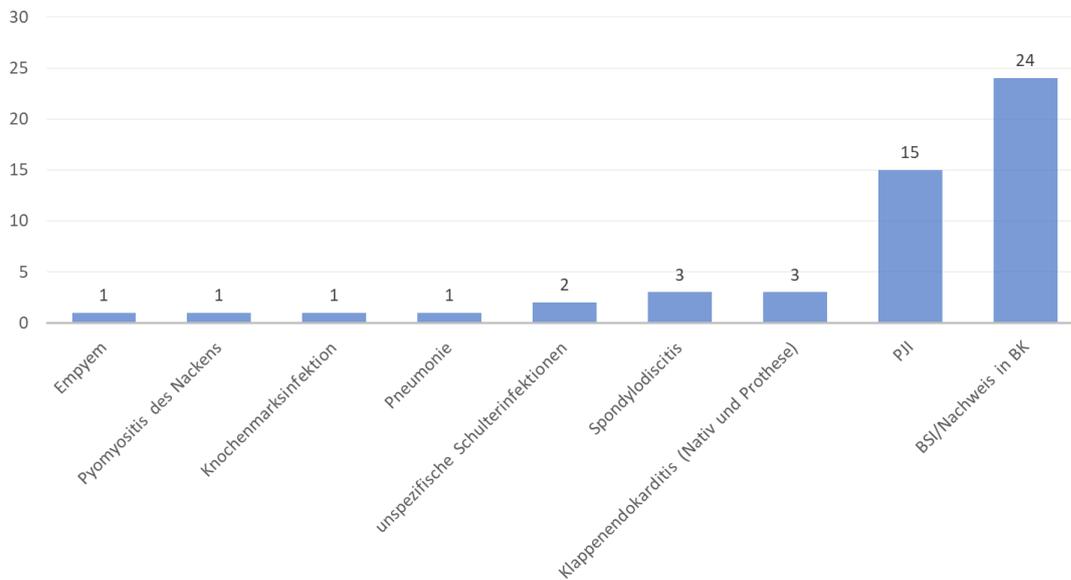


Abbildung 6 Alle jemals berichteten Fälle (Pubmed, Stand August 2024) im Zusammenhang mit *S. saccharolyticus*-Infektionen bei Menschen. PJI = prosthetic joint infection (Prothesengelenksinfektion); BSI = Blutstrominfektion; BK = Blutkultur

Es sind 15 Fälle von Prothesengelenksinfektionen beschrieben [20,97], drei Fälle von Spondylodiscitis, zwei davon nach ärztlicher Intervention bei Rückenschmerzen [44,69,103], zwei unspezifische Schulterinfektionen, einmal nach Operation [93] und einmal nach vorangegangenen Injektionen in die Schulter [94], und ein Fall einer Endokarditis bei Klappenprothese [55]. Damit sind 20 der insgesamt 51 (39,23%) beschriebenen Fälle mit Fremdkörpern assoziiert beziehungsweise stehen mit einer ärztlichen Intervention im Zusammenhang und können somit als Nosokomialinfektionen gewertet werden. *S. saccharolyticus* konnte bisher in 24 Blutkulturen (BK) als Auslöser einer Infektion nachgewiesen werden [20,98]. Ein Großteil davon stammt aus einem Ausbruch von *S. saccharolyticus*-Blutstrominfektionen (BSI) in einem deutschen Krankenhaus in Ingolstadt, bei dem die Ursache nicht abschließend geklärt werden konnte. In einem Zeitraum von sechs Monaten wurden 17 Patienten mit positiven Blutkulturen identifiziert. Es konnte kein Zusammenhang zwischen diesen Patienten hergestellt und somit die Theorie eines nosokomialen Ausbruchs nicht bestätigt werden. Ebenfalls ungeklärt blieb die Frage, ob es sich um tatsächliche BSI handelte, allerdings zeigten alle Patienten Infektionszeichen bei Abnahme der Blutkulturen [98]. Bisher gibt es keine vergleichbaren Berichte. Des Weiteren sind zwei, beziehungsweise drei Fälle mit einem tödlichen Verlauf geschildert worden. In zwei Fällen traf es jeweils junge Patienten, die beide kein Vorerkrankungen hatten. Bei dem ersten Fall handelte es sich um eine Knochenmarksinfektion, die bis dato einzig beschriebene. Trotz einer empirischen Therapie mit Penicillin, Vancomycin und Imipenem verschlechterte sich der Zustand der 26-jährigen Patientin kontinuierlich, sodass diese 2 Monate nach Beginn einer unspezifischen Infektsymptomatik verstarb [61]. Ebenfalls einmalig ist der

Einleitung

Fall einer *S. saccharolyticus*-Pneumonie. Auch hier war ein junger Patient (21 Jahre) betroffen, der sich mit Husten, blutigem Sputum und Dyspnoe vorstellte, jedoch ohne Fieber. Im CT und Röntgen-Thorax fand man typische Veränderungen einer *S. aureus*-Pneumonie, das Labor zeigte eine Leukozytose mit Linksverschiebung. Der Zustand verschlechterte sich ebenfalls rapide, trotz Antibiotikatherapie, bis der Patient nach ca. einem Monat verstarb [112]. Ebenfalls verstarb die Patientin der bereits oben erwähnten Klappenprothesenendokarditis, allerdings geht aus diesem Fall nicht klar hervor, ob die Todesursache womöglich eher in der neu implantierten Herzklappe mit darauffolgendem Herzversagen liegt, da alle postoperativen Blutkulturen negativ waren [55]. Im Gegensatz dazu sind auch mildere Fälle beschrieben: Es existieren zwei Fälle einer bakteriellen Infiltration der nativen Herzklappe, einmal jedoch ohne sämtliche Infektionszeichen und mit unklarer Relevanz [77], zum anderen im Fall einer Endokarditis, die jedoch auf die Antibiotikatherapie ansprach und einen guten Heilungsverlauf zeigte [108]. Hinzu kommen noch ein Bericht über ein von *S. saccharolyticus* verursachtes Empyem [106] und ein Bericht über eine Pyomyositis des Nackens [113]. Die Auswertung der einzelnen Fallberichte ist in Tabelle 2 zusammengefasst

Einleitung

Tabelle 2 Überblick über alle Fallberichte, die bei Pubmed zu finden sind (Stand August 2024); „/“: unbekannt, nicht beschrieben; ++: Heilung ohne Einschränkungen; +: Heilung mit Einschränkungen; †: verstorben

<u>Infektion</u>	<u>Studie</u>	<u>Infekt-symptomatik</u>	<u>Nosokomial/FBRI</u>	<u>Vorerkrankungen</u>	<u>Antibiotikatherapie erfolgt</u>	<u>Verlauf/Heilung</u>
Klappenendokarditis	Krishnan et al. [55]	ja	ja	/	/	†
	Westblom et al. [108]	ja	nein	nein	ja	++
Spondylodiscitis	Trojani et al. [103]	nein	ja	ja	ja	++
	Mikhael et al. [69]	ja	ja	/	ja	/
	Godreuil et al. [44]	ja	nein	nein	ja	++
unspezifische Schulterinfektion	Schneeberger et al. [94]	nein	ja	/	ja	+
	Schneeberger et al. [93]	nein	ja	/	ja	++
Empyem	Wang et al. [106]	ja	nein	ja	ja	++
Pyomyositis	Young et al. [113]	ja	nein	ja	ja	++
Knochenmarksinfektion	Liu et al. [61]	ja	nein	nein	ja	†
Pneumonie	Wu et al. [112]	ja	nein	/	ja	†
Gesamt	11 Fallberichte	8/11 Ja (72,6%)	5/11 Ja (45,5%)	3/6 Ja (50%)	10/10 (100%)	++/+ : 7/10 (70%) †: 3/10 (30%)

Basierend auf dieser Datenanalyse lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die klinische Relevanz von *S. saccharolyticus* schwierig einzuschätzen ist. Es existieren bisher nur wenige Fallberichte oder Studien und *S. saccharolyticus* ist nicht immer klar als auslösender Erreger identifizierbar. Oft finden sich nur unspezifische Infektionszeichen, die TTP ist meistens mit ungefähr fünf Tagen sehr lange und oft liegt nur eine positive Probe vor. Das führt dazu, dass die Unterscheidung zwischen Infektion oder Kontamination weiterhin erschwert wird. Nichtsdestotrotz gibt die Datenlage Hinweise auf ein mögliches humanpathogenes Potenzial. Insbesondere die beiden tödlich verlaufende Fälle geben Anlass zur Sorge, vor allem, da zwei sehr junge Patienten ohne Vorerkrankungen betroffen waren und die Antibiotikatherapien jeweils wirkungslos waren. Ansonsten scheint *S. saccharolyticus* eher ein opportunistischer Keim zu sein, der über die Haut als Eintrittspforte zu Infektionen führen kann. Ob vermehrt ältere

Patienten betroffen sind, lässt sich nur vermuten. Die meisten Fälle sind bisher bei älteren Patienten detektiert worden. Andererseits gab es zumindest zwei Berichte über junge Patienten. Da *S. saccharolyticus* ein Teil der normalen Hautflora ist die oben beschriebenen Wachstumsbedingungen schwierig sind, bleibt fraglich, ob es nicht womöglich viel mehr *S. saccharolyticus*-bedingte Infektionen gibt, die aber fälschlicherweise als Kontamination gewertet oder gar nicht erst identifiziert wurden. Die bisher wenigen Fallberichte könnten folglich auch dieser Ursache zugeschrieben werden. Daher sollte *S. saccharolyticus* trotz des seltenen Vorkommens nicht unterschätzt werden.

2.3 Ziel der Arbeit/Fragestellung

Inwieweit *S. saccharolyticus* klinisch relevant ist, soll in dieser Studie untersucht werden. Es wurde eine retrospektive Datenerhebung durchgeführt und hinsichtlich der Charakteristika einer durch *S. saccharolyticus* verursachten Infektion untersucht. Das Ziel dieser Studie besteht darin, einen Score zu etablieren, der zwischen Infektionen und Kontaminationen unterscheiden lässt, um somit gezielter therapieren zu können. Des Weiteren soll geklärt werden, wodurch sich Infektionen und Kontaminationen mit *S. saccharolyticus* unterscheiden, welche Faktoren eine Infektion begünstigen beziehungsweise das Risiko zu erkranken erhöhen und wie der Heilungsverlauf der Patienten war. Zusätzlich sollen durch eine Genomsequenzierung weitere Eigenschaften von *S. saccharolyticus* untersucht werden, beispielsweise das Vorliegen von Resistenzgenen und die Unterschiede zwischen den beiden Kladen. Ob es bei den beiden Kladen auch klinische Unterschiede gibt und Stämme einer Klade womöglich virulenter sind, soll ebenfalls analysiert werden. Es geht zusammenfassend darum, sowohl das aktuelle Wissen über Eigenschaften von *S. saccharolyticus* zu ergänzen als auch eine fundierte Einschätzung über die Relevanz von *S. saccharolyticus* im klinischen Alltag zu geben und die Bedeutung von positiven Befunden mit *S. saccharolyticus*, beziehungsweise das humanpathogene Potenzial besser einzuordnen.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Diese Studie wurde an der Universität des Saarlandes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Homburg, Deutschland, durchgeführt. Die Zustimmung der Ethikkommission wurde erteilt (Nr. 147/21).

Die interne mikrobiologische Datenbank („M-Lab“) wurde nach *S. saccharolyticus*-Isolaten durchsucht. Es konnten 93 Patienten identifiziert werden, die in dem Zeitraum von Juni 2009 bis Juli 2021 am Universitätsklinikum Homburg behandelt wurden und mindestens einen positiven Fund von *S. saccharolyticus* nachwiesen, unabhängig vom Probenmaterial. Anhand der elektronischen Krankenakten wurden retrospektiv klinische Daten erhoben. Für jeden einzelnen Patienten wurden folgende Variablen erhoben: Geschlecht, Alter, Art des Probenmaterials, Anzahl der positiven Proben, kein Wachstum anderer relevanter Keime, Gesamtmortalität, Vorerkrankungen, Länge des Krankenhausaufenthaltes, implantierte Fremdkörper, Time to positivity (TTP), Körpertemperatur bei Aufnahme, maximale Körpertemperatur während des gesamten Aufenthaltes, >38°C Körpertemperatur jeweils zwei Tage vor und nach Probenentnahme, erfolgte Antibiotikatherapie, klinische und laborchemische Symptomverbesserung nach Therapie, Infektion vereinbar mit Arztbrief, Aufenthalt auf der Intensivstation (ICU) und wenn ja, wie lange. Außerdem wurden die Parameter Herzfrequenz, Blutdruck, C-reaktives Protein (CRP), Leukozytenzahl und Procalcitonin zum Zeitpunkt der Probenentnahme erhoben (Übersicht der vollständigen Datenerhebung: siehe Anhang).

3.2 Einteilung in Infektion oder Kontamination

Um unterscheiden zu können, ob es sich bei den positiven Funden jeweils um eine durch *S. saccharolyticus* verursachte Infektion handelt oder ob der Nachweis von *S. saccharolyticus* eher auf eine Kontamination zurückzuführen ist, wurde ein Score entwickelt, anhand dessen die Einteilung erfolgte. Dieser Score besteht aus sechs Kriterien, welche, basierend auf bestehender Literatur, als besonders aussagekräftig und repräsentativ bewertet wurden [17,34,40,50,79]. Die sechs Kriterien lauten:

- mehrfacher Nachweis von *S. saccharolyticus* in verschiedenen Proben des gleichen Patienten
- kein Nachweis anderer relevanter Erreger
- Körpertemperatur von >38°C jeweils zwei Tage vor und nach Probenentnahme
- CRP > 80 mg/l
- klinischer Verdacht auf eine Infektion anhand des Arztbriefes
- klinische Verbesserung der Symptome nach Therapie.

Für jedes Kriterium wurde ein Punkt vergeben, sodass sich eine mögliche Punktzahl von 0 – 6 Punkten ergibt. Die Gesamtkohorte wurde anschließend mit Hilfe des Scores in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe A enthält alle Patienten, die zwischen 3 – 6 Punkte hatten und damit als „Infektion wahrscheinlich“ gewertet wurden. Patienten mit einer Punktzahl von 0 – 2 Punkten wurden als „Infektion unwahrscheinlich/Kontamination“ eingestuft und gehören damit zur Gruppe B.

3.3 Ergänzende Untersuchung von 22 Proben

Zusätzlich zu der retrospektiven Datenerhebung wurden einige Proben weitergehend untersucht, um einen Einblick in Bezug auf die Eigenschaften von *S. saccharolyticus* zu gewinnen, der über die klinische Präsentation hinaus geht. Dafür wurde im Bestand des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg, nach eingefrorenen Proben gesucht. Es wurden insgesamt 24 Isolate gefunden. Diese Isolate wurden anhand ihrer Verfügbarkeit ausgewählt. Zusätzlich wurden während der laufenden Untersuchungen zwei weitere Fälle von *S. saccharolyticus* identifiziert. Diese wurden ebenfalls miteingeschlossen, sodass insgesamt 26 Isolate verfügbar waren.

3.3.1 Anzucht und erneute Identifizierung

Die Isolate wurden jeweils mit dem 3-Ösen-Ausstrich auf Columbia-Agarplatten ausgestrichen. Columbia-Agar (BD Columbia Agar mit 5% Schafsblut) ist besonders gut für die Anzucht anspruchsvoller Erreger geeignet. Die beimpften Platten wurden unter anaeroben Bedingungen für 2 bis 5 Tage bei 35°C inkubiert. Für die Speziesidentifizierung wurden nach 48 Stunden Inkubationszeit von der jeweiligen Agarplatte immer zwei Kolonien entnommen und auf zwei Felder einer Trägerplatte gegeben, anschließend mit 1µl Ameisensäure anverdaut und mit 1µl Matrix fixiert. Nach einer Trockenzeit von 10 Minuten wurde die Trägerplatte in den Massenspektrometer (Microflex LT and Biotyper 3.1, Bruker Daltonics) eingelegt. Zur Identifizierung wurde die MALDI-TOF-Massenspektrometrie genutzt. MALDI-TOF besteht aus der Matrix-Assistierten Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) und der Flugzeitanalyse, der sogenannten *time of flight* (TOF). Das Prinzip beruht, sehr vereinfacht dargestellt, darauf, dass Moleküle durch einen Laserstrahl aus der Probe herausgelöst werden (Desorption), welche anschließend durch die Abgabe/Aufnahme von Protonen ionisiert werden. Der Massenspektrometer beschleunigt die Ionen und analysiert anschließend ihre entsprechenden Flugzeiten. Da die Flugzeit der Ionen von ihrer Masse und Ladungszahl abhängig ist, lässt sich ein Spezies-spezifisches Muster von organischen Molekülen erstellen. Dieses Muster wird mit einer Datenbank abgeglichen und daraufhin kann die Spezies identifiziert werden [30].

3.3.2 Antibiotikaresistenztestung

Es lagen für insgesamt elf Isolate Daten zur Antibiotikaresistenztestung vor. Für sechs Isolate waren in der internen Datenbank Ergebnisse vorheriger Antibiotikaresistenztestungen verfügbar. Für fünf Isolate wurde die Antibiotikaresistenztestung selbst durchgeführt. Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde der Epsilometer-Test (Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Italy) verwendet. Getestet wurde die Sensitivität der jeweiligen Stämme auf Penicillin, Piperacillin-Tazobactam, Vancomycin, Meropenem, Clindymacin und Metronidazol. Dies entspricht der Standardtestung für anaerobe grampositive Bakterien. Zur Vorbereitung wurden für jede der fünf Proben drei neue Columbia-Agarplatten bereitgelegt. Ebenfalls wurde für jede Probe ein Reagenzglas mit 2ml Kochsalzlösung (0,9%-ige Natriumchloridlösung) bereitgestellt. Anschließend wurden mit einem Tupfer einige Bakterienkolonien von der Agarplatte des ersten Isolats abgenommen und in die Kochsalzlösung eingerührt. Damit garantiert werden kann, dass die Anzahl der Bakterien in jeder Suspension dieselbe ist, wurde mithilfe eines Photometers die optische Dichte der Bakterien suspension bestimmt. Zu Beginn wurde der Photometer einmal geeicht, sodass der Wert 0,0 entsprach. Basierend auf dem McFarland-Standard wurden so lange mehr Bakterien in die Suspension eingebracht und immer wieder erneut die Absorption bei 625 nm gemessen, bis die Trübung der Suspension einen McFarland-Wert zwischen 0,5 und 0,63 ergab. Der McFarland-Wert von 0,5 entspricht ungefähr $1,5 \times 10^8$ Zellen/ml. Somit erhält man für jeden der fünf Stämme eine Suspension mit ähnlicher Bakterienanzahl, wodurch sich die Ergebnisse vergleichen lassen. Diese Suspension wurde auf die drei vorbereiteten Columbia-Agarplatten mit einem konfluenten Ausstrich aufgetragen. Auf die beimpften Platten wurden im Anschluss jeweils zwei E-Teste gegenläufig gelegt, sodass sich die sechs zu testenden Antibiotika auf die drei Agarplatten verteilen. Dieser Ablauf wurde für alle fünf Isolate identisch durchgeführt. Die insgesamt 15 Agarplatten wurden abschließend unter anaeroben Bedingungen bei 35°C inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden abgelesen. Die jeweilige minimale Hemmkonzentration wurde mit der Breakpoint Tabelle des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) aus dem Jahr 2021 (Version 11.0) [118] verglichen.

3.4 Whole-genome sequencing (WGS)

Zur genetischen Analyse wurden 22 Isolate an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Zentrum für Infektiologie, des Universitätsklinikums Heidelberg, Deutschland, zur Genomsequenzierung geschickt. Dafür wurde von den jeweiligen Agarplatten mit einem Tupfer möglichst viel Material entnommen und in ein eSwab™-Röhrchen (Copan Liquid Amies Elution Swab) eingebracht. Diese Röhrchen wurden richtlinienkonform verpackt und per Post verschickt.

In Heidelberg wurden die Proben auf Columbia-Agarplatten ausgestrichen und für 5 Tage inkubiert. Für die nachfolgende DNA-Isolation und die Library Preparation wurde es mir freundlicherweise ermöglicht, in Heidelberg dem Verfahren und Ablauf zuzuschauen, beziehungsweise die DNA-Extraktion unter Anleitung der dortigen Medizinisch-Technischen Laborassistentinnen (MTLA) selbst durchzuführen (siehe Anhang). Die DNA-Gewinnung wurde zu Beginn mit dem *DNeasy Blood and Tissue Kit (50)* (QIAGEN GmbH, Germany) nach dem Schema für *S. aureus*/MRSA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit einem NanoDrop Spektralphotometer auf ausreichend gute DNA-Qualität überprüft. Leider waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend. Ein weiterer Versuch der DNA-Isolation, dieses Mal mit dem Verfahren für „Mycobacteria Other Than Tuberculosis“ (MOTT), wurde durchgeführt. Die Idee dahinter war, dass auch Mykobakterien oft länger inkubiert werden müssen und mit diesem Verfahren trotzdem DNA gewonnen werden kann, während im Normalfall die DNA nicht älter als zwei Tage sein sollte für ausreichend gute Qualität. Leider ergab auch das MOTT-Verfahren keine besseren Ergebnisse. Daraufhin wurden die Proben in einem Brain-heart-infusion (BHI) – Medium angesetzt, einem Medium, was besonders geeignet ist für Mikroorganismen mit anspruchsvollen Wachstumsbedingungen, und erneut für 5 Tage inkubiert. Auf diese Weise sollten Verunreinigungen, die womöglich beim Verschicken entstanden waren, entfernt werden und frische DNA generiert werden. Damit konnte erfolgreich qualitativ ausreichende DNA gewonnen werden. Nach der DNA-Extraktion wurde im Anschluss die Library Preparation durchgeführt. Entsprechend des bereits von Nurjadi et al. beschriebenen Verfahrens wurde für jedes Isolatauf einer MiSeq-Illumina-Plattform (Short-Read-Sequenzierung, 2 × 300 bp) die Sequenzierung durchgeführt sowie abschließend die Post-Sequenzierung [76]. Zur Qualitätskontrolle der entstandenen Rohsequenzen wurde das fastp-Verfahren angewandt, bei dem es sich um einen ultraschnellen FASTQ-Präprozessor handelt [23]. Mithilfe des Assemblers SPAdes 3.15.5 (mit der Option `-careful and-only-assembler`) wurden die gewonnenen Nukleotidsequenzen zusammengefügt [14]. Durch das Zusammenfügen der sogenannten Contigs, welche aus überlappenden DNA-Sequenzen bestehen, lässt sich ein Genom-Entwurf erstellen. Aus diesen Genom-Entwürfen wurden Contigs mit einer Länge <500 bp und/oder einer Abdeckung <10× entfernt. Die endgültigen Assemblierungen wurden mit QUAST (v5.0.2) kontrolliert, einem Werkzeug für die Bewertung und den Vergleich von Genomassemblierungen [46]. Im nächsten Schritt erfolgte die Identifizierung von Resistenzgenen. Dazu wurde ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>) verwendet, ein Programm, welches ein Screening von Contigs durchführt und diese hinsichtlich der An-, beziehungsweise Abwesenheit von Resistenzgenen untersucht. Dementsprechend wurden die Genom-Entwürfe zur Identifizierung der antimikrobiellen Resistenz (NCBI, CARD, ARG-ANNOT, ResFinder, MEGARES-Datenbanken) und des Plasmid-Typs (PlasmidFinder-Datenbank) verarbeitet [22,41]. Mit dem Softwaretool Prokka v1.14.5 erfolgte anschließend die Annotation, bei welcher den DNA-Sequenzen

ihre jeweilige Funktion zugeordnet wird und beispielsweise die genaue Lage von proteincodierenden Bereichen oder Exons und Introns beschrieben wird [95]. Um das Pangenom, also alle in einer Art vorkommenden Gene, zu berechnen wurde das Programm Roary verwendet [82]. Nachfolgend wurde zur Artenidentifizierung jeder Genom-Entwurf mit einer Datenbank abgeglichen, die aus einem repräsentativen Genom jeder Art besteht, zu finden in der Microbial Genomes resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/microbes/>). Da in der Literatur bereits zwei Kladen beschrieben sind, wurden die Genom-Entwürfe nicht nur mit der Datenbank verglichen, es erfolgte ebenfalls der Vergleich mit den in der Literatur bereits veröffentlichten Ergebnissen [20,97]. Mit Hilfe von SKA, einem Toolkit zur Analyse und Identifizierung von Variationen zwischen Genomsequenzen, wurde jeder Genom-Entwurf an die repräsentative Genomreferenz aus der Microbial Genomes Resource (CP068029.1, Stamm 13T0028) angeglichen [47]. Abschließend wurde im Rahmen des Sequenzalignments der Algorithmus Gubbins 3.2.1 verwendet, um die phylogenetischen Beziehungen zu untersuchen sowie den hqSNPs-Abstand zu bestimmen [27].

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS® (Statistical Product and Service Solutions, IBM®, Release 28.0.1.0). Die beiden Gruppen A und B wurden miteinander verglichen. Für nominal skalierte Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test (χ^2 Test) oder der Exakte Test nach Fisher verwendet. Für ordinal skalierte Variablen wurde für nicht-normal verteilte Daten der Mann-Whitney-U-Test verwendet beziehungsweise der t-Test für normal verteilte Daten. Auf die gleiche Art wurden auch die 22 Isolate verglichen, die nach der Genomsequenzierung in die beiden Kladen A und B unterteilt werden konnten. Um mögliche Risikofaktoren zu identifizieren, die mit einer wahrscheinlichen Infektion einhergehen, wurde zusätzlich eine logistische Regressionsanalyse an der Gesamtkohorte durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Anzucht und Speziesidentifizierung

Insgesamt waren 26 eingefrorene Isolate verfügbar, zwei davon waren aktuelle Fälle. Auf den Agarplatten von zwei Isolaten wuchs auch nach mehrmaligen Versuchen nichts, sodass diese verworfen wurden. Daher wurden nur 24 Isolate für die weitere Analyse verwendet. Die 24 anderen Isolate konnten erfolgreich kultiviert werden. Unter anaeroben Bedingungen und einer Inkubationszeit von 2 - 6 Tagen bei 35°C ließ sich ein ausreichend gutes Wachstum auf Columbia-Agar feststellen. Nach 24 Stunden waren nur selten ausreichend isoliert stehende Kolonien gewachsen, nach 48 Stunden konnte man jedoch einzelne sehr kleine Kolonien identifizieren (Abbildung 7). Nach 4 - 6 Tagen Inkubationszeit ließen sich die besten Ergebnisse erzielen (Abbildung 8). *S. saccharolyticus* wächst in weißen bis teilweise hellgräulichen Kolonien. Der Bakterienrasen des ersten 3-Ösen-Ausstrichs präsentiert sich eher in grau. Die einzelnen Kolonien sind sehr klein und selten größer als 1mm. Es fällt kein besonderer Geruch auf. Längere Inkubationszeit resultiert nicht in mehr Wachstum, die Kolonien bleiben klein.



Abbildung 7 Wachstum von *S. saccharolyticus* nach 2 Tagen Inkubationszeit bei 35°C unter anaeroben Bedingungen



Abbildung 8 Wachstum von *S. saccharolyticus* nach 4 Tagen Inkubationszeit bei 35°C unter anaeroben Bedingungen

Alle 24 Isolate wurden nach 48 Stunden Inkubationszeit mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert, um die Spezies zu verifizieren. Zwei Isolate wurden im Zeitraum der laufenden Untersuchungen (Juni und August 2021) bei Patienten entdeckt und im Rahmen der Routineabläufe von Mitarbeitenden des Labors angezchtet und identifiziert. Da die Identifizierung somit aktuell war, wurden diese Isolate nicht erneut identifiziert und fehlen in der Übersicht in Tabelle 3, sodass von mir letztlich 22 Isolate untersucht wurden.

Ergebnisse

Zwei dieser 22 Isolate wurden als eine andere Spezies bestimmt, einmal wurde *S. epidermidis* und einmal *Actinotignum schaalii* identifiziert. Dieses Ergebnis wiederholte sich nach einem weiteren Versuch inklusiver erneuter Anzucht der eingefrorenen Probe. Diese Proben wurden daher ebenfalls verworfen. Da von jedem Isolat jeweils zwei Kolonien getrennt voneinander für die Analyse vorbereitet wurden und es daher zu jedem Isolat eine Doppelbestimmung gab, konnte in den anderen 20 Fällen *S. saccharolyticus* sicher identifiziert werden. Zu jedem Isolat gab es mindestens eine (+++) - Bewertung, was für eine äußerst wahrscheinliche Speziesidentifikation spricht. Die Bewertungszahlen lagen zwischen 2,00 und 2,33. Die Ergebnisse mit der jeweils besten Bewertungszahl pro Isolat sind in Tabelle 3 aufgelistet. Der Ausdruck der gesamten Ergebnisse ist im Anhang zu finden.

Tabelle 3 Übersichtstabelle der MALDI-TOF-Ergebnisse

<u>Isolat</u>	<u>Analyt-Name/ID</u> <u>(MALDI-TOF)</u> <u>(zum Abgleich mit Daten</u> <u>im Anhang)</u>	<u>Bewertungszahl</u> <u>(bester Wert)</u>	<u>Organismus (bester Treffer)</u>
1	1	2,19	<i>S. saccharolyticus</i>
2	2	2,04	<i>S. saccharolyticus</i>
3	3	2,12	<i>S. saccharolyticus</i>
4	4	2,16	<i>S. saccharolyticus</i>
5	5	2,33	<i>S. saccharolyticus</i>
6	7	2,29	<i>S. saccharolyticus</i>
7	10	2,28	<i>S. saccharolyticus</i>
8	11	2,21	<i>S. saccharolyticus</i>
9	12	2,20	<i>S. saccharolyticus</i>
10	13	2,43	<i>S. saccharolyticus</i>
11	14	2,25	<i>S. saccharolyticus</i>
33	56	2,10	<i>S. saccharolyticus</i>
40	55	2,19	<i>S. saccharolyticus</i>
49	53	2,00	<i>S. saccharolyticus</i>
57	52	2,05	<i>S. saccharolyticus</i>
59	51	2,20	<i>S. saccharolyticus</i>
62	50	2,12	<i>S. saccharolyticus</i>
68	49	2,34	<i>S. saccharolyticus</i>

Ergebnisse

73	48	2,25	<i>S. saccharolyticus</i>
74	46	2,29	<i>S. saccharolyticus</i>
-	8	2,05	<i>S. epidermidis</i>
-	9	2,13	<i>Actinotignum schaalii</i>

Zusätzlich zu den 20 erneut bestätigten Fälle kamen die zwei aktuellen Fälle hinzu, sodass letztendlich insgesamt 22 per MALDI-TOF-bestätigte *S. saccharolyticus*-Fälle zur weiteren Untersuchung vorlagen und sequenziert werden konnten (Abbildung 9).

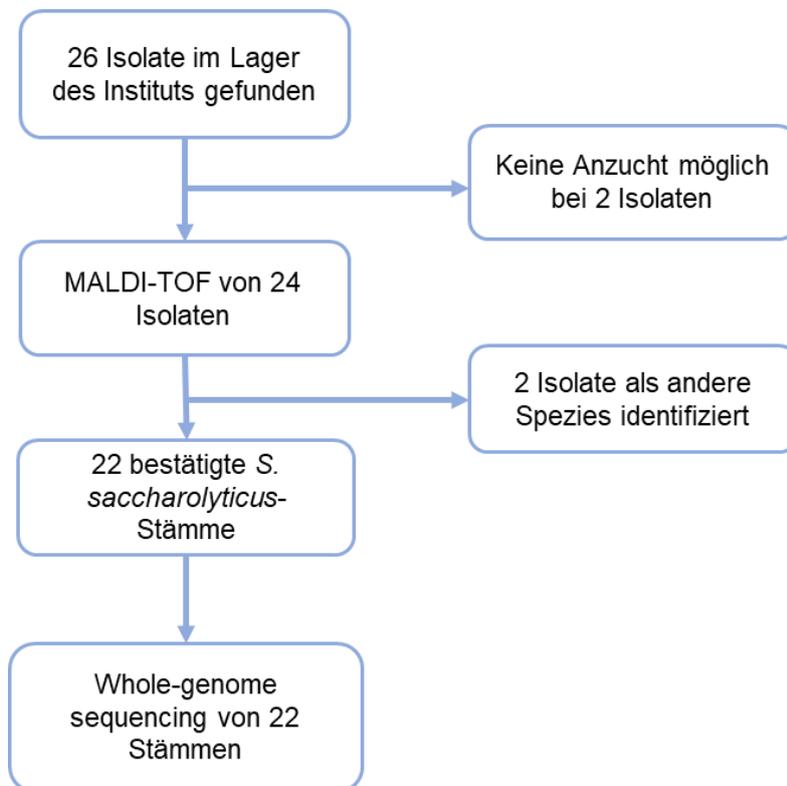


Abbildung 9 Übersicht über alle vorhandenen Proben, die als „*S. saccharolyticus*“ im Lager des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg, vorhanden sind, Speziesverifizierung und letztlich bestätigte Fälle

4.2 Antibiotikaresistenztestung

Die Ergebnisse der Antibiotikaresistenztestung der fünf Isolate sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Beispielhaft ist das Aussehen der Agarplatten für das Isolat 5 nach 24 Stunden Inkubation abgebildet (Abbildung 10).

Ergebnisse



Abbildung 10 Exemplarische Darstellung der Antibiotikaresistenztestungen an Isolat 5 nach 24 Stunden Inkubation

Jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Agarplatten neu ausgewertet und die minimale Hemmkonzentration abgelesen. Aufgrund des langsamen Wachstums von *S. saccharolyticus* war es teilweise nötig, mehrere Tage zu inkubieren und die Ergebnisse dann erst auszuwerten, statt nach den regelhaften 24 Stunden. Insbesondere ein Isolat (1) zeigte nur sehr schwaches Wachstum beziehungsweise teilweise gar kein Wachstum, sodass für Penicillin kein Wert abzulesen war. Alle 5 Isolate waren mit einer MHK von 0,002 mg/l beziehungsweise 0,012 mg/l (Isolat 5) sensibel auf Penicillin. Sensibilität gegenüber Piperacillin-Tazobactam besteht bei einem Breakpoint von 8 mg/l, was kein Isolat erreichte und somit alle Isolate auch für dieses Antibiotikum vollständige Sensibilität aufwiesen. Ebenso waren alle Isolate für Meropenem und Vancomycin sensibel (EUCAST-Breakpoint: jeweils bei 2 mg/l). Das gleiche Bild zeigte sich bei Clindamycin (EUCAST-Breakpoint: 4 mg/l). Jedoch waren ausnahmslos alle fünf Isolate resistent gegenüber Metronidazol.

Tabelle 4 Antibiotikaresistenztestung von 5 Isolaten. Zahlen entsprechen der abgelesenen minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach 24, 48 und 72 Stunden. P = Penicillin, PT = Piperacillin-Tazobactam, Mer = Meropenem, Va = Vancomycin, Cd = Clindamycin, Met = Metronidazol; Angaben in mg/l

Antibiotikum	Zeit	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5
P	24h	-	-	0,002	0,002	0,012
	48h	-	0,002	0,002	0,002	0,012
	72h	-	0,002	0,002	0,002	0,012
PT	24h	-	-	0,032	0,016	0,125
	48h	-	0,032	0,032	0,016	0,125
	72h	0,016	0,032	0,032	0,016	0,125
Mer	24h	-	0,012	0,012	0,006	0,023

Ergebnisse

	48h	0,004	0,012	0,012	0,006	0,032
	72h	0,004	0,016	0,012	0,006	0,032
Va	24h	-	0,75	0,75	1	0,75
	48h	1,5	0,75	0,75	1	1
	72h	1,5	0,75	0,75	1	1
Cd	24h	-	0,19	0,125	0,125	0,19
	48h	0,064	0,38	0,38	0,25	0,25
	72h	0,064	0,38	0,38	0,25	0,25
Met	24h	-	48-256	>256	>256	>256
	48h	>256	>256	>256	>256	>256
	72h	>256	>256	>256	>256	>256

4.3 Beschreibung der Gesamtkohorte und Vergleich der Gruppen A und B

Es wurden insgesamt 93 Patienten mit einem positiven Nachweis von *S. saccharolyticus* identifiziert. Anhand des Scores wurden 44 Patienten (47,3%) mit einer Punktzahl von 3 - 6 Punkten Gruppe A „Infektion wahrscheinlich“ zugeordnet. 0 – 2 Punkte erhielten insgesamt 49 Patienten (52,7%) und wurden daher in die Gruppe B „Infektion unwahrscheinlich“ eingeteilt. Von den 22 sequenzierten Isolaten gehören 12 zur Gruppe A, 10 zur Gruppe B (Abbildung 11).

Ergebnisse

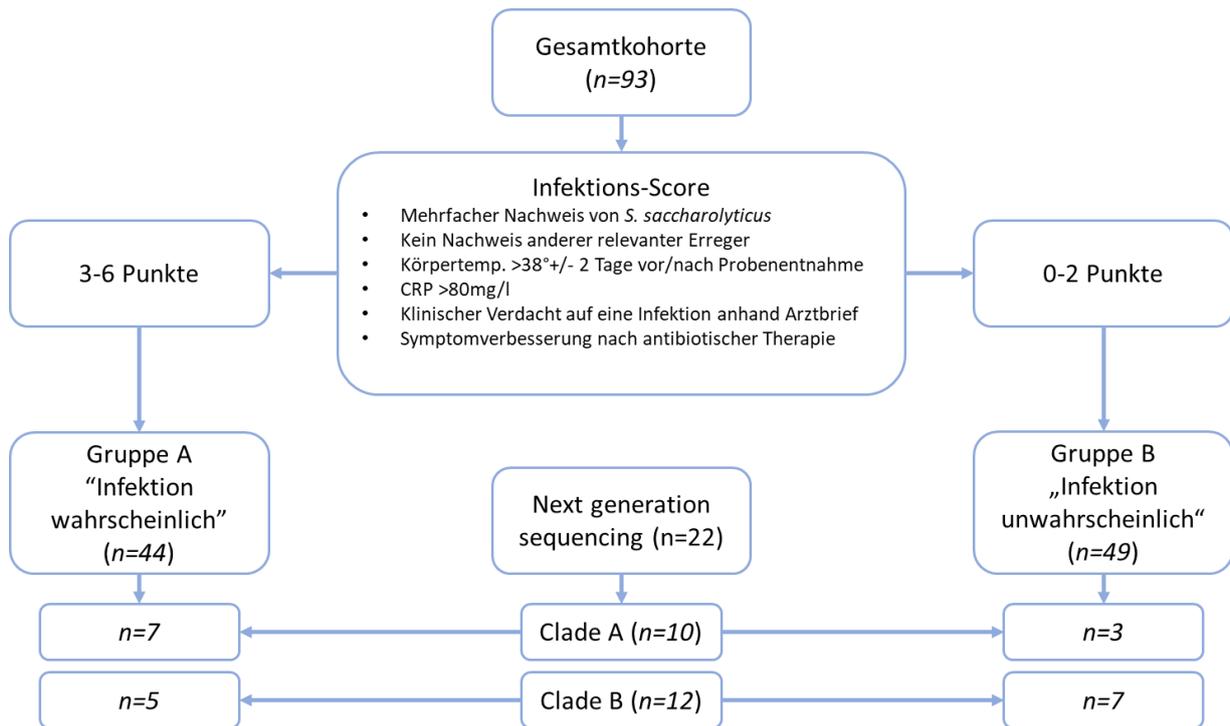


Abbildung 11 Übersicht über die Gesamtkohorte und Einteilung in die Gruppen A und B anhand des Infektions-Scores. Verteilung der sequenzierten Proben auf die beiden Gruppen (adaptiert nach Michels et al. Clinical relevance of *Staphylococcus saccharolyticus* detection in human samples: a retrospective cohort study (2024) [68].

Das mediane Alter aller Patienten betrug 56,2 Jahre und 80/93 (86%) aller Patienten waren männlich. Der größte Anteil aller gewonnenen Proben bestand aus Blutkulturen (57/93, 61,3%). Des Weiteren fand sich *S. saccharolyticus* in Wundabstrichen (23/93), Gewebeproben (6/93), Hautabstrichen (3/93), Punktionsaspirat (2/93) und in Urinproben (2/93). Während des gesamten betrachteten Zeitraumes verstarben insgesamt 5/91 (5,5%) Patienten, deren Tod in direktem Zusammenhang mit einer *S. saccharolyticus*-Infektion steht. 76/90 Patienten litten unter Vorerkrankungen (84,4%) und 42/86 hatten Fremdkörpermaterial implantiert (48,8%). Die mediane Dauer des Krankenhausaufenthaltes betrug 15 Tage und die TTP betrug 5, was einer Zeit von 96 – 120 Stunden entspricht. Bei Aufnahme in das Krankenhaus lag die mittlere Temperatur bei 36,6°C, die maximale Temperatur während des gesamten Aufenthaltes lag bei 38,5°C. Die mediane Herzfrequenz betrug 90 S/min, der Blutdruck lag bei 125/70 mmHg, das CRP betrug im Mittel 98,05 mg/l, Procalcitonin lag bei 0,9 ng/ml und die Leukozytenzahl bei 9,85 $10^9/l$. Ein Großteil der Patienten (72/82, 87,8%) erhielt eine Antibiotikatherapie, davon zeigten 68% (34/50) eine laborchemische Verbesserung nach der Therapie. Es mussten insgesamt 51/81 (63%) Patienten während ihres Krankenhausaufenthaltes auf die Intensivstation. Von diesen 51 Patienten lag die mittlere Verweildauer auf der Intensivstation bei sieben Tagen.

Ergebnisse

Der Vergleich der beiden Gruppen A und B brachte einige interessante Unterschiede hervor. Während das mittlere Alter (A: 57,7 Jahre; B: 55,7 Jahre) und die Verteilung von Männern zu Frauen vergleichbar war (A: 39/44 (88,6%) männlich; B: 41/49 (83,7%) männlich), gab es einen signifikanten Unterschied bei dem Anteil der Blutkulturen an allen gewonnenen Probenmaterialien. In Gruppe A stammten 37/44 (84,1%) der Isolate aus Blutkulturen, in Gruppe B betrug dieser Anteil mit 20/49 nur 40,8% ($p < 0,001$). Ebenfalls signifikant war der Unterschied bezüglich der Länge des Krankenhausaufenthaltes ($p < 0,001$): In Gruppe A verbrachten die Patienten im Mittel 29 Tage im Krankenhaus, in Gruppe B zehn Tage. Die Gesamtmortalität wies ebenfalls gruppenspezifische Unterschiede auf. Von den insgesamt fünf verstorbenen Patienten gehörten vier zu Gruppe A (4/44, 9,1%), aus Gruppe B verstarb eine Person (1/47, 2,1%). Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0,18$). Bei den Vorerkrankungen gab es keine Besonderheiten, in Gruppe A lag der Anteil bei 88,6% (39/44), in Gruppe B bei 80,4% (37/46). Ähnlich sieht die Verteilung bei den implantierten Fremdkörpern aus. Bei 23/44 (52,3%) Patienten aus Gruppe A lag ein implantierter Fremdkörper vor, in Gruppe B belief sich diese Zahl auf 19/42 (45,2%). Blutkulturen von Patienten aus Gruppe A benötigten im Mittel zwischen 96 und 120 Stunden, um positiv zu werden, in Gruppe B zwischen 72 und 96 Stunden. Die mediane Temperatur bei Aufnahme war sehr ähnlich in beiden Gruppen (A: 36,55°C, B: 36,6°C), aber im Gegensatz dazu war die maximale mittlere Temperatur in Gruppe A mit 39,1°C deutlich höher als in Gruppe B, in der die maximale Temperatur 37,5°C betrug ($p < 0,001$). Herzfrequenz und Blutdruck zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Herzfrequenz lag in Gruppe A bei 93 S/min, der Blutdruck bei 125/70 mmHg und in Gruppe B bei 90 S/min, der Blutdruck bei 130/71 mmHg. Wiederum voneinander abweichend waren jedoch die medianen CRP-Werte. Diese betrugen in Gruppe A 142,6 mg/l, in Gruppe B 62,5 mg/l und waren damit auf einem Niveau von $p = 0,0044$ signifikant. Außerdem waren noch drei weitere Variablen signifikant. In Gruppe A erhielten alle Patienten, mit Ausnahme von einem, eine Antibiotikatherapie (43/44, 97,7%), wohingegen in Gruppe B nur 29/38 (76,3%) Antibiotika erhielten ($p = 0,0047$). Mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,0024$ präsentieren sich die beiden Variablen „Aufenthalt auf der ICU“ und „Länge des Aufenthaltes auf der ICU“. Aus Gruppe A mussten 34/43 (79,1%) Patienten auf die Intensivstation und blieben dort im Mittel 13 Tage. Aus Gruppe B benötigten 17/38 (44,7%) Patienten eine Behandlung auf der Intensivstation und blieben dort kürzer, nämlich drei Tage. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die signifikanten Variablen in einer gesonderten Tabelle dargestellt (siehe Tabelle 5)

Ergebnisse

Tabelle 5 Darstellung der statistisch signifikanten Variablen des Vergleichs der beiden Gruppen A und B.

	Gesamtkohorte (n=93)	Gruppe A: Infektion wahrscheinlich (n=44)	Gruppe B: Infektion un- wahrscheinlich (n=49)	p-Wert
Blutkultur als Probe (n/N, %)	57/93 (61,3)	37/44 (84,1)	20/49 (40,8)	<0,001
Länge des Aufenthaltes (Tage) (Median, IQR)	15 (7 - 34)	29 (13 – 41)	10 (5 - 17)	<0,001
Max. Temperatur (°C) (Median, IQR)	38,5 (37,6 - 39,2)	39,1 (38,5 - 40)	37,5 (37,2 - 38)	<0,001
C-reaktives Protein (mg/l) (Median, IQR)	98,05 (35,4 - 193,9)	142,6 (65,4 - 230,2)	62,5 (8,1 - 154)	0,0044
Antibiotikatherapie (n/N, %)	72/82 (87,8)	43/44 (97,7)	29/38 (76,3)	0,0047
Aufenthalt auf der Intensivstation (n/N, %)	51/81 (63)	34/43 (79,1)	17/38 (44,7)	0,0024
Länge des Aufenthaltes auf Intensivstation (Tage) (Median, IQR)	7 (2 – 23)	13 (4 – 34)	3 (1 – 5)	0,0024

Die verbliebenen Variablen Leukozytenzahl (A: $11,45 \times 10^9/l$, B: $9,2 \times 10^9/l$), Procalcitonin (A: 0,95 ng/ml, B: 0,43 ng/ml) und laborchemische Verbesserung nach Therapie (A: 24/44 (63,2%), B: 10/12 (83,3%)) zeigten keine signifikanten Unterschiede: der p-Wert der Leukozyten betrug $p=0,07$, der von Procalcitonin lag bei $p=0,58$ und das Signifikanzniveau der laborchemischen Verbesserung nach Therapie lag bei $p=0,29$. Ein Überblick über alle beschriebenen Daten und die p-Werte des Gruppenvergleichs sind in Tabelle 6 dargestellt. Zur Übersicht sind des Weiteren die statistischen Ergebnisse der Variablen dargestellt, welche in den Score mit eingegangen sind.

Ergebnisse

Tabelle 6 Überblick der sechs Kriterien, die in den Score eingegangen sind. Überblick über alle erhobenen Variablen und ihre Verteilung in der Gesamtkohorte, Gruppe A und Gruppe B. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen den beiden Gruppen. * bezieht sich auf Todesfälle im gesamten betrachteten Zeitraum, die mit *S. saccharolyticus* in Verbindung gebracht wurden **TTP (time to positivity): 0 = nicht bestimmt worden, 1 = Probe positiv geworden in 0-24 Stunden; 2 = Probe positiv geworden in 24-48 Stunden; 3 = Probe positiv geworden in 48-72 Stunden; 4 = Probe positiv geworden in 72-96 Stunden; 5 = Probe positiv geworden in 96-120 Stunden; 6 = Probe positiv geworden in 120-144 Stunden; 7 = Probe positiv geworden in 144-168 Stunden; 8 = Probe positiv geworden in 168-192 Stunden

	Gesamtkohorte (n=93)	Gruppe A: Infektion wahrscheinlich (n=44)	Gruppe B: Infektion unwahrscheinlich (n=49)	p-Wert
<u>In den Score einfließende Kriterien</u>				
Mehrfacher Nachweis von <i>S. saccharolyticus</i> (n/N, %)	6/93 (6,5)	5/44 (11,4)	1/49 (2)	0,097
Kein Nachweis anderer relevanter Erreger (n/N, %)	60/90 (66,7)	33/44 (75,0)	27/46 (58,7)	1,121
Körpertemperatur >38°C +/- 2 Tage vor/nach Probenentnahme (n/N, %)	36/71 (50,7)	33/41 (80,5)	3/30 (10,0)	<0,001
CRP >80mg/L (n/N, %)	44/79 (55,7)	31/44 (70,5)	13/35 (37,1)	0,006
Verdacht auf Infektion anhand des Arztbriefes (n/N, %)	47/72 (65,3)	41/43 (95,3)	6/29 (20,7)	<0,001
Klinische Verbesserung nach Therapie (n/N, %)	33/46 (71,7)	28/39 (71,8)	5/7 (71,4)	1
<u>Alle erhobenen Daten</u>				
Männliches Geschlecht (n/N, %)	80/93 (86,0)	39/44 (88,6)	41/49 (83,7)	0,56
Alter (Jahre) (Median, IQR)	56,2 (44,5 - 66,8)	57,7 (45,7 - 69,4)	55,7 (42,7 - 64,2)	0,29
Gesamtmortalität * (n/N, %)	5/91 (5,5)	4/44 (9,1)	1/47 (2,1)	0,18
Vorerkrankungen (n/N, %)	76/90 (84,4)	39/44 (88,6)	37/46 (80,4)	0,39
Fremdkörpermaterial implantiert (n/N, %)	42/86 (48,8)	23/44 (52,3)	19/42 (45,2)	0,53
TTP ** (Median; IQR)	5 (3 - 6)	5 (4 - 6)	4 (3 - 6)	0,10
Temperatur bei Aufnahme (°C) (Median, IQR)	36,6 (36 - 37,2)	36,5 (35,7 - 37,5)	36,6 (36 - 37,2)	0,99
Herzfrequenz (S/min) (Median, IQR)	90 (80 - 100)	93 (80 - 104)	90 (80 - 96)	0,13

Ergebnisse

Blutdruck, systolisch (mmHg) (Median, IQR)	125 (110 - 140)	125 (110 - 139)	130 (110 - 145)	0,15
Blutdruck, diastolisch (mmHg) (Median, IQR)	70 (59 - 80)	70 (50 - 80)	71 (67 - 80)	0,15
Leukozytenzahl (10⁹/l) (Median, IQR)	9,85 (7,7 - 13,7)	11,45 (8,4 - 15,7)	9,2 (6,8 - 12)	0,07
Procalcitonin (ng/ml) (Median, IQR)	0,9 (0,3 - 3,4)	0,95 (0,4 - 1,6)	0,43 (0,1 - 3,56)	0,58
Laborchemische Verbesserung nach Therapie (n/N, %)	34/50 (68)	24/38 (63,2)	10/12 (83,3)	0,29

4.4 Ergebnisse der Regressionsanalyse

Es wurde eine univariate und eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der univariaten Regressionsanalyse sind in Tabelle 7 dargestellt. Es konnten 4 signifikante Variablen identifiziert werden: die Länge des Krankenhausaufenthaltes ($p=0,004$), die maximale Körpertemperatur während des Aufenthaltes ($p<0,001$), eine erfolgte Antibiotikatherapie ($p=0,017$) und Aufenthalt auf der Intensivstation ($p=0,002$). Anschließend wurde mit diesen signifikanten Variablen eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt, um mögliche Prädiktoren für eine Infektion mit *S. saccharolyticus* definieren zu können. Das Modell war statistisch signifikant ($\chi^2 (2) = 33.154$, $p < 0.001$) und besitzt mit einem Nagelkerke's R^2 von 0,527 eine gute Effektgröße. Die Variable „Maximale Körpertemperatur während des Krankenhausaufenthaltes“ hatte die stärkste Vorhersagekraft ($p<0,001$) mit einer angepassten Odds Ratio (OR) von 4,40 und einem Konfidenzintervall zwischen 2,07 und 9,23 (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7 Ergebnisse der univariaten Regressionsanalyse

	<u>Signifikanzniveau</u>	<u>Odds-Ratio ExpB</u>	<u>95% Konfidenzintervall</u>	
			unterer Wert	oberer Wert
Länge des Aufenthaltes (Tage)	0,004	1,042	1,013	1,071
Max. Temperatur (°C)	<0,001	4,845	2,272	10,332
Antibiotikatherapie	0,017	0,075	0,009	0,624

Ergebnisse

Aufenthalt auf der Intensivstation (Tage)	0,002	0,214	0,081	0,568
--	-------	-------	-------	-------

Tabelle 8 Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse mit den vier signifikanten Variablen der univariaten Analyse; Nagelkerke's R² 0,527; OR: Odds Ratio; KI: Konfidenzintervall; aOR: angepasste Odds ratio

	<u>OR</u>	<u>95% KI</u>	<u>p-Wert</u>	<u>aOR</u>	<u>95% KI</u>	<u>p-Wert</u>
Länge des Aufenthaltes (Tage)	1,04	1,01 – 1,07	0,004	-	-	-
Max. Temperatur (°C)	4,85	2,27 – 10,33	<0,001	4,40	2,07 – 9,23	<0,001
Antibiotikatherapie	0,075	0,009 – 0,624	0,017	0,02	0,0 – 1,79	0,088
Aufenthalt auf der Intensivstation (Tage)	0,214	0,08 – 0,57	0,002	-	-	-

4.5 Whole-genome sequencing

Die Genomsequenzierung wurde an 22 Proben durchgeführt, an 12 Proben aus der Gruppe „Infektion wahrscheinlich“ und an zehn Proben aus der Gruppe „Infektion unwahrscheinlich“. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten eine Einteilung in zwei Klade, Klade A (n=10) (in der Literatur als „Klade 1“ bezeichnet) und Klade B (n=12) (in der Literatur als „Klade 2“ bezeichnet), sowie einen Ausreißer, dessen SNP-Abstand zu hoch war, um ihn eindeutig Klade B zurechnen zu können. Ergänzt wurden die Ergebnisse dieser 22 Stämme durch öffentlich zugängliche Daten aus der Literatur zu bisher sequenzierten *S. saccharolyticus*-Stämmen (siehe Abbildung 12).

Ergebnisse

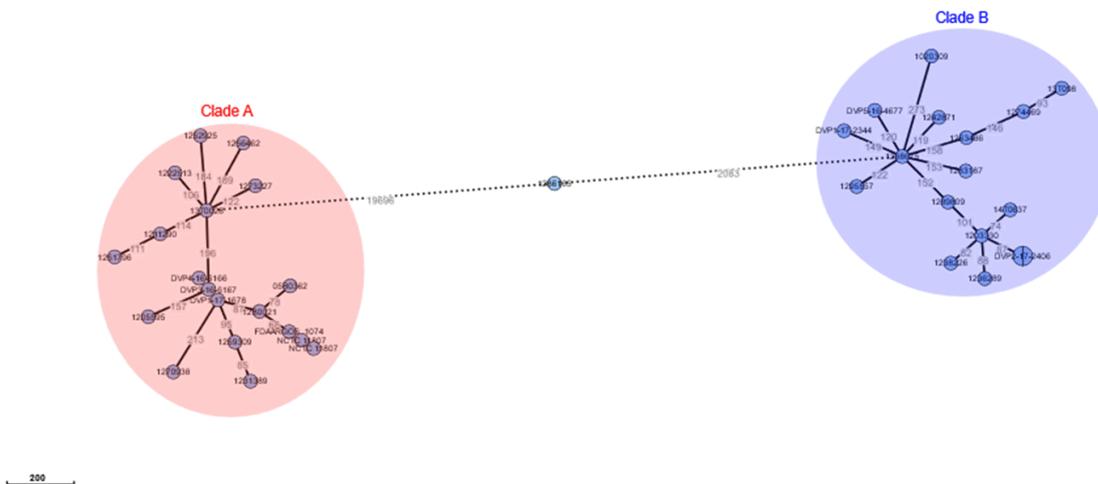


Abbildung 12 Minimum spanning tree – Darstellung der Phylogenie der *S. saccharolyticus*-Population auf der Grundlage eines Kerngenomvergleichs. Es wurden verfügbare *S. saccharolyticus*-Genome verglichen, darunter öffentlich verfügbare sequenzierte Genome und Stämme aus dieser Studie (22 Stämme). (Quelle: Michels et al. *Clinical relevance of Staphylococcus saccharolyticus* detection in human samples: a retrospective cohort study (2024) [68]. Freundlicherweise bereitgestellt von Dennis Nurjadi, Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck)

Die Kerngenome der gesamten Population lassen sich mit einer Identität von 95% gruppieren, dementsprechend mit einer Prävalenz von 100%. Sie umfassen 1765 Gene und 2361246 Basenpaare. Für die Analyse der 100%igen Identität wurden Schwellenwerte von 100% Identität und 100% Abdeckung verwendet. 679 Gene waren nur in Klade A vorhanden. Die Isolate aus Klade A trugen alle das Delta-Hämolysin-Gen *hld*. Nur 48 Gene waren spezifisch für Klade B. In Klade A fehlten 581 Gene, die wiederum in Klade B und C vorhanden waren. Bei einer verwendeten Schwelle von 100% ist das Kerngenom insgesamt jedoch eher klein. Lediglich 62 der vorhergesagten Proteine hatten Klade A und B gemeinsam. Insgesamt weist Klade A (durchschnittlich 2606,1 Offene Leserahmen (OLR)) im Vergleich zu Klade B (durchschnittlich 2651,4 OLR) einen höheren Gehalt an proteinkodierenden Genen auf sowie ein stärker konserviertes Kernproteom (2115 OLR im Kernproteom in Klade A versus 1809 OLR im Kernproteom in Klade B), was auf eine höhere Stabilität und wahrscheinlich einen geringeren Genomzerfall hinweist (Abbildung 13) [68].

Ergebnisse

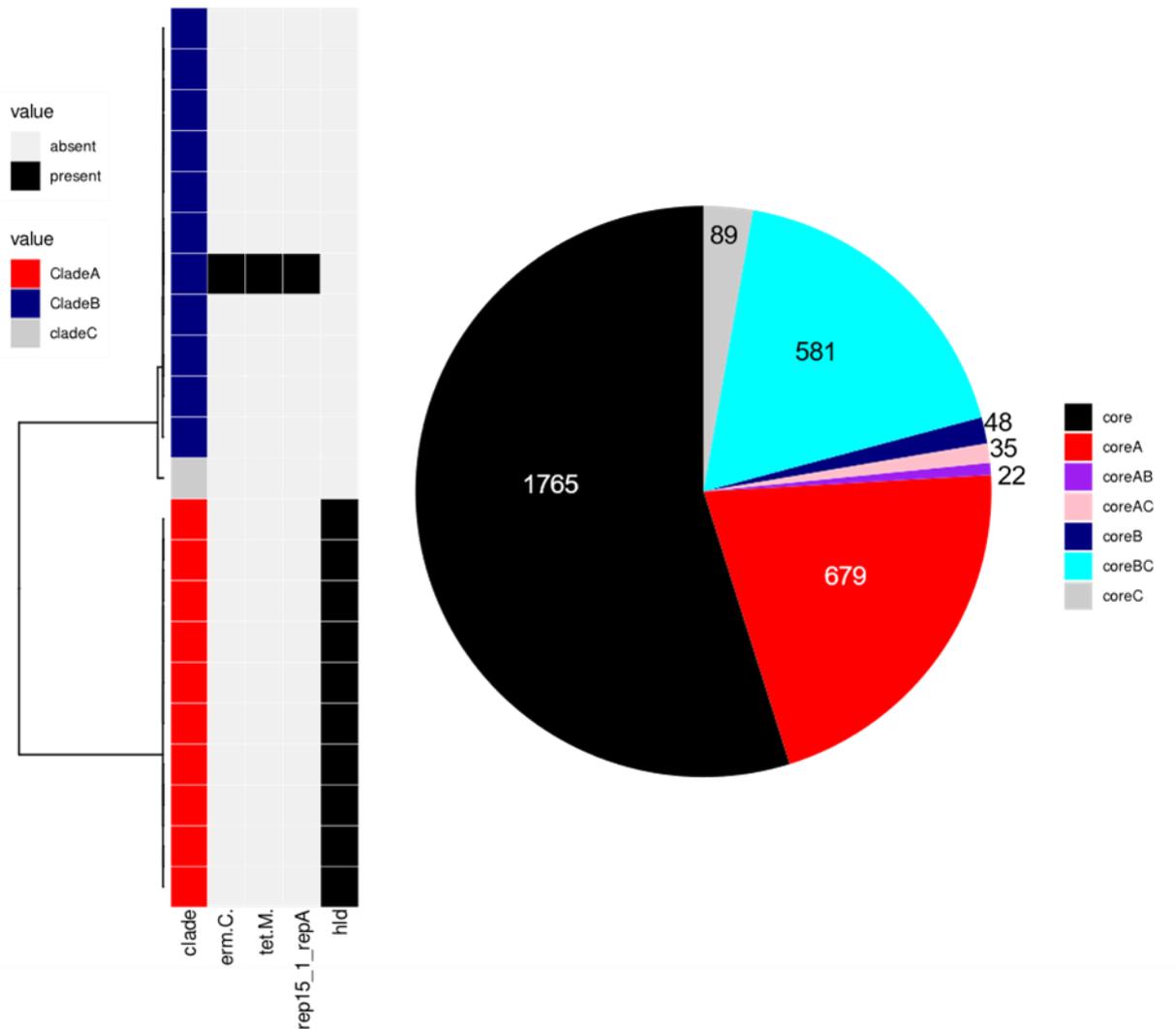


Abbildung 13 Verteilung des Kerngenoms zwischen den Kladen A und B. Die Isolate sind auf der Grundlage eines mit Gubbins erstellten phylogenetischen Baums angeordnet. Die antimikrobiellen Resistenzgene wurden mit Abricate, der Plasmid-Inc-Typ mit Plasmidfinder und das Virulenzgen mit der VFDB-Datenbank bestimmt. Die Kern-/Zusatzgenome wurden mit Roary ausgewertet. (Quelle: Michels et al. Clinical relevance of *Staphylococcus saccharolyticus* detection in human samples: a retrospective cohort study (2024) [68]. Freundlicherweise bereitgestellt von Dennis Nurjadi, Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck)

4.6 Vergleich Klade A und B

Von den Klade A zugehörigen Stämmen lassen sich sieben Stämme zu Patienten der Gruppe A einteilen. Das bedeutet, dass 7/10 Patienten (70%) aus Klade A wahrscheinlich eine Infektion mit *S. saccharolyticus* hatten. Die anderen drei Stämme der Klade A ließen sich der Gruppe B „Infektion unwahrscheinlich“ zuordnen. Die 12 Stämme, die Klade B zugehörig sind, teilen sich wie folgt auf die beiden Gruppen A und B auf: 5/12 Stämme (41,7%) von Klade B gehören zur Gruppe „Infektion wahrscheinlich“, 7/12 der anderen Stämme aus Klade B sind der Gruppe „Infektion unwahrscheinlich“ zuzuordnen (siehe Abbildung 11). Die beiden Kladen wurden, wie bereits die beiden Gruppen des Infektions-Scores, miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs finden sich in Tabelle 9.

Ergebnisse

Tabelle 9 Vergleich der beiden Klade A und B miteinander. *: bezieht sich auf Todesfälle im gesamten betrachteten Zeitraum, die mit *S. saccharolyticus* in Verbindung gebracht wurden. **TTP (time to positivity): 0 = nicht bestimmt worden, 1 = Probe positiv geworden in 0-24 Stunden; 2 = Probe positiv geworden in 24-48 Stunden; 3 = Probe positiv geworden in 48-72 Stunden; 4 = Probe positiv geworden in 72-96 Stunden; 5 = Probe positiv geworden in 96-120 Stunden; 6 = Probe positiv geworden in 120-144 Stunden; 7 = Probe positiv geworden in 144-168 Stunden; 8 = Probe positiv geworden in 168-192 Stunden

	<u>Klade A (n=10)</u>	<u>Klade B (n=12)</u>	<u>p-Wert</u>
Männliches Geschlecht (n/N, %)	8/10 (80)	11/12 (91,7)	0,57
Alter (Jahre) (Median, IQR)	61,6 (54,4 - 71,5)	54,5 (46,6 - 70,7)	0,47
Blutkultur als Probe (n/N, %)	10/10 (100)	12/12 (100)	1,00
Gesamtmortalität * (n/N, %)	1/10 (10)	2/12 (16,7)	0,57
Vorerkrankungen (n/N, %)	10/10 (100)	12/12 (100)	1,00
Länge des Aufenthaltes (Tage) (Median, IQR)	28 (12 - 50)	15,5 (7 - 29)	0,083
Fremdkörpermaterial implantiert (n/N, %)	3/10 (30)	9/12 (75)	0,046
TTP ** (Median; IQR)	4,5 (4 - 6)	3 (3 - 4)	0,016
Temperatur bei Aufnahme (°C) (Median, IQR)	36,7 (35,7 - 36,9)	36,7 (36,5 - 38,5)	0,59
Max. Temperatur (°C) (Median, IQR)	38,6 (37,9 - 40,1)	38,5 (37,5 - 39,4)	0,59
Herzfrequenz (S/min) (Median, IQR)	90,5 (72 - 130)	87 (81 - 93)	0,37
Blutdruck, systolisch (mmHg) (Median, IQR)	124,5 (110 - 140)	116 (98 - 125)	0,19
Blutdruck, diastolisch (mmHg) (Median, IQR)	70,5 (50 - 81)	62,5 (56 - 79)	0,89
C-reaktives Protein (mg/l) (Median, IQR)	113,15 (31,7 - 253,6)	96,7 (13,8 - 171,8)	0,61
Leukozytenzahl (10⁹/l) (Median, IQR)	10 (7,7 - 13)	9,7 (4,6 - 20)	0,42
Procalcitonin (ng/ml) (Median, IQR)	0,9 (-)	1,15 (-)	0,58
Antibiotikatherapie (n/N, %)	8/10 (80)	8/10 (80)	1,00
Laborchemische Verbesserung nach Therapie (n/N, %)	2/6 (33,3)	3/5 (60)	0,57
Aufenthalt auf der Intensivstation (n/N, %)	5/10 (50)	6/9 (66,7)	0,65
Länge des Aufenthaltes auf der Intensivstation (Tage) (Median, IQR)	21 (11,5 - 36,5)	3,5 (1 - 18)	0,14
Infektion wahrscheinlich (n/N, %)	7/10 (70)	5/12 (41,7)	0,23

Auch in diesem Fall beziehen sich die p-Werte auf den Vergleich der beiden Klade. Es konnten zwei statistisch signifikante Variablen identifiziert werden. Patienten aus Klade A hatten in 3/10 Fällen (30%) Fremdkörpermaterial implantiert, Patienten aus Klade B in 9/12 Fällen

Ergebnisse

(75%), was einen p-Wert von $p=0,046$ ergab. Ebenfalls signifikant war die TTP, die bei Klade A im Mittel bei 4,5 lag, während die TTP von Patienten mit Stämmen der Klade B im Mittel bei 3 lag, was einer Zeit von 48 - 72 Stunden entspricht und damit kürzer ist als die TTP der Klade A ($p=0,016$). In beiden Kladen war der Anteil der männlichen Patienten ähnlich (A: 8/10, B: 11/12) und das mittlere Alter lag in A bei 61,6, in B bei 54,5 Jahren. Von den 22 sequenzierten Proben waren drei Proben Patienten zuzuordnen, die im Zusammenhang mit *S. saccharolyticus* verstarben. Die Gesamtmortalität lag in Klade A bei 1/10 (10%), in Klade B bei 2/12 (16,7%). Alle 22 Patienten litten unter Vorerkrankungen, ebenso handelte es sich bei allen 22 sequenzierten Proben um Blutkulturen. Die mittlere Länge des Krankenhausaufenthaltes betrug bei Klade A 28 Tage, bei B 15,5 Tage. Die Temperatur bei Aufnahme war in beiden Kladen mit 36,7°C identisch und auch die maximale Temperatur während des Aufenthaltes unterschied sich mit nur 0,1°C Differenz kaum voneinander (A: 38,6°C, B: 38,5°C). Herzfrequenz und Blutdruck waren bei Patienten der Klade A mit 90,5 S/min und 124,5/70,5 mmHg etwas höher im Vergleich zu Klade B (87 S/min, 116/62,5 mmHg). Ebenfalls höher war in Klade A das mittlere CRP mit 113,5 mg/l (B: 96,7mg/l) und, wenn auch nur geringfügig, die Anzahl der Leukozyten mit $10 \times 10^9/l$ (B: $9,7 \times 10^9/l$). Wiederum etwas höher als in Klade A war in Klade B das Procalcitonin (A: 0,9 ng/ml, B: 1,15 ng/ml). Jeweils 8/10 Patienten aus beiden Kladen erhielten eine Antibiotikatherapie. Aus Klade A zeigten 2 Patienten danach eine laborchemische Verbesserung (2/6, 33,3%), aus Klade B verbesserten sich 3 Patienten (3/5, 60%). Insgesamt 5/10 (Klade A) beziehungsweise 6/9 (Klade B) der Patienten mussten auf die Intensivstation verlegt werden. Die Patienten aus Klade A blieben im Mittel für 21 Tage, die Patienten aus Klade B nur für 3,5 Tage.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der wesentlichen Erkenntnisse

Die Untersuchungen an *S. saccharolyticus* ergaben ein gutes Wachstum unter anaeroben Bedingungen bei 35°C. Die Inkubationszeit war mit durchschnittlich fünf Tagen verhältnismäßig lange. Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie MS konnte die Speziesidentifizierung zuverlässig durchgeführt werden. Die Antibiotikaresistenztestungen ergaben für alle Isolate Sensibilität für Penicillin, Piperacillin-Tazobactam, Vancomycin, Meropenem und Clindamycin. Gegenüber Metronidazol bestand vollständige Resistenz.

Die statistische Auswertung der retrospektiv erhobenen Daten von 93 Patienten ergab ein mittleres Alter von 56,2 Jahren, was auch in den beiden Vergleichsgruppen ähnlich war. In beiden Gruppen gab es einen deutlich größeren Anteil an männlichen Patienten. In der Gruppe A „Infektion wahrscheinlich“ war der Anteil der Blutkulturen als Probenmaterial deutlich höher als in Gruppe B. Ebenso waren die Patienten aus Gruppe A länger im Krankenhaus, ein größerer Anteil verstarb, die Körpertemperatur war höher, ebenso das CRP. Patienten aus Gruppe A erhielten fast immer eine Antibiotikatherapie und waren öfter und länger auf der Intensivstation als Patienten aus Gruppe B. Diese Befunde sprechen dafür, dass Infektionen mit *S. saccharolyticus* eine klinische Relevanz besitzen, da sie zu schwereren Verläufen führen.

Interessanterweise war die TTP, ein oftmals verwendeter Marker zur Differenzierung zwischen Infektion und Kontamination, in beiden Gruppen ähnlich lang, in Gruppe A etwas länger. Die Verteilung von Vorerkrankungen und implantiertem Fremdkörpermaterial war für beide Gruppen ähnlich. Auch andere Infektionsmarker, wie die Leukozytenzahl, das Procalcitonin oder Herzfrequenz und Blutdruck waren für beide Gruppen ähnlich verteilt.

Die Regressionsanalyse ergab als Variable mit dem stärksten prädiktiven Wert „Maximale Temperatur während des gesamten Aufenthalts“. Diese Variable ist kritisch zu werten, da sie immer erst retrospektiv nach Aufenthalt des Patienten erhoben werden und deswegen als Vorhersagewert nicht in Frage kommen kann.

Im Vergleich der beiden Kladen fiel auf, dass Variablen, wie das Alter oder das Geschlecht, ähnlich verteilt waren, vergleichbar mit der Verteilung in den beiden Gruppen A und B. Ausnahmslos alle sequenzierten Proben stammten aus Blutkulturen und alle Patienten hatten Vorerkrankungen. Insgesamt drei Patienten verstarben. Patienten, bei denen ein *S. saccharolyticus*-Stamm aus Klade A nachgewiesen wurde, hatten einen längeren Aufenthalt im Krankenhaus, etwas höhere Herzfrequenz und Blutdruck und höhere CRP-Werte. Diese Faktoren sprechen für eine höhere Virulenz von Klade A, ebenso wie die Tatsache, dass die

Wahrscheinlichkeit einer Infektion bei Klade A mit 70% höher lag als bei Klade B (41.7%). Im Gegensatz dazu war jedoch bei Patienten, bei denen ein *S. saccharolyticus*-Stamm aus Klade B nachgewiesen wurde, die TTP kürzer (Probe im Mittel bereits nach 48-72 Stunden positiv, $p=0.016$), deutlich häufiger Fremdmaterial implantiert und die Patienten lagen etwas häufiger auf der Intensivstation. Insbesondere die kürzere TTP spricht eher für eine höhere Virulenz von Klade B. Der Anteil von implantiertem Fremdkörpermaterial deutet darauf hin, dass womöglich Klade B besser an Fremdmaterial haften kann und zur Biofilmbildung, einem weiteren Virulenzfaktor, befähigt ist. Diese Annahme sollte allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da in aktuellen Studien keine Unterschiede bei der Biofilmbildung zwischen den beiden Kladen festgestellt werden konnten und die Kladen gleichermaßen zur Biofilmbildung befähigt sind. Andererseits war wiederum die durchschnittliche Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation bei Klade A länger. Bei der Temperatur bei Aufnahme, der maximalen Temperatur, Leukozytenzahl, Procalcitonin und erfolgter Antibiotikatherapie gab es keine großen Unterschiede. Patienten der Klade-B-Gruppe sprachen etwas besser auf die Antibiotikatherapie an.

5.2 Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur

Die Ergebnisse dieser Studie bezüglich der Anzucht von *S. saccharolyticus* decken sich weitestgehend mit denen aus der Literatur. Die überall beschriebene lange Inkubationszeit zwischen 48 bis 96 Stunden bis hin zu sieben Tagen ließ sich in dieser Studie bestätigen. Die Temperatur der Inkubation war mit 35°C um 1 – 2 °C niedriger als die in der Literatur beschriebenen Inkubationstemperaturen. Es wurde unter 35°C jedoch ausreichend zufriedenstellendes Wachstum verzeichnet. Die Anzucht erfolgte, wie in der Literatur beschrieben, auf Agarplatten für anspruchsvolle Organismen und unter anaeroben Bedingungen.

Es ließ sich ebenfalls der aktuelle Wissensstand bezüglich der Resistenzlage von *S. saccharolyticus* bestätigen. Die in der Literatur beschriebene Resistenz gegenüber Metronidazol konnte an allen fünf untersuchten Isolaten demonstriert werden. Die teilweise beschriebene Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika [55] beziehungsweise gegenüber Penicillin [113] konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die Auswertung der Fallberichte hinsichtlich des Heilungsverlaufs und des Ansprechens der Patienten auf die jeweilige Antibiotikatherapie ergab in 7/10 Fallberichten (70%) ein gutes Ansprechen und in fünf dieser Fälle auch eine vollkommene Heilung. Allerdings verstarben auch 3/10 Patienten trotz Antibiotikatherapie (30%). Die Ergebnisse unserer Studie zeigten in der Gruppe A, in denen die Patienten laut Score wahrscheinlich eine Infektion hatten, eine Mortalität von 9,1%. Dieser Anteil ist deutlich niedriger als der Anteil bei den Fallberichten. Würde man allerdings in den Vergleich weitere beschriebene Fälle aus der Literatur miteinbeziehen, zum Beispiel die 17 Blutstrominfektionen [98] oder 7 Prothesengelenksinfektionen [97], ändert sich die Verteilung. Bei den sieben Prothesengelenksinfektionen verstarb beispielsweise kein Patient, von den 17 Patienten des Ausbruchs verstarben zwei.

Diskussion

Dementsprechend wäre nicht von zehn Fällen, sondern von 34 auszugehen, von denen fünf Patienten verstarben. Das entspräche einer Mortalität von 14,6%, die sich eher den Ergebnissen dieser Studie annähert. Die Zahl könnte unter Einbeziehung weiterer beschriebener Fälle von *S. saccharolyticus* noch genauer werden, allerdings fehlen leider oftmals Daten über den Verlauf der Patienten, sodass sich die Auswertung schwierig gestaltet.

Die Verbesserung der klinischen Symptome wird in vielen Studien ebenfalls beschrieben, war in dieser Studie jedoch Teil des Scores, um die Patienten den jeweiligen Gruppen zuzuweisen. Zusätzlich wurden hier auch die Daten über die Verbesserung der Laborwerte erhoben, wovon beispielsweise ein kontinuierlich sinkendes CRP gezählt wurde. Eine laborchemische Verbesserung war bei Gruppe A in 63,2% (24/38) der Fälle zu beobachten, in Gruppe B bei 83,3% (10/12), bei der Gesamtkohorte lag der Anteil der laborchemischen Verbesserung bei 68% (34/50). Diese Ergebnisse sind kaum zu vergleichen mit Werten aus der Literatur, da nur selten über Laborwerte berichtet wurde. Auch die hier präsentierten Ergebnisse sind nur mit Vorsicht zu interpretieren. Aufgrund fehlender Daten kommt es zu Verzerrungen, die zwar Gruppe A einen niedrigeren Prozentsatz an Verbesserungen bescheinigen, die reine Anzahl an Patienten, die eine Verbesserung zeigten, ist jedoch in Gruppe A größer. Zuverlässiger auswertbar ist hingegen das Alter der Patienten, welches lückenlos erhoben werden konnte und bei 57,7 Jahren (Gruppe A) lag. Wenn man alle in der Literatur verfügbaren Altersangaben (9 Fallberichte plus 7 PJI) analysiert, ergibt sich für diese insgesamt 16 Patienten ein medianes Alter von 57,5 Jahren, der jüngste Patient war 21 Jahre, der älteste 76 Jahre alt. Diese Daten sind ähnlich zu den hier erhobenen und deuten darauf hin, dass hohes Alter keinen besonders großen Einflussfaktor auf Infektion mit *S. saccharolyticus* hat. Allgemein gilt, dass vor allem ältere Patienten (>70 Jahre) besonders anfällig sind für Infektionen mit opportunistischen Erregern. Im Falle von *S. saccharolyticus* scheint dies aber anders zu sein. Vor allem zwei der beschriebenen Fälle mit letalem Verlauf traten bei sehr jungen Patienten auf (21 und 26 Jahre). Ob damit *S. saccharolyticus* jedoch für jüngere Patienten im Allgemeinen gefährlicher ist, lässt sich daraus nicht ableiten. Trotzdem kann festgehalten werden, dass *S. saccharolyticus* für jede Altersgruppe relevant werden kann und auch bei jüngeren Patienten nicht außer Acht gelassen werden darf.

Bei der Analyse der 16 Patienten aus den Fallberichten bezüglich ihres Alters wurde auch die Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Patienten ausgewertet. Interessanterweise handelte es sich bei 14/16 (87,5%) um männliche Patienten. Der Anteil aller männlichen Patienten der Gesamtkohorte dieser Studie lag bei vergleichbaren 86,0%. Da scheinbar deutlich mehr Männer mit Detektionen von *S. saccharolyticus* betroffen sind, bleibt die Frage, ob auf der Haut von Männern häufiger *S. saccharolyticus* zu finden ist oder zum Beispiel die präoperative Desinfektion bei Männern weniger Wirkung hat, was bereits für *Cutibacterium acnes*

gezeigt werden konnte [38]. Die Daten könnten zwar darauf hindeuten, dieser Frage muss aber weiter nachgegangen werden, bevor sich eine Aussage treffen lässt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass *S. saccharolyticus* in der Lage ist, einen Biofilm zu produzieren und zur Autoaggregation befähigt ist, was als Virulenzfaktor anzusehen ist und *S. saccharolyticus* somit als möglicher Auslöser von fremdkörperassoziierten Infektionen in Frage kommt. Allerdings bleibt unklar, in welchem Ausmaß diese Fähigkeit von *S. saccharolyticus* den Infektions- und Therapieverlauf beeinflusst. Nach Auswertung aller bei PubMed gefundenen Studien im Zusammenhang mit relevanten Infektionen von *S. saccharolyticus* ergaben sich 51 berichtete Fälle, von denen 20 Fälle mit liegendem Fremdkörpermaterial beziehungsweise einer ärztlichen Intervention assoziiert waren. Das entspricht 39,2%. In dieser Studie hatten 45,2% aller Patienten, bei denen *S. saccharolyticus* nachgewiesen wurde, Fremdkörpermaterial implantiert. Der Anteil in der Infektionsgruppe betrug 52,3%, in Gruppe B lag der Anteil bei 45,2%, womit der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Die Ergebnisse aus der Literatur bezüglich der Biofilmbildung konnten keinen Klade spezifischen Unterschied bezüglich der Biofilmbildung zeigen. Ob also der Anteil fremdkörperassoziiierter Infektionen mit der Biofilm-Bildung korreliert und inwieweit *S. saccharolyticus* im Rahmen von fremdkörperassoziierten Infektionen eine Rolle spielt, bleibt noch zu erforschen.

Ähnlich sieht es bei Vorerkrankungen beziehungsweise Komorbiditäten aus. Zu Beginn dieser Studie war die ursprüngliche Erwartung, dass Infektionen mit *S. saccharolyticus* vor allem ältere Patienten mit vielen Vorerkrankungen betreffen. Wie oben erläutert, spielt das Alter jedoch womöglich keine so große Rolle. Ähnlich sieht es bei den Vorerkrankungen aus. Der Anteil an Patienten, die unter Vorerkrankungen litten, lag in der Gesamtkohorte bei 84,4%. Dieser Anteil ist nicht unbedeutend, allerdings bestand er unabhängig davon, ob eine Infektion vorlag oder nicht und war in beiden Gruppen vergleichbar hoch. In der Auswertung der Fallberichte fehlen viele Informationen, wobei allerdings nur in drei Fällen eine Vorerkrankung beschrieben ist [103,106,113]. Diese Daten sind zwar nicht ausreichend für eine fundierte Schlussfolgerung, doch ist der Einfluss von Vorerkrankungen als prädisponierender Faktor für Infektionen mit *S. saccharolyticus* vermutlich geringer als anzunehmen war.

Statistisch signifikant war der Unterschied des Probenmaterials, also ob es sich um eine Blutkultur handelte oder nicht. In Gruppe A war der Anteil der Blutkulturen deutlich höher als in Gruppe B, in der das Probenmaterial in dem *S. saccharolyticus* detektiert wurde, auch oft aus Haut- oder Wundabstrichen bestand. Da *S. saccharolyticus* ein häufiger Kommensale der Haut ist [4,36], scheint es nicht verwunderlich, dass dieser Erreger auf Hautabstrichen oft zu finden ist und in diesen Fällen eher als Kontamination zu werten ist. Findet sich jedoch ein Nachweis von *S. saccharolyticus* in einer Blutkultur, sollte die Möglichkeit einer Infektion verstärkt mit einbezogen werden.

Die *Time to positivity* ist ein allgemein verwendetes Verfahren, bei dem die Zeit ab Bebrütung der Blutkulturflaschen gemessen wird bis zu dem Zeitpunkt, ab dem Wachstum von Mikroorganismen festgestellt wird, die Flaschen also positiv werden. Dieser Wert ist als sinnvolles Werkzeug anerkannt, um zwischen Infektion oder Kontamination zu unterscheiden. Allgemein gilt, je kürzer die TTP ist, desto eher liegt eine Infektion vor [28,43,72,115]. Eine TTP unter 12 Stunden kann als Hinweis auf eine Infektion gewertet werden, längere Zeiten entsprechen eher Kontaminationen [91]. In dieser Studie gab es jedoch keine einzige Blutkultur, die innerhalb von 12 Stunden positiv wurde. Laut Literatur würden damit alle Nachweise von *S. saccharolyticus* eher als Kontamination zu bewerten sein. Betrachtet man jedoch die Fallberichte mit gesicherten Infektionen von *S. saccharolyticus*, fällt ein ähnliches Ergebnis auf: Die durchschnittliche TTP der Fallberichte betrug fünf Tage [106] und die längste berichtete TTP lag bei elf Tagen [112]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie. In Gruppe A dauerte es im Mittel 96 - 120 Stunden, bis eine Probe positiv wurde. In Gruppe B betrug die TTP zwischen 72 und 96 Stunden und war damit sogar kürzer. Dieses Ergebnis widerspricht der allgemeinen Annahme, dass eine kürzere TTP eher für eine Infektion spricht. Da die Datenlage diesbezüglich bisher eindeutig ist und alles auf eine ausgesprochen lange TTP von *S. saccharolyticus* hindeutet, unabhängig von Infektion oder Kontamination, muss diese Parameter hinsichtlich der Auswertung von *S. saccharolyticus*-Detektionen kritisch hinterfragt werden und sollte nur mit Vorsicht als Unterscheidungsmerkmal berücksichtigt werden.

Brüggemann et al. waren 2019 die Ersten, die zwei unterschiedliche Kladen der *S. saccharolyticus*-Stämme mit jeweiligen Unterschieden beschrieben [20], die oben bereits aufgeführt worden sind und durch weitere Studien ergänzt wurden [1,97] (siehe Kapitel 2.2.4). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass Subklade A virulenter ist aufgrund vorhandener/stärkerer Aktivität von Urease beziehungsweise Hyaluronidase oder durch weniger Pseudogene und einer damit verbundenen geringeren Auxotrophie. Um weitere Unterschiede zwischen den Kladen zu identifizieren, wurden die 22 Isolate, die sich Dank der Genomsequenzierung einer Klade zuordnen ließen, anhand derselben Variablen wie die beiden Gruppe A und B miteinander verglichen. Es ergaben sich zwei statistisch signifikante Variablen, nämlich das implantierte Fremdkörpermaterial ($p=0,046$) und die TTP ($p=0,016$). Patienten aus Klade A hatten in 30% einen Fremdkörper implantiert, bei Klade B lag der Wert bei 75%. Diese Diskrepanz könnte darauf hindeuten, dass *S. saccharolyticus*-Stämme der Klade B eher mit implantiertem Fremdkörpermaterial assoziiert sind. Ob die Virulenz dadurch jedoch auch höher ist, bleibt unklar. Entgegen der Hypothese, dass Subklade A womöglich virulenter sein könnte, ist die TTP in Klade B mit 48 – 72 Stunden kürzer als in Klade A (4 – 5 Tage). Wie aber bereits weiter oben erläutert, ist die TTP von *S. saccharolyticus* nur bedingt verwertbar und gibt, anders als bei den meisten anderen Bakterien, keinen Hinweis bezüglich der Infektion oder Virulenz. Für eine höhere Virulenz von Klade A sprechen der längere Aufenthalt sowohl im Krankenhaus

als auch auf der Intensivstation, die etwas höhere Herzfrequenz und der höhere Blutdruck, ein höheres CRP und die Tatsache, dass sich mehr Patienten mit Klade-A-Besiedlung in der Gruppe A für „Infektion wahrscheinlich“ wiederfanden. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht eindeutig und sollten mit Vorsicht interpretiert werden. Ein weiterer Hinweis für eine höhere Virulenz von Klade A lässt sich aus unseren Ergebnissen der Genomsequenzierung ableiten. Stämme aus Klade A besaßen einen größeren Anteil an proteinkodierenden Genen und ein stärker konserviertes Kerngenom, was eine bessere Stabilität impliziert und eine dadurch höhere Virulenz. Dem entgegengesetzt könnte der niedrige Anteil von proteinkodierenden Genen und einem weniger stark konservierten Kerngenom von Klade B ein Hinweis auf einen laufenden Genomzerfall sein, der für eine Anpassung an eine neue Nische spricht. Diese These wird unterstützt durch die kürzere TTP von Klade B, da ein schnelleres Wachstum von Vorteil sein könnte.

5.3 Stärken und Schwächen der Studie

Diese Studie ist die bis dato erste Studie, die eine vergleichbar große Anzahl von Detektionen von *S. saccharolyticus* auswertet. Bisher gibt es in der Literatur insgesamt 51 Berichte von Infektionen im Zusammenhang mit *S. saccharolyticus*. Diese Anzahl wurde nun ergänzt durch weitere 44 Fälle. Es wurden zu allen Patienten klinische Daten erhoben, die Rückschlüsse auf Krankheitsverlauf, Therapie und das Ergebnis erlauben, wodurch typische Charakteristika einer *S. saccharolyticus*-Infektion herausgearbeitet werden konnten. Auffälligkeiten, wie beispielsweise der große Anteil männlicher Patienten oder die lange TTP, konnten hier an einer großen Kohorte bestätigt werden, wodurch sich die bisherigen Beobachtungen verfestigen lassen. Besonders die große Anzahl an Patienten und der Fokus auf den klinischen Verlauf beziehungsweise die Unterschiede zu einer Vergleichsgruppe bieten ganz neue Einblicke in den Infektionsverlauf. Anhand des hier entwickelten Scores ließ sich eine Differenzierung zwischen einer wahrscheinlichen Infektion oder Kontamination vornehmen. Dieser Score kann auch in Zukunft unterstützend herangezogen werden, um bei Detektionen von *S. saccharolyticus* besser entscheiden zu können, ob es sich um eine behandlungsbedürftige Infektion handelt. Mit Hilfe dieser Studie wurde anhand einer großen Patientenzahl die klinische Relevanz von *S. saccharolyticus* aufgezeigt und die bisher bestehenden Annahmen weiter untermauert.

Allerdings beinhaltet die Studie auch einige Schwächen. In die Analyse flossen 93 Patientendaten mit ein, bei denen laut System während des Krankenhausaufenthaltes *S. saccharolyticus* detektiert wurde. Bei der erneuten Verifizierung von 24 Proben wurden zwei andere Erreger identifiziert und daraufhin ausgeschlossen. Es ist anzunehmen, dass womöglich bei der Verifizierung von weiteren Isolaten (wenn diese zur erneuten Identifizierung zur Verfügung gestanden hätten) ebenfalls andere Spezies identifiziert werden würden, obwohl diese Isolate hier mit in die Analyse einbezogen wurden. Andererseits besteht auch eine hohe

Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den beiden anderen Erregern um Kontaminationen handelt, die nachträglich in die Probe gelangt sind und entweder mit eingefroren wurden oder bei erneuter Anzucht zur Verunreinigung der Probe geführt haben und dann den weiterhin in der Probe vorhandenen *S. saccharolyticus* durch zum Beispiel schnelleres Wachstum verdrängt haben. Dieses Problem des Verdrängens von *S. saccharolyticus* durch andere wird wohl auch in Zukunft bestehen bleiben.

Ein weiteres Problem bei der Auswertung der Daten der 93 Patienten besteht in den vielen fehlenden Daten. Leider wurden die Daten in der Vergangenheit nicht immer lückenlos erhoben oder waren nicht vollständig dokumentiert. Manche Variablen sind aussagekräftig, da sich dort zu einem Großteil der 93 Patienten die Daten erheben ließen, andere Variablen müssen hingegen mit Vorbehalt betrachtet und in zukünftigen Studien bestätigt werden.

Der gewählte Score sollte an dieser Stelle ebenfalls kritisch diskutiert werden. Es gibt in der Literatur bereits Vorschläge und Verwendung verschiedener Scores, beziehungsweise Kriterien, die zur Unterscheidung zwischen Infektion und Kontamination herangezogen werden können und die für die Entwicklung des hier verwendeten Scores als Orientierung dienen. Bisher bestehende Kriterien beziehen sich allgemein auf CoNS, *S. epidermidis* ausgeschlossen, und setzen sich aus Kriterien zusammen, wie zum Beispiel: mindestens zwei oder mehr positive Blutkulturen, klinische Symptome oder laborchemische Parameter einer Infektion, die sich nach Therapie gebessert haben und kein Vorhandensein weiterer Infektionen aufzeigen [12]. Ergänzend dazu wurde zum Beispiel von Hitzenbichler et al. [50] weiterhin zwischen einer wahrscheinlichen Infektion (gleiche Kriterien wie bereits beschreiben) und einer möglichen Infektion unterschieden. Eine Detektion wurde als „mögliche Infektion“ klassifiziert, wenn Fremdkörpermaterial implantiert war, keine andere Infektion vorlag und die Symptome sich nach der Therapie gebessert hatten. Die Forschungsgruppe analysierte 252 Proben, von denen 23% als wahrscheinliche oder mögliche Infektion gewertet wurden. *S. saccharolyticus* wurde in drei Fällen detektiert und in jedem Fall als Kontamination gewertet. Der in dieser Studie verwendete Infektions-Score greift einige der allgemein verwendeten Kriterien auf, wie zum Beispiel Entzündungswerte, die klinische Symptomatik und Verbesserung der Symptome nach Therapie sowie der mehrfache Nachweis. Das fehlende Vorliegen anderer Infektionen wurde hier mit dem Parameter „kein Nachweis anderer relevanter Keime“ einbezogen. Wurden ein oder mehrere andere relevante Erreger in der gleichen Probe wie *S. saccharolyticus* detektiert, wurde dies als andere Infektion gewertet, da der Auslöser der Infektion damit eher dem anderen Erreger zuzuschreiben war. Der in dieser Studie verwendete Score ist mit sechs Kriterien etwas genauer als andere verwendete Scores und da er sich nur auf Detektionen von *S. saccharolyticus* beschränkt, kann er womöglich diese Detektionen auch besser einer Infektion oder Kontamination zuordnen. Dies ist aber auf der anderen Seite eine mögliche Schwäche, da der Score eventuell die Relevanz überbewertet. Es bleibt die Frage, ob es sich bei den

als Infektion klassifizierten Proben um tatsächliche Infektionen handelt. Manche Faktoren des Scores, wie der klinische Verdacht auf Infektion anhand des Arztbriefes, beruhen auf der retrospektiv erhobenen Beurteilung des behandelnden Arztes. Diese ist zum einen immer auch subjektiv, zum anderen sind in diese Beurteilung höchstwahrscheinlich Parameter wie CRP oder Körpertemperatur mit eingeflossen, sodass sie deswegen in diesem Score als eigenständige Parameter auch kritisch zu bewerten sind.

Bezüglich der Verteilung der Punkte kommt ebenfalls das Problem der fehlenden Daten hinzu. Konnte beispielsweise das CRP nicht erhoben werden, wurde dieser Parameter als „null“ gewertet, womit kein weiterer Punkt in den Score einging und die Gesamtpunktzahl niedriger war. Hätten diese Daten erhoben werden können, wäre womöglich ein Punkt mehr verteilt worden und die Punktzahl höher, sodass sich unter Umständen in manchen Fällen die Zuordnung in Gruppe A oder B geändert hätte. Des Weiteren zu diskutieren ist die Frage, ob eine Wertung der Kriterien sinnvoll wäre, um bestimmten Kriterien mehr Gewicht zu verleihen, was die Zuteilung in Gruppe A und B ebenfalls verändert hätte.

Abschließend ist festzustellen, dass damit kein allgemeingültiger Score vorhanden ist, der zur sicheren Differenzierung verwendet werden kann. Allerdings bietet dieser Score, basierend auf vergleichbaren Scores aus der Literatur, einen guten Ansatzpunkt zur Klassifizierung.

Aufgrund einer nur begrenzt verfügbaren Anzahl an eingefrorenen Isolaten und teilweise schweren Anzuchtbedingungen konnten nicht mehr Stämme sequenziert und für die Antibiotikaresistenztestung angezüchtet werden. Auch hier sollten die Ergebnisse in Zukunft durch eine größere Probenmenge untermauert werden.

5.4 Bedeutung und Konsequenzen für den klinischen Alltag

Eine Anforderung dieser Studie war die Evaluation der klinischen Relevanz von *S. saccharolyticus*. Von insgesamt 93 Patienten wurden 44 Patienten der Gruppe „Infektion wahrscheinlich“ zugeordnet. Dieser Anteil ist mit 47,2% erstaunlich hoch und lässt die Hypothese zu, dass fast die Hälfte aller Detektionen mit *S. saccharolyticus* zu einer Infektion führen. Der normalerweise oft verwendete Parameter TTP zur Unterscheidung zwischen Infektion und Kontamination kann nur bedingt verwendet werden. Es sollte beachtet werden, dass die TTP von *S. saccharolyticus* durchschnittlich 5 Tage beträgt, unabhängig davon, ob es sich um eine Infektion oder Kontamination handelt. Ebenfalls zu beachten ist die lange Inkubationszeit und das anspruchsvolle Wachstum von *S. saccharolyticus*. Obwohl *S. saccharolyticus* in manchen Studien auch unter bestimmten aeroben Bedingungen Wachstum zeigte, wuchsen die Isolate dieser Studie immer nur unter anaeroben Bedingungen. Die Wichtigkeit der Abnahme zweier Blutkulturpaare mit jeweils einer aeroben und anaeroben Flasche sollte im klinischen Alltag nicht außer Acht gelassen werden. Bei der Anzucht sollte auf sehr kleine, weiße Kolonien geachtet werden, die möglicherweise kaum wachsen und leicht von anderen, auffälligeren

Kolonien verdrängt werden. Es sollten folglich auch Proben in die gesamte Beurteilung miteinbezogen werden, die nur langsam oder wenig wachsen und eine lange TTP haben. Der hier entwickelte Score kann zur Differenzierung herangezogen werden. Ebenfalls mit in die Bewertung sollten die Variablen eingehen, die hier eine statistische Signifikanz gezeigt haben, zum Beispiel, ob es sich um eine Blutkultur handelt oder um anderes Probenmaterial. Alter, Vorerkrankungen und implantiertes Fremdkörpermaterial spielen womöglich eine weniger große Rolle als vermutet. Es ist festzuhalten, dass Infektionen durch *S. saccharolyticus* schwere Verläufe zeigen können, die mit längeren Krankenhausaufenthalten verbunden sind und die deswegen auch konsequent mit einer kalkulierten Antibiotikatherapie behandelt werden sollten. Basierend auf Erfahrungen aus der Literatur und den hier gewonnenen Ergebnissen wird eine Therapie mit β -Lactam-Antibiotika plus Fluorchinolonen oder Vancomycin plus Teicoplanin/Clindamycin empfohlen. Metronidazol sollte in jedem Fall vermieden werden. Unter Therapie ist der Heilungsverlauf gut, es sollte aber mit einbezogen werden, dass es auch frustrane Therapieversuche gibt, was eine konsequente, schnelle Therapie umso wichtiger macht.

Für den klinischen Alltag ist von daher relevant, dass Detektionen von *S. saccharolyticus* womöglich häufiger als ursprünglich angenommen Auslöser einer Infektion sind. Es gilt, diese Möglichkeit immer trotz dagegensprechender Faktoren, wie einer langen TTP, miteinzubeziehen und bei Verdacht gezielt zu behandeln.

5.5 Implikationen für zukünftige Studien

Diese Studie liefert neue Hinweise für die Bedeutung von *S. saccharolyticus*. Trotzdem bleiben viele weitere Fragen ungeklärt oder müssen tiefergehend untersucht werden, um konkrete Aussagen treffen zu können. Zum einen sollte die Einteilung zwischen Infektion und Kontamination überprüft werden. Beispielsweise wäre eine Studie sinnvoll, die den hier verwendeten Score auf weitere Detektionen anwendet und untersucht, ob eine ähnliche Verteilung erzielt wird. Ergänzend dazu sollte ein anderer Score mit zum Beispiel weniger subjektiven Kriterien entwickelt und eine darauf basierende Einteilung mit der hier erfolgten Einteilung verglichen werden. Damit der Score angewendet kann, wäre es zielführend, eine lückenlose Datenerhebung durchzuführen, um bei der Auswertung aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen. Ebenfalls hilfreich wäre die Verwendung eines standardisierten Fragebogens zur einheitlichen und vergleichbareren Datenerhebung. Über den hier beschriebenen Zeitraum von 12 Jahren wurden 93 Detektionen registriert. *S. saccharolyticus* scheint damit im Klinikalltag eher selten zu sein. Allerdings kann die Hypothese aufgestellt werden, dass *S. saccharolyticus* häufiger vorkommt und auch öfter detektiert werden könnte, aber aus verschiedenen Gründen übersehen wird und deswegen gar nicht erst identifiziert wird. Außerdem interessant ist zum einen die Frage, warum Männer scheinbar häufiger betroffen sind und zum anderen, welche Rolle Fremdkörpermaterial in *S. saccharolyticus*-Infektionen spielen.

Zusätzlich zu weiteren klinischen Studien sollten Genomsequenzierungen von mehr Stämmen erfolgen. Die aktuellen Daten beschrieben zwei Kladen, deren spezifische Unterschiede weitergehend untersucht werden sollten. Hierbei lässt sich eventuell in Zukunft eine fundierte Annahme über die Virulenz und über weitere Eigenschaften der jeweiligen Klade treffen.

Der beschriebene Genomzerfall deutet auf eine noch andauernde Anpassung an eine neue Nische hin. Es wäre sehr interessant, diese Anpassung im Laufe der nächsten Jahre zu verfolgen und die neue Nische, neue Fähigkeiten und neue Charakteristika von *S. saccharolyticus* zu analysieren.

5.6 Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass diese Studie einen großen Anteil bezüglich der Bedeutung von *S. saccharolyticus* im klinischen Kontext ausmacht. Es konnte ein unerwartet hoher Anteil von *S. saccharolyticus* - Detektionen als Infektion identifiziert werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Relevanz von *S. saccharolyticus* größer ist als vermutet. Es gibt zwar bisher weiterhin verhältnismäßig wenige positive Befunde, was aber an vielen verschiedenen anspruchsvollen Eigenschaften von *S. saccharolyticus* liegt. Das Wissen darüber hilft, mehr Aufmerksamkeit auf *S. saccharolyticus* zu richten und in Zukunft sowohl alle Fälle möglichst lückenlos zu detektieren als auch verstärkt diesen fakultativ pathogenen Erreger als Ursache einer Infektion zu berücksichtigen. *S. saccharolyticus* kann zu schweren Infektionen führen und sollte nicht unterschätzt werden. Die Schwierigkeit der Differenzierung zwischen Infektion und Kontamination bleibt jedoch weiterhin bestehen. Womöglich gelingt es in Zukunft, einen zuverlässigen Score zur Unterscheidung zu etablieren, der die Entscheidungen im klinischen Alltag erleichtern kann. Bis es so weit ist, muss jedoch jede Detektion von *S. saccharolyticus* unter Einbeziehung vieler verschiedener Kriterien neu bewertet werden. Eine korrekte Unterscheidung bleibt ein großes Ziel, nicht nur bezogen auf *S. saccharolyticus*, sondern auch für viele andere CoNS. Die richtige Unterscheidung würde ermöglichen, den Antibiotikagebrauch einzuschränken und gezielter zu therapieren. Um die wachsende Antibiotikaresistenz in einer Gesellschaft mit zunehmend vulnerablen Patienten zu kontrollieren und einzudämmen, sollte dieses Ziel auch in Zukunft verstärkt im Blick behalten werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Afshar M, Poehlein A, Söderquist B, Brüggemann H (2021) Complete Genome Sequences of Two *Staphylococcus saccharolyticus* Strains Isolated from Prosthetic Joint Infections. *Microbiol Resour Announc* 10:e00157-21
2. Afshar M, Møllebjerg A, Minero GA, Hollensteiner J, Poehlein A, Himmelbach A, Lange J, Meyer RL, Brüggemann H (2022) Biofilm formation and inflammatory potential of *Staphylococcus saccharolyticus*: A possible cause of orthopedic implant-associated infections. *Front Microbiol* 13:
3. Agarwal A, Jain A (2013) Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. *Indian J Med Res* 138:262–266
4. Ahle CM, Stødkilde K, Afshar M, Poehlein A, Ogilvie LA, Söderquist B, Hüpeden J, Brüggemann H (2020) *Staphylococcus saccharolyticus*: An Overlooked Human Skin Colonizer. *Microorganisms* 8:E1105
5. Ahle CM, Stødkilde-Jørgensen K, Poehlein A, Streit WR, Hüpeden J, Brüggemann H (2021) Comparison of three amplicon sequencing approaches to determine staphylococcal populations on human skin. *BMC Microbiol* 21:221
6. Aldman MH, Rasmussen M, Olaison L, Pålman LI (2021) Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*—a retrospective national registry-based study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 40:1103–1106
7. Alhussein F, Fürstenberg J, Gaupp R, Eisenbeis J, Last K, Becker SL, Papan C (2020) Human infections caused by *Staphylococcus argenteus* in Germany: genetic characterisation and clinical implications of novel species designation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 39:2461–2465
8. Ali H, Rood IGH, de Korte D, Ramírez-Arcos S (2012) Strict anaerobic *Staphylococcus saccharolyticus* isolates recovered from contaminated platelet concentrates fail to multiply during platelet storage. *Transfusion (Paris)* 52:916–917
9. Andersson SGE, Kurland CG (1998) Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol* 6:263–268
10. Appelbaum PC, Kaufmann CS, Keifer JC, Venbrux HJ (1983) Comparison of three methods for anaerobe identification. *J Clin Microbiol* 18:614–621
11. *Ärzteblatt DÄG* Redaktion Deutsches The Prevalence of Nosocomial and Community Acquired Infections in a University Hospital (05.08.2013). URL: <https://www.aerzteblatt.de/int/archive/article?id=145328>
12. Asai N, Sakanashi D, Suematsu H, Kato H, Hagihara M, Watanabe H, Shiota A, Koizumi Y, Yamagishi Y, Mikamo H (2021) Clinical characteristics and relevance of coagulase-negative *Staphylococci* other than *S. epidermidis* by positive blood culture. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 54:632–638
13. Bai AD, Lo CKL, Komorowski AS, Suresh M, Guo K, Garg A, Tandon P, Senecal J, Del Corpo O, Stefanova I, Fogarty C, Butler-Laporte G, McDonald EG, Cheng MP, Morris AM, Loeb M, Lee TC (2022) *Staphylococcus aureus* bacteraemia mortality: a systematic review

- and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 28:1076–1084
14. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477
 15. Becker K, Heilmann C, Peters G (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27:870–926
 16. Becker K, Both A, Weißelberg S, Heilmann C, Rohde H (2020) Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 18:349–366
 17. Beekmann SE, Diekema DJ, Doern GV (2005) Determining the Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Blood Cultures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26:559–566
 18. Berube BJ, Sampedro GR, Otto M, Bubeck Wardenburg J (2014) The *psmA* Locus Regulates Production of Staphylococcus aureus Alpha-Toxin during Infection. *Infect Immun* 82:3350–3358
 19. Bravo L, Oethinger M (2009) 46 Staphylococcus saccharolyticus: A Rare but Important Cause of Anaerobic Endocarditis *Microbiology No. MB 08-8 (MB-357)*. *Am J Clin Pathol* 131:295–296
 20. Brüggemann H, Poehlein A, Brzuszkiewicz E, Scavenius C, Enghild JJ, Al-Zeer MA, Brinkmann V, Jensen A, Söderquist B (2019) Staphylococcus saccharolyticus Isolated From Blood Cultures and Prosthetic Joint Infections Exhibits Excessive Genome Decay. *Front Microbiol* 10:478
 21. Buszewski B, Rațiu IA, Milanowski M, Pomastowski P, Ligor T (2018) The effect of biosilver nanoparticles on different bacterial strains' metabolism reflected in their VOCs profiles. *J Breath Res* 12:027105
 22. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H (2014) In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3895–3903
 23. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinforma Oxf Engl* 34:i884–i890
 24. Cho G-S, Li B, Brinks E, Franz CMAP (2022) Characterization of antibiotic-resistant, coagulase-negative staphylococci from fresh produce and description of Staphylococcus shinii sp. nov. isolated from chives. *J Microbiol* 60:877–889
 25. Chowdhury S, Fong SS (2020) Computational Modeling of the Human Microbiome. *Microorganisms* 8:E197
 26. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F (1999) The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in Staphylococcus aureus and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun* 67:5427–5433
 27. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SR (2015) Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res* 43:e15

28. Da R, Wu Y, Liu W, Shi H, Wang W (2016) Rapid Time to Positivity of Cerebrospinal Fluid Culture with Coagulase-Negative Staphylococcus Is More Likely to Reflect a True Infection Than Contamination. *World Neurosurg* 93:330–335
29. de Paiva-Santos W, de Sousa VS, Giambiagi-deMarval M (2018) Occurrence of virulence-associated genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from different sources. *Microb Pathog* 119:9–11
30. Dingle TC, Butler-Wu SM (2013) Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med* 33:589–609
31. Drancourt M, Raoult D (2002) *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 40:1333–1338
32. Ehlers S, Merrill SA (2022) *Staphylococcus Saprophyticus*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482367/>
33. Eichel V, Papan C, Mutters NT (2019) [Update Hygiene: Prevention of Vascular Catheter-Associated Infections in Premature and Newborn Infants]. *Klin Padiatr* 231:177–182
34. Elzi L, Babouee B, Vögeli N, Laffer R, Dangel M, Frei R, Battegay M, Widmer AF (2012) How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 18:E355-361
35. Escalante MJ, Ceriani-Cernadas JM, D'Apremont I, Bancalari A, Webb V, Genes L, Villarroel L, Munoz E, Tapia JL, Network for the NN (2018) Late Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Infants in the South American NEOCOSUR Network. *Pediatr Infect Dis J* 37:1022–1027
36. Evans CA, Mattern KL, Hallam SL (1978) Isolation and identification of *Peptococcus saccharolyticus* from human skin. *J Clin Microbiol* 7:261–264
37. Fairbrother RW (1940) Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *J Pathol Bacteriol* 50:83–88
38. Falk-Brynhildsen K, Söderquist B, Friberg O, Nilsson UG (2013) Bacterial recolonization of the skin and wound contamination during cardiac surgery: a randomized controlled trial of the use of plastic adhesive drape compared with bare skin. *J Hosp Infect* 84:151–158
39. Fan S-H, Ebner P, Reichert S, Hertlein T, Zabel S, Lankapalli AK, Nieselt K, Ohlsen K, Götz F (2019) *MpsAB* is important for *Staphylococcus aureus* virulence and growth at atmospheric CO₂ levels. *Nat Commun* 10:3627
40. Favre B, Hugonnet S, Correa L, Sax H, Rohner P, Pittet D (2005) Nosocomial bacteremia: clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 26:697–702
41. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S, Hsu C-H, McDermott PF, Tadesse DA, Morales C, Simmons M, Tillman G, Wasilenko J, Folster JP, Klimke W (2019) Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00483-19
42. Foster AP (2012) Staphylococcal skin disease in livestock. *Vet Dermatol* 23:342-e63

43. García-Vázquez E, Fernández-Rufete A, Hernández-Torres A, Canteras M, Ruiz J, Gómez J (2013) When is coagulase-negative *Staphylococcus* bacteraemia clinically significant? *Scand J Infect Dis* 45:664–671
44. Godreuil S, Jean-Pierre H, Morel J, Darbas H, Jumas-Bilak E, Bañuls A-L, Marchandin H (2005) Unusual case of spondylodiscitis due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *Joint Bone Spine* 72:91–93
45. Gruening P, Fulde M, Valentin-Weigand P, Goethe R (2006) Structure, regulation, and putative function of the arginine deiminase system of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* 188:361–369
46. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075
47. Harris SR (2018) SKA: Split Kmer Analysis Toolkit for Bacterial Genomic Epidemiology. 453142
48. Hart ME, Hart MJ, Roop AJ (2009) Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species. *Int J Microbiol* 2009:614371
49. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K (2019) Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 25:1071–1080
50. Hitzenbichler F, Simon M, Salzberger B, Hanses F (2017) Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. *Infection* 45:179–186
51. Hussain M, Kohler C, Becker K (2020) Role of SrtA in Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microorganisms* 8:E1975
52. Hynes WL, Walton SL (2000) Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 183:201–207
53. Kilpper-Bälz R, Schleifer KH (1981) Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov. *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Abteilung C Allgemeine Angewandte Mikrobiologie* 2:324–331
54. Kranjec C, Morales Angeles D, Torrissen Mårli M, Fernández L, García P, Kjos M, Diep DB (2021) Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiot Basel Switz* 10:131
55. Krishnan S, Haglund L, Ashfaq A, Leist P, Roat T (1996) Prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 22:722–723
56. Kumaran D, Kalab M, Rood IGH, de Korte D, Ramirez-Arcos S (2014) Adhesion of anaerobic bacteria to platelet containers. *Vox Sang* 107:188–191
57. Liang D, Alvarado TP, Oral D, Vargas JM, Denena MM, McCulley JP (2005) Ophthalmic examination of the captive western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *J Zoo Wildl Med Off Publ Am Assoc Zoo Vet* 36:430–433
58. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY (2004) Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186:722–729

59. Lin Y-T, Hung W-C, Wan T-W, Li H, Lee T-F, Hsueh P-R, Teng L-J (2022) *Staphylococcus taiwanensis* sp. nov., isolated from human blood. *Int J Syst Evol Microbiol* 72:
60. Lindsay JA (2019) *Staphylococci: Evolving Genomes*. *Microbiol Spectr* 7:7.6.1
61. Liu C-J, Sun B, Guo J, He J-L, Feng B, Wang H-G, Cao K-K, Liu T, Shen D-X (2015) A case of bone marrow infection by *Staphylococcus saccharolyticus*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19:1161–1163
62. Liu P-F, Cheng J-S, Sy C-L, Huang W-C, Yang H-C, Gallo RL, Huang C-M, Shu C-W (2015) IsaB Inhibits Autophagic Flux to Promote Host Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol* 135:2714–2722
63. Ma PY, Chong CW, Than LTL, Sulong AB, Ho KL, Neela VK, Sekawi Z, Liew YK (2022) Impact of IsaA Gene Disruption: Decreasing Staphylococcal Biofilm and Alteration of Transcriptomic and Proteomic Profiles. *Microorganisms* 10:1119
64. Mackey-Lawrence NM, Potter DE, Cerca N, Jefferson KK (2009) *Staphylococcus aureus* immunodominant surface antigen B is a cell-surface associated nucleic acid binding protein. *BMC Microbiol* 9:61
65. Makris G, Wright JD, Ingham E, Holland KT (2004) The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus* - a virulence factor? *Microbiol Read Engl* 150:2005–2013
66. McDuffie RS, Eskens JL, Gibbs RS (1998) Oral quinolone in the treatment of experimental polymicrobial puerperal infection in rabbits. *Obstet Gynecol* 92:28–30
67. Michels R, Last K, Becker SL, Papan C (2021) Update on Coagulase-Negative Staphylococci-What the Clinician Should Know. *Microorganisms* 9:830
68. Michels R, Papan C, Boutin S, Alhoussein F, Becker SL, Nurjadi D, Last K (2024) Clinical relevance of *Staphylococcus saccharolyticus* detection in human samples: a retrospective cohort study. *Infection*
69. Mikhael MM, Bach HG, Huddleston PM, Maus TP, Barbari EF (2009) Multilevel diskitis and vertebral osteomyelitis after diskography. *Orthopedics* 32:60
70. Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165–199
71. Monedeiro F, Pomastowski P, Milanowski M, Ligor T, Buszewski B (2019) Monitoring of Bactericidal Effects of Silver Nanoparticles Based on Protein Signatures and VOC Emissions from *Escherichia coli* and Selected Salivary Bacteria. *J Clin Med* 8:E2024
72. Morioka S, Ichikawa M, Mori K, Kurai H (2018) Coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in cancer patients. Time to positive culture can distinguish bacteraemia from contamination. *Infect Dis Lond Engl* 50:660–665
73. Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System¹. *J Bacteriol* 104:313–322
74. Noshak MA, Rezaee MA, Hasani A, Mirzaii M The Role of the Coagulase-negative Staphylococci (CoNS) in Infective Endocarditis; A Narrative Review from 2000 to 2020. *Curr Pharm Biotechnol* 21:1140–1153
75. Nurjadi D, Last K, Klein S, Boutin S, Schmack B, Mueller F, Heeg K, Ruhparwar A, Heinger A, Zanger P (2020) Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* is a risk factor for

- ventricular assist device infection in the first year after implantation: A prospective, single-centre, cohort study. *J Infect* 80:511–518
76. Nurjadi D, Kocer K, Chanthalangsy Q, Klein S, Heeg K, Boutin S (2022) New Delhi Metallo-Beta-Lactamase Facilitates the Emergence of Cefiderocol Resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 66:e0201121
 77. Oberbach A, Friedrich M, Lehmann S, Schlichting N, Kullnick Y, Gräber S, Buschmann T, Hagl C, Bagaev E, CardiOmics group, Clinical Microbiology group, Bioinformatics group (2019) Bacterial infiltration in structural heart valve disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* S0022-5223(19)30451–9
 78. Ogston A (1880) Ueber Abscesse. *Arch Für Klin Chir*
 79. Osaki S, Kikuchi K, Moritoki Y, Motegi C, Ohyatsu S, Nariyama T, Matsumoto K, Tsunashima H, Kikuyama T, Kubota J, Nagumo K, Fujioka H, Kato R, Murakawa Y (2020) Distinguishing coagulase-negative *Staphylococcus* bacteremia from contamination using blood-culture positive bottle detection pattern and time to positivity. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother* 26:672–675
 80. Osman KM, Pires Á da S, Franco OL, Orabi A, Hanafy MH, Marzouk E, Hussien H, Alzaben FA, Almuzaini AM, Elbehiry A (2020) Enterotoxigenicity and Antibiotic Resistance of Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated from Raw Buffalo and Cow Milk. *Microb Drug Resist Larchmt N* 26:520–530
 81. Otto M (2020) *Staphylococci* in the human microbiome: the role of host and interbacterial interactions. *Curr Opin Microbiol* 53:71–77
 82. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J (2015) Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinforma Oxf Engl* 31:3691–3693
 83. Pallen MJ, Wren BW (2007) Bacterial pathogenomics. *Nature* 449:835–842
 84. Papan C, Förster K, Herterich R, Schulze A, Schubert S, Flemmer AW (2019) Identification and Containment of a Cluster of Two *Bacillus cereus* Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicale* 2019:1506583
 85. Papan C, Karremann M, Weis M, Petzold A, Zahn K, Schrotten H, Weichert S, Tenenbaum T (2021) A 28-Day-Old Boy with Multifocal Osteomyelitis Mimicking Non-Accidental Injury. *Klin Pädiatr* 233:91–93
 86. Pruijn N, Heesakkers N, Kosse N, van der Pluijm M, Telgt D, Dorrestijn O (2022) Better diagnostic value of tissue cultures obtained during mini-open and arthroscopic procedures compared with sterile punctures to identify periprosthetic shoulder infections: a retrospective cohort study. *J Shoulder Elbow Surg* 31:932–939
 87. Richter M, Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19126–19131
 88. Rood IGH, de Korte D, Ramírez-Arcos S, Savelkoul PHM, Pettersson A (2011) Distribution, origin and contamination risk of coagulase-negative staphylococci from platelet concentrates. *J Med Microbiol* 60:592–599
 89. Rosenbach FJ (1884) Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden J.F. Bergmann

90. Rosenthal VD, Chaparro GJ, Servolo-Medeiros EA, Souza-Fram D, Escudero DV da S, Gualtero-Trujillo SM, Morfin-Otero R, Gonzalez-Diaz E, Rodriguez-Noriega E, Altuzar-Figueroa MA, Aguirre-Avalos G, Mijangos-Méndez JC, Corona-Jiménez F, Hernandez-Chena BE, Abu-Jarad MR, Diaz-Hernandez EM, Miranda-Navales MG, Vázquez-Rosales JG, Aguilar-De-Morós D, Castaño-Guerra E, Munoz-Gutierrez G, Mejia N, Acebo-Arcenales JJ, Di-Silvestre G (2021) An eight-year multicenter study on short-term peripheral intravenous catheter-related bloodstream infection rates in 100 intensive care units of 9 countries in Latin America: Argentina, Brazil, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, Ecuador, Mexico, Panama, and Venezuela. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *Infect Control Hosp Epidemiol* 42:1098–1104
91. Ruiz-Giardín JM, Martin-Díaz RM, Jaqueti-Aroca J, Garcia-Arata I, San Martín-López JV, Sáiz-Sánchez Buitrago M (2015) Diagnosis of bacteraemia and growth times. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 41:6–10
92. Rutherford ST, Bassler BL (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a012427
93. Schneeberger AG, Gilbert MK, Sheikh R, Gerber C, Ruef C (2009) Non-purulent low-grade infection as cause of pain following shoulder surgery: preliminary results. *Chir Organi Mov* 93 Suppl 1:S71-77
94. Schneeberger AG, Yian E, Steens W (2012) Injection-induced low-grade infection of the shoulder joint: preliminary results. *Arch Orthop Trauma Surg* 132:1387–1392
95. Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069
96. Seker E, Ozenc E, Turedi OK, Yilmaz M (2022) Prevalence of *mecA* and *pvl* genes in coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms in Turkey. *Anim Biotechnol* 0:1–6
97. Söderquist B, Afshar M, Poehlein A, Brüggemann H (2021) *Staphylococcus saccharolyticus* Associated with Prosthetic Joint Infections: Clinical Features and Genomic Characteristics. *Pathog Basel Switz* 10:397
98. Steinbrueckner B, Singh S, Freney J, Kuhnert P, Pelz K, Aufenanger J (2001) Facing a mysterious hospital outbreak of bacteraemia due to *Staphylococcus saccharolyticus*. *J Hosp Infect* 49:305–307
99. Szafraniec GM, Szeleszczuk P, Dolka B (2020) A Review of Current Knowledge on *Staphylococcus agnetis* in Poultry. *Anim Open Access J MDPI* 10:E1421
100. Tammi Raija, Ripellino JA, Margolis RU, Tammi Markku (1988) Localization of Epidermal Hyaluronic Acid Using the Hyaluronate Binding Region of Cartilage Proteoglycan as a Specific Probe. *J Invest Dermatol* 90:412–414
101. Templeton A, Schlegel M, Fleisch F, Rettenmund G, Schöbi B, Henz S, Eich G (2008) Multilumen central venous catheters increase risk for catheter-related bloodstream infection: prospective surveillance study. *Infection* 36:322–327
102. Tiwari N, López-Redondo M, Miguel-Romero L, Kulhankova K, Cahill MP, Tran PM, Kinney KJ, Kilgore SH, Al-Tameemi H, Herfst CA, Tuffs SW, Kirby JR, Boyd JM, McCormick JK, Salgado-Pabón W, Marina A, Schlievert PM, Fuentes EJ (2020) The SrrAB two-component system regulates *Staphylococcus aureus* pathogenicity through redox sensitive cysteines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:10989–10999

103. Trojani M-C, Lamy B, Ruimy R, Amoretti N, Risso K, Roux C (2020) An unusual *Staphylococcus saccharolyticus* spondylodiscitis post kyphoplasty: a case report. *BMC Infect Dis* 20:539
104. Valgepea K, Loi KQ, Behrendorff JB, Lemgruber R de SP, Plan M, Hodson MP, Köpke M, Nielsen LK, Marcellin E (2017) Arginine deiminase pathway provides ATP and boosts growth of the gas-fermenting acetogen *Clostridium autoethanogenum*. *Metab Eng* 41:202–211
105. Walther-Wenke G, Schrezenmeier H, Deitenbeck R, Geis G, Burkhart J, Höchsmann B, Sireis W, Schmidt M, Seifried E, Gebauer W, Liebscher U-M, Weinauer F, Müller TH (2010) Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical follow-up. *Ann Hematol* 89:83–91
106. Wang P, Liu Y, Xu Y, Xu Z (2020) *Staphylococcus saccharolyticus* infection: case series with a PRISMA-compliant systemic review. *Medicine (Baltimore)* 99:e20686
107. Wang Y-T, Lin Y-C, Hsieh Y-H, Lin Y-T, Hamada M, Chen C-C, Liou J-S, Lee A-Y, Zhang W-L, Chen Y-T, Huang C-H (2024) *Staphylococcus hsinchuensis* sp. nov., Isolated from Soymilk. *Pathogens* 13:343
108. Westblom TU, Gorse GJ, Milligan TW, Schindzielorz AH (1990) Anaerobic endocarditis caused by *Staphylococcus saccharolyticus*. *J Clin Microbiol* 28:2818–2819
109. Wilde AD, Snyder DJ, Putnam NE, Valentino MD, Hammer ND, Lonergan ZR, Hinger SA, Aysanoa EE, Blanchard C, Dunman PM, Wasserman GA, Chen J, Shopsin B, Gilmore MS, Skaar EP, Cassat JE (2015) Bacterial Hypoxic Responses Revealed as Critical Determinants of the Host-Pathogen Outcome by TnSeq Analysis of *Staphylococcus aureus* Invasive Infection. *PLoS Pathog* 11:e1005341
110. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 39:309–317
111. Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2009) Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 15:454–460
112. Wu X, Yu C, Wang X (2009) A case of *Staphylococcus saccharolyticus* pneumonia. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 13:e43-46
113. Young N, Bhally H (2017) Bilateral Neck Pyomyositis Caused by *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus saccharolyticus* in a Diabetic Adult. *Case Rep Infect Dis* 2017:3713212
114. Yue K, Sheng D, Xue X, Zhao L, Zhao G, Jin C, Zhang L (2023) Bidirectional Mediation Effects between Intratumoral Microbiome and Host DNA Methylation Changes Contribute to Stomach Adenocarcinoma. *Microbiol Spectr* 11:e00904-23
115. Zeng L, Wang S, Lin M, Chen Y, Deng Q, Zhong H, Guan X, Yao S, Liu H (2020) Evaluation of time to positivity for blood culture combined with immature granulocytes, neutrophil-to-lymphocyte ratio, and CRP in identifying bloodstream coagulase-negative *Staphylococci* infection in pediatric patients. *J Clin Lab Anal* 34:e23473
116. *Staphylococcus brunensis* sp. nov. isolated from human clinical specimens with a staphylococcal cassette chromosome-related genomic island outside of the *rlmH* gene

Literaturverzeichnis

bearing the ccrDE recombinase gene complex - PMC. URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10581047/>

117. KISS-Definitionen. 82

118. v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf. URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf

7 Danksagung

Für die Überlassung des Themas danke ich sehr herzlich Herrn Professor Dr. Dr. Sören Becker.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Cihan Papan, der mich mit viel Zeit und Geduld betreut hat. Ich konnte mich jederzeit auf ihn verlassen, ob nun zu Beginn bei der Einarbeitung im Labor, während der Versuche und Datenerhebung, bei der Entwicklung des Konzepts der Arbeit oder zum Ende hin durch die vielen konstruktiven Anmerkungen während des Schreibprozesses. Ganz besonders hervorheben möchte ich seine Unterstützung und Förderung bei der Veröffentlichung von zwei Publikationen. Ich weiß diese Chance sehr zu schätzen. Ebenfalls bemerkenswert war die Organisation der Hospitation in Heidelberg, die mir weitere spannende Perspektiven ermöglicht hat und deren Ergebnisse maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben. Insofern möchte ich mich hiermit ganz herzlich für die herausragende Betreuung bedanken!

Im Rahmen der praktischen Tätigkeiten wurde ich von den Medizin-Technischen Laborassistenten/Innen unterstützt und stieß jederzeit mit all meinen Fragen auf sehr bereitwillige Hilfe. Auch weitere Mitarbeitende des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum des Saarlandes und Kommilitonen haben mir tatkräftig geholfen. An dieser Stelle gilt mein Dank insbesondere Katharina Last, Farah Alhussein, Judith Fürstenberg und Sina Tegethoff.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Frau Gudrun Wagenpfeil. Ebenso geht mein Dank an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Heidelberg. Aufgrund der erheblichen Arbeit von Herrn Prof. Dr. Dennis Nurjadi und Herrn Dr. Sébastien Boutin konnte die Genomsequenzierung überhaupt erst stattfinden und ausgewertet werden.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf diesem Weg unterstützt haben und mir jederzeit zur Seite standen.

8 Publikationen

Im Rahmen meiner Tätigkeit als Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Cihan Papan am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum des Saarlandes sind unter meiner Mitwirkung folgende Publikationen entstanden:

Michels R, Last K, Becker SL, Papan C (2021)

Update on Coagulase-Negative Staphylococci - What the Clinician Should Know. Microorganisms 9:830

Michels R, Papan C, Boutin S, Alhussein F, Becker SL, Nurjadi D, Last K (2024)

Clinical relevance of *Staphylococcus saccharolyticus* detection in human samples: a retrospective cohort study. Infection

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hamburg, 10.10.2024

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. M. A.', written in a cursive style.

11 Anhang

Anhang 1: Tabelle Datenerhebung

Anhang 2: WGS - DNA-Gewinnung und Aufbereitung

Anhang 3: Ergebnisse der MALDI-TOF Speziesidentifizierung

Anhang 1: Datenerhebung

A) Identität B) Geschlecht (0=männlich, 1=weiblich) C) Alter (in Jahren) D) Blutkultur als Probe (0=nein, 1=ja) E) Vorerkrankungen (0=nein, 1=ja) F) Gesamtmortalität (0=nein, 1=ja) G) Länge des Krankenhausaufenthaltes (in Tagen) H) mehrfacher Nachweis von S. saccharolyticus (0=nein, 1=ja) J) Fremdkörpermaterial implantiert (0=nein, 1=ja) JJ) Time to positivity (TTP; 0 = nicht bestimmt worden, 1 = Probe positiv geworden in 0-24 Stunden; 2 = Probe positiv geworden in 24-48 Stunden; 3 = Probe positiv geworden in 48-72 Stunden; 4 = Probe positiv geworden in 72-96 Stunden; 5 = Probe positiv geworden in 96-120 Stunden; 6 = Probe positiv geworden in 120-144 Stunden; 7 = Probe positiv geworden in 144-168 Stunden; 8 = Probe positiv geworden in 168-192 Stunden) K) kein Nachweis anderer relevanter Erreger (0=nein, 1=ja (nur S. saccharolyticus)) L) Temperatur bei Aufnahme (in °C) M) maximale Temperatur während des Aufenthaltes (in °C) N) Körpertemperatur >38 °C +/- 2 Tage vor/nach Probenentnahme (0=nein, 1=ja) O) Herzfrequenz (in Schlägen pro Minute) P) Blutdruck (in mmHg) Q) Blutdruck, diastolisch (in mmHg) R) C-reaktives Protein (in mg/l) S) C-reaktives Protein > 80mg/l (0=nein, 1=ja) T) Leukozytenzahl (in 10⁹/l) U) Procalcitonin (in ng/ml) V) Verdacht auf Infektion anhand des Arztbriefes (0=nein, 1=ja) W) Antibiotikatherapie erfolgt (0=nein, 1=ja) X) Klinische Verbesserung nach Therapie (0=nein, 1=ja) Y) Labordiagnostische Verbesserung nach Therapie (0=nein, 1=ja) Z) Aufenthalt auf der Intensivstation (0=nein, 1=ja) AA) Länge des Aufenthaltes auf Intensivstation (in Tagen) AB) Whole Genome Sequencing (0=WGS nicht durchgeführt, 1=WGS durchgeführt) AC) Klade A, 1=Klade A, 1=Klade B) AD) Infektion-Score (Punkte) AE) CutOff3: Infektion wahrscheinlich (0=Infektion unwahrscheinlich, 1=Infektion wahrscheinlich)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	JJ	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE			
1	0	54,9	1	1	0	16	0	1	4	1	36,7	38,0	0	(-)	100	55	149,8	1	20,0	(-)	0	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1			
2	0	62,7	1	1	0	9	1	1	4	1	37,2	(-)	0	(-)	140	75	1,8	0	3,8	(-)	0	0	0	(-)	(-)	0	0	0	1	0	2	0		
3	0	80,6	1	1	0	22	0	0	0	1	35,5	37,6	0	(-)	110	50	140,1	1	22,7	(-)	1	1	1	1	1	1	21	1	0	4	1			
4	0	59,4	1	1	0	17	0	0	6	1	36,6	38,6	0	90	140	85	3,5	0	6,1	(-)	0	1	(-)	(-)	0	0	1	0	1	0	1	0		
5	0	6,3	1	1	0	7	0	1	3	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	226,2	1	34,9	(-)	1	34,9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1	2	0	0		
6	0	81,3	1	1	1	34	1	1	7	1	35,0	39,1	1	85	145	80	169,5	1	9,1	1,72	1	1	0	0	1	34	1	1	1	5	1			
7	0	76,8	1	1	0	41	0	0	0	1	36,8	38,2	0	78	110	45	86,2	1	12,1	(-)	1	1	1	1	0	1	20	1	0	4	1			
8	0	60,5	1	1	0	13	0	0	3	1	36,5	38,5	1	70	125	70	41,1	0	15,7	(-)	1	1	1	1	0	0	1	0	4	1	0	0		
9	0	83,1	1	1	0	15	0	1	3	1	36,9	37,5	0	85	125	65	4,8	0	3,5	(-)	0	0	0	(-)	1	0	0	1	1	1	1	0	0	
10	0	42,2	1	1	0	5	0	1	3	1	(-)	(-)	0	100	120	90	13,8	0	4,6	(-)	1	0	1	1	1	1	13	1	1	1	2	0		
11	0	71,3	1	1	0	29	0	1	3	0	36,5	39,5	1	(-)	125	75	62,3	0	7,7	(-)	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	
12	0	53,0	1	1	1	1	0	0	5	0	38,4	42,0	1	90	110	75	9,4	0	13,8	(-)	0	0	0	(-)	(-)	1	1	0	(-)	1	0	0	0	
13	0	62,1	0	1	0	66	0	1	0	0	(-)	37,5	(-)	(-)	(-)	200,8	1	7,8	(-)	(-)	1	0	0	1	3	0	0	(-)	1	0	0	0	0	
14	0	46,6	1	1	0	38	0	0	7	1	35,5	39,5	1	70	125	50	340,0	1	13,5	(-)	1	1	1	1	1	1	32	0	(-)	5	1	1	0	
15	0	44,2	1	1	0	13	0	1	6	1	35,2	40,0	1	(-)	130	65	2,4	0	9,5	(-)	1	1	1	1	1	1	8	0	(-)	4	1	1	0	
16	0	49,5	1	1	0	18	0	1	6	0	37,0	39,0	1	80	110	75	164,0	1	9,3	42,70	1	1	1	1	1	1	6	0	(-)	4	1	1	0	
17	0	44,7	1	1	0	10	0	0	7	1	36,1	36,9	0	85	135	70	103,3	1	10,8	(-)	0	1	(-)	1	1	0	0	0	(-)	2	0	0	0	
18	0	54,5	1	1	0	33	0	0	8	1	37,0	39,5	1	140	140	70	173,1	1	18,6	0,20	1	1	1	1	1	15	0	(-)	5	1	1	0	0	
19	0	29,5	1	1	0	49	0	1	7	1	36,4	38,7	1	100	135	85	138,9	1	16,6	1,00	1	1	0	0	1	49	0	(-)	4	1	1	0	0	
20	0	23,2	1	0	0	0	0	0	5	1	38,8	38,8	1	80	120	80	7,0	0	13,8	(-)	1	0	0	(-)	0	0	0	0	(-)	3	1	1	0	0
21	0	72,9	0	1	0	25	0	1	0	1	36,0	39,1	1	90	150	85	3,2	0	5,4	(-)	1	1	1	1	1	5	0	(-)	4	1	1	0	0	
22	0	23,2	0	0	0	5	0	0	0	0	(-)	37,3	0	(-)	140	80	104,7	1	13,6	(-)	1	1	1	1	1	0	0	(-)	2	0	0	0	0	
23	0	56,2	0	1	0	5	0	1	0	1	38,2	38,2	1	(-)	130	90	5,8	0	9,3	(-)	0	1	1	1	(-)	0	(-)	3	1	1	0	0	0	
24	1	28,8	1	0	0	32	0	0	7	1	36,5	37,9	0	90	140	80	96,5	1	16,3	(-)	1	1	1	1	1	14	0	(-)	4	1	1	0	0	
25	0	46,1	0	1	0	23	0	1	0	1	36,6	40,0	0	(-)	125	65	35,0	0	15,9	(-)	1	1	1	1	1	12	0	(-)	3	1	1	0	0	
26	0	55,8	0	1	0	13	0	1	0	1	36,0	38,0	0	90	120	60	(-)	(-)	19,4	(-)	0	1	(-)	(-)	0	0	0	(-)	1	0	0	0	0	
27	0	29,0	1	1	0	4	0	0	6	1	39,0	40,1	1	99	151	82	86,9	1	14,2	(-)	1	1	1	1	1	0	0	(-)	5	1	1	0	0	
28	0	69,9	0	1	0	12	0	1	0	1	37,0	37,7	0	80	150	75	259,8	1	10,4	(-)	0	1	(-)	1	(-)	0	(-)	2	0	0	0	0	0	
29	1	85,9	0	1	0	35	0	1	0	1	36,5	(-)	(-)	(-)	(-)	146,7	1	7,1	(-)	1	1	0	0	1	9	0	(-)	3	1	1	0	0	0	
30	0	51,5	1	1	0	14	0	0	6	0	36,5	37,2	0	94	135	85	59,4	0	10,6	3,40	0	1	1	1	1	3	0	(-)	1	1	0	0	0	

31	0	74,4	0	1	0	0	19	0	0	0	1	35,7	37,5	0	75	130	70	107,7	1	8,8	(-)	0	0	(-)	(-)	0	0	(-)	2	0	
32	0	63,9	0	1	0	21	0	1	0	0	36,5	37,0	0	90	103	68	140,0	1	10,4	(-)	0	0	(-)	(-)	0	0	(-)	(-)	1	0	
33	0	60,1	1	1	0	43	0	1	6	1	34,5	38,9	1	100	130	50	254,1	1	11,3	0,90	1	1	1	1	1	43	1	0	5	1	
34	0	33,0	0	1	0	(-)	0	(-)	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	1	0		
35	0	44,3	1	1	0	49	0	1	5	1	38,5	42,0	1	70	92	50	240,1	1	6,0	0,40	1	1	0	0	1	49	0	(-)	4	1	
36	0	64,2	1	1	0	81	0	1	6	1	35,8	39,1	1	100	150	70	263,2	1	13,5	(-)	1	1	(-)	1	1	2	0	(-)	4	1	
37	0	59,2	0	1	0	(-)	0	(-)	0	1	(-)	0,0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	1	0		
38	1	16,4	0	0	0	11	0	0	0	0	37,2	39,0	0	97	120	71	67,2	0	8,2	(-)	1	1	1	1	0	0	0	(-)	2	0	
39	0	53,5	0	1	0	0	0	1	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	110	70	1,9	0	6,7	(-)	0	1	(-)	(-)	0	0	0	(-)	1	0	
40	0	69,8	1	1	0	72	0	1	6	1	(-)	40,0	1	91	124	71	253,4	1	10,2	0,33	1	1	0	0	0	0	1	0	4	1	
41	0	40,8	1	1	0	3	0	0	8	1	37,7	37,7	0	112	144	80	265,5	1	13,3	(-)	1	1	1	1	1	0	0	(-)	4	1	
42	0	40,7	1	1	0	41	1	1	5	1	(-)	39,0	1	80	140	70	36,5	0	10,6	(-)	1	1	(-)	(-)	1	39	0	(-)	4	1	
43	0	57,0	1	1	0	62	0	1	6	0	(-)	39,5	1	104	100	48	99,4	1	9,1	0,63	1	1	1	(-)	1	46	0	(-)	4	1	
44	0	49,4	1	1	0	1	9	1	0	6	0	34,0	40,0	1	95	125	70	219,8	1	4,4	0,16	1	1	0	0	1	9	0	(-)	4	1
45	0	65,8	1	1	0	60	1	1	5	0	36,9	38,8	0	112	116	70	42,2	0	12,4	0,22	1	1	1	1	1	55	0	(-)	3	1	
46	0	74,8	1	1	0	12	0	0	5	0	35,6	38,3	1	70	110	50	42,5	0	16,5	(-)	1	1	1	1	1	7	0	(-)	3	1	
47	0	79,7	1	1	0	8	0	1	6	1	34,7	39,1	1	100	90	50	310,7	1	8,6	1,24	1	1	(-)	1	1	7	0	(-)	4	1	
48	0	69,1	0	1	0	14	0	0	0	0	37,6	37,7	0	90	200	84	282,5	1	5,3	(-)	(-)	0	(-)	(-)	1	1	0	(-)	1	0	
49	0	45,6	1	1	0	17	0	1	5	1	38,5	40,2	1	90	112	54	96,7	1	0,7	0,58	1	1	(-)	(-)	0	0	1	1	4	1	
50	0	46,6	0	1	0	20	0	1	0	1	(-)	40,0	1	65	140	80	160,2	1	11,6	(-)	1	1	1	1	1	1	0	(-)	5	1	
51	1	46,5	0	0	0	10	0	0	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	13,5	0	(-)	(-)	0	1	(-)	1	0	0	0	(-)	1	0	
52	0	47,2	0	1	0	12	0	1	0	1	37,4	38,1	1	100	130	70	57,5	0	6,3	(-)	0	1	(-)	(-)	1	1	0	(-)	2	0	
53	0	20,3	1	0	0	8	0	0	5	0	36,0	36,9	0	95	153	80	159,7	1	6,5	(-)	0	1	1	1	0	0	0	(-)	2	0	
54	0	61,7	0	1	0	2	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	70	135	90	(-)	(-)	(-)	(-)	0	1	(-)	0	0	0	0	(-)	0	0	
55	0	76,5	0	1	0	30	0	1	0	1	36,0	37,5	0	128	200	90	240,4	1	9,1	4,52	(-)	1	(-)	1	1	4	0	(-)	2	0	
56	1	90,1	1	1	0	13	0	1	6	0	35,5	38,5	0	90	190	80	158,7	1	7,4	(-)	1	1	0	0	1	13	0	(-)	2	0	
57	1	68,1	1	1	1	34	0	0	5	0	37,0	40,2	1	140	160	95	352,1	1	9,8	9,11	1	1	0	0	1	30	1	0	3	1	
58	0	26,9	1	(-)	(-)	1	0	(-)	4	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	1	0	
59	1	36,8	1	1	0	179	0	0	4	1	(-)	40,2	1	140	110	80	144,4	1	8,3	(-)	(-)	1	(-)	(-)	0	0	1	0	3	1	
60	0	61,3	1	1	0	79	0	0	4	1	(-)	37,0	(-)	(-)	(-)	(-)	74,8	0	13,6	1,28	1	1	1	1	1	1	0	(-)	3	1	
61	0	47,9	1	1	0	11	0	1	5	1	36,0	39,2	1	90	125	70	75,7	0	6,8	(-)	1	1	1	1	1	1	0	(-)	4	1	
62	0	39,6	1	1	0	7	0	0	4	1	36,8	37,4	0	65	110	60	76,2	0	9,3	(-)	1	0	(-)	(-)	1	3	1	0	2	0	
63	1	57,1	1	1	0	112	0	1	5	0	33,0	37,2	0	104	100	40	317,9	1	20,3	3,55	1	1	(-)	(-)	1	112	0	(-)	2	0	
64	0	24,7	0	1	0	(-)	0	(-)	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	0	(-)	0	0	
65	0	58,4	0	0	0	17	1	0	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	233,7	1	7,2	(-)	1	1	1	1	1	1	0	(-)	5	1	
66	0	42,3	1	1	0	14	0	0	4	1	(-)	39,0	1	78	130	70	140,8	1	6,6	(-)	1	1	1	1	1	(-)	0	(-)	5	1	
67	0	60,1	1	1	0	42	0	0	6	0	(-)	38,7	1	100	104	68	69,1	0	16,0	0,43	(-)	1	(-)	1	1	4	0	(-)	1	0	
68	0	53,7	1	1	1	29	0	0	3	1	39,0	39,0	1	89	97	60	255,9	1	38,3	(-)	1	1	0	0	1	4	1	1	4	1	
69	0	67,3	0	1	0	7	0	1	0	0	(-)	36,5	0	80	128	44	69,2	0	9,9	0,09	0	1	(-)	(-)	1	3	0	(-)	0	0	
70	0	64,5	0	1	0	10	0	1	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	32,0	0	8,8	(-)	0	1	(-)	(-)	(-)	0	(-)	0	(-)	1	0

71	0	54,7	1	1	0	28	0	1	7	0	36,0	37,6	0	80	140	50	60,9	0	12,5	0,26	1	1	1	1	1	18	0	(-)	2	0
72	0	58,7	0	(-)	(-)	(-)	0	(-)	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	0	0
73	1	57,8	1	1	0	12	0	0	3	1	36,6	37,5	0	(-)	(-)	(-)	171,8	1	9,7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2	1	1	2	0	
74	0	49,8	1	1	0	6	0	1	3	1	(-)	37,7	0	69	94	58	12,3	0	16,0	(-)	0	1	(-)	(-)	1	1	1	1	0	
75	0	35,8	0	1	0	4	0	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1,0	0	7,9	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	0	(-)	1	0	
76	1	62,2	1	1	0	41	0	0	3	0	(-)	39,1	1	95	120	50	219,0	1	16,9	8,81	1	1	0	0	1	34	0	(-)	3	1
77	0	69,4	0	0	0	16	0	0	1	(-)	(-)	(-)	0	90	110	75	47,7	0	9,9	(-)	0	1	(-)	(-)	1	1	0	(-)	1	0
78	0	56,7	1	1	0	227	0	0	7	0	37,5	40,1	1	104	120	68	103,6	1	6,4	1,33	1	1	0	0	1	141	0	(-)	3	1
79	0	33,3	0	1	0	36	0	0	0	1	37,2	37,9	(-)	(-)	(-)	(-)	3,4	0	8,1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	6	0	(-)	1	0
80	0	83,8	0	1	0	6	0	1	0	1	38,0	38,0	0	(-)	(-)	(-)	0,4	0	8,4	(-)	0	1	(-)	(-)	0	0	0	(-)	1	0
81	0	71,0	0	1	0	38	0	0	4	0	37,6	37,6	0	110	90	50	161,1	1	15,5	(-)	1	1	1	0	1	2	0	(-)	3	1
82	1	43,3	0	1	0	1	0	(-)	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	0	(-)	1	0
83	0	78,4	1	1	0	37	0	1	4	1	36,5	38,9	1	100	80	40	385,7	1	17,5	(-)	1	1	1	(-)	1	14	0	(-)	5	1
84	0	51,6	0	0	0	5	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	0	(-)	0	0	0
85	1	54,0	0	1	0	3	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	7,7	0	6,7	(-)	(-)	1	(-)	(-)	0	0	0	(-)	0	0
86	0	66,3	1	1	0	4	0	1	3	1	36,8	38,5	1	105	125	60	20,0	0	9,7	(-)	1	1	1	0	0	0	0	(-)	4	1
87	0	62,8	1	1	0	21	0	0	2	0	(-)	(-)	1	(-)	(-)	(-)	205,3	1	12,1	(-)	1	1	1	1	0	0	0	(-)	4	1
88	0	62,8	1	0	0	26	0	0	3	1	36,9	37,3	0	50	160	68	1,4	0	9,7	0,08	0	1	(-)	(-)	1	1	0	(-)	1	0
89	0	55,7	0	1	0	5	0	0	0	0	36,0	37,0	0	80	150	80	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0	(-)	(-)	0	0	0	(-)	0	0
90	0	68,9	1	1	0	30	0	1	3	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1	0	0
91	1	21,4	0	0	0	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	0	0	0
92	0	73,6	0	(-)	0	0	0	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	(-)	0	0
93	0	54,2	1	1	0	8	0	0	3	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	64,2	(-)	12,7	(-)	(-)	(-)	1	(-)	(-)	(-)	1	1	1	0

Anhang 2: WGS - DNA-Gewinnung und Aufbereitung

18.05.2021

DNA-Extraktion nach dem Schema für *S. aureus*/MRSA

DNA-Extraktion *von S. aureus/MRSA für WGS und RAPD-Isolate*

Reagenzien:

- TE Puffer pH 8,0 (Sigma-Aldrich, 93283-100ML)
- DNeasy Kit (Fa. Qiagen)
- Lysostaphin [Fa. Genaxxon; S.5201.001 (2,5mg/ml → 400 µl TE pH8 + 1 mg LS)]
- Ethanol 100% (unvergällt)

Schritt 1

Lyse:

- Bakterien aus ÜN-Kultur in 180 µl TE-Puffer suspendieren
- 2 µl Lysostaphin hinzufügen und bei 37°C 30 Minuten bei leichtem Mischen inkubieren
- 20 µl Proteinase K und 180 µl AL-Puffer hinzugeben und 10 Sekunden pulsvortexen
- 30 Minuten bei 56°C inkubieren (leichtes Mischen)

Schritt 2

DNA-Isolation:

- 200 µl Ethanol dazugeben und 20 Sekunden Pulsvortexen
- Komplette auf die Spin Column (Säule) geben
- 1 Minute bei 9000 rpm zentrifugieren
- Säule in ein neues Auffanggefäß setzen und 500 µl AW1-Puffer dazu pipettieren
- 1 Minute bei 9000 rpm zentrifugieren
- Säule in ein neues Auffanggefäß setzen und 500 µl AW2-Puffer dazu pipettieren
- 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule in 1,5 ml Eppendorf Tubes geben und 150 – 200 µl nucleasefreies H₂O zugeben
- 5 Minuten bei 56°C inkubieren
- 1 Minute bei 9000 rpm zentrifugieren
- Eluat messen und einfrieren

DNA-Extraktion nach dem Schema für MOTT

DNA-Extraktion *Glassbeads-Aufreinigung für MOTT's*

- 3 – 4 Kolonien aus ÜN Kultur in Aufreinigungspuffer mit Glassbeads (vorgefertigt) geben
- 10 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock inkubieren, bei RT kurz abühlen lassen
- 10 Minuten stark vortexen

- 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand ca. 200 µl in Eppendorf Tubes umfüllen
→ Überstand wird in die PCR eingesetzt

19.05.2021

11.1.1 Library Preparation Teil 1

Library Preparation *Verwendung des DNA Flex Kit (QIAGEN)*

Morgens alle Reagenzien auf Raumtemperatur stellen → INDEXES und EPM im Kühlschrank auftauen lassen

Tagment Genomic DNA

Dieser Schritt benutzt die Bead-Linked-Transposomes (BLT) um die DNA zu markieren. Dieser Prozess fragmentiert und markiert die DNA mit Adaptersequenzen.

Materialien:

- BLT (Magnetic Beads)
- TB1 (tagmentation Buffer 1)
- Nuclease freies Wasser
- 0,2 ml Tubes
- 1,5 ml Tubes
- Pipettenspitzen (10-1000 µl)
- Magnetplatte

Vorbereitung:

- BLT (2°C bis 8°C) → auf Raumtemperatur bringen
- TB1 (-25°C bis -15°C) → auf Raumtemperatur bringen

Durchführung:

- Über die Picogreen-Konzentration DNA-Konzentration auf 50-250 ng absolut berechnen und dann 2-15 µl DNA in ein 0,2 ml PCR-tube geben. Den Rest mit Nuclease freiem Wasser auffüllen → Endvolumen 15 µl
- BLT für 1-2 Minuten vortexen
- Folgende Reagenzien mischen, um den Tagmentation-Mastermix vorzubereiten:
 - BLT (5,5 µl)
 - TB1 (5,5 µl)
 - → Probenanzahl x5,5 µl = Mastermix
- Mastermix gründlich vortexen
- 10 µl Tagmentation Mastermix in jedes Tube pipettieren → alle 4 Proben Mastermix vortexen → Endvolumen 25 µl
- Alle Proben nochmals leicht vortexen
- Tubes in Cyler stellen, Programm: TAG FLEX.CYC (15 min./55°C)

RSB auftauen

Post tagmentation Cleanup

Dieser schritt wäscht die Adaptermarkierte DNA auf den BLT, bevor die PCR amplifiziert wird

Materialien:

- TSB (Tagment Stop Buffer, 2-8°C); Handwarm, wenn "flockig"
- TWB (Tagment Wash Buffer)
- 0,2 ml Tubes
- Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)

Vorbereitung:

- TSB (15-30°C) → auf Raumtemperatur bringen, vortexen bis der Bodensatz gelöst ist
- TWB (15-30°C) → auf Raumtemperatur bringen

Durchführung:

- Proben kurz anfügen
- 5 µl TSB zur Tagmentation Reaktion geben
- Einzeln in jedes Tube geben, leicht vortexen
- Langsam pipettieren, um die Beads zu resuspendieren
- Tubes in Cycler stellen, Programm: INCUBFLE (15 min/37°C) → runterkühlen lassen, nicht vortexen → kurz anfügen
- Tubes direkt auf Magnet stellen, bis die Lösung klar wird (ca. 3 min)
- Überstand entfernen (ca. 40 µl)
- 2x waschen (Multikanal) (→ Schaum vermeiden!):
 - Tubes aus dem Magneten entnehmen
 - 70 µl TWB dazugeben und resuspendieren
 - Tubes auf das Magnet stellen, bis die Lösung klar wird
 - Überstand mit Pipette entfernen (ca. 100 µl)
- Platte auf Magnet stellen → Überstand wird erst kurz vor Mastermix-Zugabe entfernt → kleine Reste mit 10 µl-Spitzen komplett entfernen

Tagmentierte DNA amplifizieren

Dieser Schritt amplifiziert die tagmentierte DNA. Dieser PCR-Schritt addiert Index 1.Adapters, Index 2.Adapters und die benötigten Sequenzen für die Sequenzierung.

Materialien:

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Index Adapters
- Nuclease freies Wasser
- Magnetplatte
- 1,5 ml Tubes
- Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)

Vorbereitung:

- EPM (-25°C bis -15°C) → auf Eis auftauen
- Index Adapters (-25°C bis -15°C) → auf Raumtemperatur bringen

Durchführung:

- PCR-Mastermix in 1,5 ml Tube ansetzen
- EPM (11 µl)
- Nuclease freies Wasser (11 µl)
- → Probenanzahl x11 µl = Mastermix; direkt auf Eis stellen
- PCR-Mastermix vortexen

- TWB mit Pipette entfernen
- Tubes aus dem Magnet entnehmen
- 20 µl EPM-PCR-Mastermix in jedes Tube geben und gut resuspendieren → Tubes auf kalte Platte stellen
- Die entsprechenden Index Adapters zu den entsprechenden Proben geben (Excel Tabelle verwenden, für Auswertung wichtig) → mit Mehrkanalpipette 5 µl bei CD Index Plate zum Mastermix geben und gründlich mischen → vortexen
- Tubes in Cycle stellen, Programm: PCRFLEX (5x(98°/45s+62°C/30s+68°C/2min+68°C/1min) → ∞ 10°C

Clean Up Libraries

Dieser Schritt reinigt die amplifizierte Libraries auf, durch ein doppelseitiges Bead-Aufreinigungsverfahren

Materialien:

- SPB (Sample Purification Beads)
- EtOH (frisch zubereitet)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 0,2 ml Tubes
- Magnetplatte
- 1,5 ml Tubes
- Nuclease freies Wasser
- Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)

Vorbereitung:

- SPB (2 bis 8°C) → auf Raumtemperatur bringen (30min) und gründlich vortexen
- RSP (-25°C bis -15°C) → auf Raumtemperatur bringen und vortexen

Durchführung:

- Vortexen danach kurz anfügen
- Tubes auf das Magnet stellen, bis die Lösung klar wird (ca. 5 Minuten)
- 22,5 µl Überstand einzeln in ein neues 0,2 ml Tube geben
- SPB-Reagenzien gründlich vortexen
- SPB-Mastermix in 1,5 ml Tube ansetzen
 - SPB (24,75 µl)
 - Nuclease freies Wasser (22 µl)
 - → Probenanzahl x 1 Probe mehr = Mastermix
- 42,5 µl SPB-Mastermix einzeln in jedes Tube geben und 10x auf- und abpipettieren → Mastermix nach 4 Proben gründlich vortexen → alle Proben zum Schluss leicht vortexen
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Tubes auf Magnet stellen und warten bis der Überstand klar wird (ca. 5 Minuten)
- Unverdünntes SPB vortexen und 7,5 µl in ein neues 0,2 ml Tube vorlegen
- 62,5 µl Übersand in das neue 0,2 µl Tube transferieren (beinhaltet SPB) und gut mischen → alle Proben zum Schluss leicht vortexen
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

- 5 Minuten auf Magnet inkubieren
- Überstand entfernen (ca. 100 µl)
- 2x waschen mit Mehrkanalpipette:
 - 200 µl frisches 80% EtOH (16g EtOH + 4g H₂O)
 - 30 Sekunden inkubieren
 - Überstand abnehmen, ohne die Beads zu zerstören
 - 150 µl 80% EtOH auf die Tubes geben
- EtOH mit Pipette entfernen (ca. 220 µl)
- Auf Magnet lufttrocknen (Haarrisse) → bis kein Tropfen mehr zu sehen ist
- Tubes aus dem Magnet entfernen und 20 µl RSB zu den Beads geben und resuspendieren
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Tubes auf das Magnet stellen und warten bis die Flüssigkeit klar wird (ca. 2 Minuten)
- 18 µl Überstand in ein neues Tube pipettieren

Lagerung der Zwischenprodukte bei ca. -20 °C

20.05.2021

11.1.2 Library Preparation Teil 2 und Sequenzierung

Quantifizierung Picogreen (Doppelbestimmung)

- Konzentration mit Excel berechnen
- Proben mit RSB auf 4 nM einstellen → Excel
- Proben poolen → 3-5 µl pro Library in 1,5 ml Tube

Verdünnung der Proben auf 8 pM + pHIX (interne Kontrolle)

Vorbereitung:

- HT1 (-25°C bis -15°C) → auf Raumtemperatur auftauen → dann bei 2-8°C, bis er gebraucht wird

Durchführung Denaturierung:

- Die 2 folgenden Inhalte kombinieren:
 - 4 nM library (5 µl) → Pool (4000 pM)
 - 0,2 N NaOH (5 µl) → Frisch verdünnen (NaOH (-20°C): Stock 2 nM → 1:10 mit nucleas freiem Wasser verdünnen → 2 nM [0,5 nM])
- Denaturierung: 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren → danach direkt auf Eis
- 990 µl (vorgekühlt) HTa dazugeben → auf Eis stellen → Endvolumen 1 ml (entspricht 1:100 → 20 pM)

Denaturierte 20 pM Library auf 8 pM verdünnen:

Konzentration	8 pM	10 pM	12 pM	13 pM	14 pM	15 pM	16 pM
20 pM library	228 µl	285 µl	342 µl	371 µl	399 µl	428 µl	456 µl
inkl. HT1							

Vorgekühlter HT1	360 µl	300 µl	240 µl	210 µl	181 µl	150 µl	121 µl
PhiX (20 pM, -20°C, 5% von Library)	12 µl	15 µl	18 µl	19 µl	20 µl	22 µl	23 µl

→ Endvolumen: 600 µl

→ = 1 pM → 28,5 µl Library

Sample sheet erstellen

Sequenzer starten

Materialien:

- MiSeq Reagent kit (Cartridge mit allen Puffern, HT1 Puffer) → - 20°C
- MiSeq Reagent Kit (Laufpuffer, Flow Cell) → 4°C

Cartridge auftauen:

- Mittels Wasserbad, Dauer ca. 1 -1 ½ Stunden
- Cartridge ist dann vollständig aufgetaut, wenn mittlerer Puffer mit größtem Volumen keine Kristalle mehr enthält. Sofern Cartridge noch nicht gebraucht wird, in den Kühlschrank stellen.
- Nachdem Cartridge aufgetaut ist, mindestens 10x über Kopf schwenken und danach darauf achten, dass die Reagenzien sich am Boden befinden und nicht im Deckel hängen
- Die dafür vorgesehene Position für die Probe im Cartridge mit einer Pipettenspitze größtmöglich vorstanzen und die Probe zupipettieren

MiSeq starten

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Klassifikationsergebnisse



Projektinfo

Projekt-ID: 20210428-1011020454-02
 Kommentar:
 Projekt erzeugt von: tof-user@MBT-WIN10
 Projekt erzeugt am: 2021-04-28T16:02:11.882
 Anzahl der Analyten: 26
 Typ: Standard
 Validierung: nicht vorhanden
 Validierungsposition:
 Instrument-ID: 8604832.05364
 Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Ergebnisübersicht

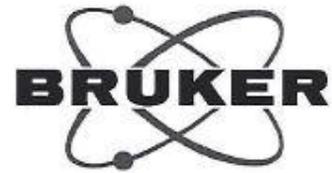
Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs- zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs- zahl
$\frac{1}{+++}$ (A)	1-1 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.19</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.15</u>
$\frac{1}{(-)}$ (A)	1-1 (Standard)	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>
$\frac{2}{+++}$ (A)	2-2 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.04</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.57</u>
$\frac{2}{+++}$ (A)	2-2 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.11</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.50</u>
$\frac{3}{(-)}$ (A)	3-3 (Standard)	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>
$\frac{3}{+++}$ (A)	3-3 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.12</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.60</u>
$\frac{4}{+++}$ (A)	4-4 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.16</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.76</u>

Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung auf nächster Seite

<i>Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung von vorheriger Seite</i>					
Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs- zahl	Organismus (zweitbest- Treffer)	Bewertungs- zahl
$\frac{4}{+++}$ (A)	4-4 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.25</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.63</u>
$\frac{5}{+++}$ (A)	5-5 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.23</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.52</u>
$\frac{5}{+++}$ (A)	5-5 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.20</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.14</u>
$\frac{7}{+}$ (A)	7-7 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.94</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.84</u>
$\frac{7}{+++}$ (A)	7-7 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.29</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.29</u>
$\frac{8}{+++}$ (A)	8-8 (Standard)	Staphylococcus epidermidis	<u>2.05</u>	Staphylococcus epidermidis	<u>1.97</u>
$\frac{8}{+}$ (A)	8-8 (Standard)	Staphylococcus epidermidis	<u>1.96</u>	Staphylococcus epidermidis	<u>1.93</u>
$\frac{9}{+}$ (A)	9-9 (Standard)	<u>Actinotignum schaalii</u>	<u>1.93</u>	<u>Actinotignum schaalii</u>	<u>1.90</u>
$\frac{9}{+++}$ (A)	9-9 (Standard)	<u>Actinotignum schaalii</u>	<u>2.13</u>	<u>Actinotignum schaalii</u>	<u>2.12</u>
$\frac{10}{-}$ (A)	10-10 (Standard)	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>
$\frac{10}{+++}$ (A)	10-10 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.28</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.82</u>
$\frac{11}{+++}$ (A)	11-11 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.21</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.73</u>
$\frac{11}{-}$ (A)	11-11 (Standard)	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>
$\frac{12}{+++}$ (A)	12-12 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.20</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.15</u>
$\frac{12}{-}$ (A)	12-12 (Standard)	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>
$\frac{13}{+++}$ (A)	13-13 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.15</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.15</u>
<i>Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung auf nächster Seite</i>					

<i>Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung von vorheriger Seite</i>					
Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs- zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewer- tungs- zahl
<u>13</u> (+++)(A)	13-13 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.43</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.42</u>
<u>14</u> (+++)(A)	14-14 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.25</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.22</u>
<u>14</u> (+++)(A)	14-14 (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.09</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.95</u>

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Klassifikationsergebnisse



Projektinfo

Projekt-ID: 20210828-1011003569-02
 Kommentar:
 Projekt erzeugt von: tof-user@MBT-WIN10
 Projekt erzeugt am: 2021-08-28T15:46:54.262
 Anzahl der Analyten: 18
 Typ: Standard
 Validierung: nicht vorhanden
 Validierungsposition:
 Instrument-ID: 8604832.05364
 Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Ergebnisübersicht

Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs- zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs- zahl
<u>46.</u> (+++)(A)	46.-46. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.13</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.11</u>
<u>46.</u> (+++)(A)	46.-46. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.29</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.19</u>
<u>48.</u> (+++)(A)	48.-48. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.06</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.04</u>
<u>48.</u> (+++)(A)	48.-48. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.25</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.14</u>
<u>49.</u> (+++)(A)	49.-49. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.34</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.25</u>
<u>49.</u> (-)(A)	49.-49. (Standard)	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>
<u>50.</u> (+++)(C)	50.-50. (Standard)	Microbacterium arborescens	<u>2.06</u>	Microbacterium lacticum	<u>1.72</u>

Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung auf nächster Seite

Ergebnisübersichtstabelle – Fortsetzung von vorheriger Seite					
Analyt-Name	Analyt- ID	Organismus (bester Treffer)	Bewertungs- zahl	Organismus (zweitbester Treffer)	Bewertungs- zahl
<u>50</u> (+++)(C)	50.-50. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.12</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.64</u>
<u>51</u> (+)(A)	51.-51. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.98</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.80</u>
<u>51</u> (+++)(A)	51.-51. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.20</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.86</u>
<u>52</u> (+)(A)	52.-52. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.87</u>	Staphylococcus capitis	<u>1.71</u>
<u>52</u> (+++)(A)	52.-52. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.05</u>	Staphylococcus capitis	<u>1.77</u>
<u>53</u> (+++)(A)	53.-53. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.00</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.95</u>
<u>53</u> (-)(A)	53.-53. (Standard)	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>	keine Peaks gefunden	<u>0.00</u>
<u>55</u> (+++)(A)	55.-55. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.19</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.92</u>
<u>55</u> (+++)(A)	55.-55. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.05</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.65</u>
<u>56</u> (+++)(A)	56.-56. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.04</u>	Keine Identifikation des Organismus möglich	<u>1.66</u>
<u>56</u> (+++)(A)	56.-56. (Standard)	Staphylococcus saccharolyticus	<u>2.10</u>	Staphylococcus saccharolyticus	<u>1.74</u>