

Aus dem Institut für
Klinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor Univ. Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

**Spezies- und Resistenzbestimmung von Darmmikrobiota
mittels metagenomischer Whole Genome Sequenzierung
aus Analabstrichen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Clemens von Wnuck-Lipinski

(2023)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Zweitgutachter: PD Dr. med. Hans Martin Bosse

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern, die mich mein ganzes Studium und darüber hinaus in jeder Lebenslage unterstützt haben.

Zusammenfassung

Multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN) nehmen weltweit zu. Infektionen führen zu signifikant höherer Morbidität und Mortalität. Oft stehen nur noch wenige oder gar keine Antibiotika als Therapie zur Verfügung. Umso wichtiger ist es, die Transmission zu verhindern. Hierzu werden im Krankenhaus Screening- und Isolationsmaßnahmen eingesetzt. Das Screening auf MRGN-Erreger basiert aktuell auf der kulturellen, phänotypischen Testung und dauert bis zu 96 Stunden. In Zukunft könnte mittels molekularer Verfahren eine schnellere Diagnostik erfolgen. Ein vielversprechender Ansatz ist die metagenomische *Whole Genome* Sequenzierung. Dabei wird die gesamte DNA einer Patientenprobe sequenziert. Anschließend können die Sequenzdaten dazu genutzt werden, bakterielle Resistenzgene mithilfe bioinformatischer Datenbanken zu identifizieren und damit phänotypische Antibiotikaresistenzen vorherzusagen.

Im Rahmen dieser *Proof-of-Concept* Studie wurden 54 Anal-Screeningabstriche auf diese Weise analysiert. Ziel war es, eine genotypische Spezies- und Resistenztestung vorzunehmen und das Ergebnis mit der kulturellen MRGN-Testung zu vergleichen. Hierzu wurde zunächst der Anteil humaner DNA in den Analabstrichen verringert, dann wurde die DNA extrahiert und schließlich sequenziert. Anschließend wurden die gewonnenen DNA-Sequenzen mit bioinformatischen Datenbanken abgeglichen, um die Bakterien zu identifizieren und nach Antibiotikaresistenzgenen zu suchen.

Anhand der DNA-Sequenzen konnte die kulturell nachgewiesene Spezies in allen Proben identifiziert werden. Die phänotypisch nachgewiesenen Antibiotikaresistenzen wurden allerdings mithilfe der genotypischen Testung häufig überschätzt. Auch in Proben, in denen kulturell kein MRGN-Erreger nachgewiesen werden konnte, wurden mittels Sequenzierung zahlreiche, potenzielle MRGN-Erreger gefunden. Schwierigkeiten bei der Interpretation der nachgewiesenen Resistenzgene zeigten die Limitationen der Studie und der genotypischen Resistenztestung allgemein.

Zusätzlich zu der Resistenzgenanalyse wurde das Mikrobiom der Analabstriche analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zum physiologischen Mikrobiom Enterobacterales stark dominierten. Ein Alleinstellungsmerkmal der Studie war, zumindest in dieser Größenordnung, die Zuordnung der Resistenzgene zur Ursprungsspezies. Anhand der Resistenzgen flankierenden Regionen wurde diese mittels bioinformatischer Software und einer Datenbank ermittelt. Die Zuordnung auf Speziesebene gelang in 80,8 % der Fälle und ermöglichte die Analyse von Patientenproben mit einer bakteriellen Diversität. Bisherige Studien waren meist limitiert auf die Resistenzgenanalyse von Isolaten oder Patientenproben mit einem einzigen Erreger.

Summary (English)

Multidrug resistant gram-negative rods (MRGN) are increasing worldwide. Infections lead to significant higher morbidity and mortality. Often there are almost no antibiotics available for therapy. Screening and isolation measures are used to prevent transmission. The MRGN screening is currently based on culture and phenotypic testing and can take up to 96 hours. In the future genotypic testing could allow faster identification of MRGN carriers. A promising technique is metagenomic whole genome sequencing. For this purpose DNA of a patient sample is sequenced. Afterwards the sequenced data can be analysed to identify resistance genes by alignment with bioinformatic databases to predict phenotypic antibiotic resistance.

In this proof-of-concept study 54 anal-screening swabs were analysed this way. The aim was to perform a genotypic species and resistance testing and to compare the results with the results of conventional, cultural MRGN testing. Therefore, the sample was depleted of human DNA and the non-human DNA then extracted and sequenced. Next the sequences were aligned with bioinformatic databases to identify all obtained species and antibiotic resistance genes.

Sequence analysis identified all of the species found by culture in all samples. Resistance genes were more often found than by phenotypic resistance testing. Even in samples, in which no phenotypic resistance was found, numerous potentially MRGN bacteria in the sequence data were identified. The difficulties of interpretation demonstrated the limitations of the study and genotypic resistance testing in general.

Additionally, the microbiome of the anal-swabs was analysed and showed a significant domination of Enterobacterales compared to the usual physiological microbiome. A unique feature of the study, at least at the scale implemented, was the attribution of resistance genes to species by analysing the resistance genes flanking regions. The attribution was successful in correlating the resistance gene with bacterial species in 80,8 % of cases. In contrast, previous studies were limited to a resistance gene analysis of isolates or patient samples with a single pathogen.

Abkürzungen:

ARG.....	Antibiotikaresistenzgen
<i>bla</i>	Betalaktamase-Gen
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
CARD.....	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA.....	doppelsträngige DNA
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. cloacae</i> Komplex.....	<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUCAST.....	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA.....	<i>Food and Drug Administration</i>
Gb.....	Gigabasen
Gbp.....	Gigabasenpaare
I.....	sensibel bei erhöhter Exposition
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
k. n. S.	kulturell nachgewiesene Spezies
Kb.....	Kilobasen
Kbp.....	Kilobasenpaare
KRINKO.....	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
MALDI-TOF MS.....	<i>Matrix-assisted laser desorption time-of-flight-Massenspektrometrie</i>
Mb.....	Megabasen
Mbp.....	Megabasenpaare
MDR.....	<i>Multi-drug resistant</i>
MHK.....	Minimale Hemmkonzentration
MRGN.....	Multiresistente gram-negative Bakterien
MRSA.....	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP.....	Penicillin-bindendes Protein
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PDR.....	<i>Pan-drug resistant</i>
PMA.....	Propidium Monoazid
POCT.....	<i>Point-of-Care-Testing</i>
R.....	resistent
S.....	sensibel
WHO.....	<i>World Health Organisation</i>
XDR.....	<i>Extensively-drug resistant</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemein.....	1
1.2	Antibiotika.....	2
1.3	Antibiotikaresistenzen.....	2
1.4	Genetik.....	3
1.5	Multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN).....	3
1.6	Konventionelle Spezies- und Resistenzdiagnostik.....	4
1.7	Antibiogramm.....	4
1.8	MRGN-Klassifikation.....	4
1.9	MRGN-Screening.....	5
1.10	MRGN-Epidemiologie.....	6
1.10.1	Resistenzrate.....	6
1.10.2	Kolonisationsrate.....	7
1.11	Dekolonisation von MRGN.....	7
1.12	Genotypische Diagnostik.....	7
1.13	DNA-Sequenzierung.....	8
1.14	Bioinformatische Analyse.....	9
1.15	Potenzielle Vorteile der sequenzierungsbasierten, genotypischen Testung.....	9
1.16	Aktueller Stand der sequenzierungsbasierten, genotypischen Testung.....	10
1.17	Ziele der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Materialien.....	13
2.1.1	Kulturelle Diagnostik.....	13
2.1.2	Human DNA-Depletion und DNA-Isolation.....	13
2.1.3	Sequenzierung.....	14
2.1.4	Bioinformatische Auswertung.....	14
2.2	Methoden.....	15
2.2.1	Probengewinnung.....	15
2.2.2	Kulturelle Routinediagnostik.....	16
2.2.3	Vorversuche.....	16
2.2.4	Depletion humaner DNA und DNA-Isolation.....	17

2.2.5	Isolate.....	17
2.2.6	Qualitäts- und Quantitätsbestimmung mittels Nanodrop	18
2.2.7	Quantitätsbestimmung mittels Qubit vor Sequenzierung.....	18
2.2.8	Library Preparation und Nanopore-Sequenzierung.....	18
2.2.9	Basecalling mit Guppy	19
2.2.10	Taxonomische Zuordnung	19
2.2.11	ARG-Zuordnung	20
2.2.12	Statistische Analyse.....	20
3	Ergebnisse.....	21
3.1	DNA-Isolation und -Sequenzierung.....	21
3.1.1	Extrahierbare DNA-Menge.....	21
3.1.2	Menge an Sequenzdaten.....	22
3.2	Speziestestung (taxonomische Zuordnung).....	22
3.2.1	Reads insgesamt.....	23
3.2.2	Reads der kulturell nachgewiesenen Spezies.....	23
3.2.3	Humane Reads.....	23
3.2.4	Zusammensetzung des Mikrobioms	24
3.2.5	Abschätzung der Coverage	26
3.3	Resistenzgenanalyse allgemein.....	27
3.3.1	Vergleich MRGN-positiver und MRGN-negativer Proben.....	27
3.3.2	Zuordnung nach Resistenzmechanismus	27
3.4	Resistenzgenanalyse der kulturell nachgewiesenen Spezies	28
3.4.1	Quantitativer Vergleich	28
3.4.2	Resistenzgenanalyse mithilfe einer Auswertungsregel	30
3.4.3	Potenziell multiresistente Erreger in MRGN-negativen Proben.....	31
3.4.4	Resistenzgenanalyse anhand von Markergenen	31
3.5	Evaluation der Spezieszuordnung der Resistenzgene	33
3.6	Vergleich zwischen MRGN-positiver Probe und Isolat	34
4	Diskussion	35
4.1	Depletion humaner DNA.....	35
4.2	DNA-Isolation	36
4.3	Nanopore-Sequenzierung.....	37
4.4	Ausreichende Coverage	37
4.5	Zukünftige Optimierung der Coverage	38
4.6	Taxonomische Zuordnung und Mikrobiom	39

4.7	Resistenzgenanalyse.....	42
4.8	Zuordnung zum Resistenzmechanismus und zu den Antibiotikaklassen.....	43
4.9	Resistenzgenanalyse der kulturell nachgewiesenen Spezies	44
4.9.1	Spezieszuordnung.....	44
4.9.2	Grundlagen der genotypischen Resistenztestung.....	45
4.9.3	Auswertung	46
4.9.4	Bestätigung phänotypischer Resistenzen in MRGN-positiven Proben	47
4.9.5	Suche nach potenziellen MRGN-Erregern in MRGN-negativen Proben.....	47
4.10	Schwierigkeiten bei der Interpretation	48
4.10.1	ARG-Datenbank	48
4.10.2	Expression.....	48
4.11	Gezielte Suche nach Markergenen.....	49
4.11.1	Penicilline und Cephalosporine.....	50
4.11.2	Fluorchinolone	50
4.11.3	Carbapeneme.....	51
4.12	Konsensus der ARG in der MRGN-positiven Probe und im Isolat.....	52
4.13	Vorhersagekraft.....	52
4.14	Schnelligkeit	53
4.15	Einschränkungen der Studie.....	54
4.16	Ausblick	55
5	Literaturverzeichnis.....	56

1 Einleitung

1.1 Allgemein

Die Entdeckung und industrielle Herstellung von Antibiotika im letzten Jahrhundert revolutionierte die Medizin und rettete Millionen von Leben. Aktuell bedrohen jedoch zunehmend Resistenzen die Wirksamkeit vieler Antibiotika. Weltweit könnten bis 2050 jährlich 10 Millionen Menschen an multiresistenten Bakterien sterben, mehr als durch Krebs [1]. In Deutschland erkranken schon jetzt jährlich über 30.000 Patienten an einer nosokomialen Infektion mit multiresistenten Bakterien, von denen etwa 2000 versterben [2]. Wie Studien zeigen, führen Infektionen mit multiresistenten Bakterien sowohl zu signifikant höherer Morbidität und Mortalität als auch zu höheren Kosten für das Gesundheitssystem [3-5]. Besonders in den Fokus geraten multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN), da hier oft nur noch wenige oder gar keine Antibiotika als Therapie zur Verfügung stehen [6].

Aus medizinischer und ökonomischer Sicht ist somit die Eindämmung der Verbreitung multiresistenter Bakterien von höchster Priorität. Wichtig hierfür ist eine verantwortungsvolle und gezielte Antibiotikatherapie, um die Selektion und Verbreitung von Resistenzen zu minimieren. Aber auch Screening-Maßnahmen sind wichtig, um frühzeitig eine Kolonisation mit multiresistenten Bakterien zu erkennen und durch Isolationsmaßnahmen eine nosokomiale Transmission zu verhindern. Beide Ansätze sind auf eine zuverlässige und möglichst rasche mikrobiologische Diagnostik angewiesen.

Aktuell erfolgt die Spezies- und Resistenztestung durch kulturelle Verfahren. Dies dauert jedoch - bei schnell wachsenden Bakterien - in der Regel 24-72 Stunden [7]. In dieser Zeit erhalten Patienten mit akutem therapeutischem Handlungsbedarf eine kalkulierte, das heißt ungezielte, breite Antibiotikatherapie. In seltenen Fällen kann diese unwirksam sein oder durch das breit gewählte Wirkspektrum zu mehr Nebenwirkungen und zu erhöhtem Selektionsdruck führen. Im Hinblick auf Screening-Maßnahmen können, bis das Ergebnis vorliegt, kolonisierte, nicht isolierte Patienten den multiresistenten Erreger bereits übertragen, während präventiv isolierte, nicht kolonisierte Patienten in dieser Zeit unnötige Beeinträchtigungen haben und hohe Kosten verursachen [8]. Schnellere Testverfahren ohne kulturelle Anzüchtung werden dringend benötigt.

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Spezies- und Resistenztestung mittels *Whole Genome* Sequenzierung direkt aus Patientenproben. Auf diese Weise könnte in Zukunft eine allumfassende und sehr schnelle mikrobiologische Diagnostik möglich sein.

Da die Spezies- und Resistenztestung im Rahmen vieler verschiedener Indikationen und mit den unterschiedlichsten Probenarten durchgeführt wird, musste ein Anwendungsbereich und eine Probenart ausgewählt werden. Aufgrund der hohen Relevanz wurde die Entscheidung für die Analyse von Analabstrichen im Rahmen des Screenings auf MRGN-Erreger getroffen.

1.2 Antibiotika

1928 entdeckte Alexander Fleming das Penicillin [9]. Seit dem wurden zahlreiche Antibiotika entdeckt und konnten so die menschliche Lebenserwartung einer Schätzung zufolge um 23 Jahre erhöhen [10]. Der Selektionsdruck durch den massiven Einsatz in der Human- und Veterinärmedizin führt jedoch zu immer neuen resistenten Stämmen und macht die stetige Entwicklung neuer Antibiotika notwendig. Nachdem zwischen den 1980er Jahren und 2010 jedes Jahr weniger neue Antibiotika zugelassen wurden, gibt es aktuell einen leichten Aufwärtstrend bei den Neuzulassungen durch die *Food and Drug Administration* (FDA) [11, 12]. Dennoch warnt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) vor einer Post-Antibiotika Ära [13]. Da es immer schwieriger wird, neue Antibiotika zu entwickeln, fokussieren sich Forscher vermehrt auf die Entdeckung neuer Adjuvantien, die die Wirkung existierender Antibiotika verstärken und die Wirkung auch in der Zukunft sicherstellen [14]. Auch werden zunehmend ältere Substanzen wie Colistin oder Fosfomycin als Reserveantibiotika zur Therapie von MRGN-Erregern eingesetzt [15]. Jedoch sind diese Substanzen häufig mit stärkeren Nebenwirkungen assoziiert [16].

Die meisten Antibiotika hemmen die Proteinbiosynthese an den Ribosomen oder behindern die Zellwandsynthese (u. a. Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme). Auch andere Stoffwechselwege, wie z. B. die Folsäuresynthese und die Replikation (u. a. Fluorchinolone) sind mögliche Angriffspunkte. Teilweise werden Antibiotika untereinander oder mit Adjuvantien wie Betalaktamaseinhibitoren kombiniert, um Resistenzmechanismen zu umgehen.

1.3 Antibiotikaresistenzen

Resistenzmechanismen sind bei Bakterien weit verbreitet und dienen in der Natur dem Schutz vor Schadstoffen und somit als Selektionsvorteil. Primäre, intrinsische bzw. natürliche Resistenzen sind speziesspezifische Eigenschaften, die eine angeborene Unempfindlichkeit gegen bestimmte Noxen, wie z. B. Antibiotika vermitteln. Sekundäre, extrinsische bzw. erworbene Resistenzen sind dagegen erst durch Mutationen oder horizontalen Gentransfer mittels Vektor (z. B. Plasmide) neu hinzugekommen. Überall dort, wo sich viele Bakterien auch aus verschiedenen Spezies versammeln, besteht eine erhöhte Chance für Gentransfer, so z. B. im Gastrointestinaltrakt, im Krankenhaus, aber auch in Kläranlagen [17, 18].

Um ihre Wirkung zu entfalten, benötigen Antibiotika eine gewisse intrazelluläre Wirkstoffkonzentration. Dadurch ergeben sich zwei mögliche Wege für Bakterien, Resistenzen gegenüber Antibiotika zu entwickeln. Entweder sie senken die intrazelluläre Antibiotikakonzentration oder sie adaptieren sich an die erhöhte intrazelluläre Antibiotikakonzentration. Ersteres geschieht durch Inaktivierung (z. B. Betalaktamasen), chemische Veränderung (z. B. Phosphorylierung), Effluxpumpen, eine reduzierte Permeabilität (z. B. Porinverlust) oder Biofilmbildung. Letzteres durch Veränderungen an Zielstrukturen (z. B. verändertes Penicillin-bindendes Protein (PBP)), neue Zielstrukturen oder

Schutzproteine für Zielstrukturen. Die Regulation der Expression kann beide Wege unterstützen.

1.4 Genetik

Als Phänotyp wird die Merkmalsausprägung eines Organismus bezeichnet, hier die der Antibiotikaresistenzen. Der Phänotyp wird maßgeblich durch den Genotyp, also die zugrundeliegenden genetischen Eigenschaften bestimmt. Die Umwelt beeinflusst ebenfalls den Phänotyp, wobei die Art und Weise wie ein Organismus auf Umwelteinflüsse reagiert, wiederum durch den Genotyp festgelegt ist.

Auf Ebene des Genotyps werden Antibiotikaresistenzen einerseits durch Antibiotikaresistenzgene (ARG) hervorgerufen, deren primäre Funktion die Resistenzvermittlung ist. Andererseits spielen (mutierte) Struktur- und Regulatorgene eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu Mutationen wird ab einer gewissen Häufigkeit einer Sequenzvariation (Allelfrequenz des varianten Allels > 1 %) von Genvarianten gesprochen [19]. Oft ist das Zusammenspiel mehrerer Gene für eine phänotypische Antibiotikaresistenz notwendig. Als Beispiele zu nennen sind Effluxpumpengene, die typischerweise nur für eine Untereinheit der späteren Effluxpumpe kodieren (z. B. *mexA*, *mexB* und *oprM*, für die Effluxpumpe MexAB-OprM) oder Gene für induzierbare Betalaktamasen (z. B. *ampC*), die maßgeblich durch Regulatorgene (z. B. *ampR*) beeinflusst werden [20-22]. Gene, die für eine Antibiotikaresistenz kodieren, können chromosomal oder auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden vorliegen.

1.5 Multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN)

Gramnegative Bakterien unterscheiden sich im Aufbau der Zellwand von grampositiven Bakterien. Dieser Unterschied ist auch namensgebend, da er die Differenzierung mittels Gramfärbung erlaubt. Gramnegative Bakterien werden von einer inneren Membran, einer dünnen Mureinschicht und ganz entscheidend von einer zusätzlichen äußeren Membran umgeben. Die äußere Membran enthält Porine für den Austausch lebensnotwendiger Substanzen, stellt jedoch gleichzeitig eine Barriere für viele Antibiotika dar. Die Barrierefunktion ist sehr komplex und Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Grob vereinfacht können hydrophile Antibiotika bis zu einer bestimmten Größe durch die Porine eindringen, während größere, lipophile Antibiotika meist nur langsam durch die Membran diffundieren und häufig keine ausreichenden Konzentrationen erreichen [23, 24]. Daneben enthält die äußere Membran gramnegativer Bakterien zahlreiche Effluxpumpen, die Fremdstoffe aktiv aus der Zelle befördern [25]. Die Barrierefunktion der äußeren Membran und die Effluxpumpen sorgen für eine Vielzahl von natürlichen Resistenzen. Kommen durch Mutationen oder Gentransfer weitere hinzu, stehen nur noch wenige oder gar keine Antibiotika für die Therapie zur Verfügung.

1.6 Konventionelle Spezies- und Resistenzdiagnostik

Bei allen konventionellen Testverfahren wird zunächst eine Kultur angelegt. Dafür werden Patientenproben auf einem Medium, häufig einem Selektivmedium, ausgestrichen und unter optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert, in der Regel für mindestens 24 Stunden. Anschließend wird anhand einer repräsentativen Kolonie eine Spezies- und Resistenztestung vorgenommen. Die Speziesidentifizierung erfolgt heutzutage häufig mittels massenspektrometrischer Verfahren.

Resistenzen können phänotypisch über eine Wachstumshemmung nachgewiesen werden. Der Goldstandard ist die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Antibiotikaverdünnungsreihe. Die MHK ist die Antibiotikakonzentration, bei der gerade noch ein bakterielles Wachstum verhindert wird [26]. Heutzutage ermöglichen moderne Testsysteme eine automatisierte und kostengünstige MHK-Testung mittels Verdünnungsreihen und photometrischen Ablesesystemen [27].

1.7 Antibiogramm

Antibiogramme listen die Resistenzen und Sensibilitäten eines untersuchten Erregers in Bezug auf alle getesteten Antibiotika auf. Die MHK ist für sich genommen wenig aussagekräftig, da sie stets in Bezug auf den untersuchten Erreger und das getestete Antibiotikum hin interpretiert werden muss. In Deutschland werden die MHK-Werte hierzu meist mit den durch das EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) festgelegten Referenzwerten abgeglichen. Anhand von *Breakpoints* erfolgt die Einteilung in „S“ sensibel, „I“ sensibel bei erhöhter (*Increased*) Exposition und „R“ resistent. Die frühere Definition von „I“ als intermediär wurde am 01.01.2019 verlassen [28]. Hintergrund dieser klinisch relevanten Änderung ist die Tatsache, dass früher „I“ größtenteils zu „R“, das heißt nicht sensibel, gezählt wurde. Dadurch blieben Patienten Antibiotika vorenthalten, die ggf. bei höherer Dosierung gewirkt hätten. Außerdem wurden Erreger ggf. einer höheren MRGN-Kategorie zugeordnet. Die *Breakpoints* richten sich nach der bakteriellen Spezies und dem untersuchten Antibiotikum und berücksichtigen eine Vielzahl von Faktoren, wie z. B. die Pharmakokinetik des Antibiotikums. Sie werden fortwährend an die neusten wissenschaftlichen Erkenntnisse angepasst [29, 30]. Anhand des Antibiogramms können MRGN-Erreger klassifiziert werden.

1.8 MRGN-Klassifikation

Für die klinische Einschätzung epidemiologisch relevanter **multiresistenter gramnegativer** Erreger (*A. baumannii*-Komplex, *P. aeruginosa*, Enterobacterales) veröffentlichte die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) 2012 die MRGN-Klassifikation [31, 32]. Als 3MRGN gilt ein Erreger, wenn er gegen 3 der 4 definierten Leitsubstanzen Piperacillin (Acylureidopenicilline), Cefotaxim/Ceftazidim (Cephalosporine der 3./4. Generation) und Ciprofloxacin (Fluorchinolone) phänotypisch resistent ist.

Als 4MRGN gilt ein Erreger, wenn er gegen alle 4 Leitantibiotika inklusive Imipenem/Meropenem (Carbapeneme) resistent ist.

Neben der kulturellen Diagnostik wird im Rahmen des MRGN-Screenings eine Carbapenemase-PCR durchgeführt, falls sich in der kulturellen Testung eine erhöhte MHK bei den Carbapenemen zeigt. Bei Nachweis eines Carbapenemasegens wird ein Erreger ungeachtet der phänotypischen Testung immer als 4MRGN klassifiziert. Virulenzfaktoren und weitere Antibiotikaresistenzen werden in der MRGN-Klassifikation nicht berücksichtigt. Wenn ein Erreger gegen mindestens 3 Leitsubstanzen resistent ist, gilt er als multiresistent. Für eine bessere Lesbarkeit wurden im Folgenden Proben als MRGN-positiv (multiresistent) bezeichnet, in denen ein 3MRGN oder 4MRGN Erreger nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt wurden Proben als MRGN-negativ (nicht multiresistent) bezeichnet, in denen nur Erreger nachgewiesen werden konnten, die gegen weniger als 3 Leitsubstanzen resistent waren.

Die MRGN-Klassifikation findet hauptsächlich in Deutschland Verwendung. International werden resistente Bakterien häufig als MDR/XDR/PDR (*multi-, extensively- and pan-drug resistant*) beschrieben. Seit 2011 gibt es eine einheitliche Klassifikation [33]. Die hohe Komplexität erlaubt eine gute Vergleichbarkeit für wissenschaftlich-epidemiologische Studien, macht sie jedoch für den klinischen Einsatz ungeeignet. In Zukunft könnte sich eine einheitliche, genetische Klassifikation als hilfreich erweisen.

1.9 MRGN-Screening

Ziel des MRGN-Screenings ist die Früherkennung meist symptomlos kolonisierter Patienten, um durch Isolationsmaßnahmen die Transmission zu verhindern (Sekundärprävention). Verschiedene Faktoren erhöhen laut einer Studie die Wahrscheinlichkeit für eine Besiedlung mit MRGN-Erregern: eine Antibiotikatherapie in den letzten sechs Monaten, eine Kolonisation mit MRGN-Erreger in der Vergangenheit, ein vorheriger Krankenhausaufenthalt, eine Reise außerhalb Europas und eine Anti-Reflux-Therapie mit Antaziden oder Protonenpumpeninhibitoren in den letzten sechs Monaten [34].

Für MRGN-Erreger stellt der Gastrointestinaltrakt das wichtigste Reservoir im menschlichen Körper dar [35]. Im Idealfall müssten also Proben direkt aus dem Darmlumen bzw. aus Stuhlproben untersucht werden. Da diese jedoch nur schwer und unangenehm für den Patienten zu gewinnen sind, werden stellvertretend Abstriche von besonders häufig besiedelten und einfach zugänglichen Körperregionen genommen. Hierzu eignen sich insbesondere Perianal- und Rektalabstriche [36, 37]. Aber auch Abstriche von Achselhöhlen, Leisten und Nasopharynx können im Rahmen des MRGN-Screenings untersucht werden.

Die Kolonisation mit multiresistenten Bakterien ist meist nicht vital bedrohlich, stellt aber einen Risikofaktor für komplizierte Verläufe nosokomialer Infektionen dar [38, 39]. Auch wenn der

betroffene Patient nicht selbst erkrankt, so muss die Transmission auf andere vulnerable Personen verhindert werden. Eine Studie konnte zeigen, dass Screening-Maßnahmen auf einer Intensivstation die Transmission signifikant senken konnten [40]. Abgesehen davon haben Screening-Maßnahmen auch eine therapeutische Bedeutung. Eine Studie zeigte, dass eine Bakteriämie auf einer Intensivstation zu 74,5 % von dem gleichen multiresistenten Keim ausging, der zuvor im Screening gefunden wurde [41]. Dies wiederum führte zu einer deutlich höheren Rate an initial zielgerichteten Antibiotikatherapien. Auch eine andere Studie zeigte ähnliche Ergebnisse für Patienten mit Sepsis und beatmungsassoziierter Pneumonie [42].

In Deutschland basiert das MRGN-Screening auf den Empfehlungen der KRINKO [32]. Da die Transmission von multiresistenten Krankenhauskeimen in der Regel über direkten Kontakt meist mit den Händen erfolgt, ist die Kontaktisolation das Mittel der Wahl bei kolonisierten Patienten. Auch die Universitätsklinik Düsseldorf orientiert sich bei den klinikinternen Leitlinien an den Empfehlungen der KRINKO. In Risikobereichen wie z. B. Intensivstationen werden Patienten mit 3MRGN und 4MRGN-Kolonisation isoliert, in allen anderen Bereichen nur 4MRGN kolonisierte Patienten. Patienten mit Risikofaktoren für eine Kolonisation mit multiresistenten Bakterien bekommen ein initiales Screening bei der Aufnahme und werden isoliert, bis das Ergebnis vorliegt. Alle Patienten, die auf der Intensivstation oder der *Intermediate Care Station* liegen, bekommen ein initiales Screening bei der Aufnahme und werden wöchentlich erneut gescreent. Ein gehäuftes Auftreten von MRGN-Infektionen bei Patienten auf einer Station ist meldepflichtig.

1.10 MRGN-Epidemiologie

Es gibt verschiedene Herangehensweisen die Epidemiologie multiresistenter Erreger zu betrachten.

1.10.1 Resistenzrate

Die Resistenzrate betrachtet den Anteil resistenter Erreger bezogen auf alle Testungen derselben Spezies [35, 43]. Anhand der Resistenzrate kann die Wirksamkeit einer kalkulierten Antibiotikatherapie abgeschätzt werden. Die Resistenzraten unterscheiden sich in ihrer Dynamik je nach Spezies und getestetem Antibiotikum. Laut aktuellen Daten sind die Resistenzraten gegenüber Carbapenemen in Europa zwischen 2016 und 2020 bei *E. coli* (0,1 % auf 0,2 %), *K. pneumoniae* (8,4 % auf 10,0 %) und *Acinetobacter* spp. (37,1 % auf 38,0 %) leicht gestiegen, während sie bei *P. aeruginosa* (20,1% auf 17,8%) leicht gefallen sind. Auch gibt es große regionale Unterschiede. Werden die Resistenzraten gegenüber Carbapenemen im gleichen Zeitraum in Deutschland betrachtet, so sind sie erfreulicherweise für *E. coli* (konstant bei 0,0 %), *K. pneumoniae* (konstant bei 0,5 %), *P. aeruginosa* (14,5 % auf 13,8 %) und *Acinetobacter* spp. (4,9 % auf 3,5 %) deutlich niedriger und es ist kein Anstieg zu beobachten [44]. Möglicherweise zeigen sich bereits erste Erfolge des seit 2012 von der KRINKO empfohlenen MRGN-Screenings.

1.10.2 Kolonisationsrate

Die Kolonisationsrate gibt den Anteil einer Population an, der mit einem bestimmten Erreger kolonisiert ist [35]. Zur Kolonisationsrate von MRGN-Erregern im Speziellen finden sich keine Studien, da die Klassifikation überwiegend in Deutschland Verwendung findet. Um die Größenordnung der Kolonisationsrate von MRGN-Erregern bei Patienten in deutschen Krankenhäusern abzuschätzen, kann jedoch eine Studie aus dem Jahr 2016 dienen [34]. Hier betrug die Kolonisationsrate von Enterobacterales, die gegen Cephalosporine der dritten Generation resistent waren, 9,5 %.

1.11 Dekolonisation von MRGN

Während eine Dekolonisation bei MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) möglich ist und praktiziert wird, ist eine Dekolonisation bei MRGN-Erregern aktuell nicht empfohlen [45, 46]. Ein systematisches *Review* kommt zu dem Schluss, dass eine Dekolonisationstherapie mit nicht absorbierbaren oralen Antibiotika (Colistin und/oder Aminoglykosiden) zwar kurzzeitig die Kolonisation reduziert, jedoch längerfristig keinen Effekt hat und sogar zusätzliche Resistenzen hervorruft [35, 47]. Da gramnegative Bakterien zum physiologischen Darmmikrobiom gehören, besteht bei MRGN-Kolonisation aktuell die einzige Möglichkeit darin, ein Überwachsen der resistenten Bakterien durch nicht resistente Bakterien abzuwarten, was mehrere Monate und länger dauern kann. Als wichtige Alternative für die Dekolonisation multiresistenter Darmbakterien wird vermehrt an Stuhltransplantationen geforscht, wie sie bereits in der Therapie schwerer *Clostridioides difficile* Infektionen zum Einsatz kommen. Der Erfolg bezüglich einer Eradikation multiresistenter gramnegativer Darmbakterien lag laut einer Metaanalyse jedoch nur bei 56,9 % [48].

1.12 Genotypische Diagnostik

Für eine schnellere Spezies- und Resistenztestung müssen Methoden verwendet werden, die keine kulturelle Anzucht benötigen. Dafür bieten sich genotypische Testverfahren an, die in der Lage sind, gezielt ARG nachzuweisen. Vereinfacht interpretieren die meisten dieser Testverfahren den Fund eines entsprechenden ARG als Resistenz und die Abwesenheit eines entsprechenden ARG als Sensibilität. PCR (Polymerase-Kettenreaktion) basierte Verfahren, sind in der Lage, einzelne definierte Gene nachzuweisen. Ein prominentes Beispiel ist die MRSA-PCR, bei der die SCCmec-Kassette nachgewiesen wird, ein mobiles genetisches Element, auf dem das *mecA* Gen lokalisiert ist, das für eine Methicillinresistenz kodiert [49]. Das Ergebnis ist noch am selben Tag verfügbar. *Microarrays* sind in der Lage eine Vielzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen. In Studien zeigten sie zum Teil gute Ergebnisse im Vergleich zur kulturellen Resistenztestung [50, 51]. Um jedoch das Resistom, also die Gesamtheit aller ARG des untersuchten Mikrobioms zu bestimmen, reicht die Suche nach einer definierten Anzahl von Genen nicht aus.

1.13 DNA-Sequenzierung

Mittels DNA-Sequenzierung kann die Basenabfolge von beliebigen DNA-Molekülen bestimmt werden. Für eine umfangreiche, genotypische, mikrobiologische Diagnostik müssen alle Gene einer Probe sequenziert und analysiert werden. Dies ist nur möglich mittels metagenomischer *Whole Genome* Sequenzierung.

Whole Genome Sequenzierung bezeichnet die Bestimmung der Basenabfolgen aller DNA-Moleküle eines Genoms. Metagenomische *Whole Genome* Sequenzierung bezeichnet die Bestimmung der Basenabfolgen aller DNA-Moleküle aller Genome innerhalb einer definierten Umgebung.

Zum weiteren Verständnis müssen einige bioinformatische Begriffe erklärt werden (Abb. 1). Ein *Read* ist ein kontinuierlich sequenziertes DNA-Fragment [52]. Die *Read*-Länge ist definiert durch die Anzahl an Basen eines *Reads*. DNA-Fragmente desselben genetischen Ursprungs, die sich in ihrer Sequenz überlappen, können zu sogenannten *Contigs* zusammengesetzt werden, um eine möglichst vollständige Rekonstruktion des Genoms zu ermöglichen [52]. Die Menge an Sequenzdaten wird in Basen, Kilobasen (Kb), Megabasen (Mb) bzw. Gigabasen (Gb) angegeben. Die Genomgröße wird in Basenpaaren, Kilobasenpaaren (Kbp), Megabasenpaaren (Mbp) bzw. Gigabasenpaaren (Gbp) angegeben. Die *Coverage* oder Sequenzierungstiefe ist definiert durch die Anzahl, wie oft eine Basenfolge im Durchschnitt sequenziert wurde [52]. Je höher die *Coverage*, desto verlässlicher ist das Ergebnis, da einzelne Fehler weniger ins Gewicht fallen. Bezogen auf ein 5 Mbp großes Genom kann bei 50 Mb an Sequenzdaten durchschnittlich eine 10-fache *Coverage* erwartet werden, was bedeuten würde, dass jede Basenfolge des Genoms durchschnittlich 10 mal sequenziert wurde und somit auf durchschnittlich 10 *Reads* vorliegt.

Die DNA-Sequenzierung wurde in den 1970er-Jahren erfunden [52]. 1977 sequenzierten Walter Gilbert, Allen Maxam und Frederick Sanger das erste komplette Genom, einen Bakteriophagen [53]. Die erste Sequenzierung eines menschlichen Genoms im Rahmen des Humangenomprojekts dauerte 13 Jahre und wurde 2003 erfolgreich abgeschlossen [54]. Seitdem sind die Sequenzierungskosten stark gesunken, während der Durchsatz (Basen pro Sekunde), die *Read*-Länge und die Verfügbarkeit gestiegen sind. Um das Jahr 2000 kostete eine Sequenzierung des humanen Genoms noch über 100 Millionen Dollar, aktuell (2021) weniger als 1000 Dollar [55, 56].

Während *First-Generation* Sequenzierung (Sanger Sequenzierung, 1975-2005) eine mittlere *Read*-Länge und eine hohe Genauigkeit lieferte, war der Durchsatz sehr gering und die Kosten hoch [52, 57]. *Second-Generation* Sequenzierung (ab 2005, viele verschiedene Technologien, u. a. *Sequencing-by-Synthesis*) lieferte und liefert noch heute einen sehr hohen Durchsatz bei einer guten Genauigkeit mit deutlich geringeren Kosten, dafür ist die *Read*-Länge jedoch

relativ kurz und erfordert oft komplexe bioinformatische Assemblierungsstrategien [52, 57]. *Third-Generation* Sequenzierung (viele verschiedene Technologien, u. a. Nanopore ab 2012) liefert sehr lange *Reads* bei einem mittleren Durchsatz und moderater Genauigkeit [52, 57]. Davon abgesehen kann jedes einzelne DNA-Molekül analysiert werden, im Gegensatz zu *Second-Generation* Sequenzierung, bei der nur der Durchschnitt aller amplifizierten DNA-Moleküle abgebildet wird [52].

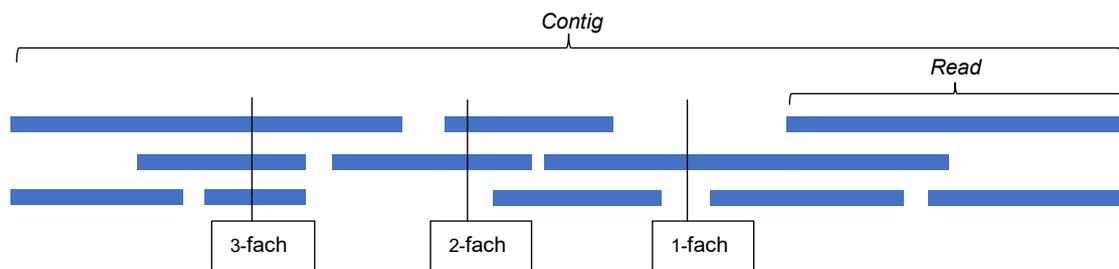


Abb. 1: **Bioinformatische Begriffe:** Dargestellt ist ein Abschnitt einer DNA-Sequenz, der sich aus überlappenden, kontinuierlich sequenzierten Fragmenten (*Reads*) zusammensetzt (*Contig*). Die *Coverage*, also die Anzahl, wie oft eine Basenfolge an einer bestimmten Position sequenziert wurde, ist an drei Positionen beispielhaft angegeben.

1.14 Bioinformatische Analyse

Auch wenn die *Read*-Länge durch neue Sequenzierungsverfahren deutlich zugenommen hat, so erhält man dennoch nur Fragmente. Lange *Reads* können direkt mit Gendatenbanken abgeglichen werden und bei Übereinstimmung einem Gen zugeordnet werden. Dies ermöglicht eine einfache Analyse, die wenig Rechenleistung benötigt. Für sehr kurze *Reads* bietet sich die *de-novo* Assemblierung an, bei der zunächst *Reads* anhand von Überlappungen zu *Contigs* zusammengesetzt werden. Dies erfordert jedoch einen deutlich höheren Arbeits- und Rechenaufwand, da jeder einzelne *Read* mit jedem anderen *Read* verglichen werden muss. Besonders kurze *Reads* mit vielen *Repeats*, das heißt Wiederholungen von kurzen Basenfolgen, sind schwer zusammzusetzen. Aus diesem Grund sind Sequenzierungstechniken, die lange *Reads* liefern, deutlich im Vorteil.

1.15 Potenzielle Vorteile der sequenzierungsbasierten, genotypischen Testung

Im Vergleich zur konventionellen Diagnostik ergeben sich bei der genotypischen Testung mittels metagenomischer Sequenzierung einige potenzielle Vorteile. So kann ein Ergebnis in einer wesentlich kürzeren Zeit ermittelt werden, bei Nanopore-Sequenzierung theoretisch sogar in Echtzeit [58-61]. Darüber hinaus könnten die kompletten Antibiotika-Resistenz-Profile nahezu aller in der Probe anwesenden Bakterien über die Sequenzdaten ermittelt werden, was kulturell nicht oder nur mit unmäßigem Aufwand möglich ist. Außerdem könnten Resistenzmechanismen aufgedeckt werden, die nicht zu einer phänotypischen Resistenz führen, da nicht alle Resistenzmechanismen, die *in vivo* ausgeprägt sind, *in vitro* über die

üblichen Methoden nachweisbar sind. Die Sequenzierung könnte schließlich auch resistente Bakterien nachweisen, die kulturell nicht nachgewiesen wurden, da sie z. B. in einer zu geringen Menge vorlagen. Aktuell ist unklar, wie sensitiv die kulturelle Testung ist.

1.16 Aktueller Stand der sequenzierungsbasierten, genotypischen Testung

Genotypische Resistenztestungen mittels Sequenzierung werden derzeit noch größtenteils im Rahmen von *Proof-of-Concept* Studien durchgeführt und sind dementsprechend schlecht miteinander vergleichbar. Unterschiede zwischen den Studien existieren hinsichtlich (1) der Probe (Probenart, untersuchte Erreger, Indikationen usw.), (2) dem DNA-Extraktionsverfahren, (3) der möglichen Amplifikation bakterieller DNA bzw. der Abreicherung (Depletion) humaner DNA, (4) der genutzten Sequenzierungstechnologie, (5) der genutzten bioinformatischen Verfahren (*Pipeline*, Gendatenbanken, Interpretation usw.) und vieler weiterer Faktoren.

Zur Erläuterung des aktuellen Forschungsstandes wird im Folgenden zwischen Studien unterschieden, die Isolate, also kulturell gewachsene Kolonien, sequenzierten und Studien, die direkt Patientenproben sequenzierten.

Die Sequenzierung von Isolaten ist in der Regel um einiges einfacher, da üblicherweise nur ein Erreger vorhanden ist, bakterielle DNA im Überfluss vorliegt und keine humane DNA die Probe kontaminiert. Studien konnten mithilfe der Suche nach ARG in Isolaten bereits eine gute Übereinstimmung zur kulturellen Spezies- und Resistenztestung zeigen [62-65]. Dabei fokussierten sich die meisten Studien auf die Resistenzvorhersage einer bestimmten Spezies und legten mit Hilfe von Gendatenbanken oder Literaturrecherchen Markergene fest. Die Sequenzierung aus Isolaten bietet jedoch häufig keinen Zeitvorteil.

Eine kulturunabhängige und schnellere Diagnostik ist nur mit metagenomischer Sequenzierung direkt aus Patientenproben möglich. Hier ergeben sich Schwierigkeiten hinsichtlich der (1) bakteriellen Diversität, (2) der zum Teil geringen Mengen an bakterieller DNA und (3) der teilweise hohen Menge an humaner DNA. Die hohe bakterielle Diversität führt dazu, dass wesentlich mehr Sequenzdaten benötigt werden, um möglichst viele der vorhandenen Spezies mit einer ausreichenden *Coverage* zu sequenzieren. Außerdem macht die hohe bakterielle Diversität eine Zuordnung der ARG zur Ursprungsspezies erforderlich. Bei Isolaten, die in der Regel nur Zellen einer Spezies enthalten, kann dagegen davon ausgegangen werden, dass alle gefundenen ARG dieser Spezies zugehören. Studien, die metagenomische Proben auf Resistenzen untersuchten, sind weniger zahlreich und nehmen größtenteils starke „Vereinfachungen“ vor. In Studien wurde beispielsweise besonders Urin gerne untersucht, da dieser vergleichsweise viel bakterielle DNA, wenig humane DNA und im Falle eines Harnwegsinfekts in der Regel nur eine Bakterienart enthält [59, 60]. Aber auch Proben aus dem Respirationstrakt, die viel humane DNA enthalten, wurden bereits

metagenomisch untersucht, jedoch ohne Zuordnung der ARG [61]. Ebenso wurden die ARG von *M. tuberculosis* in Sputum Proben analysiert, jedoch mit vorheriger gezielter Amplifikation der *M. tuberculosis* Gene [66]. Studien zur metagenomischen Resistenzvorhersage aus Proben, die eine hohe Diversität aufwiesen, existieren kaum. Einige Studien untersuchten zwar das Metagenom von Stuhlproben auf ARG, jedoch ohne Zuordnung dieser [67, 68]. Lediglich eine aktuelle Studie untersuchte Darmmikrobiota und nahm erfolgreich eine Zuordnung von ARG vor [58]. Die Genauigkeit der Resistenzvorhersage aus metagenomischen Proben ist bislang trotz „Vereinfachungen“ in den meisten Studien schlechter als die aus Isolaten. Studien, die keine „Vereinfachungen“ vornahmen und eine universelle, metagenomische Resistenztestung aus beliebigen Probenspezimen zeigten, existieren bislang nicht.

Nach aktuellem Forschungsstand gibt es bislang auch keine Studien zur metagenomischen Spezies- und Resistenzvorhersage aus Analabstrichen, insbesondere nicht im Hinblick auf Screeningabstriche und eine ARG Zuordnung.

1.17 Ziele der Arbeit

In der durchgeführten *Proof-of-Concept* Studie sollen Analabstriche und zusätzlich daraus gewonnene bakterielle Isolate mithilfe metagenomischer Nanopore-Sequenzierung auf die Präsenz von MRGN-Erregern untersucht werden.

Um den relativen Anteil nicht humaner DNA zu erhöhen, soll zunächst die humane DNA abgereichert (depletiert) werden, die oftmals in Patientenproben vorherrscht [69]. Anschließend soll die verbleibende nicht humane DNA isoliert und sequenziert werden. Methodisch soll die extrahierbare DNA-Menge sowie die daraus generierbare Menge an Sequenzdaten evaluiert werden.

Um eine metagenomische Speziesdiagnostik zu ermöglichen, sollen alle DNA-Sequenzen (*Reads*) mithilfe einer bioinformatischen Datenbank taxonomisch zugeordnet werden. Anhand dessen soll überprüft werden, ob die kulturell nachgewiesene Spezies auch metagenomisch nachweisbar ist und welchen Anteil der Probe diese ausmacht. Um zu überprüfen, wie gut die Depletion humaner DNA funktioniert, soll der Anteil verbliebener humaner *Reads* betrachtet werden. Außerdem soll die Zusammensetzung des Mikrobioms untersucht werden. Anhand der Menge an Sequenzdaten und des Anteils der kulturell nachgewiesenen Spezies soll abgeschätzt werden, ob eine ausreichende *Coverage* erreicht wurde.

Um eine metagenomische Resistenztestung vorzunehmen, sollen alle *Reads* mithilfe einer ARG-Datenbank nach möglichen ARG durchsucht werden. MRGN-positive und MRGN-negative Proben sollen hinsichtlich möglicher Unterschiede analysiert werden. Ebenso sollen die Resistenzmechanismen der ARG untersucht werden.

Die ARG sollen dann mithilfe einer bioinformatischen Software anhand der flankierenden Regionen der Ursprungsspezies zugeordnet werden. Die Zuordnung soll die gezielte Zuweisung der ARG der kulturell nachgewiesenen Spezies in MRGN-Proben ermöglichen. Anhand der ARG-Datenbank soll eine Auswertungsregel formuliert werden, die eine möglichst gute Unterscheidung zwischen sensiblen und resistenten Erregern ermöglicht. Auf dieser Basis soll ein Vergleich mit der phänotypischen Testung gezogen werden. Anschließend soll in kulturell MRGN-negativen Proben per Sequenzierung nach potenziellen MRGN-Erregern gesucht werden, die eventuell durch die kulturelle Testung übersehen wurden. Da die bioinformatische Software für die Zuordnung der ARG zur Ursprungsspezies das erste Mal in dieser Studie angewendet wird, soll außerdem die Zuordnungsquote und Genauigkeit der Spezieszuordnung überprüft werden.

Zuletzt soll die Übereinstimmung zwischen den metagenomischen Proben und den Isolaten evaluiert werden. Hierzu soll überprüft werden, ob alle in den Isolaten gefundenen ARG auch in den metagenomischen Proben zu finden sind.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Kulturelle Diagnostik

COS Agar	bioMérieux, Frankreich
WASPLab - Walk Away Specimen Processor	bioMérieux, Deutschland
VITEK MS Massenspektrometer	bioMérieux, Deutschland
VITEK 2 XL	bioMérieux, Deutschland
CHROMagar KPC/CHROMagar ESBL Fertigpl.	Mast Group, Deutschland
Impfeschlingen 10µl	Sarstedt, Deutschland
HERA safe KS 18 Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Deutschland
Brutraum 36-37°C	

2.1.2 Human DNA-Depletion und DNA-Isolation

Eppendorf Research plus 0,5-10µl	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Research plus 10-100µl	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Research plus 100-1000µl	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf ThermoMixer C	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5417R, F45-30-11	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Mastercycler personal	Eppendorf, Deutschland
DPBS (1X) 500ml, Phosphate Buffered Saline	gibco, Life Technologies Limited, UK
BBD 6220 CO2 Incubator, 220 L	Heraeus Thermo Scientific, USA
UltraPure Distilled Water DNase/RNase Free	Invitrogen by life technologies, UK
HulaMixer Ssample Mixer	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Norwegen
Qubit 3 Fluorometer	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Norwegen
Qubit 1X dsDNA HS Working Solution 250ml	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Norwegen
Qubit assay tubes	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Norwegen
Copan eSwab	Mast Diagnostica GmbH, Deutschland
HERAfreeze	Thermo Scientific, USA

NanoDrop 1000	Thermo Scientific, USA
Reagiergefäß 1,5 ml DNA LowBind	SARSTEDT AG & Co. KG, Deutschland
Vortex Genie 2 Digital, 2850 UpM	Scientific Industries, USA
TipOne 1000µl Filter Sterile	STARLAB INT. GmbH, Deutschland
TipOne 200µl Filter Sterile	STARLAB INT. GmbH, Deutschland
TipOne 10µl Filter Sterile	STARLAB INT. GmbH, Deutschland
HostZERO Microbial DNA Kit	Zymo Research, USA
Reagenzglas-Vortex-Schüttler	VVR International, Deutschland
VWR Analog Heatblock	VWR, USA
VWR Galaxy MiniStar silverline	VWR, USA

2.1.3 Sequenzierung

Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109)	Oxford Nanopore Technologies, UK
Native Barcoding Expansion 1-12 (EXP-NBD104)	Oxford Nanopore Technologies, UK
Native Barcoding Expansion 13-24 (EXP-NBD114)	Oxford Nanopore Technologies, UK
PromethION Flow Cell (FLO-PRO002)	Oxford Nanopore Technologies, UK
MinION Flow Cell (FLO-MIN106D)	Oxford Nanopore Technologies, UK
PromethION 24	Oxford Nanopore Technologies, UK
MinION	Oxford Nanopore Technologies, UK

2.1.4 Bioinformatische Auswertung

Bioinformatische Software für die ARG Zuordnung	Prof. Dr. Alexander Dilthey, Deutschland
Kraken 2	Johns Hopkins University, USA
CARD	McMaster University, Kanada
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation, USA
Guppy Basecaller 4.0.15	Oxford Nanopore Technologies, UK

2.2 Methoden

Abb. 2 zeigt eine Übersicht der Probenverarbeitung im Rahmen der kulturellen Routinediagnostik und der bioinformatischen *Pipeline*. Die genaue Methodik wird im Folgenden detailliert erläutert.

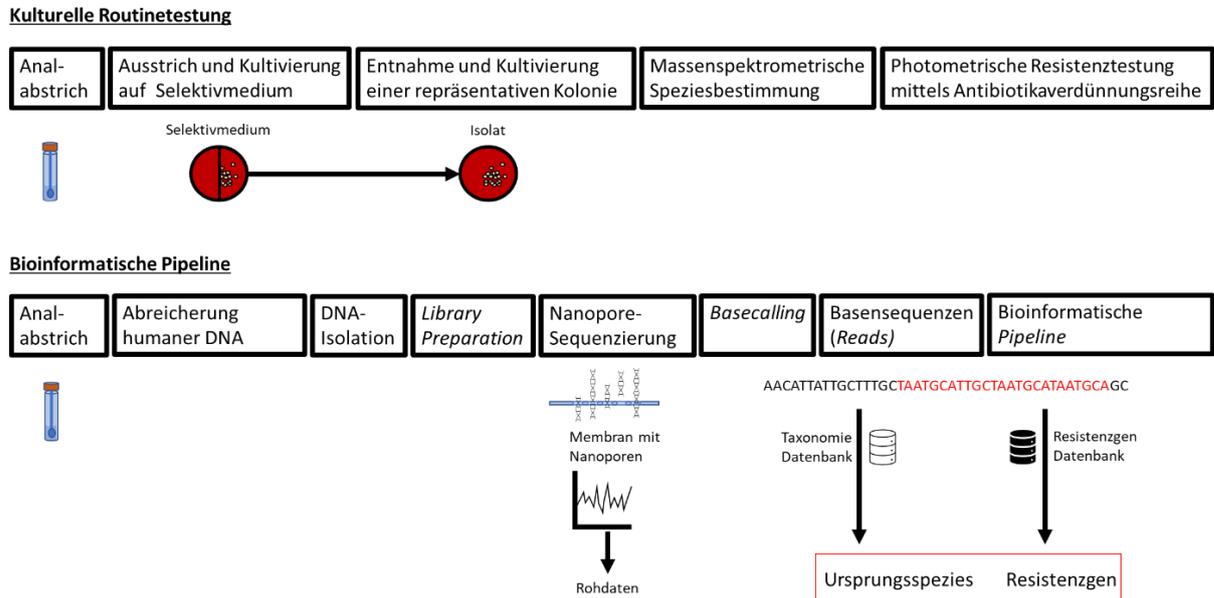


Abb. 2: **Arbeitsabläufe:** Zusammenfassend dargestellt sind die Abläufe im Rahmen der konventionellen, kulturellen Testung (oben) und der bioinformatischen *Pipeline* (unten).

2.2.1 Probengewinnung

Es wurde Probenmaterial aus Analabstrichen des Universitätsklinikums Düsseldorf verwendet, die im Rahmen des MRGN-Screenings zwischen Juli und November 2020 eingesandt wurden. Die Abstriche wurden nach der Entnahme bei 7 °C gelagert und innerhalb von 7 Tagen weiterverarbeitet. Anzumerken ist, dass die Begriffe Anal-, Perianal- und Rektalabstriche als Synonym verwendet wurden, da die Proben von zahlreichen Klinikern abgenommen wurden und die genaue Art und Weise des Abstriches nicht rekonstruierbar war.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Referenznummer: 2020-925) bewilligt. Bedingung war, dass alle Patienten zuvor ausführlich aufgeklärt wurden und schriftlich einwilligten.

Von insgesamt 214 gescreenten Patienten wurden 79 Patienten eingeschlossen (36,9 %). Von den übrigen 135 Patienten waren 58 Patienten nicht verfügbar aufgrund von Entlassung, Verlegung, Abwesenheit, Unterbringungen in Corona-Isolationszonen oder Tod während des Krankenhausaufenthaltes. 34 Patienten waren nicht einwilligungsfähig aufgrund von Sprachbarrieren, Beatmung, Sedierung, Demenz, Somnolenz, Minderjährigkeit oder motorischen Problemen, die eine Unterschrift unmöglich machten. 10 Proben waren bei Einwilligung schon über 7 Tage alt oder vernichtet. Die Gründe der verbleibenden 30 Patienten

wurden während der Frühphase der Studie nicht erfasst. Nahezu alle Patienten befanden sich während der Probenentnahme auf der *Intermediate Care* oder Intensivstation.

Insgesamt wurden 32 MRGN-positive und 37 MRGN-negative Analabstriche gesammelt. Die Proben der übrigen 10 Patienten wurden für ein anderes Projekt verwendet. Von den 32 MRGN-positiven Proben wurden 5 ausgeschlossen (4 enthielten weniger als 21,1 ng DNA, von einer Probe wurden mehrere Isolate angefertigt und fälschlicherweise das Isolat eines MRGN-negativen Erregers sequenziert). Von den 37 MRGN-negativen Proben wurden 10 Proben ausgeschlossen (9 enthielten weniger als 14,4 ng DNA, 1 Probe war fälschlicherweise MRGN-positiv). Für die Auswertung verblieben 27 MRGN-positive Proben (P01-P27) und 27 MRGN-negative Proben (N01-N27). Von den MRGN-positiven Proben wurden außerdem Isolate (I01-I27) gesammelt.

2.2.2 Kulturelle Routinediagnostik

Die kulturelle Diagnostik erfolgte im Rahmen der mikrobiologischen Routinediagnostik. Die Screeningabstriche wurden zunächst auf Selektivmedium ausgestrichen. Dieses enthielt Antibiotika und Chromogene zur Vorselektion. Nach 24 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Untersuchung. Falls sich kein Wachstum zeigte, wurde die Probe als MRGN-negativ ohne kulturell nachweisbaren Erreger klassifiziert. Falls sich ein Wachstum zeigte, wurde der Erreger anhand einer repräsentativen Kolonie mittels Vitek MS MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption time-of-flight*-Massenspektrometrie) Massenspektrometer bestimmt. Anschließend wurde mittels einer Verdünnungsreihe und photometrischer Wachstumsinhibitionsmessung mittels Vitek 2 XL ein Antibiogramm erstellt. Die Reste der repräsentativen Kolonie wurden auf COS-Agar ausgestrichen, um eventuelle Kontaminationen während der Prozessierung zu erkennen. Sie dienten als Isolate der kulturell nachgewiesenen Spezies. Basierend auf dem Antibiogramm wurden die Proben als MRGN-positiv klassifiziert, sofern sie die MRGN-Kriterien erfüllten. Zusätzlich wurde von allen MRGN-Proben eine Carbapenemase-PCR durchgeführt, sofern sich eine erhöhte MHK bei den Carbapenemen zeigte.

2.2.3 Vorversuche

Im Rahmen von Vorversuchen wurden Methoden zur Entfernung humaner DNA (Depletion) und zur Extraktion bakterieller DNA untersucht. Eine Depletion ist möglich aufgrund der Unterschiede zwischen bakteriellen und humanen Zellen. Humane Zellen sind größer, schwerer und instabiler im Hinblick auf bestimmte Umwelteinflüsse [69]. Dies ermöglicht eine Depletion mittels Filtration, differenzieller Zentrifugation, chemischer oder enzymatischer Lyse. Anhand von Analabstrichen wurden zahlreiche in Studien untersuchte Methoden zur Depletion getestet, unter anderem die differenzielle Zentrifugation und die selektive Lyse mittels Propidium Monoazide (PMA) +/- Turbo-DNAse, Saponin oder MoYsis Basic5 Kit [60, 61, 69-72]. Anschließend wurde die DNA jeweils mittels Zymo Quick-DNA HMW MagBead Kit

extrahiert. Außerdem wurde das HostZERO Kit getestet, das eine Depletion humaner DNA und die Extraktion bakterieller DNA kombiniert [73]. Die Kontrolle ohne Depletion enthielt 18,5 % humane DNA im Vergleich zu 3,92 % nach Depletion mittels HostZERO Kit. Die Testreihen mit Saponin und PMA + Turbo-DNAse in Kombination mit dem Zymo Quick-DNA HMW MagBead Kit depletierten humane DNA zwar noch besser (0,15 % bzw. 1,12 %), wiesen jedoch nach der Sequenzierung weniger verschiedene Spezies und ARG-Reads auf. Aus diesem Grund sowie aufgrund einer geringeren Durchführungsdauer wurde die Entscheidung für die Verwendung des HostZERO Kits getroffen.

2.2.4 Depletion humaner DNA und DNA-Isolation

Für die Depletion humaner DNA und die DNA-Isolation wurde das auf selektiver Lyse basierende HostZERO Kit verwendet.

Aus jedem Analabstrich wurden 800 µl Probenvolumen entnommen und das Volumen auf die im Protokoll vorgesehenen 200 µl aufkonzentriert. Hierzu wurde der Analabstrich gevortext, um möglichst viele bakterielle Zellen zu suspendieren und 800 µl Probenvolumen in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Anschließend wurde das Reagiergefäß bei 9100 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet in 200 µl PBS resuspendiert.

Danach wurde mit der humanen DNA-Depletion und der bakteriellen DNA-Isolation nach Herstellerprotokoll fortgefahren [74]. Nach dem *Bead-Beating* Schritt, der dem mechanischen Aufschluss bakterieller Zellen dient, verbleiben laut Protokoll 400 µl Probenvolumen im ZR BashingBead Lysis Tube. Um die extrahierbare DNA-Menge fast um den Faktor 2 zu erhöhen, wurde bei allen metagenomischen Proben der Überstand verwendet und damit auf gleiche Weise wie mit der regulären Probe (ebenfalls 400 µl) verfahren.

Nur im Falle von Proben mit weniger als 500 ng isolierter DNA wurde auch die extrahierte DNA des Überstandes für die nachfolgende Sequenzierung genutzt.

2.2.5 Isolate

Die Reste der repräsentativen Kolonie wurden nach der Routinediagnostik auf COS-Agar ausgestrichen und dienten als Isolate der kulturell nachgewiesenen Spezies. Mit einer Impfschlinge wurden die Kolonien gelöst und in einem frischen 1,5 ml Reagiergefäß mittels vortexen in 1000 µl PBS suspendiert. Anschließend wurden die Proben bis zur DNA-Isolation bei -80 °C eingefroren. Für die DNA-Isolation wurden nach dem Auftauen und Vortexen 220 µl Probenvolumen entnommen und auf gleiche Weise mit dem HostZERO Kit verfahren, nur ohne humane DNA-Depletion.

2.2.6 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung mittels Nanodrop

Die Konzentration und Reinheit des DNA-Eluates wurde näherungsweise mittels Nanodrop 1000 bestimmt. Hierzu wurde nach dem Kalibrieren 1,5 µl DNA Eluat auf das Messfenster pipettiert und die photometrische Messung gestartet. Ausgegeben wurde die DNA-Konzentration sowie die Absorptionsspektren bei 260/280 nm und 260/230 nm. Die Absorptionsspektren gaben Hinweise auf die Reinheit der Probe [75].

2.2.7 Quantitätsbestimmung mittels Qubit vor Sequenzierung

Außerdem wurde eine genauere Messung der DNA-Konzentration mittels Qubit Fluorometer 3.0 durchgeführt. Hierzu wurde 1 µl Eluat in 199 µl *Working Solution* gelöst, die Suspension gevortext und für 2 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA). Die Angaben der extrahierten DNA-Mengen im Ergebnisteil basieren aufgrund der höheren Genauigkeit auf der Qubit-Messung.

2.2.8 Library Preparation und Nanopore-Sequenzierung

Die Nanopore-Technologie ermöglicht die Sequenzierung sehr langer Fragmente (bis > 4 Mb) mit der Auflösung eines einzelnen DNA-Moleküls, ohne vorherige Amplifikation und in Echtzeit [76, 77]. Bei der Sequenzierung passieren DNA-Moleküle über Nanoporen eine biologische, nicht leitfähige Membran. Dies führt zu einem Ionenstrom. Anhand der Modulation der Membranspannung wird auf die mutmaßliche Basenabfolge des DNA-Moleküls geschlossen.

Die extrahierte DNA kann nicht direkt auf die Sequenzierungsmembran aufgetragen werden, sondern muss zunächst vorbereitet werden. Dieser Schritt wird *Library Preparation* genannt. Hierzu wurde das für die Nanopore-Sequenzierung entwickelte Ligation Sequencing Kit in Kombination mit dem Native barcoding genomic DNA Protokoll (Version NBE_9065_v109_revV-14Aug2019) verwendet [78]. Um mehrere Proben auf einer *Flow Cell* zu sequenzieren kann *Barcoding* eingesetzt werden. Dabei bekommen alle DNA-Moleküle einer Probe jeweils den gleichen *Barcode*, eine kurze bekannte DNA-Sequenz, angehängt. Dies ermöglicht die nachträgliche Zuordnung zur Ursprungsprobe. In dieser Studie wurden die Proben hierzu mit der Native Barcoding Expansion 1-12 oder 13-24 *gebarcoded*.

Abhängig von der extrahierten DNA-Menge der Proben wurden zwischen 14,4 ng und 1029 ng DNA als Ausgangsmaterial genutzt. Aufgrund der teilweise sehr geringen DNA-Mengen wurde unter Punkt 15, Seite 3/6 des Protokolls statt 26 µl, 10 µl Nuklease freies Wasser genutzt, um eine angemessene Konzentration für den folgenden Schritt zu erreichen. Während der *Library Preparation* wurde die DNA mehrmals gewaschen, um die Reinheit zu erhöhen. Die DNA-Enden wurden repariert und Adapter, kleine DNA-Fragmente bekannter Sequenz, die für die Sequenzierung benötigt werden, wurden angehängt. Außerdem wurden die oben genannten *Barcodes* ligiert, die DNA-Konzentration immer wieder gemessen und angepasst und Substanzen für ein optimales Sequenzierungsmilieu hinzugefügt. Als letztes wurde, wie im

Protokoll angegeben, 700 ng gelöste DNA auf die Sequenzierungsmembran aufgetragen. Die Sequenzierungsmembran befindet sich auf der sogenannten *Flow Cell*, die als Verbrauchsmaterial in das Sequenzierungsgerät eingeführt wird.

Das Sequenzierungsgerät nennt sich MinION bzw. PromethION. Der MinION ist das mit Abstand kleinste (10 x 3 x 2 cm) und leichteste (90 g) kommerziell verfügbare Sequenzierungsgerät und lässt sich an jedem Computer mit USB 3.0 verwenden [76]. Der PromethION ist deutlich größer, aber angesichts der parallelen Sequenzierungskapazität von 24 oder sogar 48 *Flow Cells* auch sehr handlich [77]. PromethION *Flow Cells* enthalten etwa sechs Mal so viele Nanoporen (max. 12.000 vs. 2.048), haben somit einen deutlich höheren Durchsatz und liefern mehr Sequenzdaten (max. 245 Gb vs. 42 Gb bei einer Laufzeit von 72 Stunden) als MinION *Flow Cells*, sind jedoch auch mehr als doppelt so teuer [76, 77, 79].

Alle metagenomischen Proben wurden auf PromethION *Flow Cells* sequenziert, mit Ausnahme von 12 Proben (P13, P17, P20, P26, N01, N03, N05, N18, N20, N21, N25, N27) die sehr geringe DNA-Mengen aufwiesen und die Kapazität einer PromethION *Flow Cell* mutmaßlich nicht hätten nutzen können. Diese und alle Isolate wurden auf MinION *Flow Cells* sequenziert. Abgesehen vom ersten Sequenzierungslauf mit 8 Proben, wurden stets 12 Proben parallel auf einer *Flow Cell* sequenziert. Bei 12 Proben pro Sequenzierungslauf konnten somit etwa 58,3 ng (x 12 = 700 ng) DNA pro Probe sequenziert werden, unabhängig davon ob MinION oder PromethION *Flow Cells* genutzt wurden. Im Falle von Proben, bei denen weniger als 58,3 ng DNA extrahiert wurde, erfolgte die Auffüllung freier Sequenzierungskapazität mit anderen Proben, um die *Flow Cell* bestmöglich zu nutzen. So wurden im Falle der metagenomischen Proben durchschnittlich 51,4 ng DNA (Min: 5,8 ng, Max: 140,4 ng, Median: 63,0 ng) auf die Sequenzierungsmembran aufgetragen, im Falle der Isolate stets die errechneten 58,3 ng.

Die Ausgabe der Sequenzdaten erfolgte in Form von Rohdaten im FAST5 Format.

2.2.9 Basecalling mit Guppy

Die Umwandlung der Rohdaten (FAST5) in eine Basenabfolge wird als *Basecalling* bezeichnet. Für diesen Vorgang wurde der Guppy Basecaller 4.0.15 genutzt [80]. Dabei übernahm dieser auch erste Post-Prozessierungen, wie das Entfernen angefügter Adaptersequenzen und das Auftrennen (demultiplexen) der Proben nach Barcodes. Die Ausgabe erfolgte als FASTQ Datei, die neben den Basenabfolgen der Fragmente (*Reads*) auch einen Qualitätsscore jeder einzelnen Base erhält.

2.2.10 Taxonomische Zuordnung

Für die Taxonomische Zuordnung der *Reads* wurde das Programm Kraken 2 genutzt [81]. Dieses gliedert jeden *Read* in den FASTQ Dateien mit der gleichnamigen Taxonomiedatenbank ab und ordnete dem *Read*, falls möglich, Domäne, Familie, Genus, Spezies und Stamm zu.

2.2.11 ARG-Zuordnung

Für die ARG-Identifizierung und -Zuordnung wurde eine eigene bioinformatische Software genutzt. Das Programm glich zunächst jeden *Read* mit der CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) ARG-Datenbank ab (Stand Mai 2021) [82]. Ab einer 80%igen Übereinstimmung wurde ein *Read* dem entsprechenden ARG zugeordnet. Nach dieser Zuordnung wurden die flankierenden Regionen des ARG analysiert und mit der oben genannten Kraken 2 Taxonomiedatenbank abgeglichen. Auch hier erfolgte die Zuordnung ab einer 80%igen Übereinstimmung. So wurden alle *Reads* auf mögliche ARG untersucht und falls möglich taxonomisch zugeordnet.

2.2.12 Statistische Analyse

Als *Proof-of-Concept* Studie mit limitierter Probenanzahl wurde zugunsten einer deskriptiven Darstellung der Ergebnisse auf statistische Tests verzichtet. Alle Analysen, Tabellen und Grafiken wurden mithilfe von Microsoft Excel erstellt. Pivot-Tabellen ermöglichten die Filterung aller *Reads* nach Taxonomie (Domäne, Familie, Genus, Spezies und Stamm). Außerdem ermöglichten sie die Filterung aller ARG-*Reads* nach Taxonomie, Resistenzmechanismus und assoziierten Antibiotikaklassen.

3.1.2 Menge an Sequenzdaten

Mittels PromethION-Sequenzierung (Ausnahme: MinION-Sequenzierung bei den 12 Proben mit der geringsten DNA-Menge) wurde aus der variablen DNA-Menge (siehe Methoden 2.2.8 Library Preparation und Nanopore-Sequenzierung) der metagenomischen Proben durchschnittlich 3,3 Gb an Sequenzdaten (Min: 0,17 Gb, Max: 14,3 Gb, Median: 2,8 Gb) gewonnen. Aus den MRGN-positiven Proben wurden durchschnittlich 3,6 Gb, aus den MRGN-negativen Proben 3,0 Gb gewonnen. (Abb. 5 und 6)

Bei den Isolaten wurden mittels MinION-Sequenzierung aus einer konstanten DNA-Menge (58,3 ng) durchschnittlich 1,0 Gb (Min: 0,21 Gb, Max: 2,6 Gb, Median: 1,2 Gb) an Sequenzdaten gewonnen. (Abb. 4)

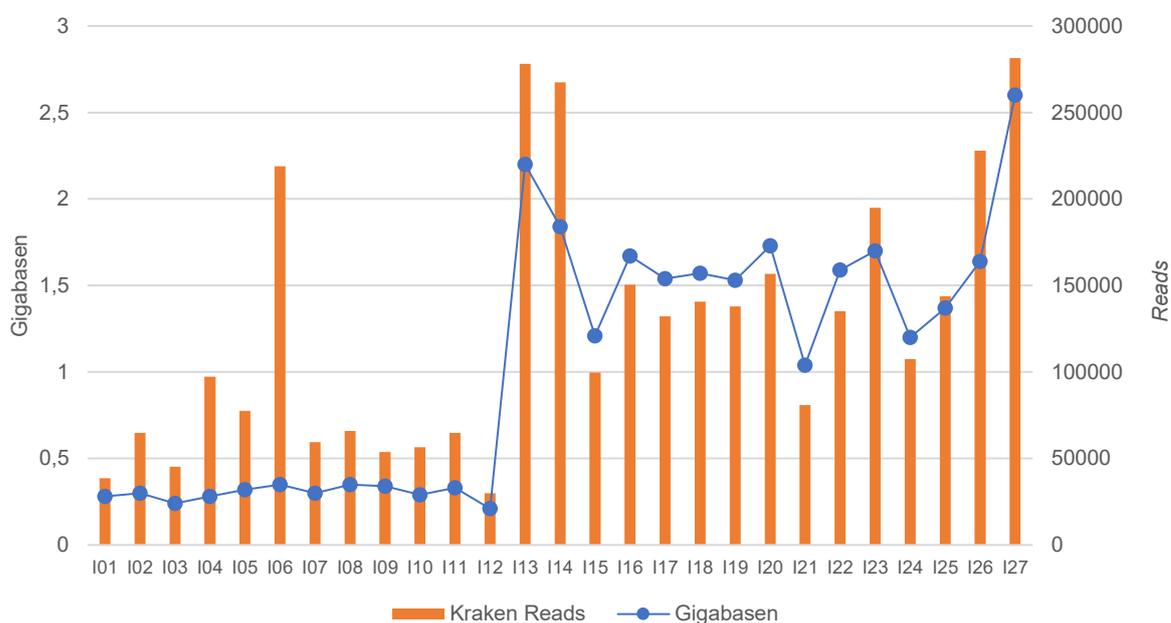


Abb. 4: Menge an Sequenzdaten der Isolate

Dargestellt ist die Ausbeute der Sequenzdaten der Isolate in Gigabasen anhand der blauen Kurve (rechte Achse) und Reads anhand der Höhe der orangenen Balken (linke Achse) aus der identischen DNA-Menge (58,3 ng). Zusammen sequenziert wurden die Proben I01-I12 (Lauf 1), I13-22 (Lauf 2) und I23-I27 (Lauf 3).

3.2 Speziestestung (taxonomische Zuordnung)

Je höher die taxonomische Ordnung, desto mehr Reads wurden mittels Kraken 2 zugeordnet. In den metagenomischen Proben ließen sich durchschnittlich 74,9 % aller Reads auf Familienebene, 71,0 % auf Genusebene und 68,8 % auf Speziesebene zuordnen.

Auf Speziesebene ließen sich in MRGN-positiven Proben durchschnittlich 71,3 % aller Reads (Min: 19,8 %, Max: 93,7 %, Median: 73,8 %) zuordnen, in MRGN-negativen Proben 67,8 % (Min: 13,4 %, Max: 94,7 %, Median 67,5 %). (Abb. 5 und 6)

3.2.1 Reads insgesamt

Aus den metagenomischen Proben wurden durchschnittlich 1.057.630 *Reads* (Min: 108.349, Max: 4.064.306, Median: 894.675) gewonnen, aus MRGN-positiven Proben 1.098.220 *Reads* und aus MRGN-negativen Proben 1.017.041. (Abb. 5 und 6)

Aus den Isolaten wurden durchschnittlich 126.212 *Reads* (Min: 29.969, Max: 281.393, Median: 107.433) gewonnen. (Abb. 4)

3.2.2 Reads der kulturell nachgewiesenen Spezies

In allen MRGN-positiven Proben konnte die kulturell nachgewiesene Spezies metagenomisch nachgewiesen werden. Durchschnittlich wurden der kulturell nachgewiesenen Spezies 32,9 % (Min: 0,1 %, Max: 84,7 %, Median: 32,3 %) aller *Reads* zugeordnet. In 14 von 27 Proben (51,9 %) dominierte die kulturell nachgewiesene Spezies und machte über die Hälfte aller bakterieller *Reads* aus. In 4 von 27 Proben machte die kulturell nachgewiesene Spezies weniger als 1 % der *Reads* aus (P07, P08, P11, P13). (Abb. 5 und 6)

3.2.3 Humane Reads

Durchschnittlich verblieben 3,8 % humane *Reads* in MRGN-positiven Proben (Min: 0,03 %, Max: 47,1 %, Median: 0,4 %) und 2,5 % in MRGN-negativen Proben (Min: 0,04 %, Max: 21,0 %, median 0,4 %). Bei Annahme einer konstanten *Read*-Länge entspricht der prozentuale Anteil der *Reads* dem prozentualen Anteil der DNA. (Abb. 5 und 6)

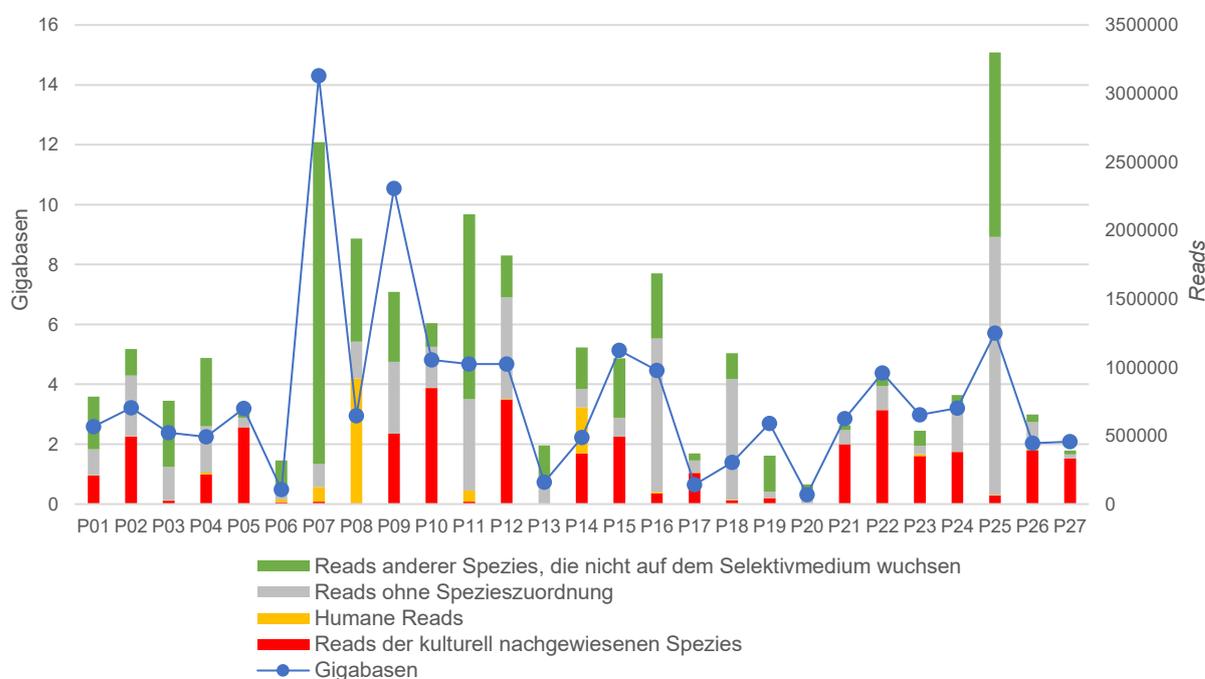


Abb. 5: **Zusammensetzung der Reads in MRGN-positiven Proben**

Dargestellt je Probe ist die Anzahl der *Reads* anhand der Höhe der Balken (rechte Achse) und die Menge der generierten Sequenzdaten in Gigabasen anhand der blauen Kurve (linke Achse). Außerdem dargestellt ist der Anteil an *Reads* der kulturell nachgewiesenen, auf dem Selektivmedium gewachsenen Spezies (rot), der Anteil humaner *Reads* (gelb), der Anteil von *Reads* ohne Spezieszuordnung (grau) und der Anteil von *Reads* anderer Spezies, die nicht auf dem Selektivmedium wuchsen (grün).

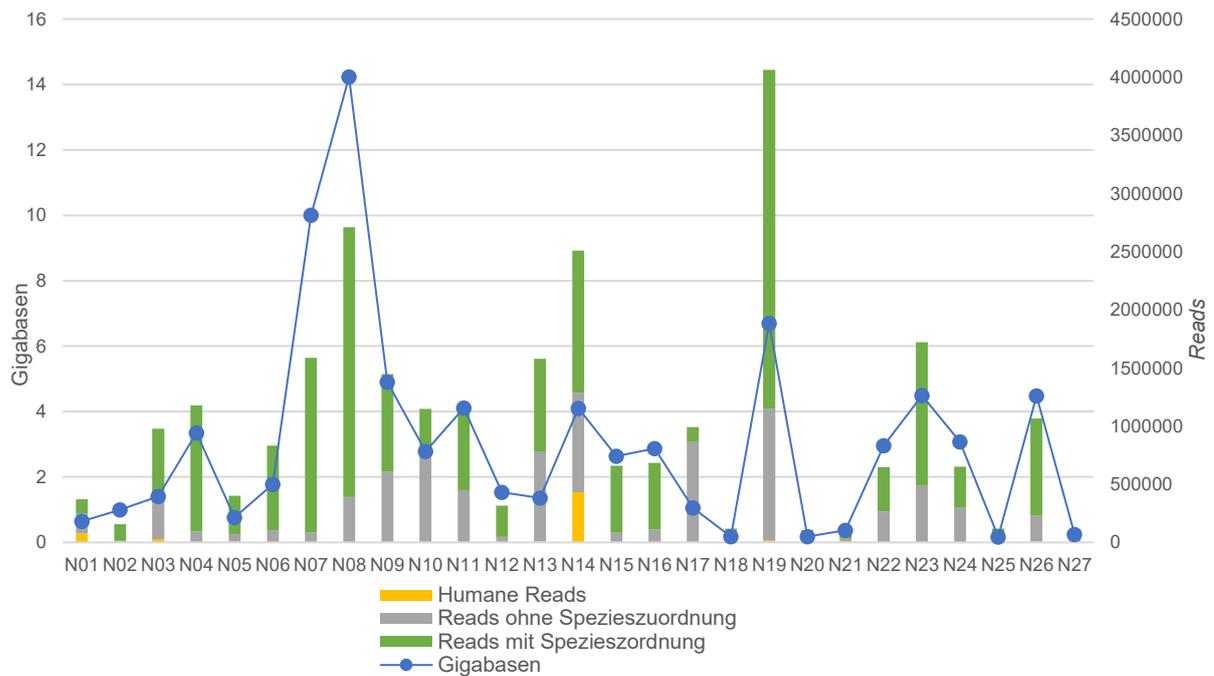


Abb. 6: **Zusammensetzung der Reads in MRGN-negativen Proben**

Dargestellt je Probe ist die Anzahl der Reads anhand der Höhe der Balken (rechte Achse) und die Menge der generierten Sequenzdaten in Gigabasen anhand der blauen Kurve (linke Achse). Außerdem dargestellt ist der Anteil an Reads der auf Speziesebene zugeordnet werden konnte (grün), der Anteil humaner Reads (gelb) und der Anteil von Reads der nicht auf Speziesebene zugeordnet werden konnte (grau).

3.2.4 Zusammensetzung des Mikrobioms

Um einen Eindruck der Diversität zu bekommen, wurde die Anzahl verschiedener Genera mit und ohne *Cut-off* bestimmt. Insgesamt wurden sehr viele verschiedene Genera gefunden, einige davon jedoch nur auf wenigen Reads. Dominiert wurden die Proben von einer deutlich geringeren Anzahl Genera. In MRGN-negativen Proben fand sich durchschnittlich eine geringfügig höhere Diversität, trotz weniger Reads. (Tab. 1)

Tabelle 1: **Diversität metagenomischer Analabstriche**

	Gesamtanzahl der Genera	Anzahl gefundener Genera, die über 1 % der Reads ausmachten*
In allen Proben	1.004	11 (90,8 % aller zugeordneten Reads*)
Ø je Probe	545	6,2 (92,8 % aller zugeordneten Reads*)
MRGN-positiv	535	5,9
MRGN-negativ	556	6,6

*nicht berücksichtigt wurden Reads ohne Zuordnung auf Genusebene

Auf Genusebene wurde etwas über ein Viertel aller Reads (25,5 %) *Escherichia* spp. zugeordnet, gefolgt von *Klebsiella* spp. (8,5 %) und *Bacteroides* spp. (8,0 %). Fast ein Drittel der Reads (29,0 %) konnte nicht auf Genusebene zugeordnet werden. (Abb. 7)

Auf Familienebene wurde fast die Hälfte aller *Reads* (44,0 %) Enterobacterales zugeordnet, gefolgt von den Bacteroidaceae (8,0 %) und Enterococcaceae (5,5 %). Ein Viertel der *Reads* konnte nicht auf Familienebene zugeordnet werden (25,1 %). (Abb. 8)

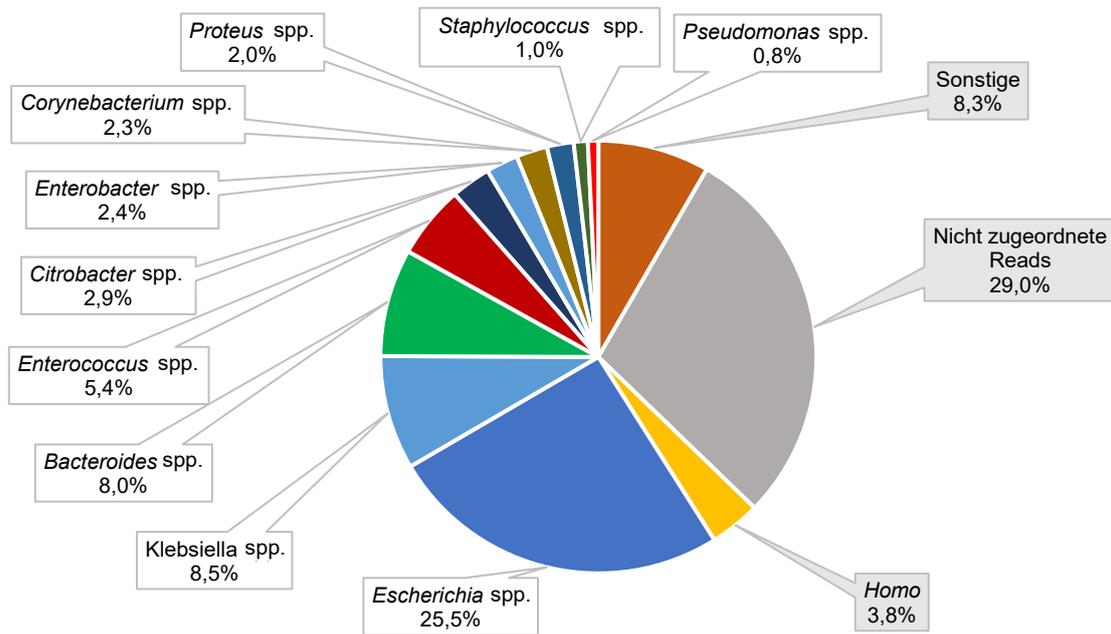


Abb. 7: Zuordnung der *Reads* auf Genusebene

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der *Reads* aller 54 metagenomischen Proben je Gattung. Namentlich genannt sind die 10 bakteriellen Genera mit den meisten *Reads*. Alle weiteren bakteriellen Genera werden unter „Sonstige“ zusammengefasst. Außerdem aufgeführt ist die Gattung *Homo* und der Anteil an *Reads*, der nicht auf Genusebene zugeordnet werden konnte.

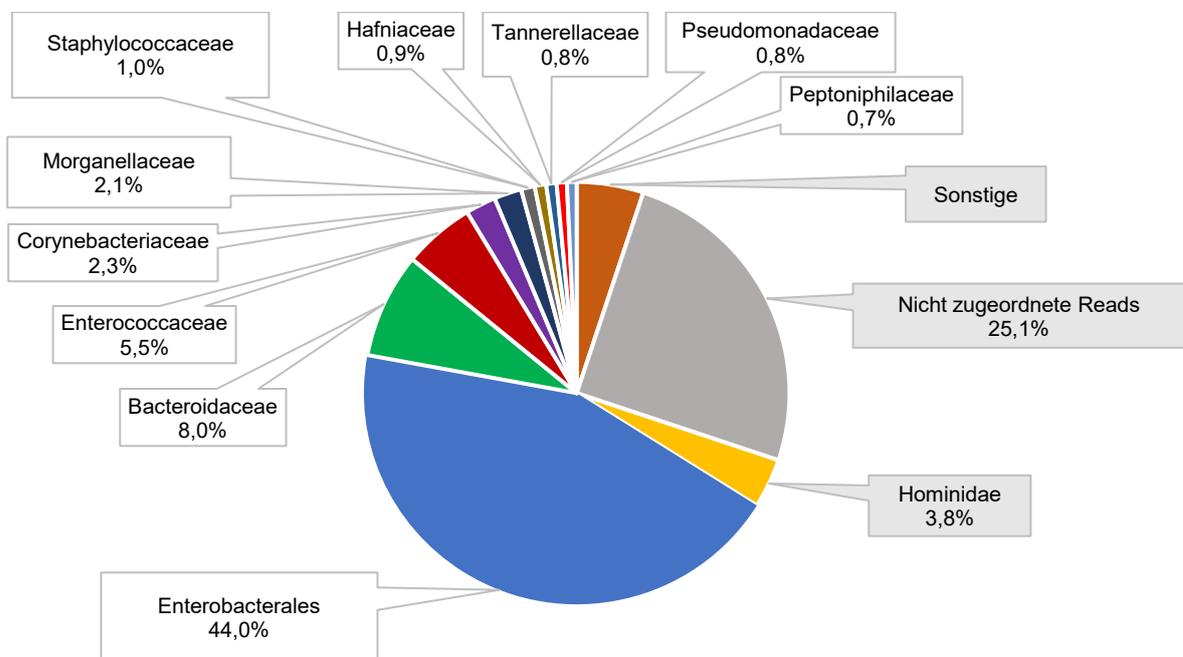


Abb. 8: Zuordnung der *Reads* auf Familienebene

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der *Reads* aller 54 metagenomischen Proben je Familie. Namentlich genannt sind die 10 bakteriellen Familien mit den meisten *Reads*. Alle weiteren bakteriellen Familien werden unter „Sonstige“ zusammengefasst. Außerdem aufgeführt ist die Familie Hominidae und der Anteil an *Reads* der nicht auf Familienebene zugeordnet werden konnte.

3.2.5 Abschätzung der Coverage

Unter der Annahme einer konstanten *Read*-Länge und einer konstanten Genomgröße von 4,6 Mbp (das entspricht der Genomgröße von *E. coli* (Stamm K12)), wurde die *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies in den MRGN-positiven Proben und Isolaten geschätzt [83].

$$S_C = \frac{S_R \times P_G}{P_R \times E_G}$$

S_C = Geschätzte **C**overage der kulturell nachgewiesenen **S**pezies

S_R = **R**eads der kulturell nachgewiesenen **S**pezies

P_R = **R**eads der gesamten **P**robe

P_G = Sequenzdaten der **P**robe in **G**igabasen

E_G = Genomgröße von *E. coli* (Stamm K12) = 0,0046 **G**igabasen

Die auf diesem Wege geschätzte durchschnittliche *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies in den MRGN-positiven Proben betrug 240,4-fach (Min: 0,13-fach, Max: 758,8-fach, Median: 150,4-fach) und in den Isolaten 225,6-fach (Min: 45,7-fach, Max: 565,2-fach, Median: 260,9-fach). (Abb. 9)

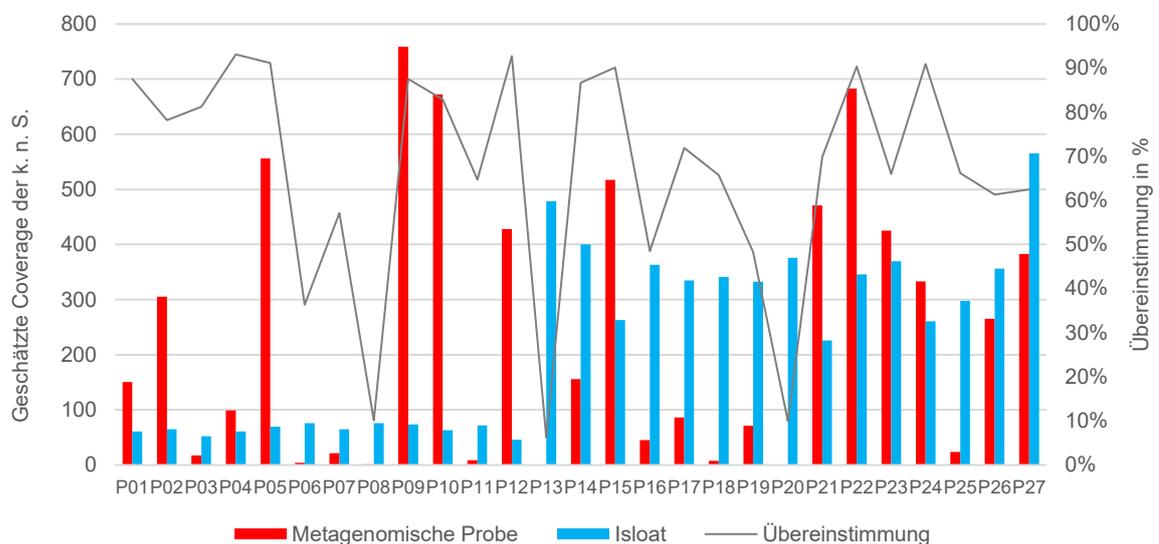


Abb. 9: **Geschätzte Coverage der kulturell nachgewiesenen Spezies und Übereinstimmung zwischen Isolat und MRGN-positiver Probe**

Dargestellt ist die geschätzte *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies in MRGN-positiven Proben (rote Balken) und Isolaten (blaue Balken). Die Schätzung erfolgte unter der Annahme, einer konstanten *Read*-Länge und einer konstanten Genomgröße von 4,6 Mbp (Genomgröße von *E. coli* (Stamm K12) [83]. Dargestellt als Kurve (grau) ist der Anteil an ARG der kulturell nachgewiesenen Spezies (k. n. S.) im Isolat, der auch in den MRGN-positiven Proben gefunden wurde.

3.3 Resistenzgenanalyse allgemein

3.3.1 Vergleich MRGN-positiver und MRGN-negativer Proben

Mithilfe der CARD-Datenbank wurden alle *Reads* nach ARG durchsucht und die MRGN-positiven mit den MRGN-negativen Proben verglichen (Tab. 2).

Tabelle 2: Unterschiede zwischen MRGN-positiven und MRGN-negativen Proben

	Alle Proben	MRGN-positiv	MRGN-negativ	Isolate
Verschiedene ARG insgesamt	717	588	560	411
Verschiedene ARG Ø je Probe	123,1	151,5	94,8	87,8
ARG-Reads insgesamt	477.459	271.615	205.844	98.662
ARG-Reads Ø je Probe	8.842	10.060	7.624	3.654
Verschiedene ARG / Gb insgesamt	4,0	3,3	3,1	14,7
Verschiedene ARG /Gb Ø je Probe	72,0	64,3	79,7	137,9
ARG-Reads / Gb insgesamt	2.678	2.803	2.529	3.521
ARG-Reads / Gb Ø je Probe	2.335	2.629	2.041	3.537
ARG-Reads / Reads insgesamt	0,84 %	0,92 %	0,75 %	2,90 %
ARG-Reads / Reads Ø je Probe	0,88 %	1,04 %	0,72 %	2,94 %

ARG: Resistenzgen, Gb: Gigabasen

Um beispielhaft den großen Überschneidungsbereich zwischen MRGN-positiven und MRGN-negativen Proben zu zeigen, ist in Abb. 10 der prozentuale Anteil der *Reads* dargestellt, auf dem ARG gefunden wurden.

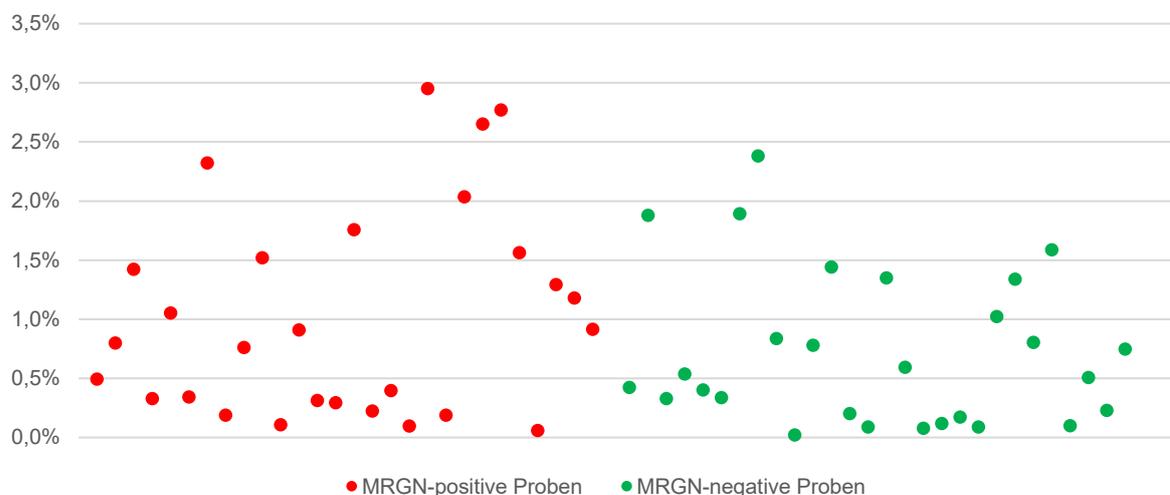


Abb. 10: Relative Menge an Resistenzgen-*Reads*

Dargestellt für alle MRGN-positiven (rote Punkte) und MRGN-negativen (grüne Punkte) Proben ist der prozentuale Anteil der *Reads*, auf dem ein Antibiotikaresistenzgen mithilfe der bioinformatischen Software in der CARD-Datenbank gefunden wurde.

3.3.2 Zuordnung nach Resistenzmechanismus

Mit der CARD-Datenbank wurde den ARG-*Reads* der jeweilige Resistenzmechanismus zugeordnet und die prozentuale Verteilung der ARG-*Reads* nach Resistenzmechanismus in allen metagenomischen Proben analysiert. Gesondert wurden die MRGN-relevanten Familien (Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae) betrachtet. (Abb. 11)

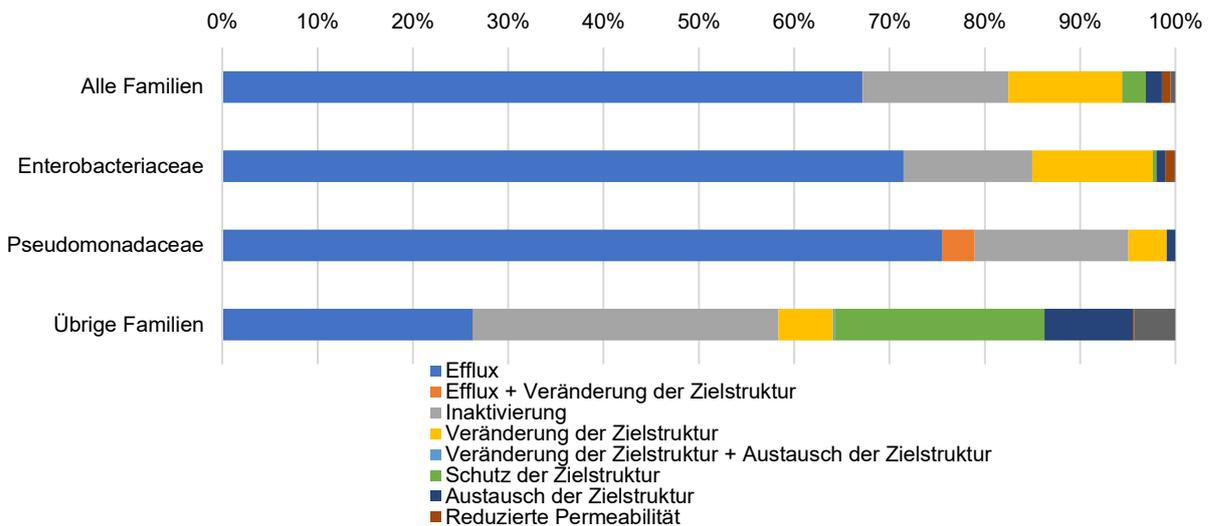


Abb. 11: Zuordnung der Resistenzgen-Reads nach Resistenzmechanismus

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der Resistenzmechanismen aller Resistenzgen-Reads der 54 metagenomischen Proben laut CARD-Datenbank. Abgebildet ist die Verteilung insgesamt, die Verteilung bei Enterobacteriales und Pseudomonadaceae und die Verteilung bei den übrigen Familien.

3.4 Resistenzgenanalyse der kulturell nachgewiesenen Spezies

3.4.1 Quantitativer Vergleich

Mittels CARD-Datenbank wurden den ARG-Reads die jeweiligen assoziierten Antibiotikaklassen zugeordnet. Zunächst wurden quantitativ die Anzahl der ARG-Reads und die Anzahl verschiedener ARG zwischen phänotypisch sensibel und resistent getesteten Spezies in den MRGN-positiven Proben und Isolaten in Bezug auf Carbapeneme verglichen. Bei den anderen MRGN-relevanten Antibiotikaklassen war dieser Vergleich nicht möglich, da die kulturell nachgewiesenen Spezies in MRGN-positiven Proben zwangsläufig gegen Penicilline, Cephalosporine und Fluorchinolone (bis auf eine Probe: 1) resistent waren und somit der Vergleich fehlte. Gezählt wurden nur ARG, die der kulturell nachgewiesenen Spezies zugeordnet und die laut CARD-Datenbank mit der Resistenz gegen Carbapeneme assoziiert waren. Auch wurden die quantitativen Unterschiede bei einem *Cut-off* von > 1 *Read* untersucht, um Fehlzuzuordnungen zu reduzieren und die Ergebnisse nach Gb adjustiert, um Proben mit geringen Mengen an Sequenzdaten nicht zu benachteiligen. Im Mittel enthielten MRGN-positive Proben und Isolate, in denen phänotypisch eine carbapenemresistente Spezies nachgewiesen wurde, mehr ARG-Reads, mehr verschiedene ARG, mehr verschiedene ARG mit > 1 *Read* und auch mehr verschiedene ARG pro Gb, die laut CARD-Datenbank mit einer Carbapenemresistenz assoziiert waren. Auf Ebene der Einzelproben gelang es jedoch nicht, einen *Cut-off* festzulegen, der sicher zwischen resistent und sensibel getesteten Spezies unterscheiden konnte. (Tab. 3 und 4)

Tabelle 3: Carbapenem-Resistenzgene in MRGN-positiven Proben

MRGN-positive Probe	Ergebnis der phänotypischen Carbapenemresistenz Testung	ARG-Reads*	verschiedene ARG*	verschiedene ARG mit > 1 Read*	verschiedene ARG* pro Gb
P01	S	94	2	2	1
P02	S	235	3	2	1
P03	R	21	10	5	4
P04	S	122	9	7	4
P05	R	1.480	44	21	14
P06	S	36	14	6	29
P07	S	37	4	4	0
P08	S	3	2	1	1
P09	S	1.674	16	10	2
P10	S	754	2	2	0
P11	S	4	1	2	0
P12	S	398	2	2	0
P13	R	3	3	0	4
P14	R	547	20	17	9
P15	S	355	2	2	0
P16	S	105	7	4	2
P17	S	94	3	3	5
P18	S	29	1	1	1
P19	S	113	9	8	3
P20	S	0	0	0	0
P21	S	500	2	2	1
P22	S	707	2	2	0
P23	S	379	2	2	1
P24	S	410	2	2	1
P25	S	35	2	2	0
P26	S	188	2	2	1
P27	S	1.053	18	11	9
Mittelwert	Carbapenem sensibel (n = 24)	318,5	4,7	3,4	2,6
Mittelwert	Carbapenem resistent (n = 4)	512,8	19,3	10,8	7,8

Grau: Proben mit phänotypischem Nachweis einer carbapenemresistenten Spezies

ARG: Antibiotikaresistenzgen, Gb: Gigabasen

*mit Zuordnung zur kulturell nachgewiesenen Spezies und Assoziation mit einer Carbapenemresistenz laut CARD-Datenbank

Tabelle 4: Carbapenem-Resistenzgene in Isolaten

Isolat	Ergebnis der phänotypischen Carbapenemresistenz Testung	ARG-Reads*	verschiedene ARG*	verschiedene ARG mit > 1 Read*	verschiedene ARG* pro Gb
I01	S	37	2	2	7
I02	S	49	2	2	7
I03	R	81	10	7	42
I04	S	55	8	4	29
I05	R	159	13	8	41
I06	S	162	13	12	37
I07	S	142	5	4	17
I08	S	176	12	8	34
I09	S	143	9	5	26
I10	S	28	2	2	7
I11	S	32	2	1	6
I12	S	31	2	1	10
I13	R	1.458	28	23	13
I14	R	1.165	25	20	14
I15	S	224	2	2	2
I16	S	820	7	5	4
I17	S	551	4	3	3
I18	S	310	2	2	1
I19	S	355	5	5	3
I20	S	58	4	3	2
I21	S	140	2	2	2
I22	S	314	2	2	1
I23	S	262	2	2	1
I24	S	180	2	2	2
I25	S	193	2	2	1
I26	S	238	2	2	1
I27	S	1.277	15	7	6
Mittelwert	Carbapenem sensibel (n = 24)	251,2	4,7	3,5	6,1
Mittelwert	Carbapenem resistent (n = 4)	715,8	19,0	14,5	27,2

Grau: Proben mit phänotypischem Nachweis einer carbapenemresistenten Spezies

ARG: Antibiotikaresistenzgen, Gb: Gigabasen

*mit Zuordnung zur kulturell nachgewiesenen Spezies und Assoziation mit einer Carbapenemresistenz laut CARD-Datenbank

3.4.2 Resistenzgenanalyse mithilfe einer Auswertungsregel

Für die genotypische Resistenztestung wurde eine Auswertungsregel formuliert. Eine Resistenz wurde angenommen, sobald ein ARG nachgewiesen werden konnte, das laut Beschreibung der CARD-Datenbank potenziell in der Lage war, eine Resistenz zu vermitteln. ARG, die nur für eine Untereinheit eines Proteinkomplexes kodierten, wurden nur berücksichtigt, sofern alle Gene der anderen Untereinheiten ebenfalls nachgewiesen wurden. Auf diese Weise wurden einzelne Effluxpumpen-Untereinheitengene ausgeschlossen, die laut Beschreibung auf weitere Untereinheitengene angewiesen waren. Außerdem wurden Regulatorgene ausgeschlossen, die laut Beschreibung nicht in der Lage waren alleinstehend eine Resistenz zu vermitteln. Bei Abwesenheit entsprechender ARG wurde eine Sensibilität angenommen. Auf einen *Cut-off* Wert für eine Mindestanzahl von *Reads* wurde aufgrund der teilweise geringen *Coverage* verzichtet (Abb. 9). Auf diese Weise wurden Resistenzen gegen Penicilline, Cephalosporine, Fluorchinolone und Carbapeneme in 14 von 27 MRGN-positiven Proben korrekt vorhergesagt. Neun 3MRGN-Proben wurden überschätzt als 4MRGN, zwei Proben (3- und 4MRGN) wurden unterschätzt als MRGN-negativ (P13, P20) und eine 3MRGN Probe (P08) wurde weder über-, noch unterschätzt, wies jedoch statt einer Fluorchinolonresistenz eine potenzielle Carbapenemresistenz auf. Letztere drei Proben waren jedoch zugleich auch die Proben mit der geringsten geschätzten *Coverage* der jeweils kulturell nachgewiesenen Spezies. (Tab. 5)

Tabelle 5: Regelbasierte Auswertung der metagenomischen Resistenztestung

Probe	Kulturell nachgewiesene Spezies (geschätzte Coverage)	Resistenz gegen MRGN-relevante Antibiotikaklassen*			
		Penicillin	Cephalosporin	Fluorchinolon	Carbapenem
P01	<i>E. coli</i> (150,4-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P02	<i>E. coli</i> (305,3-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P03	<i>E. cloacae</i> komplex (17,3-fach)	R/R	R/R	R/R	R/R
P04	<i>E. cloacae</i> komplex (98,9-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P05	<i>K. pneumoniae</i> (556,3-fach)	R/R	R/R	R/R	R/R
P06	<i>K. pneumoniae</i> (4,0-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P07	<i>K. pneumoniae</i> (21,4-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P08	<i>K. pneumoniae</i> (1,0-fach)	R/R	R/R	R/S	S/R
P09	<i>K. pneumoniae</i> (758,8-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P10	<i>E. coli</i> (672,3-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P11	<i>E. coli</i> (8,6-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P12	<i>E. coli</i> (428,2-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P13	<i>P. aeruginosa</i> (0,1-fach)	R/S	R/S	R/S	R/S
P14	<i>P. aeruginosa</i> (155,8-fach)	R/R	R/R	I/R	R/R
P15	<i>E. coli</i> (517,4-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P16	<i>K. pneumoniae</i> (45,4-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P17	<i>E. aerogenes</i> (86,5-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P18	<i>E. coli</i> (7,3-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P19	<i>E. cloacae</i> komplex (71,4-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R
P20	<i>C. freundii</i> (0,8-fach)	R/S	R/S	R/S	S/S
P21	<i>E. coli</i> (470,8-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P22	<i>E. coli</i> (682,9-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P23	<i>E. coli</i> (425,2-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P24	<i>E. coli</i> (333,0-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P25	<i>E. coli</i> (23,7-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P26	<i>E. coli</i> (265,5-fach)	R/R	R/R	R/R	S/S
P27	<i>K. pneumoniae</i> (383,0-fach)	R/R	R/R	R/R	S/R

R: resistent, S: sensibel, I: sensibel bei erhöhter Exposition

*Das erste R bzw. S steht für das kulturelle Testergebnis, das zweite für die genotypische Prädiktion aus der MRGN-positiven Probe. Grün hinterlegt sind alle Zellen, in denen das kulturelle Ergebnis mit der genotypischen Prädiktion übereinstimmt. Rot hinterlegt sind alle Zellen, in denen die genotypische Prädiktion eine Resistenz übersah, blau hinterlegt sind alle Zellen, in denen die genotypische Prädiktion eine mögliche Resistenz fand, die kulturell nicht nachweisbar war.

3.4.3 Potenziell multiresistente Erreger in MRGN-negativen Proben

Mit dieser Auswertungsregel erfolgte auch die exemplarische Untersuchung von acht MRGN-negativen Proben, um eventuelle MRGN-Erreger zu finden, die durch das kulturelle MRGN-Screening Verfahren übersehen wurden. In allen acht MRGN-negativen Proben wurden mindestens zwei potenzielle 3- oder 4MRGN-Erreger gefunden. In einer Probe sogar drei. (Tab. 6)

Tabelle 6: **Potenzielle MRGN-Erreger in 8 exemplarischen MRGN-negativen Proben***

Probe	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>
N01			PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	PE, CE, CA (<i>bla_{SHV-108}</i>)
N02			PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	PE, CE, CA (<i>bla_{SHV-28}</i>) FL (<i>kpnG, kpnH, tolC</i>)
N03	PE, CE, CA (<i>bla_{OXA-486}</i>), FL (<i>pmpM</i>)		PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	
N04			PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	PE, CE, CA (<i>ompK37</i>)
N05			PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	PE, CE, CA (<i>bla_{SHV-40}</i>), FL (<i>mdtK</i>)
N06		-	PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	PE, CE, CA (<i>bla_{SHV-1}</i>), FL (<i>mdtK</i>)
N07		PE, CE, CA (<i>ompK37</i>), FL (<i>mdtK</i>)	PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	PE, CE, CA (<i>bla_{SHV-172}</i>), FL (<i>mdtK</i>)
N08			PE, CE (<i>bla_{ampC}</i>), FL (<i>acrE, acrF, tolC</i>)	PE, CE, CA (<i>bla_{SHV-185}</i>), FL (<i>mdtK</i>)

Rot: potenziell 4MRGN, Orange: potenziell 3MRGN

PE: Penicilline, CE: Cephalosporine, FL: Fluorchinolone, CA: Carbapeneme

*hinter den Antibiotikaklassen stehen in Klammern beispielhaft Gene, die laut CARD-Datenbank einzeln oder in Kombination mit der jeweiligen Resistenz assoziiert sind

3.4.4 Resistenzgenanalyse anhand von Markergenen

Aufgrund der Überschätzung der Antibiotikaresistenzen durch die Auswertungsregel wurde als letztes gezielt nach ARG gesucht, die der kulturell nachgewiesenen Spezies zugeordnet wurden und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Resistenz vermitteln.

Außerdem wurde in allen metagenomischen Proben nach entsprechenden Markergenen mit Spezieszuordnung gesucht, um weitere potenzielle MRGN-Erreger zu identifizieren.

3.4.4.1 Penicilline und Cephalosporine

Penicilline und Cephalosporine gehören zu den Betalaktam-Antibiotika. Betalaktam-Antibiotika hemmen die Zellwandsynthese durch kovalente Bindung an Transpeptidasen, die für die Quervernetzung von Peptidoglykanen der Mureinschicht verantwortlich sind [84]. Eine Resistenz gramnegativer Bakterien gegenüber Betalaktam-Antibiotika wird überwiegend durch die Expression substratspezifischer Betalaktamasen verursacht [84, 85].

In allen MRGN-positiven Proben konnten der kulturell nachgewiesenen Spezies zugeordnete Betalaktamasegene (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *AmpC*: *bla_{ampC}*, *bla_{ACT}*, *bla_{ampH}*, *bla_{OXA}*) gefunden werden, außer in den Proben P13 und P20, die bereits in der regelbasierten Auswertung bei sehr geringer *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies unterschätzt wurden.

Auch in zahlreichen MRGN-negativen Proben wurden Betalaktamasegene gefunden. In durchschnittlich 4,7 Spezies (Min: 1, Max: 13, Median: 4) je Probe wurde mindestens ein *Read* einer der oben genannten Betalaktamasegene gefunden.

3.4.4.2 Fluorchinolone

Fluorchinolone gehören zu den Chinolon-Antibiotika. Ihre antibiotische Wirkung entfalten Fluorchinolone durch Bindung an bakterielle Topoisomerasen, die normalerweise durch gezielte Doppelstrangbrüche für eine Entspiralisierung der DNA während der Replikation, Transkription, Rekombination und DNA-Reparatur sorgen. Resistenzen werden überwiegend durch Topoisomerasemutationen hervorgerufen, häufig in Zusammenspiel mit Effluxpumpen [86].

Topoisomerasemutationen konnten mit der verwendeten bioinformatischen *Pipeline* nicht nachgewiesen werden.

Reads von Effluxpumpengenen, die laut CARD-Datenbank Fluorchinolone aus der Zelle befördern und der kulturell nachgewiesenen Spezies zugeordnet waren, fanden sich in allen Proben mit einer gewissen *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies (in den Proben P08, P13 und P20 fanden sich keine).

Auch in MRGN-negativen Proben wurden zahlreiche Gene von Effluxpumpen gefunden, die Fluorchinolone potenziell aus der Zelle befördern können.

3.4.4.3 Carbapeneme

Carbapeneme gehören ebenfalls zu den Betalaktam-Antibiotika. Eine Carbapenemresistenz gramnegativer Bakterien wird laut Studien überwiegend durch die Expression von Carbapenemasen verursacht [87, 88]. Eine Carbapenemresistenz ist von besonderer Bedeutung, da sie in der Regel den Unterschied zwischen 3MRGN und 4MRGN ausmacht.

In zwei von vier MRGN-positiven Proben mit kulturell nachgewiesener carbapenemresistenter Spezies wurden *Reads* von Carbapenemasegenen (Ambler Class A: *bla*_{NmcA}, *bla*_{SMS}, *bla*_{IMI}, *bla*_{SFC}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, B: *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{CcrA} und D: *bla*_{OXA}) gefunden [89, 90]. In Probe P05 war eine Zuordnung zur kulturell nachgewiesenen Spezies möglich, in Probe P03 war keine Zuordnung möglich. In Probe P13 wurden bei sehr wenigen *Reads* der kulturell nachgewiesenen Spezies keine Carbapenemasegene gefunden.

In Probe P14 und dem dazugehörigen Isolat (I14) wurden im Einklang mit der PCR-Testung keine *Reads* von Carbapenemasegenen gefunden, jedoch von anderen ARG (*mexAB-oprM* und *bla*_{ampC}), die in Kombination eine Carbapenemresistenz erklären können [21, 22]. In den restlichen drei Isolaten (I03, I05, I13) wurden *Reads* von Carbapenemasegenen gefunden, die der kulturell nachgewiesenen Spezies zugeordnet werden konnten. Das Ergebnis stimmte stets mit der PCR-Testung überein. (Tab. 7)

Tabelle 7: Carbapenemasegene

Proben mit Nachweis einer phänotypisch carbapenemresistenten Spezies (MRGN-Klassifikation, k. n. S., geschätzte Coverage)	Routine Diagnostik	Bioinformatische Pipeline	
	Carbapenemase-PCR aus Isolat	Isolat	MRGN-positive Probe
P03 (4MRGN, <i>E. cloacae</i> Komplex, 17,3-fach)	<i>bla</i> _{GIM-1}	<i>bla</i> _{GIM-1} (1c, 23u)	<i>bla</i> _{GIM-1} (12u), <i>bla</i> _{GIM-2} (2u), <i>bla</i> _{KPC-24} (1u)
P05 (4MRGN, <i>K. pneumoniae</i> , 556,3-fach)	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{KPC-1} (1c, 27u)	<i>bla</i> _{KPC-1} (48c), <i>bla</i> _{KPC-6} (12c), <i>bla</i> _{KPC-3} (6c), <i>bla</i> _{KPC-24} (3c), <i>bla</i> _{KPC-8} (2c), <i>bla</i> _{KPC-4/5/11/13/14/16/17/19/22} (jeweils 1c)
P13 (4MRGN, <i>P. aeruginosa</i> , 0,1-fach)	<i>bla</i> _{GIM-1}	<i>bla</i> _{GIM-1} (26c, 68u), <i>bla</i> _{GIM-2} (1c, 1u)	-
P14 (3MRGN, <i>P. aeruginosa</i> , 155,8-fach)	-	-	-

k. n. S.: kulturell nachgewiesene Spezies, Anzahl ARG Reads: c: taxonomisch anhand der flankierenden Regionen der k. n. S. zugeordnet („classified“), u: nicht zugeordnet („unclassified“)

In allen carbapenemsensiblen Isolaten wurden keine Reads von Carbapenemasegenen gefunden. In allen metagenomischen Proben, in denen keine phänotypisch carbapenemresistente Spezies nachgewiesen werden konnte, wurde ein einziger Read von *bla*_{ccrA}, einer chromosomal kodierten Carbapenemase von *Bacteroides fragilis* gefunden, die einem kulturell nachgewiesenen 3MRGN *E. coli* (P02) zugeordnet wurde [91]. Abgesehen davon wurden keine Reads von Carbapenemasegenen gefunden, die einer Spezies zugeordnet wurden. Lediglich in zwei MRGN-positiven Proben (P04, P06) und vier MRGN-negativen Proben (N12, N13, N15, N17) fanden sich einzelne, keiner Spezies zugeordnete Reads von Carbapenemasegenen.

3.5 Evaluation der Spezieszuordnung der Resistenzgene

Mithilfe der bioinformatischen Software, die eine taxonomische Zuordnung anhand der flankierenden Regionen ermöglichte, war in den metagenomischen Proben eine Zuordnung der ARG-Reads in 94,6 % auf Familienebene, in 83,1 % auf Genusebene und in 80,8 % auf Speziesebene möglich.

Auch die ARG-Reads aus den Isolaten wurden mithilfe der bioinformatischen Software taxonomisch zugeordnet, obwohl der Ursprung der ARG-Reads bekannt war. Dadurch konnte die Trefferquote der taxonomischen Spezies-Zuordnung der ARG-Reads näherungsweise bestimmt werden. 85,5 % der ARG-Reads aus den Isolaten wurde korrekterweise der jeweils isolierten Spezies zugeordnet. 2 % der ARG-Reads wurde fälschlicherweise einer anderen Spezies als der Isolierten zugeordnet. Somit zeigte sich eine Trefferquote von 97,7 %. 12,5 % der ARG-Reads konnte keiner Spezies zugeordnet werden und wurde nicht in die Berechnung einbezogen. (Abb. 12)



Abb. 12: Trefferquote bei der Spezieszuordnung der Resistenzgen-Reads

Dargestellt ist der Anteil an Antibiotikaresistenzgen-Reads aller Isolate, der korrekt der jeweiligen kulturell nachgewiesenen Spezies zugeordnet wurde (rot), der Anteil der einer falschen Spezies zugeordnet wurde (grün) und der Anteil, der keiner Spezies zugeordnet wurde (grau).

3.6 Vergleich zwischen MRGN-positiver Probe und Isolat

In der MRGN-positiven Probe wurden durchschnittlich 48,8 verschiedene ARG gefunden, die der kulturell nachgewiesenen Spezies zugeordnet werden konnten, im Isolat 57,4. Durchschnittlich 66,6 % (Min: 6.3 %, Max: 93.1 %, Median: 69.8 %) dieser ARG im Isolat fanden sich auch in der MRGN-positiven Probe. Sofern alle ARG ignoriert wurden, die nur auf einem *Read* gefunden werden konnten, erhöhte sich die Übereinstimmung leicht auf 69,8 %. Sofern nur Proben berücksichtigt wurden, in denen die MRGN-positive Probe mindestens so viele *Reads* der kulturell nachgewiesenen Spezies aufwies, wie das entsprechende Isolat (n = 16), stieg die Übereinstimmung auf 81,8 %. Zu beachten ist die Arbeitsweise der bioinformatischen *Pipeline* und der Umgang mit Genvarianten, die hier als unterschiedliche ARG betrachtet wurden. Ein *Read* wurde ab etwa 80 % Übereinstimmung mit der CARD-Datenbank einem ARG zugeordnet. Dabei wurde jeweils die Genvariante angenommen, die die höchste Übereinstimmung aufwies. Dies führte dazu, dass sehr viele Genvarianten gefunden wurden, die sich zum Teil nur durch eine Base (z. B. *bla*_{GIM-1} und *bla*_{GIM-2}) unterschieden (Tab. 7). (Abb. 9)

4 Diskussion

In dieser *Proof-of-Concept* Studie konnte aus vielen Analabstrichen eine relevante Menge bakterieller DNA extrahiert werden, nachdem erfolgreich die humane DNA depletiert wurde. Mittels metagenomischer Nanopore-Sequenzierung wurde in zahlreichen Proben eine gute *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies erzielt. Bioinformatisch konnte ein Großteil (68,8 % auf Speziesebene) aller *Reads* taxonomisch zugeordnet und auf durchschnittlich 0,88 % aller *Reads* Sequenzen von ARG gefunden werden. Auch diese konnten zu einem großen Teil (80,8 % auf Speziesebene) und mit einer hohen Genauigkeit (97,7 %) taxonomisch zugeordnet werden. Mithilfe der bioinformatischen *Analyse-Pipeline* konnten *Reads* der kulturell nachgewiesenen Spezies in allen MRGN-positiven Proben nachgewiesen sowie das Mikrobiom der Proben untersucht werden, das sich signifikant vom physiologischen Darmmikrobiom unterschied. Die genotypische Resistenztestung zeigte jedoch die Limitationen der *Analyse-Pipeline*. Das Ergebnis der genotypischen MRGN-Testung entsprach nur in etwas über der Hälfte der Proben der phänotypischen MRGN-Testung und überschätzte oft Resistenzen. Auch in exemplarisch untersuchten MRGN-negativen Proben wurden zahlreiche potenzielle MRGN-Erreger gefunden. Ein Vergleich der MRGN-positiven Proben mit den zugehörigen Isolaten bezüglich der ARG der kulturell nachgewiesenen Spezies zeigte ebenfalls nur eine teilweise Übereinstimmung. Die Untersuchung auf Markergene, insbesondere im Hinblick auf die Carbapenemresistenz, zeigte bessere Ergebnisse.

4.1 Depletion humaner DNA

Für diese Studie wurde DNA direkt aus Analabstrichen extrahiert. Patientenproben enthalten häufig zu einem erheblichen Anteil humane DNA. Dieser Anteil ist stark abhängig vom Entnahmeort. Speichelproben, Nasal-, Haut- und Vaginalabstriche enthielten in einer Studie mehr als 90 % humane DNA, Rektalabstriche (23,4 %) und Stuhlproben (5,5 % bzw. < 10%) dagegen deutlich weniger [69, 92]. In den Vorversuchen dieser Studie zeigte sich in Analabstrichen mit 18,5 % (unveröffentlichte Daten) ein vergleichbarer Anteil humaner DNA. Der höhere Anteil humaner DNA in Anal- bzw. Rektalabstrichen im Vergleich zu Stuhlproben könnte durch den Abstrichprozess bedingt sein, bei dem ungewollt anale Hautschuppen in die Probe gelangen [92]. Mittels selektiver Lyse konnte der Anteil humaner DNA auf durchschnittlich 3,11 % (Min: 0,03 %, Max: 47,11 %, Median: 0,35 %) reduziert werden. Eine andere Studie erreichte vergleichbare Werte [60].

4.2 DNA-Isolation

Analabstriche enthalten im Vergleich zu anderen Probenarten wie Stuhlproben oder Isolaten deutlich weniger DNA und vor allem sehr variable DNA-Mengen [93-95]. Durchschnittlich wurden 862,4 ng DNA aus 800 µl Probenmaterial extrahiert und damit mehr als doppelt so viel wie in einer vergleichbaren Studie [93]. Durch den Verzicht auf eine Amplifikation der DNA wurde ein möglicher Amplifikationsbias ausgeschlossen. Dadurch konnten jedoch die sehr variablen DNA-Mengen (3,6 ng bis 5.489 ng) nicht kompensiert werden. Solche Schwankungen sind nicht untypisch für metagenomische Proben, erschweren jedoch die Analyse und Vergleichbarkeit [59, 93]. Ein Amplifikationsbias besteht darin, dass in der Regel nicht alle DNA-Moleküle einer Probe bei einer Amplifikation in gleichem Maße amplifiziert werden. Bei den Isolaten, bei denen auf gleiche Weise die DNA extrahiert wurde, schwankte die DNA-Menge lediglich um den Faktor 2,8. Dies deutet darauf hin, dass die DNA-Extraktion nicht wesentlich zur hohen Schwankungsbreite beitrug, sondern tatsächlich vor allem die Menge an Ausgangsmaterial in den Abstrichen. Variationen in der Probenentnahme, Unterschiede in der Menge an humaner DNA, die depletiert wurde, oder Unterschiede im bakteriellen Mikrobiom könnten ursächlich sein. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass auch eine vorherige Antibiotikatherapie einen signifikanten, negativen Einfluss, auf die extrahierbare DNA-Menge hat [93].

Der Unterschied in der extrahierten DNA-Menge zwischen MRGN-positiven Proben (901,5 ng) und MRGN-negativen Proben (828,5 ng) fiel eher gering aus. Dagegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Proben mit kulturellem Wachstum auf Selektivmedium (1.135 ng), das zur Vorselektion diente, und Proben ohne kulturelles Wachstum auf Selektivmedium (281 ng) (siehe Abb. 3). Letzteres wirft die Frage nach der Sensitivität der kulturellen MRGN-Testung von Analabstrichen auf. Hypothetisch könnte ein inadäquat durchgeführter Abstrich über eine zu geringe Menge an Ausgangsmaterial erstens zu einer geringeren kulturellen Detektionsrate des multiresistenten Erregers geführt haben und zweitens zu einer geringeren Menge an extrahierbarer DNA. In diesem Zusammenhang ist auch die Dominanz der kulturell nachgewiesenen Spezies interessant, die sehr häufig beobachtet werden konnte. Wäre ein Nachweis auch bei geringerer DNA-Menge des MRGN-Erregers bzw. bei geringerer Dominanz erfolgt? Diese Frage lässt sich mit der geringen Probenanzahl der Studie leider nicht beantworten. Gegen diese Hypothese spricht, dass in Studien für das verwendete Selektivmedium eine relativ geringe Nachweisgrenze bezüglich der koloniebildenden Einheiten gezeigt werden konnte [96]. Dafür spricht, dass sich Wissenschaftler aufgrund vieler nicht verwendbarer Rektalabstriche bereits damit auseinandersetzten, eine molekularbiologische Qualitätskontrolle für Rektalabstriche zu entwickeln [95]. Auch dafür spricht, dass die Kultivierung zwar eine sehr sensitive Nachweismethode darstellt, aber dennoch eine gewisse Menge an koloniebildenden Einheiten für eine sichere Erkennung benötigt [97].

4.3 Nanopore-Sequenzierung

Die Menge der gewonnenen Sequenzdaten schwankte stark zwischen den metagenomischen Proben (0,17 Gb - 14,3 Gb). Dies war zu erwarten, da bei jeder Probe eine variable Menge an DNA als Ausgangsmaterial diente. Doch auch bei den Isolaten (0,21 Gb - 2,6 Gb) schwankte die Menge der gewonnenen Sequenzdaten trotz konstanter Menge an Ausgangsmaterial, wenn auch deutlich weniger. Unterschiede bezüglich der DNA Qualität und der Verteilung der Fragmentlängen zwischen den Proben könnten die Schwankungen erklären und wurden in der Literatur als Einflussfaktoren beschrieben [98].

Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass die Menge der gewonnenen Sequenzdaten besonders zwischen den einzelnen Sequenzierungsläufen deutlich schwankte (siehe Abb. 4). Dies ist höchstwahrscheinlich zu einem Großteil auf die erheblich schwankende Anzahl funktionsfähiger Nanoporen der *Flow Cells* zurückzuführen. Sind weniger Poren vorhanden, so sinkt der Durchsatz und bei konstanter Sequenzierungszeit konsequenterweise die Menge an Sequenzdaten. Da es sich um biologische Poren handelt, unterliegen diese einer gewissen alters- und lagerbedingten Degradation sowie eventuellen produktionsbedingten Schwankungen. Die maximale Porenanzahl bei MinION *Flow Cells* wird mit 2.048 angegeben, bei weniger als 800 Poren kann die *Flow Cell* im Rahmen der Garantie umgetauscht werden [99]. Unter realen Bedingungen schwankte die Anzahl der Poren in einer Studie zwischen 593 und 1.458 [100, 101].

4.4 Ausreichende Coverage

Die Frage nach einer ausreichenden *Coverage* ist schwer zu beantworten und richtet sich vorrangig nach dem Ziel der Sequenzierung bzw. nach der benötigten Genauigkeit. Da die Fehlerrate und die *Read*-Länge durch die genutzte Sequenzierungstechnologie sowie die bioinformatische *Pipeline* weitgehend vorgegeben sind, kann die Genauigkeit der Sequenzierung im Wesentlichen nur durch die *Coverage* beeinflusst werden. Je geringer die Fehlerrate und je höher die *Read*-Länge, desto kleiner ist tendenziell die benötigte *Coverage*.

Wird lediglich eine taxonomische Zuordnung angestrebt, so ist eine vergleichsweise geringe *Coverage* ausreichend [102]. Sollen dagegen einzelne Gene oder gar Einzelnukleotid-Polymorphismen bzw. Mutationen untersucht werden, wird eine deutlich höhere *Coverage* benötigt. In einer Studie mit Isolaten wird mindestens eine 30-fache *Coverage* für die ARG-Analyse mittels *Second-Generation* Sequenzierung empfohlen [103]. Für die ARG-Analyse mittels Nanopore-Sequenzierung wird aufgrund der höheren Fehlerrate (siehe Abschnitt 4.15 Einschränkungen der Studie) eine mindestens 100-fache *Coverage* empfohlen [30]. Bei der *Coverage* metagenomischer Proben muss zusätzlich bedacht werden, dass sich die *Coverage* auf alle in der Probe enthaltenen Spezies anteilig aufteilt. Die *Coverage* muss also für jede Spezies separat berechnet werden.

In einem kurzen Rechenbeispiel wird eine 100-fache *Coverage* als ausreichend für die ARG-Analyse betrachtet. Ein *E. coli* Genom (Stamm K12) hat die Größe von etwa 4,6 Mbp [83]. Für eine 100-fache *Coverage* wird demnach rund 460 Mb an Sequenzdaten des Genoms benötigt. In dieser Studie wurden durchschnittlich 3.300 Mb an Sequenzdaten aus den metagenomischen Proben erzielt, somit genügte ein Anteil von etwa 13,9 % *E. coli* Sequenzen, um eine 100-fache *Coverage* zu erreichen. Aus einer Probe wurden jedoch lediglich 170 Mb an Sequenzdaten erzielt. Hier ist, selbst wenn alle Sequenzen *E. coli* zugeordnet werden können, nur eine 37-fache *Coverage* möglich. In der Praxis machte die kulturell nachgewiesene Spezies trotz relativer Dominanz nur einen Anteil von durchschnittlich 32,9 % (Min: 0,1 %, Max: 84,7 %, Median: 32,3 %) aus (siehe Abschnitt 4.6 Taxonomische Zuordnung und Mikrobiom).

Für die zuverlässige Analyse von Genvarianten, die sich zum Teil nur durch Einzelnukleotid-Polymorphismen unterscheiden und Mutationen, die z. B. im Rahmen der Fluorchinolonresistenz relevant sind, ist nochmals eine deutlich höhere *Coverage* erforderlich. Eine Studie konnte mit einer 500-fachen *Coverage* verlässlich Genvarianten bestimmen [104].

Unter der Annahme einer konstanten *Read*-Länge und einer konstanten Genomgröße von 4,6 Mbp wurde durchschnittlich eine hohe *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies in den metagenomischen Proben (240-fach) und Isolaten (225-fach) erreicht. Die Schwankungen waren jedoch wie zu erwarten sehr groß, insbesondere in den metagenomischen Proben (0,13-fach – 759-fach). In 18 von 27 metagenomischen Proben erreichte die kulturell nachgewiesene Spezies eine geschätzte *Coverage* von > 30-fach, in 14 Proben von > 100-fach und in 5 Proben gar von > 500-fach. Die *Coverage* der Isolate schwankte deutlich geringer (46-fach – 565-fach).

Zusammenfassend konnte eine ausreichende *Coverage* für die Identifikation der kulturell nachgewiesenen Spezies in allen Proben erreicht werden. Für die ARG-Analyse erreichten mutmaßlich etwa die Hälfte aller metagenomischen Proben eine ausreichende *Coverage*. Die zuverlässige Analyse von Genvarianten bzw. Mutationen wäre unter der Voraussetzung einer geeigneten bioinformatischen *Pipeline* nur in wenigen Proben möglich gewesen.

4.5 Zukünftige Optimierung der Coverage

Die *Coverage* wurde im Wesentlichen von 3 Faktoren beeinflusst: Von der extrahierten DNA-Menge, von der Sequenzierungskapazität der *Flow Cell* und von dem Anteil der klinisch relevanten Spezies an der Gesamtmenge der DNA.

Die extrahierte DNA-Menge war in 50,7 % der metagenomischen Proben der begrenzende Faktor der *Coverage*. Um mehr DNA für die Sequenzierung zu extrahieren, könnte im Falle von Analabstrichen relativ mehr Probenmaterial entnommen werden. Auch könnte die Extraktions-*Pipeline* optimiert werden. Für eine höhere und vor allem konstantere DNA-Menge

wäre auch eine *Whole Genome* Amplifikation denkbar, jedoch müsste hier ein gewisser Amplifikationsbias in Kauf genommen werden.

In 49,3 % der metagenomischen Proben und allen Isolaten limitierte nicht die extrahierte DNA-Menge, sondern die Sequenzierungskapazität der *Flow Cells* die *Coverage*. Durch das *Barcoden* konnten parallel 12 Proben sequenziert und die Kosten gesenkt werden. Jedoch teilte sich dafür die Sequenzierungskapazität unter den 12 Proben auf. Mit weniger Proben pro *Flow Cell* ließe sich die *Coverage* deutlich erhöhen. Andere Studien sequenzierten häufig nur eine metagenomische Probe pro *Flow Cell* [58, 60]. Insbesondere für Echtzeit-Sequenzierungen empfiehlt es sich auf ein *Barcoding* zu verzichten, da hier der Durchsatz von entscheidender Bedeutung ist.

Der Anteil der klinisch relevanten Spezies an der Gesamtmenge der DNA ist abgesehen von einer Optimierung der Depletion humaner DNA nur schwer beeinflussbar, sofern keine gezielte Amplifikation speziesspezifischer Gene vorgenommen wird.

4.6 Taxonomische Zuordnung und Mikrobiom

Die metagenomische Sequenzierung von Analabstrichen ermöglicht neben der ARG-Analyse auch die Analyse des Mikrobioms der Proben. Mithilfe des aus Abstrichen bestimmten Mikrobioms können möglicherweise Rückschlüsse auf das Darmmikrobiom gezogen werden. Das Darmmikrobiom übernimmt wichtige Aufgaben bei der Nahrungsverwertung, dem Schutz des Darmes vor Pathogenen und dem Training des Immunsystems [105]. Das humane Darmmikrobiom ist 150-mal größer als das humane Genom und beherbergt 10-mal so viele bakterielle Zellen wie humane Körperzellen [106]. Es wurde bereits vorgeschlagen, das Mikrobiom als eigenes Organ zu betrachten [107]. Im Rahmen zahlreicher Erkrankungen kann das Darmmikrobiom als Ursache oder Folge verändert sein. Ein Beispiel ist die Dysbiose bei einer *Clostridioides difficile* Infektion. Aber auch im Rahmen von Übergewicht, kolorektalen Karzinomen, M. Crohn, Reizdarmsyndrom und vielen weiteren Erkrankungen fiel in Studien ein verändertes Mikrobiom auf [108-111].

Um das Mikrobiom der Proben zu bestimmen, wurden alle *Reads* mittels Kraken 2 taxonomisch zugeordnet. Je höher die Ordnung, desto mehr *Reads* konnten zugeordnet werden, auf Familienebene 74,9 %, auf Genusebene 71,0 % und auf Speziesebene 68,8 %. Die übrigen *Reads* waren vermutlich zu kurz für eine Zuordnung.

Wurden alle *Reads* der metagenomischen Proben betrachtet, zeigte sich auf den ersten Blick eine hohe bakterielle Diversität (1004 verschiedene Genera in allen Proben). Bei einem artifiziellen *Cut-off* von > 1 % aller zugeordneten *Reads* zeigte sich jedoch eine Dominanz einiger weniger Genera (11 verschiedene Genera in allen Proben), die einen Großteil (90,8 %) aller *Reads* ausmachten. Eine andere Studie fand in Rektalabstrichen eine vergleichbare Diversität mit durchschnittlich 30 verschiedenen Genera bei einem *Cut-off* von > 0,1 % [112].

Bei einem *Cut-off* von > 0,1 % aller zugeordneten *Reads* wurden in dieser Studie 32 verschiedene Genera gefunden.

Die normale Darmflora ist interindividuell sehr verschieden. Meist wird das Darmmikrobiom anhand von Stuhlproben analysiert und besteht dann in aller Regel auf Phylaebene größtenteils aus Firmicutes (Bacillota), Bacteroidetes (Bacteroidota), Actinobacteria (Actinomycetota), Proteobacteria (Pseudomonadota) und Verrucomicrobiota [113]. Alle MRGN-relevanten Bakterien gehören zum Phylum Proteobacteria (Pseudomonadota). Diese machten je nach Studie 0,1 %, 1 % bzw. 9,3 % des normalen Darmmikrobioms aus [114-117]. Das Mikrobiom der Analabstriche dieser Studie unterschied sich signifikant von der normalen Darmflora. Es dominierten die zu den Proteobacteria gehörenden Enterobacterales mit 44,0 % aller *Reads* im Großteil der Proben. Interindividuelle Unterschiede alleine können diese Diskrepanz nicht erklären.

Das Darmmikrobiom unterscheidet sich je nach bakteriellen Wachstumsbedingungen im Verlauf des Darmtraktes. Somit hat auch der Probenursprung einen Einfluss auf die Zusammensetzung. Das Mikrobiom aus Stuhlproben muss also nicht dem Mikrobiom aus Analabstrichen entsprechen. Studien, die explizit das anale oder rektale Mikrobiom mithilfe von Abstrichen untersuchten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Studien heben die Ähnlichkeit zu Stuhlproben und damit die Repräsentativität für die Untersuchung des Mikrobioms hervor [94, 118, 119]. So überwogen die interindividuellen Unterschiede die intraindividuellen Unterschiede nach Probenart deutlich [118]. Andere Studien wiederum fanden signifikante Unterschiede in den Abstrichen, wie eine Dominanz von *Prevotella* und *Bacteroides* bzw. *Enterococcus* [93, 120]. Tatsächlich fanden auch einige Studien in Analabstrichen einen höheren Anteil an Proteobacteria im Vergleich zu Stuhlproben, jedoch nicht in dem Umfang wie in dieser Studie [118, 121]. Der höhere Anteil an Proteobacteria könnte durch den höheren Sauerstoffgehalt im Bereich des Anus erklärt werden, der das Wachstum fakultativ anaerober Bakterien begünstigt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass mukosanah, wo laut Studien ein höherer Sauerstoffgehalt herrscht, mehr Proteobacteria (19,3 % vs. 9,3 %) zu finden waren und eine geringere Diversität herrschte als im sauerstoffarmen Lumen [122, 123].

Abgesehen von probenspezifischen Unterschieden könnten auch Veränderungen des Mikrobioms im Rahmen von Krankheiten die Abweichung der Proben vom normalen Mikrobiom erklären, schließlich stammten viele der Proben von Patienten auf Intensiv- bzw. Intermediate-Care-Stationen. Studien zeigen, dass bei kritisch kranken Patienten auf Intensivstationen oft eine verringerte mikrobielle Diversität mit einer Überhandnahme von Enterobacterales/Proteobacteria herrscht [124, 125]. Auch im Rahmen von Inflammationsprozessen wie bei M. Crohn oder dem Reizdarmsyndrom kam es in Studien zu einer Zunahme von Enterobacterales [108, 111, 126]. Des Weiteren zeigte sich in einer Studie

auch nach Antibiotikatherapie oft eine Dominanz von Proteobacteria, nachdem die physiologische Darmflora dezimiert wurde [127]. Auch wenn dies leider nicht erfasst wurde, dürften viele der Patienten im Rahmen einer Intensivtherapie vor der Abstrichentnahme antibiotisch therapiert worden sein.

Zuletzt könnte auch ein Selektionsbias während der Lagerung und Probenverarbeitung ein Überwiegen der Proteobacteria erklären [123, 128]. Eine Studie zeigte, dass in Stuhl-Abstrichen nach einigen Tagen ungekühlter Lagerung bis zur Analyse der Anteil von Enterobacterales stark zunahm [129]. Die Autoren vermuteten als Ursache für die Vermehrung die Sauerstofftoleranz. Durch stets gute Kühlung und zeitnahe Verarbeitung wurde versucht, einen solchen Bias während der Lagerung in der durchgeführten Studie gering zu halten. Ein Bias während der Probenverarbeitung ist nicht auszuschließen, jedoch dominierten auch in all den Vorversuchen mit Analabstrichen und verschiedenen Extraktionsmethoden Proteobacteria deutlich. Ein generelles Problem bei der humanen DNA-Depletion betrifft die selektive Lyse. Hier werden selektiv humane Zellen lysiert und die frei gewordene DNA depletiert. Dabei können jedoch auch tote oder vorgeschädigte bakterielle Zellen lysiert werden. Denkbar wäre, dass Proteobacteria von der Probenentnahme bis zur human DNA-Depletion aufgrund des fakultativ anaeroben Stoffwechsels besser überleben als andere Phyla und somit einen höheren Anteil noch lebender Zellen bei der Depletion ausmachten. Allerdings finden sich hierzu keine Studien.

Zusammenfassend kann die Dominanz der Proteobacteria in den Proben (1) teilweise durch den Unterschied von Anal- zu Stuhlproben, (2) teilweise durch die Lagerung und Probenverarbeitung, aber (3) vermutlich zum größten Teil durch die krankheitsbedingten Änderungen des Mikrobioms erklärt werden.

Im Zusammenhang mit der Dominanz der Proteobacteria, zeigte sich auch eine Dominanz der jeweils kulturell nachgewiesenen Spezies. Sie machte in MRGN-positiven Proben durchschnittlich fast ein Drittel (32,9 %) aller *Reads* aus und dominierte in über der Hälfte der Proben (51,9 %) die zugeordneten *Reads* auf Speziesebene. Die möglichen Ursachen hierfür entsprechen weitgehend den oben genannten Faktoren für die Dominanz der Proteobacteria. Hervorzuheben ist, dass in MRGN-positiven Proben trotz mehr Sequenzdaten eine etwas geringere Diversität (535 vs. 556 Genera bzw. 5,9 vs. 6,6 Genera mit *Cut-off* von > 1 %) vorgefunden wurde, vermutlich aufgrund der Dominanz der kulturell nachgewiesenen Spezies. Dies könnte suggerieren, dass Antibiotikaresistenzen zu einer höheren Dominanz im Mikrobiom führen. Es liegt aber wahrscheinlich lediglich darin begründet, dass viele der Patienten in der Zeit vor Probenabnahme antibiotisch therapiert wurden und somit ein Selektionsvorteil für resistente Bakterien bestand.

Nach Diskussion der mikrobiologischen und methodischen Einflussfaktoren vor und während der Sequenzierung muss zuletzt die bioinformatische Auswertung betrachtet und hinterfragt werden. Anhand der Anzahl taxonomisch zugeordneter *Reads* wurde auf die Zusammensetzung des Mikrobioms geschlossen. Dieser Rückschluss ist jedoch nur unter der Annahme einer konstanten *Read*-Länge und einer konstanten Genomgröße zutreffend. Ein größeres Genom führt durchschnittlich zu mehr *Reads*, ebenso ein stark fragmentiertes Genom. Beides suggeriert durch mehr *Reads* einen höheren Anteil am Mikrobiom, der in Wahrheit nicht gegeben ist. Da jedoch eine zufällige Verteilung der *Read*-Längen erwartet wird, dürfte die Zählung der *Reads* trotzdem eine näherungsweise Abschätzung der Zusammensetzung des Mikrobioms erlauben.

Eine genauere Abschätzung der Zusammensetzung ist mittels der *Coverage* möglich, die laut einer Studie tatsächlich mit der Konzentration in der Ausgangsprobe korrelierte [58]. Dies ist auch nicht verwunderlich, da die Berechnung der *Coverage* (Anzahl der *Reads* * Durchschnittliche *Reads*-Länge / Genomgröße) alle oben genannten Einflussfaktoren berücksichtigt [130]. Die Berechnung der *Coverage* jedes einzelnen Taxons wäre jedoch sehr aufwändig gewesen, zumal die genauen Daten der *Read*-Längen fehlten.

4.7 Resistenzgenanalyse

Mittels CARD-Datenbank und der bioinformatischen Software wurden alle *Reads* nach möglichen ARG durchsucht. In MRGN-positiven Proben wurden auf 0,92 % und in MRGN-negativen Proben auf 0,75 % aller *Reads* ARG gefunden (Tab. 2). Dabei nahm die Software die ARG-Variante an, die die höchste, mindestens aber eine 80%ige Übereinstimmung zeigte. Die Festlegung eines gewissen Toleranzbereiches ist üblich. Insbesondere auf kurzen *Reads* liegen häufig nur Fragmente von Genen vor. Außerdem bestimmt die Sequenzierung nicht jede Base korrekt. Auch andere Studien nutzten für die Übereinstimmung einen *Cut-off* von 80 % [60, 131]. Problematisch ist dieser Toleranzbereich, sofern Mutationen oder Genvarianten sicher bestimmt werden sollen, die sich zum Teil nur durch Einzelnukleotid-Polymorphismen unterscheiden. Der Austausch einer oder mehrerer Basen muss nicht relevant sein, kann aber zu funktionellen Unterschieden in ARG führen. Diese betreffen beispielsweise die Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum einer Klasse oder die Anfälligkeit für eine Hemmung gegenüber bestimmten Adjuvantien [60, 132]. Die Genvarianten der GIM-Carbapenemase, *bla*_{GIM-1} und *bla*_{GIM-2} (gefunden in Probe P03, siehe Tab. 7) bestehen laut CARD-Datenbank beide aus 761 Basen und unterscheiden sich nur durch eine Base, das entspricht einer Übereinstimmung von 99,9 %. Hier ist klar, dass eine 80%ige Übereinstimmung keine sichere Unterscheidung ermöglicht, ganz abgesehen von der Fehlerrate der Nanopore-Sequenzierung (siehe Abschnitt 4.15 Einschränkungen der Studie). Auch eine andere Studie, die einen *Cut-off* von 80 % und Nanopore-Sequenzierung nutzte, hatte Probleme mit der sicheren Identifikation von Genvarianten. Im Falle des

Betalaktamasegens *bla*_{CTX-M} wurden beispielsweise mittels Nanopore-Sequenzierung u. a. die Varianten 1, 3, 15, 52 und 114 gefunden. In der zur Kontrolle durchgeführten Illumina-Sequenzierung derselben Probe zeigte sich lediglich die Variante 15 [60].

Jedoch gibt es auch Genvarianten, die sich stärker im genetischen Code und vermutlich auch funktionell voneinander unterscheiden. Die OXA-Betalaktamasen *bla*_{OXA-1} und *bla*_{OXA-2} weisen nur eine Übereinstimmung von etwa 48 % auf [90]. Hier sollte mit der verwendeten Pipeline eine sichere Unterscheidung möglich sein.

Interessant ist der Ansatz der Zuordnung mit einer hierarchischen Datenbank (Resfams): Wenn keine sichere Übereinstimmung zu einer ARG-Variante gefunden wird, wird nicht die ähnlichste Variante angenommen, sondern nur die Genfamilie bestimmt (z. B. *bla*_{GIM}) [133]. Dadurch lässt sich eine falsche Genauigkeit verhindern, die häufig für die Funktionalität des Gens keine Bedeutung hat.

Insgesamt wurden 717 verschiedene ARG bzw. ARG-Varianten in allen metagenomischen Proben gefunden. Verglichen mit ähnlichen Studien (183 ARG in 41 respiratorischen Proben [61], 146 ARG in 4 Stuhlproben [58]) wurden sehr viel mehr ARG gefunden. Dies lag vermutlich hauptsächlich daran, dass im Gegensatz zu den beiden oben genannten Studien auf *Cut-off* Werte bezüglich einer Mindestanzahl an *Reads* der ARG oder eines Qualitätsscores bei der Sequenzierung, verzichtet wurde. Dadurch wurden auch ARG berücksichtigt, die beispielsweise nur auf einem *Read* gefunden und möglicherweise fehlklassifiziert wurden. Aber auch die benutzte ARG-Datenbank könnte eine Rolle gespielt haben. Eine Studie zum Vergleich bioinformatischer *Pipelines* verschiedener Laboratorien zeigte, dass alle *Pipelines*, die die CARD-Datenbank nutzten, besonders viele ARG fanden, insbesondere Effluxpumpengene [103]. Zuletzt wurde auch eine vergleichsweise hohe Anzahl an Proben analysiert.

In MRGN-positiven Proben wurden je Probe durchschnittlich mehr verschiedene ARG (151,5 vs. 97,8), mehr ARG-*Reads* (10.060 vs. 7.624) und mehr ARG-*Reads* pro Gb (2.628,9 vs. 2.040,7) gefunden. Bei Nachweis eines multiresistenten Erregers in den MRGN-positiven Proben ist dieser Unterschied zu erwarten gewesen. In MRGN-negativen Proben wurden jedoch mehr verschiedene ARG pro Gb (79,7 vs. 64,3) gefunden. Dies könnte durch die etwas höhere Diversität in MRGN-negativen Proben bei weniger Sequenzdaten erklärt werden (siehe Abschnitt 4.6 Taxonomische Zuordnung und Mikrobiom).

4.8 Zuordnung zum Resistenzmechanismus und zu den Antibiotikaklassen

Mittels CARD-Datenbank wurde jedem ARG der Resistenzmechanismus zugeordnet [134]. ARG-*Reads* von Enterobacterales und Pseudomonadaceae wurden überwiegend Effluxpumpengen zugeordnet (71,5 %). Dies verdeutlicht die Relevanz von Effluxpumpen in der natürlichen Resistenz gramnegativer Bakterien. Auch in einer anderen Studie, die

Darmmikrobiota untersuchte, wurden die meisten ARG-Reads Effluxpumpengenen zugeordnet [58]. Anzumerken ist, dass viele Effluxpumpen aus 3 Untereinheiten bestehen, die jeweils durch ein eigenes Gen kodiert werden. Jedes dieser Untereinheitengene wird separat gezählt. Weiterhin sind Effluxpumpengene bis auf wenige Ausnahmen chromosomal kodiert und wurden somit gut von der verwendeten *Pipeline* erkannt und taxonomisch zugeordnet [135, 136]. Außerdem sorgte die Nutzung der CARD-Datenbank, wie zuvor erwähnt, für die Erkennung besonders vieler Effluxpumpengene [103, 137]. Bei allen übrigen Familien, außer Enterobacterales und Pseudomonaceae, machten Effluxpumpengene einen deutlich geringeren Anteil (26,3 %) aus.

Problematisch ist die Interpretation von Effluxpumpengenegen bezüglich ihrer Funktion. Sie werden häufig eher gering exprimiert, können aber bei einer Überexpression oder in Kombination mit anderen ARG zu ausgeprägten Resistenzen führen [138-140]. Eine Studie konnte anhand von *E. coli* zeigen, dass nach Inaktivierung der Effluxpumpe AcrAB eine Gyrasemutation nicht mehr in der Lage war, eine klinische Fluorchinolonresistenz zu verursachen [141]. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass Betalaktamasen ohne Carbapenemasefunktion bzw. mit geringer Affinität zu Carbapenemen in Zusammenspiel mit bestimmten Effluxpumpen zu einer phänotypischen Carbapenemresistenz führen können [21, 22]. Aufgrund der hohen Relevanz wird bereits seit längerem an Effluxpumpen-Inhibitoren geforscht [142].

ARG-Reads, die mit einer Antibiotikainaktivierung (z. B. durch Betalaktamasen) assoziiert wurden, machten bei Enterobacterales und Pseudomonadaceae nur 13,5 % aus, bei allen übrigen Familien immerhin 32,0 %. Dies zeigt, dass sich bakterielle Familien zum Teil stark hinsichtlich der genutzten Resistenzmechanismen unterscheiden.

4.9 Resistenzgenanalyse der kulturell nachgewiesenen Spezies

Ebenfalls wurden mittels CARD-Datenbank jedem ARG alle potenziell beeinflussten Antibiotikaklassen zugeordnet. Dies erlaubte die Durchführung einer genotypischen Resistenztestung der kulturell nachgewiesenen Spezies.

4.9.1 Spezieszuordnung

Um gezielt nur die ARG der jeweils kulturell nachgewiesenen Spezies zu analysieren, wurde die Zuordnung der ARG-Reads anhand der flankierenden Regionen genutzt. Abgesehen von einer anderen Studie, die in dieser Form jedoch nur wenige Proben analysierte, war dies ein Alleinstellungsmerkmal der Studie [58]. Für zukünftige metagenomische Testungen direkt aus Patientenproben ist die Zuordnung von ARG zur Ursprungsspezies eine wesentliche Voraussetzung und dürfte in den kommenden Jahren an Bedeutung gewinnen.

Fast alle ARG-Reads (80,8 %) wurden mit einer sehr hohen Genauigkeit (97,7 %) auf Speziesebene zugeordnet. Eine wesentliche Limitation war jedoch, dass auf diese Weise

extrachromosomale ARG-Reads auf Plasmiden nicht zugeordnet werden konnten. Die Einbindung einer Plasmid-Datenbank könnte dieses Problem in Zukunft lösen. Auch konnten ARG-Reads nicht zugeordnet werden, wenn die flankierenden Regionen zu kurz waren. Hier könnte in Zukunft die Assemblierung der kurzen Reads zu Contigs Abhilfe schaffen. Welcher Anteil der nicht zugeordneten ARG-Reads durch extrachromosomale Gene und welcher Anteil durch zu kurze Reads verursacht wurde, ist ungewiss. Anhand der Präsenz von Effluxpumpengenen, die ganz überwiegend chromosomal vorliegen, wurde eine Schätzung durchgeführt [135, 136]. Auf taxonomisch zugeordneten ARG-Reads wurden 67,2 % Effluxpumpengene gefunden, auf taxonomisch nicht zugeordneten ARG-Reads, die offenbar zu kurz für eine Zuordnung waren, 50,6 %. Dies spräche dafür, dass etwa 3/4 der nicht zugeordneten ARG-Reads zu kurz für eine Zuordnung waren und 1/4 aufgrund eines extrachromosomalen Ursprungs nicht zugeordnet werden konnte.

Auch kann bei der Spezieszuordnung nicht sichergestellt werden, dass die Kombination aus ARG, die zu einer genotypisch prognostizierten Multiresistenz führen, alle ihren Ursprung im gleichen Zellklon haben. So wäre es denkbar, dass ein Bakterienklon der Spezies ARG für eine Carbapenemresistenz aufweist, ein anderer Bakterienklon der gleichen Spezies ARG für eine Fluorchinolonresistenz. Sofern beide Bakterienklone ARG für eine Penicillin- und Cephalosporinresistenz aufweisen, würde bei der genotypischen Resistenzvorhersage auf Speziesebene ein 4MRGN-Erreger detektiert werden, obwohl kulturell beide Bakterienklone für sich genommen nur als 3MRGN interpretiert worden wären.

4.9.2 Grundlagen der genotypischen Resistenztestung

Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten genotypische Resistenztestungen auszuwerten: Die regelbasierte Auswertung und die *Machine-Learning* basierte Auswertung.

Einfacher und in Studien (noch) häufiger angewandt wird die regelbasierte Auswertung. Hier werden Kriterien festgelegt, nach denen ein Erreger als resistent bzw. sensibel interpretiert wird. Häufig wird hierzu eine ARG-Datenbank (z. B. CARD) bzw. eine Liste an Markergenen verwendet. Studien, die gezielt einzelne Spezies untersuchten und hierfür individuelle Markergene festlegten, zeigten bessere Ergebnisse, als Studien die vorgefertigte Gendatenbanken nutzten [62-65, 137]. Ursächlich hierfür sind vor allem (speziespezifische) Unterschiede hinsichtlich der Relevanz einzelner ARG, die durch heutige Gendatenbanken oft nicht berücksichtigt werden. Unabhängig davon, ob eine fertige Datenbank oder individuelle Markergene verwendet werden, wird in der Regel bei Anwesenheit eines entsprechenden ARG eine Resistenz angenommen und bei Abwesenheit eine Sensibilität [51, 143]. Hinzu kommen häufig *Cut-off* Werte bezüglich der Übereinstimmung mit der Datenbank, der Mindestanzahl an Reads und weiterer Kenngrößen. Regelbasierte Resistenzvorhersagemodelle neigen jedoch zu einer binären Darstellung und kennen häufig keine Abstufungen, wie die MHK in der kulturellen Testung. Auch haben viele regelbasierte

Auswertungen Probleme mit Resistenzen, die nicht auf der Anwesenheit bekannter ARG beruhen, sondern auf der Abwesenheit (z. B. durch Porinverlust) oder auf intrinsischen Resistenzen (z. B. die Resistenz gramnegativer Bakterien gegenüber Glycopeptiden aufgrund der impermeablen äußeren Membran) [144, 145].

Machine-Learning basierte Auswertungen trainieren eine künstliche Intelligenz mithilfe von bekannten ARG-Konstellationen und dem zugehörigen phänotypischen Ergebnis. Der größte Vorteil ist, zumindest theoretisch, dass alle Gene berücksichtigt werden können, auch die, die nur einen geringen Einfluss haben (z. B. Effluxpumpengene) oder sogar negativ mit einer Resistenz korrelieren. Dies ermöglicht eine abstufende Bewertung, ähnlich der MHK, und die Bewertung der Resistenz gegenüber individuellen Antibiotika und nicht nur gegenüber Antibiotikaklassen. Außerdem kann die Genauigkeit im Laufe der Zeit immer weiter verbessert werden. Angesichts dieser Vorteile ist es nicht verwunderlich, dass *Machine-Learning* basierte Auswertungen oft eine bessere Übereinstimmung mit der kulturellen Testung zeigen, als regelbasierte. Bei Auswahl sinnvoller Markergene und Regeln war der Unterschied in Studien jedoch gering (89,0 % vs. 90,3 %) [30, 133]. Als wesentlicher Nachteil gilt, dass Fehler oft nur schwer nachzuvollziehen sind. Außerdem werden sehr viele Trainingsdurchläufe benötigt, um auch seltene Gen-Konstellationen korrekt zu bewerten.

Gemeinsam ist beiden Ansätzen, dass die Prädiktion umso besser und aussagekräftiger wird, je mehr Metadaten einfließen, auch klinische und epidemiologische (z. B. Spezies, Ort der Infektion bzw. Probenabnahme und geografische Herkunft des Patienten) [146]. Hier gibt es eine Parallele zu den *Breakpoints* der kulturellen Testung, die ebenfalls viele Einflussfaktoren berücksichtigen müssen (z. B. Spezies und Pharmakokinetik des untersuchten Antibiotikums).

4.9.3 Auswertung

Der Einfachheit halber wurde die Entscheidung für eine regelbasierte Auswertung mittels CARD-Datenbank getroffen.

Zuerst wurde quantitativ die Anzahl der verschiedenen ARG bzw. ARG-*Reads* bei phänotypisch carbapenemresistenten und -sensiblen Bakterien verglichen. Die phänotypische Antibiotikaresistenz korrelierte im Durchschnitt positiv mit der Anzahl assoziierter ARG und ARG-*Reads* – auch adjustiert an die stark schwankende Menge an Sequenzdaten und bei einem *Cut-off* von > 1 *Read* (siehe Tab. 3 und 4). Jedoch standen für diesen Vergleich lediglich 4 Proben mit einer phänotypisch nachgewiesenen carbapenemresistenten Spezies zur Verfügung. Bezüglich der Einzelproben gab es zahlreiche Überschneidungen, sodass kein sinnvoller *Cut-off* Wert festgelegt werden konnte, um eine Resistenz oder Sensibilität sicher vorherzusagen. Alle anderen Antibiotikaklassen konnten auf diese Weise nicht verglichen werden, da alle MRGN-Erreger zwangsläufig gegen Penicilline, Cephalosporine und

Fluorchinolone resistent waren und Proben mit phänotypisch sensibel getesteten Erregern als Vergleich fehlten.

Als nächstes wurde eine Auswertungsregel formuliert. Aufgrund des Screening-Settings und der Devise besser eine Resistenz zu überschätzen als eine potenzielle Resistenz zu übersehen, wurde die Regel relativ großzügig gefasst. Eine Resistenz wurde angenommen, sobald ein ARG nachgewiesen werden konnte, das laut Beschreibung der CARD-Datenbank potenziell in der Lage war, eine Resistenz zu vermitteln. Bei ARG, die nur für eine Untereinheit kodierten bzw. auf weitere ARG angewiesen waren, wurde angenommen, dass nur bei Anwesenheit aller abhängigen ARG die Funktion des ARG gegeben war. Auf diese Weise wurden Regulatorgene ausgeschlossen, die laut Beschreibung nicht in der Lage waren eine Resistenz zu vermitteln. Ebenso wurden einzelne Effluxpumpengene ausgeschlossen, die laut Beschreibung auf weitere, nicht anwesende Untereinheitengene angewiesen waren. Bei Abwesenheit entsprechender ARG wurde eine Sensibilität angenommen. Um falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen kann eine Mindestanzahl von *Reads* festgelegt werden, bevor ein ARG gezählt wird. Im Gegensatz zu vielen Studien, die Isolate analysierten, wurde jedoch aufgrund der geringen Sequenzdaten einiger Proben auf eine Mindestanzahl von *Reads* verzichtet [30].

4.9.4 Bestätigung phänotypischer Resistenzen in MRGN-positiven Proben

Etwas über die Hälfte der Proben (14 von 27) wurde mithilfe der Prädiktion genau wie in der kulturellen MRGN-Diagnostik bewertet. Viele Proben (9 von 27) wurden überschätzt als 4MRGN, aber nur wenige Proben (2 von 27) wurden unterschätzt als MRGN-negativ. Eine Probe wurde weder über-, noch unterschätzt, wies jedoch statt einer Fluorchinolonresistenz eine potenzielle Carbapenemresistenz auf. Die drei letztgenannten Proben, in denen die Resistenz unterschätzt wurde, bzw. nicht alle Resistenzen erklärt werden konnten, waren zugleich auch die Proben mit der geringsten geschätzten *Coverage* der jeweils kulturell nachgewiesenen Spezies (< 1-fach). Dies verdeutlicht die Relevanz einer ausreichenden Menge an Sequenzdaten.

4.9.5 Suche nach potenziellen MRGN-Erregern in MRGN-negativen Proben

Mithilfe dieser Auswertungsregel wurden jedoch auch in den 8 exemplarisch untersuchten MRGN-negativen Proben zahlreiche potenzielle MRGN-Erreger gefunden (siehe Tab. 6). In allen untersuchten Proben wurden mindestens 2, einmal sogar 3 potenzielle MRGN-Erreger entdeckt.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die verwendete, regelbasierte Auswertung zwar sensitiv, aber gleichzeitig zu unspezifisch war. Hauptgrund für die Überschätzung im Hinblick auf die Carbapenemresistenz war vermutlich die Berücksichtigung von Genen fraglich potenter Breitspektrum-Betalaktamasen, veränderter Porine und Effluxpumpen. Umgekehrt kann das

Ergebnis aber auch im Hinblick auf eine möglicherweise geringere Sensitivität des kulturellen Verfahrens hin interpretiert werden.

Mit einer strenger gefassten Regel hätte die Überprädiktion reduziert werden können, dabei wären jedoch wichtige phänotypisch nachgewiesene Resistenzen übersehen worden.

4.10 Schwierigkeiten bei der Interpretation

Die Interpretation der ARG war neben den Schwankungen der *Coverage* das Hauptproblem der Studie.

4.10.1 ARG-Datenbank

Die CARD-Datenbank ist im Hinblick auf die Antibiotikaklassen Zuordnung sehr umfassend, nimmt aber keine Wertung oder Gewichtung der ARG vor. So werden einerseits ARG mit einer Antibiotikaklasse assoziiert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Resistenz führen (z. B. Carbapenemasegene), andererseits aber auch ARG, die für sich genommen praktisch nie zu einer Resistenz führen oder sehr von der Expression abhängig sind [147]. Als Beispiele zu nennen sind Regulatorgene, Effluxpumpen(-Untereinheiten)-Gene, Poringene und Breitspektrum-Betalaktamasegene von Betalaktamasen mit einer fraglichen Hydrolyseaktivität gegenüber Carbapenemen (z. B. *bla_{SHV}*) [148, 149]. Die Überschätzung von Resistenzen bzw. die Unfähigkeit sensible Keime zu identifizieren ist ein bekanntes Problem und wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben [103, 137]. Hierbei zeigte sich auch der Einfluss der Datenbank und der Ein-/Ausschlusskriterien bei der Auswahl der relevanten Gene. Mittels einer anderen Datenbank (ResFinder) gelang zwar insgesamt eine bessere Prädiktion, jedoch wurden im Vergleich zur CARD-Datenbank mehr Resistenzen übersehen [137].

Ein weiterer Kritikpunkt der CARD-Datenbank ist die fehlende Information bezüglich Resistenzen gegenüber individuellen Antibiotika und nicht nur Antibiotikaklassen. Dies schränkt aktuell den klinischen Nutzen stark ein. Auch die Spezies, die das ARG trägt, wird nicht berücksichtigt. Die ResFinder-Datenbank ermöglicht in der neusten Version (2020) die Zuordnung zu individuellen Antibiotika und berücksichtigt ausgewählte Spezies [150]. Dies zeigt die enorme Entwicklungsgeschwindigkeit.

4.10.2 Expression

Mit der verwendeten *Pipeline* konnte lediglich die Existenz von ARG nachgewiesen werden, nicht die Expression. Dies ist ein generelles Problem genotypischer Testverfahren. Studien fanden beispielsweise Gene der Betalaktamasen *bla_{TEM-1}* und *bla_{CTX-M}* im Genom von sensibel auf Amoxicillin bzw. Ceftazidim getesteten *E. coli* [64, 151]. Die Balance aus Sensitivität durch Einschluss möglichst vieler Markergene und Spezifität durch Ausschluss möglichst vieler stark expressionsabhängiger Markergene ist mittels regelbasierter Auswertung schwer zu finden.

Die Expression ist unter anderem abhängig von der Ursprungsspezies, bestimmten Regulatorgenen und Promotorregionen sowie der Anzahl an Genkopien, die vor allem auf Plasmiden relevant ist [133, 152]. Diese Faktoren werden wiederum durch Umwelteinflüsse und epigenetische Modifikationen beeinflusst [153]. Umfassende bioinformatische Modelle oder Expressionsanalysen mittels RNA-Sequenzierung könnten Aufschluss über die Expression geben [154, 155].

Erste Studien, die eine parallele Analyse von Resistom und ARG-Transkriptom untersuchten, wurden bereits durchgeführt [156, 157]. Als Transkriptom wird die Gesamtheit aller RNA-Moleküle eines Mikrobioms zu einem definierten Zeitpunkt bezeichnet. Eine Studie konnte eine deutlich verbesserte Prädiktion von Antibiotikaresistenzen durch die Kombination aus DNA- und RNA-Sequenzierung zeigen [157].

Was die Aussagekraft einer Expressionsanalyse schmälert, ist die Tatsache, dass die Expression einiger ARG wie oben beschrieben *in vivo* unter wechselnden Umgebungsbedingungen variieren kann und häufig erst unter Antibiotikaeinfluss induziert wird. Eine Studie zeigte außerdem, dass die Expression vieler ARG während einer Infektion *in vivo* deutlich stärker gesteigert wird, als *in vitro* [158].

Auch die generelle metabolische Aktivität eines Erregers entscheidet über die Antibiotikaresistenz. Bakterien in Ruhephase mit einem reduzierten Stoffwechsel, sogenannte Persister, die unter Umständen kulturell gar nicht nachgewiesen oder als sensitiv eingestuft wurden, überleben Antibiotikatherapien und können wiederkehrende Infektionen verursachen [159, 160]. Dies gilt insbesondere für Bakterien, die in der Lage sind Biofilme zu bilden [161]. Interessanterweise scheinen auch Effluxpumpen eine große Rolle für das Überleben von Persistern zu spielen. Studien zeigen, dass sie trotz reduziertem Stoffwechsel oft stark exprimiert werden [162]. Bestimmte Effluxpumpen (AcrAB-TolC) sind sogar in der Lage neben ihrer Hauptfunktion die Expression von DNA-Reperaturgenen (z. B. *mutS*) zu mindern und auf diese Weise den Erwerb neuer Mutationen zu fördern [163]. So könnten Effluxpumpen bei einer Überexpression eine wichtige Rolle bei dem Übergang von einer *Low-level* Resistenz zu einer klinischen Resistenz spielen [164].

4.11 Gezielte Suche nach Markergenen

Die gezielte Suche nach ausgewählten Markergenen war zielführender als die Anwendung der Auswertungsregel anhand der CARD-Datenbank (siehe Tab. 7). Dies beruhte insbesondere auf der Bewertung der gefundenen Resistenzgene nach ihrer Relevanz, welche von der CARD-Datenbank nicht vorgenommen wird (siehe 4.10 Schwierigkeiten bei der Interpretation).

4.11.1 Penicilline und Cephalosporine

Alle MRGN-Erreger sind per se penicillin- und cephalosporinresistent. Tatsächlich konnten die phänotypischen Cephalosporin- und Penicillinresistenzen aller kulturell nachgewiesenen MRGN-Spezies mit einer über 1-fachen *Coverage* (P13 und P20 ausgenommen) durch die Anwesenheit von Betalaktamasegenen bestätigt werden. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass die Wirkspektren der einzelnen Betalaktamasen bzw. der Genvarianten nicht im Einzelnen betrachtet wurden, da die CARD-Datenbank keine genaue Differenzierung ermöglichte und Genvarianten, wie bereits erwähnt, nicht sicher identifiziert werden konnten. Eine weitere Limitation war, dass keine Negativkontrollen, d.h. keine kulturell penicillin- bzw. cephalosporinsensibel getesteten Erreger in die Studie eingeschlossen wurden.

In MRGN-negativen Proben wurden zahlreiche Spezies gefunden, denen *Reads* von Betalaktamasegenen zugeordnet wurden. Dies war jedoch zu erwarten, da Betalaktamasegene sehr häufig sind und nicht per se zu einer Multiresistenz führen.

4.11.2 Fluorchinolone

Alle MRGN-Erreger sind in der Regel fluorchinolonresistent (hier bis auf P14: I, siehe Tab. 5). Fluorchinolonresistenzen beruhen meist auf Topoisomerasemutationen (*gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*) [86]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die MHK parallel zur Anzahl der Topoisomerasemutationen zunimmt. Für eine klinisch relevante Resistenz sind häufig mindestens 2 Mutationen notwendig [165]. Abgesehen von den Topoisomerasemutationen scheinen Effluxpumpen eine wichtige Rolle bei der Fluorchinolonresistenz zu spielen. Studien konnten bei einem erheblichen Anteil phänotypisch fluorchinolonresistent getesteter Bakterien Effluxpumpengene nachweisen [166, 167]. Die Relevanz von Effluxpumpen (insb. AcrAB-TolC) könnte insbesondere in der Anhebung subklinischer Resistenzen zu klinisch ausgeprägten Resistenzen liegen. Eine Studie konnte zeigen, dass durch Anwesenheit von Effluxpumpen die MHK eines Isolates mit nur einer *gyrA* Mutation mindestens um das 16-fache gesteigert werden konnte [166]. Fluorchinolonresistenzen ohne Topoisomerasemutationen werden jedoch in der Literatur nur sehr vereinzelt beschrieben und scheinen die Ausnahme zu sein [168]. Aus diesen Erkenntnissen wird ersichtlich, dass der Nachweis von Topoisomerasemutationen für die genotypische Resistenzdiagnostik von Fluorchinolonen entscheidend ist. Studien konnten insbesondere für Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC* eine hohe Übereinstimmung mit der kulturellen Testung zeigen [147, 157].

Topoisomerasemutationen konnten mit der verwendeten bioinformatischen *Pipeline* jedoch nicht nachgewiesen werden, da nur nach dezidierten ARG gesucht werden konnte und nicht nach mutierten Struktur- und Regulatorgenen. Auch hätte die Genauigkeit nicht ausgereicht, um Punktmutationen sicher zu identifizieren. Dies ist eine wesentliche Limitation der Studie.

Reads von Effluxpumpengen, die zahlreich gefunden wurden und die laut Beschreibung der CARD-Datenbank mit einer Fluorchinolonresistenz assoziiert sind, fanden sich in allen Proben mit einer über 1-fachen *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies (ausgenommen P08, P13 und P20).

4.11.3 Carbapeneme

Klinisch relevante Carbapenemresistenzen in Enterobacterales werden zu einem Großteil, je nach Studie zwischen 73 % und 98 %, durch Carbapenemasen verursacht [87, 88]. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine fast 100%ige Übereinstimmung zwischen der Präsenz von Carbapenemasegenen und der phänotypischen Carbapenemresistenz besteht [147]. In den vier MRGN-positiven Proben mit kulturell carbapenemresistent getesteten Spezies gelang der Nachweis von Carbapenemasegenen mit Spezieszuordnung in einer Probe (P05, geschätzte *Coverage* 556-fach), in einer weiteren Probe ohne Spezieszuordnung (P03, geschätzte *Coverage* 17-fach) und in zwei Proben nicht (P13 und P14 geschätzte *Coverage* 0,13-fach und 156-fach). In den Isolaten gelang der Nachweis von Carbapenemasegenen (mit Spezieszuordnung) in drei von vier Proben (I03, I05 und I13, geschätzte *Coverage* 52-fach, 70-fach und 478-fach). In der vierten Probe, dem Isolat I14 (*P. aeruginosa*, geschätzte *Coverage* 400-fach), konnte weder in der Sequenzierung des Isolates noch in der Carbapenemase-PCR, die stets mit dem Ergebnis der Sequenzierung übereinstimmte, ein Carbapenemasegen nachgewiesen werden (siehe Tab. 7). Dies verdeutlicht, dass auch andere Resistenzmechanismen nicht außer Acht gelassen werden dürfen. In Probe 14 konnten diesbezüglich die ARG *mexA*, *mexB*, *oprM* und *bla_{ampC}* nachgewiesen werden. Studien zeigen, dass die Überexpression des Effluxpumpenkomplexes *mexAB-oprM* und/oder der AmpC Betalaktamase in *P. aeruginosa* zu einer deutlich erniedrigten Sensibilität gegenüber Carbapenemen führen kann [169]. Zu einer klinisch relevanten Resistenz kommt es laut Studien aber insbesondere durch die zusätzliche Kombination mit einem OprD Porinverlust [170, 171]. Dieser konnte jedoch leider mithilfe der verwendeten bioinformatischen *Pipeline* nicht nachgewiesen werden.

Resistenzen, die nicht auf Carbapenemasen zurückzuführen sind, scheinen laut den meisten Studien eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Eine Studie aus Texas kam interessanterweise zu einem anderen Ergebnis [172]. Hier wurde die Mehrheit der Carbapenemresistenzen in Enterobacterales nicht durch Carbapenemasen (nur 41 %) hervorgerufen. Dies betraf insbesondere Enterobacterales, die von Patienten isoliert wurden, die zuvor bereits eine längere Antibiotikatherapie erhielten bzw. häufig in der Notaufnahme vorstellig wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Carbapenemresistenzen, die nicht durch Carbapenemasen verursacht werden, möglicherweise in stärkerem Maße durch eine Anhäufung von Mutationen im Rahmen der Selektion einer Antibiotikatherapie entstehen.

Bei allen kulturell carbapenemsensibel getesteten Spezies der MRGN-positiven Proben und Isolate wurden keine *Reads* von Carbapenemasegenen gefunden, die der nachgewiesenen Spezies zugeordnet waren. Eine Ausnahme bildete die MRGN-positive Probe (P02, *E.coli*), in der ein einzelner *Read* des Carbapenemasegens *bla_{CrA}* gefunden und zugeordnet wurde. Da nur ein einzelner *Read* gefunden wurde und dieses Gen im entsprechenden Isolat (I02) nicht gefunden wurde, ist jedoch von einer Fehlklassifikation auszugehen.

Die oben genannten Gene *mexA*, *mexB*, *oprM* und *bla_{ampC}* wurden auch bei vielen phänotypisch carbapenemsensibel getesteten Spezies nachgewiesen. Dies zeigt, dass sich diese ARG ohne weitere Informationen bezüglich Regulation, Expression, Wechselwirkungen und eventuellen Genverlusten nicht als Markergene für eine Carbapenemresistenz eignen.

4.12 Konsensus der ARG in der MRGN-positiven Probe und im Isolat

Durchschnittlich wurden der kulturell nachgewiesenen Spezies in den MRGN-positiven Proben 48,8 verschiedene ARG zugeordnet, in den Isolaten 57,4. Eine andere Studie, die ebenfalls Enterobacterales untersuchte, fand abhängig von der Spezies durchschnittlich lediglich 4 bis 11 ARG je Genom, jedoch wurden hierbei keine Varianten berücksichtigt [133]. Die vermeintlich genaue Zuordnung zu Genvarianten führte nicht nur zur Erkennung sehr vieler ARG, sondern trug auch zu dem relativ schlechten Konsens (66,6 %) zwischen den Isolaten und den MRGN-positiven Proben bei (Abb. 9) [61]. Wurde beispielsweise im Isolat *bla_{GIM-1}* und in der MRGN-positiven Probe *bla_{GIM-2}* gefunden, wurde dies bereits als Abweichung gezählt, obwohl lediglich eine Base die beiden Varianten voneinander unterscheidet. Mit Anhebung des *Cut-off* auf > 1 *Read*, um möglicherweise falsch erkannte ARG auszuschließen, und durch Ausschluss von Proben mit weniger *Reads* der kulturell nachgewiesenen Spezies in der MRGN-positiven Probe als im Isolat, konnte die Übereinstimmung auf 69,8 % bzw. 81,8 % erhöht werden.

4.13 Vorhersagekraft

Das Ziel einer jeden Resistenztestung im Rahmen der Therapie ist die verlässliche Vorhersage, ob eine bestimmte Antibiotikatherapie *in vivo* wirksam ist. Für die kulturelle Testung zeigte eine Studie einen starken Zusammenhang zwischen dem Testergebnis und dem *in vivo Outcome* [173].

Das Ziel einer Resistenztestung im Rahmen des MRGN-Screenings ist in der Regel nicht das *in vivo Outcome* einer Antibiotikatherapie vorherzusagen, sondern zu entscheiden, welche Patienten isoliert werden sollten, um möglichst effizient die Ausbreitung von Resistenzen bzw. ARG zu verhindern. Hierfür ist insbesondere eine hohe Sensitivität entscheidend. Die Sensitivität kultureller MRGN-Screening-Diagnostik aus Analabstrichen ist nicht genau bekannt. Eine Studie zeigte eine Sensitivität von 90 % für die Detektion einer Kolonisation mit Fluorchinolon resistentem *E. coli* aus Rektal- und Perirektalabstrichen [174]. Während einige

Studien gute Detektionsraten carbapenemresistenter Erreger aus Isolaten bzw. Rektalabstrichen für das verwendete Selektivmedium CHROMagar KPC nachwiesen, zeigte sich in anderen Studien teilweise nur eine Sensitivität von 43 % verglichen mit dem SUPACABRA Medium bzw. von 75,4 % verglichen mit einer Vitek 2 Messung [96, 175, 176]. Es wäre somit denkbar, dass metagenomische Verfahren, die nicht nur eine repräsentative Kolonie untersuchen, sondern die gesamte Probe, eine höhere Sensitivität aufweisen. Eventuell könnte gerade hier die genotypische ARG-Bestimmung ihre Stärken ausspielen. Auch nicht exprimierte ARG, die therapeutisch keine Relevanz haben, aber ebenso übertragen werden und dann unter anderen Bedingungen möglicherweise exprimiert werden, könnten erkannt werden. Außerdem könnten bei Ausbrüchen relativ leicht die Verwandtschaftsbeziehungen der Erreger mituntersucht werden.

Schlussendlich werden vermutlich auch bei einem gut funktionierenden genotypischen Testverfahren in Zukunft noch kulturelle Testungen benötigt, da sich resistente Bakterien schnell weiter entwickeln und genotypische Testungen im Rahmen von Qualitätskontrollen angepasst werden müssen [30].

4.14 Schnelligkeit

Als *Proof-of-Concept* Studie wurde nicht das Ziel einer maximalen Geschwindigkeit angestrebt. Dennoch ist die Zeitersparnis zwischen Probenabnahme und Ergebnis einer der Hauptvorteile, der durch metagenomische Sequenzierung in Zukunft erreicht werden kann. Da die Untersuchungszeit unabhängig von der kulturellen Wachstumsgeschwindigkeit ist, profitiert insbesondere die Diagnostik langsam wachsender Bakterien. Hervorzuheben ist der Zeitfaktor insbesondere bei der kulturellen *Mycobacterium tuberculosis* Diagnostik, die mehrere Wochen benötigt. In einer Studie konnte die Testung mittels metagenomischer Sequenzierung um ganze 31 Tage verkürzt werden [66].

Verschiedene Studien konnten mithilfe von Nanopore-Sequenzierung eine Echtzeitanalyse demonstrieren, sowohl nach Kultivierung aus Isolaten, als auch direkt aus metagenomischen Proben [58, 60, 147, 177].

Studien, die eine Echtzeitanalyse bei Isolaten durchführten, zeigten, dass die Bestimmung der Spezies sehr schnell möglich ist (30 Minuten Sequenzierungszeit), während die Bestimmung der ARG länger dauert (2 Stunden Sequenzierungszeit bzw. 8 Stunden ab Kultur) [147, 177]. Die sichere Bestimmung von Genvarianten benötigt nochmals deutlich mehr Zeit (10 Stunden Sequenzierungszeit bzw. 14 Stunden ab Kultur) [147, 177]. An dieser Stelle sei nochmals auf die benötigte *Coverage* verwiesen, die sich nach dem Ziel der Sequenzierung richtet und mit längerer Sequenzierungszeit zunimmt. Nicht einberechnet ist die Kultivierungszeit, die für Isolate obligat ist.

Studien, die eine Echtzeitanalyse von metagenomischen Proben durchführten, konnten sogar noch schnellere Ergebnisse erzielen. Eine Studie, die metagenomische Urinproben (mit einer Spezies) untersuchte, konnte innerhalb von 4 Stunden (eine Stunde Sequenzierungszeit) Ergebnisse vorweisen [60]. Eine andere Studie konnte aus einer metagenomischen Stuhlprobe (90 % *K. pneumoniae*) innerhalb von 5 Minuten Sequenzierungszeit häufige ARG detektieren und taxonomisch zuordnen, seltenere ARG immerhin nach 3-4 Stunden [58].

Im Vergleich zu vielen anderen Studien wurden in dieser Studie Proben mit einem deutlich geringeren Anteil der kulturell nachgewiesenen Spezies (durchschnittlich 32,9 %, mit großer Schwankungsbreite) untersucht. Dies erklärt die Entscheidung, den Datenoutput durch die Nutzung der gesamten Sequenzierungszeit der *Flow Cells* zu maximieren, um ein Übersehen von ARG zu verhindern und eine möglichst annehmbare *Coverage* zu erreichen.

Für die Depletion humaner DNA und die DNA-Isolation wurden ungefähr 3 Stunden benötigt, für die *Library Preparation* und das *Barcoden* weitere 5 Stunden. Die Sequenzierung war jedoch mit 72 Stunden bei weitem der zeitintensivste Arbeitsschritt. Sie könnte durch eine Echtzeit Datenauswertung stark beschleunigt werden.

4.15 Einschränkungen der Studie

Eine Einschränkung der Studie war die verhältnismäßig geringe Anzahl verwendbarer Proben. Diese war größtenteils der aufwändigen und oft nicht möglichen Einwilligung der Probanden geschuldet. Bei 63,1 % aller in Frage kommenden Patienten konnte keine Einwilligung eingeholt werden. Insbesondere wurden nur 4 Proben mit einer kulturell nachgewiesenen carbapenemresistenten Spezies gesammelt, vermutlich aufgrund der vergleichsweise geringen Carbapenem-Resistenzraten in Deutschland [44].

Bezüglich der DNA-Isolation und der nachfolgenden Sequenzierung waren die hohen Schwankungsbreiten der DNA-Mengen, der Sequenzdaten und der *Coverage* der kulturell nachgewiesenen Spezies eine Herausforderung. Erschwerend kam die hohe Fehlerrate der Nanopore-Sequenzierung hinzu. Diese ist seit der Einführung im Jahr 2012 kontinuierlich gesenkt worden, liegt aber Stand 2018 immer noch bei etwa 5-15 % [178-180]. Um dennoch möglichst viele ARG zu identifizieren und die flankierenden Regionen der Ursprungsspezies zuzuordnen, wurde in der bioinformatischen *Pipeline* jeweils ein Cut-off von 80 % für die Übereinstimmung mit den Gendatenbanken gewählt. Gleichzeitig wurde aufgrund der teilweise geringen *Coverage* auf eine Mindestanzahl an *Reads* verzichtet. Diese Parametrierung hatte zur Folge, dass viele Genvarianten identifiziert wurden. Die teilweise nur minimalen Unterschiede zwischen den Genvarianten führten jedoch zu einer falschen Genauigkeit. Weiterhin muss bezüglich der bioinformatischen *Pipeline* erwähnt werden, dass nur dezidierte ARG untersucht werden konnten und keine mutierten Struktur- und Regulatorgene. Diese Einschränkung spiegelte sich insbesondere in der unzureichenden

Bewertung von Flurchinolonresistenzen wieder. Die verwendete CARD-Datenbank war sehr umfangreich, stellte sich aber als zu unspezifisch dar, sodass mithilfe der formulierten Auswertungsregel Resistenzen tendenziell überschätzt wurden.

4.16 Ausblick

Auch wenn die EUCAST bislang noch nicht die Anwendung metagenomischer Resistenztestungen für klinische Entscheidungen empfiehlt, ist diese Technologie sehr vielversprechend [181].

Mittels Nanopore-Sequenzierung könnten nicht nur Bakterien, sondern auch Viren, Pilze und Parasiten simultan und in Echtzeit nachgewiesen werden. Die umfangreichen Daten könnten zur aktiven Überwachung von Ausbrüchen genutzt werden, sodass die Verbreitung neuer Resistenzen frühzeitig erkannt würde. Außerdem könnten die Daten für die Erforschung neuer Antibiotika genutzt werden, die sich gezielt gegen bestimmte ARG bzw. Resistenzmechanismen mit hoher Prävalenz richten. In der Therapie könnten erstmalig Virulenzfaktoren und Resistenzmechanismen berücksichtigt werden, um eine gezieltere Antibiotikatherapie zu ermöglichen, die einen geringeren Selektionsdruck auf die Bakterien ausübt. Eventuelle höhere Kosten der metagenomischen Sequenzierung könnten durch kürzere Isolations- und Liegedauern kompensiert- wenn nicht sogar überkompensiert werden [8]. Im Gegensatz zur kulturellen Testung sind die Kosten für die Analyse aller Antibiotika konstant und steigen nicht mit der Anzahl der zu untersuchenden Substanzen [133]. Neben diesen Vorteilen bietet sich die Nanopore-Sequenzierung, abgesehen von den aktuell noch hohen Kosten, auch für entlegene Orte sowie Entwicklungsländer an, da sie üblicherweise mit nur einer Person und mit minimalem Laborequipment und Ressourcen durchgeführt werden kann. Sogar *Point-of-Care-Testing* (POCT) könnte in Zukunft direkt auf Station möglich sein.

Die Interpretation der Resistenzen ist immer noch eine große bioinformatische Herausforderung. Künstliche Intelligenz/*Deep-Learning* basierte Auswertungen könnten in Zukunft dieses Problem lösen.

5 Literaturverzeichnis

1. O'Neill, *Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*. 2014.
2. Neubeiser, A., et al., *Mortality attributable to hospital acquired infections with multidrug-resistant bacteria in a large group of German hospitals*. Journal of Infection and Public Health, 2020. 13(2): p. 204-210.
3. Ben-David, D., et al., *Outcome of carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae bloodstream infections*. Clin Microbiol Infect, 2012. 18(1): p. 54-60.
4. Patel, G., et al., *Outcomes of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. 29(12): p. 1099-106.
5. de Kraker, M.E., P.G. Davey, and H. Grundmann, *Mortality and hospital stay associated with resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe*. PLoS Med, 2011. 8(10): p. e1001104.
6. Tacconelli, E., et al., *Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis*. The Lancet Infectious Diseases, 2018. 18(3): p. 318-327.
7. Caliendo, A.M., et al., *Better Tests, Better Care: Improved Diagnostics for Infectious Diseases*. Clinical Infectious Diseases, 2013. 57(suppl_3): p. S139-S170.
8. Mellmann, A., et al., *Real-Time Genome Sequencing of Resistant Bacteria Provides Precision Infection Control in an Institutional Setting*. J Clin Microbiol, 2016. 54(12): p. 2874-2881.
9. Fleming, A., *On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae*. British journal of experimental pathology, 1929. 10(3): p. 226-236.
10. Hutchings, M.I., A.W. Truman, and B. Wilkinson, *Antibiotics: past, present and future*. Current Opinion in Microbiology, 2019. 51: p. 72-80.
11. Ventola, C.L., *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats*. P & T : a peer-reviewed journal for formulary management, 2015. 40(4): p. 277-283.
12. Andrei, S., G. Droc, and G. Stefan, *FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019*. Discoveries (Craiova, Romania), 2019. 7(4): p. e102-e102.
13. Reardon, S., *WHO warns against 'post-antibiotic' era*. Nature, 2014.
14. Liu, Y., et al., *Antibiotic adjuvants: an alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria*. Critical Reviews in Microbiology, 2019. 45(3): p. 301-314.
15. Theuretzbacher, U., et al., *Reviving old antibiotics*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015. 70(8): p. 2177-2181.
16. Spapen, H., et al., *Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients*. Ann Intensive Care, 2011. 1(1): p. 14.
17. Che, Y., et al., *Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing*. Microbiome, 2019. 7(1): p. 44.
18. Huddleston, J.R., *Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes*. Infection and drug resistance, 2014. 7: p. 167-176.
19. *Genetische Polymorphismen (Sequenzvariationen) von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen und ihre Bedeutung in der Umweltmedizin*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2004. 47(11): p. 1115-1123.
20. Nakano, R., et al., *Role of AmpR in the High Expression of the Plasmid-Encoded AmpC β -Lactamase CFE-1*. mSphere, 2017. 2(4): p. e00192-17.
21. Wozniak, A., et al., *Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile*. Journal of Medical Microbiology, 2012. 61(9): p. 1270-1279.
22. AMIN, N.E., et al., *Carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates*. APMIS, 2005. 113(3): p. 187-196.
23. Delcour, A.H., *Outer membrane permeability and antibiotic resistance*. Biochimica et biophysica acta, 2009. 1794(5): p. 808-816.
24. Zeitung, P. *Gramnegative Keime - Wie gut sind die neuen Antibiotika?* 2018, May 23 [cited 2021 29.05.]; Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-212018/wie-gut-sind-die-neuen-antibiotika/>.
25. Li, X.Z., P. Plésiat, and H. Nikaido, *The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria*. Clin Microbiol Rev, 2015. 28(2): p. 337-418.

26. Herbert Hof, R.D., *Duale Reihe – Medizinische Mikrobiologie*. 2009, Stuttgart.
27. Reller, L.B., et al., *Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices*. Clinical Infectious Diseases, 2009. 49(11): p. 1749-1755.
28. (KRINKO), K.f.K.u.I., *Ergänzung zur Empfehlung der KRINKO „Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen“ (2012) im Zusammenhang mit der von EUCAST neu definierten Kategorie „I“ bei der Antibiotikaresistenzbestimmung: Konsequenzen für die Definition von MRGN*. Epidemiologisches Bulletin, 2019(9): p. 82--83.
29. Humphries, R.M., A.N. Abbott, and J.A. Hindler, *Understanding and Addressing CLSI Breakpoint Revisions: a Primer for Clinical Laboratories*. J Clin Microbiol, 2019. 57(6).
30. Su, M., S.W. Satola, and T.D. Read, *Genome-Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance*. Journal of Clinical Microbiology, 2019. 57(3): p. e01405-18.
31. Koch-Institut, R., *Epidemiologisches Bulletin 09 / 2019*. 2019.
32. *Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2012. 55(10): p. 1311-1354.
33. Magiorakos, A.P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect, 2012. 18(3): p. 268-81.
34. Hamprecht, A., et al., *Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. 71(10): p. 2957-2963.
35. Hamprecht, A.G. and S. Göttig, *Häufigkeit und Vorkommen multiresistenter gramnegativer Erreger: 3MRGN/4MRGN*. Dtsch Med Wochenschr, 2018. 143(09): p. 625-633.
36. Satlin, M., et al., *Comparison of Perianal Swab and Stool Samples for Detection of Gastrointestinal Colonization with Ceftriaxone-Resistant and Fluoroquinolone-Resistant Enterobacteriaceae*. Open Forum Infectious Diseases, 2017. 4: p. S605-S606.
37. Dyakova, E., et al., *Efficacy and acceptability of rectal and perineal sampling for identifying gastrointestinal colonization with extended spectrum β -lactamase Enterobacteriaceae*. Clinical Microbiology and Infection, 2017. 23(8): p. 577.e1-577.e3.
38. Galoisy-Guibal, L., et al., *Screening for multidrug-resistant bacteria as a predictive test for subsequent onset of nosocomial infection*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006. 27(11): p. 1233-41.
39. Grasselli, G., et al., *Gastrointestinal colonization with multidrug-resistant Gram-negative bacteria during extracorporeal membrane oxygenation: effect on the risk of subsequent infections and impact on patient outcome*. Annals of Intensive Care, 2019. 9(1): p. 141.
40. Kochar, S., et al., *Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. 30(5): p. 447-52.
41. Blot, S., et al., *Colonization status and appropriate antibiotic therapy for nosocomial bacteremia caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria in an intensive care unit*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2005. 26(6): p. 575-9.
42. Papadomichelakis, E., et al., *Screening for resistant gram-negative microorganisms to guide empiric therapy of subsequent infection*. Intensive Care Med, 2008. 34(12): p. 2169-75.
43. Maechler, F., et al., *Entwicklung der Resistenzsituation in Deutschland*. Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2017. 112(3): p. 186-191.
44. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.
45. Ammerlaan, H.S., et al., *Eradication of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage: a systematic review*. Clin Infect Dis, 2009. 48(7): p. 922-30.
46. der KRINKO, E., *Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen (MRSA) in medizinischen und*. 2014.
47. Bar-Yoseph, H., et al., *Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage: systematic review and meta-analysis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. 71(10): p. 2729-2739.
48. Aira, A., et al., *The Intestinal Microbiota as a Reservoir and a Therapeutic Target to Fight Multi-Drug-Resistant Bacteria: A Narrative Review of the Literature*. Infectious Diseases and Therapy, 2019. 8(4): p. 469-482.
49. Liu, J., et al., *Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Microb Pathog, 2016. 101: p. 56-67.

50. Dally, S., et al., *DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in Acinetobacter baumannii clinical isolates*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2013. 57(10): p. 4761-4768.
51. Card, R., et al., *Evaluation of an expanded microarray for detecting antibiotic resistance genes in a broad range of gram-negative bacterial pathogens*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2013. 57(1): p. 458-465.
52. Besser, J., et al., *Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections*. Clin Microbiol Infect, 2018. 24(4): p. 335-341.
53. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA*. Nature, 1977. 265(5596): p. 687-95.
54. International Human Genome Sequencing, C., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. 431(7011): p. 931-945.
55. KA., W. *DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP)* [cited 2021 17.05.]; Available from: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>.
56. Feng, Y., et al., *Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology*. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2015. 13(1): p. 4-16.
57. Schadt, E.E., S. Turner, and A. Kasarskis, *A window into third-generation sequencing*. Human Molecular Genetics, 2010. 19(R2): p. R227-R240.
58. Leggett, R.M., et al., *Rapid profiling of the preterm infant gut microbiota using nanopore sequencing aids pathogen diagnostics*. bioRxiv, 2018: p. 180406.
59. Hasman, H., et al., *Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples*. J Clin Microbiol, 2014. 52(1): p. 139-46.
60. Schmidt, K., et al., *Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016. 72(1): p. 104-114.
61. Charalampous, T., et al., *Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection*. Nature Biotechnology, 2019. 37(7): p. 783-792.
62. Gordon, N.C., et al., *Prediction of Staphylococcus aureus antimicrobial resistance by whole-genome sequencing*. Journal of clinical microbiology, 2014. 52(4): p. 1182-1191.
63. Tyson, G.H., et al., *WGS accurately predicts antimicrobial resistance in Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015. 70(10): p. 2763-2769.
64. Stoesser, N., et al., *Predicting antimicrobial susceptibilities for Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates using whole genomic sequence data*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2013. 68(10): p. 2234-2244.
65. Feldgarden, M., et al., *Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2019. 63(11): p. e00483-19.
66. Doyle, R.M., et al., *Direct Whole-Genome Sequencing of Sputum Accurately Identifies Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Faster than MGIT Culture Sequencing*. Journal of Clinical Microbiology, 2018. 56(8): p. e00666-18.
67. Moore, A.M., et al., *Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes*. PloS one, 2013. 8(11): p. e78822-e78822.
68. De, R., A.K. Mukhopadhyay, and S. Dutta, *Metagenomic analysis of gut microbiome and resistome of diarrheal fecal samples from Kolkata, India, reveals the core and variable microbiota including signatures of microbial dark matter*. Gut Pathogens, 2020. 12(1): p. 32.
69. Marotz, C.A., et al., *Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion*. Microbiome, 2018. 6(1).
70. Hasan, M.R., et al., *Depletion of Human DNA in Spiked Clinical Specimens for Improvement of Sensitivity of Pathogen Detection by Next-Generation Sequencing*. Journal of Clinical Microbiology, 2016. 54(4): p. 919.
71. Street, T.L., et al., *Optimizing DNA extraction methods for Nanopore sequencing of Neisseria gonorrhoeae direct from urine samples*. bioRxiv, 2019: p. 827485.
72. Thoendel, M., et al., *Comparison of microbial DNA enrichment tools for metagenomic whole genome sequencing*. Journal of microbiological methods, 2016. 127: p. 141-145.
73. Heravi, F.S., et al., *Host DNA depletion efficiency of microbiome DNA enrichment methods in infected tissue samples*. Journal of Microbiological Methods, 2020. 170: p. 105856.
74. *HostZERO™ Microbial DNA Kit Protocol*. [04.05.2021]; Available from: https://files.zymoresearch.com/protocols/d4310_hostzero_microbial_dna_kit.pdf.
75. Martin Armbrrecht, E.A., Hamburg, Germany. *Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen*. März 2013 [cited 2021 30.05.]; Available from: <https://www.eppendorf.com/product->

- media/doc/de/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurements.pdf.
76. Ip, C., et al., *MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis [version 1; peer review: 2 approved]*. F1000Research, 2015. 4(1075).
 77. Nanopore, O. *Comparison*. [cited 2021 30.04.]; Available from: <https://nanoporetech.com/products/comparison>.
 78. *Native barcoding genomic DNA Protokoll Version NBE_9065_v109_revV-14Aug2019* [05.05.2021]; Available from: https://community.nanoporetech.com/protocols/native-barcoding-genomic-dna/checklist_example.pdf.
 79. Wang, Y., et al., *Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications*. Nature Biotechnology, 2021. 39(11): p. 1348-1365.
 80. Wick, R.R., L.M. Judd, and K.E. Holt, *Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing*. Genome Biology, 2019. 20(1): p. 129.
 81. Wood, D.E., J. Lu, and B. Langmead, *Improved metagenomic analysis with Kraken 2*. Genome biology, 2019. 20(1): p. 257-257.
 82. Alcock, B.P., et al., *CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database*. Nucleic acids research, 2020. 48(D1): p. D517-D525.
 83. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. 277(5331): p. 1453-62.
 84. Worthington, R.J. and C. Melander, *Overcoming resistance to β -lactam antibiotics*. J Org Chem, 2013. 78(9): p. 4207-13.
 85. Poole, K., *Resistance to beta-lactam antibiotics*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(17): p. 2200-23.
 86. Jacoby, G.A., *Mechanisms of Resistance to Quinolones*. Clinical Infectious Diseases, 2005. 41(Supplement_2): p. S120-S126.
 87. *Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacterales Collected in the United States*. Microbial Drug Resistance, 2022. 28(4): p. 389-397.
 88. Alizadeh, N., et al., *Evaluation of Resistance Mechanisms in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*. Infect Drug Resist, 2020. 13: p. 1377-1385.
 89. Codjoe, F.S. and E.S. Donkor, *Carbapenem Resistance: A Review*. Medical sciences (Basel, Switzerland), 2017. 6(1): p. 1.
 90. Evans, B.A. and S.G.B. Amyes, *OXA β -lactamases*. Clinical microbiology reviews, 2014. 27(2): p. 241-263.
 91. Yang, Y., B.A. Rasmussen, and K. Bush, *Biochemical characterization of the metallo-beta-lactamase CcrA from Bacteroides fragilis TAL3636*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. 36(5): p. 1155-7.
 92. Schlebusch, S., et al., *Standard rectal swabs as a surrogate sample for gut microbiome monitoring in intensive care*. BMC Microbiology, 2022. 22(1): p. 99.
 93. Biehl, L.M., et al., *Usability of rectal swabs for microbiome sampling in a cohort study of hematological and oncological patients*. PloS one, 2019. 14(4): p. e0215428-e0215428.
 94. Bassis, C.M., et al., *Comparison of stool versus rectal swab samples and storage conditions on bacterial community profiles*. BMC microbiology, 2017. 17(1): p. 78-78.
 95. Glisovic, S., et al., *Rectal swab screening assays of public health importance in molecular diagnostics: Sample adequacy control*. Journal of Infection and Public Health, 2018. 11(2): p. 234-237.
 96. Theofano, P., et al., *Evaluation of CHROMagar (TM) KPC for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rectal surveillance cultures*. International journal of antimicrobial agents, 2011. 37: p. 124-8.
 97. Agata, E.M.C.D., et al., *High Rate of False-Negative Results of the Rectal Swab Culture Method in Detection of Gastrointestinal Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococci*. Clinical Infectious Diseases, 2002. 34(2): p. 167-172.
 98. Sauvage, T., et al., *Promising prospects of nanopore sequencing for algal hologenomics and structural variation discovery*. BMC Genomics, 2019. 20(1): p. 850.
 99. *Flow Cell (R9.4.1)*. [14.06.2022]; Available from: <https://store.nanoporetech.com/eu/flow-cell-r9-4-1.html>.
 100. Tyler, A.D., et al., *Evaluation of Oxford Nanopore's MinION Sequencing Device for Microbial Whole Genome Sequencing Applications*. Scientific Reports, 2018. 8(1): p. 10931.
 101. Pontefract, A., et al., *Sequencing nothing: Exploring failure modes of nanopore sensing and implications for life detection*. Life Sciences in Space Research, 2018. 18: p. 80-86.
 102. Cao, M.D., et al., *Streaming algorithms for identification pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION™ sequencing*. GigaScience, 2016. 5(1).
 103. Doyle, R.M., et al., *Discordant bioinformatic predictions of antimicrobial resistance from whole-genome sequencing data of bacterial isolates: an inter-laboratory study*. Microb Genom, 2020. 6(2).

104. Magdy, T., H.H. Kuo, and P.W. Burrige, *Precise and Cost-Effective Nanopore Sequencing for Post-GWAS Fine-Mapping and Causal Variant Identification*. Iscience, 2020. 23(4): p. 100971.
105. Shreiner, A.B., J.Y. Kao, and V.B. Young, *The gut microbiome in health and in disease*. Current opinion in gastroenterology, 2015. 31(1): p. 69-75.
106. Zhu, B., X. Wang, and L. Li, *Human gut microbiome: the second genome of human body*. Protein Cell, 2010. 1(8): p. 718-25.
107. Baquero, F. and C. Nombela, *The microbiome as a human organ*. Clinical Microbiology and Infection, 2012. 18: p. 2-4.
108. Gevers, D., et al., *The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease*. Cell host & microbe, 2014. 15(3): p. 382-392.
109. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. 444(7122): p. 1027-31.
110. Sobhani, I., et al., *Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients*. PloS one, 2011. 6(1): p. e16393-e16393.
111. Si, J.-M., et al., *Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients*. World journal of gastroenterology, 2004. 10(12): p. 1802-1805.
112. Bansal, S., et al., *Rectal and Naris Swabs: Practical and Informative Samples for Analyzing the Microbiota of Critically Ill Patients*. mSphere, 2018. 3(3): p. e00219-18.
113. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. 473(7346): p. 174-80.
114. Tap, J., et al., *Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core*. Environmental Microbiology, 2009. 11(10): p. 2574-2584.
115. Ringel, Y., et al., *High throughput sequencing reveals distinct microbial populations within the mucosal and luminal niches in healthy individuals*. Gut microbes, 2015. 6(3): p. 173-181.
116. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. 473(7346): p. 174-180.
117. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora*. Science, 2005. 308(5728): p. 1635.
118. Choudhury, R., et al., *Legitimate and Reliable Determination of the Age-Related Intestinal Microbiome in Young Piglets; Rectal Swabs and Fecal Samples Provide Comparable Insights*. Frontiers in Microbiology, 2019. 10(1886).
119. Reyman, M., et al., *Rectal swabs are a reliable proxy for faecal samples in infant gut microbiota research based on 16S-rRNA sequencing*. Scientific Reports, 2019. 9(1): p. 16072.
120. Smith, B.C., et al., *Distinct Ecological Niche of Anal, Oral, and Cervical Mucosal Microbiomes in Adolescent Women*. The Yale journal of biology and medicine, 2016. 89(3): p. 277-284.
121. Jones, R.B., et al., *Inter-niche and inter-individual variation in gut microbial community assessment using stool, rectal swab, and mucosal samples*. Scientific Reports, 2018. 8(1): p. 4139.
122. Albenberg, L., et al., *Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota*. Gastroenterology, 2014. 147(5): p. 1055-63.e8.
123. Choo, J.M., L.E.X. Leong, and G.B. Rogers, *Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles*. Scientific reports, 2015. 5: p. 16350-16350.
124. Zaborin, A., et al., *Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness*. mBio, 2014. 5(5): p. e01361.
125. Lankelma, J.M., et al., *Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study*. Intensive care medicine, 2017. 43(1): p. 59-68.
126. Winter, S.E., et al., *Host-Derived Nitrate Boosts Growth of E. coli in the Inflamed Gut*. Science, 2013. 339(6120): p. 708-711.
127. Binyamin, D., et al., *The microbial diversity following antibiotic treatment of Clostridioides difficile infection*. BMC gastroenterology, 2021. 21(1): p. 166-166.
128. Budding, A.E., et al., *Rectal Swabs for Analysis of the Intestinal Microbiota*. PLOS ONE, 2014. 9(7): p. e101344.
129. Bokulich, N.A., et al., *Rapidly Processed Stool Swabs Approximate Stool Microbiota Profiles*. mSphere, 2019. 4(2): p. e00208-19.
130. Sims, D., et al., *Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses*. Nature Reviews Genetics, 2014. 15(2): p. 121-132.
131. Jaillard, M., et al., *Correlation between phenotypic antibiotic susceptibility and the resistome in Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017. 50(2): p. 210-218.

132. Palzkill, T., *Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases*. *Front Mol Biosci*, 2018. 5: p. 16.
133. Pesesky, M.W., et al., *Evaluation of Machine Learning and Rules-Based Approaches for Predicting Antimicrobial Resistance Profiles in Gram-negative Bacilli from Whole Genome Sequence Data*. *Frontiers in microbiology*, 2016. 7: p. 1887-1887.
134. McArthur, A.G., et al., *The comprehensive antibiotic resistance database*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013. 57(7): p. 3348-3357.
135. Blanco, P., et al., *Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants*. *Microorganisms*, 2016. 4(1): p. 14.
136. Martinez, J.L., et al., *Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems*. *FEMS Microbiol Rev*, 2009. 33(2): p. 430-49.
137. Mahfouz, N., et al., *Large-scale assessment of antimicrobial resistance marker databases for genetic phenotype prediction: a systematic review*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2020. 75(11): p. 3099-3108.
138. Grkovic, S., M.H. Brown, and R.A. Skurray, *Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2001. 12(3): p. 225-237.
139. Yasufuku, T., et al., *Correlation of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in Escherichia coli Strains clinically isolated from urinary tract infection patients*. *J Clin Microbiol*, 2011. 49(1): p. 189-94.
140. Bohnert, J.A., et al., *Altered spectrum of multidrug resistance associated with a single point mutation in the Escherichia coli RND-type MDR efflux pump YhiV (MdtF)*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. 59(6): p. 1216-22.
141. Oethinger, M., et al., *Ineffectiveness of Topoisomerase Mutations in Mediating Clinically Significant Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli in the Absence of the AcrAB Efflux Pump*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. 44(1): p. 10-13.
142. Askoura, M., et al., *Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan Journal of Medicine*, 2011. 6(1): p. 5870.
143. Walker, G.T., et al., *Predicting Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacilli from Resistance Genes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019. 63(4): p. e02462-18.
144. Yarlagadda, V., et al., *Glycopeptide Antibiotic To Overcome the Intrinsic Resistance of Gram-Negative Bacteria*. *ACS Infect Dis*, 2016. 2(2): p. 132-9.
145. Livermore, D.M., *Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1992. 36(9): p. 2046-2048.
146. McArthur, A.G. and G.D. Wright, *Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology*. *Current Opinion in Microbiology*, 2015. 27: p. 45-50.
147. Tamma, P.D., et al., *Applying Rapid Whole-Genome Sequencing To Predict Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Results among Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019. 63(1).
148. Poirel, L., et al., *Emergence in Klebsiella pneumoniae of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003. 47(2): p. 755-758.
149. Mendonça, N., et al., *Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolated in Portugal*. *Int J Antimicrob Agents*, 2009. 34(1): p. 29-37.
150. Bortolaia, V., et al., *ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020. 75(12): p. 3491-3500.
151. Williamson, D.A., et al., *High rates of susceptibility to ceftazidime among globally prevalent CTX-M-producing Escherichia coli: potential clinical implications of the revised CLSI interpretive criteria*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012. 31(5): p. 821-824.
152. Turton, J.F., et al., *The role of ISAbA1 in expression of OXA carbapenemase genes in Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 2006. 258(1): p. 72-77.
153. Güell, M., et al., *Bacterial transcriptomics: what is beyond the RNA horizon?* *Nature Reviews Microbiology*, 2011. 9(9): p. 658-669.
154. Belzer, C. and W.M. de Vos, *Microbes inside--from diversity to function: the case of Akkermansia*. *The ISME journal*, 2012. 6(8): p. 1449-1458.
155. Pulido, M.R., et al., *Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013. 68(12): p. 2710-2717.
156. Pitt, M.E., et al., *Evaluating the genome and resistome of extensively drug-resistant Klebsiella pneumoniae using native DNA and RNA Nanopore sequencing*. *GigaScience*, 2020. 9(2).

157. Khaledi, A., et al., *Predicting antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa with machine learning-enabled molecular diagnostics*. EMBO Molecular Medicine, 2020. 12(3): p. e10264.
158. Cornforth, D.M., et al., *Pseudomonas aeruginosa transcriptome during human infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018. 115(22): p. E5125-E5134.
159. Kaldalu, N., V. Hauriyluk, and T. Tenson, *Persists-as elusive as ever*. Applied microbiology and biotechnology, 2016. 100(15): p. 6545-6553.
160. Hassan, M.M., et al., *Detection and quantification of the heterogeneity of S. aureus bacterial populations to identify antibiotic-induced persistence*. bioRxiv, 2018: p. 320093.
161. BJARNSHOLT, T., et al., *Silver against Pseudomonas aeruginosa biofilms*. APMIS, 2007. 115(8): p. 921-928.
162. Pu, Y., et al., *Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells*. Molecular cell, 2016. 62(2): p. 284-294.
163. El Meouche, I. and M.J. Dunlop, *Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation*. Science (New York, N.Y.), 2018. 362(6415): p. 686-690.
164. Ebbensgaard, A.E., A. Løbner-Olesen, and J. Frimodt-Møller, *The Role of Efflux Pumps in the Transition from Low-Level to Clinical Antibiotic Resistance*. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2020. 9(12): p. 855.
165. Komp Lindgren, P., Å. Karlsson, and D. Hughes, *Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli Isolates from Patients with Urinary Tract Infections*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. 47(10): p. 3222-3232.
166. Aathithan, S. and G.L. French, *Prevalence and role of efflux pump activity in ciprofloxacin resistance in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2011. 30(6): p. 745-752.
167. Pakzad, I., et al., *Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in Klebsiella pneumoniae isolated from burn patients*. GMS Hyg Infect Control, 2013. 8(2): p. Doc15.
168. Sato, T., et al., *Fluoroquinolone resistance mechanisms in an Escherichia coli isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations*. Frontiers in Microbiology, 2013. 4.
169. Masuda, N., et al., *Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43(2): p. 400-2.
170. Pai, H., et al., *Carbapenem resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(2): p. 480-4.
171. Livermore, D.M., *Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. 47(3): p. 247-250.
172. Black, C.A., et al., *Predominance of Non-carbapenemase Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriales in South Texas*. Frontiers in Microbiology, 2021. 11.
173. Lorian, V. and L. Burns, *Predictive value of susceptibility tests for the outcome of antibacterial therapy*. J Antimicrob Chemother, 1990. 25(1): p. 175-81.
174. Lautenbach, E., et al., *Test Characteristics of Perirectal and Rectal Swab Compared to Stool Sample for Detection of Fluoroquinolone-Resistant Escherichia coli in the Gastrointestinal Tract*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. 49(2): p. 798.
175. Moubareck, C.A., et al., *Assessment of the performance of CHROMagar KPC and Xpert Carba-R assay for the detection of carbapenem-resistant bacteria in rectal swabs: First comparative study from Abu Dhabi, United Arab Emirates*. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020. 20: p. 147-152.
176. Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann, *Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013. 75(2): p. 214-217.
177. Cao, M.D., et al., *Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing*. Gigascience, 2016. 5(1): p. 32.
178. Mikheyev, A.S. and M.M.Y. Tin, *A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer*. Molecular Ecology Resources, 2014. 14(6): p. 1097-1102.
179. Rang, F.J., W.P. Kloosterman, and J. de Ridder, *From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy*. Genome Biology, 2018. 19(1): p. 90.
180. Laver, T., et al., *Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION*. Biomol Detect Quantif, 2015. 3: p. 1-8.
181. Ellington, M., et al., *The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee*. Clinical microbiology and infection, 2017. 23(1): p. 2-22.

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Colin Mackenzie herzlich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung.

Ebenso danke ich meinem Betreuer Dr. med. Tobias Wienemann für die enorme Unterstützung in allen Phasen der Arbeit und für das stets offene Ohr.

Prof. Dr. Alexander Diltthey danke ich für die zur Verfügung gestellte bioinformatische Software, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Co-Betreuer PD Dr. med. Hans Martin Bosse danke ich für das kontinuierliche Interesse am Fortschritt der Dissertation und die gute Begleitung.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Team des Institutes für Medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer.

Stellvertretend für das ganze Laborteam danke ich insbesondere Lisanna Hülse und Daniel Strelow für die Unterstützung und Anleitung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Zuletzt danke ich in besonderer Weise meiner Familie und meiner Freundin Fabia für die Unterstützung.