

Phänotypisches „hyper-splitting“ Phänomen einschließlich Small Colony Variant (SCV)-Generierung nach längerer Antibiotikatherapie bei einem klinischen *Klebsiella pneumoniae*-Hochrisiko-Sequenztyp

Eyüp Doğan^{1*}, Katharina Sydow², Stefan E. Heiden², Elias Eger², Jürgen A. Bohnert¹, Georgi Wassilew³, Richard A. Proctor⁴, Evgeny A. Idelevich¹, Katharina Schaufler², Karsten Becker¹

¹Friedrich Loeffler-Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald; ²Abteilung für Epidemiologie und Ökologie antimikrobieller Resistenz, Helmholtz-Institut für One Health, Greifswald; ³Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald; ⁴Departments of Medical Microbiology/Immunology and Medicine, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI, USA; *correspondence e-mail: eyuep.dogan@med.uni-greifswald.de

Hintergrund. Die Ausprägung von an das intrazelluläre Milieu adaptierten Small Colony Variant (SCV)-Phänotypen stellt eine Überlebensstrategie von Pathogenen dar, um der Immunantwort des Wirtes auszuweichen [1]. SCVs sind mit chronisch-persistierenden Infektionen assoziiert und ihre intrazelluläre Lage schützt sie vor der Wirkung vieler Antibiotika-Substanzgruppen [2]. Während Staphylokokken-SCVs relativ häufig beobachtet und umfangreich charakterisiert wurden, existieren abgesehen von *Pseudomonas/Burkholderia*-SCVs bei Mukoviszidose-Patienten kaum Berichte zu SCVs von Gram-negativen Bakterien. Wir berichten hier von einem Fall eines klinischen *Klebsiella pneumoniae*-Isolats, das eine phänotypische Aufspaltung in vier Koloniemorphotypen einschließlich des SCV-Phänotyps zeigte.

Methoden. Verschiedene isogene *K. pneumoniae*-Phänotypen wurden aus Urin- und Gewebeproben eines 23-jährigen immunkompetenten Patienten mit Hüftverletzung gewonnen [3]. Jeder Phänotyp wurde anhand der Koloniemorphologie, der Empfindlichkeitstestung (Bouillon-Mikrodilution) und wiederholter Subkultivierung charakterisiert. Alle Phänotypen wurden mittels Ganzgenomsequenzierung (WGS) charakterisiert.

Ergebnisse. Nach der initialen Isolierung von Wildtyp-*K. pneumoniae*-Isolaten traten nach längerer Antibiotikabehandlung SCVs neben verschiedenen normalgroßen Phänotypen auf. Die Subkultivierung einer einzelnen SCV-

Kolonie führte konsistent zur Bildung von vier verschiedenen Koloniemorphotypen, die neben dem SCV-Phänotyp drei normalgroße Varianten mit verschiedenen Koloniefarben und anderen Erscheinungsmerkmalen umfassten. Dieses „hyper-splitting“ Phänomen war nur ausgehend von den SCVs zu verzeichnen. Die vier Koloniemorphotypen wiesen divergierende Antibiotika-Empfindlichkeitsprofile auf, die von weitgehend antibiotikasensiblen bis hin zu multiresistenten Mustern reichten. Insgesamt wurden basierend auf sowohl Koloniemorphotypen als auch Empfindlichkeitsmustern 14 verschiedene Phänotypen definiert. Die WGS bestätigte die klonale Identität aller Phänotypen und zeigte ihre Assoziation mit dem *K. pneumoniae* Hochrisiko-Sequenztyp 147.

Schlussfolgerungen. Wir berichten nach unserem Wissenstand erstmals bei einem klinischen *K. pneumoniae*-Isolat über eine konsistente Bildung mehrerer Koloniemorphotypen einschließlich eines SCV-Phänotyps und bezeichnen dieses Phänomen als phänotypisches „Hyper-Splitting“. Angesichts der SCV-assoziierten Immunevasion und der eingeschränkten Wirkung von Antibiotika sind weitere Anstrengungen erforderlich, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und klinische Bedeutung dieses Phänomens aufzuklären.

[1] Proctor et al. Nat Rev Microbiol (2006) 4:295-305

[2] Kahl et al. Clin Microbiol Rev (2016) 29:401-27

[3] Fischer et al. Front Surg (2024) 11:1363298

Phänotypisches „hyper-splitting“ Phänomen einschließlich Small Colony Variant (SCV)-Generierung nach längerer Antibiotikatherapie bei einem klinischen *Klebsiella pneumoniae*-Hochrisiko-Sequenztyp

Eyüp Doğan^{1*}, Katharina Sydow², Stefan E. Heiden², Elias Eger², Jürgen A. Bohnert¹, Georgi Wassilew³, Richard A. Proctor⁴, Evgeny A. Idelevich¹, Katharina Schaufler², Karsten Becker¹

¹Friedrich Loeffler-Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald; ²Abteilung für Epidemiologie und Ökologie antimikrobieller Resistenz, Helmholtz-Institut für One Health, Greifswald; ³Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald; ⁴Departments of Medical Microbiology/Immunology and Medicine, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI, USA; *correspondence e-mail: eyuep.dogan@med.uni-greifswald.de

Hintergrund. Die Ausprägung von an das intrazelluläre Milieu adaptierten Small Colony Variant (SCV)-Phänotypen stellt eine Überlebensstrategie von Pathogenen dar, um der Immunantwort des Wirtes auszuweichen [1]. SCVs sind mit chronisch-persistierenden Infektionen assoziiert und ihre intrazelluläre Lage schützt sie vor der Wirkung vieler Antibiotika-Substanzgruppen [2]. Während Staphylokokken-SCVs relativ häufig beobachtet und umfangreich charakterisiert wurden, existieren abgesehen von *Pseudomonas/Burkholderia*-SCVs bei Mukoviszidose-Patienten kaum Berichte zu SCVs von Gram-negativen Bakterien. Wir berichten hier von einem Fall eines klinischen *Klebsiella pneumoniae*-Isolats, das eine phänotypische Aufspaltung in vier Koloniemorphotypen einschließlich des SCV-Phänotyps zeigte.

Methoden. Verschiedene isogene *K. pneumoniae*-Phänotypen wurden aus Urin- und Gewebeproben eines 23-jährigen immunkompetenten Patienten mit Hüftverletzung gewonnen [3]. Jeder Phänotyp wurde anhand der Koloniemorphologie, der Empfindlichkeitstestung (Bouillon-Mikrodilution) und wiederholter Subkultivierung charakterisiert. Alle Phänotypen wurden mittels Ganzgenomsequenzierung (WGS) charakterisiert.

Ergebnisse. Nach der initialen Isolierung von Wildtyp-*K. pneumoniae*-Isolaten traten nach längerer Antibiotikabehandlung SCVs neben verschiedenen normalgroßen Phänotypen auf. Die Subkultivierung einer einzelnen SCV-

Kolonie führte konsistent zur Bildung von vier verschiedenen Koloniemorphotypen, die neben dem SCV-Phänotyp drei normalgroße Varianten mit verschiedenen Koloniefarben und anderen Erscheinungsmerkmalen umfassten. Dieses „hyper-splitting“ Phänomen war nur ausgehend von den SCVs zu verzeichnen. Die vier Koloniemorphotypen wiesen divergierende Antibiotika-Empfindlichkeitsprofile auf, die von weitgehend antibiotikasensiblen bis hin zu multiresistenten Mustern reichten. Insgesamt wurden basierend auf sowohl Koloniemorphotypen als auch Empfindlichkeitsmustern 14 verschiedene Phänotypen definiert. Die WGS bestätigte die klonale Identität aller Phänotypen und zeigte ihre Assoziation mit dem *K. pneumoniae* Hochrisiko-Sequenztyp 147.

Schlussfolgerungen. Wir berichten nach unserem Wissenstand erstmals bei einem klinischen *K. pneumoniae*-Isolat über eine konsistente Bildung mehrerer Koloniemorphotypen einschließlich eines SCV-Phänotyps und bezeichnen dieses Phänomen als phänotypisches „Hyper-Splitting“. Angesichts der SCV-assoziierten Immunevasion und der eingeschränkten Wirkung von Antibiotika sind weitere Anstrengungen erforderlich, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und klinische Bedeutung dieses Phänomens aufzuklären.

[1] Proctor et al. Nat Rev Microbiol (2006) 4:295-305

[2] Kahl et al. Clin Microbiol Rev (2016) 29:401-27

[3] Fischer et al. Front Surg (2024) 11:1363298