

University of Groningen

## Bacterial fingerprints across Europe

Glasner, Corinna

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Glasner, C. (2014). *Bacterial fingerprints across Europe*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

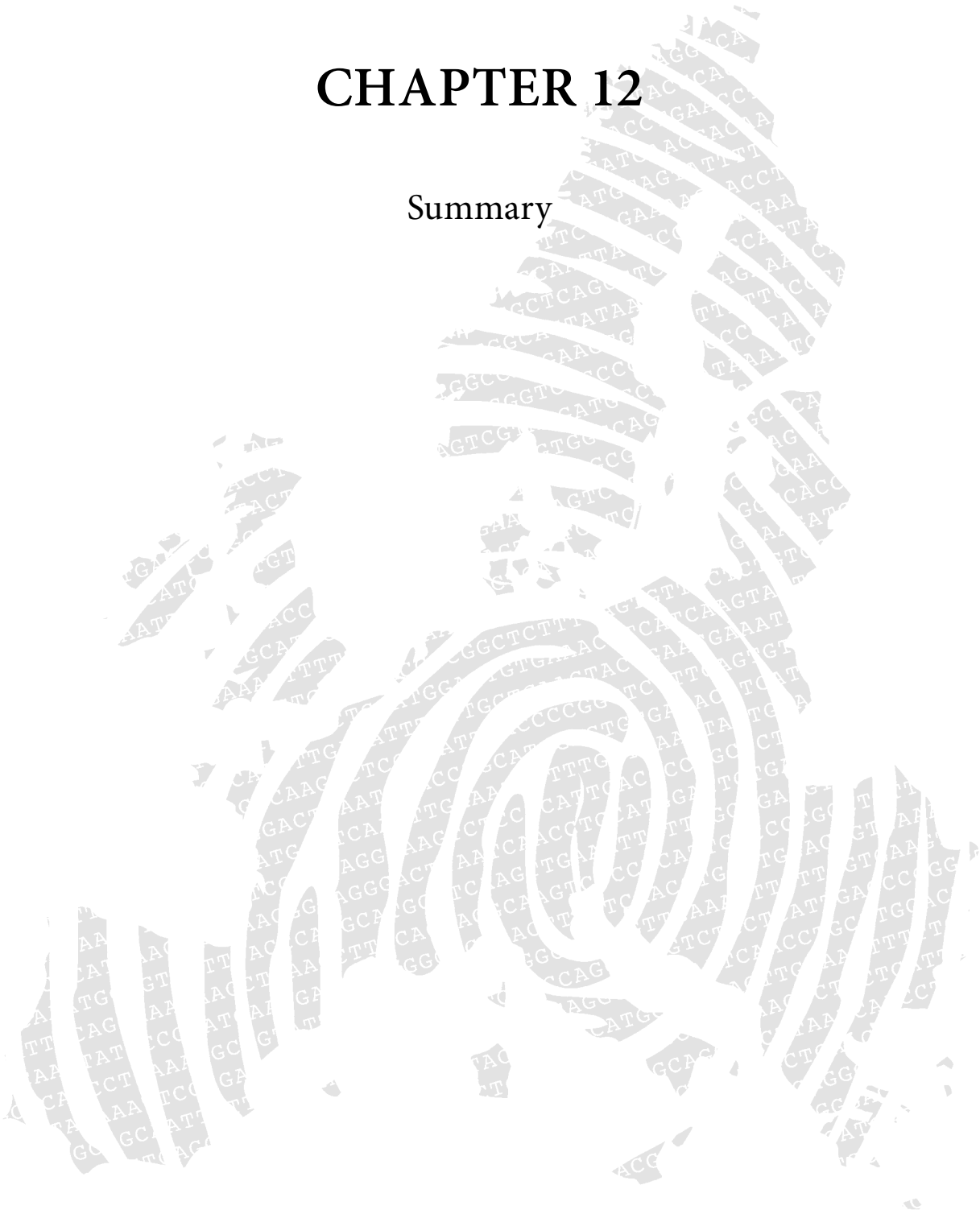
**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# CHAPTER 12

## Summary





## SUMMARY

Bacteria constitute one of the largest and most diverse groups of all living organisms on earth. Although bacteria are essentially single cells and usually no longer than a few micrometres, they exist in a number of different morphologies and arrangements and are represented by various phyla, classes, orders, families, genera and species. Bacteria belong to the group of prokaryotes, which are organisms that lack a nucleus. The word prokaryote describes this particular feature, as it means πρό- (pro-) ‘before’ and κάρυόν (karyon) ‘nut or kernel’ in Greek. The counterpart of the prokaryotes is the domain of eukaryotes that includes all organisms whose cells contain a nucleus in which their DNA is enclosed. The eukaryotes together with the two prokaryotic domains, bacteria and archaea, make up the tree of life. Notably, the diversity within the bacterial domain is so abundant that a true estimate of the exact number could not be determined so far, particularly since experts also expect that the majority of bacterial species have not even been identified yet. In addition, many discovered bacteria have not been characterised since they cannot be grown under the current state-of-the-art laboratory conditions.

Evolutionary biological studies revealed that bacteria were among the first life forms on earth approximately 4 billion years ago. Not surprisingly, in the year 2014 bacteria are ‘still’ present in almost all habitats that have been explored so far. Two very extreme habitats where bacterial life was recently discovered include the deepest spot on earth, the Mariana Trench, and inside rocks approximately 1900 feet below the sea floor under 8500 feet of ocean water off the coast of the United States of America (USA) [1,2]. Generally, bacteria inhabit amongst others the soil, water, acid hot springs, or even radioactive waste, but most importantly for the present PhD thesis research, they also live in symbiotic, mutualistic, commensal and/or parasitic relationships with plants and/or animals. The latter includes human beings who contain approximately ten times as many bacterial cells than human cells, with the largest number of different bacterial species residing in the gastrointestinal tract, the mucosa and on the skin.

As the modern human (*Homo sapiens sapiens*) has co-evolved with the already existing bacteria over the past roughly 200.000 years, and as the human body is clearly a preferred habitat of numerous different bacterial species, human existence without bacteria is unimaginable. This view is underscored by the fact that the resident microbiota cooperates in the digestion of food, produces important nutrients like butyrate and acts in general as a barrier against intrinsic or extrinsic pathogens. Hence, the ultimate goal in bacteriological research is not to eliminate these microorganisms on the whole, but to understand their diversity with respect to their opted environment. In view of the cohabitation of bacteria and humans this will help us to understand the advantageous and/or disadvantageous associations between these two complex entities to create appropriate measures with the ultimate goal to sustain human health from the moment of birth till old age. Remarkable progress was made in recent years with new and advanced technologies, but more importantly with the curiosity of many scientists to determine and analyse the vast diversity of bacteria residing in and on the human body. Bacterial communities living in and on our bodies have fascinated scientists and the public equally. Although the latter feels more often threatened due to an insufficient understanding of the benefits provided by bacteria or a misleading publicity about pathogens threatening human health, caused by a lack of appropriate explanations and/or proper communication from experts. The foundation for the numerous studies on the human microbiota was laid with the revelation of the gut microbiome. It was estimated that approximately 100 trillion bacterial cells live in the human gut, constituted by roughly 500 different species out of a possible 300 – 1000 species that can be present. However, most probably about 30-40 species constitute 99% of the microbial community in the gut [3-6]. Based on these observations and multitudinous studies, the gut microbiota has been tied to diverse functions and linked to both health and disease [5-8]. However, researchers quite quickly realized that the gut is only one of many microbial ‘homes’ in and on the human body. Research has been directed to previously believed sterile sites within the human body that were unveiled to be hotbeds of microbial diversity. Among them are body sites including the placenta or the mother’s milk during pregnancy, the eye, the nasopharynx, the lung, the urogenital tract, and naturally the skin [9-15]. While many

bacteria in and on the human body are beneficial or at least harmless, some of these bacteria can cause disease. Accordingly, endogenous bacteria have not only been implicated in long-known bacterial infections like pneumonia and otitis, but also to lower back pain, cancer, obesity and heart attacks [16-19]. Taken together all these findings indicate that humans live in a very delicate balance with their microbiota and that under normal circumstances this balance is beneficial for both the bacteria and their human host. However, since several bacterial species in and on the human body have a 'Jekyll & Hyde' character as described for the notorious opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*, this delicate cohabitation of bacteria and their host can be disturbed, potentially leading to disease.

Intriguingly, Charles Darwin, the godfather of evolutionary biology, seems not to have mentioned bacteria in his masterpiece 'On the Origin of Species' in 1859 or in any other of his papers, although Antoni van Leeuwenhoek had already reported their existence in the mid-seventeenth century and contemporary colleagues of Darwin, like Louis Pasteur and Robert Koch, were laying the foundations for the field of bacteriology as we know it today. One can only assume that Darwin was not sufficiently aware of the ground-breaking discoveries in this area and that he probably would have been astounded to know that some of the best evidence for his theory of natural selection could have been found in and on his own body. Nonetheless, in the context of bacteriology, the term 'natural selection' as described by Charles Darwin should probably be re-defined into unnatural selection of the 20<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> century as antibiotics and other human-made 'substances' have reached almost every habitat of this planet. Antibiotics (as described in **Chapter 1**) are clearly a critical driver of bacterial evolution in humans since the discovery of penicillin, most clearly evidenced by the emergence of multidrug resistant bacteria in both hospital and community settings across the globe. Aside from the unnatural selection, the discoveries of the different human microbiomes clearly generated new and exciting scientific frontiers and it is by now widely known and accepted that bacteria either directly or indirectly influence many aspects of human biology. Thus, the human species, which was for many years believed to be the pinnacle of evolution, is dependent on the simplest and oldest form of life. Thus, one could think of describing humans as 'large, highly complex microbial communities with a fancy exoskeleton' that are superimposed on the bacterial tree of life [J.M. van Dijl]. If Charles Darwin would know this now, he would probably turn in his grave.

The prime suspect *S. aureus* and his accomplices, the *Enterobacteriaceae*, that are the linchpin of this thesis are components of the complex and diverse human microbiota. As described in **Chapter 1** in **Part I** of this thesis, *S. aureus* is mainly found in the nasopharynx and on the skin, whereas *Enterobacteriaceae* are mostly found in the gut. Evidently, these bacteria are part of the complex human ecosystem and, as such, they can have a profound impact on a functioning human body. Importantly, as introduced in **Chapter 1** and described throughout this thesis, under certain circumstances these bacteria can be very harmful and dangerous pathogens causing infectious diseases or taking advantage of impaired host defences due to essentially unrelated diseases.

In a nutshell, the here presented thesis 'Bacterial fingerprints across Europe' was aimed at shedding more light on the infinite bacterial diversity, with focus on *S. aureus* and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPEs). The tracking of bacterial fingerprints was achieved through the combination of different study parameters, especially: (i) different geographical locations in Europe, (ii) different disease groups (epidermolysis bullosa (EB), granulomatosis with polyangiitis (GPA) and buruli ulcer (BU)) and (iii) different bacterial lineages (e.g. *S. aureus* ST398, *S. aureus* spa-type t437). A key component of all research studies presented in this thesis was the incorporation of patient metadata and epidemiological, molecular as well as phenotypic data of the respective study isolates. With the ultimate goal to both track the bacterial fingerprints across Europe and to evaluate existing typing tools, with focus on the genomic level, the work described in this thesis was performed with 'love, sweat, innocence, greenness, enthusiasm, motivation, commitment and hard-work'. A compilation of the scientific research projects aiming to apprehend and realize a subpart of the existing infinite diversity of bacterial fingerprints across Europe was presented in this thesis in ten scientific chapters (**Parts II** and **III**), that will be briefly summarized in the following. Apart from a thesis summary, possible future perspectives, under the 'smokescreen' of bacterial fingerprints, will be presented.

**Chapter 2** deals with the ‘rapid and high-resolution distinction of community-acquired (CA) and nosocomial *S. aureus* isolates with identical pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles and *spa*-types’, and it is the first scientific chapter in this thesis reporting on the prime suspect *S. aureus*. The investigated *S. aureus* isolates belonged to the rapidly spreading methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clone with the PFGE profile USA300, which was first reported in the USA in 2001 and disseminated throughout the community and subsequently to hospitals across all continents within a decade [20,21]. Interestingly, although this lineage is responsible for the most distinct CA-MRSA epidemic in the USA, it has not yet gained predominance in the community in other parts of the world. There were two important incentives for this study. Firstly, molecular typing of *S. aureus* is important to decide on effective surveillance and control strategies, as well as to understand the rapid spread, the complex population biology and the infectious status of this rapidly evolving pathogen. Secondly, a misclassification of this dangerous *S. aureus* clone had been reported [22]. As described in **Chapter 2**, the implemented multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting (MLVF) method had the discriminatory power needed to rapidly distinguish 91 highly similar CA- and hospital-associated (HA)-MRSA isolates, originating from Denmark and Germany, with the same USA300 PFGE profile and/or related *spa*-types. Based on its very high discriminatory power, ease-of-use, and low costs, MLVF was proposed to be a very attractive typing tool for (i) the prevention and detection of MRSA outbreaks, (ii) the identification of sources and routes of transmission, and (iii) the identification of closely related *S. aureus* isolates for epidemiological and evolutionary studies, especially in local healthcare settings. The results presented in this chapter highlighted evidence for the advantageous usage of the alternative DNA typing method MLVF that could potentially replace the ‘gold standard’ PFGE method in local laboratories in the near future.

The successful application and the demonstrated discriminatory power of MLVF presented in **Chapter 2**, was subsequently verified with a different *S. aureus* collection. In **Chapter 3** the applicability of MLVF was explored with the *S. aureus* ST398 lineage. ST398 has emerged in livestock worldwide, most dominantly in areas with high densities of livestock farming. Consequently, through the high transmission rate of this lineage, the incidence of human colonization and infection is currently increasing. In the study presented in this chapter, 184 *S. aureus* ST398 isolates from seven different European countries, mostly isolated from livestock, were typed by the complementary methods MLVF and *spa*-typing. The typing results identified an unexpected high genomic diversity of these isolates but also indicated that MLVF in combination with *spa*-typing could replace multilocus sequence typing (MLST), which is so far used as sole criterion in epidemiological analyses of ST398. Moreover, MLVF was capable of unveiling the relatedness and overall increased genomic heterogeneity of this *S. aureus* lineage and allowed the tracking of lines of transmission, which can be utilized to prevent or control possible outbreaks.

In the context of evaluating the applicability and discriminatory power of DNA typing methods to identify and describe many diverse bacterial fingerprints, **Chapter 4** apprehended yet another *S. aureus* collection that was established based on the sole criterion that all isolates possessed the *spa*-type t437. Next to *spa*-typing, three different DNA typing tools were at the centre of the study, investigating the presence and genetic relatedness of a CA *S. aureus* clone from Asia across Europe. The clone of interest in this chapter is *S. aureus* belonging to the MLST clonal complex (CC) 59, which has been primarily linked with the *spa*-type t437. This clone has so far only been reported in low numbers among large epidemiological studies in Europe. Nevertheless, the overall numbers in some Northern European reference laboratories have increased during the past decade. To determine whether the *S. aureus* CC59-t437 clone is present in other European countries, and to assess its genetic diversity across Europe, 147 *S. aureus* t437 isolates from 11 European countries collected over a period of 11 years were analysed using MLVF, multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and MLST. Additionally 16 *S. aureus* t437 isolates from healthy carriers and patients from China were included. Most isolates were shown to be monophyletic with 99% of the isolates belonging to the single MLVA complex 621, to which nearly all included isolates from China also belonged. More importantly, all MLST-typed isolates belonged to CC59. The results of this study imply that the European *S. aureus*

t437 population represents a genetically tight cluster, irrespective of the year and country of isolation. This underpins the view that *S. aureus* CC59 is present across Europe, not being restricted to particular geographical regions or specific host environments. Thus, the European *S. aureus* t437 isolates bear the general hallmarks of a high-risk clone. Since the four implemented DNA typing methods in the present study are not yet performed on a daily routine basis in most local laboratories and hospitals, it is likely that the CC59 clone has so far remained under-detected in Europe. This is a cause for concern in view of the predominance of *S. aureus* CC59 in Asia and its clinical repercussions. Where possible, the further dissemination of this potentially high-risk clone should therefore be prevented, for example through active screening of patients who have a history of traveling to Asia.

The identification of the genetically tight cluster of the *S. aureus* t437 lineage across Europe in the previous chapter and the discovery of this specific lineage in a patient suffering from recurrent ear infections visiting the outpatient clinic of our hospital formed the incentive to investigate this distinct lineage within one patient over time. **Chapter 5** reports on this investigation employing a combination of genomic and proteomic approaches to draw a very comprehensive ‘time-lapse movie’ of this particular clone. The first seven MRSA isolates originated from the patient and his first female partner over a time period of two years, and the last three isolates were unrelated methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), isolated within six months, but two years after the last MRSA isolation. Notably, despite several MRSA eradication attempts, the patient remained MRSA-positive over two years, probably due to the persistent ear infection. Whole-genome sequencing (WGS) revealed only a total number of 59 single nucleotide variants (SNPs) between the seven MRSA isolates, including 28 intragenic and 31 intergenic SNPs, and between the three MSSA isolates only a total number of 27 SNPs were identified, including 15 intragenic and 12 intergenic SNPs. The smaller portion of these SNPs was found in the core genome, with only ten SNPs among the seven MRSA isolates and three SNPs among the three MSSA isolates. Interesting SNPs were detected in the *rsbU*, *agrC* and *ClfB* genes that could affect virulence and/or adhesion, while other SNPs in intergenic regions could influence gene expression and might alter the overall proteome repertoire. Exoproteome analyses revealed that the majority of identified extracellular proteins among all MRSA isolates are virulence factors, such as protein A, Sbi, IsdA, IsdB, CHIPS and PVL. This study thus demonstrated for the first time the powerful combination of WGS and proteomics for the investigation of sequential *S. aureus* isolates from a patient over a longer time period. Importantly, the comprehensive comparison between the genome and the identified secreted proteins sheds new light on the impact of genome evolution on the global production of virulence factors. Notably, the incorporation of the antibiotic treatment and tracking the travel destinations of the patient completed the complex ‘time-lapse movie’ of this retrospective study.

The results presented in **Chapter 5** sparked interest in the human host in relation to the colonizing or infecting *S. aureus* types. For this purpose, different patient groups were selected for the examination of their anti-staphylococcal immune responses in relation to the colonizing *S. aureus* diversity within these patients. The results of these investigations are presented in the following four chapters.

**Chapter 6** reports on the first patient group that was investigated in this PhD research with regard to *S. aureus* colonization, namely patients with the genetic blistering disease EB. Previous research had shown that the wounds of EB patients are highly colonized with *S. aureus* and that these patients are more often nasal *S. aureus* carriers than healthy individuals (56-90% vs. 20-30%) [23]. These findings implied that the wounds of EB patients represent an attractive niche for *S. aureus*. Molecular typing showed that not one specific *S. aureus* type colonized EB patients and, more interestingly, that some EB patients carried up to four different types of *S. aureus* in their wounds at one time point. These results led to the research described in **Chapter 6**, unveiling high anti-staphylococcal antibody levels that could be related to long-term colonization with alternating types of *S. aureus*. The large *S. aureus* collection from 61 EB patients was typed by MLVA and *spa*-typing, which revealed major spatial and temporal fluctuations in the *S. aureus* types colonizing individual EB patients. Specifically, approximately 50% of the investigated EB patients carried alternating *S. aureus* types over time. The overall *S. aureus* genetic diversity in the EB patient cohort that was followed for two



years was surprisingly high. With regard to the anti-staphylococcal immune response, the sera of EB patients contained higher anti-staphylococcal immunoglobulin G (IgG) levels than those of healthy individuals, and this applied in particular to IgGs against IsdA, SasG, IsaA, SCIN, Nuc, LytM and the *egc* cluster staphylococcal superantigens (SAGs) SEM, SEN and SEO. Notably, it was discovered that EB patients carrying different *S. aureus* types contained significantly higher levels of anti-staphylococcal antibodies than EB patients carrying only one *S. aureus* type. This observation in combination with the overall genetic diversity of the *S. aureus* isolates suggested that the immune system of EB patients is heavily challenged with antigens of *S. aureus*. However, probably due to the underlying genetic defect or an unknown mechanism, EB patients are not capable of clearing the *S. aureus* colonization in their wounds. One major question that still remains to be answered is whether the presence of *S. aureus* in the wounds of these patients exacerbates wound healing.

The research reported in the two previous chapters, triggered even more research in the crossover area between microbiology and immunology. Specifically, potential associations between bacteria and autoimmune diseases attracted the attention and are in the centre of the following two chapters. **Chapter 7** addresses the relationship between *S. aureus* and the autoimmune disease GPA, representing one entity of the larger group of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA)-associated vasculitides (AAV). For this purpose, GPA patient-specific anti-staphylococcal IgG responses with regard to their long-term *S. aureus* exposure were examined. Previous studies already demonstrated that GPA patients are more frequently *S. aureus* nasal carriers than healthy individuals, and that chronic nasal carriage is a risk factor for disease relapse. In addition, anti-bacterial treatment with co-trimoxazole was shown to have a positive effect by reducing the occurrence of disease relapses in GPA patients [24,25]. As described in **Chapter 7**, a large retrospective cohort study was conducted, including 85 GPA patients, positive for proteinase 3 (PR3)-ANCA and 18 healthy control individuals (HC). Immune responses against *S. aureus* were investigated by determining serum IgG levels against 59 *S. aureus* antigens and 210 *S. aureus* isolates obtained from the GPA patients were characterised by MLVF and *spa*-typing. GPA patients possessed IgGs to many staphylococcal antigens at constant levels at all time points, irrespective of their disease state and treatment. Interestingly, patient sera contained lower anti-staphylococcal IgG levels than sera from HC, while total IgG levels were similar or higher. This reached statistical significance for several surface proteins (ClfA, ClfB, FnbpA, and SdrE) and secreted proteins (Atl-2, CHIPS, Efb, Lipase, NUC, SCIN, SEN, SEO, SSL3 and TSST-1). Most crucially, the isolates from patients and HC had a largely comparable gene repertoire. Therefore, the decreased IgG responses against particular proteins (e.g. ClfA, ClfB, FnbpA) in GPA patients cannot be attributed to a lower abundance of the corresponding genes in the respective *S. aureus* isolates. MLVF and *spa*-typing revealed that the *S. aureus* population of GPA patients is diverse and that it mirrors the general *S. aureus* population. The results presented in this chapter thus imply that these patients are less capable of mounting an *S. aureus*-specific antibody response than healthy individuals, and that they are insufficiently protected against this opportunistic pathogen. The measured anti-staphylococcal immune response of GPA patients as documented in **Chapter 7** is in marked contrast to the reported high anti-staphylococcal immune response of EB patients documented in **Chapter 6**. The latter investigation revealed a heavily challenged immune system with antigens of *S. aureus* that was related to long-term colonization with alternating *S. aureus* types. Although GPA patients are also chronic *S. aureus* nasal carriers, their anti-staphylococcal immune response was lower compared to healthy individuals. This discrepancy could be related to the different underlying diseases and it supports the idea that the immune system of GPA patients cannot effectively control or eliminate *S. aureus*.

With the preceding discovery of the genetic diversity of *S. aureus* isolates from PR3-ANCA patients suffering from GPA that mirrors the general *S. aureus* population, a continuation and further expansion of this project is described in **Chapter 8**. *S. aureus* from PR3-ANCA-positive patients have been under investigations at several occasions, whereas information on *S. aureus* colonizing patients positive for myeloperoxidase (MPO)-ANCA suffering from any kind of AAV is still lacking. Hence, the objective of the study presented in **Chapter 8** was to determine and compare the molecular fingerprints



of *S. aureus* nasal isolates from both particular patient groups residing in the Netherlands. Next to the application of the previously used and highly discriminatory DNA typing methods MLVF and *spa*-typing, a DNA microarray comprising 336 *S. aureus*-specific DNA probes was applied to define the gene repertoire of 88 nasal *S. aureus* isolates from these patients. Altogether, the present data revealed for the first time the overall genomic diversity of *S. aureus* isolates from AAV patients. In addition, a limited number of loci that prevail in *S. aureus* isolates from either of the two particular disease groups was identified. Specifically, different distributions in the SAg and virulence gene repertoire were uncovered, including the genes *lukXY*, *isaB*, *mprF*, Q2YUB3, *set4/set7*, *cap-1*, *cap-5*, *cap-8*, *cna* and *sasG*. In conclusion, the definition of the virulence gene repertoire of the *S. aureus* population of patients with PR3- and MPO-AAV has paved the way for further studies on the molecular traits that define the possible roles of *S. aureus* in these diseases.

In the following chapter, investigations on the *S. aureus* colonization of patients with the necrotizing skin disease BU, which is caused by the bacterium *Mycobacterium ulcerans*, are presented. BU is mainly emerging in West Africa with Benin, Côte d'Ivoire and Ghana bearing the highest burden of disease. The disease usually starts as a painless nodule, plaque, oedema or papule and progresses to form large ulcers when left untreated. The pathology of BU is strongly associated with the production of mycolactone, an immunomodulatory macrolide toxin that causes tissue necrosis. The presence of mycolactone in the wounds of BU patients has for a long time been perceived to prevent colonization by other microorganisms. However, recent studies revealed a diverse microbial community in these wounds, suggesting that the necrotic tissues in these wound represent a rich source of nutrients for microorganisms other than *M. ulcerans* [26,27]. These observations led to the study presented in **Chapter 9**. This chapter reports on the genetic diversity of a large *S. aureus* sample from 19 BU patients living in the south-eastern part of Ghana. Thirty BU patients were screened for *S. aureus* carriage during the 8-month study period, showing that 63.3% of these patients carried *S. aureus* at least at one time point of sampling. To determine the genetic diversity of the *S. aureus* isolates sampled from the nose and wounds of these patients at several time points, the two complementary DNA typing methods MLVF and *spa*-typing were again utilized. In addition, the antibiotic resistance profiles of the collected *S. aureus* isolates were determined and the wound topography of *S. aureus* was examined. Compared to the *S. aureus* isolate samples from EB or GPA patients, the 91 *S. aureus* isolates from the 19 BU patients displayed a very homogenous genotype as judged by MLVF. The results of *spa*-typing confirmed this homogeneity with the identification of only 13 different *spa*-types. Furthermore, different BU patients carried different types of *S. aureus* at one time point, kept the same types or changed *S. aureus* types over time. Altogether, this study identified for the first time the genetic diversity of *S. aureus* colonizing the wounds and noses of BU patients. Genotyping results suggested patient transmission events that need to be further investigated. Moreover, wound care and hygiene, as well as the caretakers and family members, need to be investigated to determine possible sources of *S. aureus* transmission.

For the tracking of bacterial fingerprints across Europe, large-scale molecular and epidemiological studies were also explored and reported in this thesis. These studies did not focus on a specific *S. aureus* type/lineage but were aimed at the apprehension of the overall epidemiological and molecular picture of *S. aureus*, both MSSA and MRSA, from bloodstream infections across Europe. Based on the first structured survey that was performed in 26 European countries in 2006/2007, describing the geographic distribution of *S. aureus* causing invasive bloodstream infections, **Chapter 10** reports on the follow-up survey performed in 2011 and the comparison of both surveys. During the second structured survey, 350 laboratories serving over 453 hospitals in 25 countries collected 3,753 isolates (MSSA and MRSA). A wide geographical distribution of *spa*-types was found with some prevalent in all European countries. MRSA clones maintain a predominantly regional distribution in Europe, which is indicative of the selection and spread of a few successful clones. MSSA was shown to be more diverse than MRSA, which differed considerably between countries with some international clones expanding or receding when compared to the 2006/2007 survey. This study provided evidence that this large-scale approach combining molecular typing data with epidemiological data and the

subsequent visualisation of the collected data using an interactive mapping tool can provide important information on the dynamics of MSSA and MRSA populations across borders. For future studies, a consistent integration of molecular typing data with epidemiological and clinical information collected through surveillance initiatives across Europe will lead to information on early signalling of emerging strains, cross-border spread and the import by travel.

The final research chapter targeted a different bacterial group and their current epidemiology in Europe, representing the ‘accomplices’ in the present thesis. CPEs were recently acknowledged as one of the most dangerous microbial threats to public health worldwide. The data presented in **Chapter 11** are the first results of a new European initiative, called the European Survey on CPE (EuSCAPE) that is aimed at providing a roadmap for establishing a network for CPE detection in Europe to improve early diagnosis, active surveillance, and guidance on infection control measures. The first activity of this project described in this chapter was a questionnaire survey to identify diagnostic and response gaps on the local and national levels. National experts from 39 European countries provided valuable insight into the current epidemiology of CPE in their country. Previously it was acknowledged that the keys to success in preventing the establishment of CPE are, firstly, early detection through good diagnostic practices and secondly, containment of spread through patient and contact screening as well as infection control measures. An increasing number of countries have reacted and implemented measures as indicated by the increasing availability of a recommendation or guideline on infection control measures to prevent the spread of CPE. Still 18 countries surveyed, lacked such guidance and the same number of countries lacked relevant guidance for submission of isolates to national reference laboratories. The results of the present study underscore the urgent need for an upgrading of laboratory standards to enable active surveillance and preventive action. To this purpose, the EuSCAPE project aims to build a laboratory-based network for CPE detection in Europe.

## FUTURE PERSPECTIVES

Tracking bacterial fingerprints on the local, national and international levels is key to both maintain the current balance between bacteria and humans, and more importantly, to sustain and protect human health. As humans apparently cannot exist without a certain assortment of bacteria, the ground rules for a peaceful and healthy cohabitation should be defined. Two parameters will evidently be the key to this: antibiotics and hygiene. Firstly, although antibiotics have saved many lives in the past century and will probably save many more in the near future, better monitoring of their production, prescription and usage is urgently needed. Antibiotic stewardship programmes and infection prevention and control departments in hospitals are the first prerequisites to reduce antibiotic consumption. Crucially, transparency and good communication between medical experts, scientists, doctors and the general population is needed to improve the overall public health situation and increase the awareness for this delicate situation. One very obvious example is that the majority of the general population still believes that antibiotics help against a common cold, which is of course not correct, as the common cold is caused by a virus and antibiotics have no effect on this infectious agent. Secondly, hygiene, more specifically hand hygiene, should be more strictly implemented and improved, especially in healthcare settings and in geographic areas with high prevalence of infectious diseases. As the 21<sup>st</sup> century is hallmarked by travel across borders and the globe, hygiene might play a more important role than experts and the general population might believe. Import and export of goods, both living and non-living has increased drastically over the past decades, not only in Europe but also across the globe, resembling the perfect ‘hitchhiking’ opportunity for bacteria [28]. Altogether, these developments clearly contribute to the present diversity of bacteria, their global spread, transmission, outbreaks and increasing numbers of infectious diseases worldwide.

At the time point when the research described in this thesis started, MRSA was generally designated as one of the most dangerous ‘bacterial criminals’ across the globe. With the excellent performance of the EARS-Net in the past decade and numerous other studies a very comprehensive

picture of MSSA and MRSA was drawn for many countries across Europe, but also for other parts of the world. However, although the EARS-Net has the remit to monitor antimicrobial resistance of several public health threatening pathogens, it only includes bloodstream infection isolates and is therefore certainly limited in its outcome. In addition, as no other systematic surveillance or surveys are in place to determine prevalence and occurrences of antibiotic sensitive or resistant *S. aureus* lineages, our current knowledge solely depends on published studies from different study groups and national and international research consortia. Moreover, information for numerous countries across the globe is quite scarce when it comes to antibiotic resistance and genetic diversity of *S. aureus*. The situation in Europe is very well described, not only due to the EARS-Net performance. In the past decades several countries in Europe have acknowledged the dangerous potential of MRSA in hospital and community settings and were able to decrease or contain the problem, such as Sweden, Norway, the United Kingdom (UK) and the Netherlands. The latter implemented a nationwide 'Search & Destroy' policy already in the 1980s in hospitals resulting in extremely low MRSA numbers since then. Other countries such as Germany and the UK could clearly not prevent the exacerbation of the MRSA problem and faced a major increase in MRSA-positive hospitals-associated infections. Remarkably, through governmental regulations, the UK was able to decrease the numbers of positive MRSA bacteraemia from 43.6% in 2005 to 13.6% in 2011 and 2012 ([http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/)). In Germany on the other hand, MRSA is still a large and human health-threatening problem in nosocomial settings. In 2005, 21.4% of the included isolates were resistant to methicillin and although in 2012 this number could be decreased to 15.4%, it is still a large problem of the German healthcare system. Experts believe that this is not only caused by the vast amounts of antibiotics prescribed in the past decades, but also by a lack of proper hygiene that enabled MRSA transmission. With regard to improving hygiene, one German hospital recently issued a mandatory instruction that forbids hand shaking between any two persons in this hospital. Overall, the report from the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) in late 2013 describing their antimicrobial resistance surveillance data for Europe from 2012 stated that the population-weighted mean for MRSA decreased significantly over the last four years. However, MRSA remains a public health threat as the percentage is still above 25% in seven out of the 30 participating countries [29]. Nonetheless, as indicated in this thesis, the group of Gram-negative bacteria acquiring resistance against carbapenems, our 'last resort' antibiotics, is believed to be a much more dangerous threat than MRSA. With regard to this, the ECDC issued a report in 2011 addressing a risk assessment of the spread of CPEs through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer [30]. In addition, many other experts in the CPE field have expressed their concerns about these new superbugs on the European horizon. Accordingly, the EuSCAPE project, which was presented in **Chapter 11** of this thesis, has the remit to combat this threat.

In view of bacterial fingerprints that were explored for various purposes in the present thesis, it has to be stated that there is clearly no ultimate approach in describing and capturing the diverse bacterial fingerprints. The choice of approach is dependent on the goal of the respective investigation. As an example, the MLVF typing method that was extensively employed for the research described in this thesis has been proven to be highly discriminatory and capable of identifying outbreaks and routes of transmission on the local level. However, it is not suitable for comparisons across borders and also does not produce portable data. On the other side, the second most frequently used DNA typing method described in this thesis, *spa*-typing, is a popular tool that is used across borders, as it produces portable data. It thus seems that there is no 'one solution that fits all', but different options and combinations that should be applied wisely. Moreover, these two typing methods merely produce very crude fingerprints of the investigated isolates, to simplify their very complex fingerprints. However, as scientists are also only humans, and humans like to put things in boxes and label them, these and other typing approaches have found wide appreciation and acceptance in the field of microbiology. As already discussed in detail in **Chapter 1** and the pilot approach presented in **Chapter 8**, the future in bacterial typing lies in the new revolution of WGS. This 'typing tool' bears the ultimate opportunity to reveal the full genomic complexity, but also to transform this complex information into a simple

fingerprint and even to extract the respective information for MLVF, *spa*-typing and/or MLST. Finally, it has to be emphasized that the presented work on DNA typing in this thesis provides merely a glimpse into the world of bacterial fingerprints with a focus on two particular ‘criminals’, whereas the ‘world of microbial crime threatening human health’ is infinitely larger on the global scale.

One way to not lose control in the chaos of bacterial diversity is the implementation of surveillance systems in connection with better diagnostics and improved communication across disciplines and borders. The two examples given in this thesis, the SRL network and the EuSCAPE project, demonstrate how important collaborations and the establishment of networks on the international level are. These two initiatives aiming to control both MSSA/MRSA and CPEs in the near future, and therefore to lower the potential public health threat, are perfect examples of working collaborations without borders. In addition to the examples given in this thesis, the EurSafety-Health-Net (previously named MRSA-Net) is another project that implements infection prevention across borders, in this case across the borders between Germany and the Netherlands. The purpose of this project, and actually the purpose of every network approach, is to cross borders between countries, states, districts, institutions, and sectors and most importantly between different occupational groups.

Another good example for more ‘cross-border’ work is the extension of more interdisciplinary research, as performed in the present thesis by, on the one hand, bringing microbiologists and immunologists around one table and, on the other hand, by combining previously widely separated research fields such as microbiology and (bio)informatics. These efforts to cross invisible borders are very important for the success of research projects as presented in this thesis and will be even more important in future research. I therefore believe that the saying ‘one for all, and all for one’ perfectly applies to research and researchers and that only together great advances can be achieved. Only a team effort in an interactive network on every level of research will breach borders and open up new scientific frontiers to win the global fight against the ‘bacterial criminals’.

## REFERENCES

1. Glud RN, Wenzhöfer F, Middelboe M, Oguri K, Turnewitsch R, Canfield DE, et al. High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth. *Nature Geoscience*. 2013;6:284–8.
2. Lever MA, Rouxel O, Alt JC, Shimizu N, Ono S, Coggon RM, et al. Evidence for microbial carbon and sulfur cycling in deeply buried ridge flank basalt. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2013;339(6125):1305–8.
3. Steinhoff U. Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunol Lett*. 2005;99(1):12–6.
4. Sears CL. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe*. 2004;11(5):247–51.
5. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2002;361(9356):512–9.
6. Quigley EMM. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2013;9(9):560–9.
7. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):59–65.
8. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559–63.
9. Jones ML, Ganopoulos JG, Martoni CJ, Labbé A, Prakash S. Emerging science of the human microbiome. *Gut Microbes*. 2014;5(4).
10. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science; 2014;6(237):237ra65–5.
11. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Experimental Eye Research*. Elsevier Ltd; 2013;117:99–105.
12. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogens. *Lancet Respir Med*. Elsevier; 2014;2(3):238–46.
13. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. Nature Publishing Group; 2014;498(7454):367–70.
14. Conlan S, Kong HH, Segre JA. Species-level analysis of dna sequence data from the nih human microbiome project. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2012;7(10):e47075.
15. Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med*. BioMed Central Ltd; 2011;4(10):77–7.
16. Albert HB, Sorensen JS, Christensen BS, Manniche C. Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): a double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy. *Eur Spine J*. 2013;22(4):697–707.
17. Albert HB, Lambert P, Rollason J, Sorensen JS, Worthington T, Pedersen MB, et al. Does nuclear tissue infected with bacteria following disc herniations lead to Modic changes in the adjacent vertebrae? *Eur Spine J*. 2013;22(4):690–6.
18. Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio*. 2014;5(3):e01206–14–e01206–14.
19. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1003933–3.
20. Carpaij N, Willems RJL, Rice TW, Weinstein RA, Hinds J, Witney AA, et al. Genetic variation in spatio-temporal confined USA300 community-associated MRSA isolates: a shift from clonal dispersion to genetic evolution? *PLoS ONE*. 2011;6(2):e16419.
21. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):441–6.
22. Larsen AR, Goering R, Stegger M, Lindsay JA, Gould KA, Hinds J, et al. Two distinct clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with the same USA300 pulsed-field gel electrophoresis profile: a potential pitfall for identification of USA300 community-associated MRSA. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3765–8.
23. van der Kooi-Pol MM, Veenstra-Kyuchukova YK, Duipmans JC, Pluister GN, Schouls LM, Neeling AJ, et al. High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients with epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*. 2012;21(6):463–6.
24. Stegeman CA, Tervaert J, Sluiter WJ, Manson WL, De Jong PE, Kallenberg C. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener Granulomatosis. *Ann Intern Med*. American College of Physicians; 1994;120(1):12–7.
25. Stegeman CA, Tervaert JWC, de Jong PE, Kallenberg CGM. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. *N Engl J Med*. 1996;335(1):1–5.
26. Barogui YT, Klis S, Bankolé HS, Sopoh GE, Mamo S, Baba-Moussa L, et al. Towards rational use of antibiotics for suspected secondary infections in buruli ulcer patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2010.
27. Yeboah-Manu D, Kpeli GS, Ruf M-T, Asan-Ampah K, Quenin-Fosu K, Owusu-Mireku E, et al. Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2013;7(5):e2191.
28. Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI. Global transport networks and infectious disease spread. *Adv Parasitol*. 2006;62:293–343.
29. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Surveillance report on antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2012. 2013.
30. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE). ECDC Technical Report. 2011.







# PART 5



'It is never too late or too soon, it is when it is supposed to be.'

*Mitch Albom*

## Samenvatting en toekomstperspectieven



## SAMENVATTING

Bacteriën vormen één van de grootste en meest diverse groepen van alle organismen op aarde. Hoewel bacteriën in wezen eencellige organismen zijn met een grootte van een paar micrometers, hebben ze toch een enorme variëteit aan morfologieën en worden ze onderverdeeld in vele takken, klassen, ordes, families en soorten. Alle levende organismen op aarde kunnen op grond van hun onderlinge verwantschap gerangschikt worden in de boom des levens. De eerste hoofdsplitsing in deze stamboom betreft het onderscheid tussen prokaryoten en eukaryoten. Bacteriën vormen samen met archaea de prokaryoten, ofwel organismen zonder een celkern. Het woord prokaryoot beschrijft deze typische eigenschap, aangezien het afgeleid is van het Grieks: πρό- (pro-) ‘voor’ en κάρυόν (karyon) ‘noot of kern’. In tegenstelling tot de prokaryoten bevatten de eukaryoten een celkern, waarin hun DNA ingesloten is. De diversiteit aan bacteriën is zo groot, dat een exacte schatting van het aantal bacteriesoorten tot dusver niet gemaakt kon worden. Bovendien zijn veel bacterie-soorten die al wel geïdentificeerd zijn nog steeds niet gekarakteriseerd, omdat ze niet gekweekt kunnen worden onder de huidige state-of-the-art laboratorium condities.

Evolutionair-biologische studies hebben laten zien, dat 4 miljard jaar geleden bacteriën de eerste levensvormen op aarde waren. Zelfs nu, in het jaar 2014, zijn bacteriën nog steeds aanwezig in nagenoeg alle onderzochte milieus. Recentelijk werd in twee extreme milieus nieuw bacterieel leven ontdekt, te weten op de diepste plek op aarde, de marianentrog, en zelfs voor de kust van de Verenigde Staten van Amerika (VS), in rotsblokken gelegen op een diepte van 2590 meter oceaanoever en onder 580 meter gesteente [1,2]. Over het algemeen worden bacteriën nagenoeg overal gevonden, onder andere in onze bodem, water, zure hete-bronnen en zelfs in radioactief afval. Voor dit proefschrift zijn vooral de bacteriën van belang die een symbiotische, mutualistische, commensale danwel parasitaire relatie aangaan met planten en/of dieren. De laatste groep betreft met name mensen. Mensen worden bevolkt door ongeveer tien maal meer bacteriecellen dan menselijke cellen. De grootste aantallen verschillende bacteriesoorten worden gevonden in ons maag-darm kanaal, op de mucosa en op de huid.

In de laatste 200.000 jaar is de moderne mens geëvolueerd met de bestaande bacteriën. In de loop van deze evolutie is het menselijk lichaam een habitat geworden voor vele bacteriesoorten, zelfs in zo'n mate dat het menselijk bestaan zonder bacteriën ondenkbaar is. Deze visie wordt onderstreept door het feit dat onze eigen microbiota bijdraagt aan de vertering van voedsel en de productie van belangrijke nutriënten als butyraat. Tevens fungeert onze microbiota als barrière tegen intrinsieke of extrinsieke ziekteverwekkers. Het uiteindelijke doel van bacteriologisch onderzoek is dan ook niet de eliminatie van microorganismen, maar het begrijpen van hun diversiteit in de context van hun interactie met hun menselijke gastheer. Bestudering van de interactie tussen mensen en bacteriën zal ons helpen om de voor- en nadelen te begrijpen van de interacties tussen deze twee complexe entiteiten. Met de verkregen kennis kunnen wij dan uiteindelijk de humane gezondheid ondersteunen van de wieg tot het graf.

Door de ontwikkeling van nieuwe en geavanceerde technologie zijn er recentelijk rappe schreden gemaakt op het gebied van de gastheer-bacterie interacties. Het belangrijkste blijft echter de nieuwsgierigheid en gedrevenheid van vele onderzoekers om de onmetelijke diversiteit aan bacteriën in en op de mens te bepalen en te analyseren. Zowel wetenschappers als het brede publiek worden gefascineerd door de bacteriële populaties in en op ons lichaam. Desondanks voelen de meeste mensen zich toch meer bedreigd door bacteriën dan dat ze hun voordelen zien. Dit komt met name door onvoldoende begrip van de positieve rol van bacteriën en door misleidende publiciteit over ziekteverwekkende bacteriën. Dit wordt deels veroorzaakt door een gebrek aan goede uitleg van de voor- en nadelen van bacteriën of door slechte communicatie door experts.

De grondslag voor de vele studies naar de humane microbiota werd gelegd met de exploratie van het darm-microbioom. Naar schatting leven ongeveer  $10^{18}$  bacteriecellen in de menselijke darm, bestaande uit circa 500 verschillende soorten van de ongeveer 300 tot 1000 soorten die aanwezig kunnen zijn. Zeer waarschijnlijk wordt echter 99% van het totale microbiom gevormd door slechts 30 tot 40 soorten [3-6]. Op basis van deze waarnemingen en andere studies wordt het darm-microbioom

in verband gebracht met diverse functies in zowel gezondheid als ziekte [5-8]. Verschillende onderzoekers realiseerden zich echter al snel dat de darm slechts een van de vele microbiële thuisplaatsen is in het menselijk lichaam. Zodoende werden ook andere plekken in het lichaam onderzocht, plekken die voorheen als steriel bekend stonden. Deze bleken opeens ware broeinesten van microben te zijn. Enkele van deze voorheen steriel-veronderstelde plaatsen zijn de placenta, de moedermelk, het oog, de neus-keelholte, de longen, het urogenitale stelsel en de huid [9-15]. Hoewel vele bacteriën in en op het menselijk lichaam een gunstig effect hebben, of tenminste onschadelijk zijn, kunnen sommige van deze bacteriën ziekte veroorzaken. Dienovereenkomstig zijn endogene bacteriën niet alleen betrokken bij reeds bekende bacteriële infecties als longontsteking of middenoor-ontsteking, maar wellicht ook bij lage-rug-pijn, kanker, obesitas en hartaanvallen [16-19]. Tezamen wijzen al deze bevindingen erop dat mensen en hun microbiota in een zeer delicate balans samenleven. Onder normale omstandigheden is deze balans gunstig voor zowel de bacteriën als hun gastheer. Sommige bacteriesoorten in en op het menselijk lichaam hebben echter een 'Dr. Jekyll & Mr. Hyde' karakter. Dit is zeker het geval voor de beruchte opportunistische ziekteverwekker *Staphylococcus aureus*. Door deze bipolariteit van bacteriën kan de delicate samenwerking tussen bacteriën en gastheer verstoord worden, hetgeen kan leiden tot ziekte.

Verrassend genoeg lijkt de aartsvader van de evolutionaire biologie, Charles Darwin, bacteriën niet te hebben vermeld in zijn meesterwerk 'On the origin of species' uit 1859 of in enig van zijn andere werken. Dit terwijl Antoni van Leeuwenhoek hun bestaan al had gerapporteerd in de 17e eeuw. Daarnaast werkten Darwins' tijdgenoten Louis Pasteur en Robert Koch aan de grondslagen van de bacteriologie, zoals wij die nu kennen. We kunnen alleen maar aannemen dat Darwin onvoldoende op de hoogte was van de fundamentele inzichten op het gebied van bacteriologie en dat hij wellicht stomverbaasd zou zijn als hij geweten had dat hij enkele van de beste bewijzen voor zijn theorie van natuurlijke selectie had kunnen vinden in en op zijn eigen lichaam. Desalniettemin, in de context van de bacteriologie, zou Darwins term 'natuurlijke selectie' tegenwoordig hergedefinieerd moeten worden tot 'onnatuurlijke selectie' aangezien antibiotica en andere substanties die door de mens worden gemaakt bijna alle uithoeken van deze planeet hebben bereikt. Zoals beschreven in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift zijn antibiotica duidelijk een aanjager van bacteriële evolutie in de mens sinds de ontdekking van penicilline. Dit wordt duidelijk onderstreept door de opkomst van multiresistente bacteriën in zowel ziekenhuizen als in de maatschappij zelf. Los van de 'onnatuurlijke selectie' heeft de ontdekking van de verschillende humane microbiomen zeker de wetenschappelijke grenzen van de microbiologie hergedefinieerd. Het is nu algemeen bekend en geaccepteerd dat bacteriën direct of indirect vele aspecten van de humane biologie beïnvloeden. Zodoende kan gesteld worden dat de menselijke soort, die lange tijd werd geacht het summum van de evolutie te zijn, feitelijk afhankelijk is van de oudste en meest simpele levensvorm. In dit opzicht kunnen mensen ook beschreven worden als 'grote, buitengewoon complexe microbiële gemeenschappen met een chique exoskelet' bovenin de stamboom van de levende natuur [J.M. van Dijk]. Als Charles Darwin dit nu zou horen, zou hij zich wellicht omdraaien in zijn graf.

De kern van dit proefschrift betreft onderzoek naar de hoofdverdachte van aanslagen op de menselijke gezondheid, *S. aureus*, en zijn handlangers, de *Enterobacteriaceae*. Deze bacteriën zijn onderdeel van een complex en divers human microbiom. Zoals beschreven in **hoofdstuk 1 in deel 1** van dit proefschrift wordt *S. aureus* voornamelijk gevonden in de keel en neusholte en op de huid, terwijl de *Enterobacteriaceae* voornamelijk in de darmen worden gevonden. Beide bacteriegroepen zijn overduidelijk deel van het complexe humane ecosysteem en als zodanig hebben ze een grote invloed op het lichamelijk functioneren. Zoals geïntroduceerd in **hoofdstuk 1** en beschreven in dit proefschrift kunnen deze bacteriën zeer schadelijke en gevaarlijke ziekteverwekkers zijn die met name misbruik maken van verlaagde immuniteit veroorzaakt door andere ziektes.

In het kort samengevat richt dit proefschrift zich op het verhelderen van de oneindige bacteriële diversiteit, met de focus op *S. aureus* en carbapenemase-producerende *Enterobacteriaceae* (CPEs). Het volgen van de vingerafdrukken van deze bacteriën werd bereikt door de gecombineerde analyse van verschillende studieparameters, in het bijzonder: (i) verschillende geografische locaties in Europa, (ii)

verschillende ziekten (epidermolysis bullosa [EB], ziekte van Wegener [GPA], en Buruli-ulcus [BU]), en (iii) verschillende bacteriële stammen (bijv. *S. aureus* ST398, *S. aureus spa*-type t437). Binnen alle onderzoeken in dit proefschrift was er een sleutelrol weggelegd voor het incorporeren van de metadata afkomstig van de patiënt tezamen met de epidemiologische, moleculaire, en fenotypische data van de betreffende studieisolaten. Teneinde de gebruikte typerings-methodiek te kunnen evalueren, evenals de bacteriële vingerafdrukken dwars door heel Europa te kunnen volgen is het onderzoek beschreven in dit proefschrift uitgevoerd met “liefde, zweet, naïviteit, enthousiasme, motivatie, betrokkenheid en hard werk”. Dit proefschrift vormt een compilatie van verschillende wetenschappelijke projecten gericht op het begrijpen van een fragment van de oneindige diversiteit aan bacteriën in Europa en het bestaat uit tien wetenschappelijke hoofdstukken (**deel II** en **III**) die hieronder kort samengevat worden. Naast deze samenvatting zal ook een beeld geschetst worden van een toekomst onder druk van bacteriële vingerafdrukken.

**Hoofdstuk 2** betreft de ‘snelle en hoge-resolutie onderscheiding van *S. aureus* isolaten verkregen vanuit de bevolking of vanuit het ziekenhuis, met identieke pulsed-field gelelectroforese (PFGE) profielen en *spa*-types’. Dit is het eerste experimentele hoofdstuk in dit proefschrift dat zich richt op *S. aureus*. De hier onderzochte *S. aureus* isolaten behoren tot de zich snel verspreidende meticilline-resistente *S. aureus* (MRSA) klonen met het PFGE profiel USA300. Dit profiel werd voor het eerst gerapporteerd in 2001 in de VS en verspreidde zich in het laatste decennium vanuit de VS onder de mensen en vervolgens naar ziekenhuizen op alle continenten [20,21]. Opmerkelijk is dat de voorgenoemde USA300 kloon enerzijds verantwoordelijk is voor de belangrijkste MRSA-epidemie in de VS, terwijl deze kloon anderzijds nog geen vat heeft gekregen op andere continenten. De twee belangrijkste motivaties voor de studies beschreven in **hoofdstuk 2** waren: (1) het moleculair typeren van *S. aureus* is van belang voor de besluitvorming omtrent surveillance- en controlestrategieën, alsmede voor het begrijpen van de snelle verspreiding, de complexe populatiebiologie en de infectieuze status van deze ziekteverwekker die voortdurend evolueert en (2) er was een eerdere publicatie betreffende de mogelijk foutieve klassificatie van deze gevaarlijke *S. aureus* kloon [22]. In **hoofdstuk 2** wordt het grote onderscheidende vermogen van de zogenaamde ‘multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting’ (MLVF) techniek beschreven die gebruikt kan worden om snel onderscheid te maken tussen 91 sterk gelijkende MRSA-isolaten uit Duitse en Deense lokale gemeenschappen en ziekenhuizen. Deze isolaten hadden hetzelfde USA300 PFGE profiel en/of verwante *spa*-types. Op basis van het hoge onderscheidingsvermogen, gebruiksgemak en lage kosten blijkt MLVF een zeer aantrekkelijke typeringsmethode voor i) het ontdekken en voorkomen van MRSA-uitbraken, ii) het ontdekken van MRSA-bronnen en verspreidingsroutes, en iii) het identificeren van sterk verwante *S. aureus* isolaten voor epidemiologische en evolutionaire studies, in het bijzonder in de context van de gezondheidszorg. De resultaten beschreven in dit hoofdstuk belichten de voordelen van het gebruik van MLVF als alternatieve typeringsmethode. In de nabije toekomst zou MLVF mogelijk de ‘gouden standaard’ methode PFGE kunnen vervangen in regionale laboratoria.

Het in **hoofdstuk 2** beschreven hoge onderscheidende vermogen van MLVF werd vervolgens verder getoetst met behulp van een *S. aureus* collectie die bestond uit isolaten met het sequentietype ST398. Zoals beschreven in **hoofdstuk 3** komt *S. aureus* ST398 wereldwijd veel voor in veestapels, met name in gebieden met veel veehouderijen. Als gevolg hiervan en van de hoge transmissie van dit *S. aureus* type, neemt ook de kolonisatie en infectie van mensen met dit *S. aureus* type toe. In de studie beschreven in **hoofdstuk 3** werden 184 *S. aureus* ST398 isolaten uit zeven verschillende Europese landen getypeerd met de complementaire methodes MLVF en *spa*-typering. De typeringsresultaten laten een verrassende diversiteit zien in de genomen van deze isolaten. De resultaten laten tevens zien dat MLVF, in combinatie met *spa*-typering, de zogenaamde ‘multilocus sequence typing’ (MLST) zou kunnen vervangen. MLST wordt tot op heden gebruikt als het enige criterium voor de epidemiologische analyse van *S. aureus* ST398. *Nota bene*, MLVF bleek in staat te zijn om de verwantschap en genomische heterogeniteit van dit *S. aureus* type duidelijk zichtbaar te maken. Hierdoor konden bijvoorbeeld overdrachtsroutes gevolgd worden, wat op zijn beurt weer gebruikt kan worden om potentiële uitbraken te voorkomen danwel in te perken. Ten einde de toepasbaarheid en het onderscheidend vermogen van DNA typeringsmethodes te



bestuderen in de context van het identificeren en beschrijven van diverse bacteriële vingerafdrukken, werd wederom een andere *S. aureus* verzameling bestudeerd, waarvan de resultaten beschreven zijn in **hoofdstuk 4**. Deze collectie van *S. aureus* isolaten was louter gebaseerd op het *spa*-type t437. Naast de voornoemde *spa*-typering werden drie verschillende DNA typeringsmethodes gebruikt om (1) de aanwezigheid van een Aziatische *S. aureus* kloon in Europa en (2) de genetische verwantschap van de Aziatische kloon met deze kloon in Europa te bepalen. De resultaten laten zien dat het *spa*-type t437 met name gekoppeld is aan het klonale complex (CC) 59, zoals gedefinieerd via MLST. Deze kloon werd tot nu toe alleen in lage aantallen gemeld in Europa-brede epidemiologische studies. Desalniettemin hebben sommige Noord-Europese referentielaboratoria toenemende aantallen hiervan gemeld gedurende het afgelopen decennium. Om te bepalen of de *S. aureus* CC59-t437 kloon ook aanwezig is in andere Europese landen en om de genetische variatie van deze kloon in Europa te onderzoeken werden 147 *S. aureus* t437 isolaten verzameld uit 11 Europese landen over een periode van 11 jaar. Deze werden geanalyseerd met MLVF, 'multiple-locus variable number tandem repeat analysis' (MLVA) en MLST. Tevens werden 16 *S. aureus* t437 isolaten aan de collectie toegevoegd die afkomstig waren van gezonde dragers en patiënten uit China. De meeste isolaten lijken monofyletisch te zijn, ofwel afkomstig van éénzelfde gezamenlijke voorouder. Opvallend is dat 99% van de Europese én Chinese isolaten behoren tot het MLVA complex 621 en dat alle via MLST-getypeerde isolaten behoren tot het klonale complex CC59. De resultaten van deze studie impliceren daarom dat de Europese *S. aureus* t437 populatie een genetisch nauw-verwant cluster vormt, ongeacht het jaar en de plaats van isolatie. Dit ondersteunt de conclusie dat *S. aureus* CC59 aanwezig is in heel Europa en zich niet beperkt tot een geografische regio of tot specifieke gastheermilieus. Hieruit volgt dat de Europese *S. aureus* t437 de kenmerken heeft van een hoog-risico kloon. Aangezien de vier gebruikte DNA typeringsmethodes in deze studie niet dagelijks gebruikt worden in de meeste regionale laboratoria en ziekenhuizen is het aannemelijk dat de aanwezigheid van de CC59 kloon tot nu toe onderschat wordt in Europa. Dit is een reden voor enige bezorgheid gezien de dominante aanwezigheid van *S. aureus* CC59 in Azië en de klinische implicaties van CC59 infecties. Waar mogelijk moet dan ook de verdere verspreiding van deze potentiële hoog-risico kloon worden voorkomen, bijvoorbeeld door actieve screening van patiënten die reizen naar Azië hebben gemaakt.

De in het vorige hoofdstuk beschreven identificatie van het genetisch nauw-verwante *S. aureus* t437 cluster en de isolatie van een *S. aureus* stam van dit type in een patiënt van het UMCG die leed aan herhaaldelijk terugkerende oorontstekingen vormde de aanleiding om de evolutie van het respectievelijk *S. aureus* isolaat retrospectief over een lange periode te onderzoeken. **Hoofdstuk 5** beschrijft dit onderzoek waarbij een combinatie van genomische en proteomische methodes werd benut om een uitgebreide 'time-lapse' film van dit isolaat te maken. De eerste zeven MRSA-isolaten waren gedurende een periode van twee jaar verzameld van de patiënt en zijn eerste vrouwelijke partner. De laatste drie isolaten waren niet-verwante meticilline-gevoelige *S. aureus* (MSSA) stammen die verzameld waren in de periode van zes maanden tot twee jaar na de laatste MRSA-isolatie. Opmerkelijk was dat de patient MRSA-positief bleef gedurende twee jaar ondanks meerdere pogingen tot MRSA-eradicatie. De persistente aanwezigheid van de MRSA werd waarschijnlijk veroorzaakt door de chronische oorontsteking bij de patiënt. Whole-genome sequencing (WGS) liet slechts 59 variaties van één nucleotide (single nucleotide polymorfismes of SNPs) zien tussen de zeven MRSA-isolaten, waarvan 28 in een gen-coderend gedeelte en 31 in de intergene gebieden van het bacteriële chromosoom bleken te liggen. In de drie MSSA isolaten werden slechts 27 SNPs ontdekt, waarvan 15 in een coderend gedeelte van het chromosoom en 12 daarbuiten. Een klein deel van deze SNPs werd gevonden in het kerngenoom, waarvan slechts 10 gedeeld werden door de zeven MRSA-isolaten onderling en 3 tussen de MSSA isolaten. Opmerkelijk waren de SNPs die ontdekt werden in de *rsbU*, *agrC*, en *clfB* genen, omdat mutaties in deze genen de virulentie van *S. aureus* en/of de adhesie aan gastheerweefsels zouden kunnen beïnvloeden. De overige SNPs in de niet-coderende gedeeltes kunnen hun effect hebben op de gen-expressie en de eiwitsamenstelling ofwel het proteoom van de bacterie. Analyse van de exoproteomen van alle MRSA-isolaten toonde aan, dat de meerderheid van de geïdentificeerde extracellulaire eiwitten virulentiefactoren betrof, zoals proteïne A, Sbi, IsdA,

IsdB, CHIPS en PVL. De analyses beschreven in dit hoofdstuk toonden zo voor de eerste keer de krachtige complementariteit van WGS en proteomics aan voor de karaktersering van opeenvolgende *S. aureus* isolaten van een patiënt over een lange tijdspanne. Met name de uitgebreide vergelijking van het genoom met de uitgescheiden eiwitten werpt nieuw licht op de impact van genomische evolutie op de algehele productie van virulentiefactoren en de variaties daarin. Informatie aangaande de antibioticatherapieën en de reishistorie van de onderzochte patiënt vervolmaakten de complexe ‘time-lapse’ film in deze studie.

De resultaten die gepresenteerd zijn in **hoofdstuk 5** roepen interessante vragen op over de mens in betrekking tot de hem koloniserende danwel infecterende *S. aureus* types. Voor dit doel werden verschillende patiëntengroepen geselecteerd om hun anti-*S. aureus* immunoreacties te bepalen in relatie tot de diversiteit aan *S. aureus* populaties in deze patiënten. De resultaten van deze studies werden beschreven in de volgende vier hoofdstukken.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de eerste patiëntengroep die bestudeerd werd in de context van dit promotieonderzoek naar *S. aureus* kolonisatie, namelijk patiënten die lijden aan de erfelijke huidziekte EB, waardoor blaren en veelal chronische wonden ontstaan. Eerder onderzoek heeft laten zien dat de wonden van EB-patiënten sterk bevolkt worden door *S. aureus* en dat deze patiënten vaker nasale dragers zijn van *S. aureus* dan gezonde mensen (56-90% vs. 20-30%) [23]. Deze waarnemingen impliceren dat de wonden van patiënten met EB een aantrekkelijke niche vormen voor *S. aureus*. Moleculaire typering liet zien dat patiënten met EB niet door één specifiek *S. aureus* type worden gekoloniseerd. We zagen dat, op enig moment, sommige patiënten met EB zelfs tot vier verschillende *S. aureus* types in hun wonden droegen. Deze resultaten leidden tot het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 6**, waarin hoge niveaus aan anti-*S. aureus* antilichamen mogelijk in verband konden worden gebracht met langdurig dragerschap van afwisselende *S. aureus* types. De grote collectie *S. aureus* monsters van 61 patiënten met EB werd getypeerd met behulp van MLVA en *spa*-typering. Dit liet grote wisselingen zien in zowel tijd als plaats met betrekking tot de *S. aureus* types waarmee individuele patiënten met EB waren gekoloniseerd. Opvallend was dat ongeveer de helft van de onderzochte patiënten wisselingen in de *S. aureus* types lieten zien gedurende het onderzoek. Gedurende de twee jaar waarin dit onderzoek werd verricht bleek de genetische diversiteit aan *S. aureus* types verrassend hoog. Met betrekking tot de immunoreacties van de onderzochte patiënten vonden wij hogere titers aan anti-*S. aureus* immunoglobuline G (IgG) in plasma van patiënten met EB dan in plasma van gezonde vrijwilligers. Dit gold met name voor de IgGs tegen IsdA, SasG, IsaA, SCIN, Nuc, LytM en de *egc*-cluster superantigenen (SAGs) SEM, SEN en SEO. Met name de patiënten met EB die meerdere verschillende *S. aureus* types bleken te dragen hadden hogere IgG titers in hun plasma dan de patiënten die maar één *S. aureus* type bij zich droegen. Deze waarnemingen, tezamen met de waargenomen genetische variatie aan *S. aureus* isolaten, doet vermoeden dat het immuunsysteem van de patiënten met EB sterk geprikkeld wordt door de aanwezige *S. aureus* antigenen. Patiënten met EB zijn desondanks niet in staat om *S. aureus* uit hun wonden te verdrijven, mogelijk door hun genetisch defect of door een ander, nog onbekend, mechanisme. Een belangrijke vraag die nog beantwoord moet worden betreft de kwestie of de aanwezigheid van *S. aureus* in wonden de wondgenezing verhindert.

Het onderzoek dat beschreven werd in de voorgaande twee hoofdstukken leidde tot een nieuw project op het grensgebied van microbiologie en immunologie. De potentiële correlatie tussen bacteriën en auto-immuunziekten vormde hier het centrale aandachtspunt zoals beschreven in de volgende twee hoofdstukken. **Hoofdstuk 7** behandelt het verband tussen *S. aureus* en de auto-immuunziekte GPA. GPA is één van de ziektes die gerelateerd zijn aan de aanwezigheid van anti-neutrofiel cytoplasmatische auto-antilichaam (ANCA)-geassocieerde vasculitiden (AAV). Voor dit doel werd onderzocht of de GPA-patiënt-specifieke anti-*S. aureus* IgG titers te correleren zijn aan de lange-termijn blootstelling aan *S. aureus*. Eerdere studies meldden namelijk al dat GPA-patiënten over het algemeen vaker nasale *S. aureus* dragers zijn dan gezonde individuen en dat chronische aanwezigheid van *S. aureus* een risicofactor is voor GPA terugval. Daarnaast was tevens gevonden dat behandeling met het antibioticum co-trimoxazol een positief effect heeft op de terugval-incidentie [24,25]. **Hoofdstuk 7** beschrijft een grote retrospectieve cohort studie met 85 protease 3 (PR3) ANCA-

positieve GPA-patiënten en 18 gezonde controlepersonen. De immunoreacties tegen *S. aureus* werden bepaald aan de hand van de serum IgG titers tegen 59 antigenen van *S. aureus*. Parallel hieraan werden 210 *S. aureus* isolaten van GPA-patiënten getypeerd met MLVF en *spa*-typering. Gedurende de studie bevatten de sera van GPA-patiënten constante IgG titers tegen vele *S. aureus* antigenen, ongeacht het ziektebeeld of de behandeling op dat moment. Verrassend was dat de patiëntensera lagere anti-*S. aureus* titers vertoonden dan sera van de gezonde controle personen, terwijl de totale IgG titers in beide groepen gelijk waren of zelfs hoger in de GPA-patiënten. De verlaagde GPA anti-*S. aureus* titers bereikten significantie voor enkele oppervlakteeiwitten (ClfA, ClfB, FnbpA, en SdrE) alsmede uitgescheiden eiwitten (Atl-2, CHIPS, Efb, Lipase, NUC, SCIN, SEN, SEO, SSL3 en TSST-1). In dit opzicht is het van belang dat de *S. aureus* isolaten van zowel de patiënten als de gezonde controles een grotendeels vergelijkbaar gen-repertoire vertoonden. Derhalve lijkt het onwaarschijnlijk dat de lagere IgG titers tegen enkele eiwitten, zoals ClfA, ClfB en FnbpA, veroorzaakt worden door afwezigheid van de desbetreffende genen in de *S. aureus* isolaten van GPA-patiënten. MLVF en *spa*-typering lieten tevens zien dat de *S. aureus* populatie in GPA-patiënten divers is en een afspiegeling vormt van de algemene *S. aureus* populatie in de bevolking. De resultaten die gepresenteerd worden in dit hoofdstuk impliceren daarom dat de GPA-patiënten minder goed in staat zijn om een *S. aureus*-specifieke antilichaamreactie te initiëren dan gezonde controle personen. Dientengevolge zijn GPA-patiënten wellicht onvoldoende beschermd tegen deze opportunistische ziekteverwekker. De in GPA-patiëntensera gemeten verlaagde niveaus van anti-*S. aureus* IgGs staan dan ook in schril contrast tot de eerder gerapporteerde verhoogde anti-*S. aureus* IgG niveaus in plasma van EB-patiënten zoals gemeld in **hoofdstuk 6**. In hoofdstuk 6 was sprake van een immuunsysteem dat sterk geprikkeld werd door *S. aureus* antigenen, waarschijnlijk tengevolge van de langdurige kolonisatie van EB-patiënten met wisselende *S. aureus* types. Hoewel GPA-patiënten ook chronische dragers zijn van *S. aureus* is hun anti-*S. aureus* IgG respons veel lager dan die van gezonde controle personen. Dit verschil tussen EB- en GPA-patiënten kan gerelateerd zijn aan de verschillen in de onderliggende ziekte en het ondersteunt de hypothese, dat het immuunsysteem van GPA patiënten onvoldoende in staat is om *S. aureus* te beheersen danwel op te ruimen.

De ontdekking dat de genetische diversiteit van *S. aureus* isolaten van PR3-ANCA-positieve GPA-patiënten een afspiegeling vormt van de algemene *S. aureus* populatie werd verder onderzocht in **hoofdstuk 8**. *S. aureus* isolaten van PR3-ANCA-positieve patiënten zijn reeds enkele malen onderzocht, terwijl er nog steeds informatie ontbrak over de *S. aureus* types die myeloperoxidase (MPO) ANCA-positieve patiënten koloniseren. Het doel van de studie beschreven in **hoofdstuk 8** was daarom de bepaling van de moleculaire vingerafdrukken van deze isolaten en ze te vergelijken met die van PR3-ANCA-positieve patiënten. Naast de toepassing van de eerder genoemde hoog-onderscheidende DNA typeringsmethodes MLVF en *spa*-typering, werd tevens gebruik gemaakt van een DNA microarray met 336 *S. aureus*-specifieke probes om het genrepertoire te bepalen van 88 nasale *S. aureus* isolaten. De resultaten beschrijven voor het eerst de algehele genomische diversiteit van AAV-geassocieerde *S. aureus* isolaten. Daarnaast werd ook een aantal loci geïdentificeerd die frequenter aanwezig lijken te zijn in *S. aureus* isolaten van één van beide patiëntengroepen. Tevens werden ook verschillen ontdekt in de aanwezigheid van genen voor superantigen en virulentiefactoren zoals *lukXY*, *isaB*, *mprF*, *Q2YUB3*, *set4/set7*, *cap-1*, *cap-5*, *cap-8*, en *sasG*. Samenvattend kan worden gesteld dat de bepaling van het gen-repertoire van de *S. aureus* populatie in PR3-ANCA- en MPO-ANCA-AAV patiënten de weg heeft gebaand voor verder onderzoek naar de moleculaire eigenschappen die de mogelijke rol van *S. aureus* in deze ziektes kan ophelderen.

In het volgende hoofdstuk wordt gefocust op *S. aureus* kolonisatie van de wonden van patiënten die lijden aan de necrotiserende huidziekte BU, die primair veroorzaakt wordt door de bacterie *Mycobacterium ulcerans*. BU komt voornamelijk voor in West Afrika, in het bijzonder Benin, Côte d'Ivoire en Ghana. De ziekte begint meestal als een pijnloze zwelling, vlek, of oedeem. Indien de infectie niet wordt behandeld ontstaan grote zweren. De pathologie van BU is gerelateerd aan de productie van mycolacton, een immuun-suppressief macrolide toxine dat weefselsterfte veroorzaakt. Lang werd aangenomen dat de aanwezigheid van mycolacton in de wonden van BU patiënten de

kolonisatie door andere microorganismen zou tegengaan. Enkele recente studies laten echter zien dat een diverse microbiota in deze wonden aanwezig is, hetgeen suggereert dat de necrotiserende weefsels in deze wonden een rijke bron van voedingsstoffen voor andere micro-organismen dan *M. ulcerans* vormen [26,27]. Op basis hiervan werd de studie beschreven in **hoofdstuk 9** geïnitieerd. Dit hoofdstuk draait om de genetische diversiteit van de *S. aureus* isolaten verkregen uit 19 BU-patiënten uit zuidoost Ghana. Dertig BU-patiënten waren gescreend voor de aanwezigheid van *S. aureus* gedurende de 8 maanden waarin de studie liep. Negentien van de dertig patiënten (63.3%) waren drager van *S. aureus* op één of meerdere tijdstippen waarop monsters genomen werden. Om de genetische diversiteit van de *S. aureus* isolaten uit de neus en wonden van BU-patiënten te bepalen werd wederom gebruik gemaakt van de complementaire DNA typerings-methodes MLVF en *spa*-typering. Tevens werd het antibioticumresistentieprofiel van de verzamelde *S. aureus* isolaten bepaald alsmede de wondtopografie van *S. aureus*. In tegenstelling tot de *S. aureus* isolaten van EB- of GPA-patiënten waren de 91 *S. aureus* isolaten van de 19 BU patiënten zeer homogeen op basis van MLVF typering. De resultaten van de *spa*-typering bevestigden deze homogeniteit met de vondst van slechts 13 *spa*-types. De verkregen resultaten beschrijven voor het eerst de genetische diversiteit van *S. aureus* in de wonden en neus van BU patiënten. De genotyperingsresultaten suggereren ook dat er overdracht van *S. aureus* tussen patiënten en andere personen plaats vindt, maar dit moet verder onderzocht worden. Om de mogelijke bronnen van *S. aureus* transmissie te vinden is nader onderzoek van groot belang. Dit onderzoek dient zich met name te richten op de wondverzorging en hygiëne van BU-patiënten en die van de verzorgers en gezinsleden.

Grootschalige moleculaire en epidemiologische studies werden tevens ingezet om bacteriële vingerafdrukken te kunnen volgen door heel Europa. De resultaten hiervan staan eveneens beschreven in dit proefschrift. Deze studies richtten zich niet primair op een specifieke *S. aureus* kloon of type, maar waren gericht op het verkrijgen van een algemeen epidemiologisch en moleculair beeld van *S. aureus*, waarbij zowel MSSA- als MRSA-isolaten uit bloedkweek werden onderzocht. Op basis van een onderzoek uit 2006/2007 naar de geografische verspreiding van *S. aureus* bacteriëmie in 26 Europese landen, bouwt **hoofdstuk 10** hierop verder met een follow-up enquête. Deze enquête werd uitgevoerd in 2011 en de uitkomst werd vergeleken met die uit 2006/2007. De tweede enquête omvatte informatie over 3753 *S. aureus* isolaten (zowel MSSA als MRSA) verzameld door 350 laboratoria die meer dan 435 ziekenhuizen in 25 landen bedienen. Een wijde verspreiding werd gevonden voor verschillende *spa*-types, waarvan sommige aanwezig waren in alle betrokken landen. Specifieke MRSA-klonen werden voornamelijk regionaal gevonden, wat duidt op de selectie en verspreiding van een paar succesvolle klonen. De verspreiding van MSSA daarentegen was meer divers dan die van MRSA en varieerde duidelijk tussen landen. De geografische verspreiding van verschillende ‘internationale klonen’ was nu veranderd ten opzichte van de eerste enquête uit 2006/2007. Deze studie laat zien dat het Europa-breed combineren van moleculaire typering en epidemiologische data belangrijke informatie kan geven met betrekking tot de dynamiek van MSSA- en MRSA-populaties over de landsgrenzen heen. Dit wordt pas goed duidelijk wanneer de data gevisualiseerd worden met behulp van interactieve mapping software. Toekomstige studies kunnen sterk profiteren van deze aanpak indien de moleculaire typeringsdata consistent worden gecombineerd met epidemiologische en klinische informatie uit Europese studies. Dit geeft dan gedetailleerde informatie over de vroege signalering van opkomende klonen, de import daarvan alsmede hun verspreiding over landsgrenzen heen.

Het laatste onderzoeks-hoofdstuk van dit proefschrift richt zich op een andere bacteriële groep, de CPEs, en de huidige epidemiologie daarvan in Europa. Voor dit proefschrift vormt deze groep van bacteriën de ‘handlanger’ van *S. aureus*. CPEs werden recentelijk erkend als een van de meest gevaarlijke microbiële bedreigingen voor de wereldwijde gezondheid. De data beschreven in **hoofdstuk 11** vormen de eerste resultaten van een nieuw Europees initiatief, genaamd de ‘European Survey on CPE’ (EuSCAPE), dat zich richt op het ontwikkelen van een routekaart om een robuust netwerk te vormen voor de detectie van CPE in Europa, alsmede de snelle diagnose, actieve screening, en het vastleggen van richtlijnen voor het inperken van verdere verspreiding. De eerste activiteit in het kader van dit project was het enquêteren van nationale experts uit 39 Europese landen om hiaten in de diagnostiek

en daaropvolgende werkwijzes op te sporen, zowel op landelijk als lokaal niveau. De betrokken nationale experts hebben waardevolle inzichten verstrekt over de huidige epidemiologie van CPE in hun eigen land. Het wordt algemeen aangenomen dat de sleutel voor succes in het indammen van CPE ligt in (1) een vroege signalering door middel van een goede diagnostische aanpak, (2) het inperken van de verspreiding via screening van patiënten en hun contacten en (3) de implementatie van infectie-beperkende maatregelen. Een toenemend aantal landen heeft hierop gereageerd door invoering van de juiste maatregelen en het beschikbaar stellen van aanbevelingen of richtlijnen ter inperking van de CPE-verspreiding. Er zijn echter nog steeds 18 landen waar deze richtlijnen en de richtlijnen voor deponering van CPE isolaten bij de nationale referentielaboratoria ontbreken. De resultaten beschreven in dit hoofdstuk onderstrepen de urgentie om de huidige laboratoriumstandaarden verder aan te scherpen teneinde actieve surveillance en preventie mogelijk te maken. Het EuSCAPE project streeft er naar om een laboratorium-gebaseerd netwerk op te zetten voor de detectie van CPE in Europa.

## TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Het volgen van bacteriële vingerafdrukken op lokaal, nationaal en internationaal niveau is zowel van belang voor het behoud van de balans tussen mens en bacterie, als voor het behouden en beschermen van de volksgezondheid. Paradoxaal genoeg kunnen mensen niet leven zonder een bepaald assortiment aan bacteriën en daarom moeten de spelregels voor een vreedig en gezond samenspel worden bepaald. Twee parameters spelen hierbij een grote rol, namelijk antibiotica en hygiëne. Hoewel antibiotica vele levens hebben gered in de afgelopen eeuw en zullen redden in de komende decenia, blijft het van groot belang om hun productie, afgifte en gebruik goed te monitoren. Het voorkomen en beheersen van infecties in combinatie met goede begeleiding bij het voorschrijven en de toediening van antibiotica zijn eerste vereisten om het antibioticumgebruik omlaag te brengen. Hierbij zijn transparantie en heldere communicatie tussen medici, wetenschappers en de bevolking van eminent belang om de volksgezondheid te verbeteren en het collectieve bewustzijn over verstandig gebruik van antibiotica te verhogen. Een overduidelijk voorbeeld hiervan is het gegeven dat een groot deel van de bevolking nog steeds meent dat antibiotica werken tegen een verkoudheid, hetgeen incorrect is omdat verkoudheid door een virus veroorzaakt wordt en antibiotica geen effect hebben op virussen. Daarnaast zou de hygiëne, met name de handhygiëne, strikter nageleefd en verbeterd moeten worden in medische settings en geografische gebieden met hoge incidentie van infectieuze ziektes. Aangezien de 21e eeuw gekenmerkt wordt door de mogelijkheid om vrij eenvoudig wereldwijd te reizen kan hygiëne belangrijker zijn dan experts en leken denken. Tevens is de import en export van goederen en vee drastisch toegenomen in de laatste paar decennia, niet alleen in Europa maar ook wereldwijd. Dit biedt bacteriën een perfecte gelegenheid om mee te liften [28]. Tezamen dragen deze ontwikkelingen bij aan de huidige diversiteit en (ver)spreiding van bacteriën en daarmee de incidentie van uitbraken en infectieziektes.

Op het moment dat begonnen werd met het onderzoek beschreven in dit proefschrift, werd MRSA beschouwd als een van de meest gevaarlijke ‘bacteriële criminelen’ wereldwijd. Dankzij het efficiënte optreden van EARS-Net gedurende de afgelopen 10 jaren en vele andere studies, is er een zeer uitgebreid inzicht ontstaan in de verspreiding van MSSA en MRSA in Europa en vele andere regio’s van de wereld. Hoewel het EARS-Net programma tot doel heeft om de antimicrobiële resistentie te monitoren van de meest relevante ziekteverwekkers, beperkt het zich daarbij tot invasieve isolaten verkregen uit positieve bloedkweken. Hierdoor is de reikwijdte van de uitgevoerde screening toch enigszins beperkt. Bovendien is ons huidige inzicht volledig gebaseerd op een beperkt aantal publicaties van verschillende studiegroepen en (inter-)nationale consortia als gevolg van het gebrek aan andere systematische screening-studies naar de prevalentie en incidentie van antibioticum-sensitieve of -resistente *S. aureus* types. Voor veel landen, waar dan ook ter wereld, is de beschikbare informatie zeer mager als het gaat om de antibioticum-resistentie en genetische diversiteit van *S. aureus*. De situatie in Europa is betrekkelijk goed gedocumenteerd, niet alleen dankzij het EARS-



Net programma. In de laatste paar decennia erkenden meerdere Europese landen het gevaar van de aanwezigheid van MRSA in ziekenhuizen en onder de bevolking. Als gevolg van dit inzicht kon de verspreiding van MRSA tot staan gebracht worden of zelfs teruggedrongen worden in landen als Zweden, Noorwegen, het Verenigd Koninkrijk (UK) en Nederland. Nederland implementeerde al in de jaren '80 een nationaal MRSA-beleid voor ziekenhuizen dat gebaseerd was op een 'search & destroy' aanpak. Dit beleid resulteerde in een extreem lage MRSA-prevalentie in Nederland. Andere landen als Duitsland en het UK konden daarentegen niet de uitbreiding van het MRSA-probleem voorkomen en zagen daardoor een sterke toename in de ziekenhuis-geassocieerde MRSA-infecties. Opmerkelijk is echter dat het UK door wetgeving in staat was om de MRSA-bacteriëmiegevalle te reduceren van 43.6% in 2005 naar 13.6% in 2011 en 2012 ([http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/)). Anderzijds is MRSA in de Duitse ziekenhuizen nog steeds een groot probleem voor de volksgezondheid. In 2005 waren 21.4% van de isolaten meticilline-resistent en in 2012 was dit nog steeds 15.4%. Hoewel de trend dalend is blijft dit een groot probleem voor het Duitse gezondheidssysteem. Experts denken dat dit probleem niet alleen is veroorzaakt door het voorschrijven van grote hoeveelheden antibiotica, maar ook door een gebrek aan hygiëne, waardoor de verspreiding van MRSA gefaciliteerd werd. Om de hygiëne te verbeteren heeft een Duits ziekenhuis recentelijk zelfs een regel ingevoerd die het handen-schudden binnen het ziekenhuis verbiedt. Ondanks de bestaande problemen stelt het 'European Centre for Disease Prevention and Control' (ECDC) in haar rapportage van 2013 over de Europa-wijde monitoring van antimicrobiële resistentie, dat de populatie-gewogen MRSA-incidentie significant is afgenomen in de laatste vier jaren. MRSA blijft echter een bedreiging voor de volksgezondheid aangezien het percentage positieve bloedkweek nog steeds boven de 25% is in zeven van de dertig onderzochte landen [29]. Vergeleken met MRSA vormt de groep van Gram-negatieve bacteriën met resistentie tegen carbapenems, onze laatste toevluchtsantibiotica, een veel groter gevaar. Het ECDC schreef hierover een rapport in 2011 met daarin specifieke aandacht voor het risico van CPE-verspreiding door overplaatsing van patiënten tussen verschillende ziekenhuizen en de grensoverschrijdende overplaatsing van patiënten in het bijzonder [30]. Daarnaast hebben vele experts in het CPE-veld hun bezorgdheid geuit over deze super-bacteriën die aan de Europese horizon opduiken. Het EuSCAPE project beschreven in **hoofdstuk 11** heeft daarom tot doel de CPE-dreiging tegen te gaan.

Met betrekking tot de bacteriële vingerafdrukken die in dit proefschrift werden onderzocht voor verschillende doeleinden moet gezegd worden, dat er geen ultieme universele werkwijze is om de diverse afdrukken alomvattend te beschrijven. De keuze voor de werkwijze hangt af van het doel van de desbetreffende studie. De MLVF typeringsmethode, die veel is gebruikt voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift, heeft bijvoorbeeld een hoog onderscheidend vermogen en kan goed gebruikt worden om uitbraken en transmissie-routes te identificeren op lokaal niveau. Deze methode is echter niet geschikt voor grens-overschrijvende vergelijkingen en de verkregen uitkomsten kunnen zelfs niet gebruikt worden om gegevens van verschillende laboratoria rechtstreeks te vergelijken. Daarentegen is *spa*-typering, de andere veelgebruikte methode voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift, een populaire methode voor onderzoek in internationale settings, omdat de resultaten wel gemakkelijk onderling vergeleken kunnen worden. Het lijkt er duidelijk op dat er momenteel niet één oplossing is voor elk probleem, maar dat de vele opties en combinaties zorgvuldig tegen elkaar afgewogen moeten worden. De twee gebruikte typeringsmethodes produceren feitelijk vrij ruwe vingerafdrukken van de onderzochte bacterie-isolaten teneinde een versimpeld beeld te geven. Aangezien wetenschappers ook maar mensen zijn en mensen graag alles in hokjes plaatsen, worden bovengenoemde en andere typeringsmethodes veel gebruikt in de microbiologie. Zoals besproken in **hoofdstuk 1** en de pilot-studie beschreven in **hoofdstuk 8**, ligt de toekomst van de bacteriële typing in het revolutionaire WGS. Deze typeringsmethodiek biedt de ultieme mogelijkheid om de volledige genomische complexiteit in kaart te brengen, maar ook om deze weer te terug te brengen tot een simpele vingerafdruk, of zelfs tot de eenvoudige informatie die verkregen wordt uit MLVF, *spa*-typering en/of MLST. Tot slot moet benadrukt worden dat het werk in dit proefschrift slechts een vluchtige blik biedt in de wereld van bacteriële vingerafdrukken met een focus op twee 'criminelen' in het bijzonder. De

wereld van de ‘microbiële criminaliteit’ die de volksgezondheid bedreigt is uiteraard vele malen groter.

Een manier om niet de controle kwijt te raken temidden van de bacteriële diversiteit is de implementatie van effectieve screeningssystemen in combinatie met betere diagnostiek en betere communicatie tussen experts over de landsgrenzen heen. De twee voorbeelden die genoemd zijn in dit proefschrift, namelijk het SRL netwerk en het EuSCAPE project, laten zien hoe belangrijk goede samenwerkingsverbanden en het instellen van internationale netwerken kunnen zijn. Deze twee initiatieven stellen zich ten doel om zowel MSSA en MRSA als de CPE te kunnen beheersen in de nabije toekomst en daarmee de bijhorende potentiële risico’s voor de volksgezondheid te verlagen. Hiermee zijn deze projecten perfecte voorbeelden van professionele samenwerkingsverbanden zonder grenzen. Naast de genoemde voorbeelden is het Eursafety Health-Net (voorheen MRSA-Net) een ander project dat infectiepreventie wil implementeren over landsgrenzen heen, in dit geval de grens tussen Nederland en Duitsland. Het doel van dit project, en feitelijk elk ander netwerk, is om grenzen te slechten tussen landen, provincies, districten, instituten, sectoren en, zeer belangrijk, tussen verschillende beroepsgroepen.

Een ander voorbeeld van ‘grens-overschrijdende’ werkwijze is het samenbrengen van zeer verschillende disciplines, zoals dat gedaan is voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift door het bijeenbrengen van microbiologen, immunologen en (bio)-informatici. De inspanningen om over onzichtbare grenzen te gaan zijn uiterst belangrijk voor het succes van onderzoeksprojecten en zullen wellicht nog belangrijker worden in de toekomst. Ik geloof dat het gezegde ‘één voor allen, allen voor één’ perfect van toepassing is op onderzoek en wetenschappers, want alleen gezamenlijk kunnen we grote vooruitgang bereiken. Alleen een gezamenlijke inspanning in een interactief netwerk op elk niveau van onderzoek kan grenzen doorbreken en nieuwe wetenschappelijke doorbraken forceren om het mondiale gevecht tegen de ‘bacteriële criminelen’ te winnen.

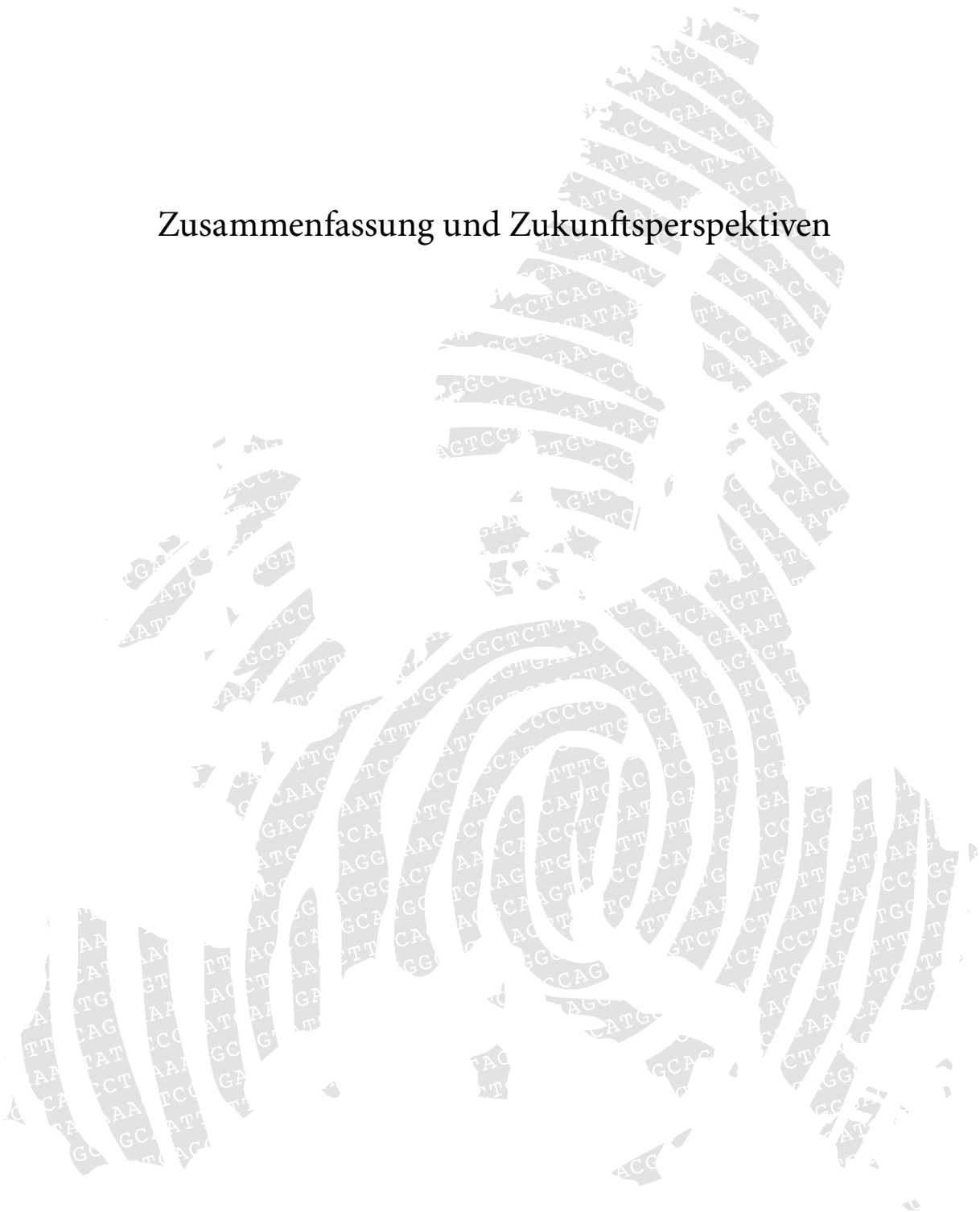


## REFERENTIES

1. Glud RN, Wenzhöfer F, Middelboe M, Oguri K, Turnewitsch R, Canfield DE, et al. High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth. *Nature Geoscience*. 2013;6:284–8.
2. Lever MA, Rouxel O, Alt JC, Shimizu N, Ono S, Coggon RM, et al. Evidence for microbial carbon and sulfur cycling in deeply buried ridge flank basalt. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2013;339(6125):1305–8.
3. Steinhoff U. Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunol Lett*. 2005;99(1):12–6.
4. Sears CL. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe*. 2004;11(5):247–51.
5. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2002;361(9356):512–9.
6. Quigley EMM. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2013;9(9):560–9.
7. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):59–65.
8. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559–63.
9. Jones ML, Ganopoulos JG, Martoni CJ, Labbé A, Prakash S. Emerging science of the human microbiome. *Gut Microbes*. 2014;5(4).
10. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science; 2014;6(237):237ra65–5.
11. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Experimental Eye Research*. Elsevier Ltd; 2013;117:99–105.
12. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med*. Elsevier; 2014;2(3):238–46.
13. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. Nature Publishing Group; 2014;498(7454):367–70.
14. Conlan S, Kong HH, Segre JA. Species-level analysis of dna sequence data from the nih human microbiome project. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2012;7(10):e47075.
15. Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med*. BioMed Central Ltd; 2011;4(10):77–7.
16. Albert HB, Sorensen JS, Christensen BS, Manniche C. Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): a double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy. *Eur Spine J*. 2013;22(4):697–707.
17. Albert HB, Lambert P, Rollason J, Sorensen JS, Worthington T, Pedersen MB, et al. Does nuclear tissue infected with bacteria following disc herniations lead to Modic changes in the adjacent vertebrae? *Eur Spine J*. 2013;22(4):690–6.
18. Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio*. 2014;5(3):e01206–14–e01206–14.
19. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1003933–3.
20. Carpaij N, Willems RJJ, Rice TW, Weinstein RA, Hinds J, Witney AA, et al. Genetic variation in spatio-temporal confined USA300 community-associated MRSA isolates: a shift from clonal dispersion to genetic evolution? *PLoS ONE*. 2011;6(2):e16419.
21. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):441–6.
22. Larsen AR, Goering R, Stegger M, Lindsay JA, Gould KA, Hinds J, et al. Two distinct clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with the same USA300 pulsed-field gel electrophoresis profile: a potential pitfall for identification of USA300 community-associated MRSA. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3765–8.
23. van der Kooij-Pol MM, Veenstra-Kyuchukova YK, Duijpmans JC, Pluister GN, Schouls LM, Neelings AJ, et al. High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients with epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*. 2012;21(6):463–6.
24. Stegeman CA, Tervaert J, Sluiter WJ, Manson WL, De Jong PE, Kallenberg C. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener Granulomatosis. *Ann Intern Med*. American College of Physicians; 1994;120(1):12–7.
25. Stegeman CA, Tervaert JWC, de Jong PE, Kallenberg CGM. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. *N Engl J Med*. 1996;335(1):1–5.
26. Barogui YT, Klis S, Bankolé HS, Sopoh GE, Mamo S, Baba-Moussa L, et al. Towards rational use of antibiotics for suspected secondary infections in buruli ulcer patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2010.
27. Yeboah-Manu D, Kpeli GS, Ruf M-T, Asan-Ampah K, Quenin-Fosu K, Owusu-Mireku E, et al. Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2191–1.
28. Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI. Global transport networks and infectious disease spread. *Adv Parasitol*. 2006;62:293–343.
29. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Surveillance report on antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2012. 2013.
30. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE). ECDC Technical Report. 2011.

‘Musik ist höhere Offenbarung als alle Weisheit und Philosophie.’  
*Ludwig von Beethoven (1770-1827)*

# Zusammenfassung und Zukunftsperspektiven





## ZUSAMMENFASSUNG

Bakterien formen eine der größten und vielfältigsten Gruppen aller lebenden Organismen auf der Erde. Obwohl Bakterien im Wesentlichen Einzelzellen und in der Regel nicht mehr als ein paar Mikrometer groß sind, kommen sie in einer Vielzahl von verschiedenen Morphologien und Anordnungen vor und sind durch verschiedene Stämme, Klassen, Ordnungen, Familien, Gattungen und Arten vertreten. Bakterien gehören zu der Gruppe von Prokaryoten, welche Organismen umfassen, die keinen Zellkern besitzen. Das Wort Prokaryot beschreibt dieses bestimmte Merkmal, da es abgeleitet ist von dem Griechischen Wort πρό- (pro-) „vor“ und κάρυόν (karyon) „Mutter oder Kernel“. Das Gegenstück zu den Prokaryoten ist die Domäne der Eukaryoten. Eukaryoten umfassen alle Organismen, deren Zellen einen Zellkern, in dem die DNA eingeschlossen ist, enthalten. Die Eukaryoten, zusammen mit den beiden prokaryotischen Domänen, Bakterien und Archaea, bilden den Baum des Lebens. Bemerkenswert ist, dass die Vielfalt innerhalb der Bakterien Domäne so reichlich ist, dass eine wahre Schätzung der genauen Zahl bisher nicht ermittelt werden konnte. Experten erwarten zumal, dass die Mehrheit der Bakterienarten noch nicht einmal identifiziert worden ist. Darüber hinaus konnten viele Bakterien noch nicht charakterisiert werden, da sie nicht unter den aktuellen State-of-the-Art-Laborbedingungen gezüchtet werden können.

Evolutionsbiologische Untersuchungen ergaben, dass vor etwa 4 Milliarden Jahren Bakterien zu den ersten Lebensformen auf dieser Erde gehörten. Nicht überraschend ist daher, dass im Jahr 2014 Bakterien immer „noch“ präsent in allen Lebensräumen sind, die bisher erkundet wurden. Zwei sehr extreme Lebensräume, in denen Bakterien vor kurzem entdeckt wurden, sind der tiefste Punkt der Erde, der Marianengraben, und vor der Küste der Vereinigten Staaten von Amerika (USA) im Inneren von Felsen ca. 580 Meter unter dem Meeresboden unter 2590 Meter Meerwasser [1,2]. Im Allgemeinen leben Bakterien unter anderem im Boden, Wasser, sauren heißen Quellen oder sogar in radioaktiven Abfällen, vor allem aber wichtig für die vorliegende Dissertation auch in symbiotischen, mutualistischen, kommensalen und/oder parasitären Beziehungen mit Pflanzen und/oder Tieren. Letztere beinhalteten auch den Menschen, der etwa zehnmal so viele bakterielle Zellen wie menschliche Zellen enthält; mit der größten Anzahl von verschiedenen Bakterienspezies im Magen-Darm-Trakt, der Schleimhaut und der Haut.

Da der moderne Mensch (*Homo sapiens sapiens*) sich mit den bereits vorhandenen Bakterien in den letzten rund 200.000 Jahren zusammen entwickelt hat, und da der menschliche Körper eindeutig ein bevorzugter Lebensraum von zahlreichen verschiedenen Bakterienarten ist, ist die menschliche Existenz ohne Bakterien unvorstellbar. Diese Ansicht wird unterstrichen durch die Tatsache, dass die Mikrobiota bei der Verdauung von Nahrung wichtige Nährstoffe wie Butyrat produziert und im Allgemeinen als Barriere gegen intrinsische oder extrinsische Krankheitserreger wirkt. Daher ist das letztendliche Ziel in bakteriologischer Forschung nicht diese Mikroorganismen komplett zu beseitigen, sondern ihre Vielfalt hinsichtlich ihrer Umgebung zu verstehen. Im Hinblick auf die Lebensgemeinschaft von Bakterien und Menschen wird dies uns helfen die vorteilhaften und/oder nachteiligen Assoziationen zwischen diesen beiden komplexen Gebilden zu verstehen, und so geeignete Maßnahmen mit dem Ziel die menschliche Gesundheit vom Moment der Geburt bis ins hohe Alter zu erhalten, zu finden. Bemerkenswerte Fortschritte wurden in den letzten Jahren gemacht, mit neuen und fortschrittlichen Technologien, aber vor allem mit der Neugier vieler Wissenschaftler, die große Vielfalt der Bakterien in und auf dem menschlichen Körper zu beschreiben und zu analysieren. Bakteriengemeinschaften in und auf unserem Körper haben Wissenschaftler und die Öffentlichkeit gleichermaßen fasziniert. Dennoch fühlt sich die Öffentlichkeit oft bedroht, aufgrund eines unzureichenden Verständnisses der Vorteile, die durch Bakterien hervorgerufen/gewährt werden, oder irreführender Öffentlichkeitsarbeit über Krankheitserreger, die die menschliche Gesundheit angeblich bedrohen. Dies wird durch einen Mangel an entsprechenden Erläuterungen und/oder richtiger Kommunikation von Experten verstärkt. Der Grundstein für die zahlreichen Studien über die menschliche Mikrobiota wurde mit der Entdeckung des Darmmikrobioms gelegt. Es wurde geschätzt, dass die etwa 100 Billionen im menschlichen Darm

lebenden Bakterienzellen von ca. 500 verschiedenen Arten stammen (aus 300 – 1000 möglichen Spezies). Allerdings repräsentieren wahrscheinlich etwa 30-40 verschiedene Arten 99% der kompletten mikrobiellen Gemeinschaft im Darm [3-6]. Basierend auf diesen Beobachtungen und zahlreichen Studien, wurde die Darmflora mit vielfältigen Funktionen assoziiert und sowohl mit Gesundheit und Krankheit in Zusammenhang gebracht [5-8]. Allerdings realisierten Forscher relativ schnell, dass der Darm nur eine der vielen mikrobiellen Heimaten in und auf unserem Körper ist. Die Forschung wurde ausgebreitet auf bisher als steril angenommene Stellen innerhalb des menschlichen Körpers, die jedoch „Brutstätten“ der mikrobiellen Diversität sind. Unter ihnen sind Körperstellen, wie die Plazenta oder die Muttermilch während der Schwangerschaft, das Auge, der Nasen-Rachenraum, die Lunge, der Urogenitaltrakt, und natürlich die Haut [9-15]. Während viele Bakterien auf und im menschlichen Körper nützlich sind oder zumindest unschädlich, können einige dieser Bakterien Krankheiten verursachen. Dementsprechend wurden endogene Bakterien nicht nur mit lang bekannten, bakteriellen Infektionen wie Lungenentzündung und Mittelohrentzündung in Verbindung gebracht, sondern auch mit Schmerzen im unteren Rücken, Krebs, Übergewicht und Herzinfarkt [16-19]. Zusammengenommen zeigen alle diese Ergebnisse, dass Menschen in einem sehr sensitiven Gleichgewicht mit ihrer Mikrobiota leben, und dass, unter normalen Umständen, diese Balance von Vorteil ist. Dies gilt sowohl für die Bakterien, als auch für ihren menschlichen Wirt. Da jedoch mehrere Bakterienarten in und auf dem menschlichen Körper einen „Jekyll & Hyde“ Charakter haben, wie für den opportunistischen Krankheitserreger *Staphylococcus aureus* beschrieben, kann dieses empfindliche Zusammenleben von Bakterien und ihrem Wirt gestört werden, was möglicherweise zu Krankheiten führt.

Interessanterweise scheint Charles Darwin, der Pionier der Evolutionsbiologie, Bakterien nicht in seinem Meisterwerk „On the Origin of Species“ im Jahr 1859 oder in einem anderen seiner Veröffentlichungen erwähnt zu haben, obwohl Antoni van Leeuwenhoek bereits über ihre Existenz Mitte des 17. Jahrhunderts berichtet hatte, und zeitgenössische Kollegen von Darwin, wie Louis Pasteur und Robert Koch, die Grundlagen für das Feld der Bakteriologie gelegt haben, wie wir sie heute kennen. Man kann nur annehmen, dass Darwin keine ausreichende Kenntnis von den bahnbrechenden Entdeckungen in diesem Feld hatte, und dass er wahrscheinlich erstaunt gewesen wäre, wenn er gewusst hätte, dass einige der besten Beweise für seine Theorie der natürlichen Selektion in und auf seinem eigenen Körper gefunden werden könnten. Dennoch, im Rahmen der Bakteriologie sollte der Begriff „natürliche Selektion“, wie von Charles Darwin beschrieben, vielleicht in unnatürliche Selektion des 20. und 21. Jahrhundert neu definiert werden, da Antibiotika und andere von Menschen gemachte „Stoffe“ fast jeden Lebensraum auf diesem Planeten erreicht haben. Antibiotika (wie in **Kapitel 1** beschrieben) sind eindeutig ein kritischer Antrieb der bakteriellen Evolution im Menschen. Seit der Entdeckung des Penicillins ist diese Entwicklung am deutlichsten erkennbar durch die Entstehung multiresistenter Bakterien im klinischen und gesellschaftlichen Hintergrund auf der ganzen Welt. Abgesehen von der unnatürlichen Selektion, hat die Entdeckung der verschiedenen menschlichen Mikrobiome neue und aufregende wissenschaftlichen Grenzen überschritten, und es ist mittlerweile weithin bekannt und akzeptiert, dass Bakterien viele Aspekte der menschlichen Biologie entweder direkt oder indirekt beeinflussen. Somit ist die menschliche Spezies, über welche für viele Jahre angenommen wurde, der Höhepunkt der Evolution zu sein, abhängig von der einfachsten und ältesten Form des Lebens. Somit könnte man den Menschen als „große, hoch komplexe mikrobielle Gemeinschaften mit einem originellen Exoskelett“ beschreiben, die auf dem bakteriellen Lebensbaum überlagert wurden [J.M. van Dijk]. Wenn Charles Darwin das jetzt wüsste, würde er sich wahrscheinlich im Grabe herumdrehen.

Der Hauptverdächtige *S. aureus* und seine Komplizen, die *Enterobacteriaceae*, die der Angelpunkt dieser Arbeit sind, sind Bestandteile der komplexen und vielfältigen menschlichen Mikrobiota. Wie in **Kapitel 1** in **Teil I** dieser Dissertation beschrieben, wird *S. aureus* vor allem im Nasen-Rachenraum und auf der Haut gefunden, während *Enterobacteriaceae* meist im Darm gefunden werden. Offenbar sind diese Bakterien Teil des komplexen menschlichen Ökosystems und als solche können sie eine tiefgreifende Wirkung auf einen funktionierenden menschlichen Körper haben. Wichtig ist, wie

in **Kapitel 1** vorgestellt und in dieser Arbeit beschrieben, dass diese Bakterien unter bestimmten Umständen sehr schädlich und gefährlich und Erreger von Infektionskrankheiten sein können oder eine eingeschränkte Immunabwehr ausnutzen können, die aufgrund von nicht verwandten anderen Krankheiten besteht.

Kurz gesagt, war die hier vorgestellte Doktorarbeit „Bacterial fingerprints across Europe“ darauf ausgerichtet, mehr Erkenntnisse in der unendlichen bakteriellen Vielfalt zu bekommen, mit Fokus auf *S. aureus* und carbapenemase-produzierenden *Enterobacteriaceae* (CPEs). Das Erstellen von bakteriellen Fingerabdrücken wurde durch die Kombination der verschiedenen Studienparameter erreicht, vor allem: (i) verschiedene geographische Standorte in Europa, (ii) verschiedene Krankheitsgruppen (Epidermolysis bullosa [EB], Granulomatose mit Polyangiitis [GPA] und Buruli-Ulkus [BU]) und (iii) verschiedene Bakterienlinien (z.B. *S. aureus* ST398, *S. aureus spa*-Typ t437). Eine Schlüsselkomponente aller Studien in dieser Arbeit war die Einbeziehung von Patienten Metadaten und epidemiologischen, molekularen sowie phänotypischen Daten der jeweiligen Isolate. Mit dem Ziel, sowohl die bakteriellen Fingerabdrücke in ganz Europa zu verfolgen, als auch die existierenden Typisierungs-Tools zu evaluieren, mit Fokus auf die genomische Ebene, wurden die in dieser These beschriebenen Arbeiten mit „Liebe, Schweiß, Unschuld, Naivität, Begeisterung, Motivation, Engagement und harter Arbeit“ durchgeführt. Eine Zusammenstellung der wissenschaftlichen Forschungsprojekte mit dem Ziel, einen Teilabschnitt der bestehenden unendlichen Vielfalt der bakteriellen Fingerabdrücke in ganz Europa zu begreifen und zu erkennen, wurde in dieser Arbeit in zehn wissenschaftlichen Kapiteln (Teil II und III) vorgestellt, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden. Abgesehen von einer Thesenzusammenfassung werden mögliche Zukunftsperspektiven unter dem „Deckmantel“ von bakteriellen Fingerabdrücken vorgestellt.

**Kapitel 2** beschäftigt sich mit der schnellen und hochauflösenden Trennung von gesellschaftlich erworbenen (CA) und nosokomialen *S. aureus* Isolaten mit identischen Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) Profilen und *spa*-Typen, und es ist das erste wissenschaftliche Kapitel dieser These mit einer Berichterstattung über den Hauptverdächtigen *S. aureus*. Die untersuchten *S. aureus* Isolate gehörten zum schnell ausbreitenden Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Klon mit dem PFGE Profil USA300, der zuerst in den USA im Jahr 2001 gefunden wurde und innerhalb eines Jahrzehntes in der Gemeinschaft und sich anschließend in Krankenhäusern auf allen Kontinenten verbreitete [20,21]. Interessant ist, obwohl diese Linie für die höchst ausgeprägte CA-MRSA-Epidemie in den USA verantwortlich ist, ist sie noch nicht vorherrschend in der Gemeinschaft in anderen Teilen der Welt. Es gab zwei wichtige Anreize für diese Studie. Erstens ist die molekulare Typisierung von *S. aureus* wichtig, um sich für eine wirksame Überwachung und Kontrollstrategie zu entscheiden, sowie die schnelle Verbreitung, die komplexe Populationsbiologie und den Infektionsstatus von diesem sich schnell entwickelnden Krankheitserreger zu verstehen. Zweitens war eine mögliche Fehlklassifikation dieses gefährlichen *S. aureus* Klons berichtet worden [22]. Wie in **Kapitel 2** beschrieben, hatte die eingesetzte „multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting“ (MLVF) Methode die Trennschärfe, die benötigt wurde, um schnell 91 sehr ähnliche CA- und Krankenhaus-assoziierte (HA)-MRSA Isolate, die aus Dänemark und Deutschland stammten, mit dem gleichen USA300 PFGE Profil und/oder verwandten *spa*-Typen, zu unterscheiden. Basierend auf der sehr hohen Trennschärfe, einfachen Bedienung und niedrigen Kosten, wurde MLVF als ein sehr attraktives Typisierungs-Tool vorgeschlagen, für (i) die Prävention und Erkennung von MRSA-Ausbrüchen, (ii) die Ermittlung der Quellen und Routen der Übertragung, und (iii) die Identifizierung von verwandten *S. aureus* Isolaten für epidemiologische und evolutionäre Studien, vor allem in lokalen Einrichtungen der Gesundheitsversorgung. Die Ergebnisse in diesem Kapitel haben Beweise für die vorteilhafte Nutzung der alternativen Methode DNA-Typisierung MLVF erbracht, die möglicherweise in naher Zukunft den „Goldstandard“ PFGE in lokalen Labors ersetzen könnte.

Die erfolgreiche Anwendung und die gezeigte Trennschärfe der MLVF Methode, die in **Kapitel 2** vorgestellt wurde, wurde im Folgenden mit einer anderen *S. aureus* Sammlung verifiziert. In **Kapitel 3** wurde die Anwendbarkeit der MLVF Methode auf die *S. aureus* ST398 Linie erforscht. ST398 kommt am häufigsten in Gebieten mit hohen Dichten der Tierhaltung vor. Folglich, durch die



hohe Übertragungsrate dieser Linie, nimmt die Häufigkeit von menschlichen Kolonisationen und Infektionen derzeit zu. In der Studie, die in diesem Kapitel vorgestellt wird, wurden 184 *S. aureus* ST398 aus sieben verschiedenen europäischen Ländern isoliert, vor allem aus der Tierhaltung, und durch die komplementären Methoden *spa*-Typisierung und MLVF miteinander verglichen. Die Typisierungsergebnisse haben eine unerwartet hohe genomische Vielfalt dieser Isolate identifiziert, aber auch darauf hingewiesen, dass MLVF in Kombination mit *spa*-Typisierung die „multilocus sequence typing“ (MLST) Methode, die bisher als einziges Kriterium in epidemiologischen Analysen der ST398 Linie genutzt wird, ersetzen kann. Darüber hinaus war MLVF in der Lage, die Verwandtschaft und insgesamt erhöhte genomische Heterogenität dieser *S. aureus* Linie zu enthüllen und erlaubt MLVF die Nachverfolgung von Übertragungslinien. MLVF kann deshalb verwendet werden um mögliche Ausbrüche zu verhindern oder zu kontrollieren.

Im Rahmen der Bewertung der Anwendbarkeit und Trennschärfe der DNA Typisierungsmethoden um viele verschiedene bakterielle Fingerabdrücke zu identifizieren und zu beschreiben, behandelt **Kapitel 4** noch eine weitere *S. aureus* Sammlung, die auf der Basis des einzigen Kriteriums, das alle Isolate den *spa*-Typ t437 besaßen, gegründet wurde. Neben *spa*-Typisierung, waren drei verschiedene DNA-Typisierungsmethoden im Mittelpunkt der Studie, die die Präsenz und genetische Verwandtschaft eines CA *S. aureus* Klons aus Asien in Europa untersuchte. Der Klon von Interesse in diesem Kapitel ist *S. aureus* des MLST klonalen Komplexes (CC) 59, welcher in erster Linie mit dem *spa*-Typ t437 assoziiert ist. Von diesem Klon wurde bisher nur in geringer Zahl in den großen epidemiologischen Studien in Europa berichtet. Dennoch haben die Gesamtzahlen in einigen nordeuropäischen Referenzlaboratorien im vergangenen Jahrzehnt zugenommen. Um festzustellen, ob der *S. aureus* CC59 t437 Klon in anderen europäischen Ländern vorhanden ist, und seine genetische Vielfalt in Europa zu bewerten, wurden 147 *S. aureus* t437 aus 11 europäischen Ländern über einen Zeitraum von 11 Jahren versammelt und mit MLVF, „multiple locus variable number tandem repeat analysis“ (MLVA) und MLST analysiert. Zusätzlich wurden 16 *S. aureus* t437 Isolate von gesunden Trägern und Patienten aus China mit einbezogen. Für die meisten Isolate wurde gezeigt, dass sie monophyletisch waren, da 99% dieser Isolate dem einzelnen MLVA Komplex 621 angehörten, wozu auch fast alle Isolate aus China gehörten. Noch wichtiger ist, dass alle MLST typisierte Isolate zu dem MLST Cluster CC59 gehörten. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die europäische *S. aureus* t437 Population einen genetisch engen Cluster unabhängig vom Jahr und Land der Isolation repräsentiert. Dies untermauert die Ansicht, dass *S. aureus* CC59 in ganz Europa vorhanden ist und nicht auf bestimmte geographische Regionen oder spezielle Wirts-Umgebungen beschränkt ist. Daher haben die europäischen *S. aureus* t437 Isolate die allgemeinen Merkmale eines Hochrisiko-Klons. Da die vier implementierten DNA Typisierungsverfahren in der vorliegenden Studie noch nicht auf einer Routine-Basis täglich in den meisten lokalen Laboratorien und Krankenhäusern durchgeführt werden, ist es wahrscheinlich, dass der CC59 Klon bisher in Europa unterdetektiert ist. Dies ist ein Grund zur Besorgnis im Hinblick auf die Dominanz von *S. aureus* CC59 in Asien und seinen klinischen Auswirkungen. Wenn möglich, sollte die weitere Verbreitung dieses potenziellen Hochrisiko-Klons daher verhindert werden, zum Beispiel durch aktives Screening von Patienten, die eine Reisegeschichte nach Asien haben.

Die Identifizierung des genetisch engen Clusters der *S. aureus* t437 Linie in Europa im vorigen Kapitel und die Entdeckung dieser besonderen Linie in einem Patienten mit wiederkehrenden Ohr-Infektionen, der die Poliklinik unseres Krankenhauses besucht hat, bildete den Anreiz, diese Linie innerhalb eines Patienten über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. **Kapitel 5** berichtet über diese Untersuchung unter Verwendung einer Kombination von genomischen und proteomischen Ansätzen um einen „Zeitraffer-Film“ dieses besonderen Klons zu erstellen. Die ersten sieben MRSA Isolate stammten von dem Patienten und seines ersten weiblichen Partners und wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren isoliert. Die letzten drei Isolate waren nicht verwandte Methicillin-sensible *S. aureus* (MSSA) Stämme, isoliert innerhalb von sechs Monaten, aber zwei Jahre nach der letzten MRSA Isolation. Bemerkenswert ist, dass trotz mehrerer Versuche zur MRSA Eradikation, der Patient über zwei Jahre MRSA-positiv blieb, wahrscheinlich aufgrund der anhaltenden Ohrentzündung.

Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS) zeigte nur eine Gesamtzahl von 59 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), zwischen den sieben MRSA Isolaten, darunter 28 intragenische und 31 intergenische SNPs, und zwischen den drei MSSA Isolaten wurde nur eine Gesamtzahl von 27 SNPs identifiziert, darunter 15 intragenischen und 12 intergenische SNPs. Der kleinere Teil dieser SNPs wurde im Kerngenom gefunden, mit nur zehn SNPs unter den sieben MRSA Isolaten und drei SNPs unter den drei MSSA Isolaten. Interessante SNPs wurden in den *rsbU*, *agrC* und *clfB* Genen identifiziert, die Virulenz und/oder Adhäsion beeinträchtigen könnten, während andere SNPs in intergenischen Regionen die Genexpression beeinflussen könnten und das Gesamt-Proteom-Repertoire ändern könnten. Exoproteom-Analysen zeigten, dass der Großteil der identifizierten extrazellulären Proteine unter allen MRSA Isolaten Virulenzfaktoren sind, wie z.B. Protein A, Sbi, IsdA, IsdB, CHIPS und PVL. Diese Studie hat somit zum ersten Mal die leistungsstarke Kombination von WGS und proteomischen Analysen zur Untersuchung von sequenziellen *S. aureus* Isolaten von einem Patienten über einen längeren Zeitraum unter Beweis gestellt. Wichtig ist, dass der umfassende Vergleich zwischen dem Genom und den identifizierten Proteinen neues Licht auf die Auswirkungen der Genomevolution auf die globale Produktion von Virulenzfaktoren wirft. Insbesondere die Einbeziehung der Antibiotika-Behandlung und die Verfolgung der Reiseziele des Patienten komplettierten den komplexen „Zeitraffer-Film“ dieser retrospektiven Studie.

Die in **Kapitel 5** dargestellten Ergebnisse erweckten Interesse an dem menschlichen Wirt in Bezug auf die Kolonisierung oder Infektion von verschiedenen *S. aureus* Typen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Patientengruppen für die Untersuchung ihrer anti-Staphylokokken Immunantworten im Zusammenhang mit der kolonisierenden *S. aureus* Vielfalt in diesen Patienten ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden vier Kapiteln beschrieben.

**Kapitel 6** berichtet über die erste Patientengruppe, die in dieser Doktorarbeit im Hinblick auf die *S. aureus* Kolonisierung untersucht wurde, nämlich Patienten mit der genetischen Krankheit EB. Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Wunden der EB-Patienten stark mit *S. aureus* besiedelt sind, und dass diese Patienten öfter nasale *S. aureus* Träger sind als gesunde Menschen (56-90% vs 20-30%) [23]. Diese Ergebnisse haben angedeutet, dass die Wunden der EB-Patienten eine attraktive Nische für *S. aureus* repräsentieren. Molekulare Typisierung zeigte, dass nicht ein bestimmter *S. aureus* Typ EB-Patienten besiedelt und was noch interessanter ist, dass einige EB-Patienten bis zu vier verschiedene Typen von *S. aureus* in ihren Wunden während eines Zeitpunkts trugen. Diese Ergebnisse führten zu der in **Kapitel 6** beschriebenen Forschung, der Enthüllung von hohen anti-Staphylokokken Antikörperspiegeln, die auf langfristige Besiedlung mit wechselnden Typen von *S. aureus* in Verbindung stehen könnten. Die große Sammlung von *S. aureus* von 61 EB-Patienten wurde mithilfe von MLVA und *spa*-Typisierung charakterisiert, was große räumliche und zeitliche Schwankungen in den *S. aureus* Typen ergab, die die einzelnen EB-Patienten besiedelten. Genauer gesagt wurden etwa 50% der untersuchten Patienten von wechselnden *S. aureus* Typen über den untersuchten Zeitraum besiedelt. Die gesamte genetische *S. aureus* Vielfalt in der EB-Patientengruppe, die über zwei Jahre verfolgt wurde, war überraschend hoch. Im Hinblick auf die anti-Staphylokokken Immunantwort, enthielten die Seren von EB-Patienten höhere anti-Staphylokokken Immunglobulin G (IgG) Konzentrationen als die von gesunden Menschen, und dies galt insbesondere für IgGs gegen IsdA, SasG, IsaA, SCIN, Nuc, LytM und die *egc* Cluster Staphylokokken-Superantigene (SAGs) SEM, SEN und SEO. Insbesondere wurde entdeckt, dass EB-Patienten mit verschiedenen *S. aureus* Typen signifikant höhere Mengen an anti-Staphylokokken Antikörpern als EB-Patienten mit nur einem *S. aureus* Typ hatten. Diese Beobachtung, in Kombination mit der gesamten genetischen Vielfalt der *S. aureus* Isolate, lässt vermuten, dass das Immunsystem von EB-Patienten stark von Antigenen von *S. aureus* herausgefordert wird. Wahrscheinlich aufgrund des zugrunde liegenden genetischen Defekts oder eines unbekanntes Mechanismus, sind EB-Patienten jedoch nicht in der Lage, die *S. aureus* Kolonisation in ihren Wunden zu beseitigen. Eine wichtige Frage, die noch zu klären bleibt, ist, ob das Vorhandensein von *S. aureus* in den Wunden der Patienten die Wundheilung verschlechtert.

Die Forschung, über die in den beiden vorangegangenen Kapiteln berichtet wurde, führte zu

noch mehr Forschung im Überlappungsbereich zwischen der Mikrobiologie und Immunologie. Insbesondere mögliche Verknüpfungen zwischen Bakterien und Autoimmunerkrankungen haben Aufmerksamkeit erweckt und stehen im Mittelpunkt der beiden folgenden Kapitel. **Kapitel 7** befasst sich mit der Beziehung zwischen *S. aureus* und der Autoimmunerkrankung GPA, welche zu der größeren Gruppe von Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA)-assoziierte Vaskulitiden (AAV) gehört. Zu diesem Zweck wurden GPA-patientenspezifische anti-Staphylokokken IgG Antworten in Bezug auf die langfristige Exposition von *S. aureus* untersucht. Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass GPA-Patienten häufiger nasale *S. aureus* Träger sind als gesunde Menschen, und dass chronische nasale Kolonisation ein Risikofaktor für Krankheitsrückfälle ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass antibakterielle Behandlung mit Cotrimoxazol eine positive Wirkung hat, durch Verringerung des Auftretens von Krankheitsrückfällen bei Patienten mit GPA [24,25]. Wie in **Kapitel 7** beschrieben, wurde eine große retrospektive Kohortenstudie durchgeführt, darunter 85 GPA Patienten, positiv für Proteinase 3 (PR3)-ANCA und 18 gesunde Kontrollpersonen (HC). Immunantworten gegen *S. aureus* wurden durch Bestimmung von Serum IgG-Werten gegen 59 *S. aureus* Antigene untersucht, und 210 *S. aureus* Isolate aus den GPA-Patienten wurden durch MLVF und *spa*-Typisierung charakterisiert. GPA-Patienten besaßen IgGs gegen viele Staphylokokken-Antigene auf einem konstanten Level zu allen Zeitpunkten, unabhängig von ihrem Krankheitszustand und ihrer Behandlung. Interessanterweise enthielten Patientenserum niedrigere anti-Staphylokokken IgG-Werte als Seren von HC, während die gesamten IgG-Spiegel ähnlich oder höher waren. Dies hat statistische Signifikanz erreicht für mehrere Oberflächenproteine (ClfA, ClfB, FnbpA und SdrE) und sekretierte Proteine (Atl-2, CHIPS, Efb, Lipase, NUC, SCIN, SEN, SEO, SSL3 und TSST-1). Am wichtigsten ist, dass die Isolate von Patienten und HC ein weitgehend vergleichbares Gen-Repertoire hatten. Daher können die verminderten IgG-Antworten gegen bestimmte Proteine (z.B. ClfA ClfB, FnbpA) in GPA Patienten nicht auf eine niedrigere Häufigkeit der entsprechenden Gene in den jeweilige *S. aureus* Isolaten zurückzuführen sein. MLVF und *spa*-Typisierung ergaben, dass die *S. aureus* Population von Patienten mit GPA vielfältig ist, und dass sie die allgemeine *S. aureus* Population widerspiegelt. Die Ergebnisse in diesem Kapitel implizieren, dass diese Patienten eingeschränkter fähig sind, eine *S. aureus*-spezifische Antikörperreaktion zu bilden als gesunde Personen, und dass sie nicht ausreichend gegen dieses opportunistische Pathogen geschützt sind. Die gemessene anti-Staphylokokken Immunantwort der GPA Patienten, wie in **Kapitel 7** dokumentiert, steht in deutlichem Gegensatz zu den berichteten hohen anti-Staphylokokken-Immunantworten der EB-Patienten in **Kapitel 6**. Letztere Untersuchung ergab ein stark herausgefordertes Immunsystem mit Antigenen von *S. aureus*, was mit einer langfristigen Besiedlung mit wechselnden *S. aureus* Typen in Zusammenhang stand. Obwohl GPA-Patienten auch chronische nasale *S. aureus* Träger sind, war ihre anti-Staphylokokken Immunantwort sehr viel niedriger im Vergleich zu gesunden Personen. Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedlichen Grunderkrankungen zurückzuführen sein, und es unterstützt die Idee, dass das Immunsystem der GPA-Patienten nicht effektiv *S. aureus* kontrollieren oder beseitigen kann.

Mit der vorangehenden Entdeckung der genetischen Vielfalt von *S. aureus* Isolaten von PR3-ANCA Patienten mit GPA, die die allgemeine *S. aureus* Population widerspiegelt, wird eine Fortsetzung und der weitere Ausbau des Projekts in **Kapitel 8** beschrieben. *S. aureus* aus PR3-ANCA-positiven Patienten wurde bei verschiedenen Gelegenheiten untersucht, während Informationen über *S. aureus* Kolonisierung in Patienten positiv für Myeloperoxidase (MPO)-ANCA mit irgendeiner Art von AAV noch nicht vorhanden sind. Daher ist die Zielsetzung der Studie in **Kapitel 8**, die molekularen Fingerabdrücke von *S. aureus* Isolaten aus Nasen beider Patientengruppen mit Wohnsitz in den Niederlanden festzustellen und zu vergleichen. Neben der Anwendung der bisher verwendeten und sehr trennfähigen DNA Typisierungsmethoden MLVF und *spa*-Typisierung, wurde ein DNA-Microarray mit 336 *S. aureus*-spezifischen DNA-Proben eingesetzt, um das Gen-Repertoire von 88 nasalen *S. aureus* Isolaten von diesen Patienten zu definieren. Insgesamt zeigten die vorliegenden Daten zum ersten Mal die genomische Diversität der AAV-assoziierten *S. aureus* Isolate. Zusätzlich wurde eine begrenzte Anzahl von Loci identifiziert, die möglicherweise häufiger in *S. aureus* Isolaten

einer der zwei bestimmten Krankheitsgruppen auftreten. Insbesondere wurden verschiedene Distributionen in dem SAG- und Virulenz-Gen-Repertoire entdeckt, darunter die Gene *lukXY*, *isaB*, *mpfF*, *Q2YUB3*, *set4/set7*, *cap1*, *cap-5*, *cap-8*, *cna* und *sasG*. Im Ergebnis hat die Definition des Virulenz-Gen-Repertoires der *S. aureus* Population von Patienten mit PR3- und MPO-AAV den Weg für weitere Studien zu den molekularen Eigenschaften, die die möglichen Rollen von *S. aureus* in diesen Krankheiten definieren, gepflastert.

Im folgenden Kapitel werden Untersuchungen von *S. aureus* Kolonisierung in Patienten mit der nekrotisierender Hauterkrankung BU vorgestellt, die durch das Bakterium *Mycobacterium ulcerans* verursacht wird. BU tritt vor allem in Westafrika auf, wobei Benin, Côte d'Ivoire und Ghana die höchste Krankheitslast aufweisen. Die Krankheit beginnt in der Regel als schmerzlose Knötchen, Plaque, Ödeme oder Papel und schreitet fort zu großen Geschwüren, wenn sie unbehandelt bleibt. Die Pathologie von BU ist stark mit der Produktion von Mykolakton, ein immunmodulatorisches Makrolid-Toxin, das Gewebe-Nekrose verursacht, in Zusammenhang gebracht. Die Anwesenheit von Mykolakton in den Wunden der BU-Patienten wurde für eine lange Zeit angenommen, Kolonisierung durch andere Mikroorganismen zu verhindern. Neuere Studien zeigten jedoch eine vielfältige mikrobielle Gemeinschaft in diesen Wunden auf, was darauf hindeutet, dass das nekrotische Gewebe in diesen Wunden eine reiche Quelle von Nährstoffen auch für andere Mikroorganismen darstellt [26,27]. Diese Beobachtungen führten zu der Studie in **Kapitel 9**. Dieses Kapitel berichtet über die genetische Vielfalt einer großen *S. aureus* Sammlung von 19 BU-Patienten vom süd-östlichen Teil von Ghana. Dreißig BU-Patienten wurden auf *S. aureus* Kolonisation während des 8-monatigen Studienzeitraums untersucht, was zeigte, dass 63,3% der Patienten *S. aureus* zumindest zu dem Zeitpunkt der Probenahme getragen haben. Zur Bestimmung der genetischen Vielfalt der *S. aureus* Isolate aus der Nase und Wunden der Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten, wurden die beiden komplementären DNA-Typisierungsmethoden MLVF und *spa*-Typisierung wieder genutzt. Darüber hinaus wurden die Antibiotikaresistenz-Profile der gesammelten *S. aureus* Isolate bestimmt und die Wunden-Topographie von *S. aureus* wurde untersucht. Im Vergleich zu den *S. aureus* Proben von EB- oder GPA-Patienten, zeigten die 91 *S. aureus* Isolate von den 19 BU-Patienten einen sehr homogenen Genotyp, wie durch MLVF gezeigt wurde. Die Ergebnisse der *spa*-Typisierung bestätigten diese Homogenität mit der Identifizierung von nur 13 verschiedenen *spa*-Typen. Ferner trugen verschiedene BU-Patienten verschiedene Typen von *S. aureus* zu einem Zeitpunkt und hielten die gleichen Typen oder geänderte *S. aureus* Typen über die Zeit. Insgesamt hat diese Studie zum ersten Mal die genetische Diversität von *S. aureus* Kolonisierung der Wunden und Nasen von BU-Patienten identifiziert. Die Genotypisierungsergebnisse legten mögliche Patientenübertragungsereignisse nahe, die weiter untersucht werden müssen. Darüber hinaus müssen Wundversorgung und Hygiene sowie die Betreuer und Familienmitglieder untersucht werden, um mögliche Quellen von *S. aureus* Übertragungen zu bestimmen.

Für die Verfolgung von bakteriellen Fingerabdrücken in Europa, wurden molekulare und epidemiologische Studien durchgeführt und auch in dieser Arbeit dokumentiert. Diese Studien haben sich nicht auf eine/n bestimmten *S. aureus* Typ/Linie konzentriert, sondern wurden auf die Aufnahme des gesamten epidemiologischen und molekularen Bild von *S. aureus* ausgerichtet, und zwar sowohl MSSA und MRSA aus Blutinfektionen in Europa. Basierend auf der ersten strukturierten Umfrage, die in 26 europäischen Ländern durchgeführt wurde in 2006/2007, und die die geografische Verteilung von *S. aureus* Isolaten beschreibt, die invasive Infektionen der Blutbahn verursacht hatten, berichtet **Kapitel 10** über die Follow-up-Befragung im Jahr 2011 und über den Vergleich der beiden Umfragen. Für die zweite strukturierte Befragung haben 350 Labors von über 453 Krankenhäusern in 25 Ländern 3,753 Isolate (MSSA und MRSA) gesammelt und analysiert. Eine breite geografische Verteilung der *spa*-Typen wurde festgestellt, wobei einige Typen weit verbreitet in allen europäischen Ländern waren. MRSA Klone hatten eine überwiegend regionale Verteilung in Europa, die auf eine Auswahl und Verbreitung von ein paar erfolgreichen Klonen hinweist. MSSA dahingegen wurde gezeigt vielfältiger als MRSA zu sein, mit deutlichen Unterschieden zwischen verschiedenen Ländern, wobei einige internationale Klone expandierten oder zurückgingen, im

Vergleich zu der Umfrage in 2006/2007. Diese Studie lieferte Hinweise darauf, dass dieser groß angelegte Ansatz der molekularen Typisierung kombiniert mit epidemiologischen Daten und der anschließenden Visualisierung der erfassten Daten mit Hilfe eines interaktiven Mapping-Tools wichtige Informationen über die Dynamik von MSSA- und MRSA-Populationen über Grenzen hinweg liefern kann. Für zukünftige Studien wird es deshalb vorteilhaft sein eine konsequente Integration von molekularen Typisierungs-Daten mit epidemiologischen und klinischen Informationen, über Überwachungsinitiativen in ganz Europa gesammelt, zu kombinieren und um Informationen über frühe Signalisierung von neuen Stämmen, ihre grenzüberschreitende Verbreitung und die Einfuhr durch Reisende zu erhalten.

Das letzte Forschungskapitel war auf eine andere Bakteriengruppe und ihre aktuelle Epidemiologie in Europa ausgerichtet, die „Komplizen“ in der vorliegenden Doktorarbeit. CPEs wurden vor kurzem als eine der gefährlichsten mikrobiellen Bedrohungen für die öffentliche Gesundheit weltweit anerkannt. Die in **Kapitel 11** dargestellten Daten sind die ersten Ergebnisse einer neuen europäischen Initiative mit dem Namen „European Survey on CPE“ (EuSCAPE), die auf die Bereitstellung einer „Roadmap“ für den Aufbau eines Netzes für CPE-Erkennung in Europa ausgerichtet ist, um eine frühzeitige Diagnose, aktive Überwachung, und Leitlinien für Maßnahmen zur Infektionskontrolle bereit zu stellen. Die erste Aktivität des in diesem Kapitel beschriebenen Projektes war eine Fragebogenerhebung, um diagnostische Problemstellen und Reaktionslücken auf der lokalen und nationalen Ebene zu identifizieren. Nationale Experten aus 39 europäischen Ländern lieferten wertvolle Einblicke in die aktuelle Epidemiologie der CPEs in ihrem Land. Zuvor wurde anerkannt, dass der Schlüssel zum Erfolg bei der Verhinderung der Etablierung von CPEs zum einen Früherkennung durch gute diagnostische Verfahren und zweitens Eindämmung der Ausbreitung durch Patienten und Kontakt Screening sowie Maßnahmen zur Infektionskontrolle sind. Eine wachsende Zahl von Ländern hat reagiert und Maßnahmen umgesetzt, wie die zunehmende Verfügbarkeit von einer Empfehlung oder Leitlinie über Maßnahmen zur Infektionskontrolle, um die Ausbreitung von CPEs zu verhindern oder einzudämmen. In immer noch 18 der untersuchten Länder fehlten solche Leitlinien und in der gleichen Anzahl von Ländern fehlten relevante Hinweise für die Einreichung der Isolate zu nationalen Referenzlaboratorien. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstreichen die dringende Notwendigkeit einer Modernisierung der Laborstandards, um eine aktive Überwachung und vorbeugende Maßnahmen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck will das EuSCAPE Projekt, ein Labor-basiertes Netzwerk für CPE Erkennung in Europa aufbauen.

## ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN

Bakterielle Fingerabdrücke auf lokaler, nationaler und internationaler Ebene zu verfolgen, ist der Schlüssel, um sowohl das derzeitige Gleichgewicht zwischen Bakterien und Menschen aufrecht zu erhalten, und noch wichtiger, die menschliche Gesundheit zu erhalten und zu schützen. Da Menschen offenbar nicht ohne eine gewisse Auswahl von Bakterien existieren können, sollten die Grundregeln für ein friedliches und gesundes Zusammenleben definiert werden. Zwei Parameter werden offenbar der Schlüssel dazu sein: Antibiotika und Hygiene. Erstens, obwohl Antibiotika viele Leben im vergangenen Jahrhundert gerettet haben und wahrscheinlich noch viele mehr in der nahen Zukunft retten werden, ist eine bessere Überwachung der Herstellung, Verschreibung und Verwendung dringend erforderlich. Antibiotische Verwaltungsprogramme und Infektionsprävention und Kontrollabteilungen in Krankenhäusern sind die ersten Voraussetzungen um Antibiotika-Verbrauch zu reduzieren. Entscheidend ist dass Transparenz und gute Kommunikation zwischen medizinischen Experten, Wissenschaftlern, Ärzten und der Bevölkerung erforderlich ist um die Gesamtsituation der öffentlichen Gesundheit zu verbessern und das Bewusstsein für diese heikle Situation zu erhöhen. Ein sehr offensichtliches Beispiel ist, dass die Mehrheit der Bevölkerung immer noch glaubt, dass Antibiotika gegen eine Erkältung helfen, was natürlich nicht richtig ist, da die normale Erkältung durch ein Virus verursacht wird und Antibiotika keine Wirkung auf Viren haben. Zweitens, die



Hygiene, insbesondere Händehygiene, sollte strikt umgesetzt und verbessert werden, vor allem im Gesundheitswesen und in geografischen Gebieten mit hoher Prävalenz von Infektionskrankheiten. Da das 21. Jahrhundert durch Reisen über die Grenzen hinweg und innerhalb der ganzen Welt geprägt wird, wird Hygiene wahrscheinlich eine wichtigere Rolle spielen als viele Experten und die Bevölkerung glauben. Import und Export von Waren, sowohl lebende, als auch nicht lebende, hat sich in den vergangenen Jahrzehnten nicht nur in Europa, sondern auch in der ganzen Welt erhöht, was die perfekte „Tramp“ Möglichkeit für Bakterien darstellt [28]. Insgesamt haben all diese Entwicklungen deutlich zur derzeitigen Vielfalt von Bakterien, ihrer globalen Verbreitung, Übertragung, Ausbrüchen und einer wachsenden Zahl von Infektionskrankheiten weltweit beigetragen.

Zu dem Zeitpunkt, als die in dieser Arbeit beschriebene Forschung begann, wurde MRSA in der Regel als eine der gefährlichsten „bakteriellen Kriminellen“ auf der ganzen Welt bezeichnet. Mit der hervorragenden Leistung des EARS-Net in den letzten zehn Jahren und zahlreichen anderen Studien, wurde ein sehr umfassendes Bild von MSSA und MRSA in vielen Ländern in ganz Europa, aber auch für andere Teile der Welt, erstellt. Doch obwohl das EARS-Net den Auftrag hat, die antimikrobielle Resistenz von mehreren die öffentliche Gesundheit bedrohenden Pathogenen zu beobachten, behandelt es nur Infektionen der Blutbahn und ist daher sicherlich im Ergebnis beschränkt. Da keine andere systematische Überwachung oder Umfrage vorhanden ist um Verbreitung und Vorkommen von Antibiotika-empfindlichen oder resistenten *S. aureus* Linien zu bestimmen, hängen unsere derzeitigen Kenntnisse ausschließlich von veröffentlichten Studien von verschiedenen Arbeitsgruppen, sowie nationalen und internationalen Forschungskonsortien ab. Zudem sind Informationen über zahlreiche Länder auf der ganzen Welt sehr knapp, wenn es um Antibiotika-Resistenz und die genetische Vielfalt von *S. aureus* geht. Die Situation in Europa ist sehr gut beschrieben, nicht nur aufgrund der EARS-Net Leistung. In den vergangenen Jahrzehnten haben mehrere Länder in Europa das gefährliche Potenzial von MRSA im Krankenhaus und in Gesundheitseinrichtungen erkannt, und waren in der Lage, das Problem zu verringern oder einzugrenzen, wie zum Beispiel Schweden, Norwegen, das Vereinigte Königreich (UK) und die Niederlande. Letztere implementierte eine landesweite „Search & Destroy“ Politik bereits in den 1980er Jahren in Krankenhäusern, was zu extrem niedrigen MRSA-Zahlen seitdem führte. Andere Länder wie Deutschland und Großbritannien konnten die Verschärfung der MRSA-Probleme eindeutig nicht verhindern und stehen vor einer großen Zunahme der MRSA-positiven Krankenhaus-assoziierten Infektionen. Bemerkenswert ist, dass durch staatliche Vorschriften in Großbritannien die Zahl der MRSA-Bakteriämien von 43,6% im Jahr 2005 auf 13,6% in 2011 und 2012 zurückgegangen ist ([http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/)). In Deutschland, auf der anderen Seite, ist MRSA immer noch ein großes Problem in Krankenhäusern, das die Gesundheit der Patienten bedroht. Im Jahr 2005 waren 21,4% der enthaltenen Isolate resistent gegen Methicillin und obwohl im Jahr 2012 diese Zahl auf 15,4% verringert werden konnte, ist es immer noch ein großes Problem im deutschen Gesundheitssystem. Fachleute glauben, dass dies nicht nur durch die großen Mengen von Antibiotika, die in den letzten Jahrzehnten verschrieben wurden, verursacht wird, sondern auch durch eine mangelhafte Hygiene, die die MRSA-Übertragung ermöglichte. Im Hinblick auf die Verbesserung der Hygiene, gab es in einem deutschen Krankenhaus vor kurzem eine verbindliche Anweisung, die das Händeschütteln zwischen zwei Personen in diesem Krankenhaus verbietet. Insgesamt besagt der Bericht des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) Ende 2013, welcher die antimikrobielle Resistenz-Überwachungsdaten für Europa ab 2012 beschreibt, dass die bevölkerungsgemittelte Zahl von MRSA deutlich in den letzten vier Jahren zurückgegangen ist. Allerdings bleibt MRSA eine Bedrohung der öffentlichen Gesundheit, da der Anteil noch über 25% in sieben der 30 Teilnehmerländer ist [29]. Dennoch wird die Gruppe der Gram-negativen Bakterien die Resistenz gegen das „last-resort“ Antibiotikum Carbapenem besitzen, als eine viel gefährlichere Bedrohung als MRSA angesehen. In Bezug auf diese hat die ECDC einen Bericht im Jahr 2011 veröffentlicht, der eine Risikobewertung der Ausbreitung von CPEs durch Patiententransfer zwischen Gesundheitseinrichtungen anstrebte, mit besonderem Schwerpunkt auf grenzüberschreitende Übertragung [30]. Außerdem haben viele andere Experten im Bereich der CPEs ihre Besorgnis über diese neuen Superkeime auf dem europäischen

Horizont ausgedrückt. Dementsprechend hat das EuSCAPE Projekt, das in **Kapitel 11** dieser Arbeit vorgestellt wurde, die Aufgabe, diese Bedrohung zu bekämpfen.

Im Hinblick auf bakterielle Fingerabdrücke, die für verschiedene Zwecke in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ist festzustellen, dass es offensichtlich keinen endgültigen Ansatz zur Beschreibung und Erfassung der verschiedenen bakteriellen Fingerabdrücke gibt. Die Wahl der Vorgehensweise ist abhängig von dem Ziel der jeweiligen Untersuchung. Als Beispiel wurde gezeigt, dass die MLVF Typisierungsmethode, die umfassend für die in dieser Arbeit beschriebene Forschung genutzt wurde, sehr trennfähig ist und die Identifizierung von Ausbrüchen und Übertragungswegen auf der lokalen Ebene ermöglicht. Sie ist jedoch nicht geeignet für Vergleiche über Grenzen hinweg und kann auch nicht übertragbare Daten produzieren. Auf der anderen Seite ist die in dieser Arbeit beschriebene *spa*-Typisierung, die am zweithäufigsten verwendete DNA Typisierungsmethode, ein beliebtes Werkzeug, das über die Grenzen hinweg verwendet wird, da es übertragbare Daten produziert. Es scheint so, dass es keine „eine Lösung, die für alles passt“ gibt, sondern verschiedene Optionen und Kombinationen mit Bedacht angewendet werden sollten. Darüber hinaus produzieren diese beiden Typisierungsmethoden nur sehr grobe Fingerabdrücke der untersuchten Isolate, um ihre sehr komplexen Fingerabdrücke zu vereinfachen. Doch da Wissenschaftler auch nur Menschen sind, und Menschen es mögen, Dinge in Kisten zu legen und diese zu beschriften, haben Typisierungsansätze breite Wertschätzung und Akzeptanz auf dem Gebiet der Mikrobiologie gefunden. Wie bereits in **Kapitel 1** und im Pilot Ansatz in **Kapitel 8** vorgestellt, liegt die Zukunft in bakteriellen Typisierungen in der neuen Revolution des WGS. Dieses „Typisierungswerkzeug“ hat nicht nur die ultimative Möglichkeit die volle genomische Komplexität aufzudecken, sondern auch, diese komplexen Daten in einen einfachen Fingerabdruck zu verwandeln und sogar die entsprechenden Informationen für MLVF, *spa*-Typisierung und/oder MLST zu extrahieren. Schließlich muss betont werden, dass die vorgestellte Arbeit mit DNA-Typisierungen in dieser These lediglich einen Einblick in die Welt der bakteriellen Fingerabdrücke bietet, mit einem Fokus auf zwei besondere „Verbrecher“, während die „Welt der mikrobiellen Kriminalität“, die die menschliche Gesundheit bedroht unendlich größer auf einer globalen Skala ist.

Ein Weg, um nicht die Kontrolle im Chaos der bakteriellen Vielfalt zu verlieren, ist die Umsetzung von Überwachungssystemen in Verbindung mit einer besseren Diagnostik und verbesserter Kommunikation zwischen den Disziplinen und Grenzen. Die beiden Beispiele in dieser Arbeit, das SRL-Netzwerk und das EuSCAPE Projekt, zeigen, wie wichtig die Zusammenarbeit und die Bildung von Netzwerken auf internationaler Ebene sind. Diese beiden Initiativen, um sowohl MSSA/MRSA und CPEs in der nahen Zukunft zu kontrollieren, und damit das Potenzial der Bedrohung der öffentlichen Gesundheit zu senken, sind perfekte Beispiele für Zusammenarbeit ohne Grenzen. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit genannten Beispiele, ist das EurSafety-Health-Net (vormals MRSA-Net) ein weiteres Projekt, das Infektionsprävention über Grenzen hinweg implementiert, in diesem Fall über die Grenzen zwischen Deutschland und den Niederlanden. Der Zweck dieses Projekts und eigentlich der Zweck eines jeden Netzwerkansatz ist es, die Grenzen zwischen Ländern, Staaten, Bezirken, Institutionen und Sektoren und vor allem zwischen den verschiedenen Berufsgruppen zu überqueren.

Ein weiteres gutes Beispiel für mehr grenzüberschreitende Arbeit ist auch die Erweiterung von interdisziplinärer Forschung, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde; auf der einen Seite, Mikrobiologen und Immunologen an einen Tisch zu bringen, und auf der anderen Seite, durch die Kombination von früher weit voneinander getrennten Forschungsfeldern wie Mikrobiologie und (Bio)Informatik. Diese Bemühungen unsichtbare Grenzen zu überschreiten sind für den Erfolg von Forschungsprojekten sehr wichtig, wie in dieser Arbeit angeführt und sie werden in Zukunft noch viel wichtiger für die Forschung sein. Ich glaube daher, dass das Sprichwort „einer für alle, und alle für einen“ besonders für Forschung und Forscher gilt und dass nur gemeinsam große Fortschritte erzielt werden können. Nur eine Teamleistung in einem interaktiven Netzwerk auf allen Ebenen der Forschung wird Grenzen durchbrechen und neue wissenschaftliche Grenzen eröffnen, um den weltweiten Kampf gegen die „bakteriellen Verbrecher“ zu gewinnen.

## REFERENCES

1. Glud RN, Wenzhöfer F, Middelboe M, Oguri K, Turnewitsch R, Canfield DE, et al. High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth. *Nature Geoscience*. 2013;6:284–8.
2. Lever MA, Rouxel O, Alt JC, Shimizu N, Ono S, Coggon RM, et al. Evidence for microbial carbon and sulfur cycling in deeply buried ridge flank basalt. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2013;339(6125):1305–8.
3. Steinhoff U. Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunol Lett*. 2005;99(1):12–6.
4. Sears CL. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe*. 2004;11(5):247–51.
5. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2002;361(9356):512–9.
6. Quigley EMM. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2013;9(9):560–9.
7. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):59–65.
8. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559–63.
9. Jones ML, Ganopoulos JG, Martoni CJ, Labbé A, Prakash S. Emerging science of the human microbiome. *Gut Microbes*. 2014;5(4).
10. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science; 2014;6(237):237ra65–5.
11. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Experimental Eye Research*. Elsevier Ltd; 2013;117:99–105.
12. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med*. Elsevier; 2014;2(3):238–46.
13. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. Nature Publishing Group; 2014;498(7454):367–70.
14. Conlan S, Kong HH, Segre JA. Species-level analysis of dna sequence data from the nih human microbiome project. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2012;7(10):e47075.
15. Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med*. BioMed Central Ltd; 2011;4(10):77–7.
16. Albert HB, Sorensen JS, Christensen BS, Manniche C. Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): a double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy. *Eur Spine J*. 2013;22(4):697–707.
17. Albert HB, Lambert P, Rollason J, Sorensen JS, Worthington T, Pedersen MB, et al. Does nuclear tissue infected with bacteria following disc herniations lead to Modic changes in the adjacent vertebrae? *Eur Spine J*. 2013;22(4):690–6.
18. Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio*. 2014;5(3):e01206–14–e01206–14.
19. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1003933–3.
20. Carpaij N, Willems RJJ, Rice TW, Weinstein RA, Hinds J, Witney AA, et al. Genetic variation in spatio-temporal confined USA300 community-associated MRSA isolates: a shift from clonal dispersion to genetic evolution? *PLoS ONE*. 2011;6(2):e16419.
21. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(3):441–6.
22. Larsen AR, Goering R, Stegger M, Lindsay JA, Gould KA, Hinds J, et al. Two distinct clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with the same USA300 pulsed-field gel electrophoresis profile: a potential pitfall for identification of USA300 community-associated MRSA. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3765–8.
23. van der Kooi-Pol MM, Veenstra-Kyuchukova YK, Duipmans JC, Pluister GN, Schouls LM, Neeling AJ, et al. High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients with epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*. 2012;21(6):463–6.
24. Stegeman CA, Tervaert J, Sluiter WJ, Manson WL, De Jong PE, Kallenberg C. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener Granulomatosis. *Ann Intern Med*. American College of Physicians; 1994;120(1):12–7.
25. Stegeman CA, Tervaert JWC, de Jong PE, Kallenberg CGM. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. *N Engl J Med*. 1996;335(1):1–5.
26. Barogui YT, Klis S, Bankolé HS, Sopoh GE, Mamo S, Baba-Moussa L, et al. Towards rational use of antibiotics for suspected secondary infections in buruli ulcer patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2010.
27. Yeboah-Manu D, Kpeli GS, Ruf M-T, Asan-Ampah K, Quenin-Fosu K, Owusu-Mireku E, et al. Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2013;7(5):e2191.
28. Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI. Global transport networks and infectious disease spread. *Adv Parasitol*. 2006;62:293–343.
29. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Surveillance report on antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2012. 2013.
30. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE). ECDC Technical Report. 2011.



'In every job that must be done, there is an element of fun.'

*Mary Poppins*



# List of publications



## LIST OF PUBLICATIONS

Ama Amissah N, Glasner C, Ablordey A, Tetteh CS, Kotey N, Prah I, van der Werf TS, Rossen JW, van Dijn JM, Stienstra Y. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* in buruli ulcer. Submitted.

Glasner C, van Timmeren MM, Stobernack T, Omansen TF, Raangs EC, Rossen JW, de Goffau MC, Arends JP, Kampinga GA, Koedijk DGAM, Neef J, Buist G, Tavakol M, van Wamel WJB, Rutgers A, Stegeman CA, Kallenberg CGM, Heeringa P and van Dijn JM. Low anti-staphylococcal IgG responses in granulomatosis with polyangiitis patients despite long-term *Staphylococcus aureus* exposure. Submitted.

Glasner C, Pluister G, Westh HT, Arends JP, Empel J, Giles E, Laurent F, Layer F, Marstein L, Matussek A, Mellmann A, Pérez-Vásquez M, Ungvári E, Yan X, Žemličková H, Grundmann H and van Dijn JM. *Staphylococcus aureus spa*-type t437: introduction of a community-associated clone from Asia into Europe. Accepted for publication in *Clinical Microbiology and Infection*.

Grundmann H, Schouls L, Aanensen DM, Pluister G, Tami A, Chlebowicz M, Glasner C, Sabat A, Weist K, Heuer O, Friedrich AW, and the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: Results of a second structured survey. Accepted for publication in *Eurosurveillance*.

Brisse S, Brehony C, Conceição T, Cubero M, Glasner C, Le Gouil M, Renvoisé A, Sheppard S, Weinert LA. Microbial molecular markers and epidemiological surveillance in the era of high throughput sequencing: an update from the IMMEM-10 conference. *Res Microbiol*. 2014;165(2):140-53.

Glasner C, Grundmann H, Magiorakos A.-P., Högberg-Diaz L., Monnet D. L. and Albiger B. ECDC technical report on carbapenemase-producing bacteria in Europe. Interim results from the European survey on carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) project 2013. doi 10.2900/91714. 2013.

Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrašević A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H, the European Survey on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013 Jul 11;18(28). pii: 20525.

Glasner C, Sabat AJ, Chlebowicz AM, Vanderhaeghen W, Fetsch A, Guerra B, Huber H, Stephan R, Torres C, Butaye P, Voss A, Wulff M, van Dijn JM. High-resolution typing by MLVF unveils extensive heterogeneity of European livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with the sequence type 398. *Int J Med Microbiol*. 2013 Apr;303(3):124-7.

Glasner C, Sabat AJ, Dreisbach A, Larsen AR, Friedrich AW, Skove RL, van Dijn JM. Rapid and high-resolution distinction of community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates with identical pulsed-field gel electrophoresis patterns and *spa*-types. *Int J Med Microbiol*. 2013 Mar;303(2):70-5.


Goosens VJ, Otto A, Glasner C, Monteferrante CG, van der Ploeg R, Hecker M, Becher D, van Dijk JM. J. Novel twin-arginine translocation pathway-dependent phenotypes of *Bacillus subtilis* unveiled by quantitative proteomics. *J Proteome Res.* 2013 Feb 1;12(2):796-807.

van der Kooi-Pol MM, de Vogel CP, Westerhout-Pluister GN, Veenstra-Kyuchukova YK, Duipmans JC, Glasner C, Buist G, Elsinga GS, Westra H, Bonarius HP, Groen H, van Wamel WJ, Grundmann H, Jonkman MF, van Dijk JM. High Anti-Staphylococcal Antibody Titers in Patients with Epidermolysis Bullosa Relate to Long-Term Colonization with Alternating Types of *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol.* 2013 Mar;133(3):847-50.

Monteferrante CG, Miethke M, van der Ploeg R, Glasner C, van Dijk JM. Specific targeting of the metallophosphoesterase YkuE to the bacillus cell wall requires the twin-arginine translocation system. *J Biol Chem.* 2012 Aug 24;287(35):29789-800.



‘Sleep is the best meditation.’  
*Dalai Lama*



# Biography





## BIOGRAPHY

Corinna Glasner was born on the 16<sup>th</sup> of March 1985 in Dinslaken, Germany. After graduating from high school at the Kopernikus Gymnasium in Duisburg-Walsum in 2004, she spent one year in Oak Park (USA) as an Au-Pair taking care of two young children. From 2005 until 2008 she studied Biological Sciences at the Wilhelms University in Münster, Germany, for which she graduated *cum laude*. During the last year of her studies for the bachelor's degree her research interests were directed towards biotechnology and microbiology. Subsequently, she wrote her bachelor's thesis addressing the experimental evolution of bacteria.

After receiving her bachelor's degree, she was accepted to study in the topmasters programme of Medical and Pharmaceutical Drug Innovation at the University of Groningen, the Netherlands. During her first internship, under the supervision of Prof. J. M. van Dijl, she developed a toolbox to gain more insight in the twin-arginine translocation (Tat) pathway in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. She spent her second internship at the Morimoto Lab at the Northwestern University in Evanston (USA) studying the heat shock factor 1 in the model organism *Caenorhabditis elegans*, under the supervision of Prof. R. Morimoto. In September 2010 she received her Master's degree with *cum laude*.

During the final part of the studies for her master's degree, she wrote a proposal for her own PhD research project together with Prof. J. M. van Dijl for which she received a fellowship from the Graduate School of Medical Sciences at the University of Groningen. In September 2010, she started her PhD research on *Staphylococcus aureus* in the Department of Medical Microbiology at the University Medical Center Groningen in Groningen, the Netherlands, which resulted in this thesis.

'You must be the change, you wish to see in the world.'  
*Mahatma Gandhi*



## Acknowledgements – Dankwoord – Dankwort



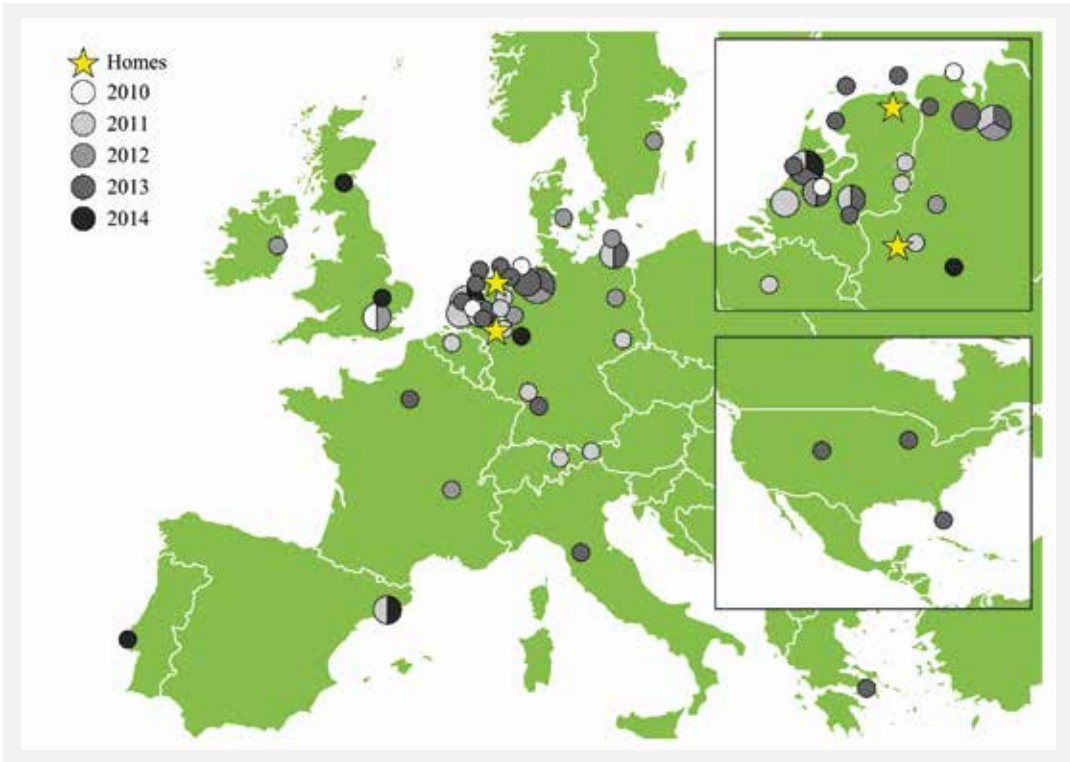
## ACKNOWLEDGEMENTS – DANKWOORD - DANKWORT

It is done. And finally I can write the most read chapter in every Dutch PhD thesis: the acknowledgements! One would think that all the great science that has been performed in the past four years and has been written down with so much effort in all the chapters are of interest for your fellow scientists but it is not. The first page everyone opens and reads with such interest and curiosity is this part of the long expected PhD book. It is truly a joy to watch colleagues and other fellow scientists performing this kind of tradition. To be honest, I do the same ☺ And moreover I also believe that this is the key and most important part of every PhD. Without all the great people in your life: colleagues, family and friends, no one would actually be able to perform a PhD.

So here it comes....

More or less four years ago my PhD paths started and looking back now on this time, I simply have to say: "It was AWESOME." ☺ One of my favorite quotes that I also try to follow in my life is 'The way is the goal' particularly applies for doing a PhD. These four years were exciting, wonderful, challenging, busy, instructive, happy, awesome, encouraging, ..... but sometimes also very disappointing, nerve-wracking, discouraging and frustrating and basically very hard work. But I believe (and probably all my fellow PhDs agree with me ;) that experiencing all these different emotions is part of every PhD. All these feelings, emotions and moments, shape you as a person and as a scientist, and I am more than happy that I have gone through all of this.... and I would do it all over again ☺ Next to all these emotions and diverse entities that you encounter during a PhD, it would also be unimaginable to do a PhD without 'extrinsic' support. And this support comes in many different flavours and colours represented by various people, places and situations.

Before I go into detail in thanking everyone one by one (individuals or groups of individuals), I would like to thank firstly everyone and I actually mean EVERYONE. To illustrate this, all the places I have visited from September 2010, when I started my PhD, until August 2014, when I handed in my thesis are plotted on the map below. The most important people obviously are at my two home bases, one in Groningen (the Netherlands) and the other one in Duisburg (Germany), which are indicated with yellow stars. All the other places I have visited during this time are indicated per year. Thanks to all people at all these places. All the people that have inspired me, all the people that taught me, all the people that spent time with me, all the people that laughed with me, all the people that supported me, all the people that were there for me, all the people that travelled with me to those places, all the people that I visited or met at all those places... .. thanks for being there and thanks that our paths have crossed. With this map I would also exemplify that this 256 page PhD book (which you probably have not read 'yet') is also not the work of one single person (in this case me since my name is on the cover) but it is truly the production of this large 'network'. So many people contributed in so many different ways to this wonderful PhD book, so before I am thanking now many people separately I would like to thank you all again ☺



(Thanks to Tjibbe Donker for making this awesome map for me!)

Who will be the first individual? That is always one of the biggest questions of every acknowledgement, but I am sure that the person who should be named first in mine is my professor and supervisor Jan Maarten. The happiest and most optimistic person I have met in my ‘short’ life.

Dear Jan Maarten, I still remember our first meeting about my Master’s internship in your group in late 2008, when your office was still at ‘the Brug’. At that time you could still convince me (during my PhD it got more difficult ;) ) as I came to you with the ‘plan’ to work with *Staphylococcus aureus*, but you sold me a very fundamental scientific research project with *Bacillus subtilis*. Although I did not ‘plan’ this, I really enjoyed my 6-months internship at your research group. During that time you mentioned more than once that I would always be welcome in your group for a PhD and I took you up on this offer. Through the MDPI topmaster programme, I choose you as my final supervisor to write my own PhD proposal, which in the end got granted by the university. This meant that for the next 3 years (or then 4 years) I would be your PhD student. And then the whole fun, science, discussion and excitement began. Choosing you as my supervisor was one of the best decisions I ever made, working with and for you was ‘awesome’. Looking back on these four years, I honestly learned so much from you, and thanks to you I have grown a lot, personally and most importantly scientifically. Comparing our first sessions in 2012 where we wrote my first first-author paper together with one of our last sessions working together on my thesis introduction, it still makes me laugh. In the more recent sessions, we more often ‘agreed to disagree’ but in the end we were always both happy... more or less ☺. Many working situation with you reminded me of a ‘good cop, bad cop’ situation, which always ended up to be in good balance. I would like to thank you for all your trust, support, time, scientific and textual input, the freedom you have given me, the conference/working trips we have taken together, the kindness, the happiness and optimism (most of the times too much ;) ) and most importantly for all your Emails ☺ My favourite ones were always the “All clear. JM”. All the support you have given me during these four years would not have happened without the support

and understanding you get from your family. So I would also like to thank your wife Rita and your two children Mark and Lotte for their support for you and for their understanding that you work so much ☺ Thanks also to Rita for reading and correcting my Dutch summary. And to end with ..... clearly, it was good, as long as it lasted! Thank you!

At the beginning of my PhD I did not even had a co-supervisor. All the more I am so happy that Hajo became my co-supervisor and more importantly my mentor during the course of my PhD.

Dear Hajo, although I did not remember it the last time we spoke about it, when and how we met the first time, you certainly did. And I still love your expression when describing my hairstyle during that time. Your move to the UMCG was definitely the best decision you have made, at least from my point of you ;) I am so grateful that we met and that you took me on board, first for the 2<sup>nd</sup> SRL *S. aureus* collection and then for our EuSCAPE project. These past 2 years have gone by so fast but I can say that I have learned so much from you. Our hour-long sessions working on all these documents together and organizing meetings and analysing data, I thank you so much for everything you have taught me and for all your support and trust in me. The way you explain science or answer questions is always so instructive and illustrative, and I highly value all your scientific input and support that you have given me in these past years. Our language switching between English and German was also always a delight, especially when we spoke in our 'Ruhrpott Dialekt' ☺ Thank you for everything!

I am most grateful to the reading committee of my PhD thesis, Prof. Dr. Barbara Kahl, Prof. Dr. Ed Feil and Prof. Dr. Michael Hecker, who have agreed to access my PhD thesis. Thank you very much for your time to read and evaluate my thesis.

My three (Yes I have three ☺) dear paranimfen, Monika, Tim and Eleni. First of all I would like to thank you all three for actually being my paranimfen, which I highly appreciate, and I am so happy that during this very special day you three are standing right next to me.

Dear Monika, when I started my PhD you left for your two year PostDoc to England, but luckily you came back. Together we froze more then 2000 *S. aureus* isolates of the European collection, which meant so many hours working together at the LAF together, which were always a delight. But also before and after that you were always there for me when I had a practical or theoretical question, for which I am very thankful. And discussing science with you is always fun, as you always find 'something interesting' in every dataset or experiment.

Dear Eleni, my all-time favorite Griek friend and colleague ;) You have been the most stable colleague to me in these 4 years of my PhD, my *S. aureus* companion. You were there at the beginning and you will be there at the end. For this I already have to thank you ☺ I always valued your input and opinion and are very grateful for all the help and support you have given me during this time. Especially your help and positive 'aura' during my last big experiment was more than appreciated. And thanks also for all the fun time we had together in Lyon and Chicago ☺ Thank you my dear.

Dear Tim, first I was not sure in which section I should put you in my Acknowledgement: in the paranimf, the MolBac colleagues, the student or the friend section. Since actually you should be in all of them. So I decided to mention you here as this is the first one ☺ I don't even know where to start but I have to thank you for so many things. Our 'story' began in early 2012 where you came to our lab as a student and I still remember our first encounter in the lab. Your start was a bit 'hurdled' since I, your supervisor, was incapacitated ... But besides that little hurdle you performed an excellent start in our group and after that our paths did not separate anymore, which makes me very happy. Since our first meeting, where I thought Harry Potter is standing in front of me, I knew you were awesome ☺ And you stood up to that 'picture' these past 2.5 years and we truly became a wonderful team, helping each other out, discussing our work, sharing important and not so important opinions and so much more. From the supervisor point of you I am very proud of you and of everything you have done and achieved. From the friend and colleague point of you I am just so happy to know you. So so so happy ☺ I think next to Jan Maarten and me you are the only one who literally read my complete



PhD thesis from Chapter 1 through Chapter 12 over and over again. And then you also helped me so much in translating my thesis summary into German. Thank you so much for all your support in formatting my thesis, I honestly could not have done it without you. I wish you all the best, success, discipline, power of endurance but most importantly a lot of fun during your next scientific and life challenge. And I hope that I will be a part of it ☺

My direct work environment and therefore also one of the most important parts of my PhD is the Molecular Bacteriology (MolBac) laboratory of the Medical Microbiology Department. It was such a joy to be part of this very special and awesome research group. So many great people, great scientists, working in this wonderful lab (that kind of looks like a church ☺). I would like to thank with all my heart all MolBac members, both past and present. With special thanks to my two PostDoc supervisors who helped me in getting my PhD started, Annette and Artur. Thank you both for sharing your expertise with me, answering my questions and for all your support. Through your input, I believe that my PhD really had a 'kick-start' ☺ I would also like to specially thank Carmine ('Best supervisor in the universe'), Emma (Always loved to chat with you about anything ;)), Henrik ('Doeiiiiiiiiiii'), Federico ('Mutant'), Vivianne ('The Germans, the Germans, they are everywhere'), Marcus (For all your statistics support), Ruben, Ewoud, Jolanda, Dennis and Rense for just being my fantastic, wonderful and awesome colleagues, for helping me when I needed help and for all the fun, especially all the singing and dancing the lab. Andrea, you are my new office-mate since you started last year and I am happy that you decided to sit next to me. Although I was not that often in the office anymore, I enjoyed the time we spent together and wish you success and fun for the rest of your PhD. Mei, my dear Mei, for two years we were office mates and it was 'awesome'. Although we did not connect from the very beginning, the trip together to Lyon in 2012 was truly the 'transition point'. The whole week in Lyon and the journey there and back was just so much fun with you. Thank you for this. I am very happy that we got to know each other. Since you left for China last year, you are being missed. I wish you all the best and hope that we will see each other soon again. Thank you MolBac.

One of my favourite parts of doing a PhD was the supervision of students. So I would like to thank and congratulate my awesome students that actually survived my supervision, Emerald, Tim, (Yeah, I am mentioning you again ☺), Till, Caitlin and Mirja. Till, although your time in our lab was always so limited, I really enjoyed introducing you to the world of microbiology and wish you all the best for your future career, which will be a doctor, a scientist or even both?! ☺ Caitlin, although your time in our lab was very short, looking back to these few weeks, I can say they were AWESOME, both in the lab and outside of the lab. I am so grateful that you came to our lab and that we became friends and still are ☺ Tim and Mirja, it was my utmost pleasure to be your supervisor. I enjoyed discussing science with you, especially during our 'end of the day' (Tim) or 'end of the week' (Tim) or 'daily Skype' (Mirja) meetings. Teaching you, seeing you 'fall' but also 'get up' again, but most importantly see you 'grow' during your time in our lab makes me very proud. I wish you both a lot of success and fun for your future in the exciting world of science.

As our research group is part of the Department of Medical Microbiology of the University Medical Center Groningen, I also have to thank many people in this wonderful and very large department. Dear Alex, as the head of this awesome department that has changed so much since you 'took the rein' ;), I would like to thank you. You have done a lot in this short time to bring the clinics and research together in our department and I felt privileged to be a part of this.

Dear John, my dear John. What would we do without each other? You are truly a wonderful person and scientist. Working with you is always such a pleasure. You always put a smile on my face and our meetings and discussion are always so much fun. Thanks for taking me on board for the organization of the WGS workshop. I would also like to thank all the people in your group, with special thanks to Erwin for all his work on the *spa*-typing for me.

Dear Jan, I honestly have no idea where my work would have been able to 'go' without you. From the very beginning of my PhD I was sure that I would like to solely work with clinical *S. aureus* isolates and not with 'lab strains', which was more commonly done in the MolBac group. And to do so I needed an 'Inside Man' in the diagnostic laboratory and that was you ☺ Thank you so much for all your support, all the files you have created for me, all the questions you have answered, all the manuscripts and abstracts you have read. It was always so nice to interact with you, even when we just passed by on the hallway, you always had some time for me or just quickly asked me how it was going. Dank je wel!

Since most of my research was very much directed towards combining the clinics and research and after I had the connection strongly build with my personal 'Inside Man', I have to thank many other people in the clinical bacteriology laboratory for their help and time. Greetje, Benita (Thanks for doing all the ClonDiags for me ☺), Peter, Bas, Willy, Wietske, Gini, Froukje, Careen, Martijn, Jeanet, Francy, Karuna, Iris, Tamara, Ludy, Joke, Hanny, Wilma, Marga, Mohammed and basically everyone who was not named ;). Special thanks to Guido and Bert in the kitchen. Without you two, my experiments in the lab would not have been possible ;) And also all your help Guido in finding special labware or chemicals or needing something very quickly – thank you!

Dear Ank and Marchiene, a successful department needs a very talented secretary and our department even has TWO! Thank you both for kind of everything ☺ If I would start listing all the things you helped me with, the list would never end. Danke – Dank je wel – Thanks ☺ Since we also spoke all three languages sometimes.

And there are so many more people in this wonderful department. Dear Jan, thanks for all the coffee breaks or lunch breaks we had together. It is always a joy to hear about your super exciting weekends or discuss TV series with you. Dear Henk, thank you so much for all your 'financial support' ☺. Dear Jet, sometimes we shared an office together when I was working together with Hajo, or even when he was not there. Thanks for all the 'snoepjes' that you always brought to work and shared with everyone ;)

Dear Tjibbe, my personal map-maker ☺ It feels like if we work together for ages already, but it must have been all these 10000 Emails we have written in this short time, that make me feel this way. Thank you for keeping up with me and for doing all these awesome maps for me ☺ Thanks also to Mariano who always had to bear my presence when I had to discuss the colours of the maps with Tjibbe! It was always great to stop by your office, especially since you had your own, and chat about basically everything.

Dank je wel MMB !!!!!

I would also like to thank the postkamer of the UMCG. I have no idea how many packages I sent and received in these four years, but I know it were a lot ☺ So thank you for sending and receiving my packages and for supporting me whenever there was a problem. Moreover, I would like to thank the 'Technisch Dienst' of the UMCG for repairing equipment in our lab when I dearly needed it and also all the other very kind and helpful medewerkers of the UMCG.

One of the key components in research are collaborations and a strong network. And from my very first project on, which resulted in my first paper, I enjoyed this collaborative work and networking so much that since then I extended it greatly across Europe. I am so thankful for everyone and for everything that was contributed to this PhD thesis.

Dear Peter and Mirjan (Department of Pathology and Medical Biology, UMCG, the Netherlands), since 2.5 years we work together on the very exciting project of the potential association of *S. aureus* in the autoimmune disease granulomatosis with polyangiitis. Although our awesome paper is still not published and just gets rejected by all these editors, I would like to thank you both for everything. We have written so many Emails during this time and you are always so responsive and helpful. I very much value all your support and knowledge and am very grateful to know you and work with you. Thanks also to all the other people involved in this project.

Dear Dörte, Andreas, Knut and Dirk (Department of Microbiology, University of Greifswald, Germany), thanks for all the mass spectrometry analyses you have performed for me. Thanks also for your hospitality when I visited Greifswald and for all your help and answers to all my questions.

Dear Robert and Anders (Staten Serum Institut, Copenhagen, Denmark), you were my first collaborators and still are (That means something ;)). After successfully finishing one project together we went on and started the next one, which is still on-going. Working with you was always a pleasure and so productive. I also always enjoyed meeting you at international conferences. And I truly hope that our collaboration will continue.

Dear Henrik (Hvidovre Hospital, Copenhagen, Denmark), I believe our first contact started when I was 'hunting' for *S. aureus* t437 isolates across Europe. Just recently our t437 story got accepted, thank you so much for all your support and work for this. Thanks also to your two co-workers Peder and Jesper for helping me with some WGS analyses. Thank you also for introducing me to 'Happy Socks', wearing them or seeing you wear them always makes me so happy ☺

Dear Willem (Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases Erasmus MC, Rotterdam, the Netherlands), thank you for performing the Luminex analyses for our GPA-*S. aureus* project. And thank you also for all your patience and support within this project.

I would also like to thank all the people involved in the two European projects, EuSCAPE and SRL, with special thanks to Carola. Being part of the EuSCAPE project was one of the best things that ever happened to me (work-wise ;) ) and I am so happy that I am a part of it and so grateful for all the wonderful people that work within this project. And thanks to all the scientists who have shared their *S. aureus* isolates with me and thanks to all the great scientists I have met during conferences and workshops during these past four years.

Dear GUIDE ☺ First of all thank you for not only for granting me my 3-year PhD project but also for giving me the extra year. Thanks to the two PhD coordinators Riekje and Maaïke for all their work and help with regard to PhD related paperwork. It was always a pleasure to have a little chat with you when I had to bring some papers to GUIDE ☺

This PhD would not have happened without me studying the topmaster's programme here at the University of Groningen. Dear Han, thank you very much for accepting me for this awesome programme. Dear Harrie, thank you for all your honesty and fun that we had during the first year of the topmaster's. I more than appreciated your super honesty and hope that more people would be like you. Dear Ellen, during one of our first topclass we spent one day in your lab, where I learned to pick worms. As I was so enthusiastic about this, you immediately suggested to me to go to the Morimoto Lab for my second internship. Thank you so much for this suggestion, for making it possible and for your support. And most importantly, thank you for actually not telling me what I might experience over there, or I probably would not have gone ;)

Special thanks also goes to the Groningen Graduate Interest Network (GRIN ☺). When I started my PhD, the PhD organization GRASP was split up into Gopher and GRIN and I was so lucky that I was a part of this. I started up GRIN together with Jonathan Mall, Jan Blaauw and Gerdien Regts and so many other wonderful people with whom it was such a pleasure to work with. Thank you all.

Dear Morimoto lab members, now that I look back on these 7 months, I do have to thank you so much. I would never have thought that I could become more independent and critical, but this is what I learned during my time in your lab. During these 7 months I probably would have never thought that I will write these words here about this time, but it is true. Looking back and thinking about it, which I have done a lot, it was one of the best decisions I have ever made. Thanks to my office mates Jesper, Catarina, Liz, Ning and Patricjia and super special thanks to the best supervisor in the world Daniel. I do not know what I would have done without you during this time. All your enthusiasm, all your knowledge, optimism.... it was AWESOME working with you and learning

from you. I am happy that I got to know you and that we are still friends. And next time we see each other again, 'let's sit down and talk about it ;))' Your PCR Rock Star ☺

So let's go one more step back into the past. There I would like to thank all my friends and fellow students from the bachelor of biological sciences that graduated with me in 2008. Thank you Nacho for being my bachelor thesis supervisor and for being such a great badminton player. Thank you Dolors for your support in the lab but also for all the fun stuff we did outside of the lab. I also need to thank Dr. Opperman who is the one person who sparked my interest in microbes during the microbiology practicum in my first bachelor year. And special thanks to all my friends for these awesome three years that we had in Münster together. Dear Lena, Sascia and Britta, I am happy that we still have contact and at least see each other once a year. I wish you all three all the best for your future and hope that we stay in contact.

William Shakespeare once said, 'A friend is one that knows you as you are, understands where you have been, accepts what you have become, and still, gently allows you to grow.' In principle, a friend knows all about you and still likes you ☺ And I am so happy that I can call so many awesome and wonderful people my friends.

Dear Petra, we 'survived' the 2-year MPDI together and became friends during this time but our friendship has grown since you left. We supported each other during these two years and now that we are both PhDs we still exchange our knowledge, share opinions and ask each other's advice. I value your opinion so much and am very glad that I can call you my friend. We also started to travel together which I always enjoy. Next stop Istanbul, right?! ;) We can basically discuss every topic or come up with silly ideas like exchanging our tea/coffee drinking habits ☺ Thanks to you I also met Jan, first as your boyfriend, then as your husband. It is always so great hanging out with both of you!

Dear Maarten, somewhere during the beginning of my PhD where you helped with some formatting issues I promised you your own sentence in this section of my book, so here it is ☺ I can almost not find any words on how much I value our friendship. And it is actually you who I need to thank for being able to speak and understand Dutch. Thanks to all the Emails and all the corrections you have made, I can speak Dutch. Although I still believe I am almost accent-free ;) And you are my favorite movie-buddy (especially since Jelmar left us L), we are for sure most of the times the real 'Die-Hards' ☺ I have no idea how many movies we have watched together, first in the MustSee and then in the Wolff. Thanks for all the game nights, borrels, Weihnachtsmarktbesuche, Pokernights, Queens Days. Thanks for being my friend!

Dear Jelmar, you are definitely the funniest person I know ☺ I am very glad that I have met you and that we became friends. It started with our Monday movie nights, but we also played badminton together. Thanks also for all the borrels, game and poker nights. Hanging out with you is always a guarantee for fun. Thanks a lot. And you are really missed up here in Groningen, although you regularly show up here in the North ☺

Dear Alwin, my favorite mix partner. Standing together with you on the field is so much fun and so awesome ☺ I always enjoy playing badminton with you, especially when we win ;) Sometimes it feels as if we have known each other forever and actually you are like the little brother I never had. Thanks for your friendship, for all the great dinners we had together, the fun bike trips, movie nights and just for being my friend and being there for me when I need you. I wish you all the best for your personal and scientific future and hope that we will stay friends.

Dear Marcella, I am writing these sentences here now on purpose in English – only for YOU ☺ At the beginning of our friendship was AMOR 5 where we basically did not understand each other, because of language issues. Looking back now, it makes me laugh so badly. Muetzi, you are by far one of my dearest friends and my favorite double partner. Als wij samen op het veld staan.... och dat is zo geweldig ☺ I miss it !!! Thanks for being my friend, for all the time we spent and the trips we did together. I value your friendship very much. Thanks Muetzi ☺

Dear Jill, mijn sjaat ☺ A couple of months ago you moved away from Groningen and I want to let you know how much I miss you up here in the North. I am so grateful that we have met and became friends. Hanging out with you is always such a mixture of fun and seriousness and I thank you for being just who you are.

And there are so many more great friends I have found here in Groningen. Thank you Marieke (my favorite IKEA friend), Willem, Freddy, Catherine, Charlotte, Boudewijn, Joost, Mirjam, Loic, Duurt, Melle, Ronald, Remko, Marjanne, Mark, Rik, Jantien, José, Jeffrey and many more for all the parties, borrels, gezelligheid, fun, Queens Day and Night parties, verjaardag feestjes and many more things that we did together. In this line I also have to thank my former badminton club GSBC Amor for all the 'gezelligheid'. And of course my new badminton club BC GO!, I don't know what I would do without playing badminton and all the great players I always play together and against.

Dear Jacky, our friendship just started recently at a goodbye borrel of a MMB colleague of ours and has since been growing and I do not want to miss it anymore. We made it a little tradition to have an ice cream during the day, discussing work but also so many other things. I enjoy your company and even more the good food you always cook for me :) It is always zo gezellig met jou ☺ And it is good to know that there is someone out there who writes even more than me and who is even more crazy with 'organizing' ;) I am very grateful that our paths have crossed and that we became friends. And thanks also for translating my English summary for me, I honestly could not have done this!

Somewhere in between these paragraphs now I would also take this opportunity to thank everyone who supported me especially during the time after my ski accident in January 2012. Special thanks goes of course to my awesome physiotherapist Thomas Geudecker who helped me so much to get back on my feet for 1.5 years, most of the times twice a week. Now that I realize it, I have seen my physiotherapist more during this time than most of my friends or family. I would also like to thank all my friends and colleagues who have helped me out during this kind of difficult time for me (being so immobile and independent was very challenging for me ;)). Don't know what I would have done without all of you :D Thanks!

Now we have to drive 60km East and 200km South und dann befinden wir uns um schönen Ruhrgebiet wo ich aufgewachsen bin und nun müssen wir auch eine andere Sprache sprechen ☺ Meine Muttersprache Deutsch in der ich mich gerne bei all meinen Freunden und meiner Familie bedanken möchte.

Mein lieber Andreas, unsere Freundschaft bedeutet mir so unendlich viel. Wir kennen uns nun schon über 20 Jahre und ich danke dir für jede Sekunde die wir zusammen verbracht haben, für all die Gespräche, für all unsere Reisen auf die Jugendburg Gemen, nach Gramsbergen und nach Frankreich, für all deine Unterstützung. Unsere Gemeinde kann sich glücklich schätzen so einen wundervollen und awesome Pfarrer zu haben und ich kann mich glücklich schätzen dass ich deine Werbung für den KiJuGo damals als ich 7 Jahre alt war so toll und aufregend fand. Seitdem haben wir viel zusammen erlebt und selbst wenn wir etwas nicht direkt zusammen erlebt haben, haben wir uns von unseren tollen Erlebnissen erzählt ☺ Ich danke Dir dass du so bist wie du bist und dass du ein Teil von meinem Leben bist.

Liebe Sofia, endlich jemand der genauso laut und crazy ist wie ich. Das dachten wir alle beide damals in Wismar als wir uns kennen lernten auf einer super tollen Orchesterreise. Nur für kurze Zeit haben wir beide in Duisburg noch gewohnt, wo unsere Freundschaft began. Seit mehr als 10 Jahren treiben wir 2 Globetrotter uns aber immer irgendwo in der Welt rum, und doch kann ich dich zu einer meiner besten Freunde zählen. In dir habe ich eine Seelenverwandte gefunden. Und immer wenn wir uns sehen, was manchmal nur einmal im Jahr ist, ist es so also hätten wir uns gestern erst gesehen ☺ I love this about our friendship! Wir beide erleben soviel und durch die Erzählungen von deinem Leben, habe ich manchmal das Gefühl das ich sogar noch mehr erlebe. You are awesome und ich bin so happy das wir Freunde sind.

Liebe Carina, meine Puppe ☺ Ach was bin ich froh dich zu kennen. Durch eine gemeinsame Freundin haben wir uns damals hier in Groningen kennen gelernt und trotz der vielen Reisen und Umzüge haben wir uns nicht aus den Augen verloren, was ich wirklich sehr schätze. So ein Wochenende hier mit dir in Groningen oder auch in Stuttgart ist immer was besonderes ☺ Oder mein Zwischenstopp im schönen Erika um Apfelmuchen zu essen ☺ Ich liebe es wenn wir uns Bilder schicken wenn wir durch den Heimatort des anderen fahren, so funny ☺ Thanks for being my friend ☺

Liebe Ursu (Sabine), einer meiner Anker zuhause in Deutschland. Viel haben wir in den vielen

Jahren unserer Freundschaft erlebt und ich könnte nun wahrscheinlich ein ganzes Kapitel über unsere wundervolle Freundschaft schreiben .... aber das brauch ich gar nicht, da du es alles weisst ☺ Du bedeutest mir so viel und ich hab dich unendlich dolle lieb! Danke für alles! xoxo

Lieber Horst (oder auch Sveniboy oder einfach Sven), einer meiner längsten und aller liebsten Weggefährten. Was unsere Freundschaft schon alles mit erlebt hat in diesen fast 20 Jahren..... das ist so wertvoll und so wundervoll. Unsere Freundschaft kann ich wirklich kaum in Worte fassen, aber da du eh nicht so auf 'Worte' stehst, mache ich es nunmal in deinem Style. DANKE :-\*

At the end of this chapter I would also like to thank all my friends from all over the world. Thanks for everything!

Adolph Kolping sagte einmal: "Das erste was der Mensch im Leben vorfindet, das Letzte, wonach er seine Hand ausstreckt, das Kostbarste, was er im Leben besitzt, ist die Familie." Und da stimme ich ihm vollkommen zu. Die Familie ist der Dreh und Angelpunkt in meinem Leben, obwohl ich in den letzten 4 Jahren nicht sehr oft zuhause war. Aber das ist gerade das tolle an meiner Familie, man ist immer ein Familienmitglied egal wo man ist. Umso schöner war es dann wenn ich mal an Geburtstagen oder anderen Familienfeiern anwesend war. Aber am schönsten ist dann doch immer Weihnachten ☺ Ach wie liebe ich Weihnachten mit der Familie. Ich danke meiner Familie in Millingen und Hösel: Gilla, Günter, Heiko, Holger, Melanie, Zoé und Mila und Sandra und Moni. Ich danke meiner Familie in Duisburg/Dinslaken, meinem lieben Großen Opa, Rosi, Peter, Bärbel, Miriam und Lutz. Ich danke meiner Patentante Elvira und Hans-Jürgen und Sven. Lieber Hermann, liebe Irene, meine absoluten Lieblings-Oldies. Mein ganzes Leben kenne ich Euch schon und ihr ward immer wie Großeltern für mich, wofür ich sehr dankbar bin. Leider kannst du Irene, diesen tollen Tag in meinem Leben nicht mehr miterleben obwohl du so gehofft hast dass du es noch schaffst. Du wirst an diesem Tag in meinem Herzen dabei sein.

Johan Wolfgang Goethe sagte einmal: "Zwei Dinge sollten Kinder von ihren Eltern bekommen, Wurzeln und Flügel." Und meine Eltern haben in diesem Sinne wirklich eine gute Tat vollbracht.

Liebe Mom, lieber Dad, Worte sind gar nicht genug um all meine Dankbarkeit und Liebe auszudrücken. Eins ist allerdings klar, ohne Euch, ohne Eure ungezweifelte Unterstützung in allem und Eure bedingungslose Liebe würde ich heute nicht hier stehen und die Person sein die ich bin. Eure unendliche Unterstützung hat mich immer motiviert und hat mich gelehrt immer mein bestes zu geben und vor allem dass einfach alles möglich ist wenn man daran glaubt und dafür auch etwas tut. Diese Eigenschaften haben mir definitiv während meines PhDs sehr geholfen. Immer ward ihr da und es ist ein gutes Gefühl zu wissen dass ihr auch weiterhin immer für mich da sein werde. In Liebe, Eure Onna.

Liebe Bücheroma, lieber Kinderopa. Für Euch zwei habe ich den besten Teil in diesem wundervollen Buch aufgehoben, nämlich das Ende ☺ Ja Euer Enkelkind hat es geschafft und hat ein Buch geschrieben, ein Buch an dem sie nun 4 Jahre lang sehr hart gearbeitet hat. Du mein liebster Kinderopa hast meinen Bachelorabschluss leider nicht mehr miterlebt und du meine liebe Bücheroma hast mich leider kurz vor meinem Ziel verlassen. Daher habe ich dieses Buch Euch gewidmet da ihr leider nicht mehr dabei sein könnt. Ihr ward ein so wichtiger Teil in meinem Leben und seid Euch sicher, ihr seid es immer noch ☺ Jeden Tag trage ich Euch in meinem Herzen! Ich vermisse Euch sehr. Ich hab Euch unendlich lieb, Eure Schnuppe.

*Danke an Euch alle!*

*Dank jullie allemaal!*

*Thanks to all of you!*

*Corinna*



*Don't judge me.  
I was born to be AWESOME not perfect.*







Bacterial pathogens, such as *Staphylococcus aureus* and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), impose major threats to human health worldwide. Both have a 'Jekyll & Hyde' character, since they can be present as human commensals, but can also become harmful invasive pathogens especially when the human host defences are impaired due to underlying diseases. Moreover, multi-drug resistant lineages have emerged not only in healthcare settings, but also in the community, sometimes causing close to untreatable infections. This calls for improved methods to detect these dangerous pathogens and to map their geographic spread. Accordingly, specific aims for the present PhD research were to apply DNA fingerprinting methods to typify highly heterogeneous *S. aureus* populations in Europe, to understand their epidemiology, to improve infection prevention strategies, and to avoid transmission events and outbreaks. By addressing different geographical locations, different disease groups, patient metadata including anti-staphylococcal immune responses, and different bacterial lineages and their resistance phenotypes, the molecular fingerprints of *S. aureus* were tracked across Europe. The use of two complementary DNA fingerprinting methods, namely multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting (MLVF) and *spa*-typing, was shown to be particularly effective to assess the genetic diversity of *S. aureus*. An additional aim was to obtain a first glimpse of the current spread of CPE across Europe. This was achieved through a structured survey study involving 39 European countries. Altogether, this PhD research project provided novel insights into the European epidemiology of particular *S. aureus* types representing high-risk clones, and the even more worrisome emergence of CPE in Europe.