

**Antibiotika-Multiresistenz**  
**bei**  
*Pseudomonas aeruginosa*

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Beate Henrichfreise

aus Bonn

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Bernd Wiedemann
2. Referent: Prof. Hans-Georg Sahl

Tag der Promotion: 21.06.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

.....*meiner Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Biologie und Phylogenie von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.2	Bedeutung von <i>P. aeruginosa</i> als Krankheitserreger .....	1
1.2.1	Cystische Fibrose .....	2
1.2.2	Mutatorphänotyp .....	3
1.3	Natürliche Resistenz von <i>P. aeruginosa</i> .....	4
1.4	Therapie von <i>P.-aeruginosa</i> -Infektionen .....	8
1.5	Erworbene Resistenz .....	8
1.5.1	Durch Mutation erworbene Resistenz .....	8
1.5.1.1	Überexpression von Effluxsystemen .....	9
1.5.1.2	Verlust des Porins OprD .....	11
1.5.1.3	Überexpression von AmpC .....	11
1.5.1.4	Typ-II-Topoisomerasen DNA-Gyrase und Topoisomerase IV.....	12
1.5.2	Durch erworbene Resistenzgene vermittelte Resistenz .....	12
1.5.2.1	Aminoglykosid-modifizierende Enzyme .....	12
1.5.2.2	Erworbene $\beta$ -Laktamasen .....	13
1.5.2.3	Sonstige Resistenzdeterminanten .....	15
1.5.2.4	Lokalisation und Verbreitung von erworbenen Resistenzgenen bei <i>P. aeruginosa</i> .....	15
1.6	Entstehung von Resistenz unter der Therapie .....	17
1.7	Aktuelle Situation zur Multiresistenz .....	18
1.8	Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	21
2.1	Material .....	21
2.1.1	Bakterien .....	21
2.1.1.1	Klinische <i>P.-aeruginosa</i> -Stämme .....	21
2.1.1.2	Labor- und Referenzstämme .....	23
2.1.1.3	Mutanten .....	25
2.1.2	Antibiotika .....	26
2.1.3	Chemikalien und sonstige Materialien .....	27
2.1.4	Lösungen und Puffer .....	28
2.1.5	Enzyme .....	28

2.1.6	Oligonukleotide .....	29
2.1.7	DNA-Größenmarker .....	32
2.1.8	Nährmedien .....	32
2.1.9	Geräte .....	32
2.2	Mikrobiologische Methoden .....	34
2.2.1	Reidentifizierung mit Hilfe des Selektivmediums Ceftrimid .....	34
2.2.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	34
2.2.3	Detektion des Mutatorphänotyps .....	35
2.2.4	Bestimmung der Mutationsfrequenz .....	35
2.2.5	Effluxpumpen-Inhibitionstest .....	36
2.2.6	Cephalosporinase- Inhibitionstest .....	36
2.2.7	EDTA-Phenanthrolin-Imipenem Mikrodilutionstest .....	36
2.2.8	Keimzahlbestimmung .....	37
2.2.9	<i>In-vitro</i> -Modell nach Grasso .....	37
2.2.9.1	Mathematische Korrektur von Verdünnungseffekten .....	38
2.2.9.2	Simulation der Pharmakokinetik .....	39
2.2.9.3	Einstellung der Peristaltikpumpe .....	41
2.2.9.4	Versuchsauswertung .....	42
2.2.9.4.1	Pharmakodynamische Parameter .....	42
2.2.9.4.2	Bestimmung des AAC-Wertes .....	42
2.2.9.5	Pharmakokinetische Parameter .....	42
2.2.9.5.1	Halbwertszeit .....	42
2.2.9.6	Pharmakologische Indizes .....	43
2.2.9.6.1	$C_{\max}$ /MHK [dimensionslos]: .....	43
2.2.9.6.2	$T_{>MHK}$ [%]: .....	43
2.2.10	Nachweis von Mutanten im <i>in-vitro</i> Modell .....	43
2.2.11	Kompetitiver Wachstumsversuch .....	43
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	43
2.3.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) .....	43
2.3.2	Extraktion von genomischer DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit <sup>TM</sup> (Qiagen) .....	44
2.3.3	Extraktion von Plasmid-DNA mit Hilfe des Fast Plasmid <sup>TM</sup> Mini Kit (Eppendorf) .....	45
2.3.4	Aufkochpräparation von genomischer DNA .....	45

2.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
2.3.5.1	Reidentifizierung durch den Nachweis von <i>algD</i> .....	46
2.3.5.2	Defekte im DNA Reperatursystem (MMR System) .....	46
2.3.5.3	Nachweis von durch Mutation erworbenen Resistenzmechanismen.....	46
2.3.5.3.1	Modifikation der Typ II Topoisomerasen DNA Gyrase und Topoisomerase IV .....	47
2.3.5.3.2	Modifikationen des Porins OprD.....	47
2.3.5.3.3	Modifikationen in AmpD/E .....	47
2.3.5.3.4	Überexpression von Effluxpumpen .....	47
2.3.5.4	Screening nach erworbenen Resistenzdeterminanten .....	47
2.3.5.5	Nachweis von Klasse-1- und -2-Integrans .....	48
2.3.5.6	Charakterisierung von Klasse-1-Integrans.....	48
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	50
2.3.7	Aufreinigung mit dem MinElute PCR Purification Kit <sup>TM</sup> (Qiagen) .....	51
2.3.8	Sequenzierungen .....	51
2.3.9	Übertragung von Resistenzgenen durch Konjugation.....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
3.1	Reidentifizierung.....	53
3.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	53
3.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	53
3.3.1	Epidemiologie .....	53
3.3.2	Korrelation der PFGE- und Resistenzmuster .....	55
3.4	Identifizierung von Mutatorstämmen.....	57
3.4.1	Genetische Charakterisierung des Mutatorphänotyps von Klon XXI.....	59
3.5	Phänotypische Tests zur Analyse von erworbener Resistenz .....	59
3.5.1	Effluxpumpen-Inhibitionstest.....	59
3.5.2	Cephalosporinase-Inhibitionstest .....	60
3.5.3	EDTA-Phenanthrolin-Imipenem Mikrodilutionstest .....	62
3.6	Genotypische Tests zur Analyse von durch Mutationen erworbener Resistenz ..	63
3.6.1	Effluxpumpen-Überexpression .....	63
3.6.2	Verlust von OprD .....	65

3.6.3	Typ-II-Topoisomerasen DNA-Gyrase und Topoisomerase-IV ...	67
3.7	Durch erworbene Resistenzgene vermittelte Resistenz .....	67
3.7.1	Lokalisation von erworbenen Resistenzgenen .....	69
3.7.2	Konjugation .....	70
3.8	Entstehung von Resistenz unter der Therapie .....	71
3.8.1	Antibakterieller Effekt.....	72
3.8.1.1	Antibakterieller Effekt von Meropenem .....	72
3.8.1.2	Antibakterieller Effekt von Ceftazidim.....	73
3.8.2	Selektion von Mutanten .....	74
3.8.2.1	Mutanten von PAO1 unter der Therapie mit Meropenem .....	74
3.8.2.2	Mutanten von PAO1 unter der Therapie mit Ceftazidim .....	74
3.8.2.3	Mutanten von 12-09-15 unter der Therapie mit Meropenem.....	74
3.8.3	Kompetitiver Wachstumsversuch .....	76
3.8.4	Phänotypische und genotypische Untersuchung der selektierten Mutanten .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>108</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Biologie und Phylogenie von *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein Gram-negatives, bewegliches, monotrich begeißeltes stäbchenförmiges Mitglied der  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien (Stackebrandt, 1999). Die Oxidase-positive Spezies gewinnt als Nonfermenter unter oxidischen wie anoxischen Bedingungen Energie über Respiration. Besonders augenfällig sind die von *P. aeruginosa*-Stämmen in unterschiedlichem Ausmaß und variabler Kombination produzierten Pigmente Pyozyanin (bläulich, nicht fluoreszierend), Pyoverdin (gelblich fluoreszierend), Pyomelanin (bräunlich bis schwärzlich) und Pyorubin (rot), welche als Siderophore fungieren. Das Genom von *P. aeruginosa*, welches im Jahr 2000 komplett sequenziert wurde, ist mit 6,3 Megabasen und 5570 Genen überaus groß (Stover et al. 2000). Es verfügt über eine Vielzahl an Transportsystemen, sowie an Systemen zur Metabolisierung diverser Kohlenstoffverbindungen. Bislang konnte noch bei keiner Spezies ein höherer Anteil an Regulatoren (fast eins von zehn Genprodukten) festgestellt werden. Entsprechend überragend ist die Anpassungsfähigkeit von *P. aeruginosa* (als Übersicht in Salyers u. Whitt, 2002). Bereits geringste Mengen organischer Verbindungen ermöglichen dem genügsamen Bakterium das Überleben. Dies hat zur Folge, dass die ubiquitäre Spezies, deren natürliches Habitat Wasser, Boden und Pflanzen umfasst, auch im Krankenhaus nahezu allgegenwärtig ist und u. a. durch die Präsenz in Wasserhähnen, Siphons, Toiletten und unterdosierten Desinfektionsmitteln sehr schnell zu ernsthaften Hygieneproblemen führen kann.

## 1.2 Bedeutung von *P. aeruginosa* als Krankheitserreger

Eine transiente Kolonisierung des menschlichen Körpers durch *P. aeruginosa* ist nicht ungewöhnlich. Charakteristisch für einen opportunistischen Krankheitserreger ruft das Bakterium ausschließlich Infektionen hervor, wenn in der Wirtsabwehr Lücken jeglicher Art auftreten (als Übersicht in Salyers u. Whitt, 2002). Dementsprechend breit gefächert ist das Spektrum an durch *P. aeruginosa* verursachten Infektionen, welches durch moderne Errungenschaften der Medizin wie z.B. chirurgische Eingriffe oder Kontaktlinsen erweitert wurde. So werden u. a. Augeninfektionen bei Kontaktlinsenträgern, Verbrennungs- und Wundinfektionen, Sepsen nach chirurgischen Eingriffen, Harnwegsinfektionen bei Dauerkatheter-Trägern und Lungeninfektionen bei künstlich beatmeten Patienten durch das ubiquitäre Bakterium verursacht. *P. aeruginosa* verfügt über ein Arsenal an Pathogenitätsfaktoren, von denen zwei mit herausragender Bedeutung für die Infektion der

Lunge zu nennen sind: Die Serin-Protease LasA und die Zink-Metalloprotease LasB bauen Elastin ab, welches nahezu 30 % des Proteingehalts der Lunge stellt (Galloway, 1991). Ein einzigartiger Pathogenitätsfaktor bei *P. aeruginosa* ist die Produktion von Alginat (Rehm u. Valla, 1997). Das acetylierte Polymer aus Manuron- und Guluronsäure umgibt die Zelle als ein viskoses Gel und verleiht Kolonien eine mukoide Morphologie. Die komplex regulierte Alginatproduktion geht mit der Bildung von äußerst viskosen Biofilmen einher, welche gleichermaßen eine physikalische Barriere für Phagozyten und Antibiotika darstellt.

Eine besondere Rolle wird *P. aeruginosa* als Erreger akuter nosokomialer, d. h. im Krankenhaus erworbener, Infektionen zuteil. Betroffen sind insbesondere immunsupprimierte Patienten in der Intensivmedizin. Die Prävalenz von nosokomial infizierten Patienten auf Intensivstationen liegt bei etwa 15 bis 25% (Rüden et al., 1996 und Vincent et al., 1995), wobei eine Mortalität von 16,3% erreicht wird (Sanchez-Velazquez, 2006). Untersuchungen des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) ergaben, dass in Deutschland *P. aeruginosa* 9,7% dieser Infektionen hervorruft und damit nach *Staphylococcus aureus* (13,3%), *Enterococcus* spp. (11,0%) und *E. coli* (11%) der vierthäufigste Erreger nosokomialer Infektionen ist (Steinbrecher, et al., 2000). Bei der häufigsten nosokomialen Infektion auf Intensivstationen, der Beatmungs-assoziierten Pneumonie, war *P. aeruginosa* mit 11,1% als zweithäufigster Erreger nach *S. aureus* (16,6%) nachzuweisen. Darüber hinaus sind über 90% der Todesfälle bei Patienten mit cystischer Fibrose auf chronische *P. aeruginosa*-Infektionen der Lunge zurückzuführen (siehe unten, Cystic Fibrosis Foundation, 2002).

### 1.2.1 Cystische Fibrose

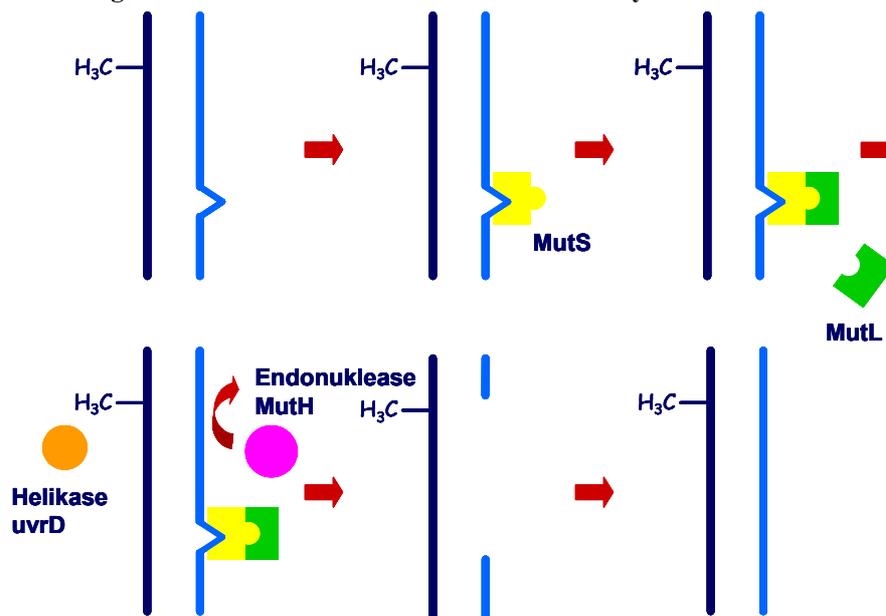
Bei der cystischen Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, handelt es sich um die häufigste autosomale, rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit (Koch u. Hoiby, 1993). In Deutschland ist eine von 2000 Geburten betroffen. Die Krankheit äußert sich in Funktionsstörungen aller exokrinen Drüsen, wobei in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt große Mengen viskoser Sekrete produziert werden. In der Lunge führt dies zu einer progressiven Erkrankung mit partieller bis vollständiger Verstopfung. Noch vor wenigen Dekaden starben CF-Patienten im frühen Kindesalter auf Grund einer unzureichenden Absorption von Nährstoffen. Heute erreichen sie das junge Erwachsenenalter, während dessen in fast allen Fällen die Lunge chronisch durch *P. aeruginosa* infiziert wird. Im Zuge dieser Infektion vollzieht sich eine autarke Evolution eines Stammes in der Lunge des Patienten, wobei eine phänotypische Adaption beobachtet werden kann und häufig über Jahre hinweg wenige verwandte Stämme (Subklone) nachweisbar bleiben, deren Eradikation sich als

förmlich unmöglich erweist (Römling, 1994). Für gewöhnlich werden CF-Patienten unabhängig voneinander von nicht miteinander verwandten Stämmen infiziert. In den letzten Jahren wurde in einigen Fällen die klonale Ausbreitung von hochvirulenten multiresistenten *P.-aeruginosa*-Stämmen bei CF-Patienten nachgewiesen. In diesem Zusammenhang tut sich der Liverpool Epidemic Strain (LES) besonders hervor, welcher in einer britischen Studie in 48% von 31 CF-Zentren nachzuweisen war und nicht nur bei CF-Patienten Superinfektionen sondern auch bei zwei nicht-CF-Patienten Infektionen zu verursachen vermochte (Cheng, 1996, Jones et al. 2001, Scott, 2004, McCallum et al. Lancet 2001, McCallum et al. 2002).

### 1.2.2 Mutatorphänotyp

Für die Evolution von *P.-aeruginosa*-Stämmen während der chronischen Infektion der Lunge von CF-Patienten scheint der Mutatorphänotyp eine zentrale Rolle zu spielen (Oliver et al., 2000). Der Mutatorphänotyp ist gekennzeichnet durch eine erhöhte spontane Mutationsrate, die zumeist auf Defekten in Genen beruht, welche in das DNA methyl-directed mismatch repair system (MMR System) involviert sind. Dieses Reparatursystem ist ubiquitär bei pro- und eukaryontischen Zellen und dient u. a. der Korrektur von bei der Replikation entstandenen Fehlern (Schofield u. Hsieh, 2003). Bei klinischen *P.-aeruginosa*-Stämmen wurden Defekte in den MMR Genen *mutS*, *mutL* oder *uvrD* als Ursache für die Ausprägung eines Mutatorphänotyps identifiziert (Oliver et al., 2002). In *E. coli* konnte die Funktion dieser Genprodukte bestimmt werden (Abbildung 1.1).

Abbildung 1.1 Schema zur Funktionsweise des MMR Systems



Dargestellt ist ein DNA-Doppelstrang nach der Replikation. Der linke methylierte Strang diente als Matritze, der rechte neu synthetisierte Strang enthält eine Insertion. Nähere Erläuterungen siehe Text.

MutS erkennt nicht-komplementäre Basenpaare sowie Insertionen und Deletionen in einem Umfang von 1-4 Nukleotiden. Im Folgenden rekrutiert MutS MutL, um einen Komplex zu bilden, welcher die Aktivierung von MutH, einer Endonuklease, und einer DNA Helikase II (entspricht dem *uvrD* Genprodukt) bewirkt.

In einer Studie aus dem Jahr 2000 wurde bei elf von 30 chronisch infizierten CF-Patienten (37%) ein *P.-aeruginosa*-Mutatorstamm nachgewiesen, während bei 75 Patienten ohne diese Erbkrankheit und mit akuten Infektionen kein Stamm mit Mutatorphänotyp gefunden wurde (Oliver et al. 2000). Die (Rifampicin-Resistenz vermittelnde) spontane Mutationsfrequenz der Mutatorstämme war im Vergleich zu der der Wildtypstämme um ca. zwei Zehnerpotenzen erhöht ( $3,2 \pm 2,5 \times 10^{-6}$  versus  $2,9 \pm 2,5 \times 10^{-8}$ ). Nachfolgende Untersuchungen mit Stämmen, die gleichfalls chronische Lungeninfektionen bei Patienten mit anderen zu Grunde liegenden Erkrankungen (Bronchiektasie (dauerhafte Erweiterung von Bronchialästen) und Chronic Obstructive Pulmonary Disease (chronische obstruktive pulmonale Krankheit (COPD)) verursachen, lieferten mit 17 von 30 durch Mutatorstämme infizierten Patienten (57%) vergleichbare Ergebnisse (Maciá et al. 2005). Es wurde postuliert, dass erhöhte Mutationsfrequenzen in der Adaption an eine heterogene und fluktuierende Umwelt, wie sie in der Lunge eines chronisch infizierten Patienten nicht zuletzt durch häufige und wechselnde Behandlungen mit Antibiotika vorliegt, einen Selektionsvorteil mit sich bringen. Der Mutatorphänotyp scheint eine Schlüsselfunktion für eine lang andauernde Persistenz zu spielen und wurde als treibende Kraft bei der Entwicklung von Multiresistenz bei chronischen Infektionen identifiziert. Bei akuten Infektionen hingegen scheinen Mutatorstämme äußerst selten zu sein. In einer Studie mit Isolaten von akut infizierten Intensivpatienten konnten keine Hinweise auf die Koselektion von Hypermutation und Antibiotikaresistenz gefunden werden (Gutiérrez et al. 2004).

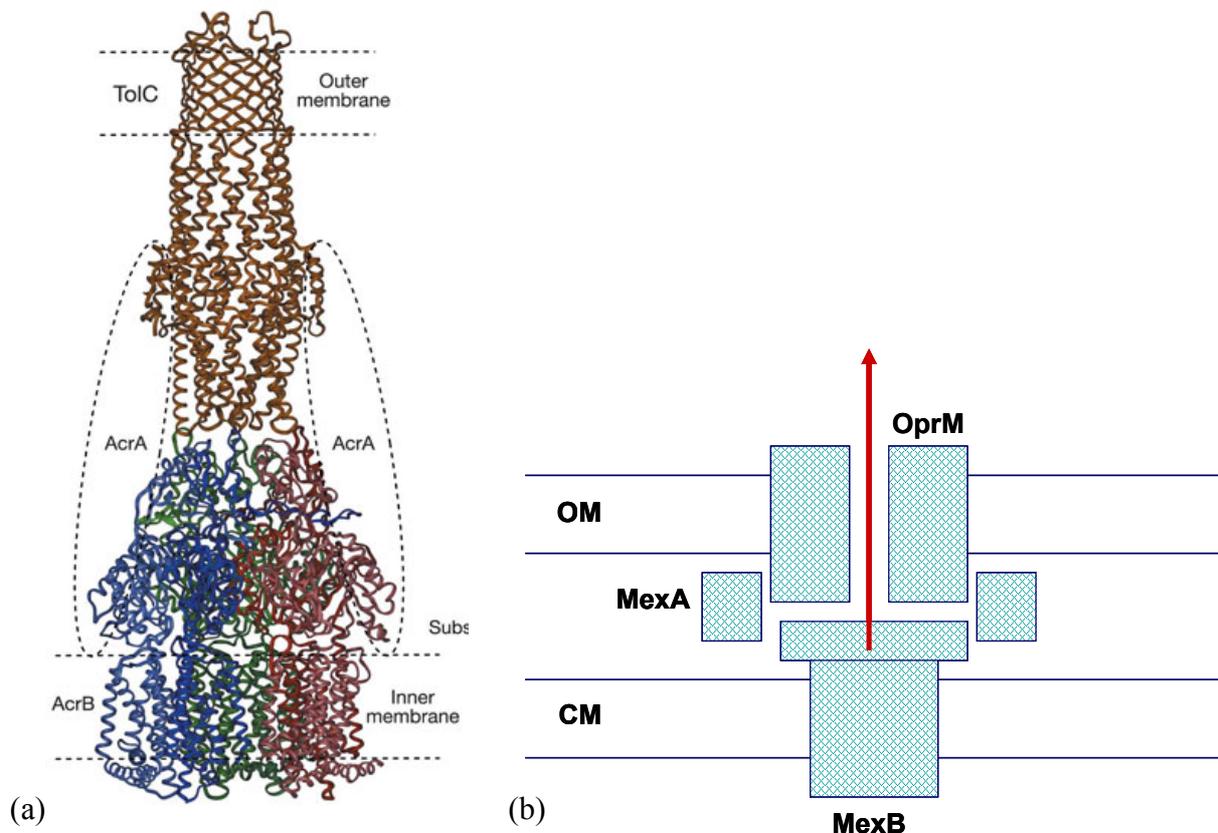
### 1.3 Natürliche Resistenz von *P. aeruginosa*

Die natürliche Resistenz bei *P. aeruginosa* resultiert aus dem Zusammenspiel dreier Eigenschaften: Der im Vergleich zu anderen gram-negativen Krankheitserregern geringeren Permeabilität der äußeren Membran, dem Vorhandensein von Breitspektrum-Effluxsystemen und der Ausstattung mit einer chromosomal kodierten, induzierbaren AmpC- $\beta$ -Laktamase (Li et al. 2000, Sanders u. Sanders, 1992). In der Vergangenheit wurde allein der verminderten Permeabilität der äußeren Membran, die um 92% geringer als bei *E. coli* ist, die natürliche Resistenz von *P. aeruginosa* zugerechnet. Diese Bedeutung wurde mit der Entdeckung der Efflux-Systeme relativiert (Nikaido, 1996).

Bei *P. aeruginosa* konnten bislang sieben Effluxsysteme der **Resistance-Nodulation/(Cell)-Division (RND)** -Familie charakterisiert werden. Bezeichnend für diese Systeme ist ein sehr breites Spektrum an Substraten, die strukturell keinesfalls verwandt sind. Es wurde neben dem Transport diverser Antibiotika auch ein Transport von Biociden, organischen Lösungsmitteln, toxischen Säuren und Lipiden, metabolischen Inhibitoren und Quorum-Sensing-Effektor-Molekülen durch Mitglieder der RND Familie nachgewiesen (als Übersicht in Morita et al., 2006). Es handelt sich um 3-Komponenten-Systeme, die sich aus einem die Zytoplasmamembran durchspannenden Protonenpotential nutzenden Antiporter (z.B. MexB), einem Tunnel-bildenden Protein (auch Efflux-Porin genannt) in der äußeren Membran (z.B. OprM) und einem Membranfusionsprotein im Periplasma (z.B. MexA) zusammensetzen (Nikaido, 1996).

#### Abbildung 1.2. Aufbau von RND-Effluxsystemen

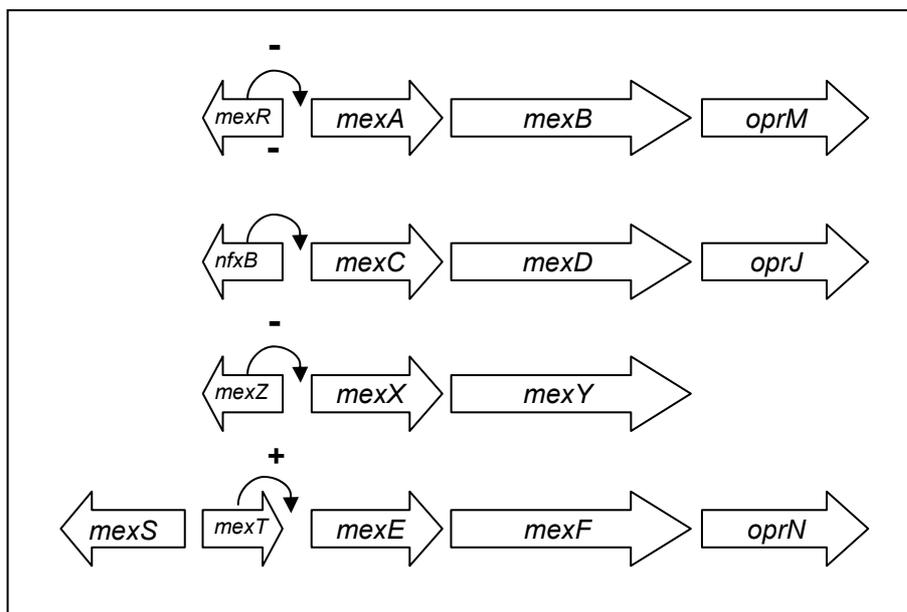
(a) Anhand von Kristallstrukturen entworfenes Modell zum AcrB–AcrA–TolC Effluxsystem von *E. coli* (Murakami et al., 2002). (b) Schema zu den entsprechenden Komponenten der RND-Effluxsysteme bei *P. aeruginosa* am Beispiel von MexAB–OprM. AcrB, MexB: Antiporter; TolC, OprM: Tunnel-bildendes Protein; AcrA, MexA: Membranfusionsprotein; OM: äußere Membran, CM: Zytoplasmamembran.



Für vier der Effluxsysteme - MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ und MexEF-OprN - wurde eine signifikante Bedeutung bei der natürlichen sowie der durch Mutation erworbenen Resistenz nachgewiesen (Köhler et al., 1997, Mine et al., 1999, Poole et al., 1993,

1996). MexAB-OprM und MexXY-OprM werden konstitutiv auf niedrigem Niveau produziert und tragen zur natürlichen Resistenz beim Wildtyp bei. MexCD-OprJ und MexEF-OprN dagegen werden nicht beim Wildtyp produziert und spielen keine Rolle für die natürliche Resistenz (Aires et al., 1999, Gotoh et al., 1994, Hosakah et al., 1995, Köhler et al., 1997). Die Strukturgene der individuell regulierten Effluxsysteme sind in Operons organisiert, welche jeweils unter der Kontrolle eines in umgekehrter Leserichtung kodierten Regulators stehen (Abbildung 1.3). Bis auf MexT, dem Regulator des *mexEF*-OprN-Operons, fungieren diese als Repressoren.

**Abb. 1.3:** Schema zur Regulation der untersuchten Effluxsysteme, Erörterungen siehe Text.



Nicht zuletzt gehört die chromosomale AmpC- $\beta$ -Laktamase zu den natürlichen Resistenzmechanismen bei *P. aeruginosa*. Das induzierbare Enzym, welches gegenüber allen handelsüblichen  $\beta$ -Laktamase-Hemmern unempfindlich ist, hydrolysiert über einen Serin-Rest im katalytischen Zentrum diverse  $\beta$ -Laktame (Livermore, 1995). Es vermittelt natürliche Resistenz gegenüber Ampicillin und sog. narrow-spectrum Cephalosporinen (= Gruppe 1 der Cephalosporine mit eingeschränktem Wirkspektrum gegenüber Gram-negativen Bakterien, Vogel et al., 1999), die gegenüber dem Enzym labil sind und es zugleich stark induzieren. Piperacillin und Cefotaxim sind schlechtere Induktoren der AmpC- $\beta$ -Laktamase. Da die Substanzen weniger labil sind, bleibt beim Wildtyp eine Wirksamkeit gewährleistet. Carbapeneme induzieren die Expression von AmpC stark, sind aber nur marginal (Imipenem) oder in keiner Form (Meropenem) labil gegenüber dem Enzym (Livermore, 1995). Die Induktion der AmpC- $\beta$ -Laktamase erfolgt durch einen komplexen Mechanismus. Das verantwortliche System wurde für Enterobacteriaceen (*Enterobacter cloacae* und *Citrobacter*

*freundii*) aufgeklärt. Später konnten die beteiligten Strukturen auch in *P. aeruginosa* nachgewiesen werden (Langae et al. 1998, 2000). Die Induktion wird bei den Enterobacteriaceen nach dem folgenden Prinzip bewirkt: Durch die Aktivität des  $\beta$ -Laktams kommt es zu einem Ungleichgewicht im Mureinstoffwechsel (siehe unten). Unter Einfluß des induzierenden  $\beta$ -Laktams akkumulieren Abbauprodukte des Mureins, die über eine Permease, AmpG, ins Cytoplasma transportiert werden, um sie dem Peptidoglykan-Recycling zukommen zu lassen. Dort werden sie unter anderem durch die N-Acetyl-Anhydromuramyl-L-Alanin-Amidase AmpD gespalten. Ist AmpD durch große Substratmengen abgesättigt, so induziert eines der Substrate, vermutlich das Anhydro-Murosaccharid-Pentapeptid die Expression von AmpC. Die Induktion erfolgt durch die Wechselwirkung des Signalmoleküls mit dem Transkriptionsregulator AmpR. Dieser Regulator dient normalerweise unter der Bindung eines Mureinvorläufermoleküls als Repressor von *ampC*. Vermutlich verdrängt das Signalmolekül unter induzierenden Bedingungen das Mureinvorläufermolekül vom Regulator, wodurch AmpR zum Aktivator des  $\beta$ -Laktamase-Gens werden kann (als Übersicht in Wiegand, 2003).

Kürzlich wurde in *P. aeruginosa* eine weitere chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamase charakterisiert, die nicht signifikant zur natürlichen Resistenz beizutragen scheint (Girlich et al. 2004). Die Oxacillinase OXA-50 (Annotationsnummer PA5514 des *Pseudomonas* Genome Project, <http://www.pseudomonas.com/>), die ein Jahr später erneut unter dem Namen PoxB (**P**seudomonas **O**xacillinase) veröffentlicht wurde (Kong et al. 2005), wird im Gegensatz zu anderen chromosomalen Oxacillinasen konstitutiv gebildet und hydrolysiert u. a. Ampicillin, Benzylpenicillin, Piperacillin und, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, Imipenem. Die Verwandtschaft von OXA-50 zu anderen Oxacillinasen ist recht gering, die größte Homologie besteht mit OXA-23 und OXA-27 von *Acinetobacter baumannii*.

Aus dem Zusammenspiel der niedrigen Permeabilität der äußeren Membran, der konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimierten Effluxsysteme MexAB-OprM und MexXY-OprM und der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase resultiert der natürliche Resistenzphänotyp von *P. aeruginosa*. Dieser zeichnet sich durch Resistenz gegenüber den folgenden  $\beta$ -Laktamen aus: Aminopenicilline, (auch in Kombination mit der als  $\beta$ -Laktamase-Hemmer eingesetzten Clavulansäure), Cephalosporine der Gruppen 1 und 2 (wie Cefazolin und Cefuroxim) sowie Cephalosporine der Gruppe 3a (wie Cefotaxim und Ceftriaxon). Darüber hinaus wird Resistenz gegenüber Tetrazyklinen, Chloramphenicol, Makroliden und Lincosamiden vermittelt.

## 1.4 Therapie von *P.-aeruginosa*-Infektionen

Auf Grund der natürlichen Resistenz von *P. aeruginosa* steht dem behandelnden Arzt nur ein beschränktes Arsenal an Antibiotika für die Therapie zur Verfügung. Zu diesem zählen folgende  $\beta$ -Laktame: die Carbapeneme Imipenem und Meropenem, das Ureidopenicillin Piperacillin, das Carboxypenicillin Ticarcillin und das Cephalosporin Ceftazidim. Desweiteren können auf Grund der natürlichen Sensibilität von *P. aeruginosa* Chinolone (Ciprofloxacin) und Aminoglykoside (Gentamicin) eingesetzt werden.

An dieser Stelle sollen die  $\beta$ -Laktame Ceftazidim und Meropenem, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Simulationen therapeutischer Bedingungen im *in-vitro* Modell (siehe 2.2.9) ausgewählt wurden, vorgestellt werden. Ceftazidim wurde 1984 auf den Markt gebracht und zählt zur Gruppe 3b der Cephalosporine (Vogel et al., 1999). Die Substanz zeichnet sich im Gegensatz zu vielen anderen Cephalosporinen durch Aktivität gegenüber *P. aeruginosa* aus, eine Monotherapie wird allerdings nicht uneingeschränkt empfohlen, da der Substanz ein hohes Resistenzselektionspotential zugeschrieben wird (Cunha, 2002). Meropenem wurde 1996 zugelassen und gilt als Reservesubstanz zur initialen Behandlung lebensbedrohlicher Krankheitsverläufe. Bei dem Carbapenem handelt es sich um ein Breitspektrum Antibiotikum, das gute Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Erregern einschließlich der Anaerobier aufweist und zugleich über ein sehr geringes Resistenzselektionspotential verfügt (Vogel et al., 1999, Cunha, 2002).

## 1.5 Erworbene Resistenz

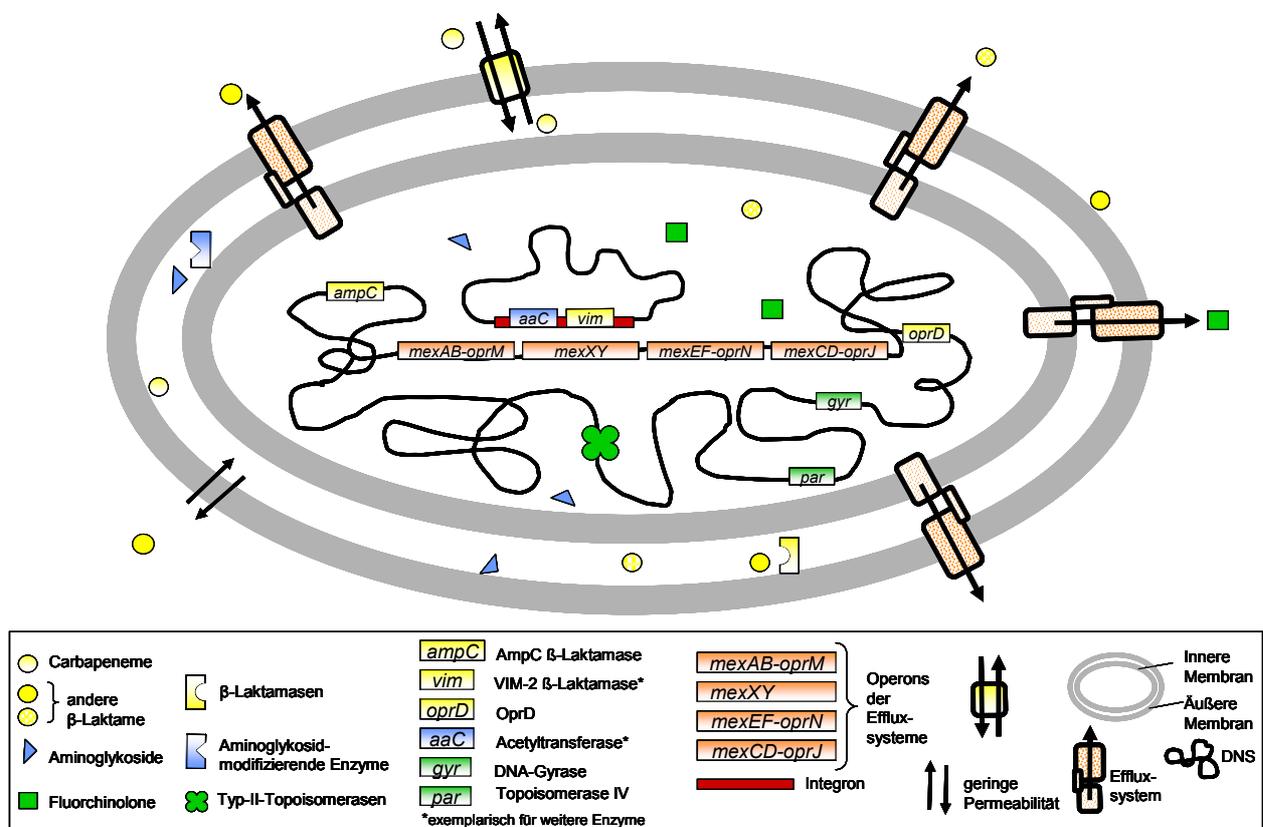
Erworbene Resistenzmechanismen können bei *P. aeruginosa* Resistenz bzw. eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber allen oben genannten zur Therapie geeigneten Substanzen vermitteln. In der Abbildung 1.4 ist eine *P.-aeruginosa*-Zelle schematisch dargestellt, in der alle Strukturen, die von Resistenz vermittelnden Mutationen betroffen sein können, sowie exemplarisch einige erworbene Resistenzdeterminanten zusammengefasst sind. Je nach Mechanismus und Mechanismuskombination treten diverse Kreuzresistenzen auf, welche in einem Multiresistenzphänotyp resultieren können.

### 1.5.1 Durch Mutation erworbene Resistenz

Zu den durch Mutation erworbenen Resistenzmechanismen zählen die Überexpression bzw. Expression der Efflux-Systeme MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ und MexEF-OprN, die Überexpression der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase, die verminderte Expression bzw. der Verlust des in der äußeren Membran lokalisierten Porins OprD und die Modifikationen der Typ-II-Topoisomerasen. Die Überexpression bzw. Expression der Efflux-

Systeme führt zu Kreuzresistenz bzw. verminderter Empfindlichkeit gegenüber einer Reihe von  $\beta$ -Laktamen (Piperacillin, Ticarcillin, Ceftazidim, Meropenem), Aminoglykosiden und Chinolonen (als Übersicht in Livermore, 2002). Die Derepression von *ampC* vermittelt Kreuzresistenz bzw. verminderte Empfindlichkeit gegenüber Piperacillin, Ticarcillin und Ceftazidim (Livermore, 1995). Der Verlust von OprD hingegen führt nur bei Carbapenemen zu verminderter Empfindlichkeit, und Modifikationen bei Typ-II-Topoisomerasen verursachen nur gegenüber Chinolonen Resistenz (Livermore, 2002).

Abbildung 1.4: Schematische Übersicht zu den erworbenen Resistenzmechanismen bei *P. aeruginosa*, Erläuterungen siehe Text.



### 1.5.1.1 Überexpression von Effluxsystemen

Die Überexpression von MexAB-OprM ist ein häufiger und wichtiger Resistenzmechanismus bei *P. aeruginosa* und wird zumeist durch Mutationen im Repressor MexR des *mexA-mexB-oprM* Operons (*nalB*-Mutanten) verursacht. MexR ist ein Mitglied der MarR-Familie, umfasst 147 Aminosäure-Reste und koreguliert die Expression des eigenen Gens sowie die von *mexA-mexB-oprM*. Diese Koregulation geschieht durch Bindung von MexR als Homodimer im Intergenbereich zwischen *mexR* und *mexA*, in dem die gemeinsame Operator-Promotor-Region lokalisiert ist. (Evans et al., 2001). Das Gen *oprM*, welches innerhalb des Operons unmittelbar hinter dem *mexB* lokalisiert ist, kann zusammen mit den

beiden anderen Strukturgenen oder unabhängig von diesen, über einen innerhalb der *mexB*-Sequenz liegenden Promotor exprimiert werden (Zhao et al. 1998). Unlängst konnten zwei weitere, seltenere Mechanismen identifiziert werden, die eine Überexpression von MexAB-OprM verursachen: Modifikationen in *NalC* (Annotationsnummer PA3721), dem zur TetR-Familie zählenden Repressor eines Operons mit zwei Genen PA3720-PA3719, verursachen offensichtlich durch die erhöhte Expression von PA3719 eine Überexpression von MexAB-OprM (*nalC*-Mutanten, Cao et al. 2004). In *nalD*-Mutanten sind Modifikationen in einem Repressor PA3574 (*NalD*), der wahrscheinlich ebenfalls der TetR-Familie zuzuordnen ist, für eine Überexpression des Effluxsystems verantwortlich (Sobel et al. 2005).

Die Überexpression von *mexX* und *mexY*, den Strukturgenen des Membranfusionsproteins und des Antiporters des Effluxsystems MexXY-OprM, wird wie bei *nalC*-Mutanten durch Modifikationen im Repressor des gemeinsamen Operons, *MexZ*, verursacht. *MexZ* gehört ebenso wie *NalC* zur TetR-Familie und bindet als Homodimer am Operator des Operons. Bemerkenswert ist, dass das MexXY-OprM Effluxsystem als einziges der bei *P. aeruginosa* relevanten Effluxsysteme Aminoglykoside aus der Zelle schleusen kann. Darüber hinaus ist es das einzige System, das durch ein Antibiotikum induzierbar ist und wird in Zusammenhang mit der adaptiven Aminoglykosid-Resistenz gebracht, welche bei *P. aeruginosa* beobachtet wurde (Hocquet et al., 2003). Eine unmittelbare Induzierung durch Aminoglykoside als Liganden von *MexZ* konnte ausgeschlossen werden, der Mechanismus der Induzierung harrt noch seiner vollständigen Aufklärung (Morita et al., 2006).

Die Expression des beim Wildtyp nicht exprimierten Effluxsystems MexCD-OprJ ist auf Modifikationen im Repressor *NfxB* zurückzuführen. *NfxB* gehört zur Familie der LacI/GalR-Repressoren (Poole et al. 1996), welche wie die oben genannten Regulatoren als Homodimer am Operator des Operons binden. Für *nfxB*-Mutanten wurde eine Hypersensibilität gegenüber dem Carbapenem Imipenem festgestellt (Masuda et al. 1996), deren Ursache noch ungeklärt ist. Eine Beteiligung von *AmpC* und *OprD* konnte aber bereits ausgeschlossen werden (Wolter et al. 2005).

Das Operon, welches für die Strukturgene von MexEF-OprN kodiert, wird im Gegensatz zu den anderen relevanten Effluxsystemen durch *MexT* positiv reguliert. Bei sogenannten *nfxC*-Mutanten kommt es zu einer Koregulation von MexEF-OprN und dem Porin *OprD*, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist (siehe unten). Dabei wird die Expression des Effluxsystems hochreguliert und die Expression des Porins *OprD* höchstwahrscheinlich auch auf transkriptionaler Ebene herunterreguliert (Köhler et al., 1999, Ochs et al., 1999). *MexT* gehört zur Familie der LysR-Regulatoren, der größten prokaryontischen Regulator-Familie deren

Mitglieder als Homodimer oder Homotetramer agieren (Maseda et al., 2000). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass es nur dann zur Expression von MexEF-OprN kommt, wenn MexT intakt ist und in MexS, einer Oxidoreduktase, die unmittelbar vor *mexT* kodiert wird und unter Kontrolle von MexT steht, Modifikationen vorliegen (Sobel et al., 2005). Dies ist das erste Beispiel für eine Veränderung in einem nicht regulatorischen Locus, der für die Überexpression eines Effluxsystems in *P. aeruginosa* verantwortlich ist.

### 1.5.1.2 Verlust des Porins OprD

Der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber Carbapenemen bei *P. aeruginosa* ist der Verlust des Porins OprD (**o**uter membrane **p**roteine), welcher zumeist auf Mutationen in *oprD* beruht (Pai et al., 2001). Dabei kommt es zur Resistenz gegenüber Imipenem, aber nur zu verminderter Empfindlichkeit gegenüber Meropenem. Porine sind wassergefüllte Tunnel, die die äußere Membran durchspannen und für die Semipermeabilität der Membran verantwortlich sind. OprD gehört zu den substratspezifischen Porinen und dient der Aufnahme von basischen Aminosäuren. Für kleinere Substrate scheint es aber auch als unspezifisches generelles Porin zu fungieren (Hancock u. Brinkman, 2002). OprD umfasst 420 Aminosäurereste und besteht aus 16 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, welche durch acht kurze periplasmatische Windungen und acht externen längere Schleifen (L1-L8) verbunden sind. Während die Schleifen L2 und L3 für die Bindung von basischen Aminosäuren und Imipenem verantwortlich gemacht werden, wird vermutet, dass L7 die Empfindlichkeit gegenüber Meropenem moduliert (Huang et al., 1995, Huang u. Hancock, 1996, Ochs et al., 2000, Epp et al., 2001). In einer Studie von 2002, in welche insgesamt 55 weltweit gesammelte klinische und aus der Umwelt stammende Isolate von *P. aeruginosa* einbezogen worden waren, wurde für OprD eine auf Rekombinationsereignissen beruhende Mosaikstruktur nachgewiesen. Diese Mosaikstruktur war auf intraspezifische (und evtl. auch interspezifische) rekombinatorische Austausche in einer Größenordnung von 100-300 bp zurückzuführen. Anhand Aminosäure-Sequenzhomologien wurden dabei drei OprD-Gruppen (A, B, C,) mit Homologien von 88-93% zusammengefasst, wobei die Gruppe C wiederum in zwei Untergruppen C1 und C2 aufgeteilt werden konnte (Pirnay et al., 2002).

### 1.5.1.3 Überexpression von AmpC

Eine aktuelle Studie mit klinischen Stämmen ergab, dass eine konstitutive Überexpression der chromosomalen *AmpC*- $\beta$ -Laktamase bei *P. aeruginosa* zumeist durch Inaktivierung der Amidase AmpD (siehe 1.3) verursacht wird und Mutationen im Regulator AmpR keine Rolle spielen (Juan et al., 2005). Desweiteren zeigte die Studie auf, dass AmpE, dessen Gen

zusammen mit *ampD* auf einem bicistronischen Operon kodiert wird und als sensorisches Transduktionsmolekül agieren soll, eine indirekte Rolle bei der Induktion spielt. Zuletzt wurde postuliert, dass weitere unbekannte Genprodukte in die Überexpression der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase bei *P. aeruginosa* involviert sind.

#### **1.5.1.4 Typ-II-Topoisomerasen DNA-Gyrase und Topoisomerase IV**

Modifikationen in den Zielstrukturen, den Typ-II-Topoisomerasen DNA-Gyrase und Topoisomerase IV, sind die häufigsten Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen bei *P. aeruginosa* (Jalal u. Wretling, 1998). Diese Modifikationen werden durch Mutationen in den Genen *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* verursacht. Die meisten dieser Mutationen sind in dem Gen *gyrA* lokalisiert. Dieses Gen kodiert für die A-Untereinheit der DNA-Gyrase, der primären Zielstruktur der Fluorchinolone bei Gram-negativen Bakterien. Diese Mutationen liegen zumeist innerhalb der QRDR (quinolone resistance-determining region) und betreffen die Codons 83 und 87, die für die Aminosäuren Threonin und Aspartat kodieren. Für das Erreichen hoher Fluorchinolonresistenz sind bei *P. aeruginosa* neben Doppel-Mutationen in *gyrA* auch Modifikationen in der ParC-Untereinheit der Topoisomerase IV, der sekundären Zielstruktur der Chinolone, essentiell.

#### **1.5.2 Durch erworbene Resistenzgene vermittelte Resistenz**

Über mobile genetische Elemente werden Resistenzgene in die Zelle eingebracht (1.5.2.4). Unter diesen sind Aminoglykosid-modifizierende Enzyme und zusätzliche  $\beta$ -Laktamasen für die Resistenz von *P. aeruginosa* von besonderer Bedeutung.

##### **1.5.2.1 Aminoglykosid-modifizierende Enzyme**

An Aminoglykosid-modifizierenden Enzymen (AME) treten Acetyltransferasen, Nukleotidyltransferasen und Phosphorylasen auf, die spezifische Amino- und Hydroxylgruppen der Aminoglykoside modifizieren und dadurch die Affinität des Antibiotikums an seine Zielstruktur signifikant reduzieren (Poole, 2005). N-Acetyltransferasen (AAC) nutzen Acetyl-CoenzymA als Donor und greifen Amino-Gruppen an, O-Nukleotidyltransferasen (AAD oder ANT) und O-Phosphotransferasen (APH) hingegen bedienen sich des ATPs als Donor und modifizieren Hydroxyl-Gruppen (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Kürzlich wurde die Variante einer N-Acetyltransferase (AAC(6')-Ib-cr) identifiziert, die neben Aminoglykosiden auch Chinolone zu modifizieren vermag und dadurch gegenüber zwei nicht verwandten Antibiotika-Gruppen zugleich Resistenz vermittelt (Robicsek et al., 2006). Die Gene Aminoglykosid-modifizierender Enzyme sind häufig

Plasmid-kodiert oder auf Transposons und in z. T. hoher Stückzahl als Genkassetten in Integrons (siehe unten) lokalisiert.

### 1.5.2.2 Erworbene $\beta$ -Laktamasen

Unter den  $\beta$ -Laktamasen wird eine äußerst heterogene Gruppe von Enzymen zusammengefasst, welche  $\beta$ -Laktame durch Hydrolyse inaktivieren. Diese Hydrolyse erfolgt bei Serin- $\beta$ -Laktamasen über einen katalytischen Serin-Rest und bei Metallo- $\beta$ -Laktamasen mit Hilfe von bivalenten  $Zn^{2+}$ -Ionen im katalytischen Zentrum. Eine Einteilung der  $\beta$ -Laktamasen in verschiedene Gruppen wird mit Hilfe des Klassifizierungssystems von Bush, Jacoby und Madeiros (BJM) entsprechend der Substratprofile und der Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren vorgenommen (Bush et al., 1995). Die ältere Klassifizierung nach Ambler beruht auf Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz und liefert ähnliche Ergebnisse (Ambler, 1980).

**Tabelle 1.1: Klassifizierung der  $\beta$ -Laktamasen (Bush, 2001)**

BJM-Gruppe	Untergruppe	Ambler-Klasse	Eigenschaften	Substrate	Hemmung	Beispiel
1		C	chromosomal kodiert bei Gram-negativen Bakterien, auch auf Plasmiden lokalisiert	alle $\beta$ -Laktame außer den Carbapenemen	keine Hemmung durch Clavulansäure	AmpC
2		A,D			zumeist durch Clavulansäure hemmbar	
	2a	A	Penicillinasen	Penicilline		BlaZ
	2b	A	Breit-Spektrum- $\beta$ -Laktamasen	Penicilline, Breit-Spektrum Cephalosporine		TEM-1
	2be	A	$\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL)	Oxyimino-Cephalosporine und Monobaktame		TEM-3 bis TEM-20, SHV-2, PER, VEB
	2br	A	Breit-Spektrum- $\beta$ -Laktamasen		nicht durch Inhibitoren hemmbar	TEM-30-TEM-40
	2c	A	Carbenicillinasen	Carbenicillin		PSE-1, PSE-4
	2d	D	sehr heterogene Gruppe	Cloxacillin		OXA-1
	2e	A	Cephalosporinasen	Cephalosporine	durch Clavulansäure hemmbar	FPM-1
2f	A	Serin-Carbapenemasen	Carbapeneme	durch Clavulansäure hemmbar	GES-1	
3	3a,3b,3c	B	Metallo-Enzyme	alle $\beta$ -Laktame außer den Monobaktamen	nicht durch Clavulansäure hemmbar	VIM-2
4		-	Unsequenzierte Enzyme, welche nicht in die anderen Gruppen einzuordnen sind.			

-: unbekannt

Neben der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase (und OXA-50) kann *P. aeruginosa* eine Vielzahl an erworbenen  $\beta$ -Laktamasen akquirieren: PSE-1- und PSE-4- $\beta$ -Laktamasen sind bei *P. aeruginosa* am häufigsten nachzuweisen (Livermore, 2002). Bei diesen Enzymen handelt es sich um Carbenicillinasen (BJM-Gruppe 2c), die durch Clavulansäure gehemmt werden. Seltener werden, die bei Enterobacteriaceen sehr verbreiteten TEM- $\beta$ -Laktamasen (BJM-Gruppe 2b) oder OXA- (BJM-Gruppe 2d) Oxacillinasen nachgewiesen.

Können diese  $\beta$ -Laktamasen noch durch den Einsatz von Carbapenemen, Ceftazidim, Cefepim und Monobaktamen umgangen werden, so sind die Therapiemöglichkeiten gegenüber extended-spectrum- $\beta$ -Laktamasen (ESBL), die immer häufiger und in immer neuen Varianten bei *P. aeruginosa* auftreten, sehr eingeschränkt. Zu diesen zählen die TEM- und SHV-Enzyme, deren Substratspektrum durch Aminosäureaustausche erweitert wurde, sowie die bislang nur vereinzelt auftretenden PER- und VEB- $\beta$ -Laktamasen, die allesamt als ESBL-Klasse-A- $\beta$ -Laktamasen der BJM-Gruppe 2be bezeichnet werden (Poirel et al., 2004). Die genauso klassifizierten CTX-M-Cefotaximasen gewinnen zusehends an klinischer Relevanz, ohne bislang in *P. aeruginosa* detektiert worden zu sein. Je nach ES- $\beta$ -Laktamase können nur noch Carbapeneme oder Monobaktame eingesetzt werden (Wiegand, 2003, Poirel et al., 1999).

Allerdings wurden in *P. aeruginosa* auch Carbapenemasen detektiert, zu denen die selten auftretenden GES- (BJM-Gruppe 2f) Serin-Carbapenemasen und die Metallo- $\beta$ -Laktamasen (BJM-Gruppe 3) zählen. Innerhalb der letzten Jahre nahmen weltweit in beunruhigender Weise die Funde von Metallo- $\beta$ -Laktamasen produzierenden gram-negativen nosokomialen Krankheitserregern inklusive *P. aeruginosa* stetig zu (Walsh et al., 2005). Metallo- $\beta$ -Laktamasen hydrolysieren bis auf Aztreonam sämtliche  $\beta$ -Laktame einschließlich der Carbapeneme. Die Produktion von Metallo- $\beta$ -Laktamasen stellt ein ernsthaftes therapeutisches Problem dar, nicht zuletzt, weil bis heute kein klinisch einsetzbarer Inhibitor dieser Enzyme bekannt ist.

Bei *P. aeruginosa* wurden bislang vier unterschiedliche Metallo- $\beta$ -Laktamase-Gruppen, VIM, IMP, SPM und GIM nachgewiesen. Derzeit sind 12 VIM- und 18 IMP-Varianten sowie jeweils 1 Variante von SPM und GIM bekannt. VIM- und IMP-Metallo- $\beta$ -Laktamasen sind weit verbreitet. Inzwischen wurden VIM-Determinanten in Asien, Nord- und Südamerika sowie diversen europäischen Staaten wie Portugal, Spanien, Griechenland, Frankreich, England, Schweden, Polen und Kroatien dokumentiert. IMP-Metallo- $\beta$ -Laktamasen konnten in Asien, Australien, Nord- und Südamerika und innerhalb in Europa in Großbritannien, Italien und Portugal nachgewiesen werden (als Übersicht in Walsh 2005). In Deutschland

wurde erstmals 2002 eine Metallo- $\beta$ -Laktamase beschrieben. Es handelte sich um den ersten und bislang einzigen Nachweis einer neuen Metallo- $\beta$ -Laktamase-Klasse, GIM (German Imipenemase), in Düsseldorf. GIM-Enzyme weisen innerhalb der Metallo- $\beta$ -Laktamasen die größte Homologie zu IMP-Enzymen auf (43,1%, 43,1% und 43,5% Homologie mit IMP-1, IMP-4 und IMP-6). Den VIM-Enzymen stehen sie mit 31,2% (VIM-7) bis 28,8 % (VIM-1) Homologie weniger nahe.

### 1.5.2.3 Sonstige Resistenzdeterminanten

In der variablen Region von Integrons wird neben AME- und  $\beta$ -Laktamase-Genen u.a. das Gen *cmlA* gefunden, das für ein Chloramphenicolresistenz vermittelndes Effluxprotein kodiert und zu den wenigen Genkassetten gehört, die mit einem eigenen Promotor ausgestattet sind (Bissonnette et al., 1991).

Ein aktuelles Phänomen ist das Auftreten von lange als unmöglich erachteter plasmidkodierter Chinolonresistenz. Das verantwortliche Protein Qnr ist ein Mitglied der Pentapeptide Repeat Family und verringert die Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen über einen Mechanismus der Zielstruktur-Protektion (Tran et al., 2005). Das „quinolone resistance“ Gen (*qnr*) wurde erstmals 1994 in *Klebsiella pneumoniae* isoliert. Inzwischen wurden die Varianten *qnrA*, *B* und *S* designiert und in den USA, Europa, dem nahen und fernen Osten in den Spezies *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Providencia stuartii*, *Salmonella* spp. und *Shigella flexneri* jedoch noch nicht in *P. aeruginosa* nachgewiesen (Cheung et al., 2005, Hata et al., 2005, Nordmann u. Poirel, 2005).

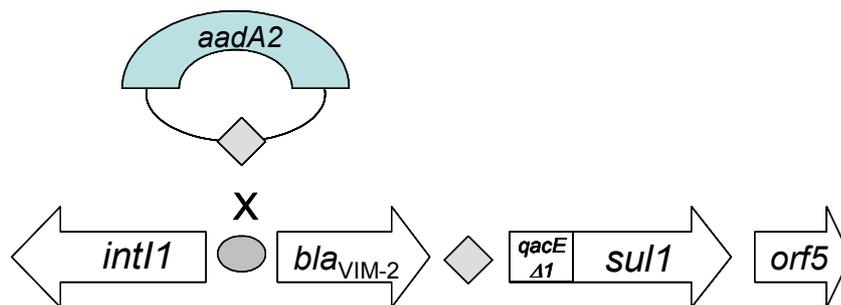
### 1.5.2.4 Lokalisation und Verbreitung von erworbenen Resistenzgenen bei *P. aeruginosa*

Plasmide sind zirkuläre DNA-Doppelstränge ( $3 \times 10^3 - 4,5 \times 10^5$  bp), die separat vom Chromosom repliziert werden und neben Resistenzdeterminanten u. a. auch Virulenzfaktoren beherbergen können (Kayser et al., 1998). Sie werden vertikal bei der Zellteilung an die Tochterzellen oder horizontal durch Konjugation weitergegeben. Der horizontale Transfer kann intra- und interspezifischer Natur sein (Waters, 1999). Das Bindeglied zwischen chromosomal- und Plasmid-kodierter Resistenz stellen mobile genetische Elemente dar. Mit Hilfe dieser können Resistenzgene vom Chromosom auf Plasmide transferiert und durch Konjugation verbreitet werden. Unter den mobilen genetischen Elementen, welche die unter 1.5.2.1-1.5.2.3 genannten Resistenzgene in die Bakterienzelle einbringen, nehmen für die Ausbreitung von Multiresistenz die Integrons eine herausragende Position ein. Integrons sind zumeist in Transposons der Tn21-Gruppe der Tn3-Familie lokalisiert oder liegen frei auf Plasmiden vor (Grinsted et al., 1990). Transposons der Gruppe Tn21 verfügen über eine

Transposase, TnpA, eine Resolvase, TnpR, eine *res*-Site (Resolution site) und zwei kurze „inverted repeats“ oder IRs an den Enden des Elements, die bei der replikativen Transposition von TnpA erkannt und gebunden werden (Liebert et al., 1999). Während der Transposition entsteht ein Kointegrat aus Donor- und Rezipienten-Replikon, das durch die Aktivität der Resolvase an der *res*-Site wieder gelöst wird. Zusätzlich kodiert Tn21 für Quecksilber-Resistenz- vermittelnde Gene (*mer*-Operon).

Als Integrons werden genetische Einheiten bezeichnet, die Komponenten eines Rekombinationssystems besitzen, die sie dazu befähigen, Gene, die in sog. Genkassetten vorliegen, zu akquirieren und zu mobilisieren (Hall u. Collis, 1995). Da Integrons über einen Promotor zu Expression der Genkassetten verfügen, dienen sie zugleich als natürliche Klonierungssysteme und Expressionsvektoren. Bislang wurden fünf Resistenz-Genkassetten enthaltende Integron-Klassen identifiziert. Unter diesen stellen die Klasse-1-Integrons die zugleich häufigste und am besten charakterisierte Gruppe dar (Abbildung 1.5):

**Abbildung 1.5: Schema zur Struktur eines Klasse-1-Integrons**



**Gene sind als Pfeile entsprechend ihrer Transkriptionsrichtung dargestellt. Der attI-Bereich wird durch eine Ellipse und das 59-Basenelement durch eine Raute symbolisiert. Oberhalb des Klasse-1-Integron ist eine freie zirkuläre Genkassette vor der Insertion abgebildet.**

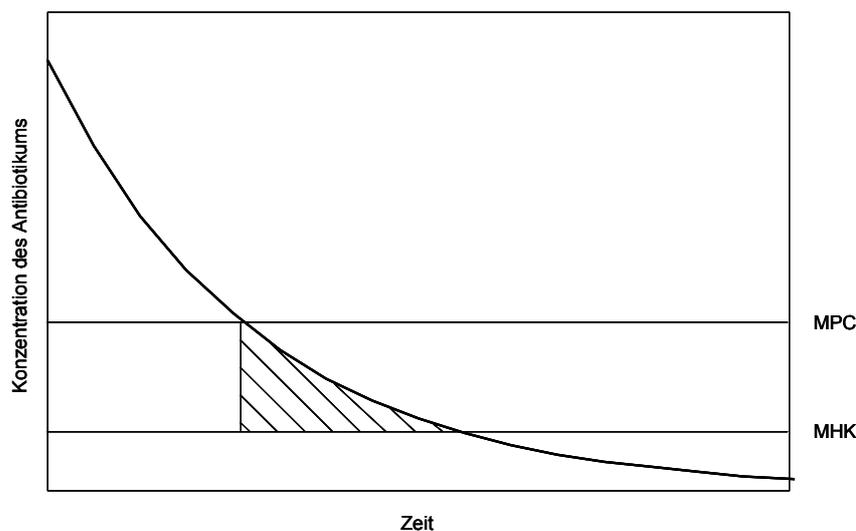
Zu den essentiellen Bestandteilen eines Klasse-1-Integrons gehören ein *int*-Gen, das für die ortsspezifische Integrase kodiert, der angrenzende *attI*-Bereich, der von der Integrase erkannt wird und an dem die Genkassetten inseriert werden sowie der bereits genannte Promotor. Diese stark konservierten Elemente im vorderen Bereich des Integrons werden als 5'-CS (5'-conserved segment) zusammengefasst. An den 5'-CS schießt sich der variable Bereich des Integrons an, in den Genkassetten, deren Anzahl und Art stark variiert, inseriert werden. Genkassetten bestehen aus einem Gen, welches meistens für Antibiotika-Resistenz kodiert, und einer spezifischen Rekombinationsstelle, dem 59-Basenelement. Sie liegen frei in zirkulärer Form vor und werden von der Integrase durch stellenpezifische Rekombination über den *attI*-Bereich und das 59-Basenelement eingefügt. In vielen Integrons liegt

stromabwärts der variablen Region ein zweiter konservierter Bereich, der als 3'-CS (3'-conserved segment) bezeichnet wird. Der 3'-CS umfasst die drei Gene *qacEΔ1*, *sull* und *orf5*. *qacEΔ1* kodiert für ein partiell funktionales Effluxprotein, das Resistenz gegenüber Ethidiumbromid sowie quaternären Ammonium-Verbindungen vermittelt (Paulsen et al., 1993), während *sull* für eine alternative Dihydropteroat-Synthase kodiert. Das für *orf5* postulierte Gen-Produkt besitzt Ähnlichkeit mit der Puromycin-Acetyltransferase aus *Streptomyces alboniger*; es ist unklar, ob das Gen exprimiert wird (Bissonnette u. Roy, 1992). Abwärts des 3'CS findet man häufig die Überreste von bis zu vier Transpositionsgenen (*tni*-Modul). Es konnte gezeigt werden, dass Integrons, bei denen alle vier Gene intakt sind, zur Transposition fähig sind (Brown et al., 1996).

## 1.6 Entstehung von Resistenz unter der Therapie

Die Entstehung von durch Mutationen verursachter Resistenz vollzieht sich gewöhnlich in mehreren Einzelschritten, wobei jede Mutation für sich die Antibiotika-Empfindlichkeit geringfügig verringert. Um diesen Vorgang zu verhindern, sollten in der Therapie Substanzen und Dosierungen gewählt werden, die weniger empfindlichen „Ein-Schritt-Mutanten“ (single-step mutants) keinen selektiven Vorteil einbringen. In diesem Zusammenhang wird die Hypothese des Mutanten-Selektionsfensters (mutant selection window) diskutiert (Abbildung 1.6).

**Abbildung 1.6: Mutanten-Selektionsfenster.** Dargestellt ist die Konzentrations-Zeit-Kurve eines Antibiotikums während der Elimination. MHK: Minimale Hemmkonzentration, MPC: Mutanten-Präventionskonzentration. Der schraffierte Bereich kennzeichnet das Mutanten-Selektionsfenster.



Das Mutanten-Selektionsfenster ist spezifisch für die Kombination eines Antibiotikums und eines Bakterienstamms und umfasst einen Konzentrationsbereich, dessen untere Grenze die Konzentration des Antibiotikums darstellt, durch die das Wachstum der meisten Wildtyp-Zellen verhindert wird (Drlica, 2003). Dementsprechend wird das Fenster oberhalb durch die Konzentration begrenzt, die das Wachstum der „Ein-Schritt-Mutante“ des Stammes verhindert. Die untere Grenze kann nahe der MHK des Stammes angesiedelt werden, während die obere begrenzende Konzentration, auch MPC (mutant prevention concentration) genannt, mit der MHK der „Ein-Schritt-Mutante“ korreliert werden konnte.

Eine Kombination von zwei Substanzen zur Therapie wird insbesondere bei *P. aeruginosa*-Infektionen eingesetzt und soll nicht nur synergistisch wirken, sondern auch die Entwicklung von Resistenz verhindern, da unter der Therapie nur Bakterienzellen mit mindestens zwei Resistenz-vermittelnden Mutationen selektiert werden können (Cunha, 2002).

Bei Mutatorstämmen (siehe 1.2.2) dürfte sich die Resistenzentwicklung, die durch die Akkumulation von Mutationen im Chromosom verursacht wird, wesentlich schneller vollziehen und zu Multiresistenz führen als bei Wildtypstämmen. Dies konnte in einer aktuellen Studie mit *P.-aeruginosa*-Stämmen von chronisch infizierten Patienten bestätigt werden. Von 33 Isolaten mit Mutatorphänotyp waren 42% multiresistent, während bei 29 parallel untersuchten Isolaten ohne Mutatorphänotyp keine Multiresistenz beobachtet werden konnte (Macia et al., 2005).

## 1.7 Aktuelle Situation zur Multiresistenz

Die Auswahl Therapieerfolg versprechender Substanzen wird weltweit zusehends durch den Erwerb weiterer Resistenzeigenschaften limitiert (Livermore, 2002). Angesichts dieser Problematik ist es von elementarer Bedeutung, die Resistenzentwicklung bei *P. aeruginosa* wachsam zu verfolgen. Den Grundstock bilden dabei epidemiologische Untersuchungen auf phänotypischer Ebene.

Die kontinuierliche Surveillance des Genars-Projektes (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance) ergab mit 6.150 *P. aeruginosa*-Isolaten aus sechs deutschen Krankenhäusern für den Zeitraum Januar 2002 bis Juni 2004 Resistenzraten gegenüber den  $\beta$ -Laktamen Meropenem, Ceftazidim und Piperacillin von 2,5%, 5,6% und 7,7% (entsprechend der DIN Richtlinien, Noll et al., 2005). Gegenüber Ciprofloxacin und Gentamicin waren 12,9% bzw. 16,3% der Isolate resistent. Multiresistenz (definiert als Resistenz gegenüber mindestens vier der genannten Substanzen) wurde bei 2,4% der Isolate festgestellt. Gegenüber 22 multiresistenten Isolaten war kein gängiges Antibiotikum mehr wirksam. Diese stammten gleichermaßen von CF-Patienten und Patienten mit anderen schwerwiegenden Erkrankungen.

Ansonsten zeichneten sich bei CF-Patienten deutlich höhere Resistenzraten ab. Im Vergleich zu anderen Patienten wurden bei diesen etwa doppelt so häufig Isolate mit einfacher Resistenz (33%/15%) und dreifacher Resistenz (8,2%/3,2%) nachgewiesen. Dieses Phänomen wird mit der intensiven Antibiotikabehandlung der chronisch infizierten CF-Patienten und dem häufigen Auftreten von Mutatorstämmen in diesem Patientenkollektiv in Verbindung gebracht (1.2.1, 1.2.2, 1.6).

In einer aktuellen, statistischen Studie konnten als Risikofaktoren für die Infektion mit einem multiresistenten *P. aeruginosa*-Stamm der Aufenthalt in einer Intensivstation (OR (odds ratio) 10,1), Bettlägerigkeit (OR 3,5), mindestens 2 invasive Vorrichtungen (künstliche Beatmung, Dauerkatheter, zentraler Venenkatheter) OR 13,9) und die Behandlung mit Breitspektrum-Cephalosporinen (OR 9,6) und Aminoglykosiden (OR 6,1) belegt werden (Aloush et al., 2006). Ein besonders hohes Risiko besteht für schwerkranke Patienten, die auf Intensivstationen liegen und mit mehreren Antibiotika behandelt werden. Die Infektion durch einen multiresistenten *P. aeruginosa* Stamm hat wiederum weiterer Behandlungen (OR 5,4) eine längere Verweildauer im Krankenhaus (OR 2) und eine erhöhte Mortalität (OR 4,4) zur Folge.

Um jedoch die Ursachen von Multiresistenz und deren Ausbreitung erfassen zu können, ist die Evaluierung der zu Grunde liegenden Resistenzmechanismen auf genotypischer Ebene unabdingbar. Die Ausbreitung von Multiresistenz kann sowohl horizontal durch die Übertragung mobiler genetischer Elemente - auch Spezies-übergreifend von Stamm zu Stamm - als auch bei mangelnder Hygiene klonal durch die Ausbreitung eines resistenten Stammes erfolgen. Allein durch den Erwerb eines Integrons (ausgestattet mit den Genen für eine  $\beta$ -Laktamase und ein Aminoglykosid-modifizierendes Enzym) und durch eine einzige Punktmutation (z.B. im Efflux-Regulatorgen *mexR*) kann ein *P.-aeruginosa*-Stamm mit multipler Resistenz entstehen, gegenüber dem kein gängiges Antibiotikum mehr eingesetzt werden kann.

Vor diesem Hintergrund ist es von äußerster Wichtigkeit, Antibiotika gegenüber dem gefürchteten Krankenhauskeim *P. aeruginosa* rational einzusetzen. Mehr Kenntnis vom Selektionsdruck, der von unterschiedlichen Substanzen und Substanzkombinationen ausgeht, mehr Kenntnis von der Häufigkeit der Resistenzmechanismen, der Lokalisation und Kombination ihrer kodierenden Gene und rechtzeitige Kenntnis neuer Resistenzmechanismen können einer Strategie zum optimalen Einsatz von Antibiotika gegenüber *P. aeruginosa* den Weg bereiten.

## **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst auf molekularer Ebene die aktuelle Situation zur Multiresistenz bei *P. aeruginosa* in deutschen Krankenhäusern erfasst werden. Es soll aufgezeigt werden, welche Resistenzmechanismen in welcher Kombination häufig vorkommen und dargelegt werden, welche Auswirkungen diese einzelnen Mechanismen auf die ausgeprägte Multiresistenz haben. Weiterführend soll mit Hilfe von *in-vitro*-Simulationen therapeutischer Antibiotika-Konzentrations-Zeitverläufe die Entstehung von durch Mutationen verursachter Resistenz unter der Therapie analysiert werden, um aufzuklären, durch den Einsatz welcher Antibiotika am ehesten Selektion von Multiresistenz verhindert werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterien

##### 2.1.1.1 Klinische *P.-aeruginosa*-Stämme

In Vorbereitung der in dieser Arbeit durchgeführten Studie wurden freundlicherweise 275 *P.-aeruginosa*-Stämme von den Zentren Hannover (n=160), Jena (n=78) und Ulm (n=37) des GENARS (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance) Projektes zur Verfügung gestellt und in einer Stammsammlung zusammengefasst. Die Stämme wurden in Krankenhäusern der Maximalversorgung im Untersuchungszeitraum Januar bis März 2004 von Patienten isoliert. Dank des Datentransfers innerhalb des GENARS-Projekts wurden zu allen Stämmen demographische Daten und MHK-Ergebnisse übermittelt. Diese wurden mit Hilfe der Datenbanksoftware „whonet“ der WHO verwaltet. Mit Hilfe einer Resistenzmusterabfrage wurden aus dem Kollektiv 33 multiresistente *P.-aeruginosa*-Stämme herausgefiltert, die eine reduzierte Empfindlichkeit (intermediär oder resistent entsprechend den Richtlinien der DIN (Deutsches Institut für Normierung)) gegenüber den Vertretern aller fünf in der Therapie bei *P. aeruginosa* einsetzbaren Antibiotika-Gruppen: Imipenem (Carbapeneme), Piperacillin (Penicilline), Cefazidim (Cephalosporine), Ciprofloxacin (Chinolone) und Gentamicin (Aminoglykoside) aufwiesen. Diese Stämme waren elf an cystischer Fibrose erkrankten sowie zehn Patienten ohne diese Erbkrankheit zuzuordnen. Lagen von den betroffenen Patienten weitere Stämme vor, so wurden diese ebenfalls für epidemiologische Fragestellungen in die Studie einbezogen. Zusätzlich wurde ein multiresistenter Stamm, der vom einem Patienten der TU Berlin stammte, untersucht.

Tabelle 2.1: Klinische *P.-aeruginosa*-Stämme

Zentrum	Patient	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter <sup>1</sup>	Belgdatum <sup>2</sup>	Abteilung	Art der Station	Materialart	Identnummer <sup>3</sup>
Hannover	I	m	36	18.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-09
Hannover	I	m	36	18.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-10*
Hannover	I	m	36	18.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-11
Hannover	C	f	15	19.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-16
Hannover	D	f	18	21.03.04	cystische Fibrose	n	Sputum	10-10-20
Hannover	D	f	18	21.03.04	cystische Fibrose	n	Sputum	10-10-22*
Hannover	G	m	28	19.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-25*
Hannover	C	f	15	19.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-26*
Hannover	H	m	37	24.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-35*
Hannover	H	m	37	24.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-36
Hannover	M	m	30	05.03.04	Infektionsstation	n	Sputum	12-09-47*
Hannover	J	m	28	05.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-09-58*
Hannover	J	m	28	05.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-09-60*
Hannover	J	m	28	05.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-09-61*
Hannover	E	m	26	06.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-09-62*
Hannover	E	m	26	06.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-09-63*
Hannover	M	m	30	05.03.04	Infektionsstation	n	Sputum	12-09-66*
Hannover	M	m	30	05.03.04	Infektionsstation	n	Sputum	12-09-80*
Hannover	F	f	26	11.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-07*
Hannover	F	f	26	11.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-08*
Hannover	D	f	18	11.03.04	cystische Fibrose	n	Sputum	12-10-16
Hannover	B	m	24	13.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-28
Hannover	B	m	24	13.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-29*
Hannover	B	m	24	13.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-44*
Hannover	L	f	29	15.03.04	Innere Medizin	n	Sputum	12-10-51*

Fortsetzung der Tabelle 2.1

Zentrum	Patient	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter <sup>1</sup>	Beigdatum <sup>2</sup>	Abteilung	Art der Station	Materialart	Identnummer <sup>3</sup>
Hannover	A	m	26	18.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-69*
Hannover	A	m	26	18.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-70*
Hannover	A	m	26	18.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-71*
Hannover	A	m	26	18.03.04	cystische Fibrose	a	Sputum	12-10-72*
Jena	K	m	18	30.01.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-64
Jena	O	f	22	06.02.04	Neurologie	i	Bronchoalveolar Lavage	10-10-68*
Jena	K	m	18	06.02.04	cystische Fibrose	a	Sputum	10-10-72*
Jena	R	m	77	08.02.04	Herz- und Gefäßchirurgie	n	Mittelstrahlurin	10-10-74*
Jena	O	f	22	11.02.04	Neurologie	i	Vaginalabstrich	10-10-77*
Jena	Q	m	64	25.02.04	Innere Medizin (Knochenmarkstransplantation)	i	Blutkultur	15-01-05*
Jena	N	kA	kA	24.02.04	interdisziplinäre Station	i	Bronchoalveolar Lavage	15-01-10*
Jena	P	kA	kA	04.05.04	Innere Medizin	i	Sputum	15-01-40*
Ulm	S	m	57	12.01.04	Infektionsstation	n	Sputum	12-09-03*
Ulm	U	m	62	06.02.04	Neurochirurgie	n	Trachealsekret	12-09-14*
Ulm	T	m	63	06.02.04	Anästhesiologie	i	Wundeiter	12-09-15*
Ulm	T	m	63	18.02.04	Abdominalchirurgie	n	Wundabstrich	12-09-24*
Berlin	U	m	70	09.10.03	Onkologie	i	Blutkultur	15-01-59*

<sup>1</sup>: Die Angaben beziehen sich auf den Patienten.; <sup>2</sup>: Datum der Empfindlichkeitsprüfung. Diese erfolgt in GENARS-Zentren in der Regel 2 Tage nach der Probenentnahme.; <sup>3</sup>: Die Identnummer dient als Stammbezeichnung und gibt Auskunft über den Standort der Dauerkultur. f: weiblich, m: männlich, a: ambulant, n: stationär (Normalstation), i: intensiv \*: multiresistenter Stamm, Definition siehe oben; kA: keine Angabe.

### 2.1.1.2 Labor- und Referenzstämme

In der Tabelle 2.2 sind Bakterienstämme zusammengefasst, die bei phänotypischen und genotypischen Untersuchungen als Kontrollstämme, als Teststämme in *in-vitro* Modellen oder bei Konjugationsexperimenten als Rezipienten eingesetzt wurden.

Tabelle 2.2: Referenz- und Laborstämme

Bakterienstamm	Verwendung	Charakteristika	Standort der Dauerkultur
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Kontrollstamm bei der MHK-Bestimmung	$\beta$ -Laktamase-positiv	04-10-34
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Kontrollstamm bei der MHK-Bestimmung	$\beta$ -Laktamase-negativ	04-10-03
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Kontrollstamm bei der MHK-Bestimmung	$\beta$ -Laktamase-positiv	04-10-06
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Kontrollstamm bei der MHK-Bestimmung	$\beta$ -Laktamase-negativ	04-10-07
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Kontrollstamm bei der MHK-Bestimmung		04-10-15
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Kontrollstamm bei der MHK-Bestimmung, beim Effluxpumpen-Inhibitionstest und bei der <i>algD</i> -PCR		04-10-11
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Teststamm bei <i>in-vitro</i> -Modellen, Kontrollstamm beim Effluxpumpen-Inhibitionstest	Wildtypstamm, gesamte Genomsequenz bekannt	15-01-54
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Rif <sup>R</sup>	Rezipient für Konjugationen	Rifampicin-resistent	15-01-58
<i>E. coli</i> W3110 <i>lac</i> <sup>-</sup> 3a Rif <sup>R</sup>	Rezipient für Konjugationen	<i>lac</i> <sup>-</sup> , Rifampicin-resistent	10-03-02
<i>P. aeruginosa</i> R20	Kontrolle beim Cephalosporinase-Inhibitionstest	AmpC Wildtyp	10-07-39
<i>P. aeruginosa</i> 1405 CON	Kontrolle beim Cephalosporinase Inhibitionstest	AmpC überproduziert	10-07-40
<i>Burkholderia</i> „ <i>cepacia</i> “ Komplex	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		05-10-33
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		08-08-57
<i>P. alcaligenes</i> NE 511	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		08-04-63
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		08-05-18
<i>P. mendocina</i> ATCC 25411	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		08-04-57
<i>P. putida</i> ATCC	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		04-10-47
<i>P. stutzeri</i> DSM 50288	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		08-03-50
<i>P. veronii</i> OSM 11331	Kontrolle bei <i>algD</i> -PCR		08-08-19
<i>E. coli</i> W3110	Referenz für <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	04-03-08
<i>E. coli</i> JM83 pBR322	Referenz für <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	10-03-05
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Referenz für <i>bla</i> <sub>PER-1</sub>	<i>bla</i> <sub>PER-1</sub>	15-01-55
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ p22K9	Referenz für <i>bla</i> <sub>GES-1</sub>	<i>bla</i> <sub>GES-1</sub> , <i>intI3</i>	15-01-76

Fortsetzung der Tabelle 2.2

Bakterienstamm	Verwendung	Charakteristika	Standort der Dauerkultur
<i>A. baumannii</i> <i>Ab VEB-1 AYE</i>	Referenz für <i>bla</i> <sub>VEB-1</sub>	<i>bla</i> <sub>VEB-1</sub>	15-01-75
<i>P. aeruginosa</i> B63230	Referenz für <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> , <i>cmlA</i> , <i>intI1</i>	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> , <i>cmlA</i> , <i>intI1</i>	15-01-59
<i>E. coli</i> K-12J62	Referenz für <i>intI2</i>	<i>colE1::Tn7</i>	15-01-73
<i>Providencia stuartii</i> P125	Referenz für <i>qnr</i> und OXA-Gruppe-I (OXA-10-Gruppe)	<i>qnr</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-10</sub>	12-01-12
<i>E. coli</i> 38	Referenz für <i>aac(3)-IIc</i>	<i>aac(3)-II</i>	10-04-31
<i>E. coli</i> 30	Referenz für <i>aac(6')-I</i> , <i>aph(3'')-Ib (strA)</i> , <i>aph(6)-Id (strB)</i>	<i>aac(6')-Ib<sub>7</sub></i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i>	10-04-20
<i>P. aeruginosa</i> 15-01-40	Referenz für <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aph(3')-I</i>	<i>ant(2'')-Ia (aadB)</i> , <i>aphA1-IAB</i>	15-01-40
<i>E. coli</i> 31	Referenz für <i>ant(3'')-I</i>	<i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aadA1</i>	10-04-21
<i>P. aeruginosa</i> 04-03-13	Referenz für <i>bla</i> <sub>PSE-1</sub>	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub>	04-03-13
<i>K. pneumoniae</i>	Referenz für <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	05-02-01
<i>E. coli</i> W3110	Referenz für OXA-Gruppe-II (OXA-2-Gruppe)	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	04-03-09
<i>E. coli</i> E2	Referenz für OXA-Gruppe-III (OXA-1-Gruppe), <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-30</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	12-04-02
<i>P. aeruginosa</i> 86-14571A	Referenz für <i>bla</i> <sub>IMP-13</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP-13</sub>	-*
<i>P. aeruginosa</i> 48-1997A	Referenz für <i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	-*

\* Als Positivkontrolle diente die von M. Toleman zugesandte genomische Präparation des Stammes.

### 2.1.1.3 Mutanten

Im *in-vitro*-Modell selektierte Mutanten, welche am Ende der Simulation (40h) aus dem Zentralkompartiment des *in-vitro*-Modells entnommen wurden (siehe 2.2.9), sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Mutanten

Bakterienstamm	Verwendung	Standort der Dauerkultur
PA01/MER	kompetitive Wachstumsversuche	15-01-61
PA01/CAZ	kompetitive Wachstumsversuche	15-01-76
12-09-15/MER	kompetitive Wachstumsversuche	15-01-64

### 2.1.2 Antibiotika

Die im jeweiligen Zentrum gewonnenen Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung wurden mit Hilfe von Mikrotitrationsplatten der Firma Merlin Diagnostika verifiziert und ergänzt. Die im Mikrodilutionsverfahren verwendeten Mikrotitrationsplatten enthielten die in Tabelle 2.4 aufgeführten Antibiotika in dehydratisierter Form.

**Tabelle 2.4: Antibiotika der Empfindlichkeitsprüfung**

<b>β-Laktame</b>	Carbapeneme	Imipenem
		Meropenem
	Penicilline	Piperacillin
		Piperacillin/ Tazobactam
		Ticarcillin
	Cephalosporine	Ceftazidim
Cefepim		
<b>Chinolone</b>	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
	Moxifloxacin	
<b>Aminoglycoside</b>	Gentamicin	
	Amikacin	
	Tobramycin	

In Tabelle 2.5 sind unter Angabe der Bezugsquelle Antibiotika aufgelistet, die zusätzlich zur Empfindlichkeitsbestimmung verwendet wurden.

**Tab. 2.5 Zusätzlich zur Empfindlichkeitsprüfung verwendete Antibiotika**

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Meropenem	AstraZeneca, Wilmington, DEL, USA
Imipenem	Merck&CO, INC. West Point, PA, USA
Ceftazidim	GlaxoSmithKline GmbH& Co KG, München
Rifampicin	Grünenthal GmbH, Stolberg
Tobramycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cloxacillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Levofloxacin	Hoechst Marion Roussel

### 2.1.3 Chemikalien und sonstige Materialien

In Tabelle 2.6 sind alle verwendeten Chemikalien und Materialien aufgelistet.

**Tabelle 2.6: Chemikalien und Materialien**

Chemikalien und Materialien		Hersteller
Antibiotika-Testblättchen	Ceftazidim (30µg)	Oxoid, Ltd., Basingstoke
	Ciprofloxacin (5µg)	
	Imipenem (10µg)	
	Meropenem (10µg)	
	Tobramycin (10µg)	
1,10-Phenanthrolin		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agar-Agar		Merck KGaA, Darmstadt
Agarose		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose, SeaKem <sup>R</sup> LE		Cambrex BioScience, Rockland, USA
Agarose, Small DNA		Biozym GmbH, Hess. Ollendorf
Borsäure		Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau		Merck KGaA, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat		Merck, KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat		Merck KGaA, Darmstadt
DNeasy Tissue Kit <sup>TM</sup>		Qiagen GmbH, Hilden
dNTP		PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen; Eppendorf, Hamburg
Eisessig		Riedel-de Haen (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Ethanol ≥99,9%		Merck, KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid		Biomol GmbH, Hamburg; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fast Plasmid <sup>TM</sup> Mini kit		Eppendorf, Hamburg
Ficoll		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin		Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat		Merck KGaA, Darmstadt
MC-207,110 (Phe-Arg-β-Naphtylamid)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol		Merck KGaA, Darmstadt
MinElute PCR Purifikation Kit		Qiagen GmbH, Hilden
Mitsubishi Thermo Papier K61B		Mitsubishi Electric Corporation, Japan
Natriumchlorid		Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid		Merck KGaA, Darmstadt
Parafilm		American National Can <sup>TM</sup> , Menesha, USA

**Fortsetzung der Tabelle 2.6**

<b>Chemikalien und Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilfilter	Pall Corporation, Ann Arbor, USA Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Titriplex III (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser, HPLC rein	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol	Fluka AG, Buchs, Schweiz

**2.1.4 Lösungen und Puffer**

Tabelle 2.7 zeigt alle verwendeten Puffer und Lösungen.

**Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen**

<b>Puffer, Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung, Hersteller</b>
DNeasy Tissue Kit <sup>TM</sup> : ATL-, AL-, AW1-, AW2-, AE-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Fast Plasmid <sup>TM</sup> Mini kit : Lysis solution, wash buffer, elution buffer	Eppendorf, Hamburg
Ladepuffer (Gelelektrophorese)	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15% Ficoll
MinElute PCR Purification Kit <sup>TM</sup> : PB-Puffer PE-Puffer EB-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Phosphatpuffer	50 mM KPO <sub>4</sub> , pH 7
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5

**2.1.5 Enzyme**

In der Tabelle 2.8 sind alle Enzyme, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, aufgeführt. Die für die optimale Aktivität der Enzyme benötigten Puffer wurden in 10x Konzentration mitgeliefert und laut Herstellerangabe verwendet.

Tabelle 2.8: Enzyme

Enzyme	Hersteller
HotMaster™ Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Phusion DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden
REDTaq® DNA Polymerase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase (100mg/ml)	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.1.6 Oligonukleotide

Alle in Tabelle 2.9 aufgelisteten Oligonukleotide wurden von Operon Europe, Köln synthetisiert.

Tabelle 2.9 Oligonukleotide

Bezeichnung	Target	Anwendung	Sequenz 5'-3'	Referenz
mutS-f	<i>mutS</i>	Am, Se	CTTCCGAAGGCCCGTATGA	diese Arbeit
mutS-r	<i>mutS</i>	Am, Se	TTGTGCGGTAGTCCGTCAGA	
mutS-s1	<i>mutS</i>	Se	ATGGGACTTCGATCGCGA	
mutS-s2	<i>mutS</i>	Se	ATCGGCACCTATCCCGAA	
mutS-s3	<i>mutS</i>	Se	ACGACCTGGCGCTGGATGC	
mutL-f	<i>mutL</i>	Am, Se	ATGAGTGAAGCACCGCGTAT	diese Arbeit
mutL-r	<i>mutL</i>	Am, Se	CGCAGGAAGAGCTTGTCCA	
mutL-s1	<i>mutL</i>	Se	TGCACGAGGCGCGAGACGAGC	
mutL-s2	<i>mutL</i>	Se	TATACCCGGCCGGAGGCG	
uvrD-f	<i>mutL</i>	Am, Se	ATGAACGACGACCTCTCCCTC	diese Arbeit
uvrD-r	<i>uvrD</i>	Am, Se	CTACAGGGCTTCCAGCTTG	
uvrD-s1	<i>uvrD</i>	Se	ACCATCCCGGCGTGCTCGAGC	
uvrD-s2	<i>uvrD</i>	Se	AACGACGCGGCGCTGGAACG	
DE1	<i>ampD/E</i>	Am, Se	GTACGCCTGCTGGACGATGCCTTGCTGT TCGAC	Bagge et al., 2002
DE2	<i>ampD/E</i>	Am, Se	GGAGTCCGCTCGGTAGTGGCCTTTCGA AATCATGC	
3'CS	3'-konservierte Region von Klasse- 1-Integrans	Am, Se, Ma	AAGCAGACTTGACCTGA	Levesque et al., 1995
5'CS	5'-konservierte Region von Klasse- 1-Integrans	Am, Se, Ma	GGCATCCAAGCAGCAAG	
aac(3)-Ia-F	<i>aac(3)-Ia</i>	Am	ACCTACTCCCAACATCAGCC	Choi et al., 2002
aac(3)-Ia-R	<i>aac(3)-Ia</i>	Am	ATATAGATCTCACTACGCGGCT	
aac(3)-IIc-F	<i>aac(3)-IIc</i>	Am	ACTGTGATGGGATACGCGTC	Choi et al., 2002
aac(3)-IIc-R	<i>aac(3)-IIc</i>	Am	CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	

## Fortsetzung der Tabelle 2.9.

Bezeichnung	Target	Anwendung	Sequenz 5'-3'	Referenz
aac(3)-IVa-F	<i>aac(3)-IVa</i>	Am	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT	Choi et al., 2002
aac(3)-IVa-R	<i>aac(3)-IVa</i>	Am	TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	
aac(6')-Ib-F	<i>aac(6')-Ib</i>	Am	TATGAGTGGCTAAATCGAT	Choi et al., 2002
aac(6')-Ib-R	<i>aac(6')-Ib</i>	Am	CCCGCTTTCTCGTAGCA	
aac(6')-II-F	<i>aac(6')-II</i>	Am	CCSCACATHGTYGARTGGTGGGG	Sherwood, pers. Mitteilung
aac(6')-II-R	<i>aac(6')-II</i>	Am	GCCTTCTCRTAGCAGCGWATGGC	
algD-F	<i>algD</i>	Am	CACAAGCTCACCTGTCCG	diese Arbeit
algD-R	<i>algD</i>	Am	CTACCAGCAGATGCCCTCG	
ant(2'')-Ia-F	<i>ant(2'')-Ia</i>	Am	ACACAACGCAGGTCACA	Choi et al., 2002
ant(2'')-Ia-R	<i>ant(2'')-Ia</i>	Am	CATGCGAGCCTGTAGGA	
ant(4')-IIa-F	<i>ant(4')-IIa</i>	Am	ATCGATCGTCTGCGAGA	Choi et al., 2002
ant(4')-IIa-R	<i>ant(4')-IIa</i>	Am	CGACCAGACCCATGCA	
aph(3)-Ia-F	<i>aph(3)-Ia</i>	Am	TTATGCCTCTTCCGACCATC	Ng et al., 1999
aph(3)-Ia-R	<i>aph(3)-Ia</i>	Am	GAGAAAACCTACCGAGGCAG	
cml-F	<i>cml</i> -Nachweis	Am, Se, Ma	CCGCCACGGTGTGTTGTTATC	Keyes et al., 2000
cml-R	<i>cml</i> -Nachweis	Am, Se, Ma	CACCTTGCTGCCATCATTAG	
CTX-MA	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Am	CGCTTTGCGATGTGCAG	Bonnet et al., 2001
CTX-MB	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Am	ACCGCGATATCGTTGGT	
D0_1	<i>oprD</i>	Am, Se	AGGCGAAGCCATTTTCCAAT	diese Arbeit
D1	<i>oprD</i>	Am, Se	CCTCAACAAGAGTGACCAAC	
D2	<i>oprD</i>	Am, Se	TTACAGGATCGACAGCGGA	
D3	<i>oprD</i>	Am, Se	CGTCATCGCGTGGCGAA	
D4	<i>oprD</i>	Am, Se	CGTGACGGCAAGAG	
D5	<i>oprD</i>	Am, Se	ATCTCCAAGACCATGCTGAAG	
GES-1a	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Am	ATGCCTTCATTCACGCAC	Poirel et al., 2000
GES-1b	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	Am	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	
gyrA1	<i>gyrA</i>	Am, Se	TTATGCCATGAGCGAGCTGGGCAACGAC	diese Arbeit
gyrA2	<i>gyrA</i>	Am, Se	AACCGTTGACCAGCAGGTTGGGAATC	
IMP AS	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	Am	TCY CCA AYT TCA CTR TGA CT	Yatsuyanagi et al., 2004
IMP S	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	Am	AAA GAT ACT GAA AAG TTA GT	
M1	<i>mexR</i>	Am, Se	GGTTTACTCGGCCAAACC	Ziha-Zarifi et al., 1999
M2	<i>mexR</i>	Am, Se	CTTCGAAAAGAATGTTC	
mexS_f1	<i>mexS</i>	Am, Se	ATGTCCCCGAGTGATCCGTTT	diese Arbeit
mexS_r1	<i>mexS</i>	Am, Se	TCAATCGGGCAGCTGGAT	
mexS-f	<i>mexS</i>	Am, Se	ATACAGTCACAACCCATGA	
mexS-r	<i>mexS</i>	Am, Se	TCAACGATCTGTGGATCT	
mexT-F1	<i>mexT</i>	Am, Se	GTTGTGACTGTATCCGCC	Sobel et al., 2005
mexT-R1	<i>mexT</i>	Am, Se	TGGAATAAGCCGCACACCC	

Fortsetzung der Tabelle 2.9.

Bezeichnung	Target	Anwendung	Sequenz 5'-3'	Referenz
mexZ1026	<i>mexZ</i>	Am, Se	CAGCGTGGAGATCGAAGGCAGCCGG	Hocquet et al., 2003
mexZ2060	<i>mexZ</i>	Am, Se	CCAGCAGGAATAGGGCGACCAGGGC	
nfxB-1	<i>nfxB</i>	Am, Se	CGCCCCGATCCTTCCTATT	nach Jalal u. Wretlind, 1998
nfxB-2	<i>nfxB</i>	Am, Se	ACGAGCGTCACGGTCCTTT	
nfxc-M2	<i>mexT</i>	Am, Se	TCCCACTCGTTCAGCGGTTGTTC	Köhler et al., 2001
nfxc-P1	<i>mexT</i>	Am, Se	TCTCGCACGCAAGGCTTGACG	
NI1	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	Am	GCCCCGGTTATTCTTATTTGTCGC	Nüesch-Inderbinen et al., 1996
NI2	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	Am	TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	
OT3	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	Am	ATGAGTATTCAACATTTCCG	Arlet et al., 1995
OT4	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	Am	CCAATGCTTAATCAGTGAGG	
OXA-2f	OXA-Gruppe II (OXA-2 Gruppe)	Am, Se, Ma	AAGAAACGCTACTCGCCTGC	Bert et al. 2002
OXA-2r	OXA-Gruppe II (OXA-2 Gruppe)	Am, Se, Ma	CCACTCAACCCATCCTACCC	
OXA-F	OXA-Gruppe III (OXA-1 Gruppe)	Am	TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT	Bert et al. 2002
OXA-R	OXA-Gruppe III (OXA-1 Gruppe)	Am	TTTCTTGCTTTTATGCTTG	
oxa-IA	Oxa-Gruppe I (OXA-10 Gruppe)	Am	TCAACAAATCGCCAGAGAAG	Bert et al. 2002
oxa-IB	Oxa-Gruppe I (OXA-10 Gruppe)	Am	TCCCACACCAGAAAACCAG	
parC1	<i>parC</i>	Am, Se	ATGAGCGAACTGGGGCTGGA	Hocquet et al., 2003
parC2	<i>parC</i>	Am, Se	ATGGCGGCGAAGGACTTGGA	
pDF1	<i>oprD</i>	Am, Se	ATGAAAGTGATGAAGTGGAGC	Pirnay et al., 2002
PER-A	<i>bla<sub>PER</sub></i>	Am	ATGAATGTCATTATAAAAAGC	Poirel et al., 2000
PER-B	<i>bla<sub>PER</sub></i>	Am	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	
PSE-1f	<i>bla<sub>PSE</sub></i>	Am, Se, Ma	AAAACAATAGCTTGCCTAAA	diese Arbeit
PSE-1r	<i>bla<sub>PSE</sub></i>	Am, Se, Ma	TCAGCGCGACTGTGATGTATA	
qnr-F	<i>qnr</i>	Am	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	Wang et al., 2003
qnr-R	<i>qnr</i>	Am	CTAATCCGGCAGCACTATTA	
SPM-1a	<i>bla<sub>SPM</sub></i>	Am	CTGCTTGGATTCATGGGCGC	Poirel et al., 2004
SPM-1b	<i>bla<sub>SPM</sub></i>	Am	CCTTTCCGCGACCTTGATC	
strA-F	<i>aph(3'')-I</i>	Am	TGACTGGTTGCCTGTCAGAGG	Kehrenberg u. Schwarz, 2001
strA-R	<i>aph(3'')-I</i>	Am	CCAGTTCTTTCGGCGTTAGCA	
strB-F	<i>aph(6)-I</i>	Am	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	Gebreyes u. Altier, 2002
strB-R	<i>aph(6)-I</i>	Am	GGATCGTAGAACATATTG	
VEB-1A	<i>bla<sub>VEB</sub></i>	Am	CGACTTCCATTTCCCGAT GC	Naas et al., 2001.
VEB-1B	<i>bla<sub>VEB</sub></i>	Am	GGACTCTGCAACAAATACGC	
VIM AS	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Am, Se, Ma	GAA TGC GCA GCA CCA GGA T	Yatsuyanagi et al., 2004
VIM S	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Am, Se, Ma	CCG ATG GTG TTT GGT CGC AT	

IUB (International Union of Biochemistry)-Code gemischter Basen: M = A+C; S = G+C; R = A+G; Y = C+T; W = A+T; K = G+T; V = A+G+C; H = A+C+T; D = A+G+T; B = G+C+T; N = A+T+C+G Am: Amplifikation (bei erworbenen Resistenzgenen als Nachweis), Se: Sequenzierung, Ma: Mapping

### 2.1.7 DNA-Größenmarker

Tabelle 2.10 zeigt die zur Größen- und Mengenbestimmung verwendeten DNA-Größenmarker.

**Tabelle 2.10: DNA-Größenmarker**

DNA-Größenmarker	Hersteller
100bp-Leiter	Gibco/BRL, Eggenstein
Smart Ladder	Eurogentec, Seraing, Belgien
Smart Ladder SF (Small Fragment)	Eurogentec, Seraing, Belgien

### 2.1.8 Nährmedien

In Tabelle 2.11 sind die verwendeten Nährmedien verzeichnet.

**Tabelle 2.11: Nährmedien**

Nährmedium	Hersteller
BBL™ Mueller Hinton II Agar	Becton, Dickinson & Co., Sparks, USA
BBL™ Mueller Hinton II Bouillon	Becton, Dickinson & Co., Sparks, USA
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LB-Agar	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1,3% Agar-Agar
Cetrimid-Agar	Merck, KGaA, Darmstadt

### 2.1.9 Geräte

Alle in dieser Arbeit genutzten Geräte sind in Tabelle 2.12 aufgelistet.

**Tabelle 2.12: Geräte**

Gerät	Hersteller
Achtkanalpipette Titertek, Multistep	Labsystems, Helsinki, Finnland
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Auslaufstäbe, Glas	Glasbläser Eich, Bonn
Biofuge 28RS, Rotoren 3042, 3751	Heraeus, Holding GmbH, Osterode
Brutschrank	Heraeus, Holding GmbH, Osterode
Cellulose-Nitrat Filter, 0,45 µm, 47 mm	Sartorius, Göttingen
Certomat® H	B.Braun Biotech International, Melsungen
Certomat® S	B.Braun Biotech International, Melsungen

## Fortsetzung der Tabelle 2.12.

Gerät	Hersteller
Electrophoresis Power Supply	LKB Pharmacia, Freiburg
Electrophoresis Power Supply	Gibco/BRL, Eggenstein
Filtereinheit Rotrand, FP/ 0,2 CA-S	Schleicher & Schüll, Dassel
Geltray	Danner, Darmstadt
Heizwasserbad	Juchheim Labortechnik, Seelheim
Hotplate Magnetic Stirrer cluco	Instrumenten. Bv. Breda, Niederlande
I-Cycler	Biorad Laboratories GmbH, München
Kolbenhubpipetten, Gilson, variabel	Abimed, Langenfeld
Laborflasche Schott mit GL 45 Gewinde	VWR International, Langenfeld
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Schwabach
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mini Spin	Eppendorf Deutschland, Wesseling-Berzdorf
Vortexer VF2	IKA®-Labortechnik, Staufen
PCR Uno-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Peristaltikpumpe IPC N-8	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Peristaltikpumpe IPN-8	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
pH-Meter CG810	Schott, Mainz
Photometer Novaspec II	Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Pumpschläuche Tygon R 2607: Color-Code rot-grau, ID 1,22 mm, Color-Code violett-schwarz, ID 2,29 mm	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Reinstwasseranlage Easy Pure LF®	Barnstead, Dubuque, USA
Rollinkubator	Schütt, Göttingen
Rotilabo-Schlauch Teflon ID 0,8 mm	Roth, Karlsruhe
Savant Speed Vac® SP101B	Thermo Savant, Holbrook, USA
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Silikonschlauch, ID 2mm	VWR International, Langenfeld
Spectralphotometer 150-20	Hitachi Ltd, Tokyo, Japan

Fortsetzung der Tabelle 2.12

Gerät	Hersteller
Teflondeckel, Sonderanfertigung	Fa. Eich, Bonn
Universalwaage	Sartorius, Göttingen
UV-Bank	Biometra GmbH, Göttingen
Vakuumfiltrationsgerät, Edelstahl	Sartorius, Göttingen
Videodokumentationsanlage mit Programm WINCAM, Ver.2.2	INTAS, Göttingen Cybertec, Berlin über INTAS

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Reidentifizierung mit Hilfe des Selektivmediums Cetrimid

Zur Reidentifizierung der Stämme wurde das Wachstum auf dem Selektivmedium Cetrimid überprüft. Da auf Cetrimid-Medium auch Stämme anderer Spezies der Gattung *Pseudomonas* (u.a. *P. mendocina*) zu wachsen vermögen, wurde die Reidentifizierung durch die Etablierung eines PCR-Nachweises der für *P. aeruginosa* spezifischen GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD ergänzt (siehe 2.5.1).

### 2.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Bei der minimalen Hemmkonzentration (mg/L) eines Antibiotikums handelt es sich um die Konzentration, die gerade ausreicht, um unter definierten Bedingungen ein mit dem „unbewaffneten“ Auge sichtbares Wachstum von Bakterien zu verhindern. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) der 24 Testantibiotika wurde mit Hilfe eines standardisierten Mikrodilutionsverfahrens nach den Empfehlungen des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) in Mikrotitrationsplatten bestimmt.

Von auf MH-Agar angezogenen Übernachtskulturen (18-20h, 36°C) wurden Einzelkolonien in 2,7 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendiert, so dass ein MacFarland-Standard von 0,5 eingestellt wurde, der am Photometer einer OD<sub>560</sub> von 0,12± 0,02 und einer Keimzahl von 1-2x10<sup>8</sup> KBE/ml entsprach. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend 1:200 in MH-Bouillon verdünnt, indem 75µl der Bakteriensuspension in 15ml Bouillon aufgenommen und gut durchmischt wurden. Es ergab sich eine finale Bakterienkonzentration von 5x10<sup>5</sup> KBE /ml in der Bouillon. Von diesem Ansatz wurden nun mit Hilfe einer Mehrkanalpipette jeweils 100µl der Bakteriensuspension in die Kavitäten der Mikrotitrationsplatten überimpft. Die

abgedeckten Mikrotitrationsplatten wurden im Anschluss 18h bei 36°C inkubiert und visuell abgelesen.

Zur Qualitätssicherung wurde bei jeder MHK-Bestimmung der *P. aeruginosa*-ATCC-Referenzstamm 27853, sowie alternierend drei der weiteren ATCC-Stämme (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 oder *E. faecalis* ATCC 29213) getestet.

### 2.2.3 Detektion des Mutatorphänotyps

Die für Mutatorstämme charakteristische erhöhte Mutationsfrequenz (mind. 20-fach höher als die des Wildtypstamms PAO1) wurde mittels der von Maciá et al. (2004) beschriebenen Methode durchgeführt. Dafür wurde ein Agardiffusionstest mit den Substanzen Ceftazidim, Imipenem, Meropenem, Ciprofloxacin, und Tobramycin auf MH-Agar für alle multiresistenten Stämme genutzt: Ein wie unter 2.2.2 beschrieben hergestelltes Inokulum des Teststammes wurde auf eine MH-Agarplatte mit einer Schichthöhe von 3,5 mm aufgetragen. Dazu wurde ein steriles Wattestäbchen mit der Bakteriensuspension getränkt und in drei Richtungen über die gesamte Fläche der Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurden die mit den oben genannten Substanzen beschickten Testblättchen auf den Agar appliziert. Nach 36h oder 48h Inkubation (für Teststämme mit normaler oder langsamer Wachstumsgeschwindigkeit) bei 36°C wurde die Präsenz von resistenten Mutantensubpopulationen überprüft. Dabei galten folgende Kriterien: Außer bei Tobramycin wurden nur Subpopulationen berücksichtigt, deren Hemmhof  $\geq 5$  mm kleiner war als bei der empfindlichen Population. Bei Ceftazidim wurde erst eine Anzahl von mehr als zehn Kolonien im Hemmhof als Subpopulationen gewertet. Waren in den Hemmhöfen von mindestens drei Substanzen Subpopulationen zu verzeichnen, so galt der Teststamm als Mutatorstamm. Für Stämme, bei denen auf Grund eines hohen Resistenzniveaus bei mindestens einer Substanz kein Hemmhof vorlag, konnte keine Bewertung erfolgen.

### 2.2.4 Bestimmung der Mutationsfrequenz

Zur Verifizierung der Ergebnisse des Mutatorstamm-Screenings (2.2.3) wurde die Rifampicin-Resistenz vermittelnde Mutationsfrequenz bestimmt.

Dazu wurde eine 20 ml Übernachtkultur des Teststammes (in MH-Bouillon) abgeerntet und in 3 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung resuspendiert. Anschließend wurde in Dezimalschritten eine Verdünnungsreihe in 0,9%-iger Kochsalzlösung hergestellt. Von den Verdünnungsstufen  $10^0$  bis  $10^{-2}$  wurde jeweils 1 ml auf Rifampicin-Agar (MH-Agar supplementiert mit 300 mg/L Rifampicin) ausplattiert und 48h bei 36°C inkubiert. Zusätzlich wurde unter der Verwendung

der Verdünnungsstufen  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  eine Keimzahlbestimmung in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Der Quotient aus der Anzahl der Mutanten (Selektivagar) und dem arithmetischen Mittel der Zellzahl der Gesamtpopulation (MH-Agar) ergab die Mutationsfrequenz des Teststammes. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Pulsfeldgelelektrophorese (2.3.1) wurde pro Klon für einen repräsentativen Stamm die Mutationsfrequenzbestimmung dreifach durchgeführt. Bei allen weiteren Stämmen eines Klons wurde die Stabilität des Mutatorphänotyps mit einer einmaligen Mutationsfrequenzbestimmung geprüft.

### **2.2.5 Effluxpumpen-Inhibitionstest**

Die Überexpression von Effluxpumpen wurde mit Hilfe des Effluxpumpen-Inhibitionstests untersucht (Lomovskaya et al., 2001). Dazu wurde die MHK von Levofloxacin mit Hilfe des Mikrodilutionsverfahren (2.2.2) im Konzentrationsbereich von 256 mg/L bis 0,06 mg/L jeweils in An- und in Abwesenheit des Effluxpumpen-Inhibitors MC-207,110 (Phe-Arg- $\beta$ -Naphthylamid, 20 mg/L) ermittelt. Levofloxacin ist ein Substrat aller signifikant zur natürlichen und erworbenen Resistenz beitragenden Effluxsysteme MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN und MexXY-OprM. Von einer Effluxpumpen-Überexpression wurde ausgegangen, wenn es in Anwesenheit des Effluxinhibitors mindestens zu einer 16-fachen Reduktion der Levofloxacin-MHK kam. Der Inhibitor MC-207,110 vermag nicht das Effluxsystem MexXY-OprM zu inhibieren.

### **2.2.6 Cephalosporinase- Inhibitionstest**

Um die Überproduktion der chromosomalen Cephalosporinase AmpC zu untersuchen, wurden Agardiffusionstests wie unter 2.2.3 beschrieben mit Ceftazidim durchgeführt (De Champs et al., 2002). Diese erfolgten auf MH-Agar sowie auf mit 500 mg/L Cloxacillin supplementiertem MH-Agar. Verursachte die Inhibition von AmpC durch Cloxacillin eine Vergrößerung des Ceftazidim-Hemmhofes von mindestens 10 mm, so wurde von einer Überproduktion der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase ausgegangen.

### **2.2.7 EDTA-Phenanthrolin-Imipenem Mikrodilutionstest**

Auf das Vorhandensein einer Metallo- $\beta$ -Laktamase wurde mit Hilfe des Mikrodilutionsverfahrens (2.2.2) getestet. Dazu wurde die MHK von Imipenem (Konzentrationsbereich 512 mg/L bis 0,25 mg/L) in der An- und Abwesenheit von 0,4 mM EDTA and 0,04 mM 1,10-Phenanthrolin bestimmt (Migliavacca et al., 2002). Wurde die MHK

von Imipenem durch die inhibitorischen Substanzen mindestens 8-fach reduziert, so wurde der Test positiv gewertet.

### 2.2.8 Keimzahlbestimmung

Zur Überprüfung der Anzahl lebensfähiger Zellen pro ml wurde eine Verdünnungsreihe in 0,9%-iger Kochsalzlösung je nach der erwarteten Keimzahl über mehrere Zehnerpotenzen durchgeführt. Jeweils 50 µl der Verdünnungsstufen wurden auf MH-Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die koloniebildenden Einheiten ausgezählt und die Keimzahl pro Milliliter bestimmt. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 20 KBE/ mL. Lag die zu erwartende Keimzahl unterhalb dieser Nachweisgrenze, so wurden 1000 µL der unverdünnten oder verdünnten Probe filtriert (Membranfilter: Porendurchmesser 0,45 µm) und mit 50 mL steriler, isotoner Kochsalzlösung nachgewaschen. Der Filter wird nun auf eine MH-Agar-Patte gelegt und inkubiert. Die Nachweisgrenze kann mit diesem Verfahren auf 1 KBE/ mL gesenkt werden.

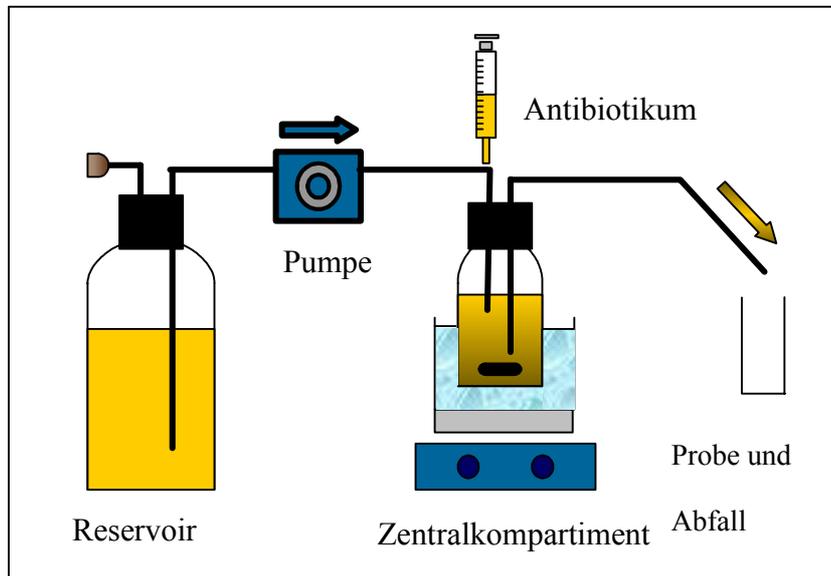
### 2.2.9 *In-vitro*-Modell nach Grasso

Mit Hilfe von pharmakologischen *in-vitro*-Modellen ist es möglich, das Absterbeverhalten von Bakterien in Abhängigkeit von der Zeit unter der Simulation der humanen Pharmakokinetik eines Antibiotikums zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden modifizierte *in-vitro*-Modelle nach Grasso et. al. verwendet (1978). Zur Simulation der Konzentrations-Zeit-Verläufe über 40 Stunden hinweg unter der in der Praxis gängigen Dosierung von Meropenem (3x 1g pro Tag als Kurzinfusion) und Ceftazidim (3x 2g pro Tag als Kurzinfusion) wurden pharmakokinetische Daten von Krüger et al. und Lüthy et al verwendet (2005 und 1981). Im Modell wurden die Kurzinfusionen vereinfacht als i.v. Bolus Applikation simuliert (siehe 2.2.9.2).

Das *in-vitro*-Modell bestand aus einem Zentralkompartiment und einem Reservoirgefäß (Abbildung 2.1). Im Zentralkompartiment, welches MH-Bouillon und den Teststamm in einem konstanten Volumen von 150 ml enthielt, wurden die humanen Konzentrations-Zeit-Verläufe des Antibiotikums simuliert. Das Ausgangsinokulum des jeweiligen Teststammes betrug  $\sim 1 \times 10^7$  KBE/ml. Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 8, 16$  h wurde die jeweilige Dosis des Antibiotikums in das Zentralkompartiment injiziert. Ein Rührfisch im Zentralkompartiment sorgte für eine gleichmäßige Durchmischung der Bakteriensuspension mit dem Antibiotikum. Durch einen kontinuierlichen Fluss von MH-Bouillon aus dem Reservoirgefäß durch das Zentralkompartiment in das Proben- und Abfallgefäß mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe

wurde ab den Zeitpunkten  $t = 0, 8, 16$  h jeweils das Antibiotikum aus dem Zentralkompartiment nach einer Kinetik erster Ordnung eliminiert.

**Abb. 2.1: Aufbau des in-vitro-Modells nach Grasso zur Simulation einer i.v. Bolus Applikation mit anschließender Elimination (Quelle: Christine Fuhst)**



Die jeweiligen, anhand der Probandendaten ermittelten, Eliminationsphasen des Antibiotikums, wurden durch eine Modifikation der Flussraten simuliert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Proben zur Keimzahlbestimmung entnommen. Das Zentralkompartiment befand sich über den gesamten Zeitraum von 40 Stunden in einem Wasserbad mit konstanter Wassertemperatur von  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.9.1 Mathematische Korrektur von Verdünnungseffekten

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro*-Modell handelt es sich um ein sogenanntes „offenes,, Modell, bei dem die Bakterien im Zentralkompartiment im Gegensatz zum „geschlossenen“ Modell nicht durch einen Filter zurückgehalten werden. Somit bedingt der kontinuierliche Fluss des Nährmediums nicht nur die Elimination des Antibiotikums, sondern auch eine Verringerung der Keimzahl. Aufgrund der langen Versuchslaufzeit von 40 Stunden und hohen Flussraten würde dies zur Überbewertung des antibakteriellen Effektes des Antibiotikums führen. Aus diesem Grund wurde die experimentell ermittelte Keimzahl mit Hilfe der nachfolgenden Formeln korrigiert (Keil et al., 1995):

$$N'(t) = N(t) \times e^{f \times \Sigma (ke \times \Delta t)} \quad (2.1.)$$

$$N'(t) = N_{\max} \times N(t) / \{N(t) + [N_{\max} - N(t)] \times e^{-f \times \Sigma (ke \times \Delta t)}\} \quad (2.2.)$$

**Gleichungen (2.1.) und (2.2.):**  $N'(t)$  = korrigierte Keimzahl in KBE/mL zum Zeitpunkt  $t$ ;  $N(t)$  = Anzahl der KBE/ mL in einer zum Zeitpunkt  $t$  aus dem in-vitro Modell entnommenen Probe;  $N_{\max}$  = maximale Keimzahl;  $f$  = Korrekturfaktor (0,5 – 1);  $ke$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante;  $\Delta t$  = Zeitintervall zwischen  $t = 0h$  und der betrachteten Zeit, in dem die jeweilige  $ke$  konstant ist.

Die Gleichung (2.1.) entspricht einer unbegrenzten Exponentialfunktion, aus der sich bei einem Wiederauwachen der Bakterien im Modell korrigierte Keimzahlen ergäben, die oberhalb der maximal von dem jeweiligen Teststamm unter den gegebenen Bedingungen erreichten Keimzahl lägen. Daher wurde im gegebenen Fall zur Berechnung der Keimzahlen die modifizierte Gleichung (2.2.) verwendet, die einen über  $N_{\max}$  liegenden Wert für die korrigierte Keimzahl ausschließt.

### 2.2.9.2 Simulation der Pharmakokinetik

In den Tabellen 2.13 und 2.14 sind den Publikationen von Krüger et al. und Lüthy et al. entnommene pharmakokinetische Parameter und Konzentrationszeitprofile aufgeführt, die den in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen zu Grunde lagen.

**Tabelle 2.13: Pharmakokinetische Parameter**

	<b>Meropenem (Krüger et al., 2005)</b>	<b>Ceftazidim (Lüthy et al., 1981)</b>
Dosis	3x 1 g alle 8h	3x 2g alle 8 h
$C_{\max}$ [mg/L]	56.1	173.8
$t_{1/2}$ [h]	0.45 h	1.96
$ke_1$ [1/min]	0,0321 (15 min)	0,008416667 (60 min)
$ke_2$ [1/min]	0,0179 (75 min)	0,003418333 (240 min)
$ke_3$ [1/min]	0,013 (390 min)	0,002321667 (180 min)

$C_{\max}$  = maximale Plasmakonzentration;;  $t_{1/2}$  = Eliminationshalbwertzeit;  $ke_{1,2,3}$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten.

Tabelle 2.14: Konzentrations-Zeitprofile der Probandendaten

Zeit (h)	Konzentration (mg/L)	
	Meropenem (Krüger et al., 2005)	Ceftazidim (Lüthy et al., 1981)
0	56,1	173,8
0,08	48,7	-
0,17	40,9	-
0,25	34,8	-
0,33	-	128,8
0,50	27,0	-
0,67	-	95,5
0,75	20,0	-
0,83	-	74,13
1	15,2	64,57
1,50	9,2	46,77
2	5,9	38,02
2,50	3,9	-
3	-	22,39
3,50	1,7	-
4	-	14,79
5,50	0,4	9,55
6	-	6,46
7	-	4,79
7,33	0,0	-
7,50	0,0	-
8	-	3,63

-: keine Angabe

Die Menge des Antibiotikums, das zu den Zeitpunkten  $t = 0, 8, 16$  h in das Zentralkompartiment injiziert wurde, berechnete sich aus dem Produkt des Volumens des Zentralkompartiments und der Konzentration  $C_{\max}$  zum Zeitpunkt  $t=0$ .

$$\text{Dosis} = C_{\max} \times V(\text{ZK}) \quad (2.3.)$$

**Gleichung (2.3.):**  $C_{\max}$ : maximale Antibiotikumkonzentration zum Zeitpunkt  $t=0$  [mg/L];  $V(\text{ZK})$ : Volumen des Zentralkompartiments [ml].

Im Anschluss an eine Infusion wird ein Antibiotikum nach einer Kinetik erster Ordnung aus dem Organismus eliminiert. Dies vollzieht sich *in vivo* gemäß der Gleichung 2.4.:

$$C = C_{\max} \times e^{-k_e \times t} \quad (2.4.)$$

**Gleichung (2.4.):**  $C$ : Antibiotikumkonzentration [mg/L];  $C_{\max}$ : maximale Antibiotikumkonzentration zum Zeitpunkt  $t=0$  [mg/L];  $k_e$ : Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [1/min];  $t$ : Zeit [min]

Im *in-vitro* Modell besteht zwischen der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante  $k_e$ , der Flussrate  $F$  sowie dem Volumen des Zentralkompartiments  $V(\text{ZK})$  eine proportionale Abhängigkeit. Diese Proportionalität wird durch die folgende Formel beschrieben:

$$k_e = F / V(\text{ZK}) \quad (2.5.)$$

**Gleichung (2.5.):**  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [1/min];  $V(\text{ZK})$  = Volumen des Zentralkompartiments [mL];  $F$  = Flussrate [ml/ min]

Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten der Eliminationsphasen wurden aus den halblogarithmisch aufgetragenen Konzentrations-Zeit-Verläufen der Probandendaten berechnet:

$$k_e = \frac{\ln C_2 - \ln C_1}{t_2 - t_1} \quad (2.6.)$$

**Gleichung (2.6.):**  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [1/min];  $\ln C$  = natürlicher Logarithmus der Antibiotikumkonzentration;  $t$  = Zeit [min]

Nach der Berechnung der Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten, konnten mit Hilfe der Gleichung (2.5.) die Flussraten bestimmt werden, welche nötig waren, um das Antibiotikum aus dem Zentralkompartiment nach einer Kinetik erster Ordnung zu eliminieren.

### 2.2.9.3 Einstellung der Peristaltikpumpe

Nach der Bestimmung der erforderlichen Flussraten wurden für die Simulationen die geeigneten Pumpen und Schläuche gewählt und die Einstellungen der Pumpe errechnet (Tabelle 2.15)

**Tabelle 2.15 Kombinationsmöglichkeiten von Pumpen und Schläuchen**

	Pumpschlauch Tygon R 2607, Color-Code	Flussraten von...bis... [mL/ min]	Einstellung der Pumpe (F = Flussrate)
Peristaltikpumpe IPN-8	weiß-orange	0 - 0,493	200,82 x F
	rot-grau	0 - 1,653	59,875 x F
	violett-schwarz	0 - 5,668	19,26 x F - 0,528
Peristaltikpumpe IPC N-8	weiß-orange	0 - 2,357	42,425 x F
	rot-grau	0 - 7,993	12,511 x F
	violett-schwarz	0 - 21,43	4,6658 x F

### 2.2.9.4 Versuchsauswertung

#### 2.2.9.4.1 Pharmakodynamische Parameter

#### 2.2.9.4.2 Bestimmung des AAC-Wertes

Der AAC (area above the curve) -Wert stellt ein relatives Maß für die Anzahl der abgestorbenen Bakterien dar. Es handelt sich hierbei um die Fläche oberhalb der Absterbekinetik eines Bakterienstammes gegenüber einem Antibiotikum bei einer Dosierung (Rustige *et al.*, 1990). Oberhalb des Ausgangsinokulums befindliche Flächen werden als negativ und unterhalb des Ausgangsinokulums liegende Flächen als positiv bewertet (Abb. 2.2).

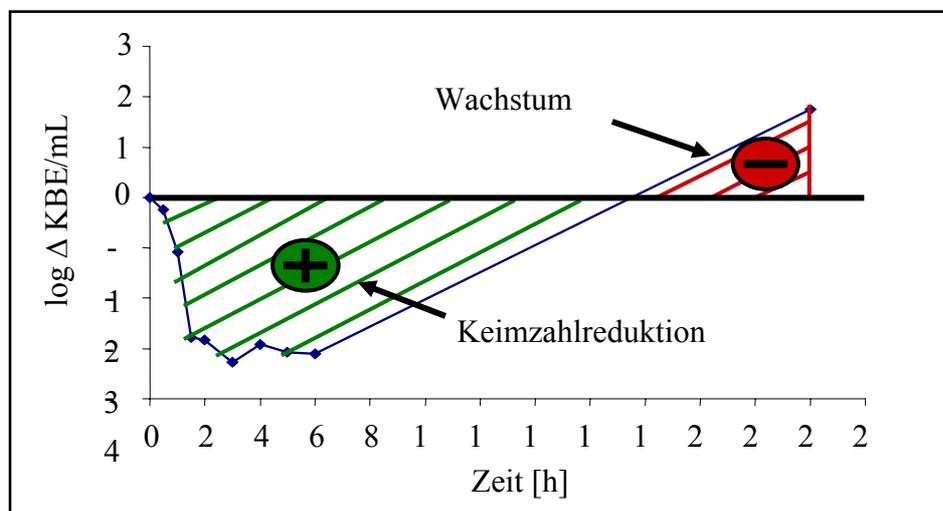


Abb. 2.2: Graphische Darstellung des AAC-Wertes (Fläche oberhalb der Absterbekinetik, Bildquelle Christine Fuhst)

### 2.2.9.5 Pharmakokinetische Parameter

#### 2.2.9.5.1 Halbwertszeit

Die Halbwertszeit ist die Zeit, innerhalb derer eine Konzentration auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes abfällt und kann mit Hilfe der Gleichung 2.7. berechnet werden.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_e = 0,693 / k_e \quad (2.7.)$$

Gleichung (2.7.):  $t_{1/2}$  = Halbwertszeit [min];  $k_e$  = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min]

### 2.2.9.6 Pharmakologische Indizes

#### 2.2.9.6.1 $C_{\max}$ /MHK [dimensionslos]:

Quotient der maximalen Plasmakonzentration und der MHK des Teststammes (Mouton *et al.*, 2002).

#### 2.2.9.6.2 $T_{>\text{MHK}}$ [%]:

Kumulativer Prozentsatz der Zeit, innerhalb derer die Konzentration des Antibiotikums oberhalb der MHK des Bakterienstammes liegt (Mouton *et al.*, 2002).

### 2.2.10 Nachweis von Mutanten im *in-vitro* Modell

Der Nachweis von Mutanten, welche während der *in-vitro* Modelle selektiert wurden, erfolgte auf MH-Agarplatten supplementiert mit Meropenem (Modell mit PAO1: 2 mg/L, Modell mit *P. aeruginosa* 12-09-15: 8 mg/L) bzw. Ceftazidim (Modell mit PAO1: 8 mg/L).

### 2.2.11 Kompetitiver Wachstumsversuch

Die Fitness der in *in-vitro* Modellen selektierten Mutanten PAO1/MER, PAO1/CAZ und 12-09-15/MER wurde im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Mutanten und ihr Ausgangsstämme mit einem identischen, photometrisch eingestellten Inokulum von  $10^2$  KBE/ml gemeinsam für acht Stunden bei 37°C in einer Batchkultur (MH-Bouillon) ohne Selektionsdruck durch ein Antibiotikum inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 6 und 8h wurden Keimzahlbestimmungen ( ) durchgeführt. Von den Agarplatten der ausgewerteten Keimzahlbestimmungen wurden anschließend jeweils 47 Kolonien in Anlehnung an die Agardilutionsmethode mittels eines Stempels sowohl auf MH-Agar als auch auf selektiven MH-Agar supplementiert mit Meropenem (PAO1/MER: 2 mg/L, 12-09-15: 8 mg/L) oder Ceftazidim (PAO1/CAZ: 8 mg/L) aufgebracht. Anhand des Wachstums auf dem Selektivagar erfolgte die Bestimmung des Anteils der jeweiligen Mutante an der Gesamtpopulation der Batchkultur.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde freundlicherweise im GENARS-Zentrum Jena im Labor von Herrn Prof. Pfister durchgeführt. Bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese handelt es sich um eine molekulare Methode zur Typisierung von Bakterienstämmen, die für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt wird.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese verläuft nach folgendem Prinzip: Bei einer Bakterien-Spezies besteht keine 100%-ige Homologie innerhalb der genomischen DNA. Schon geringe Unterschiede können bei einer Restriktionsverdauung des gesamten Genoms anhand des resultierenden Fragmentmusters nachgewiesen werden. Es ergibt sich für jeden Stamm innerhalb der Spezies ein charakteristisches Fragmentmuster, welches die Anzahl und Position der Schnittstellen des Restriktionsenzym innerhalb des Genoms widerspiegelt. Die Erkennungssequenz von Spe I kommt bei *P. aeruginosa* 20 bis 25 mal vor, die Fragmentgröße nach Verdauung mit Spe I variiert zwischen 10kb und 700kb (Tenover et al., 1995).

Die Auswertung der PFGE-Muster erfolgte nach den von Tenover et.al. 1995 aufgestellten Kriterien. Als Stamm wird ein Isolat (Reinkultur eines Bakteriums, die durch Subkultur von einer primären Isolationsplatte gewonnen wurde) bezeichnet, das sich phänotypisch oder genotypisch von anderen Isolaten der Spezies unterscheidet. Als Klone werden Isolate/ Stämme bezeichnet, die anhand genetischer Tests – wie der PFGE – nicht voneinander unterscheidbar sind (identisches PFGE-Muster) bzw. sehr ähnlich sind (die Unterschiede im PFGE-Muster sind durch ein einziges genetisches Ereignis zu erklären), so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie desselben genetischen Ursprungs sind. Letztere werden im Folgenden als Varianten bezeichnet (PFGE-Muster weist maximal drei Fragmentunterschiede auf).

Tabelle 2.16 fasst die Kriterien zur Interpretation von PFGE-Mustern zusammen.

**Tabelle 2.16: Kriterien zur Interpretation von PFGE-Mustern (in Anlehnung an Tenover et al., 1995)**

Kategorie	Anzahl der genetischen Unterschiede	Typischerweise resultierende Anzahl der Fragmentunterschiede	Epidemiologische Interpretation
ununterscheidbar	0	0	Stamm ist Teil des Klons
nahe verwandt	1	2-3	Stamm ist wahrscheinlich Teil des Klons (Variante)
möglicherweise verwandt	2	4-6	Stamm hat möglicherweise den selben genetischen Ursprung
unterschiedlich	≥3	≥7	Stamm hat nicht den selben genetischen Ursprung

### 2.3.2 Extraktion von genomischer DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit<sup>TM</sup> (Qiagen)

Eine Übernachtskultur (2 ml in LB-Medium) wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 7500 rpm abgeerntet und in 180 µl ATL Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 µl Proteinase K erfolgte die Deproteinisierung der Probe während einer Inkubation von 2h bei 55°C. In den nachfolgenden Arbeitsschritten wurde die Probe durch „Vortexen“ 15s

gemischt, und es erfolgte eine Zugabe von 200 ml AL-Puffer, eine erneute Durchmischung durch „Vortexen“ und eine 10-minütige Inkubation bei 70°C. Daraufhin wurden 200 µl Ethanol ( $\geq 99,9\%$ ) durch „Vortexen“ untergemischt, und die Probe wurde in ein DNeasy Mini Spin Säulchen mit Ausgangsgefäß überführt. Durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 8000 rpm wurde die genomische DNA auf dem Säulchen gebunden. Daraufhin wurde das Säulchen zunächst durch die Zugabe von 500 ml AW1-Puffer und Zentrifugation (8000 rpm) und die nachfolgende Zugabe von 500 µl AW2-Puffer und Zentrifugation für 3 min bei 13400 rpm gewaschen und getrocknet. Im anschließenden Arbeitsgang wurde das Säulchen auf ein Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA in 100 µl AE-Puffer nach einer Inkubation von 1 min durch Zentrifugation bei 800 rpm eluiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Mini-Spin-Zentrifuge.

### **2.3.3 Extraktion von Plasmid-DNA mit Hilfe des Fast Plasmid™ Mini Kit (Eppendorf)**

4 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium wurden durch Zentrifugation abgeerntet und in 400 µl eiskalter Lysis-Lösung durch Vortexen (30 sec.) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und der Transfer des Lysats in ein Spin Column Assembly (Elutionssäulchen mit Auffanggefäß). Nach einem Zentrifugationsschritt zum Binden der Plasmid-DNA wurde in zwei Arbeitsschritten jeweils durch Zugabe von 500 µl Wasch-Puffer und einer Zentrifugation das Elutionssäulchen gewaschen. Die nachfolgende zusätzliche Zentrifugation und 1-minütige Inkubation gewährleistete ein Abtrocknen des Elutionsäulchens. Daraufhin wurde das Elutionssäulchen auf ein Reaktionsgefäß transferiert und nach der Zugabe von 50 µl Elutionspuffer und einer Inkubation von 5 min, wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation eluiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden 1min bei 13400Upm in der Mini-Spin-Zentrifuge durchgeführt.

### **2.3.4 Aufkochpräparation von genomischer DNA**

Drei Einzelkolonien wurden von einer Übernachtskultur auf MH-Agar in 100µl Wasser reinst. suspendiert und 10min bei 99°C inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer 10min bei 13400Upm abzentrifugiert (Mini-Spin-Zentrifuge). Die im Überstand gelöste DNA der Bakterien wurde als Matrize für die Screening-PCR-Ansätze eingesetzt.

### **2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Amplifikation eines DNA-Abschnittes. Bei der PCR werden zyklisch drei Phasen durchlaufen:

Phase I (Denaturierung): Bei der Denaturierung werden die Doppelstränge der DNA-Matrize thermisch aufgetrennt.

Phase II (Primeranlagerung): Primer binden gegenläufig komplementär an die flankierenden Sequenzbereiche des zu amplifizierenden als Einzelstrang vorliegenden DNA-Abschnittes.

Phase III (Synthese): Ausgehend vom freien OH-Ende der Primer wird durch die Polymerase eine Kopie synthetisiert, wobei komplementär dNTPs eingebaut werden.

Als Primer für alle nachfolgend genannten PCR-Versuche wurden die jeweiligen in Tabelle 2.9 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet.

### **2.3.5.1 Reidentifizierung durch den Nachweis von *algD***

Die Reidentifizierung der in der Studie untersuchten multiresistenten *P.-aeruginosa*-Klone erfolgte durch den PCR-Nachweis des für *P. aeruginosa* spezifischen Gens *algD*. Dieses Gen kodiert für eine GDP-Mannose-6-Dehydrogenase, die für die Alginateproduktion von *P. aeruginosa* essentiell ist (siehe 1.2). Zur Etablierung des Tests wurde vor dem Screening der Teststämme verifiziert, dass unter Verwendung der gewählten Primer ausschließlich bei *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* ATCC 27853) nicht aber bei anderen Spezies der Gattung (*P. alcaligenes*, *P. fuoesizens*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. veronii*) oder anderen Non-Fermentern (*Burkholderia* „*cepacia*“ Komplex, *Stenotrophomonas maltophilia*) ein Produkt amplifiziert wurde. Die verwendeten Kontrollstämme sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

### **2.3.5.2 Defekte im DNA Reperatursystem (MMR System)**

Der Mutatorphänotyp wird zumeist verursacht durch Defekte in Genen, die in das MMR System involviert sind (1.2.2). Die MMR System Gene *mutS*, *mutL* und *uvrD* wurden für den im *in-vitro* Modell eingesetzten Mutatorstamm 12-09-15 sequenziert. Als Templates für die vorhergehende Amplifikation der Gene wurden genomische Präparationen eingesetzt.

### **2.3.5.3 Nachweis von durch Mutation erworbenen Resistenzmechanismen**

Um Resistenzmechanismen zu detektieren, die auf Mutationen in chromosomalen Genen zurückzuführen sind (1.5.1), wurden die unten aufgeführten Loki, sofern nicht anders aufgeführt, für alle Klone amplifiziert und sequenziert. Dabei wurde folgende Strategie verfolgt: Pro Klon wurde ein repräsentativer Stamm für die genomischen Untersuchungen herangezogen. Lagen PFGE-Varianten oder bei identischem PFGE-Muster phänotypische Varianten eines Klons vor, so wurden diese zusätzlich hinsichtlich abweichender chromosomaler Modifikationen untersucht. Für die Untersuchungen wurden als Template genomische Präparationen verwendet.

#### 2.3.5.3.1 Modifikation der Typ II Topoisomerasen DNA Gyrase und Topoisomerase IV

Die Hauptursache für Chinolonresistenz bei *P. aeruginosa* sind Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC*, welche für Untereinheiten der DNA Gyrase und der Topoisomerase IV kodieren. Die Chinolon-Resistenz-vermittelnde Region (QRDR) der Gene *gyrA* und *parC* wurde für alle Klone sequenziert.

#### 2.3.5.3.2 Modifikationen des Porins OprD

Der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber Carbapenemen bei *P. aeruginosa* ist der Verlust des Porins OprD, welcher zumeist auf Mutationen in *oprD* beruht. OprD wurde bei allen Klonen sequenziert.

#### 2.3.5.3.3 Modifikationen in AmpD/E

Die Überexpression der chromosomalen  $\beta$ -Laktamase AmpC bei *P. aeruginosa* wird zumeist durch Modifikationen in der cytosolische N-Acetyl-Anhydromuramyl-L-Alanin-Amidase AmpD verursacht. Aus diesem Grund wurde für die unter Ceftazidim im *in-vitro* Modell selektierte Mutante PAO1/CAZ das bicistronische *ampD/E* operon sequenziert.

#### 2.3.5.3.4 Überexpression von Effluxpumpen

Bei Klonen, deren Effluxpumpen-Inhibitionstest positiv ausgefallen war, wurden die Efflux-Regulatorgene *mexR* (MexAB-OprM) und *nfxB* (MexCD-OprJ) untersucht. Da mit Hilfe des verwendeten Effluxpumpen-Inhibitors ein Nachweis der Überexpression von MexXY-OprM nicht möglich ist, wurde das für den Regulator des Effluxsystems kodierende Gen *mexZ* für alle Klone sequenziert. Für Klone, deren Carbapenem-Resistenz nicht durch den Verlust des Porins OprD erklärt werden konnte, wurde außerdem die Überexpression des Effluxsystems MexEF-OprM überprüft, welche über denselben Regulationsmechanismus mit einer reduzierten Expression von OprD einhergeht. Dazu wurde sowohl das Gen des positiven Regulators MexT als auch das für eine Oxidoreduktase kodierende Gen *mexS* sequenziert.

#### 2.3.5.4 Screening nach erworbenen Resistenzdeterminanten

Für den Nachweis einer großen Anzahl relevanter Resistenzgene wurden PCR Screenings durchgeführt. In die Untersuchungen wurden sämtliche Stämme aller Klone einbezogen. Die jeweils als Positivkontrolle verwendeten Bakterienstämme sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen. Eine genaue Identifizierung der detektierten Gene erfolgte im Anschluss durch die Sequenzierung des Amplikons. Das Screening richtete sich auf die unten aufgelisteten Resistenzdeterminanten:

Aminoglykosid-Modifizierende-Enzyme:

Acetyltransferasen: *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIc*, *aac(3) IVa*, *aac(6')-I*

Nukleotidyltransferasen: *ant(2'')-Ia*, *ant(3'')-I*, *ant(4')-IIa*

Phosphorylasen: *aph(3')-I*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3')-IIa*, *aph(6)-Id*

$\beta$ -Laktamasen:

*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>PSE</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, für die OXA-Gruppen-I (OXA-10), -II (OXA-2), und -III (OXA-1)

kodierende Gene, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>VEB</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>PER</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>*

Sonstige Resistenzdeterminanten:

*qnr* (Chinolon-Resistenz), *cmlA* (Chloramphenicol-Resistenz)

In allen PCR-Ansätzen wurden Aufkochpräparate als Template eingesetzt.

### 2.3.5.5 Nachweis von Klasse-1- und -2-Integrans

Auf Integrans werden erworbene Resistenzgene kodiert. Zum Nachweis von Integrans wurde ein PCR-Screening für *intI1* und *intI2* durchgeführt. Diese Gene kodieren für die Integrase der Klasse-1- und -2-Integrans. Die als Positivkontrolle verwendeten Bakterienstämme sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen. Für die Untersuchungen wurden als Template Aufkochpräparate verwendet.

### 2.3.5.6 Charakterisierung von Klasse-1-Integrans

Zur Charakterisierung der gefundenen Klasse-1-Integrans wurde PCR-Mapping verwendet (Levesque et al. 1995). Dazu wurden die Primer der oben genannten nachgewiesenen Resistenzgene untereinander kombiniert. Zusätzlich wurden Primer (5'-CS und 3'-CS), die in den konservierten 5' und 3'-Randbereichen von Typ-1-Integrans binden, genutzt. Zur Verifizierung der ermittelten Integransstrukturen wurden die PCR-Mapping-Produkte partiell sequenziert. Bei allen Mapping-PCRs kamen Plasmidpräparationen als Template und die HotMaster™ Taq DNA Polymerase zum Einsatz.

Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die PCR-Laufbedingungen gehen aus den Tabellen 2.17 und 2.18 hervor.

Tabelle 2.17: Zusammensätze der PCR-Ansätze

Zielstruktur der PCR	Primer	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur [°C]	Syntheszeit	Enzym
<i>algD</i>	algD-F, algD-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	40 s	R
<i>mutL</i>	mutL-f, mutL-r	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	55	2 min	H
<i>mutS</i>	mutS-f, mutS-r	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	60	2,5 min	H
<i>uvrD</i>	uvrD-f, uvrD-r	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	55	2 min	H
<i>gyrA</i>	gyrA1, gyrA2	2,5 mM	0,2 µM	50 µM	62	40 s	R
<i>parC</i>	parC1, parC2	3 mM	0,2 µM	50 µM	70	40 s	R
<i>oprD</i>	D1, D2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	58	1,5 min	H
	pDF1, D2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	60	1 min	H
	D0_1, D2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	55	1,5 min	H
	D4, D2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	58	1 min	H
	D5, D2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	57	1 min	H
<i>mexR</i>	M5, M1	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	48	40 min	H
<i>mexR</i>	M1, M2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	55	40 min	H
<i>mexS</i>	mexS-f1, mexS-r1	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	58	1 min	H
	mexS-f, mexS-r	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	58	1 min	H
<i>mexT</i>	nfxC-P1, nfxC-M2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	60	1,5 min	H
	mexT-F1, mexT-R1	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	57	1,5 min	H
<i>mexZ</i>	mexZ1026, mexZ2060	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	70	40 s	H
	mexZ1026, mexZ-2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	60	40 s	H
	mexZ1026, mexZ-1	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	66	40 s	H
<i>nfxB</i>	nfxB-1, nfxB-2	2,5 mM	0,1 µM	20 µM	59	40 s	H
<i>ampD/E</i>	DE1, DE2	1,5 mM	0,5 µM	200 µM	72	45 s	P
<i>bla<sub>GES</sub></i>	GES-1a, GES-1b	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	40 s	R
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP S, IMP AS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	SPM-1a, SPM-1b	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57	40 s	R
<i>bla<sub>VEB</sub></i>	VEB-1A, VEB-1B	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	51	40 s	R
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM S, VIM AS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	60	40 s	R
OXA-Gruppe I (OXA-10 Gruppe)	oxa-1A, oxa-1B	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	54	40 s	R
OXA-Gruppe II (OXA-2 Gruppe)	OXA-2f, OXA-2r	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57	40 s	R
OXA-Gruppe III (OXA-1 Gruppe)	OXA-F, OXA-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>bla<sub>PER</sub></i>	PER-A, PER-B	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	48	40 s	R
<i>bla<sub>PSE</sub></i>	PSE-1f, PSE-1r	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57	40 s	R
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	OT3, OT4	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	NI1, NI2	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	59	40 s	R

Fortsetzung der Tabelle 2.17.

Zielstruktur der PCR	Primer	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration	Primer-Konzentration	dNTP-Konzentration	Annealing-Temperatur [°C]	Synthesezeit	Enzym
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-MA, CTX-MB	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	52	40 s	R
<i>int1</i>	int1-F, int1-R	2 mM	0,2 µM	50 µM	55	40 s	R
<i>int2</i>	int2-F, int2-R	3 mM	0,2 µM	50 µM	50	40s	R
Klasse-1-Integron	5'CS, 3'CS	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	3 min	H
<i>cml</i>	cml-F, cml-R	2 mM	0,5 µM	200 µM	54	40 s	R
<i>aphA</i>	aph(3)-Ia-F, aph(3)-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	57	40 s	R
<i>aac(3)-Ia</i>	aac(3)-Ia-F, aac(3)-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>aac(3)-IIc</i>	aac(3)-IIc-F, aac(3)-IIc-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	40 s	R
<i>aac(3)-IVa</i>	aac(3)-IVa-F, aac(3)-IVa-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib-F, aac(6')-Ib-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>ant(2'')-Ia</i>	ant(2'')-Ia-F, ant(2'')-Ia-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>ant(4')-IIa</i>	ant(4')-IIa-F, ant(4')-IIa-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R
<i>aac(6')-II</i>	aac(6')-II-F, aac(6')-II-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	55	40 s	R
<i>strA</i>	strA-F, strA-R	1,5 mM	0,2 µM	200 µM	48	40 s	R
<i>strB</i>	strB-F, strB-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	53	40 s	R
<i>qnr</i>	qnr-F, qnr-R	1,5 mM	0,2 µM	50 µM	50	40 s	R

H: HotMaster™ Taq DNA Polymerase; P: Phusion DNA Polymerase; R: REDTaq® DNA Polymerase

Tabelle 2.18. PCR Laufbedingungen

Enzym	Denaturierung		Annealing-Dauer (Temperatur siehe Tab. 2.17)	Synthese-Temperatur (Dauer siehe Tab. 2.17)	Anzahl der Zyklen
	Temperatur	Dauer			
REDTaq® DNA Polymerase	94°C	30s	30s	72°C	30
HotMaster™ Taq DNA Polymerase	96°C	20s	20s	65°C	30
Phusion DNA Polymerase	98°C	10s	30s	72°C	30

### 2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren nach ihrer Masse aufgetrennt werden. Im elektrischen Feld wandern die auf Grund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Agarosegel zum Pluspol. Bei der Wanderung durch die Poren des Agarosegels werden größere Fragmente stärker behindert als kleinere. Zwischen

der Wanderungsstrecke und der Länge des Fragments besteht ein nicht linearer Zusammenhang. Zur Größenbestimmung der Fragmente werden Größenmarker mit auf das Gel aufgetragen. Je nach den Laufbedingungen der Elektrophorese besteht für einen bestimmten Größenbereich der Fragmente zwischen der Wanderungsstrecke (cm) und dem Logarithmus der Größe der Fragmente (bp) ein linearer Zusammenhang. Anhand linearer Regression kann in diesem linearen Bereich die Größe der Proben-Fragmente relativ genau bestimmt werden.

Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde den 0,8-2%-igen Agarosegelen in TAE-Puffer Ethidiumbromid (0,3 µg/ml) zugesetzt, das in die Doppelhelix der DNS interkaliert, unter UV-Lichtbestrahlung luminesziert und eine Dokumentation der Ergebnisse mit einer Videoanlage ermöglicht.

### **2.3.7 Aufreinigung mit dem MinElute PCR Purification Kit<sup>TM</sup> (Qiagen)**

Vorbereitend für Sequenzierungen wurden PCR-Produkte 1:6 mit PB-Puffer gemischt und auf ein in einem Auffanggefäß befindliches MinElute-Säulchen gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt zum Binden der DNA wurde das MinElute-Säulchen durch die Zugabe von 750µl PE-Puffer und eine erneute Zentrifugation gewaschen. Eine zusätzliche Zentrifugation sowie eine Inkubation des Säulchens bei offenem Deckel ermöglichte das Entfernen von Puffer- und Ethanolresten. Das MinElute-Säulchen wurde auf ein steriles Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 10 µl auf 50°C erwärmtem EB-Puffer und fünfminütiger Inkubation wurde zur Eluation der DNA zum vierten Mal zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten 1min bei 13400 upm in der Mini-Spin-Zentrifuge.

### **2.3.8 Sequenzierungen**

Die Sequenzierungen sämtlicher PCR-Produkte wurde von Seqlab Sequence Laboratories Göttingen durchgeführt.

### **2.3.9 Übertragung von Resistenzgenen durch Konjugation**

Die Möglichkeit des horizontalen Transfers der detektierten Klasse-1-Integrone wurde in Konjugationsexperimenten untersucht. Bei der Konjugation erfolgt, ermöglicht durch direkten Zell-Zell-Kontakt über eine Plasmabrücke, ein gerichteter Gentransfer von einem Spender-Stamm (Donor) in einen Empfänger-Stamm (Rezipient).

In dieser Arbeit kamen bei der Konjugation mittels Filter-Mating (Wang et al., 2003) als Rezipienten die Rifampicin-resistenten Stämme *E. coli* W3110*lac*<sup>-</sup>3a Rif<sup>R</sup> und *P. aeruginosa* PAO1 Rif<sup>R</sup> zum Einsatz. Donor und Rezipient wurden jeweils in LB-Medium bei 37°C bis

auf eine  $OD_{546}$  von 0,4–0,5 angezogen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT ohne Schütteln wurden jeweils 1 ml der Kultur 2 min bei 5000 upm in der Mini-Spin Zentrifuge abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l LB-Bouillon resuspendiert. Im Anschluss wurden die Suspensionen des jeweiligen Donors und Rezeptors gemischt und auf einen sterilen Nitrocellulosefilter auf einer LB-Agarplatte gegeben. Der Konjugationsansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen in 2,7 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und Keimzahlbestimmungen auf antibiotikahaltigem Agar vom Transkonjuganten und vom Donor durchgeführt. Dabei diente LB-Agar supplementiert mit 300 mg/L Rifampicin und 4mg/L Tobramycin (auf allen Klasse-1-Integrans, deren Mobilität überprüft werden sollte, wurden im Vorfeld Gene von Tobramycin-Resistenz vermittelnden Aminoglycosid-modifizierenden Enzymen nachgewiesen) dem selektiven Nachweis der Transkonjuganten und LB-Agar supplementiert mit Tobramycin (4 mg/L) dem Nachweis des Donors.

Der Quotient aus der Anzahl der Transkonjuganten und der Zellzahl des Donors ergab die Konjugationsfrequenz für die jeweilige Donor- und Rezeptorkombination.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Reidentifizierung

Eine Reidentifizierung wurde für alle als *P. aeruginosa* eingesendeten multiresistenten Stämme des GENARS-Projektes durchgeführt. Lagen von den durch multiresistente Stämme betroffenen Patienten weitere Stämme vor, so wurden diese ebenso wie der zusätzlich untersuchte multiresistente Stamm aus der Berliner TU hinsichtlich ihrer Spezieszugehörigkeit geprüft. Die Reidentifizierung erfolgte mit Hilfe des Selektivmediums Ceftrimid und wurde durch einen PCR-Nachweis der für *P. aeruginosa* spezifischen GDP-Mannose-6-Dehydrogenase AlgD ergänzt. Dies war erforderlich, da auf Ceftrimid z. T. auch Stämme anderer Spezies der Gattung *Pseudomonas* zu wachsen vermögen. Zudem erwies sich eine Identifizierung mit Hilfe konventioneller biochemischer Tests insbesondere bei den sehr variablen Stämmen mit Mutatorphänotyp als ungeeignet. Alle Stämme zeichneten sich durch Wachstum auf Ceftrimid-Medium aus und lieferten positive Resultate in der *algD*-PCR. Dadurch konnte die Identifizierung für alle als *P. aeruginosa* erhaltenen Stämme bestätigt werden.

### 3.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Im Anschluss an die Reidentifizierung erfolgte die Verifizierung und Ergänzung der in den jeweiligen Zentren gewonnenen Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung (Tabelle 3.1).

### 3.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde freundlicherweise im GENARS-Zentrum Jena im Labor von Herrn Prof. Pfister durchgeführt.

#### 3.3.1 Epidemiologie

Anhand der PFGE-Typisierung wurden 22 multiresistente Klone identifiziert (Tabelle 3.1). Elf dieser Klone, die zumeist von CF-Patienten stammten, konnten mehrere Stämme zugeordnet werden, wobei auf einen Klon vier, auf fünf Klone drei und auf sieben Klone zwei Stämme entfielen. Unter den elf Klonen mit Mehrfachisolaten traten wiederum bei neun Klonen Varianten des Klons auf, deren Fragmentmuster sich in bis zu drei Banden vom Referenzmuster unterschieden und demselben genetischen Ursprung zugeordnet werden können (siehe 2.3.1). Bei zwei Klonen wurden zwei Varianten identifiziert, während für die übrigen sieben Klone nur eine Variante nachgewiesen wurde. Ausschließlich bei dem CF-

Patienten A wurden zwei unterschiedliche multiresistente Klone (I, II) identifiziert. In dem untersuchten Kollektiv wurde ferner die Ausbreitung eines Klons auf zwei CF-Patienten nachgewiesen: Drei Stämme des Klons XI wurden vom Patienten J isoliert, während die nicht multiresistente Variante XIa des Klons aus einer Sputumprobe des CF-Patienten I kultiviert wurde. Eine klonale Ausbreitung von multiresistenten Stämmen trat nicht auf.

Die CF-Patienten, aus deren Sputum multiresistente *P.-aeruginosa*-Klone isoliert worden waren, wurden zumeist ambulant betreut. Dagegen wurden nicht-CF-Patienten zu gleichen Teilen auf Intensiv- und auf Normalstationen unterschiedlicher Abteilungen behandelt.

**Tabelle 3.1: Ergebnisse zur Empfindlichkeitsprüfung und PFGE-Typisierung**

Zentrum	Ident-nummer <sup>1</sup>	MHK (mg/L) gegenüber											PFGE-Muster
		Piperacilin	Piperacilin/Tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ceftazidim	Cefepim	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Moxifloxacin	Ciprofloxacin	
Hannover	10-10-09	nd	128	8	1	>32	16	8	2	0,5	4	0,5	X
Hannover	10-10-10*	128	128	16	4	>32	32	8	4	1	8	4	X
Hannover	10-10-11	nd	4	1	1	2	4	16	4	1	8	1	XIa
Hannover	10-10-16	nd	4	4	1	4	8	>32	>16	16	>8	4	IVa
Hannover	10-10-20	nd	4	8	2	1	2	4	2	0,5	4	1	Va
Hannover	10-10-22*	>128	>128	16	16	>32	>32	>32	>32	8	>8	4	V
Hannover	10-10-25*	64	32	8	4	8	32	>32	16	2	>8	8	VIII
Hannover	10-10-26*	>128	>128	8	16	>32	>32	>32	>32	32	8	2	IV
Hannover	10-10-35*	>128	>128	>32	32	>32	>32	32	16	4	>8	>8	IX
Hannover	10-10-36	>128	≤1	16	4	4	8	16	8	1	>8	4	IXa
Hannover	12-09-47*	>128	>128	>32	32	>32	>32	>32	16	2	>8	4	XIV
Hannover	12-09-58*	>128	>128	32	8	>32	>32	16	16	2	8	2	XI
Hannover	12-09-60*	128	128	16	16	32	32	>32	32	2	>8	2	XI
Hannover	12-09-61*	64	64	8	8	16	16	16	8	2	>8	2	XI
Hannover	12-09-62*	32	32	8	4	32	32	>32	>32	4	>8	4	VI
Hannover	12-09-63*	64	16	8	4	16	32	32	16	2	8	4	VIa
Hannover	12-09-66*	>128	>128	>32	32	>32	>32	>32	16	4	>8	4	XIV
Hannover	12-09-80*	nd	>128	>32	32	>32	>32	32	8	1	8	2	XIV
Hannover	12-10-07*	128	128	8	8	32	>32	16	8	1	>8	4	VII
Hannover	12-10-08*	>128	>128	16	16	>32	>32	32	16	2	>8	8	VIIa
Hannover	12-10-16	nd	8	16	4	2	4	8	4	0,5	8	2	Vb
Hannover	12-10-28	>128	>128	4	4	>32	>32	>32	32	4	4	0,5	III
Hannover	12-10-29*	128	128	32	8	32	32	>32	16	4	>8	4	III
Hannover	12-10-44*	>128	>128	32	8	>32	>32	>32	>32	8	>8	4	IIIa
Hannover	12-10-51*	>128	>128	32	32	>32	>32	>32	32	8	>8	4	XIII

Fortsetzung der Tabelle 3.1.

Zentrum	Ident-nummer <sup>1</sup>	MHK (mg/L) gegenüber											PFGE-Muster
		Piperacillin	Piperacillin/Tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ceftazidim	Cefepim	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Moxifloxacin	Ciprofloxacin	
Hannover	12-10-69*	128	128	32	8	>32	>32	32	16	2	>8	4	I
Hannover	12-10-70*	128	64	32	4	>32	>32	32	16	2	>8	4	Ia
Hannover	12-10-71*	>128	>128	32	8	>32	>32	>32	32	4	>8	2	II
Hannover	12-10-72*	>128	>128	32	8	>32	>32	16	8	1	8	2	Ib
Jena	10-10-64	8	8	0,25	0,25	2	8	16	8	2	8	4	XIIa
Jena	10-10-68*	32	32	16	8	16	16	8	>32	16	>8	>8	XVI
Jena	10-10-72*	>128	128	16	4	>32	32	32	4	4	>8	>8	XII
Jena	10-10-74*	>128	>128	32	16	32	>32	32	16	16	>8	>8	XIX
Jena	10-10-77*	64	32	8	8	32	16	8	>32	16	>8	>8	XVI
Jena	15-01-05*	32	16	16	16	16	16	>32	32	16	>8	>8	XVIII
Jena	15-01-10*	64	32	32	16	16	>32	>32	>32	>32	>8	>8	XV
Jena	15-01-40*	64	32	32	16	>32	>32	16	>32	>32	>8	8	XVII
Ulm	12-09-03*	>128	>128	16	8	>32	>32	16	>32	16	>8	>8	XX
Ulm	12-09-14*	32	32	16	16	16	16	8	2	1	4	2	XXII
Ulm	12-09-15*	32	16	4	2	16	4	8	4	2	16	16	XXI
Ulm	12-09-24*	32	32	4	2	16	8	16	8	2	16	16	XXI
Berlin	15-01-59*	≥128	≥128	128	≥32	≥64	≥32	≥16	≥64	≥64	nd	≥16	nd

<sup>1</sup>Die Identnummer dient als Stammbezeichnung und gibt Auskunft über den Standort der Dauerkultur. nd: nicht getestet; \*: multiresistenter Stamm mit reduzierter Empfindlichkeit (intermediär oder resistent entsprechend den Richtlinien der DIN gegenüber den Vertretern aller fünf in der Therapie bei *P. aeruginosa* einsetzbaren Antibiotika-Gruppen: Imipenem (Carbapeneme), Piperacillin (Penicilline), Ceftazidim (Cephalosporine), Ciprofloxacin (Chinolone) und Gentamicin (Aminoglykoside).

### 3.3.2 Korrelation der PFGE- und Resistenzmuster

Bei der in Tabelle 3.2 dargestellten Korrelation der PFGE-Muster und der Antibiotika-Empfindlichkeit wurde für Klone mit mehr als drei Stämmen jeweils der Median der MHK gewählt, sofern die MHK-Werte nicht mehr als um eine Stufe nach oben oder unten abwichen. Lagen pro Klon nur zwei Stämme vor, so wurde der höhere Wert angegeben, wenn die MHK-Werte nicht um mehr als eine Stufe divergierten. Wichen dagegen die MHK-Werte für mindestens eine Substanz um mehr als eine Stufe ab, so wurde der entsprechende Stamm mit dem abweichenden Phänotyp gesondert aufgeführt.

Bei vier Klonen wiesen die Varianten keine abweichenden Phänotypen auf, während bei fünf Klonen die Varianten eine erhöhte Antibiotika-Empfindlichkeit zeigten und nicht als multiresistent eingestuft wurden. Ein Stamm des Klons III wies bei identischem PFGE-Muster nicht den Phänotyp der Multiresistenz auf.

Tabelle 3.2. Epidemiologie und Resistenzphänotyp der multiresistenten Klone

	Epidemiologie							Antibiotika-Empfindlichkeit						
	Klon*	Variante*	Anzahl der Stämme	Patient	Abteilung	Art der Station	GENARS-Zentrum	Multiresistenz	MHK (mg/L) von					
									Ciprofloxacin RI $\geq$ 2	Gentamicin RI $\geq$ 2	Piperacillin RI $\geq$ 8	Piperacillin/ Tazobactam RI $\geq$ 8/8	Ceftazidim RI $\geq$ 8	Meropenem RI $\geq$ 4
CF-Patienten	I <sup>1</sup>		3	A	CYF	a	Han	+	4	16	128	128	>32	8
	II		1	A	CYF	a	Han	+	2	32	>128	>128	>32	8
	III <sup>2,3</sup>		2	B	CYF	a	Han	+	4	32	>128	>128	>32	8
			1	B	CYF	a	Han	-	0,5	32	>128	>128	>32	4
	IV		1	C	CYF	a	Han	+	2	>32	>128	>128	>32	16
		IVa	1	C	CYF	a	Han	-	0,5	32	nd	4	4	1
	V		1	D	CYF	n	Han	+	4	>32	>128	>128	>32	16
		Va	1	D	CYF	n	Han	-	1	2	nd	4	1	2
		Vb	1	D	CYF	n	Han	-	2	4	nd	8	2	4
	VI <sup>2</sup>		2	E	CYF	a	Han	+	8	>32	64	32	32	8
	VII <sup>2</sup>		2	F	CYF	a	Han	+	8	16	>128	>128	>32	16
	VIII		1	G	CYF	a	Han	+	8	16	64	32	8	4
IX		1	H	CYF	a	Han	+	>8	16	>128	>128	>32	32	
X		1	I	CYF	a	Han	+	4	4	>128	>128	>32	4	
	Xa	1	I	CYF	a	Han	-	4	8	>128	$\leq$ 1	4	4	
XI		3	J	CYF	a	Han	+	2	16	128	128	32	8	
	XIa	1	I	CYF	a	Han	-	1	4	nd	4	2	1	
XII		1	K	CYF	a	Jen	+	>8	4	>128	128	>32	4	
	XIIa	1	K	CYF	a	Jen	-	4	8	8	8	2	0,25	
nicht-CF-Patienten	XIII		1	L	MED	n	Han	+	4	32	>128	>128	>32	16
	XIV		3	M	INF	n	Han	+	4	16	>128	>128	>32	32
	XV		1	N	ID	i	Jen	+	>8	>32	64	32	16	16
	XVI		2	O	NEU	i	Jen	+	>8	>32	64	32	32	8
	XVII		1	P	MED	i	Jen	+	8	>32	64	32	>32	16
	XVIII		1	Q	MED	i	Jen	+	>8	32	32	16	16	16
	XIX		1	R	HGC	n	Jen	+	>8	16	>128	>128	32	16
	XX		1	S	INF	n	Ulm	+	>8	>32	>128	>128	>32	8
	XXI		2	T	ANA	i	Ulm	+	>8	8	32	32	16	2
	XXII		1	U	NEC	n	Ulm	+	2	2	32	32	16	16

\*Die Identifizierung der Klone und deren Varianten erfolgte mit Hilfe der PFGE-Muster. Nur Varianten mit abweichendem Phänotyp sind mit den zugehörigen MHK-Werten separat aufgeführt. <sup>1</sup>Es traten bei gleichem Phänotyp zwei Varianten des PFGE-Musters auf. <sup>2</sup>Es trat bei gleichem Phänotyp eine Variante des PFGE-Musters auf. <sup>3</sup>Ein Stamm des Klons wies bei identischem PFGE-Muster nicht den Phänotyp der Multiresistenz auf. ANA: Anästhesiologie, CYF: Cystische Fibrose; HGC: Herz- und Gefäßchirurgie; INF: Infektionsstation; ID: Interdisziplinäre Intensivstation; MED: Innere Medizin; NEC: Neurochirurgie; NEU: Neurologie; a: ambulant; i: Intensiv-; n: Normal-Station; RI: Grenzwert für verminderte Empfindlichkeit (intermediär und resistent) gemäß DIN.

### 3.4 Identifizierung von Mutatorstämmen

Mutatorstämme werden durch eine im Vergleich zum Wildtypstamm PAO1 mindestens 20-fach erhöhte Rifampicin-Resistenz vermittelnde Mutationsfrequenz charakterisiert. Die Prävalenz von Mutatorstämmen wurde phänotypisch mit Hilfe von Agardiffusionstests untersucht und durch die Bestimmung der Rifampicin-Resistenz vermittelnden Mutationsfrequenz validiert. In das Screening mittels Agardiffusion wurden alle multiresistenten Stämme einbezogen. Die Mutationsfrequenz wurde jeweils repräsentativ mit einem Stamm pro Klon in einer dreifachen Bestimmung untersucht. Bei allen anderen Stämmen des jeweiligen Klons und Varianten eines Klons wurde die Stabilität des Mutatorphänotyps mit einer einmaligen Mutationsfrequenzbestimmung geprüft.

Die Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch ein positives Testergebnis des phänotypischen Mutatorstamm-Screenings. In mindestens drei der Hemmhöfe des untersuchten Stammes 12-09-15 (Klon XXI) liegen nach 36h Inkubation Subpopulationen mit verringerter Empfindlichkeit gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum vor.

**Abbildung 3.2:** Detektion des Mutatorphänotyps mit Hilfe des Agardiffusionsverfahrens. Die Testblättchen sind mit Ciprofloxacin, Ceftazidim, Imipenem, Meropenem und Tobramycin (im Uhrzeigersinn beginnend bei 12:00 Uhr) beschickt.



Das Mutatorstamm-Screening mittels Agardiffusion ergab für elf Klone ein positives Ergebnis. In sieben Fällen konnte anhand des Tests keine Aussage getroffen werden, da auf Grund eines hohen Resistenzniveaus bei mindestens einer Substanz kein Hemmhof vorlag. Anhand der Mutationsfrequenzbestimmungen wurde bei 14 Klonen ein Mutatorphänotyp nachgewiesen. Dabei stammten drei der betroffenen Klone nicht von CF-Patienten. Eine

Korrelation der Ergebnisse beider Nachweisverfahren ergab, dass zehn Mutatorstämme mit Hilfe des Screenings identifiziert werden konnten. Zwei Screeningtests fielen falsch positiv aus, während ein falsch negatives Ergebnis zu verzeichnen war. Drei der Mutatorstämme waren auf Grund eines zu hohen Resistenzniveaus und fehlender Hemmhöfe im Zuge des Screenings nicht nachweisbar. Bei vier Klonen, deren Agardiffusionstests nicht auswertbar waren, wurde keine erhöhte Mutationsfrequenz nachgewiesen. Der Mutatorphänotyp der Klone VI und XI war nicht stabil. Die Varianten beider Klone (VIa und XIa) wiesen eine um zwei Zehnerpotenzen niedrigere Mutationsrate auf.

**Tabelle 3.3: Ergebnisse des phänotypischen Mutatorstammscreenings und der Mutationsfrequenzbestimmung.**

	Klon	Variante	Mutatorphänotyp	Mutationsfrequenz
CF-Patienten	I		-	3.26±0.65x10 <sup>-9</sup>
		Ia	-	(6,15x10 <sup>-9</sup> )
		Ib	-	(3,36x10 <sup>-8</sup> )
	II		-	<b>3.56±1.67x10<sup>-6</sup></b>
	III		+	<b>1.09±0.21x10<sup>-5</sup></b>
		IIIa	+	(4,90x10 <sup>-6</sup> )
	IV		keine Aussage	<b>2.00±0.19x10<sup>-6</sup></b>
	V		+	<b>1.27±0.93x10<sup>-5</sup></b>
	VI	VI	+	<b>6.57±1.14x10<sup>-7</sup></b>
		VIa	+	(3,61x10 <sup>-9</sup> )
	VII		+	<b>2.50±0.82x10<sup>-6</sup></b>
		VIIa	+	(3,80x10 <sup>-6</sup> )
	VIII		+	<b>7.30±4.91x10<sup>-7</sup></b>
	IX		keine Aussage	<b>1.94±0.24x10<sup>-6</sup></b>
X		+	<b>5.85±0.68x10<sup>-7</sup></b>	
XI		+	<b>1.43±0.15x10<sup>-5</sup></b>	
	XI	+	(1,71x10 <sup>-7</sup> )	
XII		+	<b>1.20±0.14x10<sup>-6</sup></b>	
nicht-CF Patienten	XIII		-	8.03±3.68x10 <sup>-9</sup>
	XIV		-	1.47±0.48x10 <sup>-8</sup>
	XV		keine Aussage	<b>3.06±1.26x10<sup>-6</sup></b>
	XVI		keine Aussage	2.01±0.66x10 <sup>-8</sup>
	XVII		+	3.50±0.66x10 <sup>-8</sup>
	XVIII		keine Aussage	3.24±0.55x10 <sup>-8</sup>
	XIX		keine Aussage	1.57±0.44x10 <sup>-8</sup>
	XX		keine Aussage	5.86±1.41x10 <sup>-8</sup>
	XXI		+	<b>2.26±0.23x10<sup>-6</sup></b>
	XXII		+	<b>5.40±1.65x10<sup>-6</sup></b>
PAO1 Wildtypstamm			-	3,07±0.58x10 <sup>-8</sup>

+: Mutatorphänotyp; -: kein Mutatorphänotyp; Die Mutationsfrequenz von Mutatorstämmen ist durch Fettdruck gekennzeichnet.

### 3.4.1 Genetische Charakterisierung des Mutatorphänotyps von Klon XXI

Mutatorstämme werden typischer Weise bei CF-Patienten nachgewiesen und sind sehr selten von Patienten ohne diese genetische Grunderkrankung zu isolieren. Vor diesem Hintergrund waren die drei Klone XV, XXI und XXII mit Mutatorphänotyp, die nicht von Patienten mit cystischer Fibrose stammten, von besonderem Interesse. Bei dem Klon XXI, dessen Mutationsfrequenz  $2.26 \pm 0.23 \times 10^{-6}$  betrug wurde exemplarisch die Ursache des Mutatorphänotyps auf genetischer Ebene untersucht. Der Klon wurde bei einem 63-jährigen Patienten während dessen Behandlung auf einer Intensivstation der Anästhesiologie aus Wundeiter und zwölf Tage später auf einer Normalstation der Abdominalchirurgie erneut aus einem Wundabstrich desselben Patienten isoliert. Um die Ursache des Mutatorphänotyps zu klären, wurden die Gene des DNA-Reperatur-Systems MMR *mutL*, *mutS* und *uvrD* amplifiziert und sequenziert. Dabei konnte in *mutL* (1902bp) die Deletion der Base A1250 in Kodon 417 identifiziert werden, welche einen Frameshift verursachte. MutL hat während der Aktivität des MMR-Systems eine essentielle Aufgabe und bewirkt durch eine Komplexbildung mit MutS die Aktivierung einer DNA-Helikase II (*uvrD* Genprodukt) und einer Endonuklease, wodurch das Entfernen einer fehlerhaften Sequenz ermöglicht wird. In *mutS* and *uvrD* wurden keine Mutationen identifiziert.

Der Klon XXI wurde für spätere *in-vitro*-Simulationen ausgewählt, um das Potential eines Mutatorstamms zu prüfen, weitere Resistenzeigenschaften unter der Therapie zu akkumulieren (3.9).

## 3.5 Phänotypische Tests zur Analyse von erworbener Resistenz

### 3.5.1 Effluxpumpen-Inhibitionstest

Vorbereitend für molekulare Untersuchungen zur Überproduktion von Effluxsystemen wurden phänotypische Effluxpumpen-Inhibitionstests durchgeführt. Dazu wurde für jeden multiresistenten Klon inklusive der Varianten die MHK von Levofloxacin in An- und Abwesenheit des Inhibitors MC-207,110 ermittelt. Levofloxacin ist ein Substrat der vier signifikant zur erworbenen Resistenz beitragenden Effluxsysteme MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN und MexXY-OprN. Von einer Effluxpumpen-Überexpression wurde ausgegangen, wenn es in Anwesenheit des Effluxinhibitors mindestens zu einer 16-fachen Reduktion der Levofloxacin-MHK kam. Der Inhibitor MC-207,110 ist jedoch nicht geeignet, das Effluxsystem MexXY-OprN zu inhibieren (Lomovskaya et al., 2001). Für zehn der Klone wurde eine Effluxsystem-Überproduktion nachgewiesen (Tabelle 3.4), während der Klon VIII in Anwesenheit des Effluxinhibitors nicht zu wachsen vermochte. Auffällig war, dass die

Reduktionen der Levofloxacin-MHK-Werte des Klons VI und seiner Variante VIa starke Unterschiede aufwiesen.

**Tabelle 3.4: Ergebnisse zum Effluxpumpen-Inihitionstest**

	Klon	Variante	Levofloxacin MHK (mg/L)		Reduktion der MHK (-fach)	Ergebnis
			MC-207,110 (20 mg/L)			
			in Abwesenheit	in Anwesenheit		
CF-Patienten	I		8	2	4	-
	II		8	0,5	16	+
	III		8	2	4	-
	IV		4	1	4	-
	V		8	0,25	32	+
	VI		8	8	1	-
		VIa	4	0,5	8	-
	VII		8	0,5	16	+
	VIII		16	kW	kA	kA
	IX		128	32	4	-
	X		4	0,5	8	-
	XI		4	0,5	8	-
XII		16	1	16	+	
nicht-CF-Patienten	XIII		8	0,5	16	+
	XIV		8	1	8	-
	XV		32	32	1	-
	XVI		32	2	16	+
	XVII		16	2	8	-
	XVIII		128	4	32	+
	XIX		16	2	8	-
	XX		32	1	32	+
	XXI		128	2	64	+
	XXII		8	0,5	32	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			1	0,125	8	-
PAO1			0,5	0,06	8	-

+: Überexpression; -: keine Überexpression; kW: kein Wachstum in Anwesenheit des Inhibitors; kA: keine Auswertung möglich; PIP: Piperacillin; PIP/TAZ: Piperacillin/Tazobaktam; CAZ: Ceftazidim.

### 3.5.2 Cephalosporinase-Inhibitionstest

Zum Nachweis der bei *P. aeruginosa* häufig auftretenden Überproduktion der chromosomalen AmpC-β-Laktamase wurden Ceftazidim-Agardiffusionstests in Ab- und Anwesenheit von Cloxacillin durchgeführt. Trat auf Grund der inhibitorischen Wirkung des Cloxacillins auf AmpC eine Vergrößerung des Ceftazidim-Hemmhofs um mindestens 10 mm auf, so wurde von einer Überproduktion der chromosomalen β-Laktamase ausgegangen. Die Ergebnisse der

Untersuchungen sind für sämtliche Klone in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Varianten der Klone sind nur bei abweichenden Werten separat aufgeführt. Bei 17 der 22 Klone wurde eine Überproduktion der AmpC-β-Laktamase detektiert. Für drei Klone konnte keine Aussage getroffen werden, da auch in Anwesenheit des Inhibitors Cloxacillin durch Ceftazidim kein Hemmhof verursacht wurde.

**Tabelle 3.5: Ergebnisse des Cephalosporinase-Inhibitionstests**

	Klon	Variante	Ceftazidim (30 µg) Hemmhofdurchmesser (mm)		Differenz der Hemmhof- durchmesser (mm)	Test- ergebnis	Antibiotika- Empfindlichkeit MHK (mg/L) von		
			Cloxacillin (500 mg/L)				PIP	PIP/TAZ	CAZ
			in Abwesenheit	in Anwesenheit					
CF-Patienten	I		≤6	16	≥10	+	128	128	>32
	II		≤6	≤6	0	kA	>128	>128	>32
	III		≤6	33	≥27	+	>128	>128	>32
	IV		≤6	≤6	0	kA	>128	>128	>32
	V		≤6	≤6	0	kA	>128	>128	>32
	VI		16	27	11	+	64	32	32
	VII		17	32	16	+	>128	>128	>32
		VIIa	≤6	23	≥17				
	VIII		30	35	5	-	64	32	8
	IX		18	32	14	+	>128	>128	>32
	X		10	27	17	+	>128	>128	>32
	XI		≤6	25	≥19	+	128	128	32
XII		≤6	20	≥14	+	>128	128	>32	
nicht-CF-Patienten	XIII		≤6	17	≥11	+	>128	>128	>32
	XIV		9	27	18	+	>128	>128	>32
	XV		≤6	30	≥24	+	64	32	16
	XVI		≤6	25	≥19	+	64	32	32
	XVII		≤6	17	≥11	+	64	32	>32
	XVIII		15	25	10	+	32	16	16
	XIX		13	25	12	+	>128	>128	32
	XX		15	30	15	+	>128	>128	>32
	XXI		29	30	1	-	32	32	16
	XXII		24	26	2	-	32	32	16
<i>P. a.</i> R20, AmpC: WT			29	31	2	-	2	nd	1
PAO1 AmpC:WT			27	27	0	-	4	4	2
<i>P. a.</i> 1405 CON, AmpC:überexprimiert			7	21	14	+	128	nd	32

+: Überexpression; -: keine Überexpression; kA: keine Auswertung möglich; WT: Wildtyp; nd: nicht getestet; PIP: Piperacillin; PIP/TAZ: Piperacillin/Tazobactam; CAZ: Ceftazidim.

### 3.5.3 EDTA-Phenanthrolin-Imipenem Mikrodilutionstest

Um zu prüfen, ob die multiresistenten Klone Metallo-β-Laktamasen produzieren, wurde die MHK des Carbapenems Imipenem in An- und Abwesenheit der Metalloproteasen hemmenden Substanzen EDTA und 1,10-Phenanthrolin bestimmt. Wurde die MHK von Imipenem durch die inhibitorischen Substanzen mindestens achtfach reduziert, so wurde der Test positiv gewertet.

**Tabelle 3.6 Ergebnisse des EDTA-Phenanthrolin-Imipenem Mikrodilutionstests**

	Klon	Variante	Imipenem MHK (mg/L)		Reduktion der MHK (-fach)	Test-ergebnis	Antibiotika-Empfindlichkeit MHK (mg/L) von			
			1-10-Phenantrolin (0,04mM)/ EDTA (0,4mM)				PIP	PIP/TAZ	CAZ	MEM
			in Abwesenheit	in Anwesenheit						
CF-Patienten	I		64	32	2	-	128	128	>32	8
	II		64	32	2	-	>128	>128	>32	8
	III		64	kW	kA	kA	>128	>128	>32	8
	IV		16	8	2	-	>128	>128	>32	16
	V		16	8	2	-	>128	>128	>32	16
	VI	VI	16	kW	kA	kA	64	32	32	8
		Vla	16	4	4	-				
	VII		32	8	4	-	>128	>128	>32	16
	VIII		8	kW	kA	ka	64	32	8	4
	IX		32	8	4	-	>128	>128	>32	32
	X		32	kW	kA	-	>128	>128	>32	4
	XI		32	16	2	-	128	128	32	8
XII		64	32	2	-	>128	128	>32	4	
nicht-CF-Patienten	XIII		64	32	2	-	>128	>128	>32	16
	XIV		64	32	2	-	>128	>128	>32	32
	XV		32	32	1	-	64	32	16	16
	XVI		16	16	1	-	64	32	32	8
	XVII		64	32	2	-	64	32	>32	16
	XVIII		16	16	1	-	32	16	16	16
	XIX		64	16	4	-	>128	>128	32	16
	XX		16	8	2	-	>128	>128	>32	8
	XXI		16	8	2	-	32	32	16	2
	XXII		16	8	2	-	32	32	16	16
<i>P. aeruginosa</i> B63230			128	2	64	+	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			2	1	2	-	2	2	1	0,5

+: Expression einer Metallo-β-Laktamase; -: keine Expression einer Metallo-β-Laktamase; PIP: Piperacillin; PIP/TAZ: Piperacillin/Tazobactam; CAZ: Ceftazidim; MEM: Meropenem; kW: keine Wachstum; kA: keine Auswertung möglich.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind der Tabelle 3.6 zu entnehmen. Sofern nicht anders angegeben wurde pro Klon repräsentativ ein Stamm getestet. Varianten sind nur bei abweichenden Testwerten separat aufgeführt.

Für keinen der multiresistenten Klone des GENARS-Projektes wurde die Expression einer Metallo- $\beta$ -Laktamase nachgewiesen. Bei zwei Klonen und einem Stamm des Klons VI wurde das Wachstum in Anwesenheit von EDTA und 1,10-Phenanthrolin inhibiert, sodass keine Auswertung der Tests erfolgen konnte. Für den zusätzlich untersuchten Berliner *P. aeruginosa*-Stamm B63230 dagegen konnte auf Grund einer 64-fachen Reduktion der Imipenem-MHK die Expression einer Metallo- $\beta$ -Laktamase belegt werden. Dies war der zweite Nachweis einer Metallo- $\beta$ -Laktamase in Deutschland.

### **3.6 Genotypische Tests zur Analyse von durch Mutationen erworbener Resistenz**

#### **3.6.1 Effluxpumpen-Überexpression**

In der Entstehung von Multiresistenz nimmt bei *P. aeruginosa* die Überexpression von Breitspektrum-Effluxsystemen der RND-Familie eine zentrale Rolle ein. Die zuvor durchgeführten phänotypischen Effluxpumpen-Inhibitionstests (3.5.1) ermöglichten nur eine Aussage darüber, in welchem Ausmaß die durch den Inhibitor hemmbaren Effluxsysteme, MexAB-OprM, MexCD-OprJ und MexEF-OprN, insgesamt exprimiert wurden. Um zwischen diesen Effluxsystemen differenzieren zu können und die zusätzliche Überexpression des durch den Inhibitor nicht hemmbaren Effluxsystems MexXY-OprM nachzuweisen, wurde folgende Strategie verfolgt: Für die zehn Klone, deren Effluxpumpen-Inhibitionstests positiv ausgefallen waren, sowie den Klon VIII, dessen Test nicht auswertbar war (3.5.1), wurden die Efflux-Regulatorgene *mexR* (MexAB-OprM) und *nfxB* (MexCD-OprJ) amplifiziert und sequenziert. Für Klone, deren Carbapenem-Resistenz nicht durch den Verlust des Porins OprD erklärt werden konnte (siehe 3.6.2), wurde außerdem die Überexpression des Effluxsystems MexEF-OprN überprüft. MexEF-OprN wird mit OprD koreguliert, wobei die Expression des Effluxsystems hochreguliert und die des Porins OprD gesenkt wird. Im Zuge der Untersuchungen wurden sowohl das Gen des positiven Regulators MexT als auch das für eine Oxidoreduktase kodierende Gen *mexS* sequenziert. Der Regulator MexZ des Effluxsystem-Operons *mexX-mexY* wurde für alle Klone hinsichtlich Modifikationen untersucht.

**Tabelle 3.7: Modifikationen von Genprodukten, die in die Regulation der Expression von Effluxsystemen involviert sind**

	Klon	Variante	EPI-Test	MexR	NfxB	MexT	MexS	MexZ	
				MexAB-OprM	MexCD-OprJ	MexEF-OprN (OprD)		MexXY	
CF-Patienten	I		-					Leu138 Arg Deletion C595 Frameshift	
	II		+	-	-			Gln134Stop	
	III		-					Tyr49Cys	
	IV		-					Leu123Stop	
	V		+	-	Leu62Pro Arg186His			Val58Ala Gly89Ser Arg143Gln	
	VI			-			intakt	Gly68Ser	Arg65His
		Vla		-					Val23Gly
	VII			+	Val126Glu	-	intakt	Phe273Ile	Deletion G142 Frameshift
		VIIa					intakt Val199Ala		
	VIII			kA	-	-			Thr32Ile Ala175Val
	IX			-					Ser44Phe
	X			-					Asp155Gly
XI			-					Arg45Leu	
XII			+	Val126Glu	Arg21His Asp56Gly Ser167Pro			Leu138Arg Deletion bp 447-630 Frameshift	
nicht-CF-Patienten	XIII		+	-	-			bp318-592*	
	XIV		-					Deletion bp491-496 Frameshift	
	XV		-					Leu138Arg Deletion bp515-532 Frameshift	
	XVI		+	Val126Glu	-			-	
	XVII		-					Gly89Ser Asp155Gly	
	XVIII		+	Lys44Met Val126Glu	-			Val48Ala	
	XIX		-			intakt	-	-	
	XX		+	Insertion von C nach G75 Frameshift	-			Val48Ala	
	XXI		+	Asn Insertion nach Leu52	-	intakt	-	-	
	XXII		+	Val126Glu	Arg21His Asp56Gly			Val48Ala Asn186Ser	

**\*Wiederholte Sequenzierungen mit unterschiedlichen Primern ergaben für den Sequenzbereich bp318-592 nicht differenzierbare Mehrfachsignale; kA: keine Auswertung möglich; EPI-Test: Effluxpumpeninhibitionstest.**

Die Ergebnisse sämtlicher Sequenzanalysen sind in der Tabelle 3.7 zusammengefasst. Bis auf die Klone II und XIII wurden bei allen Klonen mit einem positiven Ergebnis des Effluxpumpen-Inhibitionstests Modifikationen in MexR und/ oder NfxB identifiziert. In MexR wurden mit sieben Klonen am häufigsten und in NfxB bei drei Klonen (zweimal in Kombination mit MexR) Modifikationen gefunden. Für den Klon VIII, dessen Test nicht auswertbar war, wurden keine Veränderungen der Aminosäuresequenzen von MexR und NfxB festgestellt. Bei den Klonen VI (exklusive der Variante VIa), VII, XIX und XXI, bei denen die Carbapenemresistenz nicht durch den Verlust von OprD zu erklären war, konnte MexT als funktionstüchtiger Aktivator identifiziert werden. In MexS lagen bei zweien dieser Klone Modifikationen vor. Auffälliger Weise war die Prävalenz von Modifikationen im Repressor MexZ mit 19 von 22 betroffenen Klonen sehr hoch. Klon VI und die Variante VIa wiesen unterschiedliche Modifikationen der MexZ-Aminosäuresequenz auf.

### 3.6.2 Verlust von OprD

Als häufigste Ursache von Carbapenem-Resistenz gilt bei *P. aeruginosa* der Verlust des in der äußeren Membran lokalisierten Porins OprD (Pai et al., 2001). Diesem Resistenzmechanismus wurde durch Sequenzanalysen des für OprD kodierenden Gens auf den Grund gegangen (Tabelle 3.8.a). Die Prävalenz von Frameshifts oder vorzeitigen Stopkodons innerhalb der Sequenz, welche die Expression eines intakten Porins verhinderten, lag bei 82% (18/22). Bei dem Klon VI war nur in der Variante VIa ein Frameshift nachweisbar. Ergänzend zu der Analyse von Resistenz-relevanten Modifikationen, wurden die gewonnenen OprD-Aminosäuresequenzen epidemiologisch untersucht und den von Pirnay et al. identifizierten drei Gruppen A, B und C zugeordnet (2002). Die Sequenzunterschiede dieser Gruppen beruhen auf rekombinatorischen Ereignissen und sind durch eine Mosaikstruktur geprägt. Im Falle der Gruppe C sind weitere Subgruppen (C1, C2 und PAO1) benannt worden.

Vierzehn der multiresistenten Klone (64%) des GENARS-Projektes konnten der Gruppe B zugeordnet werden. Sechs Vertreter der Gruppe C (27%) traten auf. Von diesen gehörten drei Klone der Subgruppe C2, ein Klon der Subgruppe C1 und ein Klon der Subgruppe PAO1 an. Der Klon VI war auffälliger Weise im vorderen Sequenzbereich (Schleifen 2-7) der Subgruppe C1 und im Bereich der Schleife 7 der Subgruppe PAO1 zuzuordnen. Zwei Klone (9%), die nicht von Patienten mit cystischer Fibrose stammten, wiesen ein OprD-Porin der Gruppe A auf.

**Tabelle 3.8: Ergebnisse der Sequenzanalysen zum (a) Porin OprD und zu (b) den Typ-II-Topoisomerasen.**

(a)		(b)							
	Klon	Variante	OprD			Klon	Variante	Typ-II-Topoisomerasen	
			Modifikation	Gruppe/ Subgruppe				DNA- Gyrase	Topo- isomerase - IV
CF-Patienten	I		Deletion von bp745-748, <b>Frameshift</b>	B	CF-Patienten	I		Thr83Ile	-
	II		Trp138 <b>Stop</b>	B		II		-	-
	III		Trp277 <b>Stop</b> , Asp318Asn	B		III		Asp87Asn	-
	IV		Tyr91 <b>Stop</b>	B		IV		Asp87Asn	-
	V		Trp138 <b>Stop</b>	B		V		Thr83Ile	-
	VI		-	Schleifen 2-5: C1 Schleife 7: PAO1		VI		Thr83Ile	-
		Via	Insertion von C nach A1205, <b>Frameshift</b>				-	-	
	VII		-	PAO1		VII		Thr83Val	-
	VIII		Deletion von G1017, <b>Frameshift</b>	B		VIII	VIIa	Thr83Ala	-
								Thr83Ile	-
	IX		Trp277 <b>Stop</b>	B		IX		Thr83Ile	-
	X		Insertion von G nach G635, <b>Frameshift</b>	C1		X		Thr83Ile	-
XI		Trp277 <b>Stop</b>	B	XI		Asp87Asn	-		
XII		Trp277 <b>Stop</b>	B	XII		Thr83Ile	-		
nicht-CF-Patienten	XIII		Trp277 <b>Stop</b>	B	nicht-CF-Patienten	XIII		Thr83Ile	-
	XIV		Trp339 <b>Stop</b>	B		XIV		Thr83Ile	-
	XV		Deletion von bp155-167, <b>Frameshift</b>	B		XV		Thr83Ile	-
	XVI		Deletion von C393, <b>Frameshift</b>	A		XVI		Thr83Ile	Ser80Leu
	XVII		Trp138 <b>Stop</b>	B		XVII		Thr83Ile	-
	XVIII		Deletion von A1007, <b>Frameshift</b>	C2		XVIII		Thr83Ile Asp87His	Ser80Leu
	XIX		-	A		XIX		Thr83Ile	Ser80Leu
	XX		Gln327 <b>Stop</b>	C2		XX		Thr83Ile	-
	XXI		-	B		XXI		Thr83Ile Asp87Gly	Ser80Leu
	XXII		Insertion von C nach T1002, <b>Frameshift</b>	C2		XXII		-	-

-: Es wurde keine Modifikation der Aminosäuresequenz nachgewiesen.

### 3.6.3 Typ-II-Topoisomerasen DNA-Gyrase und Topoisomerase-IV

Modifikationen in der QRDR (quinolone resistance determining region) der Typ-II-Topoisomerasen DNA-Gyrase und Topoisomerase-IV gelten als die häufigsten Resistenzmechanismen gegenüber Chinolonen bei *P. aeruginosa* (Jalal u. Wretling, 1998). Die Prävalenz Resistenz vermittelnder Aminosäureaustausche wurde für sämtliche Klone einschließlich der Varianten durch Sequenzanalysen untersucht (Tabelle 3.8.b). Bei 86% der Klone (19/22) lagen in dem Gen *gyrA*, das für eine Untereinheit der DNA-Gyrase kodiert, mindestens eine resistenzrelevante Mutation vor. Bei dem Klon VII wurde für die Variante VIIa eine abweichende Modifikation in GyrA festgestellt. In dreien der Klone traten weder in *gyrA* noch in *parC* relevante Mutationen auf. Modifikationen wurden im sekundären Target der Chinolone, ParC, nur in Kombination mit relevanten Mutationen in *gyrA* nachgewiesen. Lediglich vier Klone mit Resistenz vermittelnden Mutationen in beiden Target-Genen wurden ausschließlich im nicht-CF-Patienten-Kollektiv gefunden. Nur bei zweien dieser Klone wurden wiederum Mutationen in zwei Kodons der QRDR von *gyrA* festgestellt.

### 3.7 Durch erworbene Resistenzgene vermittelte Resistenz

Bei *P. aeruginosa* kann eine Vielzahl von Resistenzdeterminanten auftreten, welche in erster Linie Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und  $\beta$ -Laktamen vermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde für sämtliche Stämme und Varianten der 22 multiresistenten Klone sowie den zusätzlich untersuchten Berliner Stamm B63230 ein umfassendes PCR-Screening nach relevanten erworbenen Resistenzgenen durchgeführt, welches insgesamt elf unterschiedliche Aminoglykosid-modifizierende-Enzym (AME)-Determinanten und 13 verschiedene  $\beta$ -Laktamase-Gene bzw. -Gruppen berücksichtigte. Bei einem positiven PCR-Testergebnis wurde exemplarisch das Amplicon jeweils eines Stammes pro Klon sequenziert, um die exakte Identität des Gens zu klären. Darüber hinaus wurde überprüft, ob das an Bedeutung gewinnende *qnr*-Gen, das die Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen verringert, im Kollektiv nachweisbar sei. Sekundäre Resistenzdeterminanten werden zumeist innerhalb der variablen Region von Integrons kodiert. Aus diesem Grunde wurde auch das Vorhandensein der für Klasse-1- und Klasse-2-Integrons charakteristischen Integrase-Gene *intI1* und *intI2* getestet. Da innerhalb von Integrons regelmäßig das Chloramphenicol-Resistenzgen *cmlA* auftritt, wurde trotz der natürlichen Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber dieser Substanz auch ein Screening nach dieser Determinante durchgeführt.

In der Tabelle 3.9 sind sämtliche Resistenzdeterminanten aufgeführt, die bei den GENARS-Klonen und dem Berliner Stamm B63230 identifiziert wurden. Diese erworbenen

Resistenzgene wurden auffälliger Weise ausschließlich bei Klonen nachgewiesen, die nicht von CF-Patienten stammten. Insgesamt wurden bei GENARS-Klonen zehn AME-, zwei  $\beta$ -Laktamase- und zwei *cmlA*-Gene gefunden. Diese entfielen auf nur fünf Klone, wobei sich die Klone XVII mit drei AME-Genen und XIX mit zwei AME-, einem  $\beta$ -Laktamase- und einem *cmlA*-Gen besonders hervortaten. Der Stamm B63230 beherbergte mit insgesamt sieben unterschiedlichen Resistenzgenen mit Abstand die meisten erworbenen Resistenzdeterminanten. Ausschließlich in den Stämmen, in denen erworbene Resistenzgene vorlagen, wurden die für die Integrase von Klasse-1-Integrans kodierenden *intI1*-Gene gefunden. Qnr und IntI2 wurden nicht nachgewiesen.

**Tabelle 3.9: Ergebnisse des Screenings nach erworbenen Resistenzdeterminanten und Integrase-Gene**

	Klon*	Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME)	$\beta$ -Laktamasen	sonstige Resistenzdeterminanten	Integrase-Gene
CF Patienten	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	-	-
	IV	-	-	-	-
	V	-	-	-	-
	VI	-	-	-	-
	VII	-	-	-	-
	VIII	-	-	-	-
	IX	-	-	-	-
	X	-	-	-	-
	XI	-	-	-	-
	XII	-	-	-	-
nicht-CF Patienten	XIII	-	-	-	-
	XIV	-	-	-	-
	XV	-	-	-	-
	XVI	<i>aac(6')Ib'</i>	-	<i>cmlA</i>	<i>intI1</i>
	XVII	<i>aadA1</i> <i>aadB</i> <i>aphA1-IAB</i>	-	-	<i>intI1</i>
	XVIII	<i>aacA7, aacA8</i>	<i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	-	<i>intI1</i>
	XIX	<i>aac(6')Ib, aadA2</i>	<i>bla<sub>PSE-1</sub></i>	<i>cmlA</i>	<i>intI1</i>
	XX	<i>aac(6')Ib', aadA2</i>	-	-	<i>intI1</i>
	XXI	-	-	-	-
	XXII	-	-	-	-
B63230 (15-01-59)		<i>aadA2, aac(6')Ib, aac(6')Ib'</i>	<i>bla<sub>PSE-1</sub>, bla<sub>VIM-2</sub></i>	<i>cmlA</i>	<i>intI1</i>

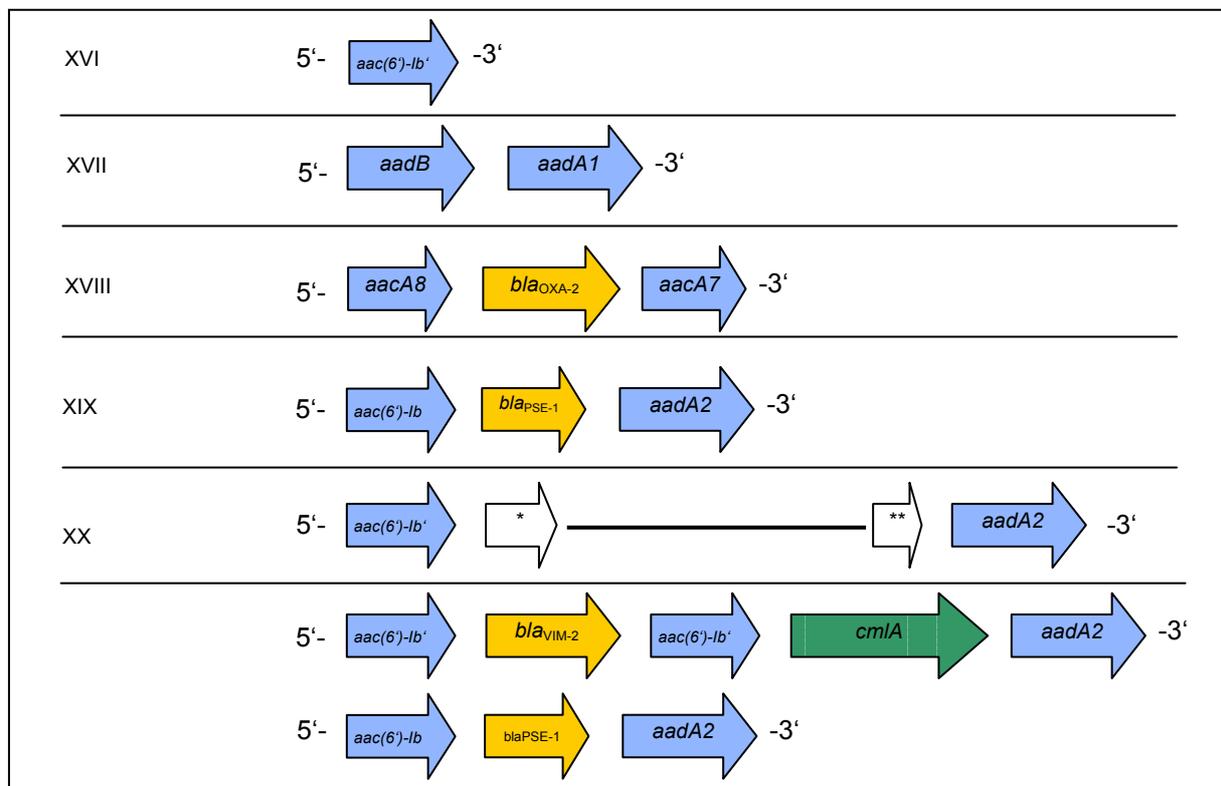
-: Es wurde keine Resistenzdetermine/ kein Integrase-Gen nachgewiesen.

### 3.7.1 Lokalisation von erworbenen Resistenzgenen

Zur Charakterisierung des genetischen Kontextes der beim PCR-Screening nachgewiesenen Resistenzgene wurden Analysen mit Hilfe von PCR-Mapping durchgeführt. Da ausschließlich Integrase-Gene von Klasse-1-Integrans gefunden wurden, konnten zu diesem Zweck die Primer der oben genannten Resistenzgene sowie Primer (5'-CS und 3'-CS), die in den konservierten 5'- und 3'-Randbereichen von Typ-1-Integrans binden, untereinander kombiniert werden. Zur Verifizierung der ermittelten Integronstrukturen wurden die PCR-Mapping-Produkte partiell sequenziert. In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst.

Insbesondere für den Berliner Stamm B63230 waren die Ergebnisse der Mapping-PCRs sehr aufschlussreich, da sie den Nachweis mehrerer Kopien desselben Genes innerhalb eines Stammes erlauben. Es konnten zwei Integrans differenziert werden. Innerhalb des größeren war, das Metallo-β-Laktamase-Gen *bla<sub>VIM-2</sub>* flankierend, zweimal das Acetyltransferase-Gen *aac(6')-Ib'* nachzuweisen.

Abbildung 3.3: Struktur der nachgewiesenen Klasse-1-Integrans



\*Der Open-Reading-Frame zeigt 80% Aminosäuresequenz-Homologie mit QacEA1. \*\* Der Open-Reading-Frame weist 57% Aminosäuresequenz-Homologie mit der RecA/RadA Rekombinase von *Yersinia bercovieri* auf.

Die Struktur des in Klon XX lokalisierten Integrons war ungewöhnlich und wurde nicht vollständig aufgeklärt. Zwischen den beiden Resistenzdeterminaten des Integrons erstreckte sich ein Sequenzbereich von ~2 kb Länge, in dessen vorderen Bereich unmittelbar stromabwärts von *aac(6')-Ib'* ein Open-Reading-Frame (348bp) lokalisiert war, der 80% Aminosäuresequenz-Homologie mit QacEΔ1 aufwies. Am hinteren Ende des Sequenzbereichs unmittelbar stromaufwärts von *ant(3'')-I* wurde ein Open-Reading-Frame (234bp) kodiert, der 57% Aminosäuresequenz-Homologie mit der RecA/RadA Rekombinase von *Yersinia bercovieri* zeigte.

Die Aminoglykosid-Resistenz vermittelnde Phosphorylase AphA1-IAB wird nicht auf Integrons kodiert und wurde somit nicht innerhalb des Integrons des Klons XVII lokalisiert. Bei den Klonen XVI und XIX konnten die *cmlA*-Resistenzgene nicht den Klasse-1-Integrons zugeordnet werden.

### 3.7.2 Konjugation

Integrons der Klasse 1 sind zumeist auf Transposons und Plasmiden lokalisiert. Die Aufklärung der Struktur der Integrons zeigte auf, in welcher Kombination die nachgewiesenen Resistenzgene auftraten. Im Anschluß sollte geprüft werden, ob und in welcher Frequenz diese z. T. Multiresistenz vermittelnden Integrons auf andere Bakterienstämme übertragen werden könnten. Dazu wurden intraspezifische und interspezifische Konjugationsexperimente mit den Rezipienten *P. aeruginosa* PAO1Rif<sup>R</sup> und *E. coli* W3110 *lac*<sup>-</sup>3a Rif<sup>R</sup> durchgeführt (Tabelle 3.10). Die Konjugationsfrequenz betrug zumeist zwischen  $1,5 \times 10^{-8}$  und  $8,7 \times 10^{-8}$ , wobei die Frequenz für die interspezifische Übertragung auf *E. coli* etwas geringer und bei den Klonen XVII und XX nicht nachweisbar war. Die Konjugationsexperimente für den Berliner Stamm B63230 blieben für beide Spezies ohne Erfolg.

Die Analyse der Antibiotika-Empfindlichkeit der gewonnenen Transkonjuganten zeigte bei sämtlichen Aminoglykosiden eine deutliche Verringerung der Empfindlichkeit. Für den Rezipienten *P. aeruginosa* PAO1Rif<sup>R</sup> ergab sich zum Beispiel bei Amikacin eine mindestens 16-fache Erhöhung der MHK von 4 mg/L auf  $\geq 64$  mg/L und für *E. coli* W3110 *lac*<sup>-</sup>3a Rif<sup>R</sup> eine mindestens achtfache Erhöhung der Amikacin-MHK von 0,5 mg/L auf 4 mg/L bzw. 8 mg/L. Die  $\beta$ -Laktamasen PSE-1 und OXA-2 vermögen beide Piperacillin und Ticarcillin zu hydrolysieren. Durch die Übertragung des *bla*<sub>PSE-1</sub> kodierenden Integrons des Klons XIX konnte bei den Transkonjuganten beider Spezies eine deutliche Erhöhung der MHK-Werte beider Substanzen verzeichnet werden. Die Übertragung des u. a. für OXA-2 kodierenden Integrons von Klon XVIII dagegen vermittelte keine Resistenz gegenüber Piperacillin und

Ticarcillin. Einhergehend mit der ebenfalls nicht verringerten Ticarcillin-Empfindlichkeit des Donors (MHK 64 mg/L), zeigten diese Ergebnisse, dass das *bla*<sub>OXA-2</sub>-Gen im Donor und in den Transkonjuganten nicht funktionstüchtig exprimiert wurde.

**Tabelle 3.10: Ergebnisse der Konjugationsversuche.**

Donor	Rezipient**	Konjugationsfrequenz	Transkonjugant	Antibiotika-Empfindlichkeit MHK (mg/L) von					
				AMK	GEN	TOB	PIP	PIP/TAZ	TIC
XVI	PA	1,48x10 <sup>-8</sup>	PA-A	≥64	≥32	4	nd	nd	nd
	EC	2,50x10 <sup>-8</sup>	EC-A	8	2	1	nd	nd	nd
XVII	PA	1,67x10 <sup>-6</sup>	PA-B	≥64	≥32	4	nd	nd	nd
	EC	< Nachweisgrenze***	-	-	-	-	-	-	-
XVIII	PA	1,90x10 <sup>-8</sup>	PA-C	≥64	≥32	4	8	8	16
	EC	3,67x10 <sup>-8</sup>	EC-C	8	2	1	0,25	≤1	2
XIX	PA	3,40x10 <sup>-7</sup>	PA-D	≥64	≥32	4	64	4	≥512
	EC	8,67x10 <sup>-8</sup>	EC-D	4	1	0,5	1	≥1	16
XX	PA	2,99x10 <sup>-9</sup>	PA-E	8	8	1	nd	nd	nd
	EC	< Nachweisgrenze***	-	-	-	-	-	-	-
B63230 (15-01-59)	PA	< Nachweisgrenze***	-	-	-	-	-	-	-
	EC	< Nachweisgrenze***	-	-	-	-	-	-	-
	PA			4	2	0,5	4	4	32
	EC			0,5	0,25	≤0,25	0,25	≤1	2

\*Als Donor wurden jeweils die Stämme 10-10-77 (XVI), 15-01-40 (XVII), 15-01-05(XVIII), 10-10-74 (XIX) und 12-09-03 (XX) verwendet. \*\*PA: *P. aeruginosa* PAO1Rif<sup>R</sup>; EC: *E. coli* W3110 *lac*3a Rif<sup>R</sup>. \*\*\* Die Nachweisgrenze betrug 20 KBE/mL. AMK: Amikacin, GEN: Gentamicin, TOB: Tobramycin, PIP: Piperacillin, PIP/TAZ: Piperacillin/Tazobactam, TIC: Ticarcillin; nd: nicht getestet.

### 3.8 Entstehung von Resistenz unter der Therapie

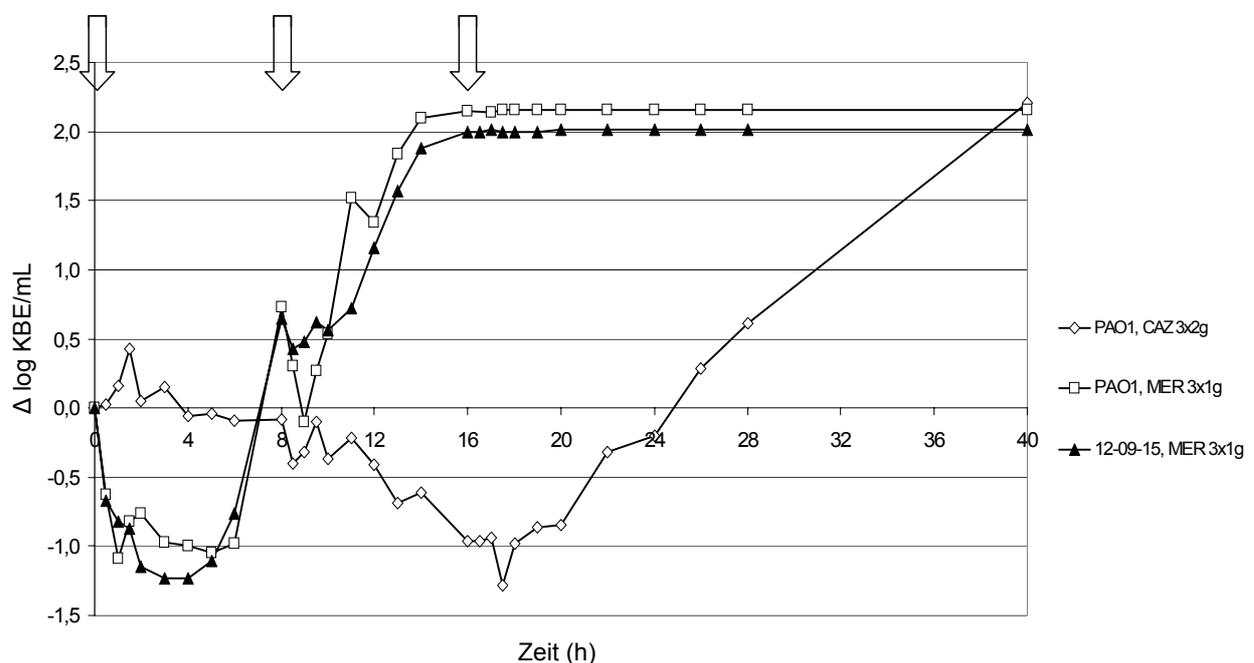
Nach der Untersuchung der in klinischen Stämmen auftretenden Resistenzmechanismen wurden weiterführende Experimente zur Entstehung der durch Mutationen hervorgerufenen Resistenz unter der Therapie durchgeführt. Dazu wurden Teststämme mit Hilfe von *in-vitro*-Modellen klinischen Konzentrationszeitprofilen der Substanzen Meropenem und Ceftazidim ausgesetzt. Für die Behandlung von *P.-aeruginosa*-Infektionen wird für beide Antibiotika von den Herstellern eine dreifache Dosierung im Intervall von 8 h empfohlen. Die Applikation der Einzeldosen von 1 g bei Meropenem und 2 g bei Ceftazidim erfolgt jeweils als 30-minütige Kurzzeitinfusion. Um Einblicke in die Bedeutung pharmakokinetischer Profile sowie erhöhter Mutationsraten für die Evolution von Resistenz zu gewinnen, wurden als Teststämme der

Wildtypstamm PAO1 und ein zuvor charakterisierter klinischer Mutatorstamm (12-09-15, Klon XXI) für die Simulationen herangezogen.

### 3.8.1 Antibakterieller Effekt

Die in den *in-vitro*-Modellen nach Applikation der therapeutischen Antibiotika-Konzentrationen erzielten Absterbekinetiken sind in der Abbildung 3.4 dargestellt.

**Abbildung 3.4:** Absterbekinetiken der Teststämme PAO1 und 12-09-15 unter der simulierten Behandlung mit Meropenem und Ceftazidim. Die Differenz der gemessenen logarithmierten KBE/mL und der initialen logarithmierten KBE/mL wurde gegenüber der Zeit aufgetragen. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der jeweiligen drei applizierten Dosen.



#### 3.8.1.1 Antibakterieller Effekt von Meropenem

Gegenüber dem Wildtypstamm PAO1 betrug die MHK von Meropenem 0,5 mg/L. Die MHK gegenüber dem klinischen Mutatorstamm 12-09-15 (Klon XXI) war ebenfalls nach DIN-Grenzwerten als klinisch sensibel einzustufen, lag jedoch mit 2 mg/L zwei MHK-Stufen höher. Dies war auf eine Überexpression des Effluxsystems MexAB-OprM zurückzuführen, die offenbar von Modifikationen im Repressor des Effluxsystems, MexR, herrührten (3.6.1). Nach der ersten Dosierung mit 1 g Meropenem erfolgte die maximale Reduktion der Zellzahl des Stammes PAO1 nach einer Stunde um -1,09  $\Delta$  log KBE/ml. Die maximale Reduktion für 12-09-15 trat nach 3 h ein und betrug -1,23  $\Delta$  log KBE/ml. Die Meropenem-Konzentration fiel während der Simulation für PAO1 nach 5,33 h und für 12-09-15 nach 2,33 h unter die MHK gegenüber dem jeweiligen Stamm. Bei beiden Stämmen war kurz darauf ein Wiederauwachen der Population zu beobachten, wobei die Zellzahl beider Kulturen zum

Zeitpunkt der zweiten Dosierung (8h) über dem Ausgangsinokulum lag. Bei 12-09-15 konnten die zweite und dritte Dosierung keine effektive Reduktion der Keimzahl erzielen. Die Reduktion der Keimzahl nach der zweiten Dosis Meropenem betrug für PAO1  $-0,83 \Delta \log$  KBE/ml. Auch beim Wildtypstamm vollzog sich das Wiederauwachsen der Kultur genauso schnell wie beim Mutatorstamm 12-09-15 und wurde durch die dritte Dosis nach 16 h nicht beeinträchtigt. 40 h nach dem Beginn der Simulation betrug die Zellzahl beider Stämme ein 20-faches des Ausgangsinokulums.

### 3.8.1.2 Antibakterieller Effekt von Ceftazidim

Die erste Gabe von 2g Ceftazidim führte zu keiner Reduktion der Zellzahl des Wildtypstammes PAO1, dessen MHK von Ceftazidim 2 mg/L beträgt. Nach der zweiten Dosis war eine schwache Reduktion um eine Zehnerpotenz zu verzeichnen. Der maximale Effekt von  $-1,28 \Delta \log$  KBE/ml wurde eineinhalb Stunden nach der dritten Dosis nach 17,5h erzielt. Ab diesem Zeitpunkt war ein langsames Wachstum der Kultur im Zentralkompartiment zu beobachten. Während der simulierten Behandlung mit Ceftazidim (dreimal 2 g im Abstand von jeweils 8 h pro Tag) lag die Konzentration des Antibiotikums für 24 h nicht unterhalb der MHK des Wildtypstammes PAO1. 40 h nach der ersten Dosis betrug die Zellzahl des Teststammes ein 20-faches des Ausgangsinokulums. Für 12-09-15 wurde aufgrund der ungünstigen pharmakokinetischen Parameter und pharmakologischen Indices von Ceftazidim (MHK 16 mg/L,  $T > MIC$  pro Dosis 45,75 % und  $C_{max}/MHK$  10,86) auf eine Simulation verzichtet.

**Tabelle 3.11: Pharmakodynamische Parameter und pharmakologische Indices**

Antibiotikum	Meropenem		Ceftazidim	
	PAO1	12-09-15 (XXI)	PAO1	12-09-15 (XXI)
MHK	0,5	2	2	16
Rmax (CFU (logΔ)/ml)	1h -1,09	3h -1,23	17,5 h -1,28	-
AAC <sub>24h</sub> (KBE [logΔ]/mL*h)	-22,46	-19,58	9,29	-
AAC <sub>40h</sub> (KBE [logΔ]/mL*h)	-57,02	-51,74	-8,62	-
T>MHK (%) pro Dosis	66,67	41,67	100	45,75
C <sub>max</sub> /MHK (dimensionslos)	112,2	28,05	86,9	10,86

**Rmax: maximaler Effekt; AAC-Wert (area-above-the-curve): relatives Maß für die Anzahl der abgestorbenen Bakterien; T>MHK: Prozentsatz der Zeit, innerhalb derer die Konzentration des Antibiotikums oberhalb der MHK des Bakteriums liegt; Cmax/MHK: Quotient der maximalen Konzentration und der MHK des Teststammes.**

### **3.8.2 Selektion von Mutanten**

Die Ergebnisse zur Selektion von Mutanten unter der simulierten Therapie sind der Abbildung 3.5 zu entnehmen.

#### **3.8.2.1 Mutanten von PAO1 unter der Therapie mit Meropenem**

Nach der Applikation der ersten Dosis von 1 g Meropenem konnte bei *P. aeruginosa* PAO1 keine Selektion von Mutanten nachgewiesen werden, da deren Zellzahl unterhalb der Nachweisgrenze von 1 KBE/ml lag. Während der zweiten Dosierung war eine Selektion zu verzeichnen, welche bis zum Beginn der dritten Dosis (16 h) zu einem Anteil der Mutante von 0,026 % an der Gesamtpopulation führte. Im Anschluss an die dritte Dosierung stieg der Anteil der Mutante an der Gesamtzellzahl rasch an, woraufhin am Ende der 40-stündigen Simulation ausschließlich Mutanten in der Population nachweisbar waren.

#### **3.8.2.2 Mutanten von PAO1 unter der Therapie mit Ceftazidim**

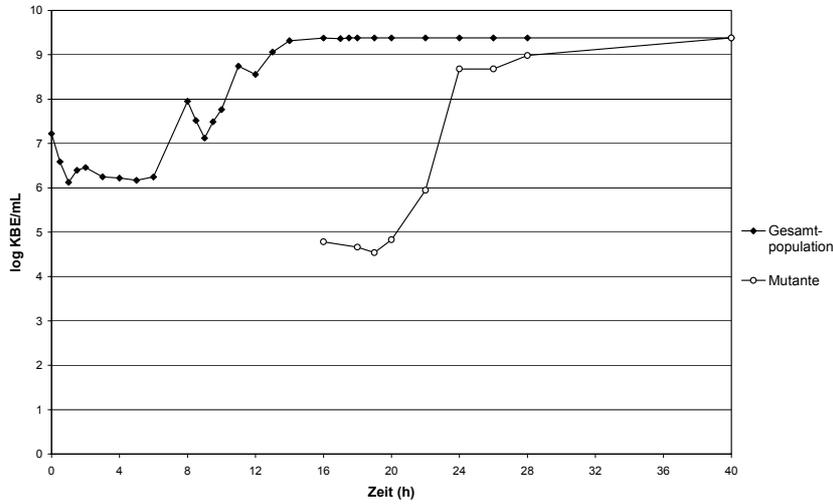
Auch unter dem Selektionsdruck von Ceftazidim konnte bei dem Wildtypstamm PAO1 nach der zweiten Dosis die Selektion von Mutanten im Zentralkompartiment des *in-vitro* Modells nachgewiesen werden. Dabei wurde im Vergleich zur Behandlung mit Meropenem ein 10.000-fach höherer Anteil an der Gesamtpopulation erzielt. Nach 16 h, zu Beginn der dritten Dosierung nahmen Mutanten-Zellen 33% der Population ein. Der Anteil der Mutanten stieg während der verbleibenden Zeit der Simulation weiterhin an und betrug nach 40 h 100% der Population.

#### **3.8.2.3 Mutanten von 12-09-15 unter der Therapie mit Meropenem**

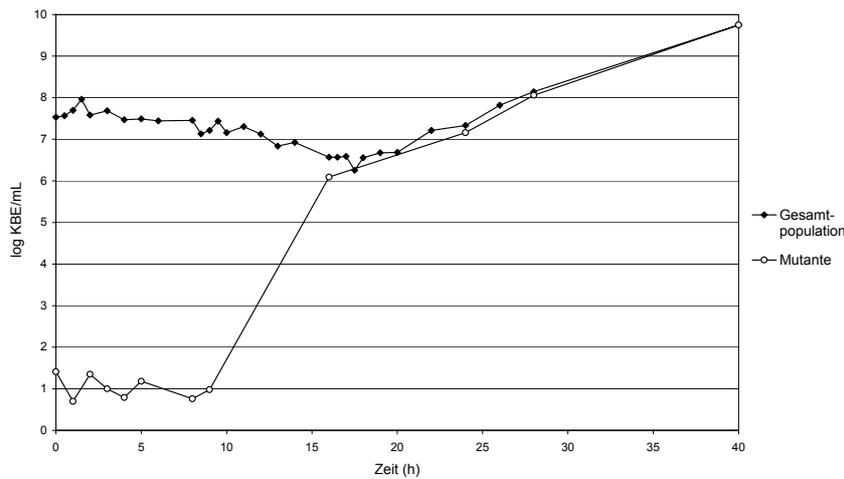
Bei dem Mutatorstamm 12-09-15 war bereits nach der ersten Dosierung die Selektion von Mutanten zu verzeichnen, wobei der Anteil der Mutanten nach acht Stunden 0,8 % betrug und nach 16 Stunden auf 16,7% anstieg. Während der dritten Dosierung bis zum Ende der Simulation kam es zu keiner weiteren Selektion.

Abbildung 3.5: Selektion von Mutanten während der im *in-vitro* Modell simulierten Therapie. Aufgetragen wurden jeweils die logarithmierten Zellzahlen (KBE/mL) der Gesamtpopulation und der selektierten Mutanten für (a) PAO1 unter der Therapie mit Meropenem, für (b) PAO1 unter der Therapie mit Ceftazidim und für (c) den Mutatorstamm 12-09-15 unter der Therapie mit Meropenem .

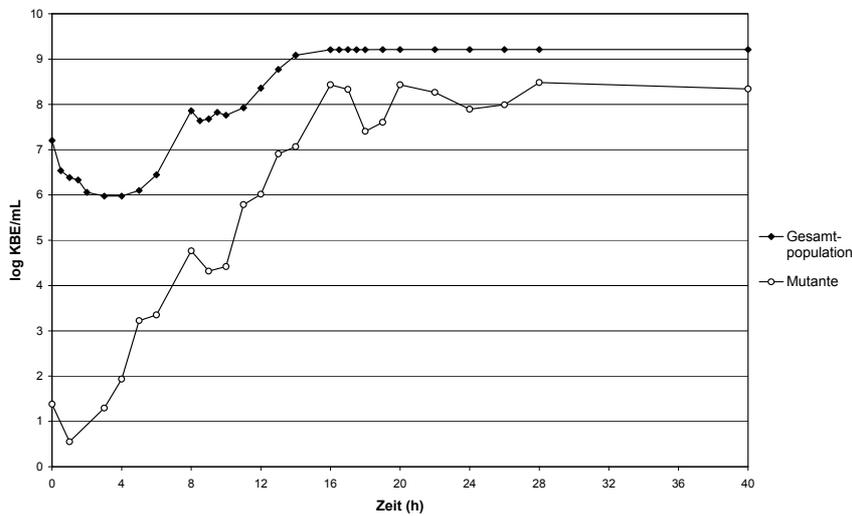
(a)



(b)



(c)

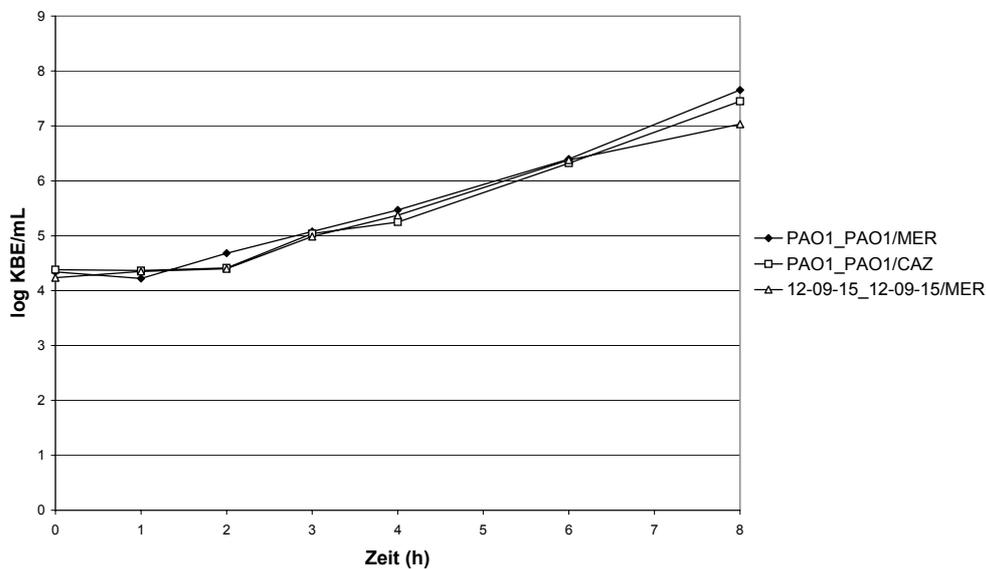


### 3.8.3 Kompetitiver Wachstumsversuch

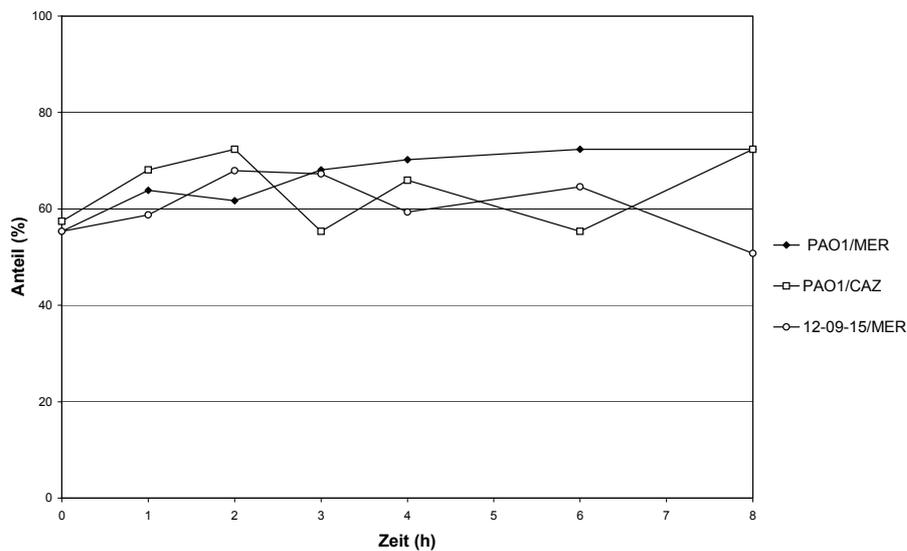
Die kompetitiven Wachstumsversuche dienten der Untersuchung der in den *in-vitro*-Modellen selektierten Mutanten bezüglich ihrer Fitness in Abwesenheit eines antimikrobiellen, selektiven Drucks. Dazu wurden die jeweilige Mutante und ihr Ausgangsstamm mit einem identischen Inokulum von  $10^2$  KBE/ml gemeinsam über 8h in einer Batchkultur ohne Antibiotium-Zugabe inkubiert.

**Abbildung 3.6** Kompetitive Wachstumsversuche mit im *in-vitro*-Modell selektierten Mutanten und den jeweiligen Ausgangsstämmen. Dargestellt sind (a) die logarithmierten Keimzahlen der Gesamtpopulationen und (b) die Anteile der Mutanten an der Gesamtpopulation.

(a)



(b)



Die als PAO1/MER, PAO1/CAZ und 12-09-15/MER bezeichneten Mutanten, welche unter der simulierten Therapie mit Meropenem und Ceftazidim selektiert und nach 40h aus den Zentralkompartimenten der *in-vitro*-Modelle entnommen worden waren, zeigten gegenüber ihrem Ausgangsstamm keine Wachstumsnachteile. Für alle Mutanten war über den Zeitraum des Versuchs hinweg keine bedeutsame Änderung des Anteils an der Gesamtpopulation zu verzeichnen.

### 3.8.4 Phänotypische und genotypische Untersuchung der selektierten Mutanten

Zur Charakterisierung der Mutanten, die unter der Therapie mit Meropenem selektiert worden waren, wurden zunächst auf phänotypischer Ebene die Empfindlichkeit gegenüber den Carbapenemen Meropenem und Imipenem und die Überexpression von Effluxpumpen geprüft (Tabelle 3.12.a).

**Tabelle 3.12: Phänotypische und genotypische Untersuchung von unter der Therapie mit (a) Meropenem und (b) Ceftazidim selektierten Mutanten und den jeweiligen Ausgangstämmen.**

(a)

Stamm	MHK (mg/L) von		Effluxpumpen-Inhibitionstest				Modifikationen in OprD
			MHK von LEV		Reduktion der MHK (-fach)	Ergebnis	
			MC-207,110 (20 mg/L)				
	MER	IMP	in Abwesenheit	in Anwesenheit			
PAO1	0,5	2	0,5	0,06	8	-	kM
12-09-15	2	4	128	2	64	+	kM
PAO1/MER	4	16	0,5	0,12	4	-	Insertion von C nach A1205, Frameshift
12-0915/MER	16	16	64	1	64	+	kM

(b)

Stamm	MHK (mg/L) von			Cephalosporinase-Inhibitionstest				Effluxpumpen-Inhibitionstest				Modifikationen in AmpD und AmpE
				Ceftazidim (30µg) Hemmhof-durchmesser (mm)		Differenz der Hemmhof-durchmesser (mm)	Ergebnis	MHK von LEV		Reduktion der MHK (-fach)	Ergebnis	
				Cloxacillin (500 mg/L)				MC-207,110 (20 mg/L)				
	CAZ	PIP	PIP/TAZ	in Abwesenheit	in Anwesenheit	in Abwesenheit	in Anwesenheit					
PAO1	2	4	4	27	27	0	-	0,5	0,06	8	-	kM
PAO1/CAZ	32	64	64	17	27	10	+	0,5	0,06	8	-	kM

LEV: Levofloxacin; MEM: Meropenem; IMP: Imipenem; CAZ: Ceftazidim; PIP: Piperacillin, PIP/TAZ: Piperacillin/Tazobactam; +: Überexpression von Effluxpumpen (a) bzw. der AmpC-β-Laktamase (b); -: keine Überexpression von Effluxpumpen (a) oder der AmpC-β-Laktamase (b).

Bei PAO1/MER wurde eine Senkung der Empfindlichkeit gegenüber beiden Substanzen festgestellt, die entsprechend der DIN-Grenzwerte zu intermediärer Resistenz gegenüber Meropenem und Resistenz gegenüber Imipenem führte. Für 12-09-15/MER lagen die MHK-Werte beider Substanzen bei 16 mg/L und waren in beiden Fällen als klinisch resistent einzustufen.

Analog zu den obigen Untersuchungen wurde bei der unter Ceftazidim-Therapie selektierten Mutante PAO1/CAZ die Empfindlichkeit gegenüber den  $\beta$ -Laktamen Ceftazidim, Piperacillin und Piperacillin/Tazobaktam geprüft. Typisch für die Überexpression der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase war eine 16-fache Senkung der MHK gegenüber allen drei Substanzen zu beobachten. Der Cephalosporinase-Inhibitionstest bewies mit einem positiven Ergebnis die Überexpression von AmpC, während der Effluxpumpen-Inhibitionstest kein positives Resultat ergab. Bei *P. aeruginosa* wird die Überexpression von AmpC zumeist durch Modifikationen in der zytosolischen N-Acetyl-Anhydromuramyl-L-Alanin-Amidase AmpD verursacht (Juan et al., 2005). Aus diesem Grund wurden *ampD* sowie das in demselben Operon kodierte *ampE* (Funktion ungeklärt) sequenziert, ohne Veränderungen in der Aminosäuresequenz festzustellen.

## 4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie zur Multiresistenz von *P. aeruginosa* lieferte neue Einblicke in die der Resistenz zu Grunde liegenden Mechanismen und deren Zusammenspiel. So wurde u. a. ein Mutatorstamm nachgewiesen und genetisch charakterisiert, der nicht wie gewöhnlich eine chronische Infektion der Lunge verursachte. Des Weiteren wurde im Gegensatz zu bisherigen Studien bei fast allen Klonen eine Beteiligung des Effluxsystems MexXY-OprM am Phänotyp der Multiresistenz festgestellt. Im Zusammenhang mit der zunehmenden globalen Ausbreitung von Metallo- $\beta$ -Laktamasen hatte der erstmalige Fund einer VIM-2-Metallo- $\beta$ -Laktamase in Deutschland eine besondere Bedeutung. Weiterführende Experimente zur Evolution der durch Mutationen hervorgerufenen Resistenz unter der Therapie untermauerten auch im Zusammenhang mit Mutatorstämmen die Hypothese des Mutantenselektionsfensters.

Bei der epidemiologischen Auswertung der PFGE-Fragmentmuster aller 41 untersuchten Stämme des GENARS-Projekts war das auffälligste Ergebnis, dass in allen drei in die Studie einbezogenen Krankenhäusern, die sich an dem kontinuierlichen Resistenz-Surveillance-Projekt beteiligen, bei den insgesamt 22 nachgewiesenen multiresistenten Klonen keine klonale Ausbreitung multiresistenter Stämme festgestellt wurde. Lediglich in einem Fall wurde die nicht multiresistente Variante eines multiresistenten CF-Patienten-Klons aus der Sputumprobe eines anderen CF-Patienten desselben Krankenhauses isoliert. Mehrere Stämme pro Klon wurden in erster Linie bei CF-Patienten isoliert. Diese Beobachtung lässt sich durch die intensive und häufige Kontrolle der lebensbedrohlichen chronischen Infektion der Lunge von CF-Patienten erklären. Ferner wurden nur im CF-Patienten-Kollektiv für Klone Varianten nachgewiesen, welche z. T. nicht multiresistent waren. Diese Variabilität stellt einen Beweis für die autarke Evolution eines *P.-aeruginosa*-Klons im Zuge der chronischen Infektion der Lunge dar, wie sie für CF-Patienten typisch ist (Römling et al., 1994). In diesen Kontext ist weiterhin einzuordnen, dass nur bei einem der zwölf CF-Patienten zwei multiresistente Klone parallel auftraten.

Für die autarke Evolution eines *P.-aeruginosa*-Stammes in der Lunge eines chronisch infizierten CF-Patienten scheint die für Mutatorstämmen charakteristische erhöhte Mutationsfrequenz eine Schlüsselfunktion zu spielen (Oliver et al., 2000). Eine Jahre

andauernde Persistenz erfordert die fortlaufende Adaption an die heterogene und fluktuierende Umwelt mit regelmäßiger und alternierender Antibiotikaexposition, wie sie für die Lunge eines CF-Patienten charakteristisch ist. Während es offenbar nur selten zur Akquirierung von Resistenzgenen durch die Übertragung von mobilen genetischen Elementen kommt, ermöglichen eine hohe spontane Mutationsrate und zugleich eine äußerst hohe Zellzahl ( $10^8$  bis  $10^{10}$  KBE/ml Sputum, Hoiby et al., 2001), dass relativ häufig mutierte Stämme vorliegen, die in der herrschenden Situation einen Selektionsvorteil haben.

So wiesen elf der zwölf Klone, die von CF-Patienten stammten, den Mutatorphänotyp auf. Zugleich wurde bei sämtlichen CF-Patienten ein multiresistenter, hypermutabler *P. aeruginosa*-Klon gefunden. Dieses Ergebnis übertrifft die bisher nachgewiesene Prävalenz von Mutatorstämmen bei CF-Patienten. In einer Studie aus dem Jahr 2000 wurden bei 37% von 30 CF-Patienten Mutatorstämmen nachgewiesen, unter denen Antibiotika-Resistenz bei bis zu ca. 70% der Stämme auftrat. Bei Stämmen ohne Mutatorphänotyp lag dagegen eine Resistenzrate von ca. 35% vor (Oliver et al., 2000). Eine Studie mit *P. aeruginosa*-Isolaten, welche eine chronische Infektion der Lunge als Folge anderer zu Grunde liegender Erkrankungen verursachten (Bronchiektasie, COPD), belegte für alle Isolate, die gegenüber mindestens zwei Substanzen Resistenz aufwiesen, den Mutatorphänotyp (Macia et al., 2005). Die äußerst hohe Prävalenz des Mutatorphänotyps in der vorliegenden Arbeit dürfte darauf zurückgeführt werden, dass ausschließlich multiresistente Klone untersucht wurden und untermauert eindrücklich die hohe Korrelation von Multiresistenz und Mutatorphänotyp.

Mehrere Beobachtungen innerhalb des Kollektivs von CF-Patienten sind bezeichnend für eine chronische Infektion der Lunge durch *P. aeruginosa*: Wie der oben genannte mehrfache Nachweis von Varianten eines Klons und die Tatsache, dass bis auf eine Ausnahme pro Patient lediglich ein multiresistenter Klon nachgewiesen wurde, kann auch die Beobachtung der Instabilität des Mutatorphänotyps bei zwei Klonen durch eine autarke Evolution erklärt werden. Der zufällige Verlust des Mutatorphänotyps scheint den betroffenen Stämmen keinen Nachteil zu verschaffen, sondern könnte im Gegenteil während einer Phase gleich bleibender Umweltbedingungen einen Verlust vitaler Funktionen durch nachteilige spontane Mutationen verhindern.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden nicht nur bei CF-Patienten, sondern auch bei drei Patienten mit anderen Erkrankungen Mutatorstämmen nachgewiesen. Mutatorstämmen sollen gemäß den oben stehenden Überlegungen zur Persistenz während einer chronischen Infektion wesentlich beitragen, bei akuten Prozessen, wie sie zumeist bei nosokomialen Infektionen

auftreten, allerdings keinen Vorteil bringen. Zwei der drei Mutatorstämme von nicht CF-Patienten wurden aus bronchoalveolärer Lavage bzw. Trachealsekret von Patienten isoliert, die auf einer interdisziplinären Intensivstation und einer Normalstation der Neurologie behandelt wurden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesen Patienten eine chronische Infektion der Lunge vorlag, bei denen Mutatorstämme wie bei CF-Patienten häufig auftreten. Ungewöhnlich ist dagegen der Mutatorstamm, der bei einem 63-jährigen Intensiv-Patienten der Anästhesiologie aus Wundeiter und zwölf Tage später erneut während der Behandlung auf einer Normalstation der Abdominalchirurgie aus einem Wundabstrich isoliert wurde. Dieser Fund lässt die Spekulation zu, dass der Mutatorstamm, wie für den äußerst virulenten Liverpool Epidemic Strain belegt wurde (McCallum et al., 2002), von einem CF-Patienten oder einem anderen chronisch erkrankten Patienten auf den betroffenen Patienten übertragen wurde.

Der Nachweis und die genetische Charakterisierung eines Mutatorstammes, der nicht im Kontext mit chronischen Infektionen der Lunge steht, wurden bislang noch nicht veröffentlicht. Aus diesem Grunde wurde für diesen Stamm die Ursache der erhöhten Mutationsfrequenz analysiert. Bisherige Untersuchungen von Mutatorstämmen ergaben, dass bei *P. aeruginosa* zumeist Modifikationen in MutS, dem Protein des DNA-Reparatursystems MMR, das kleinere Insertionen und Deletionen sowie nicht komplementäre Basen im Chromosom erkennt und bindet, den Mutatorphänotyp verursachen (Oliver et al., 2002). In diesem Stamm hingegen wurde eine bislang nicht veröffentlichte Deletion in *mutL* festgestellt, welche einen Frameshift und somit die Zerstörung der C-terminalen Dimerisierungsdomäne von MutL verursacht. Das Protein hat bei der Initiierung des MMR-Systems eine essentielle Aufgabe und bewirkt durch eine Komplexbildung mit MutS die Einleitung der nachfolgenden Reparaturschritte (Schofield u. Hsieh, 2003).

Die beinahe 100%-ige Korrelation von Multiresistenz und Mutatorphänotyp bei CF-Patienten und das mehrfache Auftreten des Mutatorphänotyps bei multiresistenten Klonen, die nicht von CF-Patienten stammen, sind zwei Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die für die Therapie von *P.-aeruginosa*-Infektionen von nicht unerheblichem Belang sind. Bei CF-Patienten kann bei einem *P.-aeruginosa*-Stamm mit multiresistentem Befund zugleich von einem Mutatorstamm ausgegangen werden. Dieser dürfte während der häufigen und alternierenden Antibiotika-Therapie, welche über kurze Zeiträume die Beschwerden, die mit der chronischen Infektion der Lunge einhergehen, reduzieren, in einem recht kurzen Zeitraum immer mehr mutationsbedingte Resistenzmechanismen akkumulieren und immer schwerer einzudämmen sein. Auch bei einem multiresistenten Stamm, der nicht im Kontext mit

cystischer Fibrose steht, kann ein Mutatorphänotyp nicht ausgeschlossen werden und den Behandlungserfolg ungünstig beeinflussen.

Für die Multiresistenz von *P. aeruginosa* wird Effluxsystemen nicht zuletzt wegen ihrer Fähigkeit, eine Vielzahl an Substanzen unterschiedlicher Antibiotika-Klassen zugleich aus der Zelle zu schleusen, eine herausragende Rolle zuteil. Für zehn der 22 multiresistenten Klone wurde in dieser Studie mit Hilfe eines Effluxpumpen-Inhibitionstests eine Überexpression nachgewiesen, die auf die Überexpression bzw. Expression der Systeme MexAB-OprM, MexCD-OprJ oder MexEF-OprN zurückgeführt werden könnte. Eine exakte Differenzierung ist jedoch, wie Untersuchungen mit definierten - eines der Systeme überexprimierenden - Mutanten von Lomovskaya et al. zeigten, anhand des Tests nicht möglich (Lomovskaya et al., 1999, 2001). Zudem gibt die Methode keinen Aufschluss über die Expression des Systems MexXY-OprM.

Um differenzierte Aussagen über die Expression der einzelnen Systeme treffen zu können, wurden die Regulatoren MexR (MexA-MexB-OprM), NfxB (MexC-MexD-OprJ), MexT (MexEF-OprN) und MexZ (MexX-MexY) auf Modifikationen hin untersucht. Die vier Regulatoren gehören zu den Familien MarR (MexR), LacI/GalR (NfxB), LysR (MexT) und TetR (MexZ) der Transkriptionsregulatoren (als Übersicht in Grkovic et al., 2002). Gemeinsame Strukturmerkmale dieser als Homodimer agierenden Regulatoren sind eine N-terminale, überwiegend hydrophobe DNA-Bindedomäne mit einem  $\alpha$ -Helix-Turn- $\alpha$ -Helix (HTH) DNA-Bindemotiv, eine Ligandenbinde- sowie eine Dimersierungsdomäne (Grkovic et al., 2002). Die Regulatoren kontrollieren zugleich durch eine sequenzspezifische Bindung in zwei benachbarte große Furchen der DNA-Doppelhelix im überschneidenden Operatorbereich die Expression des eigenen Gens, sowie die der Strukturgene des jeweiligen Effluxoperons. Durch Bindung eines Liganden an das Protein erfolgt eine fein abgestimmte Konformationsänderung innerhalb des Dimers, welche die DNA-Bindung des HTH-Motivs verhindert und somit auch eine regulatorische Aktivität. Die Liganden aller vier Regulatoren der Effluxsysteme sind unbekannt. Es konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich um Antibiotika-Substrate der Effluxsysteme handelt (als Übersicht in Morita et al., 2006). Dies stellt eine primär metabolische Funktion der Effluxsysteme unter Beweis. Für eine mutationsbedingte Inaktivierung der Regulatoren kommen Modifikationen in Frage, welche die Stabilität insbesondere in der DNA-Bindedomäne, die Dimerisierung sowie die DNA-Bindung beeinträchtigen oder unterbinden. Bei den Regulatoren MexR, NfxB und MexZ führt dies zu einer Derepression des Operons. MexT, ein Aktivator, liegt beim Wildtyp inaktiv vor. Erst durch eine Mutation erfolgt die Reaktivierung des Proteins. Diese führt offenbar nur dann

zu einer Aktivierung der Expression von MexEF-OprN und zugleich über einen ungeklärten Mechanismus zu einer verringerten Expression des Porins OprD, wenn Modifikationen in der unmittelbar stromaufwärts kodierten Oxidoreduktase MexS vorliegen (Sobel et al., 2005).

In dieser Studie wurde eine Zerstörung der Funktionsfähigkeit als Regulator bei zwei *mexR*-Genen und fünf *mexZ*-Genen durch Frameshifts und bei zwei weiteren *mexZ*-Genen durch Stopkodons innerhalb der Sequenz belegt. Die Signifikanz von Aminosäureaustauschen in den übrigen modifizierten Regulatoren wurde auf zwei Ebenen analysiert. Zunächst wurde anhand der Kristallstruktur oder sofern bislang keine Kristallstruktur des Proteins veröffentlicht wurde mit Hilfe der Software LOOPP (Learning, Observing and Outputting Protein Patterns), welche eine Vorhersage der Sekundärstruktur ermöglicht, die Position des jeweiligen Aminosäureaustauschs innerhalb der Sekundärstruktur bestimmt. Dies ermöglichte eine exakte Zuordnung auf die jeweiligen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern unterschiedlicher funktionaler Domänen. Modifikationen innerhalb der hoch konservierten DNA-Bindedomäne, insbesondere innerhalb des HTH-Motivs, wurden als besonders kritisch für die Funktion erachtet. Zudem wurde berücksichtigt, ob der Aminosäureaustausch einen Wechsel der Ladung oder eine sterische Beeinträchtigung innerhalb der Struktur mit sich brachte. Zusätzlich wurden für sämtliche Regulatoren bislang veröffentlichte Modifikationen recherchiert, deren Relevanz für die Expression der Systeme experimentell belegt wurde. Diese Daten wurden in Alignements zusammengefasst und sind im Anhang einzusehen. Alle Aminosäureaustausche, für die eine Signifikanz postuliert wurde, sind in der Tabelle 4.1 durch Fettdruck gekennzeichnet.

Für die Klone VII, XII, XVI und XXII wurde in MexR, dem Repressor des MexAB-OprM-Effluxsystemes ausschließlich der Austausch von Val126 in Glu innerhalb der Helix 6 der Dimerisierungsdomäne nachgewiesen. Die Relevanz dieser Modifikation wurde angezweifelt, da sie in zwei Studien zum Teil nicht mit einer Resistenz gegenüber Substraten von MexAB-OprM korrelierte (Pai et al., 2001, Ziha-Zarifi et al., 1999). Andere Untersuchungen mit multiresistenten *P.-aeruginosa*-Isolaten zeigten dagegen für alle untersuchten Stämme mit dieser Modifikation in einem anderen Regulator des *mexAB-oprN* Operons, NalC (PA3721), relevante Aminosäure-Austausche (Llanes et al., 2004). Ob bei den Stämmen in der vorliegenden Arbeit mit dem Austausch Val126Glu eine Überexpression des MexAB-OprM Systems am Phänotyp der Multiresistenz beteiligt ist, bleibt unklar.

**Tabelle 4.1** Signifikanz von Modifikationen in an der Regulation von Effluxsystemen beteiligten Genprodukten.

	Klon	Variante	MexR	NfxB	MexT	MexS	MexZ	
			(MexAB-OprM)	(MexCD-OprJ)	(MexEF-OprN)		(MexXY)	
CF-Patienten	I						<b>Leu138Arg*</b> <b>Deletion C595</b> <b>Frameshift*</b>	
	II		-	-			<b>Gln134Stop*</b>	
	III						<b>Tyr49Cys*</b>	
	IV						<b>Leu123Stop*</b>	
	V		-	<b>Leu62Pro*</b> Arg186His			Val58Ala, <b>Gly89Ser*</b> <b>Arg143Gln*</b>	
	VI	VI				intakt	Gly68Ser	Arg65His
		VIa						<b>Val23Gly*</b>
	VII		Val126Glu?	-		intakt	Phe273Ile	<b>Deletion G142</b> <b>Frameshift*</b>
		VIIa				intakt Val199Ala		
	VIII		-	-				<b>Thr32Ile*</b> Ala175Val
	IX							<b>Ser44Phe*</b>
	X							<b>Asp155Gly*</b>
XI							<b>Arg45Leu*</b>	
XII		Val126Glu?	Arg21His <b>Asp56Gly*</b> <b>Ser167Pro*</b>				<b>Leu138Arg*</b> <b>Deletion bp 447-630</b> <b>Frameshift*</b>	
nicht-CF-Patienten	XIII		-	-	intakt	-	<b>bp318-592*</b>	
	XIV						<b>Deletion bp491-496,</b> <b>Frameshift*</b>	
	XV						Leu138Arg, <b>Deletion</b> <b>bp515-532,</b> <b>Frameshift*</b>	
	XVI		Val126Glu?	-	intakt	-	-	
	XVII						<b>Gly89Ser*</b> <b>Asp155Gly*</b>	
	XVIII		<b>Lys44Met**<sup>1</sup></b> Val126Glu?	-			<b>Val48Ala**<sup>1</sup></b>	
	XIX				intakt	-	-	
	XX		<b>Insertion von C</b> <b>nach G75</b> <b>Frameshift*</b>	-	intakt	-	<b>Val48Ala**<sup>1</sup></b>	
	XXI		<b>Asn Insertion</b> <b>nach Leu52*</b>	-	intakt	-	-	
	XXII		Val126Glu?	Arg21His <b>Asp56Gly*</b>			<b>Val48Ala**<sup>1</sup></b> Asn186Ser	

**Fettdruck:** Modifikation signifikant für Funktionalität als Regulator, \*: postuliert anhand Lokalisation und Art des Austauschs. <sup>1</sup>Relevanz experimentell belegt; ?: Überexpression von MexAB-OprM könnte durch Mutation in NaIC hervorgerufen werden; -: keine Modifikation der Aminosäuresequenz.

In allen untersuchten Klonen wies MexT im Vergleich zum Wildtyp eine Deletion von 8 bp auf, welche zur Aktivierung des Regulators führt (Maseda et al., 2000). Der Aminosäureaustausch Val199Ala in der Klon-Variante VIIa wird als irrelevant erachtet, da beide Aminosäuren unpolar aliphatisch und von ähnlicher Größe sind. Zudem wurden in dem Sequenzbereich dieser Modifikation in keiner Studie Veränderungen beschrieben. Für die Oxidoreduktase MexS wurden bislang zwei Aminosäureaustausche (Ser124Arg und Val333Gly) beschrieben, welche gemeinsam mit der Aktivierung von MexT zu einer Expression von MexEF-OprN führten (Sobel et al., 2005). Diese publizierten Aminosäureaustausche konnten mit Hilfe von Aminosäuresequenz-Alignments keinen konservierten Domänen innerhalb des Enzyms zugeordnet werden. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Aminosäureaustausche hingegen wurden zwei konservierten funktionalen Domänen zugeordnet (Acyltransferase-Domäne (Gly68Ser) und der Kondensationsdomäne (Phe273Ile) und werden somit als signifikant erachtet.

In 19 der 22 multiresistenten Klone wurden Modifikationen in MexZ, dem Repressor des Operons *mexXY*, gefunden. Nur für einen von diesen Klonen wurde keine als relevant erachtete Modifikation in MexZ detektiert. Alle übrigen Veränderungen führten zu Frameshifts, Stopkodons innerhalb der Sequenz, zu schwerwiegenden Veränderungen innerhalb der DNA-Bindedomäne (Helices 1 bis 4) inklusive des HTH-DNA-Bindemotivs (Helices 2 und 3) oder innerhalb stabilisierender oder für die Dimerisierung wichtiger Bereiche der Dimerisierungsdomäne (Helices 5, 7 und 8). Die Lokalisation der Modifikationen korrelierte dabei stark mit den Ergebnissen anderer Studien, innerhalb derer die meisten relevanten Veränderungen ebenfalls in der DNA-Bindedomäne und den Helices 7 und 8 gefunden wurden.

Ein vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung, welche Resistenzmechanismen in welcher Kombination häufig bei multiresistenten *P.-aeruginosa*-Stämmen vorkommen und welche Auswirkungen diese Mechanismen im Zusammenspiel auf den ausgeprägten Phänotyp haben. Eine Korrelation der nachgewiesenen Phänotypen und der Resistenzmechanismen für alle bei *P. aeruginosa* Therapie-relevanten Antibiotika-Gruppen soll darüber Aufschluss geben.

Carbapeneme spielen für die Therapie von *P.-aeruginosa*-Infektionen eine wichtige Rolle ein; insbesondere Meropenem hat mit seit der Markteinführung kontinuierlich sehr geringen Resistenzraten von 1-2 % in Deutschland das größte therapeutische Potential aller einsetzbarer Antibiotika (Noll et al., 2005, Kresken et al., 2003).

Der dominierende Mechanismus der Carbapenem-Resistenz im untersuchten Kollektiv multiresistenter *P.-aeruginosa*-Stämme war, Ergebnisse anderer Studien bestätigend, der Verlust von OprD (Pai et al. 2001, Livermore, 2002). Bei den auf intraspezifische rekombinatorische Ereignisse zurückzuführenden OprD-Gruppen wurde keine Korrelation der Gruppe mit einem Resistenzniveau gegenüber Carbapenemen festgestellt. Mutatorstämme zeigten nicht, wie zuvor von Pirnay et al. postuliert mehr Modifikationen innerhalb der Aminosäuresequenz (Pirnay et. al., 2002). Der Verlust von OprD führt, wie mit charakterisierten Mutanten nachgewiesen wurde, zu Resistenz gegenüber Imipenem (MHK 16 mg/L) und intermediärer Resistenz gegenüber Meropenem (MHK 4mg/L, Köhler et al., 1999). Die bei *nfxC*-Mutanten auftretende reduzierte OprD-Expression führt zu grenzwertiger Resistenz gegenüber Imipenem (MHK 4 mg/L) und keiner klinisch relevanten Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber Meropenem (Köhler et al., 2001). *NfxB*-Mutanten, welche MexCD-OprJ überproduzieren, zeigen einen heterogenen Phänotyp. Mutanten des Typs B unterscheiden sich von Typ-A-Mutanten durch eine Hypersensibilität gegenüber Imipenem. Diese geht mit einer 16-fachen Reduktion der Imipenem-MHK einher und konnte nicht auf eine Beteiligung der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase oder OprD zurückgeführt werden (Wolter et al. 2005). Meropenem ist im Gegensatz zu Imipenem zusätzlich ein Substrat der MexAB-OprM-, MexCD-OprJ- und MexXY-OprM-Effluxsysteme von *P. aeruginosa* (Masuda et al., 2000). So führt z.B. die Überexpression von MexAB-OprM zu einer als intermediär klassifizierten Meropenem-MHK von 4 mg/L. Aus der Kombination von OprD-Verlust und MexAB-OprM-Überexpression resultiert ein Phänotyp von Imipenem- und Meropenem-Resistenz mit jeweiligen MHK-Werten von 16 mg/L (Köhler et al., 1999). Meropenem ist ein wesentlich schlechteres Substrat von MexCD-OprJ und MexXY-OprM und wird bei überproduzierenden Mutanten in einem ca. zehnfach geringeren Ausmaß als bei MexAB-OprM-Überproduzenten aus der Zelle geschleust. (Masuda et al., 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten klinischen multiresistenten Stämme zeigten keine klare Korrelation von Geno- und Phänotypen, wie sie für charakterisierte Laborstämme gezeigt wurden. Bei vielen Klonen dürfte das Zusammenspiel des OprD-Verlustes mit einer Überexpression von bis zu drei Effluxsystemen verantwortlich für eine Reduktion der Meropenem-Empfindlichkeit in einen klinischen relevanten Konzentrationsbereich sein. Für zwei der Klone ohne OprD-Verlust scheint die verringerte Produktion des Porins durch Modifikationen in MexT und MexS Ursache der verminderten Carbapenem-Empfindlichkeit zu sein. Eine Hypersensibilität gegenüber Imipenem bei Überproduktion des MexCD-OprJ-Effluxsystems wurde nicht gefunden. Bei einigen Klonen mit Resistenz gegenüber beiden

Carbapenemen scheinen andere als die bislang bekannten und in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen zusätzlich vorhanden (z. B. IX) oder allein (XIX) verantwortlich zu sein.

**Tabelle 4.2: Korrelation des Phänotyps und relevanter mutationsbedingter Resistenzmechanismen für die Resistenz gegenüber Carbapenemen**

	Klon	Variante	Phänotyp			Resistenzmechanismen								
			MHK (mg/L) von		Mutator	Porin OprD		Efflux						
			IMP	MER		Status	Gruppe	EPI-test	MexR	NfxB	MexT	MexS	MexZ	
									(MexAB-OprM)	(MexCD-OprJ)	(MexEF-OprN)		(MexXY)	
						MER	MER	Koregulation von OprD		MER				
CF-Patienten	IX		>32	32	+	Verlust	B	-						+
	I		32	8	-	Verlust	B	-						+
	II		32	8	+	Verlust	B	+	-	-				+
	III		32	8	+	Verlust	B	-						+
	V		16	16	+	Verlust	B	+	-	+				+
	VII		16	16	+	kM	PAO1	+	?	-	intakt	+		+
	XI		16	8	+	Verlust	B	-						+
	XII		16	4	+	Verlust	B	+	?	+				+
	X		16	4	+	Verlust	C1	-						+
	IV		8	16	+	Verlust	B	-						+
	VI	VIa	8	4	+	kM	C1/ PAO	-			intakt	+		-
-	Verlust				+									
VIII			8	4	+	Verlust	B	kA	-	-				+
nicht-CF-Patienten	XIV		>32	32	-	Verlust	B	-						+
	XIII		32	16	-	Verlust	B	+	-	-				+
	XV		32	16	+	Verlust	B	-						+
	XVII		32	16	-	Verlust	B	-						+
	XIX		32	16	-	kM	A	-			intakt	-		-
	XVIII		16	16	-	Verlust	C2	+	+	-				+
	XXII		16	16	+	Verlust	C2	+	?	+				+
	XVI		16	8	-	Verlust	A	+	?	-				-
	XX		16	8	-	Verlust	C2	+	+	-				+
	XXI		4	2	+	kM	B	+	+	-	intakt	-		-

\*Schleifen 2-5: C1, Schleife 7: PAO1; IMP: Imipnem, MEM: Meropenem; kM: keine Modifikation; kA: keine Auswertung möglich. ?: Überexpression von MexAB-OprM könnte durch Mutation in NalC hervorgerufen werden; +: der entsprechende Phänotyp oder eine relevante Modifikation liegt vor. -: der entsprechende Phänotyp oder die jeweilige Modifikation liegt nicht vor. EPI-Test: Effluxpumpen-Inhibitionstest.

Während unter den Stämmen des GENARS-Projekts keine Metallo- $\beta$ -Laktamase nachgewiesen wurde, konnte mit einem zusätzlich untersuchten multiresistenten Stamm aus Berlin erstmals in Deutschland ein VIM-Metallo- $\beta$ -Laktamase-Produzent detektiert werden. Die gefundene VIM-2 Determinante zeigt unter allen VIM-Enzymen bislang mit Abstand die größte Ausbreitung und wurde in 18 Staaten und elf Spezies (*Achromobacter xylosoxidans*,

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter genomsp.* 3, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* und *Serratia marcescens*) nachgewiesen (Conceição et al. 2005, Walsh et al. 2005). Der in dieser Arbeit charakterisierte *bla*<sub>VIM-2</sub> kodierende *P. aeruginosa*-Stamm besitzt typische Eigenschaften eines MBL-produzierenden Krankheitserregers: Er ist multiresistent und verfügt über ein Arsenal an weiteren Resistenzdeterminanten. Diese vermitteln hauptsächlich Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und sind auf zwei Klasse-1-Integrone lokalisiert. Diese Kombination des Metallo- $\beta$ -Laktamase-Gens mit zahlreichen AME-Genen stellt nicht zuletzt wegen der Gefahr von Koselektion eine große Herausforderung für die Therapie dar.

Der Fund eines VIM-2 produzierenden *P.-aeruginosa*-Stamms aus einem Berliner Krankenhaus im Kontext mit der Entdeckung der Metallo- $\beta$ -Laktamase GIM-1 ein Jahr zuvor in Düsseldorf macht die Notwendigkeit zur verstärkten Wachsamkeit deutlich und verlangt nach kontinuierlicher Surveillance. Die derzeitige Situation kann vielleicht auch für Deutschland nicht treffender bezeichnet werden als im Titel des kürzlich erschienenen Reviews von Walsh et al. „Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm?“ (2005).

Die Untersuchung des GENARS-Kollektivs hinsichtlich der Resistenz gegenüber Ureidopenicillinen (Piperacillin) und Cephalosporinen (Ceftazidim und Cefepim) und deren Korrelation mit dem Genotyp zeigte zwei Auffälligkeiten: Bei dem CF-Patienten-Kollektiv wurde ein insgesamt höheres Resistenzniveau beobachtet. Insbesondere wurden mehr Klone (8/12 versus 4/10) mit MHK-Werten von Piperacillin, Piperacillin/Tazobaktam und zumeist auch Ceftazidim jenseits des Grenzwertes zur klinischen Resistenz und des getesteten Konzentrationsbereichs gefunden (Tabelle 4.3). Dieses Phänomen dürfte auf ein starkes Expressionsniveau der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase zurückzuführen sein. Je nach dem Ausmaß der AmpC-Überproduktion werden für Piperacillin und Piperacillin/Tazobaktam MHK-Werte von 32mg/L bis 512 mg/L, für Ceftazidim MHK-Werte von 8mg/L bis 128mg/L und für Cefepim MHK-Werte von 8mg/L bis 32 mg/L vermittelt (Livermore, 1995). Eine Überproduktion von AmpC war in der vorliegenden Arbeit bei 73% der Klone nachweisbar und wurde als häufigster und für das Resistenzniveau wichtigster Mechanismus bestätigt. Zusätzlich kann die Überexpression verschiedener Effluxsysteme nicht zuletzt durch unterschiedliche Substratspektren den Phänotyp der  $\beta$ -Laktam-Resistenz modulieren. MexAB-OprM schleust Piperacillin, Ceftazidim und Cefepim aus der Zelle. Bei einer Überproduktion des Systems wird die MHK von Piperacillin ähnlich wie bei Ticarcillin vier-

bis sechzehnfach erhöht, während die MHK-Werte der Cephalosporine Ceftazidim und Cefepim verdoppelt werden. Eine Überproduktion von MexCD-OprJ vermag die MHK-Werte von Piperacillin und Cefepim um den Faktor vier zu erhöhen. Auch die Überproduktion von MexXY-OprM kann zu bis zu vierfach höheren MHK-Werten gegenüber Cefepim führen, während Piperacillin ein wesentlich schlechteres Substrat darstellt (Masuda et al., 1996, Masuda et al., 2000, Hocquet et al., 2006).

**Tabelle 4.3: Korrelation des Phänotyps und der  $\beta$ -Laktamresistenz vermittelnden Mechanismen**

	Klon	Phänotyp					Resistenzmechanismen					
		MHK (mg/L) von				Mutator	AmpC <sup>1</sup>	EPI-Test	Efflux			erworbene $\beta$ -Laktamase-Gene
		Piperacillin	Piperacillin/ Tazobactam	Ceftazidim	Cefepim				MexR	NfxB	MexZ	
									MexAB-OprM	MexCD-OprJ	MexXY-OprM	
Piperacillin Ceftazidim Cefepim	Piperacillin Cefepim	Piperacillin Cefepim										
CF-Patienten	II	>128	>128	>32	>32	+	kA	+			+	
	III	>128	>128	>32	>32	+	+	-			+	
	IV	>128	>128	>32	>32	+	kA	-			+	
	V	>128	>128	>32	>32	+	kA	+	-	+	+	
	VII	>128	>128	>32	>32	+	+	+	?	-	+	
	IX	>128	>128	>32	>32	+	+	-			+	
	X	>128	>128	>32	32	+	+	-			+	
	XII	>128	128	>32	32	+	+	+	?	+	+	
	I	128	128	>32	>32	-	+	-			+	
	XI	128	128	32	32	+	+	-			+	
nicht-CF-Patienten	VI	64	32	32	32	+	+	-			-	
	Vla				-	+						
	VIII	64	32	<b>8</b>	<b>32</b>	+	-	kA			+	
	XIII	>128	>128	>32	>32	-	+	+	-	-	+	
XIV	>128	>128	>32	>32	-	+	-			+		
XX	>128	>128	>32	>32	-	+	+	+	-	+		
XIX	>128	>128	32	>32	-	+	-			-	<i>bla</i> <sub>PSE-1</sub>	
XVII	64	32	>32	>32	-	+	-			+		
XVI	64	32	32	16	-	+	+	?	-	-		
XV	64	32	<b>16</b>	<b>&gt;32</b>	+	+	-			+		
XXII	32	32	16	16	+	-	+	?	+	+		
XXI	32	32	16	8	+	-	+	+	-	-		
XVIII	32	16	16	16	-	+	+	+	-	+	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> *	

\* Mit Hilfe von Transkonjuganten wurde nachgewiesen, dass diese Determinate keine Resistenz zu vermitteln vermag. kA: keine Auswertung möglich. ?: Überexpression von MexAB-OprM könnte durch Mutation in *NalC* hervorgerufen werden; +: der entsprechende Phänotyp oder eine relevante Modifikation liegt vor. -: der entsprechende Phänotyp oder die jeweilige Modifikation liegt nicht vor; EPI-Test: Effluxpumpen-Inhibitionstest.

Das zweite auffällige Ergebnis bei der Untersuchung der  $\beta$ -Laktamresistenz ist die um mindestens zwei Stufen höhere MHK von Cefepim im Vergleich zu Ceftazidim, die in zwei

Klonen (VIII und XV) beobachtet wurde. Für gewöhnlich liegt die MHK von Cefepim eine Stufe niedriger oder auf demselben Konzentrationsniveau von Ceftazidim. Dieses Phänomen wurde jedoch auch in anderen Studien vereinzelt beobachtet und kürzlich mit der Überexpression von MexXY-OprM in Zusammenhang gebracht (Hocquet et al., 2006). MexXY-OprM transportiert Cefepim, nicht aber Ceftazidim aus der Zelle. Vermutlich wird durch ein unterschiedliches Ausmaß der Überproduktion von MexXY-OprM die Empfindlichkeit gegenüber Cefepim bei den meisten Klonen der vorliegenden Studie nur leicht gesenkt und lediglich in den zwei beschriebenen Klonen um mehrere MHK-Stufen erhöht. Tatsächlich wurden in verschiedenen Studien sehr unterschiedliche Niveaus der Überexpression von MexXY-OprM belegt (Islam et al., 2004).

Die  $\beta$ -Laktamresistenz wurde fast ausschließlich durch das Zusammenspiel von mutationsbedingten Resistenzmechanismen verursacht. Lediglich zwei erworbene  $\beta$ -Laktamase-Gene wurden bei nicht-CF-Patienten nachgewiesen, von denen eines wiederum, wie die Charakterisierung von Transkonjuganten bewiesen, nicht funktionstüchtig exprimiert wurde.

Bei der Analyse der Aminoglykosid-Resistenz vermittelnden Mechanismen und der ausgeprägten Phänotypen war ein wichtiger Unterschied zwischen dem GENARS-Kollektiv von CF-Patienten und Patienten ohne diese Erkrankung zu verzeichnen: Ausschließlich bei Klonen von nicht-CF-Patienten wurden zahlreiche erworbene Gene Aminoglykosid-modifizierender Enzyme gefunden (Tabelle 4.4). Diese waren z. T. mehrfach und in Kombination mit  $\beta$ -Laktamase-Genen auf Klasse-1-Integrone lokalisiert, welche, wie Transkonjugationsexperimente zeigten, alle intraspezifisch und teilweise auch interspezifisch (auf *E. coli*) transferierbar waren. Die Tatsache, dass bei Klonen von CF-Patienten keinerlei erworbene Resistenzgene nachgewiesen wurden, betont die Bedeutung des Mutatorphänotyps für dieses Kollektiv und belegt zusätzlich die autarke Evolution der Stämme im Zuge der chronischen Infektion der Lunge. Für die multiresistenten Klone von Patienten ohne zystische Fibrose hingegen zeigt der Fund zahlreicher erworbener Resistenzgene bei der Hälfte der Klone auf, dass die horizontale, auch Speziesgrenzen überschreitende, Übertragung von Resistenz in diesem Kollektiv eine wichtige Rolle spielt. Diese Form der Resistenzausbreitung kann ebenso wie eine klonale Ausbreitung resistenter Stämme die Therapiemöglichkeiten nachhaltig schmälern.

An chromosomalen, mutationsbedingten Aminoglykosid-Resistenzmechanismen ist bei *P. aeruginosa* bislang nur eine Überexpression des MexXY-OprM-Effluxsystems bekannt. Zu diesem System wurden noch nicht viele Studien durchgeführt, doch diese legten ebenso wie die vorliegende Arbeit dar, dass dieses System in seiner Bedeutung für die Resistenz bei *P. aeruginosa* bislang unterschätzt wurde (Hocquet et al., 2006, Islam et al., 2004, Sobel et al., 2003).

**Tabelle 4.4: Korrelation des Phänotyps und der Aminoglykosidresistenz vermittelnden Mechanismen**

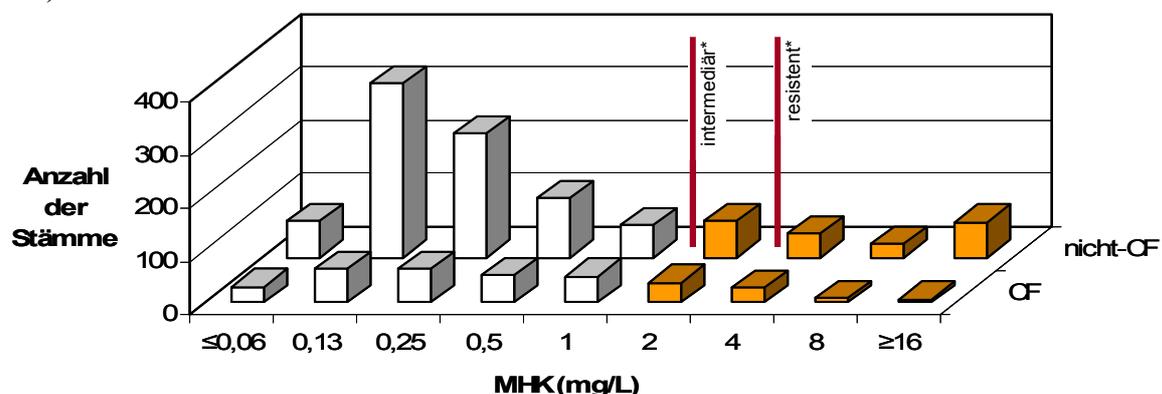
	Klon	Variante	Phänotyp				Resistenzmechanismen		
			MHK (mg/L) von			Mutator	Efflux	erworbene AME-Gene	
			Gentamicin	Tobramycin	Amikacin		MexZ		
			MexXY-OprM						
CF-Patienten	IV		>32	32	>32	+	+		
	V		>32	8	>32	+	+		
	VI		>32	4	>32	+	-		
		Vla				-	+		
	III		32	8	>32	+	+		
	II		32	4	>32	+	+		
	IX		16	4	32	+	+		
	VIII		16	2	>32	+	+		
	I		16	2	32	-	+		
	VII		16	2	32	+	+		
	XI		16	2	16	+	+		
	XII		4	4	32	+	+		
X		4	1	8	+	+			
nicht-CF-Patienten	XV		>32	>32	>32	+	+		
	XVII		>32	>32	16	-	+	<i>aadA1, aadB, aphA1-IAB</i>	
	XX		>32	16	16	-	+	<i>aac(6')Ib', aadA2</i>	
	XVI		>32	16	8	-	-	<i>aac(6')Ib'</i>	
	XVIII		32	16	>32	-	+	<i>aacA7, aacA8</i>	
	XIII		32	8	>32	-	+		
	XIX		16	16	32	-	-	<i>aac(6')Ib, aadA2</i>	
	XIV		16	2	>32	-	+		
	XXI		8	2	16	+	-		
	XXII		2	1	8	+	+		

AME: Aminoglykosid-modifizierendes Enzym; +: der entsprechende Phänotyp oder eine relevante Modifikation liegt vor. -: der entsprechende Phänotyp oder die jeweilige Modifikation liegt nicht vor.

Das Ausmaß der Überexpression von MexXY-OprM, welches neben Aminoglykosiden auch Chinolone, Meropenem, Cefepim und Piperacillin aus der Zelle transportiert (siehe oben), kann sehr unterschiedlich sein. Bei Überproduzenten konnte in Real-Time-PCR-Experimenten eine drei- bis 727-fach erhöhte Menge an MexY mRNA detektiert werden (Islam et al., 2004). Diese enormen Expressions-Unterschiede könnten auch die große Spannbreite an Phänotypen der Aminoglykosid-Resistenz in der vorliegenden Arbeit, insbesondere bei den von CF-Patienten stammenden Klonen, bedingen. Als Ursache käme zum einen eine unterschiedliche Auswirkung und Anzahl von Mutationen im Repressor MexZ in Frage. Zum anderen wurden in zwei Studien Hinweise darauf gefunden, dass neben MexZ weitere noch unbekannte Komponenten an der Regulation des MexXY-OprM-Systems beteiligt sind (Islam et al., 2004, Sobel et al., 2003). So wurden Überproduzenten des Systems charakterisiert, welche keine Mutationen in *mexZ* aufwiesen. Dies könnte auch für Stämme aus dieser Arbeit eine Erklärung für Aminoglykosid-Resistenz in Abwesenheit von (relevanten) Modifikationen in MexZ oder erworbenen Resistenzgenen geben.

Bei der Analyse der Chinolon-Resistenz vermittelnden Mechanismen und der ausgeprägten Phänotypen waren Unterschiede in den Resistenzniveaus zwischen Klonen von CF- und nicht-CF-Patienten das auffälligste Ergebnis: Während sieben von 10 Klonen von nicht CF-Patienten hohe Resistenzniveaus mit Ciprofloxacin-MHK-Werten  $>16$  mg/L zeigten, lagen bei CF-Patienten nur zwei Klone mit derart hoher Resistenz vor. Eine Analyse von Surveillance-Daten des GENARS-Projekts, welche inklusive der in dieser Arbeit untersuchten Klone mit 78 CF-Patienten- und 207 nicht-CF-Patienten-Isolaten durchgeführt wurde, bestätigte dieses Phänomen mit größeren Stammzahlen auf höherer Ebene (Abbildung 4.1).

**Abbildung 4.1:** MHK-Häufigkeitsverteilung von Ciprofloxacin für 78 *P.-aeruginosa*-Isolate von CF-Patienten und 207 *P.-aeruginosa*-Isolate von nicht-CF-Patienten des GENARS-Projektes (Januar bis Juni 2004).



\*Die senkrechten Balken kennzeichnen die Grenzen des intermediären und resistenten Konzentrationsbereiches.

Diese Ergebnisse lassen die Spekulation zu, dass aufgrund niedriger Chinolon-Konzentrationen im Mukus der Lunge von CF-Patienten oder/ und durch eine Biofilmbildung bei Stämmen von CF-Patienten die Notwendigkeit höherer Resistenzniveaus nicht gegeben ist.

Die deutlichen Unterschiede zwischen den Kollektiven von CF- und nicht-CF-Patienten setzten sich auf molekularer Ebene fort (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5: Korrelation des Phänotyps und der Chinolonresistenz vermittelnden Mechanismen**

	Klon	Variante	Phänotyp			Resistenzmechanismen							
			MHK (mg/L)		Mutator	Typ-II-Topoisomerasen		Efflux					
			Ciprofloxacin	Levofloxacin		DNA-Gyrase	Topoisomerase IV	EPI-Test	MexR	NfxB	MexT	MexS	MexZ
									MexAB-OprM	MexCD-OprJ	MexEF-OprN		MexXY-OprM
CF-Patienten	IX		≥16	128	+	Thr83Ile	-	-					+
	XII		≥16	16	+	Thr83Ile	-	-	?	+			+
	VIII		8	16	+	Thr83Ile	-	kA					+
	VII		8	8	+	Thr83Val	-	+	?	-	intakt	+	+
		VIIa	8			Thr83Ala			-		intakt		
	I		4	8	-	Thr83Ile	-	-					+
	VI		4	8	+	Thr83Ile	-	-			intakt	+	-
		VIa	4	8	-	-	-	-					+
	III		4	8	+	Asp87Asn	-	-					+
	V		4	8	+	Thr83Ile	-	+	-	+			+
	X		4	4	+	Thr83Ile	-	-					+
	II		2	4	+	-	-	+	-	-			+
	IV		2	4	+	Asp87Asn	-	-					+
XI		2	4	+	Asp87Asn	-	-					+	
nicht-CF-Patienten	XVIII		≥16	128	-	Thr83Ile Asp87His	Ser80Leu	+	+	-			+
	XXI		≥16	128	+	Thr83Ile Asp87Gly	Ser80Leu	+	+	-	intakt	-	-
	XV		≥16	32	+	Thr83Ile	-	-					+
	XVI		≥16	32	-	Thr83Ile	Ser80Leu	+	?	-			-
	XX		≥16	32	-	Thr83Ile	-	+	+	-			+
	XVII		≥16	16	-	Thr83Ile	-	-					+
	XIX		≥16	16	-	Thr83Ile	Ser80Leu	-			intakt	-	-
	XIV		4	8	-	Thr83Ile	-	-					+
	XIII		4	8	-	Thr83Ile	-	+	-	-			+
	XXII		2	8	+	-	-	+	?	+			+

?: Überexpression von MexAB-OprM könnte durch Mutation in NalC hervorgerufen werden; +: der entsprechende Phänotyp oder eine relevante Modifikation liegt vor. -: der entsprechende Phänotyp oder die jeweilige Modifikation liegt nicht vor; kA: keine Auswertung möglich; EPI-Test: Effluxpumpen-Inhibitionstest.

So konnten in den Typ-II-Topoisomerase-Untereinheiten ausschließlich bei Klonen von nicht CF-Patienten Modifikationen in ParC und Mehrfachmodifikationen in GyrA detektiert werden, welche hohe Resistenz-Niveaus vermitteln. Neben Modifikationen in den Zielstrukturen der Chinolone kann die Überexpression von allen vier Effluxsystemen zur Chinolonresistenz beitragen. Eine Studie mit chinolonresistenten Isolaten von CF-Patienten ergab, dass weder Mutationen in *parC* noch in *mexR* gefunden wurden und die meisten Isolate MexCD-OprJ überproduzierten (Jalal et al., 2000). Dahingegen wurde in einer Vergleichsuntersuchung mit chinolonresistenten *P.-aeruginosa*-Isolaten von Harnwegs- und Wund-Infektionen festgestellt, dass etliche Targetmodifikationen in beiden Loci sowie Modifikationen in MexR auftraten, welche zu einer Überproduktion von MexAB-OprM führten. Die Überproduktion von MexCD-OprJ spielte eine untergeordnete Rolle (Jalal u. Wretling, 1998). Beide Studien berücksichtigten jedoch nicht die mögliche Beteiligung des MexXY-OprM-Systems an dem Gesamtphänotyp der Chinolonresistenz. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Bedeutung von Mehrfachmutationen in den Targetgenen für die Resistenz unter Klonen von nicht-CF-Patienten. Unterschiede zur Prävalenz von relevanten Modifikationen in den Regulatoren MexR und NfxB können nicht belegt werden. Es wurden jedoch mehrere Klone mit unterschiedlich hohen Resistenzniveaus gefunden, welche lediglich Modifikationen in GyrA und MexZ aufwiesen. Deren Resistenz dürfte wie schon zuvor bei der Analyse der Aminoglykosid-Resistenz auf die unterschiedlich hohe Expression des MexXY-OprM-Systems zurückzuführen sein. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren deutlichen Hinweis für die große Bedeutung dieses bislang unterschätzten Effluxsystems für die Ausprägung von Multiresistenz bei *P. aeruginosa*.

Neben der Frage, welche Mechanismen der Multiresistenz in klinischen Stämmen auftreten, nahm in dieser Arbeit die Frage nach der Entstehung von Resistenz unter der Therapie eine zentrale Rolle ein. Es sollte aufgeklärt werden, welche Substanzen unter in der Praxis verwendeten Dosierungen am ehesten eine Resistenzentwicklung vermeiden können und welche Bedeutung der Mutatorphänotyp dabei einnimmt. Dazu wurden zwei Vergleichssubstanzen ausgewählt: Meropenem, da es auf Grund sehr niedriger Resistenzraten als die Substanz mit dem besten Potenzial zur Therapie von *P.-aeruginosa*-Infektionen gilt und Ceftazidim, weil es als Cephalosporin eine andere bei *P.-aeruginosa*-Infektionen eingesetzte  $\beta$ -Laktam-Gruppe repräsentiert. Als Teststämme wurden ein Mutatorstamm (12-09-15, Klon XXI) und zum Vergleich der Wildtypstamm PAO1 eingesetzt.

Berücksichtigt man bei der Beurteilung der Wirksamkeit eines Antibiotikums nur den antibakteriellen Effekt, so lassen die in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen der Therapie Ceftazidim geeigneter erscheinen als Meropenem. So wurde für den Wildtypstamm PAO1 mit Ceftazidim ein  $AAC_{24h}$ -Wert von  $+9,29 \Delta\log\text{KBE/ml}\cdot\text{h}$  und mit Meropenem lediglich von  $-22,46 \Delta\log\text{KBE/ml}\cdot\text{h}$  erzielt.

Im Vergleich zum Wildtypstamm PAO1 wies der Mutatorstamm 12-09-15 (Klon XXI) eine vierfach höhere – aber ebenso als klinisch sensibel eingestufte - Meropenem-MHK (2mg/L versus 0,5 mg/L) auf. Dennoch wurde mit  $-19,58 \Delta\log\text{KBE/ml}\cdot\text{h}$  (12-09-15) und  $-22,46 \Delta\log\text{KBE/ml}\cdot\text{h}$  (PAO1) kein signifikanter Unterschied in den  $AAC_{24h}$ -Werten von Meropenem gegenüber beiden Stämmen festgestellt.

Neben dem antibakteriellen Effekt spielt das Ausmaß der Selektion von Mutanten eine wichtige Rolle bei der Einstufung der Wirksamkeit von Antibiotika und deren Dosierung. Während der Behandlung des Wildtypstammes PAO1 mit Ceftazidim kam es während der zweiten Dosierung innerhalb der Population trotz einer Reduktion der Gesamtzellzahl zu einer starken Selektion von Mutanten. Diese „Ein-Schritt-Mutanten“ zeigten auf Grund einer Überexpression der chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamase volle Resistenz gegenüber Ceftazidim und ersetzten kontinuierlich die Wildtypzellen innerhalb der Population. Auch bei der Behandlung mit Meropenem konnte während der zweiten Dosierung eine Selektion von Mutanten nachgewiesen werden. Diese wurden durch einen Verlust von OprD charakterisiert, welcher, wie auch bei dem klinischen multiresistenten Klon VI, von einer Insertion der Base C nach A1205 herrührte. Genauso wie die unter Ceftazidim selektierte Mutante vermochte auch diese, den Wildtyp in der Population zu ersetzen, prägte aber mit einer Meropenem-MHK von 4 mg/L keine volle Resistenz aus.

Der klinische Mutatorstamm 12-09-15 wies bereits zu Beginn der simulierten Therapie mit Meropenem eine Mutation auf: Ein Aminosäureaustausch in dem Regulator MexR führte zu einer Überproduktion des Effluxsystems MexABOprM. Dies war die Ursache für eine im Vergleich zum Wildtyp vierfach erhöhte, aber dennoch als sensibel eingestufte Meropenem-MHK von 2 mg/L. Unter der Therapie wurde eine Mutante selektiert, welche in einem weiteren Schritt eine zusätzliche Mutation, den Verlust von OprD, akkumuliert hatte. Dies verhalf dem als klinisch sensibel eingestuften Ausgangsstamm zu voller Resistenz. Auffällig war, dass trotz des Mutatorphänotyps von 12-09-15 die während der Simulation selektierte Mutante des Stamms nicht noch zusätzliche mutationsbedingte Resistenz, wie die Überproduktion eines weiteren Effluxsystems, akkumulierte.

Ebenso auffallend war, dass diese Mutante zudem nicht wie die Mutanten von PAO1, die unter Meropenem und Ceftazidim-Therapie selektiert wurden, die Zellen des Ausgangsstamms in der Population vollständig ersetzen.

Das Ausmaß der Selektion von Mutanten kann mit Hilfe der Hypothese des Mutanten-Selektionsfensters, ergänzt durch die Ergebnisse der kompetitiven Wachstumsversuche der Ausgangsstämme und der jeweiligen Mutanten, erklärt werden. Bei der Therapie von PAO1 mit Ceftazidim hatte das Mutanten-Selektionsfenster eine Dauer von 2,5h und die Konzentration des Antibiotikums lag über die ganze Behandlung hinweg nicht unterhalb der MHK des Teststammes. Zusätzlich bewies der kompetitive Wachstumsversuch, dass die Mutante in Konkurrenz mit ihrem Ausgangsstamm keinen Nachteil in Abwesenheit eines Selektionsdruckes hatte. Somit wurde diese „Ein-Schritt-Mutante“ während jedes der drei Mutanten-Selektionsfenster selektiert, ohne zu irgendeinem Zeitpunkt der Simulation einen Nachteil zu verzeichnen und ersetzte letztendlich die gesamte Wildtyppopulation. Bei der Kombination des Wildtypstammes PAO1 und Meropenem waren das Mutanten-Selektionsfenster (2,8h) sowie die Zeit der Antibiotikum-Konzentration unter der MHK (2,7h) von etwa gleicher Dauer. Zusätzlich zeigte die Mutante keinen Wachstumsnachteil im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm. Somit vermochte auch diese „Ein-Schritt-Mutante“ aus vergleichbaren Gründen ihren Ausgangsstamm in der Population vollständig zu ersetzen. Die Mutante 12-09-15/MER des Mutatorstammes hingegen, wurde unter der Therapie mit Meropenem lediglich während dreier Mutanten-Selektionsfenster mit einer jeweiligen Dauer von 2,3h selektiert. Die Zeit, während derer die Konzentration unter der MHK des Teststammes lag und der Ausgangsstamm keinem Nachteil im Wachstum ausgesetzt wurde, war mit jeweils 4,7h in etwa doppelt so lang. Auf Grund dieser Umstände erreichte die Mutante lediglich ca. 14% der Gesamtpopulation.

Die Ergebnisse der simulierten Therapie eines Mutatorstammes mit Meropenem zeigen, dass es - obwohl zahlreiche Effluxsysteme diese Substanz transportieren - im Rahmen eines Therapiedurchlaufs mit dieser Substanz auch bei einem Mutatorstamm nicht zur Akkumulation mehrerer Resistenz-vermittelnder Mechanismen kommen muss. Ein kleines Selektionsfenster scheint insbesondere bei Mutatorstämmen, bei denen in diesem Konzentrationsbereich eine größere Anzahl an Mutanten-Zellen selektiert werden dürfte, eine elementare Rolle für die Vermeidung von Resistenz-Entstehung unter der Therapie einzunehmen.

Die in diesem Projekt erarbeiteten Einblicke in das äußerst komplexe Zusammenspiel der Multiresistenz vermittelnden Mechanismen bei *P. aeruginosa* machen deutlich, dass die Ausprägung eines Mutatorphänotyps insbesondere für die autarke Evolution bei Stämmen von chronisch infizierten CF-Patienten aber auch in einem nicht zu unterschätzenden Umfang bei Patienten ohne diese Erbkrankheit eine elementare Rolle spielt. Die Ergebnisse der *in-vitro*-Simulationen geben erste Hinweise darauf, dass jedoch durch den rationalen Einsatz von Substanzen und Dosierungen mit kurzen Mutanten-Selektionsfenstern die Entstehung von Multiresistenz unter der Therapie auch bei Infektionen durch Mutatorstämme eingedämmt werden könnte.

Die Analyse klinischer *P.-aeruginosa*-Stämme hinsichtlich ihrer der Multiresistenz zugrunde liegenden Mechanismen zeigte auf, dass bei Stämmen von CF-Patienten in Korrelation mit der äußerst hohen Prävalenz des Mutatorphänotyps ausschließlich ein komplexes Zusammenspiel von mutationsbedingten Mechanismen die Multiresistenz bedingt. Bei multiresistenten *P.-aeruginosa*-Stämmen, welche nicht im Kontext mit cystischer Fibrose stehen, fiel dagegen eine hohe Präsenz insbesondere von Aminoglykosid-Resistenz vermittelnden erworbenen Resistenzgenen auf. Die Ergebnisse beider Stamm-Kollektive zeigten, dass die Überproduktion von unterschiedlichen Effluxsystemen einen erheblichen und bislang zum Teil unterschätzten Anteil an der Modulation des Gesamtphänotyps der Multiresistenz bei *P. aeruginosa* hat. Ferner wurde in etlichen Fällen, Funde anderer Studien bestärkend (El Amin et al., 2005, Morita et al., 2006, Sobel et al., 2003, Vogne et al., 2004) belegt, dass das bisherige Wissen zu Mechanismen der Resistenz nicht ausreicht, um alle bei klinischen Stämmen vorkommenden Phänotypen der Multiresistenz erklären zu können. Insbesondere Aspekte der Effluxsystem-Überproduktion sind noch nicht aufgeklärt. Dies steht im Einklang damit, dass bislang bei keinem anderen Organismus ein höherer Anteil an regulatorischen Loci gefunden wurde als bei dem äußerst anpassungsfähigen, gefürchteten Krankenhauskeim *P. aeruginosa*.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die Notwendigkeit sowohl der Aufklärung weiterer an der Multiresistenz beteiligter Mechanismen als auch der konsequenten Surveillance der in Krankenhäusern auftretenden Multiresistenz auf phänotypischer und molekularer Ebene.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden auf molekularer Ebene die Resistenzmechanismen multiresistenter Stämme von *P. aeruginosa*, einem der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen, in deutschen Krankenhäusern untersucht. Zwölf multiresistente Klone stammten von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) und zehn von Patienten ohne diese Erbkrankheit. Eine klonale Ausbreitung multiresistenter Stämme wurde nicht nachgewiesen.

Elf der Klone von CF-Patienten wiesen einen Mutatorphänotyp auf. Diese hohe Korrelation des Mutatorphänotyps mit der Ausprägung von Multiresistenz belegt dessen elementare Bedeutung für die autarke Evolution während einer chronischen Infektion der Lunge durch *P. aeruginosa*. Zum ersten Mal konnte ein Mutatorstamm molekular charakterisiert werden, der nicht im Kontext mit einer chronischen Infektion der Lunge stand.

Bei der Evaluierung der Mechanismen, die der Multiresistenz zugrunde lagen, wurden deutliche Unterschiede zwischen den Stammkollektiven von CF- und nicht-CF-Patienten festgestellt. Ausschließlich bei *P.-aeruginosa*-Klonen von nicht-CF-Patienten trugen zahlreiche erworbene in erster Linie Aminoglykosid-Resistenz vermittelnde Resistenzgene zur Multiresistenz bei. Diese wurden auf Klasse-1-Integrone kodiert. Auch Mehrfachmodifikationen in den Zielstrukturen der Chinolone, welche hohe Resistenz-Niveaus gegenüber dieser Antibiotika-Gruppe vermitteln, wurden ausschließlich bei *P.-aeruginosa*-Klonen von nicht-CF-Patienten detektiert.

Analysen der Phäno- und Genotypen aller multiresistenten Klone zeigten, dass die Überproduktion unterschiedlicher Effluxsysteme einen erheblichen und teilweise bislang unterschätzten Anteil an der Modulation des Gesamtphänotyps der Multiresistenz bei *P. aeruginosa* hat. Im Einklang mit anderen Studien wurde belegt, dass noch weitere unbekannt mutationsbedingte Mechanismen der Resistenz insbesondere im Zusammenhang mit der Regulation von Effluxsystemen bei *P. aeruginosa* einer Aufklärung harren.

Der Erstdnachweis einer VIM-Metallo- $\beta$ -Laktamase in Deutschland ist ein weiteres Indiz der zunehmenden globalen Ausbreitung dieser, die Therapie-Optionen stark einschränkenden, Enzyme und untermauert zugleich die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Surveillance der in Krankenhäusern auftretenden Multiresistenz bei *P. aeruginosa* auf molekularer Ebene.

*In-vitro*-Simulationen therapeutischer pharmakokinetischer Profile gaben erste Hinweise darauf, dass durch den rationalen Einsatz von Substanzen und Dosierungen mit kurzen Mutanten-Selektionsfenstern die Entstehung von Multiresistenz unter der Therapie auch bei Mutatorstämmen eingedämmt werden könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R., Poole, K.** The MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J. Bacteriol.* 184: 4308-4312. 2002.
- Aires, J. R., Köhler, T., Nikaido, H., Plesiat, P.** Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2624-2628. 1999.
- Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 43-48. 2006.
- Ambler, R. P.** The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 289: 321-331. 16-5-1980.
- Arlet, G., Brami, G., Decre, D., Flippo, A., Gaillet, O., Lagrange, P. H., Philippon, A.** Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 203-208. 1995.
- Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J. I., Givskov, M., Hoiby, N.** Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3406-3411. 2002.
- Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N.** Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 11-18. 2002.
- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J. P., Roy, P. H.** Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J. Bacteriol.* 173: 4493-4502. 1991.
- Bissonnette, L., Roy, P. H.** Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 1248-1257. 1992.
- Bonnet, R., Dutour, C., Sampaio, J. L., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Sirot, J.** Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2269-2275. 2001.
- Brown, H. J., Stokes, H. W., Hall, R. M.** The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J. Bacteriol.* 178: 4429-4437. 1996.
- Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211-1233. 1995.
- Bush, K.** New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32: 1085-1089. 1-4-2001.
- Cao, L., Srikumar, R., Poole, K.** MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol. Microbiol.* 53: 1423-1436. 2004.

- Cheng, K., Smyth, R. L., Govan, J. R. W., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., Heaf, D. P., vanSaene, H., Hart, C. A.** Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 348: 639-642. 7-9-1996.
- Cheung, T. K., Chu, Y. W., Chu, M. Y., Ma, C. H., Yung, R. W., Kam, K. M.** Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J.Antimicrob.Chemother.* 56: 586-589. 2005.
- Choi, S., Lee, D., Choi, J., Yoo, J., Shin, W., Kang, M.** Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes using multiplex PCR in *Escherichia coli*. 42<sup>nd</sup> Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother. Poster C2-713. 2002.
- Conceicao, T., Brizio, A., Duarte, A., Barros, R.** First isolation of *bla*(VIM-2) in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49: 476. 2005.
- Cunha, B. A.** Strategies to control antibiotic resistance. *Semin.Respir.Infect.* 17: 250-258. 2002.
- Cystic Fibrosis Foundation.** Patient registry 2001 Annual report, Bethesda, Maryland.
- De Champs, C., Poirel, L., Bonnet, R., Siro, D., Chanal, C., Sirot, J., Nordmann, P.** Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a French Hospital in 2000. *Anitmicrob. Agents Chemother.* 46: 3031-3034. 2002.
- Drlica, K.** The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* 52: 11-17. 2003.
- El Amin, N., Giske, C. G., Jalal, S., Keijser, B., Kronvall, G., Wretling, B.** Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* 113: 187-196. 2005.
- Epp, S. F., Kohler, T., Plesiat, P., Michea-Hamzehpour, M., Frey, J., Pechere, J. C.** C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45: 1780-1787. 2001.
- Evans, K., Adewoye, L., Poole, K.** MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: indentification of MexR binding sites in the mexA-mexR intergenic region. *J. Bacteriol.* 183: 807-812. 2001.
- Galloway, D. R.** *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol.Microbiol.* 5: 2315-2321. 1991.
- Gebreyes, W. A. Altier, C.** Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium isolates from swine. *J.Clin.Microbiol.* 40: 2813-2822. 2002.
- Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P.** Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48: 2043-2048. 2004.
- Gotoh, N., Itoh, N., Tsujimoto, H., Yamagishi, J., Oyamada, Y., Nishino, T.** Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon insertion mutagenesis: evidience of involvement in multiple antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 122,: 267-273. 1994.
- Grasso, S.G., Meinardi, G., de Caneri, I., Tarnassia, V.** New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination of antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 570-576. 1978.

- Grinsted, J., de la Cruz F., Schmitt, R.** The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* 24: 163-189. 1990.
- Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A.** Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 671-701. 2002.
- Gutierrez, O., Juan, C., Perez, J. L., Oliver, A.** Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3573-3575. 2004.
- Hall, R. M. and Collis, C. M.** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15: 593-600. 1995.
- Hancock, R. E. u. Brinkman, F. S.** Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 17-38. 2002.
- Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S., Sakae, K.** Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 801-803. 2005.
- Hocquet, D., Bertrand, X., Kohler, T., Talon, D., Plesiat, P.** Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1887-1894. 2003.
- Hocquet, D., Vogne, C., El Barch, F. E., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O., Plesiat, P.** MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1371-1375. 2003
- Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L., Plesiat, P.** Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1347-1351. 2006.
- Hoiby, N., Johansen, H. K., Moser, C. M., Song, Z., Ciofu, O., Kharazmi, A.** *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microb. Infect.* 3: 23-35. 2001.
- Hosakah, M., Gotoh, N., Nishino, T.** Purification of a 54-kilodalton protein (OprJ) produced in *nfxB* mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and production of a monoclonal antibody specific to OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1731-1735. 1995.
- Huang, H., Jeanteur, D., Pattus, F., Hancock, R. E.** Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol. Microbiol.* 16: 931-941. 1995.
- Huang, H. u. Hancock, R. E.** The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178: 3085-3090. 1996.
- Islam, S., Jalal, S., Wretling, B.** Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 877-883. 2004.
- Jalal, S. u. Wretling, B.** Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 4: 257-261. 1998.
- Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N., Wretling, B.** Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 710-712. 2000.

- Jones, A. M., Govan, J. R., Doherty, C. J., Dodd, M. E., Isalska, B. J., Stanbridge, T. N., Webb, A. K.** Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* 358: 557-558. 18-8-2001.
- Juan, C., Macia, M. D., Gutierrez, O., Vidal, C., Perez, J. L., Oliver, A.** Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4733-4738. 2005.
- Kayser, F.H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M.** Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1998.
- Kehrenberg, C. u. Schwarz, S.** Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 283-290. 18-12-2001.
- Keil, S. u. Wiedemann, B.** Mathematical corrections for bacterial loss in pharmacodynamic in vitro dilution models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1054-1058. 1995.
- Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G., Lee, M. D.** Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 421-424. 2000.
- Koch, C., u. Hoiby, N.** Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet.* 341:1065-1069. 1993.
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K., Pechere J. C.** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 23: 345-354. 1997.
- Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L. K., Pechere, J. C.** Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181: 6300-6305. 1999.
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Epp, S., Pechere J. C.** Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 424-427. 1999.
- Köhler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M., Pechere, J. C.** Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183: 5213-5222. 2001.
- Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Del Puerto, A., Wichlmann, L., Laabs, U., Tummeler, B., Mathee, K.** Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene* 358: 82-92. 2005.
- Kresken, M., Hafner, D., Schmitz, F.-J., Wichelhaus, T. A.** Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial agents in Germany. 43th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, USA, September 14-17. Poster C2-1961. 2003.
- Krüger, W. A., Bulitta, J., Kinzig-Schippers, M., Landersdorfer, C. Holzgrabe, U., Naber, K. G., Drusano, G. L., Sörgel, F.** Evaluation by monte carlo simulation of the pharmacokinetics of two doses of meropenem administered intermittently or as a continuous infusion in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1881-1889. 2005.
- Langae, T. Y., Dargis, M., Huletsky, A.** An *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 3296-3300. 1998.

- Langae, T. Y., Gagnon, L., Huletsky, A.** Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob.Agents Chemother.* 44: 583-589. 2000.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P. H.** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob.Agents Chemother.* 39: 185-191. 1995.
- Li, X.-Z., Zhang, L., Poole, K.** Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob. Chemother.* 45: 433-436. 2000.
- Liebert, C. A., Hall, R. M., Summers, A. O.** Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63: 507-522. 1999.
- Livermore, D. M.** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* 8: 557-584. 1995.
- Livermore, D. M.** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin.Infect.Dis.* 34: 634-640. 2002.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., Plesiat, P.** Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1797-1802. 2004.
- Lomovskaya, O., Lee, A., Hoshino, K., Ishida, H., Mistry, A., Warren, M. S., Boyer, E., Chamberland, S., Lee, V. J.** Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43: 1340-1346. 1999.
- Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., Lee, V. J.** Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45: 105-116. 2001.
- Lüthy, R., Blaser, J., Bonetti, A., Simmen, H., Wise, R., Siegenthaler, W.** Comparative multiple-dose pharmacokinetics of cefotaxime, moxalactam, and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother.* 20: 567-575. 1981.
- Macia, M. D., Borrell, N., Perez, J. L., Oliver, A.** Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48: 2665-2672. 2004.
- Macia, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J. L., Oliver, A.** Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49: 3382-3386. 2005.
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., Nakae, T.** Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol.Lett.* 192: 107-112. 2000.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S., Nishino, T.** Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 40: 909-913. 1996.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Nishino, T.** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 44: 3322-3327. 2000.

- McCallum, S. J., Corkill, J., Gallagher, M., Ledson, M. J., Hart, C. A., Walshaw, M. J.** Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonised by *P. aeruginosa*. *Lancet* 358: 558-560. 18-8-2001.
- McCallum, S. J., Gallagher, M. J., Corkill, J. E., Hart, C. A., Ledson, M. J., Walshaw, M. J.** Spread of an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain from a patient with cystic fibrosis (CF) to non-CF relatives. *Thorax* 57: 559-560. 2002.
- Migliavacca R., Docquier, J. D., Mugnaioli, C., Amicosante, G., Daturi, R., Lee, K., Rossolini, G. M., Pagani, L.** Simple microdilution test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4388-4390. 2002.
- Mine T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., Tsuchiya, T.** Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 415-417.1999.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., Tulkens, P. M.** Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43: 727-737. 1999.
- Morita, Y., Sobel, M., Poole, K.** Antibiotic inducibility of the MexXY multirug efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *J. Bacteriol.* 188: 1847-1855. 2006.
- Mouton, J. W., Dudley, M. N., Cars, O., Derendorf, H., Drusano, G. L.** Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. *Int.J.Antimicrob.Agents* 19: 355-358. 2002.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Yamaguchi, A.** Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419: 587-593. 2002.
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., Nordmann, P.** Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J.Bacteriol.* 183: 235-249. 2001.
- Ng, L. K., Mulvey, M. R., Martin, I., Peters, G. A., Johnson, W.** Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43: 3018-3021. 1999.
- Nikaido, H.** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853-5859. 1996.
- Noll, I., Beer, J, Huppertz, K., Pfister, W., Pietzcker, T. Schubert, S., Wichelhaus, T. Ziesing, S., Wiedemann, B.** Multi-resistance in *P. aeruginosa*: Epidemiological results from the GENARS-project. 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, April 2–5, 2005. Poster 1831.
- Nordmann, P. u. Poirel, L.** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J.Antimicrob.Chemother.* 56: 463-469. 2005.
- Nuesch-Inderbinen, M. T., Hachler, H., Kayser, F. H.** Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 15: 398-402. 1996.
- Ochs, M. M., McCusker, M. P., Bains, M., Hancock, R. E.** Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43: 1085-1090. 1999.

- Ochs, M. M., Bains, M., Hancock, R. E.** Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1983-1985. 2000.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., Blazquez, J.** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254. 19-5-2000.
- Oliver, A., Baquero, F., Blazquez, J.** The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol. Microbiol.* 43: 1641-1650. 2002.
- Pai, H., Kim, J.-W., Kim, J., Lee, J. H., CHoe, K. W., Gotoh, N.** Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 480-484. 2001.
- Paulsen, I. T., Littlejohn, T. G., Radstrom, P., Sundstrom, L., Skold, O., Swedberg, G., Skurray, R. A.** The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 761-768. 1993.
- Pirnay, J. P., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P., Zizi, M.** Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ. Microbiol.* 4: 872-882. 2002.
- Poirel, L., Le, Thomas, I, Naas, T., Karim, A., Nordmann, P.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 622-632. 2000.
- Poirel, L., Gniadkowski, M., Nordmann, P.** Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 1031-1034. 2002.
- Poirel, L., Magalhaes, M., Lopes, M., Nordmann, P.** Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene *bla*(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1406-1409. 2004.
- Poirel, L., Cabanne, L., Vahaboglu, H., Nordmann, P.** Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase *bla*PER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1708-1713. 2005.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X. Z., Nishino, T.** Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21: 713-724. 1996.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., Neshat, S.** Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175: 7363-7372. 1993.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J.-I., Li, X.-Z., Nishino, T.** Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21: 713-724. 1996.
- Poole, K.** Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 479-487. 2005.
- Rehm, B. H. and Valla, S.** Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 281-288. 1997.

- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K., Hooper, D. C.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat.Med.* 12: 83-88. 2006.
- Romling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., Vonderhardt, H., Tummler, B.** Epidemiology of Chronic *Pseudomonas-aeruginosa* Infections in Cystic-Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* 170: 1616-1621. 1994.
- Rustige, C. u. Wiedemann, B.** Antibacterial activity of lomefloxacin in a pharmacokinetic in vitro model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1107-1111. 1990.
- Rüden, H., Gastmeier, P., Daschner, F., Schumacher, M.** Nosokomiale Infektionen in Deutschland, Epidemiologie in den alten und neuen Bundesländern. *Dtsch Med Wochenschr.* 121: 1281-1287. 1996.
- Saito, K., Akama, H., Yoshihara, E., Nakae, T.** Mutations affecting DNA-binding activity of the MexR repressor of mexR-mexA-mexB-oprM operon expression. *J. Bacteriol.* 185: 6195-6198. 2003.
- Salyers, A. A., u. Whitt, D. D.** Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press. S. 247-262. 2002.
- Sanchez-Velazquez, L. D., Rosales, S. P. D., Frausto, M. S. R.** The burden of nosocomial infection in the intensive care unit: Effects on organ failure, mortality and costs. A nested case-control study. *Archives of Medical Research* 37: 370-375. 2006.
- Sanders, C. C., u. Sanders, W. E.** Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* 15: 825-839. 1992.
- Schofield, M. J., u. Hsieh, P.** DNA Mismatch Repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 579-608. 2003.
- Scott, F. W. u. Pitt, T. L.** Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J.Med.Microbiol.* 53[Pt 7], 609-615. 2004.
- Sobel, M. L., McKay, G. A., Poole, K.** Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47: 3202-3207. 2003.
- Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P., Poole, K.** Mutations in PA3574 (nalD) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49: 1782-1786. 2005.
- Sobel, M. L., Neshat, S., Poole, K.** Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 187: 1246-1253. 2005.
- Stackebrandt, E.** Diversity and systematics. In: Lengeler, J. W., Drews, G., and Schlegel, H. G. *Biology the prokaryotes.* Georg Thieme Verlag. S. 714. 1999.
- Steinbrecher, E., Sohr, D., Nassauer, A., Daschner, F., Rüden, H., Gastmeier, P.** Die häufigsten Erreger bei Intensivpatienten mit nosokomialen Infektionen. *Ergebnisse des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS).* CTJ. 5: 179-183. 2000.

- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., Olson, M. V.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959-964. 2000.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J.Clin.Microbiol.* 33: 2233-2239. 1995.
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., Hooper, D. C.** Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 118-125. 2005.
- Vincent, J. L., Bihari, D. J, Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M. H., Wolff, M., Spencer, R. C, Hemmer, M.** The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 274: 639-644. 1995.
- Vogel, F., Naber, K. G., Wacha, H., Shah, P., Sörgel, F., Kayser, F. H., Maschmeyer, G., Lode, H.** Parenterale Antibiotika bei Erwachsenen. *CTJ*. 8: 3-. 1999.
- Vogne, C., Aires, J., R., Bailly, C., Hocquet, D., Plesiat, P.** Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1676-1680. 2004.
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., Nordmann, P.** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin.Microbiol.Rev.* 18: 306-325. 2005.
- Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F., Hooper, D. C.** Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47: 2242-2248. 2003.
- Waters, V. L.** Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci.* 4: D433-D456. 1999.
- Wiegand, I.** Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch Beta-Lactamasen. *CTJ*. 12: 151-167. 2003.
- Wolter, D. J., Hanson, N. D., Lister, P. D.** AmpC and OprD are not involved in the mechanism of imipenem hypersusceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates overexpressing the *mexCD-oprJ* efflux pump. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49: 4763-4766. 2005.
- Yatsuyanagi, J., Saito, S., Harata, S., Suzuki, N., Ito, Y., Amano, K., Enomoto, K.** Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene *bla*VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48: 626-628. 2004.
- Zhao, Q., Li, X. Z., Srikumar, R., Poole, K.** Contribution of outer membrane efflux protein OprM to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independent of MexAB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1682-1688. 1998.
- Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Kohler, T., Pechere, J. C., Plesiat, P.** In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 287-291. 1999.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
AAC	area above the curve
AAC	N-Acetyltransferase
AAD	O-Nukleotidyltransferase
Ala	Alanin
AME	Aminoglykosid-modifizierendes Enzym
ANT	O-Nukleotidyltransferase
APH	O-Phosphotransferase
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATCC	American Typ Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
B	Guanin + Cytosin + Thymin (IUB-Code)
BJM	Bush, Jakoby, Medeiros
bp	Basenpaare
C	Cystein
CF	cystische Fibrose
Cys	Cystein
D	Guanin + Adenin + Thymin (IUB-Code)
D	Asparaginsäure
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	extended-spectrum- $\beta$ -lactamase
F	Phenylalanin
G	Guanin
G	Glycin
g	Gramm
GENARS	German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance
Gln	Glutamin

---

Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
H	Cytosin + Adenin + Thymin (IUB-Code)
H	Histidin
H	Stunde
His	Histidin
I	Isoleucin
Ile	Isoleucin
IRBL	Inhibitor-resistente $\beta$ -Laktamase
IUB	International Union of Biochemistry
K	Guanin + Thymin (IUB-Code)
K	Lysin
kb	Kilobasen
KBE	Kolonien bildende Einheit
L	Leucin
L	Liter
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Meter
M	molar
M	Adenin + Cytosin (IUB-Code)
M	Methionin
Met	Methionin
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MH	Mueller Hinton
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MMR	Methyl-Directed Mismatch Repair System
N	Adenin + Cytosin + Guanin + Thymin (IUB-Code)
N	Asparagin
n	Anzahl
OD <sub>Index</sub>	optische Dichte bei [Index] nm Wellenlänge
orf	Offener Leserahmen
OSBL	original-spectrum- $\beta$ -lactamase
P	Prolin
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

---

PEG	Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Q	Glutamin
QRDR	quinolon-resistance determining region
R	Adenin + Guanin (IUB-Code)
R	Arginin
Rif <sup>r</sup>	Rifampicin-resistent
RND	Resistance-Nodulation/(Cell)-Division
RT	Raumtemperatur
S	Cytosin + Guanin (IUB-Code)
S	Serin
Ser	Serin
spp.	Spezies (Plural)
Sulf	Sulfamethoxazol
T	Threonin
T	Thymin
Thr	Threonin
Trim	Trimethoprim
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trizma Base)
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Adenin + Cytosin + Guanin (IUB-Code)
V	Valin
V	Volt
Val	Valin
W	Adenin + Thymin (IUB-Code)
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Cytosin + Thymin (IUB-Code)
Y	Tyrosin

## 7.2 Aminosäuresequenz-Alignment des Regulators MexR (MexAB-OprM). Aufgeführt sind die Sequenzen des Wildtypstamms PAO1 und der klinischen multiresistenten Klone dieser Arbeit.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	10	20	30	40	50	60	70	80	
<b>PAO1</b>	MNYPVNPDLM	<u>P</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>V</u>	<u>R</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>C</u>	QRLDLTPPDV	HVL <u>K</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u>	GLNLQDL <u>G</u> <u>R</u> <u>Q</u>	MCRDKALIT <u>R</u>	<u>K</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>L</u>	
		1	2		3, 4, 5	6 7	8	9 10 11	
<b>XVIII</b>	MNYPVNPDLM	PALMAVFQHV	RTRIQSELDC	QRLDLTPPDV	HVL <u>M</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u>	GLNLQDLGRQ	MCRDKALITR	KIRELEGRNL	
<b>XXI</b>	MNYPVNPDLM	PALMAVFQHV	RTRIQSELDC	QRLDLTPPDV	HVLKLIDEQR	GL <u>N</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>R</u>	QMRDKALIT	RKIRELEGRN	
<b>XX</b>	MNYPVNPDLM	PALMAVFQHV	RTRIQ <u>Q</u> ARL	PATRPDPARR	PCIEAYRRTT	RAEPAGPGTP	DVPRQGTDHP	EDPRAGGKKP	
<b>VII, XII, XVI, XX</b>	MNYPVNPDLM	PALMAVFQHV	RTRIQSELDC	QRLDLTPPDV	HVLKLIDEQR	GLNLQDLGRQ	MCRDKALITR	KIRELEGRNL	
<b>Sekundärstruktur</b>	-----HH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHHH	H-----HHHH	HHHHHH-EEE	EE-HHHHHH-	-----HHHHH	HHHHHHH---	
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	90	100	110	120	130	140			
<b>PAO1</b>	VRRERNPSDQ	RSFQ <u>L</u> FLTDE	GLAIHQHAE <u>A</u>	IMSRVHDELF	APLTP <u>V</u> EQAT	LVHLLDQCLA	AQPLEDI.		
		12	13		14				
<b>XVIII</b>	VRRERNPSDQ	RSFQ <u>L</u> FLTDE	GLAIHQHAE	IMSRVHDELF	APLTP <u>E</u> EQAT	LVHLLDQCLA	AQPLEDI.		
<b>XXI</b>	LVRERNPSD	QRSFQ <u>L</u> FLTD	EGLAIHQHAE	AIMSRVHDEL	FAPLTPVEQA	TLVHLLDQCL	AAQPLEDI		
<b>XX</b>	GPPRAQPQRP	AQLPALPHRR	GAGHPACGG	HHVTRA*RVV	CPAHPGGTGH	PGASPRVPG	RATA*GYL		
<b>VII, XII, XVI, XX</b>	VRRERNPSDQ	RSFQ <u>L</u> FLTDE	GLAIHQHAE	IMSRVHDELF	APLTP <u>E</u> EQAT	LVHLLDQCLA	AQPLEDI.		
<b>Sekundärstruktur</b>	EEEE-----	--EEEE-HH	HHHHHHHHHH	HHHHHHHHH-	----HHHHHH	HHHHHHHHH-	-----.		

Aminosäureaustausche, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, sind grau unterlegt. Die Sekundärstruktur des Proteins ist in der untersten Zeile aufgeführt (Saito et al., 2003). H: Helix; E: Faltblatt. Die Positionen von in der Literatur belegten relevanten Aminosäureaustauschen sind durch Fettdruck und Unterstreichung gekennzeichnet.

1: Leu13Met (Adewoye et al., 2002), 2: Arg21Trp (Adewoye et al., 2002), 3: Lys44Met (Jalal et al., 1998, Llanes, et al., 2004), 4: Leu45Pro (Saito et al., 2003), 5: Ile46Asn (Saito et al., 2003), 6: Leu57Arg, Pro (Adewoye et al., 2002, Saito et al., 2003), 7: Arg59Cys (Jalal et al., 1998), 8: Thr69Ile (Saito et al., 2003), 9: Ile72Asn (Saito et al., 2003), 10: Leu75Pro (Saito et al., 2003), 11: Asn79Ser (Jalal et al., 1998), 12: Leu95Phe (Adewoye et al., 2002), 13: Ala110Thr (Jalal et al., 1998), 14: Val126Glu (Pai et al., 2001, Ziha-Zarifi et al., 1999).







