

**Identifizierung und Charakterisierung von multiresistenten
klinischen Isolaten von *E. coli* ST131
mittels Rapid-Parallel Multilocus Sequence Typing**

An der Universität Hamburg eingereichte

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

vorgelegt von

Phyllis Christine Zimmermann

Hamburg 2024

Gutachter der Dissertation:

Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Wicha

Mitglieder der Prüfungskommission:

1. Prof. Dr. Peter Heisig
2. Prof. Dr. Ralph Holl
3. Prof. Dr. Daniel N. Wilson

Datum der Disputation: 25.10.2024

Freigabe der Dissertation am: 24.02.2025

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 2014 bis Mai 2019 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie im Institut für Biochemie und Molekularbiologie am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

I. Publikationsliste

Artikel in Fachzeitschriften

1. Protecting-Group-Free Total Syntheses of Rubrolide R and S
M. Schacht, G. J. Boehlich, J. de Vries, S. Bertram, G. Gabriel, P. Zimmermann,
P. Heisig, N. Schützenmeister; *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 1745-1748.
(DOI: 10.1002/ejoc.201700158)
2. Investigation of Antifouling Properties of Surfaces Featuring Zwitterionic
 α -Aminophosphonic Acid Moieties
N. Wagner, P. Zimmermann, P. Heisig, F. Klitsche, W. Maison, P. Theato; *Macromol.*
Biosci. **2015**, 15, 1673–1678. (DOI: 10.1002/mabi.201500196)

Kongressteilnahmen Vorträge

1. Rapid Parallel Multilocus Sequence Typing (RP-MLST) – A new Application of Next
Generation Sequencing for the simultaneous Identification of Sequence Type and
Resistance Markers in *Escherichia coli* ST131 isolates
P. Zimmermann, A. Heisig, P. Heisig; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Hygiene und Mikrobiologie, 19.-21. Februar **2018**, Bochum
2. Die Anwendung von Next-Generation Sequencing für die schnelle Identifizierung von
E. coli ST131 Klonen und deren Multiresistenzprofil.
P. Zimmermann, Wissenschaftliches Begleitsymposium anlässlich des Tages der
Pharmazie, 14. Juni **2017**, Hamburg

Kongressteilnahmen Poster

1. Localization of cefotaxime resistance genes in multidrug resistant (MDR) Isolates of
E. coli ST131-O25b P. Zimmermann, A. Heisig, P. Heisig; Jahrestagung der Deutschen
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 05.-07. September **2022**, Berlin

2. **Investigation on Transferability of Antibiotic Resistance Plasmids in a Multiple Drug Resistant *E. coli* ST131 Isolate**
P. Zimmermann, A. Heisig, P. Heisig; Jahrestagung der Deutschen pharmazeutischen Gesellschaft, 02.-05. Oktober **2018**, Hamburg

3. **Parallel MLST-NGS Analysis - A Novel Application of Next Generation Sequencing for both, Rapid Identification of *Escherichia coli* ST131 Clonal Lines and Characterization of Strain-specific MDR-Profile**
P. Zimmermann, A. Heisig, P. Heisig; 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 22.-25. April **2017**, Wien

4. **Rapid detection of *E. coli* ST131 clones and their CTX-M beta-lactamases**
P. Zimmermann, K. R. Andersen, A. Heisig, P. Heisig; Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 29.-31. März **2017**, Frankfurt am Main

5. **Charakterisierungen von CTX-M-Typ β -Lactamasen in klinischen *E. coli* Isolaten**
L. Pahlk, P. Zimmermann; Wissenschaftliches Begleitsymposium anlässlich des Tages der Pharmazie, der Universität Hamburg, 14. Juni **2017**, Hamburg

6. **Rapid ESBL-Detection in clinical *E. coli* isolates with the oCelloScope™ - A novel application for identification of CTX-M-15 β -lactamases carrying *E. coli* ST131 High Risk Clones** P. Zimmermann, K. R. Andersen, A. Heisig, P. Heisig; Jahrestagung der Paul Ehrlich Gesellschaft, 6.-8. Oktober **2016**, Rostock

7. **Prevalence of Chromosomal and Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Mechanisms among Bacteraemia Isolates of *Escherichia coli* including Phylotype B2 from 2001 to 2004 – The Quiet before the Storm?**
P. Hebel, P. Zimmermann, H-P. Sfeir, R. Reynolds, A. Schnasse, P. Heisig, A. Heisig; 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 25.-28. April **2015**, Kopenhagen

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Publikationsliste	4
II.	Inhaltsverzeichnis.....	6
III.	Abkürzungsverzeichnis	12
IV.	Zusammenfassung	18
V.	Abstract	20
1	Einleitung.....	22
1.1	Bakterien, Antibiotika und Resistenz	22
1.1.1	Bakterien als Infektionserreger – Antibiotika als Therapie	22
1.1.2	Antibiotika und Resistenz.....	22
1.1.3	Definition der Multiresistenz bei Bakterien	23
1.1.4	Multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN)	24
1.1.5	Kritische bakterielle Infektionserreger	24
1.1.6	<i>Escherichia coli</i>	25
1.1.7	Resistenzüberwachung	26
1.1.8	Bakterielle Resistenzmechanismen.....	27
1.2	Antibiotika und Resistenzmechanismen bei <i>E. coli</i>	28
1.2.1	Mechanismen der Multiresistenz.....	28
1.2.2	Fluorchinolone	33
1.2.3	Mechanismen der Fluorchinolonresistenz	34
1.2.4	β -Lactam-Antibiotika	36
1.2.5	Mechanismen der β -Lactam-Resistenz	40
1.3	Interbakterielle Verbreitung von Resistenz	44
1.3.1	Plasmide	44
1.3.2	Konjugation von Resistenzplasmiden.....	45
1.4	<i>E. coli</i> ST131.....	46
1.4.1	Auftreten und Verbreitung von <i>E. coli</i> ST131.....	46
1.4.2	Multiresistenz bei <i>E. coli</i> ST131.....	47

1.4.3	Relevanz von <i>E. coli</i> ST131	48
1.4.4	Die <i>E. coli</i> ST131 Linie und ihre Subtypen	48
1.4.5	Genomsequenzierte <i>E. coli</i> ST131 Isolate der Literatur	52
1.4.6	β -Lactamasen in <i>E. coli</i> ST131	53
1.4.7	Carbapenemasen in <i>E. coli</i> ST131.....	54
1.4.8	Plasmide in <i>E. coli</i> ST131	54
1.5	Typisierung von <i>Escherichia coli</i>	55
1.5.1	Antigenbestimmung.....	55
1.5.2	Phylogenie.....	56
1.5.3	Multilocus Sequence Typing (MLST)	57
1.5.4	Genomsequenzierung	60
2	Zielsetzung.....	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Charakterisierung von <i>E. coli</i> Isolaten aus der BSAC-Studie 2001-2004.....	63
3.1.1	Phylogenie der klinischen <i>E. coli</i> Isolate aus England von 2001-2004	63
3.1.2	Screening der klinischen <i>E. coli</i> Isolate aus England auf <i>E. coli</i> ST131-O25b	65
3.1.3	Bestimmung der <i>E. coli</i> ST131-O25b spezifischen SNPs in <i>pabB</i>	69
3.2	<i>E. coli</i> ST131-O25b im BSAC-Kollektiv 2001-2004.....	73
3.2.1	Fluorchinolonresistenz der <i>E. coli</i> ST131-O25b Stämme im Vergleich zu nicht-ST131	74
3.3	Rapid-Parallel Multilocus Sequence Typing (RP-MLST)	75
3.3.1	Fragmentierung der DNA-Pools	75
3.3.2	Präparation der NGS-Library	80
3.4	RP-MLST I – Analyse eines Kollektivs der BSAC- und QU-Stämme.....	83
3.4.1	MLST-Analyse nach Achtman	83
3.4.2	MLST-Analyse nach Pasteur Schema.....	86
3.4.3	Mutationen in den Target- und resistenzassoziierten Genen	88
3.4.4	Datenvalidität von RP-MLST im Vergleich zu anderen Methoden	91
3.4.5	RP-MLST Sequenz-Analyse mittels CLC Genomics Workbench.....	92
3.5	β-Lactamasen in <i>E. coli</i> Isolaten der BSAC- und QU-Stämme	93
3.5.1	β -Lactamase Screening und Nachweis	93
3.5.2	Bestimmung des CTX-M-Enzyms.....	94

3.6	Charakterisierung von <i>E. coli</i> Isolaten aus der PEG-Studie 2016.....	96
3.6.1	Resistenztestungen	96
3.6.2	Einteilung in Resistotypen	98
3.6.3	Auswahl von Isolaten aus der PEG-Studie 2016 für das RP-MLST.....	100
3.6.4	Nachweis von β -Lactamasen	101
3.7	RP-MLST II – Analyse von Stämmen aus der PEG-Studie 2016	102
3.7.1	Besonderheiten einzelner Stämme	102
3.7.2	RP-MLST Sequenzierung.....	103
3.7.3	MLST-Analyse nach Achtman	104
3.7.4	MLST-Analyse nach Pasteur Schema.....	106
3.7.5	RP-MLST-Analyse mit CLC Genomics.....	108
3.7.6	Mutationen in den Target- und resistenzassoziierten Genen	110
3.7.7	Resistenzdetektion mit CLC Genomics	112
3.8	Vergleich von Resistotyp, SNP und <i>Sequence Type</i> nach Achtman und Pasteur der PEG-Stämme ..	113
3.8.1	Anteil von <i>E. coli</i> ST131 im Kollektiv aus der PEG-Studie 2016	116
3.9	Resistenz von <i>E. coli</i> ESBL Isolaten gegen Ceftolozan/Tazobactam	117
3.10	Resistenzen und Plasmide in <i>E. coli</i> ST131 Isolaten der Literatur	119
3.11	Plasmide und Resistenzen in MDR <i>E. coli</i> ST131 Isolaten	120
3.11.1	Plasmide in <i>E. coli</i> ST131-O25b Isolaten.....	120
3.12	Charakteristika, Resistenzen und Plasmide der MDR <i>E. coli</i> ST131 Isolate	126
3.13	Übertragbarkeit von Resistenzplasmiden durch <i>E. coli</i> ST131 Isolate	127
3.13.1	Etablierung von <i>E. coli</i> SG22215 als Rezipient.....	128
3.13.2	Konjugation von <i>E. coli</i> ST131 Isolaten mit <i>E. coli</i> SG22215	129
3.14	Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> ST131 Isolat eo791	129
3.14.1	Konjugation von <i>E. coli</i> ST131 Isolat eo791 mit <i>E. coli</i> SG22215	129
3.14.2	Empfindlichkeitsbestimmung der Transkonjuganden.....	131
3.14.3	Nachweis übertragener Plasmide von <i>E. coli</i> ST131 Isolat eo791.....	133
3.14.4	Nachweis übertragener Resistenzgene von <i>E. coli</i> ST131 Isolat eo791	137

4	Diskussion	141
4.1	Auftreten und Entwicklung von <i>E. coli</i> ST131	141
4.1.1	Erstes Auftreten pathogener <i>E. coli</i> ST131 Isolate in den 2000er Jahren	141
4.1.2	Prävalenz von <i>E. coli</i> ST131-O25b in England 2001-2004 (BSAC-Kollektiv).....	142
4.1.3	<i>E. coli</i> ST131 in anderen frühen Kollektiven 2002-2004.....	144
4.1.4	<i>E. coli</i> ST131 H30-Rx in Kollektiven von 2010-2015	144
4.1.5	Prävalenz von <i>E. coli</i> ST131 in Deutschland in 2016 (PEG-Kollektiv).....	146
4.1.6	Entwicklung von CTX-M in <i>E. coli</i> und speziell bei <i>E. coli</i> ST131.....	146
4.2	Diversität der (Multi-) Resistenz bei <i>E. coli</i> ST131	148
4.2.1	Ceftolozan/Tazobactam Resistenz bei <i>E. coli</i> ST131	149
4.3	Detektion von <i>E. coli</i> ST131 anhand des SNPs <i>pabB_573</i>	151
4.4	Mutationen in <i>E. coli</i> ST131 Isolaten	152
4.4.1	Mutationen in der QRDR.....	152
4.4.2	Mutationen in resistenzassoziierten Genen	153
4.4.3	Mutationen in den Porinen und Porin-regulierenden Genen	154
4.4.4	Die <i>ompR</i> Mutation A35D in <i>E. coli</i> QU015	156
4.4.5	Die <i>acrR</i> Mutation fM1 in <i>E. coli</i> eo795	159
4.4.6	Zusammenhang von <i>acrR</i> und <i>OmpR</i> -P.....	163
4.5	Rapid-Parallel MLST (RP-MLST)	164
4.5.1	RP-MLST als Methode	164
4.5.2	Bewertung von RP-MLST.....	167
4.5.3	RP-MLST im Vergleich zur Genomsequenzierung	168
4.6	Plasmide in <i>E. coli</i> ST131 Stämmen	169
4.6.1	Plasmide der genomsequenzierten <i>E. coli</i> ST131 Stämme der Literatur	169
4.6.2	Plasmide in den charakterisierten <i>E. coli</i> ST131 Stämmen dieser Arbeit.....	170
4.6.3	Fitness von <i>E. coli</i> ST131 mit und ohne Plasmide	172
4.7	Transfer von Resistenzplasmiden (R-Faktoren) durch <i>E. coli</i> ST131	172
4.7.1	Transfer von Resistenzplasmiden durch MDR <i>E. coli</i> ST131 Isolate.....	173
4.7.2	Transfer der Resistenzplasmide von <i>E. coli</i> ST131-O25b Isolat eo791.....	175
4.7.3	Fazit zu <i>E. coli</i> ST131-O25b Isolat eo791.....	180
5	Ausblick	181

6	Experimenteller Teil (Material und Methoden)	182
6.1	Material	182
6.1.1	Bakterienstämme	182
6.1.2	Oligonukleotide	192
6.1.3	Größenstandards.....	199
6.1.4	Wasser, Lösungen und Puffer	201
6.1.5	Nährmedien und Antibiotika.....	203
6.1.6	Kits und Enzyme	205
6.1.7	Chemikalien.....	207
6.1.8	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	208
6.1.9	Datenbanken und Software	213
6.2	Methoden	216
6.2.1	Arbeiten mit Bakterien	216
6.2.2	Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung - Detektion von Resistenz	219
6.2.3	Konjugationsexperimente	228
6.2.4	Isolierung von DNA.....	231
6.2.5	Isolierung von Plasmiden	232
6.2.6	Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	234
6.2.7	Phylogenie-Bestimmung bei <i>E. coli</i> (nach Clermont)	241
6.2.8	Screening auf <i>E. coli</i> ST131-O25b.....	242
6.2.9	Nachweis von β -Lactamase-Genen	244
6.2.10	Reinigung und Konzentration von DNA und PCR-Produkten	249
6.2.11	Scherung von DNA.....	250
6.2.12	DNA-Analytik	252
6.2.13	Sequenzierung.....	256
6.2.14	Sequenzanalyse.....	259
6.2.15	Multilocus Sequence Typing (MLST)	261
6.2.16	Rapid-Parallel Multilocus Sequence Typing (RP-MLST).....	263
7	Literaturverzeichnis	271
8	Anhang	299
8.1	Detektion von <i>E. coli</i> ST131-O25b und β-Lactamasen	299
8.1.1	<i>gyrA-pabB</i> (ARMS) Duplex-PCR auf spezifische SNPs in <i>pabB</i>	299
8.1.2	Screening und Pyrosequencings auf <i>E. coli</i> ST131-O25b spezifische SNPs	300

8.1.3	PCR-Screening auf SHV und TEM β -Lactamasen (BSAC-/ und QU-Stämme).....	302
8.1.4	CTX-M-Gruppen PCR für <i>E. coli</i> eo971 (GK 2913).....	303
8.2	Neue Mutationen in <i>E. coli</i> ST131 Isolaten	304
8.2.1	<i>acrR fM1</i> in <i>E. coli</i> eo795 (GK 2914).....	304
8.2.2	<i>ompR A35D</i> in <i>E. coli</i> QU015 (GK 3438)	305
8.2.3	<i>pabB</i> I268L in <i>E. coli</i> eo760 (GK 2903).....	306
8.3	Sequenzen neuer Allele	307
8.3.1	<i>pabB</i> in <i>E. coli</i> eo760 (GK 2903)	307
8.3.2	<i>pabB</i> in <i>E. coli</i> eo979 (GK 2956)	307
8.3.3	<i>trpA</i> in <i>E. coli</i> PEG-16-27-35 (GK 4465)	308
8.3.4	<i>dinB</i> in <i>E. coli</i> PEG-16-101-31 (GK 4512)	309
8.4	RP-MLST NGS-Sequenzierung und Analysen	310
8.4.1	Ion Torrent™ PGM Run Reports	310
8.4.2	Sequenzen der MLST Housekeeping-Gene	314
8.4.3	Sequenzen der <i>bla</i> _{CTX-M} Gene aus der RP-MLST-Analyse in IGV	317
8.4.4	CLC Genomics Workflow zur MLST-Analyse und Resistenzdetektion	318
8.4.5	CLC „Type a known species“ Analyse der RP-MLST Daten	319
8.4.6	CLC „Find Resistance“ Analyse der RP-MLST Daten	322
8.5	Gefahrstoffverzeichnis.....	324
8.5.1	KMR-Stoffe	324
8.5.2	Gefahrstoffe	325
9	Danksagung	328
10	Eidesstattliche Versicherung	330

III. Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen

®/R	Registered Trade Mark (eingetragene Warenmarke)
°C	Grad Celsius
3.GC/3.GC-R	Drittgenerations-Cephalosporin/-Resistenz
3MRGN	Multiresistente Gramnegative mit Resistenz gegen 3 AB-Klassen
4MRGN	Multiresistente Gramnegative mit Resistenz gegen 4 AB-Klassen
A	Adenin (DNA-Base)
AB	Antibiotikum, Antibiotika
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp/AMP	Ampicillin
Amp ^R /AMP ^R /amp ^R	Ampicillinresistenz, ampicillinresistent
AMR	Antimikrobielle Resistenz, <i>antimicrobial resistance</i>
ARMS	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSI	<i>bloodstream infection</i> , Bakteriämie
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (DNA-Base)
ca.	<i>circa</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CAZ	Ceftazidim
CAZ ^R /CAZ-R	Ceftazidimresistenz, ceftazidimresistent
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDS/ (cds.)	coding sequences, codierende Sequenzen
cg	<i>core genome</i>
cgMLST	<i>core genome Multilocus sequence typing</i>
Cip/CIP	Ciprofloxacin
Cip ^R /Cip ^R /CIP-R/cip ^R	Ciprofloxacinresistenz, ciprofloxacinresistent
Clm/CLM	Chloramphenicol
Clm ^R /Clm ^R /clm ^R	Chloramphenicolresistenz, chloramphenicolresistent
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Clv/CLV	Clavulansäure

cm	Centimeter
CTX	Cefotaxim
CTX ^R /CTX-R/ctx ^R	Cefotaximresistenz, cefotaximresistent
Da	Dalton
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
doi, DOI	<i>Digital Object Identifier</i> (DOI)
dsDNA	Doppelstrang-DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ESBL	<i>Extended spectrum</i> β -lactamase
ESKAPE	Akronym für die nosokomialen bakteriellen Erreger <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter-Spezies et alii</i> (lat.): und andere
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.): und andere
etc.	<i>et cetera</i> (lat.): und so weiter
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPEC	Extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>
for / fw	<i>forward</i>
fs	<i>frameshift</i> (Leserahmenverschiebung)
FQ	<i>Flouroquinolone</i> ; Fluorchinolon
G	Guanin (DNA-Base)
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskonstante
Gen/GEN	Gentamicin
Gen ^R /Gen ^R /gen ^R	Gentamicinresistenz, gentamicinresistent
GHS	<i>Global Harmonized System of Classification, Labeling and Packaging of Chemicals</i>
GK / GK-Nr.	Glycerinkultur (GK), GK-Nr. (Interne Labornummer)
h	Stunde
HWI, UTI	Harnwegsinfektion(en), <i>urinary tract infection(s)</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kan/KAN	Kanamycin
Kan ^R /Kan ^R /kan ^R	Kanamycinresistenz, kanamycinresistent
Kap.	Kapitel

KBE	Koloniebildende Einheiten
k; kbp; kDa	Kilo (10^3); Kilobasenpaare; Kilodalton
KMR	Kanzerogen, Mutagen, Reproduktionstoxisch
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
L	Liter
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid/e
M	molar (mol/L)
m; mg; mL, mm	Milli (10^{-3}); Milligramm; Milliliter; Millimeter
μ ; μ g; μ L; μ M	Mikro (10^{-6}); Mikrogramm; Mikroliter; Mikromolar
mar	<i>multiple antibiotic resistance</i>
MBL	Metallo- β -Lactamase
M; Mbp; MDa	Mega (10^6); Megabasenpaare; Megadalton
MDR	Multiresistenz, <i>multidrug-resistant</i> , <i>multidrug-resistance</i>
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
MLST	<i>Multilocus Sequence Type</i> , <i>multilocus sequence typing</i>
MRGN	<u>M</u> ultiresistente <u>g</u> ram <u>n</u> egative Bakterien
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
n; ng; nm	Nano (10^{-9}); Nanogramm; Nanometer
n. a.	nicht analysiert, nicht auswertbar, nicht untersucht
n. d.	<i>not determined</i> (nicht bestimmt)
NEB	New England BioLabs
Nr.	Nummer
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTC	<i>no template control</i>
OD	Optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
Ori, oriT	<i>Origin of Replication</i> , <i>Origin of Transfer</i>
PBPs	Penicillin-binde-Proteine
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDR	<i>pandrug-resistant</i>
PEG	Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
Pen/PEN	Penicillin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
QRDR	<i>Quinolone Resistance Determining Region</i>
R / ^R	Resistenz, resistant
RKI	Robert Koch-Institut

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (deutsch: Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rev / rv	<i>reverse</i>
S / ^s	Sensibilität, sensibel
S.	Seite
s	Sekunde
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>E. coli</i>
T	Thymin (DNA-Base)
t	Zeit
T [C°]	Temperatur in Grad Celcius
Tab.	Tabelle
T _{an.}	Temperatur der Primeranlagerung (<i>annealing</i>)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet/TET	Tetracyclin
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting</i>)
™/TM	<i>Unregistered Trade Mark</i> (unregistrierte Warenmarke)
Tsd.	Tausend
U	Unit (Enzymaktivität) oder Uracil (RNA-Base)
ÜNK	Übernachtkultur
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vis	<i>Visible</i> (sichtbarer Bereich des Lichtspektrums)
wg	<i>whole genome</i>
wgMLST	<i>whole genome Multilocus sequence typing</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
XDR	<i>extensively drug-resistant</i>
z. B.	zum Beispiel
Δ	delta - Deletion

Aminosäuren

Aminosäure	3 Buchstaben Code	1 Buchstaben Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Gene

Gen	Protein	Funktion
<i>aac</i>	AAC	Aminoglykosid-Acetyltransferase
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	AAC (6')-Ib-cr	Aminoglykosid-Acetyltransferase mit FQ-Spektrum
<i>aad</i>	AAD	Aminoglykosid-Adenylyltransferase
<i>acrA</i>	AcrA	Membranfusionsprotein der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrB</i>	AcrB	Pump-Protein der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrR</i>	AcrR	Repressor von <i>acrAB</i> in <i>acrRAB</i> -Operon
<i>adk</i>	Adk	Adenylatkinase
<i>ampC</i>	AmpC	β -Lactamase vom AmpC-Typ
<i>aph</i>	APH	Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>bacA</i>	BacA	Undecaprenyl-Diphosphatase
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M	β -Lactamase vom CTX-M-Typ
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	CTX-M-1	β -Lactamase vom CTX-M-Typ 1

<i>bla</i> _{CTX-M-15}	CTX-M-15	β-Lactamase vom CTX-M-Typ 15
<i>bla</i> _{KPC}	KPC	β-Lactamase vom KPC-Typ (Carbapenemase)
<i>bla</i> _{OXA}	OXA	β-Lactamase vom OXA-Typ (Carbapenemase)
<i>bla</i> _{TEM} / <i>bla</i> _{SHV}	TEM/SHV	β-Lactamase vom TEM/SHV-Typ
<i>cat</i>	CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>dinB</i>	DinB	DNA-Polymerase IV
<i>dfrB4</i>	DHFR	Trimetoprim-resistente Dihydrofolat-Reduktase
<i>envZ</i>	EnvZ	Histidin-Kinase
<i>fimH</i>	FimH	Fimbrie, Adhäsionsprotein
<i>fumC</i>	FumC	Fumarase (Fumarathydratase)
<i>gyrA</i> / <i>gyrB</i>	GyrA/GyrB	Gyrase Untereinheit A/B
<i>icd</i>	Icd	Isocitratdehydrogenase
<i>marA</i>	MarA	Globaler Transkriptionsaktivator
<i>marR</i>	MarR	Repressor im <i>marRAB</i> -Operons
<i>mdh</i>	MDH	Malatdehydrogenase
<i>mdtG</i> / <i>mdtH</i>	MdtG/ MdtH	Multiresistenz-Transport-Protein (Efflux)
<i>micC</i>	-	Antisense-RNA
<i>micF</i>	-	Antisense-RNA
<i>mphA</i>	MPH	Makrolid-Phosphotransferase
<i>ompC</i>	OmpC	Transmembranprotein (Porin)
<i>ompF</i>	OmpF	Transmembranprotein (Porin)
<i>ompR</i>	OmpR	Regulatorprotein von OmpC und OmpF
<i>pabB</i>	PabB	Aminodeoxychorismat-Synthase
<i>parC</i>	ParC	Topoisomerase IV Untereinheit A
<i>polB</i>	PolB	DNA-Polymerase II
<i>purA</i>	PurA	Adenylsuccinatdehydrogenase
<i>putP</i>	PutP	Prolin-Natriumsymporter
<i>qepA</i>	QepA	FQ-spezifische Effluxpumpe
<i>qnr</i>	Qnr	Gyrase-Schutzprotein
<i>recA</i>	RecA	DNA-Reparaturprotein
<i>rob</i>	Rob	Transkriptionsregulator
<i>soxR</i>	SoxR	Transkriptionsregulator
<i>soxS</i>	SoxS	Transkriptionsaktivator
<i>sul1</i> / <i>sul2</i>	DHPS	alt. Dihydropteroat-Synthase (Sulfonamid Resistenz)
<i>tetA</i> / <i>tetB</i>	TetA/TetB	Tetracyclin-spezifische Effluxpumpe
<i>tolC</i>	ToIC	Äußeres Membranprotein (AcrAB-ToIC Effluxpumpe)
<i>trpA</i> / <i>trpB</i>	TrpA/TrpB	Tryptophansynthetase Untereinheit A/B
<i>uidA</i>	UidA	β-D-Glucuronidase

IV. Zusammenfassung

Eine wichtige Ursache für die weltweit zu beobachtende Zunahme von multipler Antibiotikaresistenz ist die Ausbreitung einiger sich besonders stark verbreitender Erreger (Woodford *et al.* 2011). Ein solcher multiresistenter pandemischer Erreger ist *E. coli* ST131, der Harnwegsinfekte (HWI), Bakteriämien und Sepsis verursacht und aufgrund seiner Resistenzen, insbesondere gegen Fluorchinolone (FQ) und β -Lactam-Antibiotika sowie seiner klinischen Relevanz und Verbreitung (Mathers *et al.* 2015b) von besonderem Interesse ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand zum einen darin, die Prävalenz von *E. coli* ST131 innerhalb klinischer Kollektive unterschiedlichen Zeitraums und lokalen Ursprungs mittels Multilocus Sequence Typing (MLST) zu bestimmen. Zum anderen stand die Analyse der zugrundeliegenden molekularen Ursachen der Resistenzeigenschaften und deren Verbreitungswege im Fokus.

Das erste *E. coli* Kollektiv entstammte dem *resistance surveillance project* der *British Society of Antimicrobial Chemotherapie* von repräsentativ gesammelten klinischen Isolaten aus Bakteriämien in England von 2001 bis 2004. Die Arbeit zeigt, dass sich darin bereits *E. coli* ST131 Isolate unter den Stämmen mit einer erhöhten MHK für Ciprofloxacin ($\geq 0,25$ - $256 \mu\text{g/mL}$) befanden, wobei ihr Anteil über die Jahre kontinuierlich anstieg. War 2001 noch kein ST131 Isolat im Kollektiv vertreten, waren es 2004 bereits 43,8 %. Die Daten weisen auf den Beginn der Ausbreitung von *E. coli* ST131 in England mit Start im Jahre 2002 hin.

Das zweite Kollektiv stammte aus einer Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft von 2016 in Deutschland und beinhaltete Isolate aus HWI und Bakteriämien. In diesem waren 31,6 % der Isolate gegen mindestens ein Antibiotikum resistent und 8,2 % der Isolate multiresistent (3MRGN). Der Anteil an *E. coli* ST131 Isolaten lag insgesamt bei 10,7 %. Unter den gegen Ciprofloxacin resistenten sowie auch unter den 3MRGN Isolaten lag er jeweils bei 50 %.

Hinsichtlich der genetischen Grundlage für die FQ-Resistenz wurde in den *E. coli* ST131 Isolaten zumeist eine Doppelmutation in den bakteriellen Topoisomerase-Genen *gyrA* und *parC* detektiert. In Bezug auf die β -Lactam-Resistenz wurden in den gegen Ampicillin

resistenten Isolaten β -Lactamasen vom TEM- oder SHV-Typ identifiziert, in den gegen Cefotaxim resistenten solche vom CTX-M-Typ, meist CTX-M-15.

Eine neue Next-Generation Sequencing (NGS) Anwendung, genannt Rapid-Parallel Multilocus Sequence Typing (RP-MLST), wurde etabliert und ermöglichte die parallele Sequenzierung der relevanten MLST-, Housekeeping-, Resistenz-, Target- und resistenzassoziierten Gene von mehreren Stämmen gleichzeitig.

Durch die Sequenzierung wurden in den *E. coli* ST131 Isolaten zwei noch nicht beschriebene Mutationen gefunden, die einen FQ-Resistenz vermittelnden Effekt haben könnten: erstens die Mutation *acrR* fM1, die wahrscheinlich zur Folge hat, dass *acrR* nicht translatiert wird und in der konstitutiven Expression der von *acrAB* codierten *multidrug-resistance* (MDR)-Effluxpumpe AcrAB-TolC resultieren könnte; zweitens die Mutation *ompR* A35D, die potentiell eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle in OmpR erzeugt und so über eine Aktivierung zu OmpR-P die Regulation der Porine OmpC und OmpF beeinflussen könnte. Außerdem wurden zwei neue Allele des Housekeeping-Gens *pabB* in *E. coli* identifiziert.

Multiresistente *E. coli* ST131 Isolate wurden auf das Vorhandensein von Plasmiden untersucht. In allen Fällen wurde mindestens ein Plasmid nachgewiesen, in manchen Fällen sogar bis zu fünf, einige mit Größen von 60 bis zu > 100 kbp. Für ein klinisches ST131 Isolat konnte gezeigt werden, dass Gene für Resistenz gegen Ampicillin, Gentamicin und Cefotaxim auf einen empfindlichen Stamm übertragen wurden. Dabei wurde der Erwerb von Plasmiden und Resistenzgenen, sowie die Übertragung von Mehrfachresistenz nachgewiesen.

Die benannten Ergebnisse liefern Erkenntnisse zu dem global präsenten Pathogen *E. coli* ST131 und seinen pandemischen Subklonen ST131 H30-R und ST131 H30-Rx, deren Resistenzmechanismen, R-Faktoren und Verbreitung der Multiresistenz. Darüber hinaus liefern sie Erkenntnisse zur zeitlichen Verbreitung und Entwicklung innerhalb der ST131 Linie.

V. Abstract

The development of multiple antibiotic resistance worldwide is mainly driven by few intensively spreading pathogens (Woodford *et al.* 2011). One of these pandemic high-risk clones is *E. coli* ST131, which causes urinary tract infections (UTI), bloodstream infections (BSI) and sepsis, and due to its multidrug-resistances (MDR), especially to fluoroquinolones (FQ) and β -lactam antibiotics, as well as its clinical relevance and spread (Mathers *et al.* 2015b), is of particular interest.

This study aimed to investigate the prevalence of *E. coli* ST131 within clinical strain collections from different time periods and local origins, using Multilocus sequence typing (MLST). Furthermore, this work focussed on the analysis of the underlying molecular mechanisms of antibiotic resistance and gene transfer.

The first *E. coli* strain collection consisted of clinical isolates from bacteraemia obtained in the UK between 2001 and 2004 as part of the resistance surveillance project of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy. This work shows, that *E. coli* ST131 isolates were already present in strains with increased MICs of Ciprofloxacin (≥ 0.25 -256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and their amount increased continuously over the years. While no ST131 isolate was present in 2001, an increase to 43.8 % in 2004 was detected. The data indicate that the spread of *E. coli* ST131 in England started in 2002.

The second strain collection from a study of the Paul-Ehrlich-Society conducted in Germany 2016, contained UTI und BSI isolates. It showed 31.6 % of strains with resistance against at least one antibiotic and 8.2 % with multidrug resistance (3MRGN). Therefore, *E. coli* ST131 isolates accounted for 10,7 % of all isolates, whilst 50 % of the ciprofloxacin resistant, as well as the 3MRGN isolates, respectively.

Regarding the genetic background causing FQ-resistance in *E. coli* ST131 isolates, in most strains a double mutation in bacterial topoisomerase coding genes *gyrA* and *parC* was detected. In relation to β -lactam resistance, in all strains showing ampicillin resistance,

β -lactamases of TEM- or SHV-type were identified, while in cefotaxime resistant strains CTX-M-type β -lactamases, mostly CTX-M-15 were present.

A novel next-generation sequencing (NGS) application, called rapid-parallel multilocus sequence typing (RP-MLST) was established and allowed simultaneous sequencing of relevant housekeeping, resistance, target, and resistance-mediating genes in many strains in parallel.

Among the *E. coli* ST131 isolates, DNA-sequencing revealed two not yet described mutations, which could have a FQ-resistance mediating effect. Firstly, mutation *acrR* fM1, which probably results in the non-translation of *acrR*, could result in the constitutive expression of the *acrAB*-encoded MDR-efflux pump AcrAB-TolC. Secondly, mutation *ompR* A35D may create an additional phosphorylation site in OmpR resulting in an altered activation to OmpR-P influencing the control of the OmpC and OmpF porin regulation. Furthermore, two new alleles of the housekeeping gene *pabB* have been identified in *E. coli* isolates.

Investigation of the plasmid content of multi-drug-resistant *E. coli* ST131 strains revealed that all harboured at least one plasmid. However, in some strains up to five, some ranging from 60 up to ≥ 100 kbp in size. One clinical *E. coli* ST131 isolate has been shown to transfer its resistance to ampicillin, gentamicin, and cefotaxime to a susceptible strain. With this the acquirement of plasmids and resistance genes was proven, as well as transfer of multi-resistance.

The above results contribute to understanding the globally present pathogen *E. coli* ST131, its pandemic subclones ST131 H30-R and ST131 H30-Rx, the mechanisms underlying its resistance(s) to antibiotics, R-factors and spread of multi-resistance. Furthermore, it provides insights into its spread in the temporal context and its evolution within the ST131 lineage.

1 Einleitung

1.1 Bakterien, Antibiotika und Resistenz

1.1.1 Bakterien als Infektionserreger – Antibiotika als Therapie

Infektionskrankheiten werden von pathogenen Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten hervorgerufen. Die Erkrankung entsteht dabei durch die Infektion, also das Eindringen der Erreger in den Organismus und die sich anschließende Entwicklung oder Vermehrung dieser (RKI 2015). Wahrscheinlich seit Anbeginn der Menschheit existierend, zeigten sich Infektionskrankheiten vor allem durch Ausbrüche in den großen Epidemien, wie der der Pest von 1347-1353, verursacht durch das Bakterium *Yersinia pestis* (Haensch *et al.* 2010) oder der Spanischen Grippe von 1918-1920, die auf ein Influenza-Virus zurückgeht und an der ca. 50-100 Millionen Menschen starben (Berche 2022).

Die Entdeckung der Mikroorganismen geht auf Louis Pasteur zurück (Tyndall und Pasteur 1878), die der Bakterien als Auslöser von Infektionskrankheiten und da insbesondere die Entdeckung des Milzbranders *Bacillus anthracis* auf Robert Koch (Koch 1876). Das erste Antibiotikum war Salvarsan, welches unter Paul Ehrlich entwickelt und 1910 erstmals erfolgreich eingesetzt wurde (Christensen 2021). Ehrlich begründete damit die moderne Antiinfektive Therapie. Die Entdeckung des Penicillins geht auf Alexander Fleming zurück (Fleming 1929), welcher später auch die Resistenzentwicklung als potenzielle Bedrohung erkannte und davor warnte (Fleming 1945).

1.1.2 Antibiotika und Resistenz

Ein Organismus kann von Natur aus resistent gegen einen Stoff sein, was bedeutet, dass er diesem gegenüber, aufgrund seiner vorliegenden genetischen Variante, unempfindlich ist. In diesem Fall besteht eine sogenannte intrinsische Resistenz. Andernfalls kann er empfindlich für einen Stoff sein, also sensibel für dessen Wirkung. Im Speziellen, auf Mikroorganismen bezogen, spricht man von antimikrobieller Resistenz (AMR), welche die z.B. durch Mutation oder Aufnahme von Resistenzgenen erworbene (aber nicht die natürliche) Unempfindlichkeit

gegen einen Wirkstoff beschreibt (WHO 2024). Im Kontext von Bakterien spricht man konkret auch von antibakteriellen Wirkstoffen und allgemeiner von Antibiotika. Gegen eben diese kann eine durch genetische Veränderung erworbene Resistenz auftreten (European Centre for Disease Prevention and Control 2010).

Die Wirkung der Antibiotika beruht insbesondere auf dem Prinzip ihrer selektiven Toxizität. Bei hoher Wirksamkeit gegen das Bakterium vermitteln sie keine oder wenig schädliche Wirkungen für den menschlichen oder tierischen Wirt. Bezogen auf ihre Wirkweise unterscheidet man zwischen bakteriziden und bakteriostatischen Antibiotika. Bakterizide Wirkstoffe töten die Bakterienzellen irreversibel ab (Pschyrembel 2024b). Bakteriostatische Substanzen hemmen dagegen reversibel das Wachstum der Zellen, sodass sie sich nicht mehr weiter vermehren, die Elimination muss allerdings durch das Immunsystem des Wirts erfolgen (Pschyrembel 2024a). Zu den bakteriziden Antibiotika gehören unter anderen die β -Lactam-Antibiotika, Aminoglykoside, Fluorchinolone, Glykopeptide sowie die Lipopeptide und zu den bakteriostatischen Antibiotika beispielsweise die Makrolide, Oxazolidinone, Sulfonamide sowie Tetracycline (RKI 2024; Patel *et al.* 2024). Gegen nahezu alle Antibiotika sind bereits Resistenzen bekannt (Ventola 2015).

1.1.3 Definition der Multiresistenz bei Bakterien

Im Allgemeinen gelten Bakterien als multiresistent, wenn sie gegen viele antibakterielle Wirkstoffe resistent sind. Sie werden als MDR (engl. *multidrug-resistant*) bezeichnet, wenn sie mehrere erworbene Resistenzen gegen Substanzen dreier verschiedener Antibiotika-Klassen haben. Daneben gibt es weitere Bezeichnungen für gesteigerte Multiresistenz: XDR (*extensively drug-resistant*) und PDR (*pandrug-resistant*). Eine Definition der Multiresistenz nach Art und Menge wurde 2012 durch Vertreter des *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) und des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) gegeben. Danach gilt MDR als erworbenermaßen unempfindlich gegen mindestens je einen Wirkstoff aus drei oder mehr Antibiotika-Klassen, XDR als unempfindlich gegen mindestens einen Wirkstoff aus allen bis auf zwei Antibiotika-Klassen und PDR als unempfindlich gegen alle Antibiotika aller Klassen (Magiorakos *et al.* 2012).

1.1.4 Multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN)

Unter den MRGN versteht man bestimmte multiresistente gramnegative Bakterien, die Resistenzen gegen Antibiotika gleich mehrerer Gruppen aufweisen. Diese Einteilung wurde aus Gründen der einheitlichen Resistenzbewertung von der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) des Robert-Koch-Instituts (RKI) vorgenommen und bezieht sich auf phänotypische Eigenschaften der Erreger gegen bakterizide Therapeutika für schwere Infektionen. Die betroffenen Erreger sind *Escherichia coli*, *Klebsiella species (spp.)*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und andere *Enterobacterales*. Die definierten Antibiotika-Gruppen (mit Leitsubstanz) dieser Einteilung sind die Acylureidopenicilline (Piperacillin), die Drittgenerations-Cephalosporine (3.GC) (Cefotaxim oder Ceftriaxon für Enterobakterien, bzw. Ceftazidim oder Cefepim bei *Pseudomonas aeruginosa*), die Fluorchinolone (Ciprofloxacin) und die Carbapeneme (Imipenem oder Meropenem), (vgl. Kap. 1.2.2 und 1.2.4). Nach der Anzahl der Resistenzen unterscheidet man in gegen drei bzw. vier Klassen resistente Erreger (3MRGN bzw. 4MRGN). Enterobakterien der 3MRGN sind als resistent gegen Fluorchinolone, Acylureidopenicilline, Cephalosporine und sensibel für Carbapeneme definiert und die der 4MRGN entsprechend als zusätzlich resistent gegen Carbapeneme (KRINKO 2012).

1.1.5 Kritische bakterielle Infektionserreger

Einige besonders relevante Erreger, die Multiresistenz besitzen, werden unter dem Akronym ESKAPE zusammengefasst. Diese umfassen die folgend aufgeführten Erreger mit den für sie typischen Resistenzen: Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) (*Enterococcus faecium*), Methicillin-resistente Staphylokokken (Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* = MRSA), Carbapenemresistente Metallo- β -Lactamase (MBL-) bildende Klebsiella pneumoniae (KPC) Stämme, multiresistente Acinetobacter baumannii, multiresistente Pseudomonas aeruginosa Stämme sowie Extended-Spektrum- β -Lactamase (ESBL-) und Carbapenemase bildende Enterobakterien (*Enterobacter spp.*), (Santajit und Indrawattana 2016; Rice 2008).

Zur Letzteren gehört auch *Escherichia coli*. Ein besonders kritischer, multiresistenter *Escherichia coli* Stamm ist der vom *Sequence Type* 131 (*E. coli* ST131), der in Kap. 1.3 detailliert beschrieben ist.

1.1.6 *Escherichia coli*

Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde 1885 von Theodor Escherich entdeckt (Escherich 1886). Es handelt sich dabei um ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium, welches Bestandteil der natürlichen Darmflora ist und als solches dort auch erstmal nicht pathogen.

1.1.6.1 Pathogene *E. coli* Stämme

Es gibt allerdings verschiedene *E. coli* Stämme, die aufgrund ihrer Eigenschaften humanpathogen sind, indem sie entweder an Darmzellen anhaften, in diese eindringen oder Toxine bilden und freisetzen, welche die Zellen schädigen. Unter ihnen sind insbesondere enteropathogene (EPEC) und enterotoxische (ETEC), sowie enterohämorrhagische (EHEC) und Shiga-Toxin produzierende (STEC) *E. coli* Stämme zu erwähnen (Chaudhuri und Henderson 2012; Kaper *et al.* 2004). Darüber hinaus kann durch sogenannte extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC), auch an anderer Stelle (extraintestinal) als im Darm (intestinal), eine Infektion verursacht werden (Russo und Johnson 2000). Unter diesen verursachen insbesondere uropathogene *E. coli* (UPEC) Harnwegsinfektionen (HWI), wie Blasen- und Nierenentzündungen, die fortschreitend zu einer Bakteriämie mit Folge einer Sepsis führen können (Kaper *et al.* 2004). Diese pathogenen *E. coli* und insbesondere die ExPEC Erreger haben bereits Resistenzen gegen jede Klasse an Antibiotika entwickelt, die zur humanen Therapie eingesetzt werden (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014).

1.1.6.2 Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli* Stämme

Bei den uropathogenen *E. coli* Stämmen (UPEC) spielen insbesondere Typ-1 Fimbrien eine wesentliche Rolle für das Anhaften am Uroepithel (Kaper *et al.* 2004). Während kommensale Wildtyp *E. coli* Stämme nur an Trimannose Strukturen binden, führt eine Mutation im Fimbrienadhäsion-Gen *fimH* dazu, dass es zu einem Monomannose bindenden Phänotyp

kommt, welcher mit den UPEC Stämmen assoziiert ist (Sokurenko *et al.* 1998). Auch die H4-Flagellen (Oberflächenantigen H:4) sind ein Faktor für die Virulenz, da sie die Motilität und Interaktion mit den Epithel- und Immunzellen beeinflussen (Kakkanat *et al.* 2015). Weitere Virulenzfaktoren, die UPEC Stämme aufweisen können, sind weitere Fimbrientypen, bestimmte Lipopolysaccharide (O Serotypen), Toxine, eine Kapsel, Oberflächenproteine, Serumresistenz-Proteine und Eisen-Aufnahmesysteme (Toh *et al.* 2010; Jahandeh *et al.* 2015).

1.1.7 Resistenzüberwachung

Zu Zwecken der Resistenzüberwachung (*Resistance Surveillance*) werden von vielen nationalen und internationalen Gremien und Gesellschaften regelmäßig Bakterienstämme aus dem klinischen Kontext gesammelt. Sie werden je nach Programm und Zweck auf Resistenz sowie weitere Charakteristika untersucht, archiviert und stehen der Wissenschaft für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Je nach Umfang des jeweiligen Programms werden die Daten in Studien publiziert oder sind auf Nachfrage verfügbar.

Eine der frühesten klinischen *E. coli* Stammsammlungen aus Europa zu Zwecken der Resistenzüberwachung und Forschung stammt aus England. Dort wurden ab 2001 im Rahmen des damals neu eingerichteten *Resistance Surveillance Programmes* der *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) klinische Isolate aus Bakteriämien gesammelt (Reynolds *et al.* 2008). Nationale Gremien in Deutschland sind z. B. die nationalen Referenzzentren (NRZ) für die jeweiligen Spezies und die Paul Ehrlich Gesellschaft für Infektionstherapie, die regelmäßig Stämme sammeln und untersuchen (RKI-NRZ 2023).

Auf globaler Ebene sind vor allem die Zusammenschlüsse der regionalen Einrichtungen wie dem *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net), *Latin American Network for Antimicrobial Resistance Surveillance* (ReLAVRA) und das *Western Pacific Regional Antimicrobial Consumption Surveillance System* (WPRACSS) relevant, die auch über das *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS) der WHO vernetzt sind (WHO-GLASS 2024).

1.1.8 Bakterielle Resistenzmechanismen

Resistenz gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen wird durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen, die zu einer Verringerung der Empfindlichkeit gegen den Wirkstoff führen. Grundlegende Resistenzmechanismen sind die Veränderung der Zielstruktur, die Herabsetzung der Wirkstoffkonzentration an dieser, Wirkstoffabbau und Biofilmbildung.

Eine direkte verminderte Empfindlichkeit der Zelle gegen ein Antibiotikum beruht in vielen Fällen auf einer Veränderung der Zielstruktur. Dieses sogenannte Target, ist ein Molekül oder Protein, an dem der Wirkstoff angreift und einen Effekt verursacht. Es ist für die Substanz spezifisch und seine Empfindlichkeit wirksamkeitsbestimmend. Veränderungen die diese Zielstruktur z. B. weniger zugänglich machen oder der Schutz der Zielstruktur, führen in der Folge zu Resistenz (Blair *et al.* 2015).

Eine verminderte Wirkstoffkonzentration in der Zelle beruht vor allem auf zwei Prinzipien, der Verhinderung des Eindringens der antibakteriellen Substanzen in die Zelle und der gesteigerten Elimination aus der Zelle (Christaki *et al.* 2020). Die Mechanismen unterscheiden sich zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien, zu *E. coli* vgl. Kap. 1.2.1.

Im Hinblick auf Wirkstoffabbau ist die enzymatische Umsetzung die relevanteste Ursache für Resistenz. Dabei wird von der Zelle ein Enzym gebildet, das in der Lage ist den Wirkstoff abzubauen oder anderweitig chemisch zu verändern, sodass er seine Wirksamkeit verliert. Diese Enzyme sind meistens spezifisch in ihrem Substratspektrum, wie die β -Lactamasen (vgl. Kap. 1.2.5.1), vermitteln aber auch Resistenz gegen verschiedene Stoffklassen, wie die Aminoglykosid modifizierenden Enzyme (vgl. Kap. 1.2.3.2.1) (Ramirez und Tolmasky 2010).

In Biofilmen lagern sich die Bakterien in einer funktionellen Einheit zusammen, die eine extrazelluläre Matrix bildet, in deren Inneren andere Bedingungen herrschen als außen (Darby *et al.* 2023). Die einzelnen Zellen gehen im Biofilm in verschiedene metabolische Stadien über, von denen einige durch diverse Anpassungsvorgänge, wie unter anderem reduziertem Stoffwechsel, zu persistierenden Zellen werden, die gegen viele Einflüsse antibakteriell wirksamer Stoffe geschützt sind (Stewart *et al.* 2019).

1.2 Antibiotika und Resistenzmechanismen bei *E. coli*

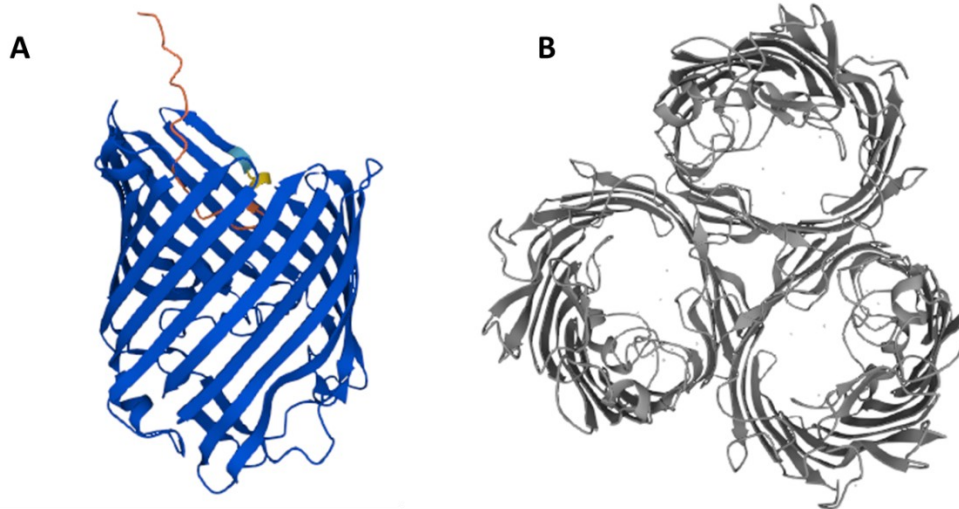
Im Folgenden werden die Antibiotikaklassen und Resistenzmechanismen aufgeführt die bei *E. coli* zu Resistenz gegen Fluorchinolone (FQ) und β -Lactam-Antibiotika sowie zu Multiresistenz führen. Der Fokus liegt dabei auf den Mechanismen, die insbesondere in Bezug auf den multiresistenten Erreger *E. coli* ST131 (vgl. Kap. 1.3) eine wesentliche Rolle spielen. Die Aufführung ist exemplarisch und nicht abschließend, da bei *E. coli* bereits Resistenzen gegen jede Antibiotikaklasse mit gramnegativem Wirkspektrum bekannt sind (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014).

1.2.1 Mechanismen der Multiresistenz

In Bezug auf Multiresistenz spielen bei gramnegativen Bakterien vor allem der verminderte Influx (Einstrom von Stoffen in die Zelle) und ein gesteigerter Efflux (Austransport von Stoffen aus der Zelle) eine Rolle. Diese Systeme werden über verschiedene Faktoren reguliert, die sich auf die Menge und Zusammensetzung der äußeren Membranproteine (Porine) sowie der Effluxpumpen auswirken, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

1.2.1.1 Porine

Der Einstrom von Stoffen in die Zelle, auch Influx, erfolgt insbesondere über Porine in der äußeren Membran, den sogenannten OMPs (*outer membrane proteins*). Die in Bezug auf Antibiotika besonders wichtigsten OMPs in *E. coli* sind OmpC und OmpF. Sie formen eine Art Pore, durch welche größere hydrophile Moleküle, bis zu 600 Da, die lipophile Membran passieren und so in die Zelle gelangen (Delcour 2009; Blair *et al.* 2015). Aufgebaut sind sie aus antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen, die einen Kanal bilden und die sich zu Trimeren zusammenlagern (vgl. Abbildung 1-1). Verschiedene Substanzen passieren, bedingt durch ihren Größe und Ladung, die verschiedenen OMPs unterschiedlich stark, wobei OmpF einer der Haupteintrittskanäle für FQ und β -Lactam-Antibiotika ist (Delcour 2009). Die Struktur von OmpF ist in Abbildung 1-1 gezeigt, die Struktur von OmpC weiter unten in Abbildung 1-3.



Quelle: UniProt, P02931_OMP_F_ECOLI, AlphaFold Structure: AF-P02931-F1 und X-ray Structure: PDB-P02931-1BT9 (ompF - Escherichia coli (strain K12) | UniProtKB | UniProt 2023)

Abbildung 1-1: Proteinstrukturen von OmpF aus *E. coli* K-12. A zeigt die vorausgesagte Struktur des Monomers in Seitenansicht. B zeigt die Röntgenkristallstruktur eines Trimers in Aufsicht. Die Darstellungen entstammen UniProt.

Die Expression der Porine, vor allem die von OmpF, wird in Gegenwart bestimmter Antibiotika verändert, und die geringere Permeation von antibakteriellen Wirkstoffen über veränderte Porine ist ein beschriebener Resistenzmechanismus (Delcour 2009). Ihr Effekt ist ein verminderter Einstrom betroffener Substanzen (z. B. von Cephalosporinen) in die Zelle, der zu Resistenz führt (Alzayn *et al.* 2021). Die Expression von *ompC* und *ompF* wird über die Konzentration ihres Transkriptionsfaktors OmpR-P reguliert (Lan und Igo 1998), wie in Abbildung 1-3 dargestellt.

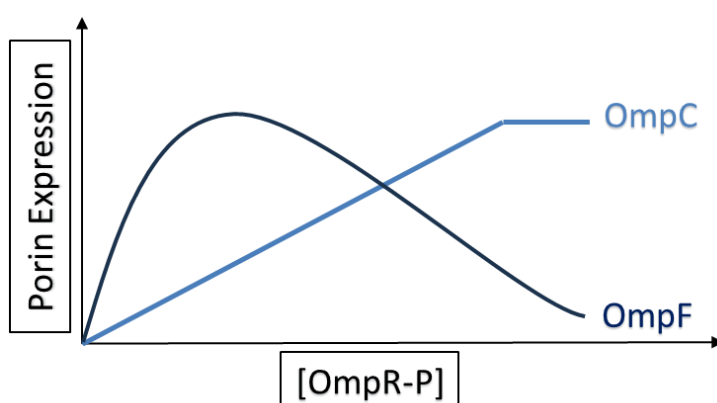


Abbildung 1-2: Expression der Porine OmpC und OmpF in Abhängigkeit der Menge an OmpR-P (nach: Lan und Igo 1998).

Dabei werden die Gene *ompF* und *ompC* in *E. coli* naturgemäß reziprok und in Abhängig der Osmolarität des Mediums von ihrem Transkriptionsfaktor OmpR-P reguliert (Yoshida *et al.* 2006). Bei OmpR-P handelt es sich um die phosphorylierte Form von OmpR. Die Regulation durch OmpR-P bewirkt mengenabhängig einerseits erst eine gesteigerte *ompF* Transkription, dann mit steigender Menge andererseits auch seine Reprimierung und daneben die Aktivierung der *ompC* Transkription, über die Bindung von OmpR-P in Bereichen vor den Promotoren von *ompC* und *ompF* (Yoshida *et al.* 2006).

Die Aktivierung von OmpR zu OmpR-P erfolgt über Phosphorylierung durch EnvZ. Bei EnvZ handelt es sich um eine osmosensitive Protein-Kinase (Aiba *et al.* 1989), die in der Lage ist OmpR zu phosphorylieren und auch wieder zu dephosphorylieren (Igo *et al.* 1989). OmpR fungiert als DNA-Bindeprotein, welches durch EnvZ zu OmpR-P aktiviert wird. Die Phosphorylierung bringt dabei eine Konformationsänderung mit sich, durch die OmpR-P seine DNA-bindende Aktivität erlangt (Kenney *et al.* 1995). OmpR-P bindet an die DNA im Promotorbereich von *ompF* und *ompC* und reguliert so deren Expression (Aiba und Mizuno 1990). Mit steigender Konzentration von OmpR-P wird die Expression von *ompF* runterreguliert und die Expression von *ompC* hochreguliert (Lan und Igo 1998).

Im Weiteren wird die Proteinsynthese von OmpC und OmpF auch durch post-transkriptionale Faktoren beeinflusst. So inhibiert *micF* als *mRNA-interfering complementary RNA* (micRNA) die Translation von OmpF (Mizuno *et al.* 1984). Dabei reduziert *micF*, mit Wirkung einer *antisense*-RNA zur m-RNA von *ompF*, die Menge an gebildetem Protein auf Translationsebene (Delihhas und Forst 2001). Analog wird die Translation von OmpC über die *antisense*-RNA *micC* reguliert (Chen *et al.* 2004).

Resistenz vermittelnde Mutationen in den Porinen spielen ebenfalls eine Rolle. Die Gegenwart von Antibiotika führt z. B. zu verschiedenen Veränderungen von OmpC, die die Passage durch die Pore verändern (Lou *et al.* 2011). Darunter scheinen vor allem Mutationen im Bereich der Konstriktionszone (Engstelle) von OmpC den Transport einiger Antibiotika zu verändern, was zu einer Modulation der Resistenz führt, insbesondere für größere Moleküle, wie z. B.

Cefotaxim (299 Da) (Lou *et al.* 2011). Die Struktur des Porins OmpC20, welches von Lou *et al.* untersucht wurde, ist mit den relevanten Positionen in Abbildung 1-3 dargestellt.

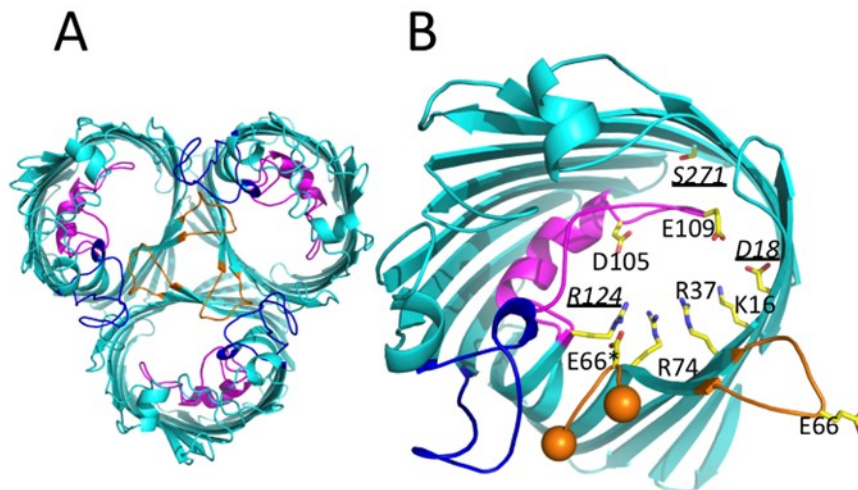


Abbildung 1-3: Struktur von OmpC mit den gefundenen Mutationen (nach: Lou *et al.* 2011). **A** zeigt das Trimer von OmpC20 (Aufsicht von außerhalb der Zelle). **B** zeigt die Konstriktionszone von OmpC20, mit den geladenen (markierten) Resten in dieser Zone. Farbschema für A und B: Loop L2 (orange) reicht von einem Monomer in die Pore eines anderen mit drei Kontaktpunkten pro Trimer, L3 (magenta) formt die Konstriktionszone und L4 (blau) trägt zur Trimerstabilität bei und formt den Eingang in die Pore. Die in resistenten Isolaten gefundenen mutierten Positionen sind kursiv und unterstrichen. Die Reste R124 und D18 sitzen an der Konstriktionszone, S271 befindet sich hinter L3. Detailliertere Informationen finden sich in der Originalpublikation (Lou *et al.* 2011). Abbildung: doi:10.1371/journal.pone.0025825.g001 (verändert nach: Lou *et al.* 2011).

In Gegenwart der mutierten OmpC Varianten zeigte sich eine um zwei bis drei Stufen höhere minimale Hemmkonzentration (MHK) als bei der nativen *E. coli* K-12 OmpC Variante (Lou *et al.* 2011). Daneben zeigten weitere Isolate mit OmpC Mutationen Resistenzen gegen Ceftazidim (546 Da), Ciprofloxacin (331 Da), Meropenem (383 Da) und Imipenem (299 Da) (Lou *et al.* 2011).

Ebenso gibt es auch Mutationen in *ompF*, die zu Resistenz führen (Delcour 2009).

1.2.1.2 Effluxpumpen

Auf der anderen Seite steht die Elimination der Stoffe aus der Zelle, die als Efflux bezeichnet wird. Efflux ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozess, für den die Zelle sogenannte Effluxpumpen besitzt, die toxische Stoffe und Stoffwechsel-Abbauprodukte aus der Zelle herauspumpen (Piddock 2006). Es gibt sowohl Effluxpumpen mit engem Substratspektrum, wie z. B. die Tetracyclin-spezifische Effluxpumpe TetA, als auch solche die eine große Breite an unterschiedlichen Substanzen, darunter diverse Antibiotika, aus der Zelle befördern, die

sogenannten *multidrug-resistance* (MDR)-Effluxpumpen (Blair *et al.* 2015). Bei *E. coli* ist im Hinblick auf ein vermehrtes Herauspumpen antibakterieller Substanzen insbesondere die Effluxpumpe AcrAB-TolC relevant (Munita und Arias 2016). Neben den MDR-Effluxpumpen gibt es auch Fluorchinolon-spezifische Effluxpumpen, zu welchen die plasmidcodierten Effluxpumpen OqxAB und QepA gehören (Rodríguez-Martínez *et al.* 2016), (vgl. Kap. 1.2.3.2).

1.2.1.2.1 Die Effluxpumpe AcrAB-TolC

Die Effluxpumpe AcrAB-TolC gehört zu der Familie der RND (*resistance nodulation division*) Effluxpumpen, die diverse antibakteriell wirksame Substanzen aus der Zelle herauspumpen, darunter Tetracycline, Chloramphenicol, einige β -Lactame, Fusidinsäure und Fluorchinolone (Munita und Arias 2016). Aufgebaut ist die AcrAB-TolC Effluxpumpe aus drei Kompartimenten, erstens einem Transporterprotein in der inneren Membran (AcrB), zweitens einem verbindenden Protein im periplasmatischen Raum (AcrA), und einem Tunnelprotein in der äußeren Membran (TolC) (Du *et al.* 2014). Die Gene für AcrAB liegen in dem Operon *acrRAB*, in dem *acrR* für den Transkriptionsregulator AcrR codiert. AcrR fungiert als Repressor der Expression von *acrA* und *acrB* sowie für sich selbst (Autorepressor) (Ma *et al.* 1996). Die Expression von AcrAB-TolC wird über mehrere Transkriptionsfaktoren kontrolliert, aktivierend durch MarA, SoxS und Rob, und reprimierend über den AcrR Repressor (Harmon und Ruiz 2022). Von diesen ist AcrR der wichtigste, da er *acrAB* direkt reguliert, sowie auch das *marRAB*-Operon und *soxRS*, also Gene die unter anderem wiederum für MarA and SoxS codieren, die wiederum Transkriptionsregulatoren von *acrAB* und *tolC* sind (Harmon und Ruiz 2022).

AcrAB kann über eine Regulationskaskade überexprimiert werden, in der besonders die Gene *marA* und *marR* des *marRAB*-Operons eine Rolle spielen (vgl. Kap. 1.2.1.1). Die Überexpression von Effluxpumpen und in *E. coli* insbesondere die von AcrAB-TolC führt über gesteigerten Efflux zu Resistenz (Pidcock 2006). Sie bewirkt eine höheren Toleranz gegenüber diversen antibakteriell wirksamen Stoffen, wie den Tetracyclinen, Chloramphenicol, Ampicillin und Nalidixinsäure (Okusu *et al.* 1996). Der daraus resultierende Effekt wird auch als *multiple antibiotic resistance* (*mar*)-Phänotyp bezeichnet (vgl. Kap. 1.2.1.1).

1.2.1.3 Das *marRAB*-Operon

Das *multiple-antibiotic resistance* (*mar*) Operon *marRAB* besteht aus den Genen *marR*, *marA* und *marB*, ist in Enterobakterien chromosomal codiert und in der Lage Resistenz gegen mehrere antibakterielle Wirkstoffe zu vermitteln (Sharma *et al.* 2017). Es codiert für zwei Transkriptionsfaktoren, MarR (Repressor) und MarA (Aktivator), die sowohl ihr eigenes Operon autoreprimieren (MarR) und autoaktivieren (MarA) (Martin *et al.* 1996), als auch diverse andere Gene regulieren (*mar*-Regulon) (Alekhun und Levy 1997). Dabei vermitteln MarA und MarR Multiresistenz, vor allem indem sie die Regulation von Effluxsystemen und Porinen modulieren (Sharma *et al.* 2017). So entsteht z. B. Fluorchinolonresistenz in Mar-Mutanten durch eine Kombination von vermindertem Influx (OmpF Reduktion) und gesteigertem Efflux (Alekhun und Levy 1997; Cohen *et al.* 1989).

Der sogenannte Mar-Phänotyp ist mit der Überexpression der *acrAB* Gene verbunden, die für Proteine der AcrAB Effluxpumpe codieren, welche eine entscheidende Rolle für die Antibiotikaresistenz spielt (Okusu *et al.* 1996), (vgl. auch Kap. 1.2.1.2.1). Zu MarA gibt es zwei weitere homologe Transkriptionsregulatoren, SoxS und Rob, die zusammen mit MarA in *E. coli* die Expression von mehr als 80 Genen kontrollieren (Prajapat *et al.* 2015).

1.2.2 Fluorchinolone

Bei den Fluorchinolonen (FQ) handelt es sich um eine bakterizid wirkende Antibiotikaklasse, die seit 1986 zur Therapie eingesetzt wird (Paton und Reeves 1988; Fàbrega *et al.* 2009). Der Vorläufer und erste Vertreter dieser Gyrasehemmer, wie die Chinolone auch genannt werden, war 1962 Nalidixinsäure (Leshner *et al.* 1962). Die Fluorchinolone wurden im Labor entwickelt, vollkommen synthetisch hergestellt und basieren auf einer Weiterentwicklung der Chinolone, bei der die Grundstruktur um ein Fluoratom erweitert wurde (vgl. Abbildung 1-4), was zu einem breiteren Wirkspektrum führte (Fàbrega *et al.* 2009). Der erste Vertreter dieser Klasse war Norfloxacin (1978), daneben sind heute vor allem Ciprofloxacin, Ofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin von klinischer Bedeutung (Correia *et al.* 2017).

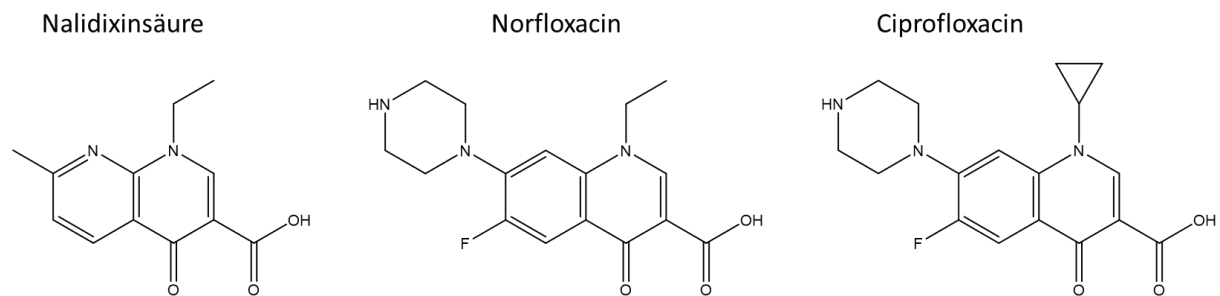


Abbildung 1-4: Strukturformeln von Nalidixinsäure, Norfloxacin und Ciprofloxacin (nach: Ph. Eur. 2019).

1.2.2.1 Wirkmechanismus der Fluorchinolone

Der Wirkmechanismus der Fluorchinolone beruht auf der Hemmung der bakteriellen Topoisomerasen durch ihre Bindung an erstens die DNA Gyrase (Topoisomerase II) und zweitens an die Topoisomerase IV (Hooper 2000). Die Funktion der Gyrase besteht darin negative Überspiralisierung in die DNA einzuführen und diese so zu komprimieren (Gellert *et al.* 1976). Dazu muss die DNA verdrillt werden, was die Gyrase unter Energieverbrauch (in Form von ATP) durchführt, indem sie den DNA-Doppelstrang öffnet, einen Strang durch den anderen durchführt und wieder schließt (Liu *et al.* 1980; Nöllmann *et al.* 2007). Im Zustand des geöffneten DNA-Strangs binden die Fluorchinolone an den DNA-Gyrase-Komplex und stabilisieren dadurch den Doppelstrangbruch, was die Wiederverschließung des DNA-Strangs und das Fortschreiten der Replikationsgabel verhindert (Wentzell und Maxwell 2000; Hooper 2001). Dadurch läuft die DNA-Replikation und auch die Transkription nicht mehr richtig ab (Willmott *et al.* 1994). Zudem induziert der bestehende Doppelstrangbruch der DNA zusätzlich die SOS-Antwort der Zelle (Drlica *et al.* 2008). Die Effekte, die durch den FQ-DNA-Gyrase-Komplex hervorgerufen werden, führen in der Folge zum Zelltod (Correia *et al.* 2017). In analoger Weise wirken die FQ auch auf die strukturell homologen Bereiche der Topoisomerase IV (Khodursky *et al.* 1995; Blondeau 2004).

1.2.3 Mechanismen der Fluorchinolone-resistenz

Zu den entscheidenden Faktoren für Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen (FQ) zählen Targetmutationen, die Steigerung der Effluxpumpenaktivität, Veränderungen in den Membranproteinen, FQ-abbauende Enzyme und DNA-Schutzproteine (Aldred *et al.* 2014).

1.2.3.1 Targetmutationen in den Topoisomerasen

In erster Linie spielen Mutationen in den Genen der Topoisomerasen, welche die Zielstrukturen (Targets) der Fluorchinolone sind, eine bedeutende Rolle. Der Bereich, in dem die Mutationen liegen, wird als *quinolone resistance-determining region* (QRDR) bezeichnet (Yoshida *et al.* 1990). Durch eine Mutation im Gen *gyrA*, welches für die Untereinheit A der DNA-Gyrase codiert, kommt es zu einer Veränderung von GyrA, zumeist zuerst an der Aminosäure (AS)-Position S83 (Wiedemann und Heisig 1994). Durch eine zweite Mutation in *gyrA* kommt es zu einer weiteren Veränderung an der AS-Position D87 in GyrA (Wiedemann und Heisig 1994). Diese beiden Positionen stellen Schlüsselpositionen für die Bindung des FQ an die Gyrase dar und sind in *E. coli* die meistveränderten Positionen in Bezug auf FQ-Resistenz (Hooper und Jacoby 2016). Dazu gibt es analoge Mutationen im Gen *parC*, welches für die Untereinheit A der Topoisomerase IV codiert, die zu Veränderungen der AS-Positionen S80 und E84 in ParC führen, welche entsprechend an diesem Target die kritischen Positionen der FQ-Bindung darstellen (Hiasa 2002). Sie führen aufgrund einer geringeren Affinität der FQ zum DNA-Enzym-Komplex zu verminderter Empfindlichkeit, wobei klinisch relevante Resistenz erst durch eine Akkumulation der Mutationen entsteht (Hooper und Jacoby 2016). Bei *E. coli* bewirkt eine Doppelmutation in *gyrA* erst in Kombination mit einer weiteren Mutation in *parC* oder mit anderen Mutationen (z. B. in *marR*), welche die Menge an FQ in der Zelle verringern, eine klinisch relevante Resistenz (Wiedemann und Heisig 1994; Bagel *et al.* 1999).

1.2.3.2 Plasmid-vermittelte Chinolonresistenz

Zu der sogenannten *plasmid-mediated quinolone resistance* (PMQR) gehören die *Quinolone resistance* (Qnr)-Proteine, die AAC(6′)-Ib-cr Enzyme und die FQ-spezifischen Effluxpumpen OqxAB und QepA (vgl. Kap. 1.2.1.2) (Rodríguez-Martínez *et al.* 2016).

1.2.3.2.1 AAC(6′)-Ib-cr Enzyme

Enzyme die in der Lage sind Fluorchinolone abzubauen, sind die Aminoglykosid-Acetyl (AAC)-Transferasen (Rodríguez-Martínez *et al.* 2016). Diese waren ursprünglich nur in der Lage Aminoglykoside umzusetzen. Allerdings erweiterte sich das Substratspektrum von der

Wildtypvariante *aac(6′)-Ib*, die nur Resistenz gegen Aminoglykoside wie Kanamycin and Amikacin besaß, durch zwei Mutationen (Trp102Arg and Asp179Tyr), zu der Variante *aac(6′)-Ib-cr* (Robicsek *et al.* 2006). Das resultierende AAC(6′)-Ib-cr Enzym kann die FQs Ciprofloxacin und Norfloxacin durch Acetylierung am N4 des Piperazinrings (vgl. Kap. 1.2.1.1) umsetzen und vermindert so deren Wirkung (Rodríguez-Martínez *et al.* 2016). AAC(6′)-Ib-cr trat plasmidcodiert auf und begründete zusammen mit den Qnrs den Begriff der *plasmid-mediated quinolone resistance* (PMQR) (Robicsek *et al.* 2006), zu denen mittlerweile auch die FQ-spezifischen Effluxpumpen OqxAB und QepA gehören (Rodríguez-Martínez *et al.* 2016).

1.2.3.2.2 Qnr-Proteine (Gyrase-Schutzproteine)

Eine speziellere Art der Resistenzvermittlung findet sich für die Fluorchinolone anhand von *Quinolone resistance* (Qnr) Proteinen. Diese sind sogenannte Pentapeptid-*repeat* Proteine, deren räumliche Struktur aufgrund der *tandem-repeat* Sequenzen entsteht (Vetting *et al.* 2006). Durch die charakteristische Faltung, ähneln solche Enzyme in ihrer Form der DNA (DNA-Mimiking) und vermitteln Resistenz gegen Ciprofloxacin (Hegde *et al.* 2005). Qnr-Proteine interagieren mit der Gyrase und der Topoisomerase IV (Tran *et al.* 2005), und schützen sie vor dem Einfluss der FQ (Rodríguez-Martínez *et al.* 2016) und in der Folge die DNA vor Strangbruch (vgl. Kap. 1.2.1.1). Von Qnr sind verschiedene Varianten bekannt, darunter QnrA, QnrB, QnrS und QnrD (Rodríguez-Martínez *et al.* 2016).

1.2.4 β -Lactam-Antibiotika

Die β -Lactame sind eine Antibiotikaklasse mit bakterizider Wirkung und einem sehr breiten Wirkspektrum, sowohl gegen grampositive sowie gegen gramnegative Bakterien. Sie werden zur Behandlung von Infektionen wie Atemwegsinfektionen, Haut- und Weichteilinfektionen, Harnwegsinfekten sowie systemischen und schweren Infektionen bis zur Sepsis eingesetzt.

1.2.4.1 Penicilline und Aminopenicilline

Die β -Lactam-Antibiotika gehen zurück auf die Entdeckung und Beschreibung des Penicillins aus *Penicillium* durch Alexander Fleming 1928 (Fleming 1929) und dessen erste Anwendung

durch Florey und Chain am Menschen 1941 (Penicillin: the Oxford story | University of Oxford 2023). Ausgehend von Penicillin G wurden sie weiterentwickelt, sodass sie oral verfügbar wurden (Penicillin V) und ein breiteres Wirkspektrum erreichten. Indem Seitenketten und Substituenten verändert wurden, entstanden die Aminopenicilline (Ampicillin, Amoxicillin) und Ureidopenicilline (Piperacillin), die in Abbildung 1-5 dargestellt sind.

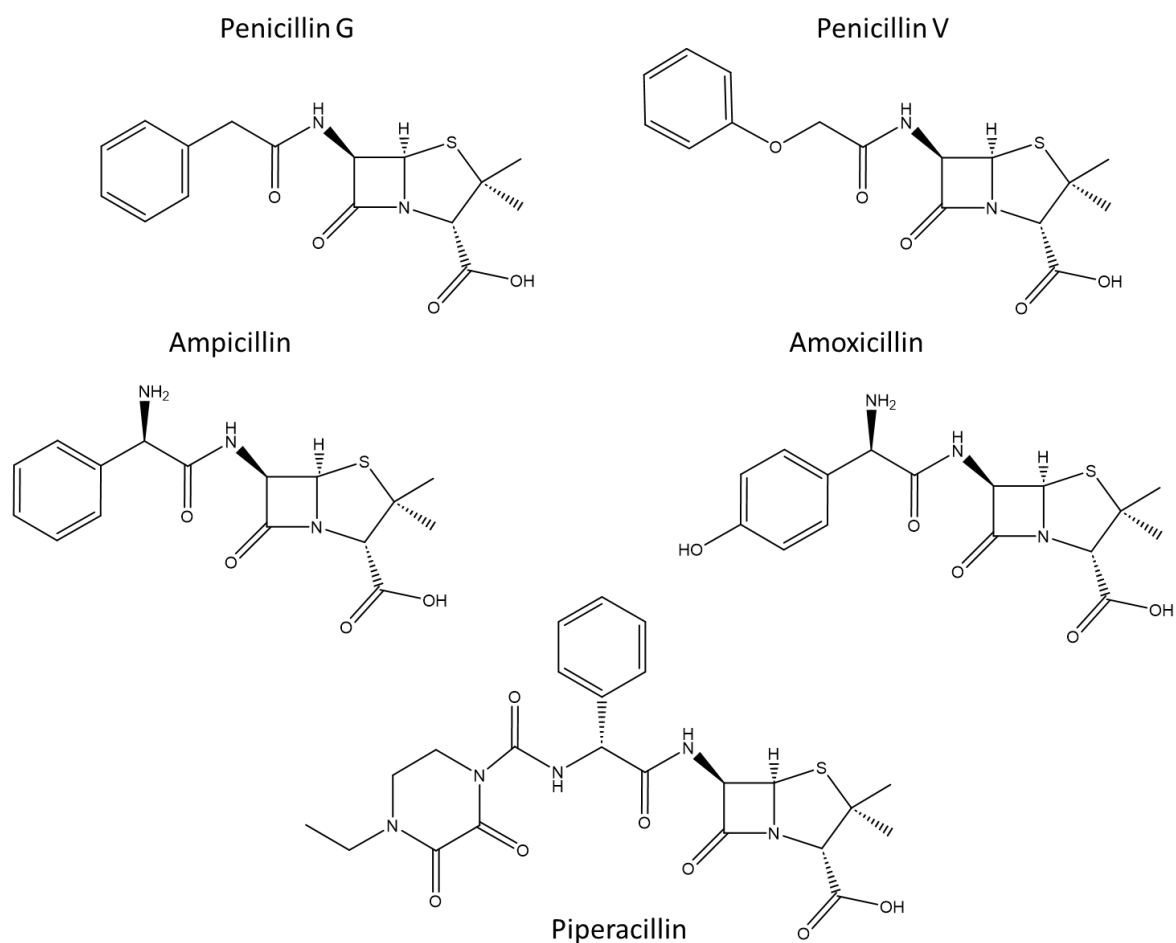


Abbildung 1-5: Strukturformeln von Penicillin G und Penicillin V, Ampicillin, Amoxicillin und Piperacillin (nach: Bush und Bradford 2016; Ph. Eur. 2019).

1.2.4.2 Cephalosporine

Mit der Entdeckung von Cephalosporin N aus *Cephalosporium* kam 1953 eine weitere Wirkstoffklasse mit einem veränderten Ring-System hinzu, deren Wirkung der der Penicilline entsprach, jedoch umfangreicher war (Abraham *et al.* 1953). Diese wurden dann ebenfalls weiterentwickelt zu den verschiedenen Cephalosporinen (Cefalexin, Cefuroxim, Cefotaxim,

Ceftazidim, Cefepim, Ceftolozan, etc.) mit erweiterten Spektren, besserer Bioverfügbarkeit, stärkerer Wirksamkeit und höherer β -Lactamase-Stabilität. Sie werden nach ihrem Wirkspektrum in Generationen eingeteilt. Cefalexin stammt aus der 1. Generation, Cefuroxim aus der 2. Generation, Cefotaxim und Ceftazidim aus der 3. Generation der Cephalosporine (3.GC), Cefepim aus der 4. Generation und Ceftolozan gehört zur Neusten (Bush und Bradford 2016). Einige neuere Cephalosporine sind in Abbildung 1-6 dargestellt.

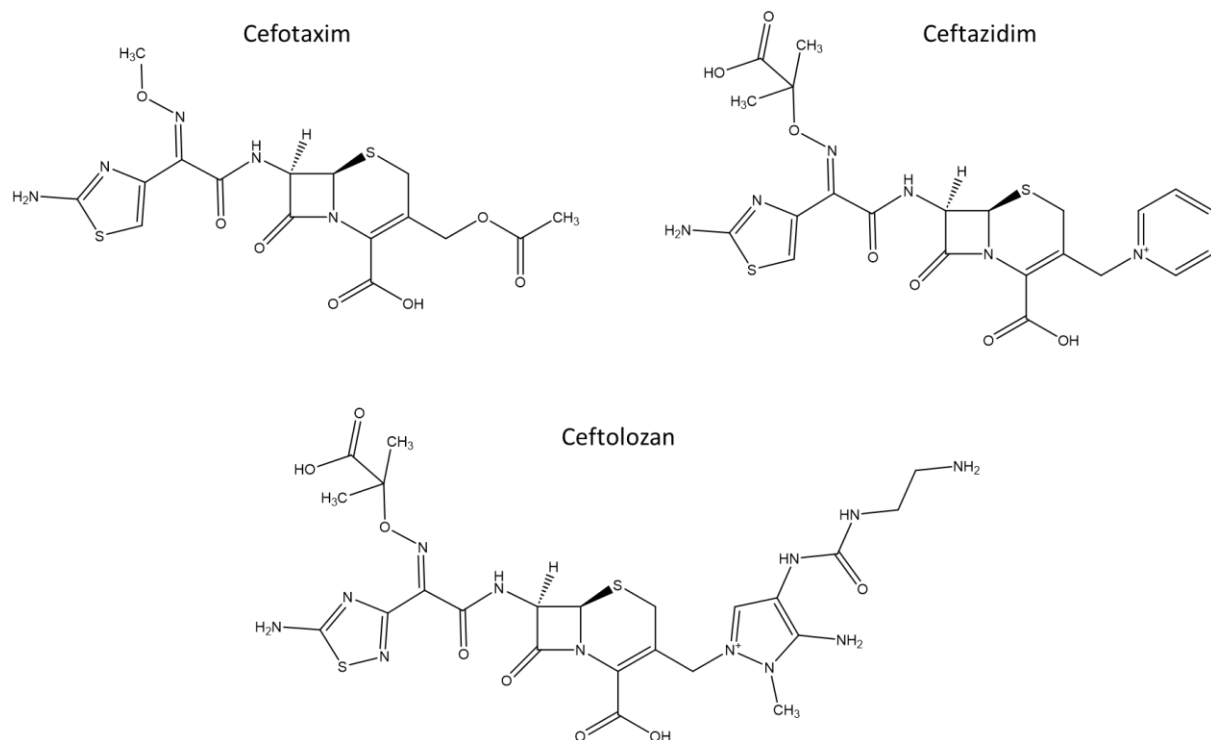


Abbildung 1-6: Strukturformeln der Cephalosporine Cefotaxim, Ceftazidim und Ceftolozan (nach: Bush und Bradford 2016).

1.2.4.3 Carbapeneme

1976 wurde mit Thienamycin aus *Streptomyces cattleya* das erste natürliche Carbapenem entdeckt, welches eine sehr gute Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative Bakterien zeigte (Kahan *et al.* 1979). Auf dessen Struktur basierend wurden dann die Carbapeneme wie Imipenem und Meropenem (vgl. Abbildung 1-7) und Ertapenem entwickelt, die bis heute eine der wirksamsten antibiotischen Therapieoptionen darstellen. Carbapeneme sind aufgrund ihres breiten Wirkspektrums und ihrer ESBL-Stabilität die wirksamsten Substanzen unter den β -Lactamen und stellen für viele Infektionen, vor allem mit 3MRGN

Erregern (vgl. Kap. 1.1.4), eine der letzten Therapieoptionen dar. Sie zählen zu den Reserveantibiotika und sind dem klinischen Einsatz vorbehalten.

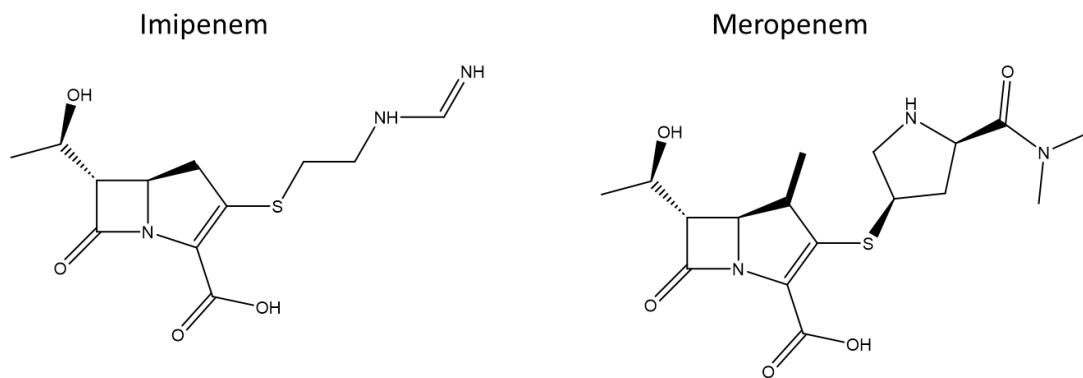


Abbildung 1-7: Strukturformeln von Imipenem und Meropenem (nach: Bush und Bradford 2016).

1.2.4.4 Wirkmechanismus der β -Lactam-Antibiotika

Der Wirkmechanismus der β -Lactam-Antibiotika beruht auf der Hemmung der bakteriellen Transpeptidasen (Frère *et al.* 1992). Diese Enzyme verknüpfen bei Bakterien im Prozess der Mureinsynthese die Polyglykanstränge (Glykanketten aus Oligopeptiden und N-Acetyl-Glucosamin sowie N-Acetyl-Muraminsäure) (Wise und Park 1965) und sorgen so für die stabilisierende Quervernetzung der Bakterienzellwand (Mutschler *et al.* 2020). Genauer verknüpfen die Transpeptidasen zwei Stränge unter Abspaltung des D-Alanins des endständigen D-Alanyl-D-Alanin Dipeptids miteinander (Frère *et al.* 1992). Die Struktur von Penicillin ähnelt sterisch der von D-Alanyl-D-Alanin (Tipper und Strominger 1965) und die Transpeptidasen (Serinproteasen) binden das Penicillin über Acylierung als Substrat (Oliva *et al.* 2003). Aufgrund dieser Eigenschaft werden die Enzyme auch als Penicillin-bindende Proteine (PBP) bezeichnet, wobei die Bindung über einen Acyl-Enzym-Komplex an das Serin im aktiven Zentrum erfolgt und das Enzym inhibiert wird (Oliva *et al.* 2003). β -Lactam-Antibiotika wirken, resultierend aus ihrer Bindung an die PBPs, die in die Quervernetzung von Zellwand (bei grampositiven Bakterien) und Zellmembran (bei gramnegativen Bakterien) involviert sind, indem sie die Zellwandformation unterbrechen (Bush und Bradford 2016). Sie induzieren die Lyse der Bakterienzelle (Wong *et al.* 2021) und wirken zeitabhängig bakterizid (Eagle *et al.* 1953).

1.2.5 Mechanismen der β -Lactam-Resistenz

Die Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika wird hauptsächlich über zwei klinisch relevante Mechanismen hervorgerufen. Zum einen spielen insbesondere bei grampositiven Bakterien Veränderungen der Zielstrukturen, den Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs), eine Rolle. Zum anderen gibt es β -Lactam-Antibiotika abbauende Enzyme (β -Lactamasen), die den Lactam-Ring der Substanzen so spalten, dass sie ihre Wirksamkeit verlieren. Auf der Aktivität der β -Lactamasen beruht die β -Lactam-Resistenz bei gramnegativen Bakterien hauptsächlich (Drawz und Bonomo 2010). Zwei weitere relevante Resistenzmechanismen, die auch für die β -Lactame von Bedeutung sind, sind zum einen die verringerte Expression von OMPs (vgl. Kap. 1.2.1.1) und zum anderen eine erhöhte Effluxpumpenaktivität (vgl. Kap. 1.2.1.2) (Drawz und Bonomo 2010).

1.2.5.1 β -Lactamasen

β -Lactamasen sind Enzyme, die β -Lactam-Antibiotika spalten, wodurch diese ihre Wirkung verlieren. Die meisten β -Lactamasen sind Serinproteasen und ihr Wirkmechanismus beruht auf der hydrolytischen Spaltung des β -Lactamrings nach Acylierung (Fisher und Mobashery 2009). Durch die Ringöffnung verlieren die β -Lactame ihre Struktur und Wirkung, wobei das Enzym seine Funktion nach der Abspaltung beibehält (Drawz und Bonomo 2010). Die verschiedenen β -Lactamasen lassen sich grundsätzlich nach ihrem Substratspektrum unterscheiden und demnach in einfache β -Lactamasen, solche mit erweitertem Spektrum (ESBLs) und die Carbapenemasen einteilen.

Die ersten beschriebenen β -Lactamasen waren Enzyme vom Typ TEM (nach Temoneira, dem ersten Patienten aus dem es isoliert wurde), die β -Lactam-Antibiotika bis zum Spektrum der Aminopenicilline (Ampicillin, Amoxicillin) umsetzen und SHV (*Sulfhydryl variable*) Enzyme, deren Spektrum je nach Variante bis zu den Cephalosporine der dritten Generation (3.GC-R) reicht (Castanheira *et al.* 2021). Von den einzelnen Enzymen sind diverse verschiedene Varianten bekannt, für TEM sind es über 200, die sich in ihrer Sequenz unterscheiden und teils andere Eigenschaften und Substratspektren aufweisen (Bush 2018), (vgl. Tabelle 1-1).

1.2.5.2 Extended-Spektrum β Lactamasen (ESBLs)

Extended-Spektrum β -Lactamasen (ESBL) setzen ein breiteres Spektrum der β -Lactam-Antibiotika um, darunter auch die Cephalosporine. Zu den ESBLs gehören einige Varianten von TEM und SHV (vgl. Tabelle 1-1), sowie klassischerweise die CTX-M Enzyme. Diese können Cefotaxim hydrolysieren und wurden erstmalig 1990 in München entdeckt (Bauernfeind *et al.* 1990) und demnach als Cefotaximase-München (CTX-M) bezeichnet. Von ihnen sind mittlerweile mehr als 250 verschiedene Varianten bekannt, die fortlaufend mit CTX-M-1, CTX-M-2, etc. nummeriert sind (Naas *et al.* 2017). Die verschiedenen CTX-M Enzyme haben unterschiedlich starke Wirksamkeiten gegen die einzelnen Substanzen. Sie erzeugen insbesondere Resistenz gegen die Drittgenerations-Cephalosporine (3.GC-R), variieren aber in ihrem Spektrum. So vermittelt CTX-M-1 Resistenz gegen Cefotaxim, nicht aber gegen Ceftazidim, CTX-M-15 dagegen gegen beide Substanzen. Die CTX-M Enzyme werden in fünf Hauptgruppen (mit Beispielen) eingeteilt: Gruppe 1 (CTX-M-1/-3/-15), Gruppe 2 (CTX-M-2/-4/-20), Gruppe 8 (CTX-M-8), Gruppe 9 (CTX-M-9/-16/-27) und Gruppe 25 (CTX-M-25/-26) (Bonnet 2004). Carbapeneme sind jedoch stabil gegen die CTX-M Enzyme (Bonnet 2004).

1.2.5.3 Carbapenemasen

Carbapenemasen spalten diverse β -Lactam-Antibiotika bis hin zu den Carbapenemen. Bekannte Vertreter sind die *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasen (KPC), Verona-Integron-Metallo- β -Lactamasen (VIM), Neu-Delhi-Metallo- β -Lactamasen (NDM) und einige Oxacillinasen (OXA), die sich in Serinproteasen, wie KPC und Metallo- β -Lactamasen, wie VIM und NDM unterteilen (Bush und Jacoby 2010). Letztere tragen ein zweiwertiges Kation im aktiven Zentrum und setzen nahezu alle β -Lactam-Antibiotika um (Mojica *et al.* 2016). Daneben gibt es noch die OXA-48-like Enzyme (Klasse D). (Ambler 1980; Castanheira *et al.* 2021).

1.2.5.4 Übersicht der β -Lactamasen

Eine exemplarische Übersicht der β -Lactamasen und ihrer Substratspektren zeigt Tabelle 1-1.

Tabelle 1-1: Exemplarische Übersicht der β -Lactamasen, ihrer Klassifikation nach Bush-Jacoby und Ambler (Ambler 1980; Bush et al. 1995; Bush und Jacoby 2010; Bush und Bradford 2016; Bush 2018), (verändert nach: Santajit und Indrawattana 2016).

Klassifikation		Antimikrobielles Wirkungsspektrum	Enzyme
Bush-Jacoby	Ambler	β -Lactame	β -Lactamasen
1	C	Einfache und Extended-spektrum Cephalosporine, inkl. Cephamyline	ACT-1, FOX-1, MIR-1, CMY
2a	A	Penicilline	PC1
2b	A	Penicilline, Cephalothin	TEM-1, TEM-2, TEM-13, SHV-1, SHV-11
2be	A	Penicilline, Oxyimino-Cephalosporine (Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefepim), Monobactame	TEM-3, TEM-10, TEM-26, SHV-2, SHV-3, CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-15, etc.)
2br	A	Penicilline, Inhibitor-resistent (Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam)	TEM-30, TEM-31, SHV-10, SHV-72
2ber	A	Penicilline, Oxyimino-Cephalosporine, Monobactame, Inhibitor-resistent (Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam)	TEM-50, TEM-158
2c	A	Penicilline, Carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicillin, Cefepim	RTG-4
2d	D	Cloxacillin, Oxacillin	OXA-1, OXA-2, OXA-10
2de	D	Cloxacillin, Oxacillin, Oxyimino-Cephalosporine, Monobactame	OXA-11, OXA-15
2df	D	Cloxacillin, Oxacillin, Carbapeneme	OXA-23, OXA-51, OXA-48
2e	A	Cephalosporine	CepA
2f	A	Alle β -Lactame, inkl. Carbapeneme	KPC, SME, GES, IMI-1
3	B	Alle β -Lactame, inkl. Carbapeneme, außer Monobactame	IMP, VIM, IND, NDM

Die Klassifizierung nach Ambler folgt der molekularen Struktur und Funktionsart (Ambler 1980). Dieser nach gibt es die Klasse A der Serinproteasen, die Klasse B der Metallo- β -Lactamasen, die Klasse C der AmpC-Enzyme und die Klasse D der OXA-Enzyme (Tooke *et al.* 2019; Naas *et al.* 2017). Eine die Funktionsart und das Substratspektrum stärker berücksichtigende Einteilung ist die nach Bush-Jacoby in Gruppen, die auch kontinuierlich um die hinzukommenden β -Lactamasen erweitert wird (Bush *et al.* 1995; Bush 2018; Bush und Bradford 2016; Bush und Jacoby 2010; Drawz und Bonomo 2010; Fisher und Mobashery 2009).

1.2.5.5 β -Lactamase-Inhibitoren

β -Lactamase-Inhibitoren sind Substanzen, die β -Lactamasen inhibieren, dadurch die β -Lactam-Wirkstoffe vor dem Abbau schützen und so deren Wirkung erhalten (Drawz und Bonomo 2010). Sie werden immer in Kombination mit einem β -Lactam eingesetzt, da sie alleine kaum wirksam sind (Bush und Bradford 2016). Ihr Wirkmechanismus liegt in der irreversiblen Bindung an die β -Lactamase, für welche die β -Lactamase-Inhibitoren ebenso ein Substrat sind wie die β -Lactame. Dabei acyliert der Inhibitor initial das Serin im aktiven Zentrum der β -Lactamase und wird hydrolysiert (Suizid-Inhibitor) wonach das Enzym komplett inaktiviert wird (Bush und Bradford 2016). Die bekanntesten Vertreter sind Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam und Avibactam. Sie sind in Abbildung 1-8 dargestellt.

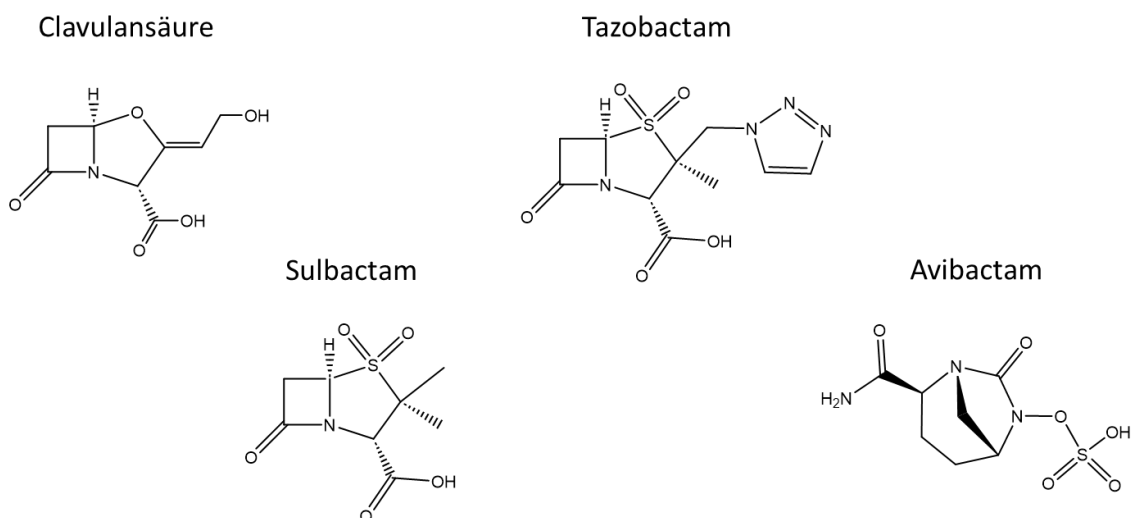


Abbildung 1-8: Strukturformeln der β -Lactamase-Inhibitoren (nach: Bush und Bradford 2016).

1.3 Interbakterielle Verbreitung von Resistenz

Bakterien können genetisches Material nicht nur über vertikalen Transfer zwischen Mutter- und Tochterzelle übertragen und aufnehmen, sondern auch über horizontalen Gentransfer (HGT) über drei verschiedene Mechanismen: Transformation mit isolierter DNA, Transduktion mittels Bakteriophagen und Konjugation von Plasmiden mittels Fertilitäts-Pili (Thomas und Nielsen 2005; Curtiss 1969). Darunter spielt insbesondere die Konjugation eine bedeutende Rolle für die Verbreitung von Resistenzgenen auf Plasmiden (Munita und Arias 2016), den sogenannten Resistenzplasmiden bzw. Resistenzfaktoren (R-Plasmiden bzw. R-Faktoren).

1.3.1 Plasmide

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die einen Teil der Erbinformation einer Bakterienzelle tragen. Im Vergleich zum *E. coli* Chromosom, welches ca. 4,5-5,5 Mbp groß ist (Rode *et al.* 1999), sind sie mit einem bis zu mehreren 100 kbp (ca. 1-10 % des Chromosoms) deutlich kleiner und können mit einer oder mehreren Kopien in der Zelle vorhanden sein (Clark *et al.* 2019). Plasmide sind insbesondere dafür bekannt, dass sie oft Resistenzgene tragen. Solche R-Plasmide oder Resistenzfaktoren vermitteln den Bakterien spezifische Resistenz und sind daher in Gegenwart der entsprechenden antibakteriellen Wirkstoffe von enormem Vorteil. Weiterhin sind Plasmide dafür bekannt, dass sie zwischen Bakterienzellen übertragen werden können. Plasmide in *E. coli*, die sich selbst übertragen können, sind sogenannte Fertilitäts- oder F-Plasmide, die durch Konjugation von einer F⁺ auf eine F⁻ Zelle weitergegeben werden (Fernandez-Lopez *et al.* 2016). Die für die Übertragbarkeit von Plasmiden nötigen Transfer (*tra*) Gene sind diejenigen, deren Produkte für den Prozess wichtig sind, darunter z. B. auch jene für die Synthese von Pili; sie liegen meist zusammen in einem Operon (Grieß 2018). Die Mobilitäts (*mob*)-Gene sind enger gefasst und bezeichnen die für die Übertragung der Plasmid-DNA relevanten Gene (Grieß 2018). Plasmide können entweder selbstübertragend (F⁺) oder mobilisierbar (*mob*⁺) oder nicht übertragbar sein (Thomas und Nielsen 2005). Die MOB-Region eines Plasmids beinhaltet u. a. die *mob*-Gene: Origin of Transfer (*oriT*) und der Relaxase (*tra*). Diese Region klassifiziert das konjugative System, welches in Familien eingeteilt wird. Eine davon ist MOB_F, die wiederum weitere Unterarten besitzt, wie MOB_{F12} (Smillie *et*

al. 2010). Plasmide werden auch nach ihrem Replikon-Typ bzw. ihren Inkompatibilitätsfaktoren (Inc) kategorisiert und benannt, wie IncF, IncP, IncH, etc. (Couturier *et al.* 1988). Die jeweiligen Inc-Faktoren werden dann in weitere Gruppen unterteilt, wie IncFI und IncFII, sowie die Untergruppen IncFIA und IncFIB, etc., nach denen sie auch typisiert werden (Couturier *et al.* 1988; Carattoli *et al.* 2005). Die Kombination aus Inc-Faktor und MOB-Region wird zur charakterisierenden Beschreibung von Plasmiden verwendet, wie z. B. für die IncF/MOB_{F12}-Plasmide, welche oft in *E. coli* ST131 Stämmen vorkommen (vgl. Kap. 1.4.8).

1.3.2 Konjugation von Resistenzplasmiden

Der Plasmidtransfer zwischen zwei Bakterienzellen erfolgt durch Konjugation von einem Plasmid tragenden Stamm, dem Donor, auf einen das Plasmid empfangenden Stamm, den Rezipienten. Bei diesem Mechanismus vermittelt der vom Donor ausgebildete F-Pilus einen physischen Kontakt zu einer empfangenden Zelle und ermöglicht dadurch den DNA-Transfer (Hu *et al.* 2019). Dabei wird genetisches Material, meist F-Plasmide, die u. a. für die Strukturproteine des F-Pilus codieren, von einer Zelle auf eine andere übertragen. Die erste Beschreibung eines F-Plasmids stammt aus dem Jahr 1946 (Lederberg und Tatum 1946).

Bei der Konjugation werden häufig Antibiotikaresistenzigenschaften übertragen, die den Bakterien einen evolutionären Vorteil für das Überleben in Gegenwart von Antibiotika bringen. Resistenz (R)-Plasmide tragen einzelne oder mehrere erworbene und auf einem Plasmid gesammelten Resistenzgene, die sie zusammen weitergeben (Mazel 2006). Solche Multiresistenz vermittelnden MDR-Plasmide sind für die Zelle allerdings oft mit einem Fitness-Verlust verbunden (San Millan und MacLean 2017). Bei erneutem Kontakt mit entsprechenden Stoffen, bietet das Plasmid aber den entscheidenden Überlebensvorteil und durch Kontakt mit einem Antibiotikum wird im Grunde immer gleich die Multiresistenz selektiert, wenn die einzelnen Resistenzgene auf demselben Plasmid liegen (Partridge *et al.* 2018). Aber auch unter nicht selektiven Bedingungen, tritt Stabilität der Plasmide in Bakterienzellen auf, die die Resistenz erhält (Wein *et al.* 2019). Die Ruhigstellung der Transkription der Resistenzgene resultiert in stabilen Plasmiden und Plasmidverlust ist eher durch Transkriptions-Replikations-Konflikte bedingt (Wein *et al.* 2019).

1.4 *E. coli* ST131

1.4.1 Auftreten und Verbreitung von *E. coli* ST131

1.4.1.1 Der steile Anstieg von ESBLs in *E. coli*

Während die β -Lactamasen vom TEM- und SHV-Typ bereits seit den 1980er Jahren bei den Enterobakterien, vor allem bei *Klebsiella subspecies*, vorkamen, traten seit den späten 1990ern und 2000ern vermehrt neue ESBL-Enzyme vom CTX-M Typ bei *E. coli* auf (Pitout *et al.* 2005). Die Stämme, die diese CTX-M Enzyme produzierten, verursachten vor allem HWIs und wiesen neben der 3.GC-Resistenz oft weitere Resistenzen, insbesondere gegen FQ, auf (Pitout *et al.* 2005). Aufgrund der starken globalen Verbreitung der CTX-M Enzyme wurde dieses Phänomen auch als „CTX-M β -Lactamase Pandemie“ bezeichnet (Cantón und Coque 2006). Ab circa 2006 wurden ESBL produzierende *E. coli* Stämme auch als Ursache von Bakteriämien beschrieben und zunehmend ein Anliegen für die öffentliche Gesundheit; besonders gravierend waren dabei die Co-Resistenzen gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Tetracyclin, Gentamicin und Ciprofloxacin (Pitout und Laupland 2008).

1.4.1.2 Erste Beschreibungen von *E. coli* ST131

Aufgrund des in den Jahren ab 2000 steigenden Auftretens von ESBLs bei *E. coli*, und speziell von CTX-M-15 Enzymen, untersuchten Nicolas-Chanoine *et al.* eine internationale Auswahl ebensolcher Stämme auf ihre klonale Verwandtschaft. Sie fanden dabei heraus, dass diese zu einem sehr hohen Anteil (88 %) die gleichen Charakteristika aufwiesen, welche die Zugehörigkeit zur Phylogruppe B2, der Serotyp O25:H4, die Ciprofloxacinresistenz und das *Multilocus Sequence Typing* (MLST) Profil (vgl. Kap. 1.5.2.1) des *E. coli Sequence Type* 131 (ST131) waren (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008). Weiterhin zeigten sich für diese Stämme ein hoher Verwandtschaftsgrad, die Zugehörigkeit zu einer klonalen Gruppe und bei mehr als 90 % die gleichen Virulenzfaktoren, weshalb die Autoren diesen Typ als virulenten CTX-M-15 positiven O25:H4-ST131 *E. coli* Klon bezeichneten (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008). Auch Coque *et al.* fanden bei Untersuchungen von CTX-M-15 produzierenden *E. coli* Stämmen aus sechs Ländern, die zwischen 2000 und 2006 gesammelt wurden, solche vom *Sequence Type* 131.

Diese brachten sie außerdem mit IncFII-Plasmiden, die *bla*_{CTX-M-15} und weitere Resistenzgene trugen, in Verbindung (vgl. Kap. 1.4.8). Aus ihren Untersuchungen folgerten sie, dass die weltweite Ausbreitung von *bla*_{CTX-M-15} hauptsächlich von zwei epidemischen *E. coli* Stämmen beeinflusst wurde, einer davon war *E. coli* ST131 (Coque *et al.* 2008).

Clermont *et al.* charakterisierten den sich in Europa und Afrika ausbreitenden CTX-M-15 produzierenden *E. coli* Klon phylogenetisch als Untergruppe von B2 mit spezifischem molekularem O25b-Subtyp und identisch zu dem pandemischen CTX-M-15 tragenden *E. coli* O25:H4-ST131 Klon (Clermont *et al.* 2008). Auch in England wurde *E. coli* ST131 nach Anwendung von MLST auf pathogene *E. coli* Stämme, die 2004-2005 isoliert wurden, als einer der wichtigsten Uropathogene beschrieben (Lau *et al.* 2008). Er war in Nordwest-England weit verbreitet, resistent gegen ein sehr breites Spektrum der Cephalosporine und verursachte HWIs und Bakteriämien im klinischen und ambulanten Bereich (Lau *et al.* 2008). Wenig später wurde das europaweite Auftreten des ciprofloxacinresistenten *E. coli* O25:H4-ST131 Klons als Erreger unkomplizierter HWIs beschrieben (Cagnacci *et al.* 2008).

1.4.1.3 Weltweite Verbreitung von *E. coli* ST131

Das weltweite Auftreten des CTX-M β -Lactamase produzierenden *E. coli* ST131 O25:H4 Klons wurde 2009 beschrieben (Pitout *et al.* 2009). Da viele weitere Beschreibungen dieses Stamms mit zunehmendem Auftreten in klinischen Untersuchungen folgten (Arpin *et al.* 2009; Platell *et al.* 2010; Xu *et al.* 2011; Doi *et al.* 2013; Colpan *et al.* 2013), gewann er stetig an Relevanz. Er wurde aufgrund seines *Sequence Type* (ST) vor allem unter dem Namen *E. coli* ST131 bekannt und vielfach mit der Phylogruppe B2 und dem zugehörigen Serotyp O25b:H4 beschrieben, weshalb er auch als *E. coli* ST131-O25b bezeichnet wird (Rogers *et al.* 2011).

1.4.2 Multiresistenz bei *E. coli* ST131

E. coli ST131 Stämme weisen meist mehrere Resistenzen gegen Antibiotika verschiedener Klassen auf, insbesondere gegen Fluorchinolone und β -Lactame, inklusive der Extended Spektrum Cephalosporine, sowie gegen Aminoglykoside, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Fosfomycin (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Ihre Resistenzursachen sind in Form der ihnen

zugrundeliegenden genetischen Information entweder im Genom verankert, wie die durch chromosomale Mutationen erworbene FQ-Resistenz (vgl. Kap. 1.4.4.4), oder auf Plasmiden (vgl. Kap. 1.4.8). Die für *E. coli* ST131 charakteristischen CTX-M-15 Enzyme kommen plasmidcodiert vor (vgl. Kap. 1.4.4.5), aber auch ins Genom integriert (Price *et al.* 2013).

1.4.3 Relevanz von *E. coli* ST131

Von *E. coli* sind generell einige pandemische Linien bekannt, die extraintestinale Infektionen verursachen, doch ist die von *E. coli* ST131 eine der relevantesten, weil sie sich dominant verbreitet hat und gegen viele eingesetzte Antibiotika resistent ist (Stoesser *et al.* 2016). Gerade weil *E. coli* ST131 auch global so stark verbreitet ist, schwere Infektionen verursacht, Resistenzen gegen die viel verwendete Wirkstoffklassen aufweist und für den generellen Anstieg der Antibiotika Resistenzen bei *E. coli* insgesamt mitverantwortlich ist, wird er auch als globaler Hochrisiko-Klon beschrieben (Mathers *et al.* 2015a).

Ebensolche Risikokeime spielen für die Verbreitung sowie für die weltweite Entwicklung von Antibiotikaresistenz, insbesondere Multiresistenz, eine wesentliche Rolle (Woodford *et al.* 2011). *E. coli* ST131 ist schätzungsweise für an die Millionen AMR-Infektionen jährlich verantwortlich (Pitout und DeVinney 2017).

Der fortschreitenden antimikrobiellen Resistenz, insbesondere gegen die derzeit verfügbaren Antibiotika, nachzukommen und Strategien zur Eindämmung, Überwachung und effektiven Behandlung von bakteriellen Infektionen zu etablieren, ist seit 2015 ein benanntes und im „*Global action plan on antimicrobial resistance*“ formuliertes Ziel der WHO (Antimicrobial Resistance Division (AMR) 2016). Die Verfügbarkeit von wirksamen Antibiotika ist dabei eines der Hauptanliegen der Bemühungen zur globalen Gesamtgesundheit „*One Health*“ (WHO).

1.4.4 Die *E. coli* ST131 Linie und ihre Subtypen

1.4.4.1 *E. coli* ST131

Die Bezeichnung *E. coli* ST131 beschreibt streng genommen nur einen *E. coli* Stamm mit dem *Sequence Type* 131 nach dem MLST-Achtman Schema (vgl. Kap. 1.5.3.1). Sie wird allerdings

oft synonym für den pathogenen, pandemischen und resistenten *E. coli* ST131-O25b Klon verwendet. Die zuerst beschriebene Variante des Stamms vom Typ ST131 wurde mit den Charakteristika eines FQ-resistenten *E. coli* der Phylogruppe B2, des Serotyps O25:H4 und *Sequence Type* 131 beschrieben (vgl. Kap. 1.4.1.2), (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008), wobei der ST namensgebend wurde.

1.4.4.2 *E. coli* ST131-O25b

E. coli ST131-O25b ist der pathogene, pandemische und resistente *E. coli* ST131 Stamm mit dem Oberflächenantigen O25b. Die Bezeichnung rührt daher, dass der Stamm zunächst meist über seinen Serotyp O25:H4 beschrieben wurde. In *E. coli* ST131-O25b steht O25b für das spezifische Oberflächenantigen der Lipopolysacharide (O) und H4 für das der Flagellen (H). Später zeigte sich allerdings, dass *E. coli* ST131 auch mit verschiedenen anderen Serotypen vorkommt, darunter O16:H5, NT:H4 und O157 (Johnson *et al.* 2014; Riley 2014).

E. coli ST131-O25b weist auch für ihn spezifische Polymorphismen im Gen *pabB* der Aminodeoxychorismat-Synthase auf, über die er identifiziert werden kann (Clermont *et al.* 2009), (vgl. Kap. 3.1.2.1). In der Literatur wird die Bezeichnung -O25b nicht konsequent verwendet, vor allem nicht, wenn noch eine spezifischere Bezeichnung der Sublinie erfolgt.

1.4.4.3 *E. coli* ST131 H30 Linie

Unter den *E. coli* ST131 Isolaten gibt es verschiedene subklonale Linien (auch *Clades*, vgl. Kap. 1.4.4.7). Die am stärksten verbreitete, dominante Linie ist die, die Typ-1-Fimbrien besitzende, das *fimH30* Allel tragende *E. coli* ST131-*fimH30*, kurz *E. coli* ST131 H30 Linie (Johnson *et al.* 2013). Die Zusatzbezeichnung H30 stammt aus der Allelbezeichnung des Fimbrienadhäsins-Gens *fimH30*, welches die pathogenen *E. coli* ST131 Stämme aufweisen und welches zu ihrer Virulenz beiträgt (vgl. Kap. 1.1.6.2). Die folgend beschriebenen weiteren Subklone H30-R und H30-Rx (alternative Schreibweise: H30R bzw. H30Rx) sind sehr wahrscheinlich aus dem noch FQ sensiblen H30 Vorfahren hervorgegangen (Banerjee und Johnson 2014). Eine Übersicht der *E. coli* ST131 Linie findet sich in Abbildung 1-9.

1.4.4.4 *E. coli* ST131 H30-R

Ein weiterer *E. coli* ST131 Subklon ist *E. coli* ST131 H30-R, dessen Zusatzbezeichnung -R den fluorochinolonresistenten Phänotyp (FQ-R) dieser Stämme beschreibt. Dieser Subtyp ging aus *E. coli* ST131 H30 mit dem Erwerb der FQ-Resistenz durch Mutationen in *gyrA* und *parC* hervor (Banerjee und Johnson 2014). Die dadurch in der H30-R Linie auftretenden Veränderungen sind GyrA S83L und D87N sowie ParC S80I und E84V (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014).

1.4.4.5 *E. coli* ST131 H30-Rx

Der mit *E. coli* ST131 H30-Rx bezeichnete Subklon, produziert CTX-M-15 und gehört mit in die Sublinie von H30-R (Price *et al.* 2013). Er besitzt die gleichen QRDR Mutationen (FQ-Resistenz) wie H30-R und zusätzlich das Gen *bla*_{CTX-M-15}, welches die Drittgenerations-Cephalosporinresistenz (3.GC-R) hervorruft, die für diesen Klon charakteristisch ist (Banerjee und Johnson 2014). Dabei steht H30 wie bisher auch für *fimH30*, -R für FQ-Resistenz und x für die durch CTX-M-15 hervorgerufene sehr hohe (*extensive*) Cefotaximresistenz bei (ESBL-bedingter) *extended spectrum* β -Lactamresistenz (Ranjan *et al.* 2015; Price *et al.* 2013).

1.4.4.6 *E. coli* ST131 H30-R1

E. coli ST131 H30-R1 ist die Linie, die sich aus *E. coli* ST131 H30-R entwickelte, die keine Cefotaximresistenz über die Aufnahme von CTX-M-15 erworben hat. Sie ist weiterhin FQ-R und gleicht *E. coli* ST131 H30-R, erwarb aber im späteren Verlauf auch IncF Plasmide, mit F1:A2:B20 Replikons, die die H30-R (non-Rx) Linie geprägt haben (Johnson *et al.* 2016b). H30-R1 ist im Prinzip synonym zu H30-R zu verwenden, meint aber die zeitlich nach der Separation der -Rx Sublinie auftretenden H30 non-Rx Stämme und verläuft parallel zu H30-Rx (Johnson *et al.* 2016b). Vergleiche dazu auch Abbildung 1-9.

1.4.4.7 Einteilung in *Clades*

Mit fortschreitender Kenntnis der Linie von *E. coli* ST131 wurde auch seine Beschreibung differenzierter. Nach Pitout und DeVinney gibt es von *E. coli* ST131 drei Kläden (*Clades*). *Clade A* liegt zeitlich sehr früh und beinhaltet hauptsächlich Stämme mit Serotyp O16:H5 und

fimH41. *Clade B* umfasst die späteren Stämme ab den 1990ern mit dem Serotyp O25:H4 und *fimH22* und *Clade C* dann die ab den 2000ern mit *fimH30* (Pitout und DeVinney 2017). *Clade C* ist aus *Clade B* hervorgegangen und umfasst die ganze ST131 H30 Linie, sowohl die FQ-sensiblen (H30 non-R) als auch die mit der erworbenen FQ-Resistenz (H30-R) (Pitout und DeVinney 2017). Diese *Clade C* hat sich dann dominant ausgebreitet (Johnson *et al.* 2013). *E. coli* ST131 H30 wird auch als *Clade C0* beschrieben, welche sich dann in *Clade C1* (H30-R) und *Clade C2* (H30-Rx) aufgeteilt hat (Pitout und DeVinney 2017). *Clade C1* und C2 sind beide durch die FQ-R vermittelnden Mutationen in *gyrA* und *parC* gekennzeichnet und *Clade C2* zusätzlich durch *bla_{CTX-M-15}* (Pitout und DeVinney 2017). Eine Übersicht der Benennung und Entwicklung der *E. coli* ST131 Linie liefert Abbildung 1-9.

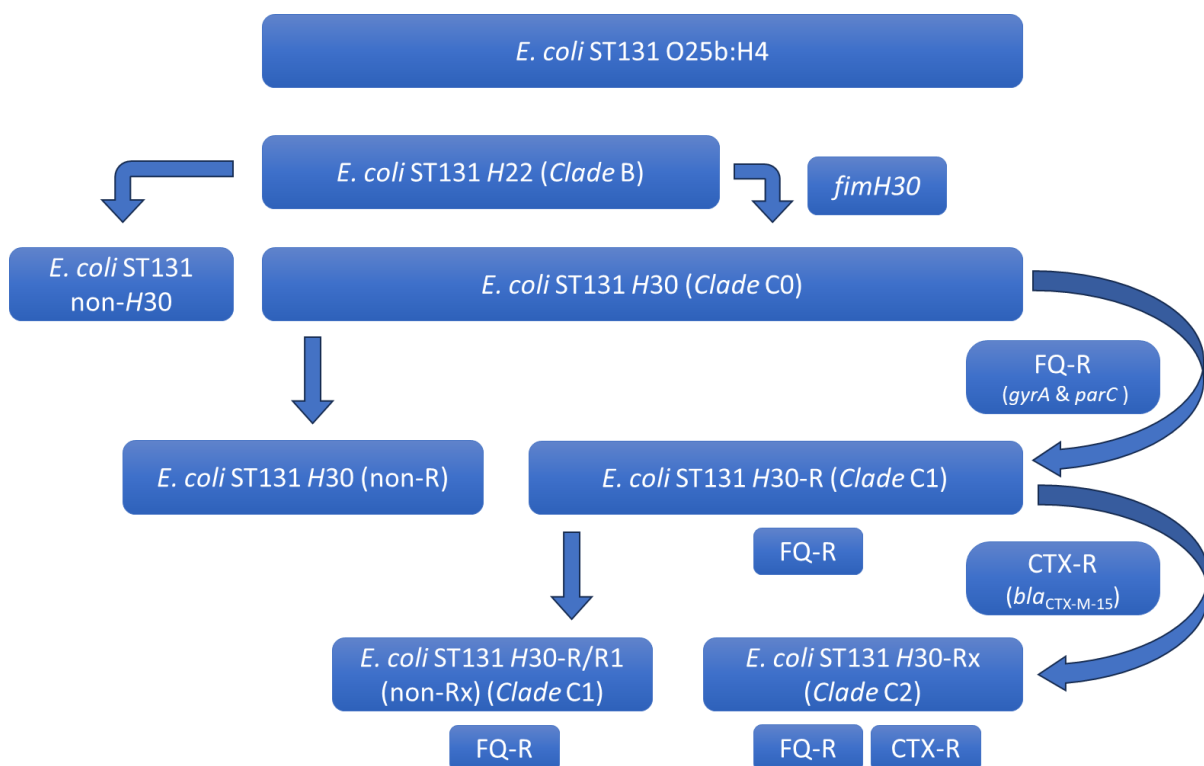


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der Phylogenetischen Entwicklung der *E. coli* ST131 O25b Linie mit ihren jeweiligen Bezeichnungen, Subtypen, Charakteristika und der jeweiligen Klade (Clade), modifiziert nach: Pitout und DeVinney 2017, Banerjee und Johnson 2014 und Johnson *et al.* 2016b.

1.4.5 Genomsequenzierte *E. coli* ST131 Isolate der Literatur

1.4.5.1 *E. coli* SE15

Toh *et al.* veröffentlichten 2010 die Genomsequenz des kommensalen Wildtyp *E. coli* Stammes SE15, welchen sie aufgrund der Sequenzen seiner Housekeeping-Gene in die Phylogruppe B2 einordneten (Toh *et al.* 2010), aber noch nicht als ST131 benannten. Diesen verglichen sie mit bekannten uropathogenen *E. coli* Stämmen, was zeigte, dass *E. coli* SE15 Gene für Virulenzfaktoren, wie spezielle Fimbrienadhäsine, Toxine, Kapsel, Serumresistenz und Eisen-Aufnahmesysteme fehlen, die UPEC Stämme sonst aufweisen (Toh *et al.* 2010).

1.4.5.2 *E. coli* EC958

Der *E. coli* Stamm EC958 wurde aufgrund eines HWIs 2005 in England isoliert und gehört zu der ST131 Sublinie H30 (*fimH30* Fimbrienadhäsine). Er weist den O25b:H4 Serotyp auf, entstammt der Phylogruppe B2, ist FQ-resistent und CTX-M-15 positiv (Forde *et al.* 2014). In diesem Stamm werden neben CTX-M-15 auch andere β -Lactamasen gebildet, darunter CMY-23, welche für die Resistenz gegen die 3.GC eine erhebliche Rolle spielt (Phan *et al.* 2015).

1.4.5.3 *E. coli* NA114

Im Jahr 2011 beschrieben Avasthi *et al.* den uropathogenen *E. coli* (UPEC) Stamm NA114 als repräsentativ für ein indisches Stammkollektiv, welches Multiresistenz und ESBL-Produktion aufwies, als epidemiologisch sowie klinisch signifikant und veröffentlichten seine Genomsequenz. Es handelte sich bei *E. coli* NA114 um einen Stamm der Serogruppe O25, der Phylogruppe B2 und des *Sequence Type* 131 (Avasthi *et al.* 2011). *E. coli* NA114 wird in die Linie des H30-Rx Subklons von *E. coli* ST131 eingeordnet (Ranjan *et al.* 2015).

1.4.5.4 *E. coli* JJ1886

Das *E. coli* ST131 Isolat JJ1886 von 2007 stammt von einer Patientin mit fataler Urosepsis in den USA und gehört der virulenten CTX-M-15 produzierenden H30-Rx Sublinie an (Andersen *et al.* 2013). Das Genom wurde sequenziert und analysiert, wobei sich zeigte, dass *bla*_{CTX-M-15}

in diesem Stamm innerhalb einer unvollständigen Tn3-Transposon Struktur und innerhalb eines lambda-like 58-kb Prophagen ins Chromosom integriert vorliegt (Andersen *et al.* 2013).

1.4.5.5 *E. coli* JJ1887

Bei *E. coli* JJ1887 handelt es sich ebenfalls um ein ST131 H30-Rx Isolat, welches diverse Resistenzgene trägt, darunter weist es *bla*_{CTX-M-15} ins Chromosom integriert auf (Johnson *et al.* 2016a). Isoliert wurde es 2007 in den USA aufgrund von wiederkehrender Zystitis aus der Schwester der Patientin, aus der JJ1886 isoliert wurde (Johnson *et al.* 2016a)

1.4.5.6 *E. coli* MNCRE44

Das *E. coli* ST131 Isolat MNCRE44 zeigte Resistenz gegen Cefotaxim, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Ertapenem und Gentamicin. Es stammte aus dem Jahr 2012 aus den USA, gehörte der H30-R Linie an und war das erste Carbapenem-resistente H30-R ST131 ExPEC Isolat, dessen Genomsequenz inklusive der Sequenzen aller Plasmide vorlag (Johnson *et al.* 2015).

1.4.6 β -Lactamasen in *E. coli* ST131

Das am häufigsten für *E. coli* ST131 beschriebene Enzym ist CTX-M-15 (vgl. Kap. 1.4.1.1). Es ist auch generell die bei *E. coli* weltweit am häufigsten auftretende ESBL (Castanheira *et al.* 2021). Die Verbreitung von CTX-M-15 ließ sich auf den *E. coli* ST131 H30-Rx Klon zurückführen (vgl. Kap. 1.4.4.5). Bei dessen Isolaten kommt das Gen *bla*_{CTX-M-15} nicht nur plasmidcodiert sondern auch chromosomal vor (Price *et al.* 2013). Neben CTX-M-15 wurden in den *E. coli* ST131 Stämmen diverse weitere β -Lactamasen anderer Typen gefunden, die Resistenz gegen Aminopenicilline vermitteln und sehr oft plasmidcodiert vorliegen, wie z. B. OXA-1, TEM-1 und SHV-2 (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Sie treten vor allem auf IncF und IncN Plasmiden in Kombination mit anderen ESBL-Enzymen auf, aber am häufigsten mit CTX-M-15 (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Insofern ist CTX-M-15 ein gewisser Indikator für die ST131 H30-Rx Isolate, da es für sie charakteristisch ist (Price *et al.* 2013). Aber auch andere CTX-M Enzyme finden sich bei *E. coli* ST131, darunter CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-27, und CTX-M-65, sowie auch andere TEM- und SHV-Typ ESBLs (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014).

1.4.7 Carbapenemasen in *E. coli* ST131

Auch Carbapenemasen treten zunehmend in *E. coli* ST131 Stämmen auf. So wurden 2011 bereits KPC-2, VIM-1 und NDM-1 in ST131 Isolaten beschrieben (Morris *et al.* 2011; Naas *et al.* 2011; Mantengoli *et al.* 2011; Peirano *et al.* 2011), sowie 2012 auch OXA-48 (Morris *et al.* 2012). Der 2012 isolierte und genomsequenzierte ExPEC Stamm MNCRE44 (vgl. Kap. 1.4.5.6) zeigte eine reduzierte Empfindlichkeit gegen Cefotaxim, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Ertapenem, und Gentamicin, war vom Subtyp ST131 H30-R und bildete eine Carbapenemase vom Typ KPC-3 (Johnson *et al.* 2015). Die Carbapenemasen liegen auch plasmidcodiert vor, so wurde z. B. im Jahr 2012 NDM-1 bei *E. coli* ST131 auf einem IncFII Plasmid gefunden (Bonnin *et al.* 2012) und im Jahr 2016 dann auf einem neuartigen IncHI3 Plasmid in Kombination mit diversen weiteren Resistenzgenen (Subramanian *et al.* 2017).

1.4.8 Plasmide in *E. coli* ST131

Coque *et al.* beschrieben im Jahr 2008, dass CTX-M-15 zu 50 % von *E. coli* Isolaten der Phylogruppe B2 produziert wird und sowohl plasmidcodiert als auch chromosomal auftritt. Die Plasmide, die die *bla*_{CTX-M-15}-Gene aufwiesen, waren mit 85-160 kbp sehr groß und zu 37 % mittels Konjugation oder Transformation übertragbar, wobei sie keine konkreten Angaben zur Übertragbarkeit bei ST131 machten. In den *E. coli* ST131 Isolaten befand sich CTX-M-15 auf 85 und 120 kbp großen IncFII Plasmiden, auf welchen teilweise auch *aac(6′)-Ib-cr* Gene lagen, die Resistenz gegen spezielle Vertreter der Aminoglykoside und FQ vermitteln (Coque *et al.* 2008).

Weitere Untersuchungen der Resistenzgene auf Plasmiden in CTX-M-15 bildenden *E. coli* ST131 Stämmen zeigten, dass diese in verschiedenen Kombinationen auf Plasmiden unterschiedliche Inkompatibilitätsgruppen (Inc) auftreten (Smet *et al.* 2010). Zum einen lagen *bla*_{TEM-1} sowie *bla*_{CTX-M-15} auf einem IncFII Plasmid und zum anderen *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *aac6′-Ib-cr*, *tetA* und *catB4*, sowie selbiges Motiv ohne *tetA* auf einem weiteren IncFII/FIA-Fusionsplasmid (Smet *et al.* 2010). Sie zeigten Evidenz für eine Transposition eines *bla*_{CTX-M-15}-ISEcp1 Insertionselements in das *tnpA*-Gen des *bla*_{TEM}-tragenden Tn3-like Transposons (Smet *et al.* 2010). Daneben fanden Smet *et al.* ein weiteres IS26-Transposon, welches *bla*_{OXA-1}, *aac6′-Ib-cr* und *catB4* trägt und über homologe Rekombination inserierte.

Dies ermöglichte eventuell die strukturelle Neuordnung der Gene und die Mobilisation von Fragmenten aus anderen Plasmiden (Smet *et al.* 2010). *E. coli* ST131 Stämme tragen vor allem IncF und IncN Plasmide mit verschiedenen einfachen β -Lactamasen und ESBLs, darunter OXA-1, TEM-1 und SHV-Varianten in Kombination mit CTX-M-15 sowie anderen CTX-M-Varianten (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Lanza *et al.* beschrieben das „ST131 Plasmidom“ als bemerkenswert heterogen. Sie fanden verschiedenste nicht F und F-Plasmide von 1,6-211 kbp Größe, die diverse MOB/Inc Typen aufwiesen. Unter den F-Plasmiden waren dabei vor allem jene vom Typ MOB_{F12}/IncF präsent (Lanza *et al.* 2014).

1.5 Typisierung von *Escherichia coli*

Um Verwandtschaftsverhältnisse von *E. coli* Stämmen zu erkennen, unterschiedliche Stämme voneinander zu unterscheiden und sie generell zu charakterisieren, haben sich verschiedene Methoden der Erregertypisierung im Laufe der Zeit durchgesetzt. Sie erstrecken sich über die Antigenbestimmung, die Einteilung in Phylogenetische Gruppen bis hin zu den heute relevanten, universal verwendeten sequenzbasierten Methoden, wie dem Multilocus-Sequence Typing (MLST) und der Genomsequenzierung. Die Kategorien, in die die Stämme nach den einzelnen Verfahren eingeteilt werden, haben größtenteils heute noch Relevanz und sind folgend beschrieben.

1.5.1 Antigenbestimmung

Anfänglich, bevor modernere Möglichkeiten zur Typisierung und Sequenzierung bestanden, wurde *E. coli* hauptsächlich anhand seines Serotyps unterschieden. Dabei wurden die Stämme hinsichtlich ihrer Antigene typisiert, wobei vor allem die O-, H- und K-Antigene eine Rolle spielten (Kauffmann 1944; Orskov *et al.* 1977; Ewing 1953). Es stellte sich allerdings heraus, dass der Serotyp in seiner Variation nicht gut mit der genetischen Unterschiedlichkeit korrelierte (Chaudhuri und Henderson 2012; Ochman und Selander 1984; Caugant *et al.* 1985; Maiden *et al.* 1998), weshalb er heute nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. Allerdings

ist die Antigen Bezeichnungen für viele Stämme Teil der spezifischen Benennung, wie bei *E. coli* ST131-O25b (vgl. Kap. 1.4.4.2).

1.5.2 Phylogenie

Die Verwandtschaft verschiedener *E. coli* Stämme kann anhand ihrer Ähnlichkeit beurteilt werden, bezogen auf das Auftreten von gleichen Enzymen bzw. Genen. Die Methode des Enzymvergleichs von essentiellen oder charakteristischen Enzymen stellte eine Vorstufe des späteren Gen-Nachweises und -Vergleichs dar. Basierend auf einem 1984 von Ochman und Selander etablierten Kollektiv aus 72 *E. coli* Stämmen (ECOR Collection) wurden anhand der Enzyme durch *multi-locus enzyme electrophoretotyping* (MLEE) zunächst sechs phylogenetische Gruppen definiert, welche A, B1, B2, C, D und E waren (Selander *et al.* 1987), und woraus dann die Hauptgruppen A, B1, B2, und D definiert wurden (Saitou und Nei 1987). Bei späteren sequenzbasierten Untersuchungen anderer Kollektive, auch pathogener Stämme, blieben die Gruppen bestehen. Sie wurden lediglich noch erweitert, was in den Phylogruppen A, B1, B2, C (I-V), D1, D2 und E resultierte (Chaudhuri und Henderson 2012; Clermont *et al.* 2015).

1.5.2.1 Phylogenie nach Clermont *et al.*

Eine Methode der genetischen Phylogenie-Bestimmung ist die nach Clermont *et al.* aus dem Jahr 2000. Sie umfasste die Gene *chuA*, *yjaA* und TspE4.C2, deren Vorhandensein nach, die Zuordnung der Stämme in die phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D erfolgt (Clermont *et al.* 2000). Diese Typisierung und Einteilung wurde im Jahr 2012, wieder durch Clermont, entsprechend erweitert und es kamen weitere Gruppen dazu. Die neuere Bestimmung stellte eine Erweiterung des ersten Schemas dar. Sie umfasste neben den Genen *chuA*, *yjaA* und TspE4.C2 des alten Schemas noch zwei weitere Gene: *trpA* und *arpA*. Die Einteilung der Stämme wurde dementsprechend erweitert und umfasst neben den Gruppen A, B1, B2 und D, nun auch C, E, F und *Clade I* (Clermont *et al.* 2012), bzw. A, B1, B2, C, D1, D2, E, F und *Clade I-V* (Chaudhuri und Henderson 2012; Clermont *et al.* 2015). Zwar wird *E. coli* heute anhand der verschiedenen phylogenetischen Gruppen charakterisiert, aber meistens mit einem neueren, auf Sequenzierung beruhenden Typisierungsverfahren beschrieben.

1.5.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Beim Multilocus Sequence Typing (MLST) handelt es sich um eine Typisierungsmethode für bakterielle Erreger, die auf den Verwandtschaftsverhältnissen ihrer Sequenzen beruht (Maiden 2006). Dazu werden mehrere (*multi*) verschiedene Genabschnitte (*loci*) universal vorkommender Gene, sogenannter Housekeeping-Gene, sequenziert und verglichen. Diese Genabschnitte sind für eine Spezies, wie hier *E. coli*, durch ein festgelegtes Schema (z. B. nach Achtman) definiert und ermöglichen so eine nähere Charakterisierung (Wirth *et al.* 2006). Aus ihren Sequenzen wird für jedes Gen das entsprechende Allel bestimmt und aus ihrer Kombination anhand einer entsprechenden Datenbank der *Sequence Type* (ST) ermittelt.

Die Analyse der relevanten Sequenzabschnitte der Housekeeping-Gene ermöglicht die Bestimmung des *Sequence Type* (von engl. *sequence type*), der im Ergebnis mit ST und entsprechender Nummer bezeichnet wird. Für *E. coli* gibt es mehrere anerkannte MLST-Schemata. Die zwei bekanntesten sind erstens das global sehr stark verbreitete und am meisten verwendete Schema nach Achtman von der Universität Warwick (Wirth *et al.* 2006); und zweitens das des Institut Pasteur (Jaureguy *et al.* 2008). Beide Schemata wurden in der Arbeit berücksichtigt. Sie sind folgend mit ihren determinierenden Genen dargestellt.

1.5.3.1 MLST - Achtman Schema (Enterobase)

Die MLST-Bestimmung bei *E. coli* geht ursprünglich auf das nach Mark Achtman benannte Achtman Schema zurück, welches zunächst auf der Seite der Warwick University und heute bei Enterobase abzurufen ist. Die Originalquelle dieses Schemas ist „*Sex and virulence in Escherichia coli...*“ (Wirth *et al.* 2006).

Dieses Schema vergleicht sieben Sequenzabschnitte von Housekeeping-Genen in *E. coli* miteinander. Sie sind in Abbildung 1-10 aufgeführt.

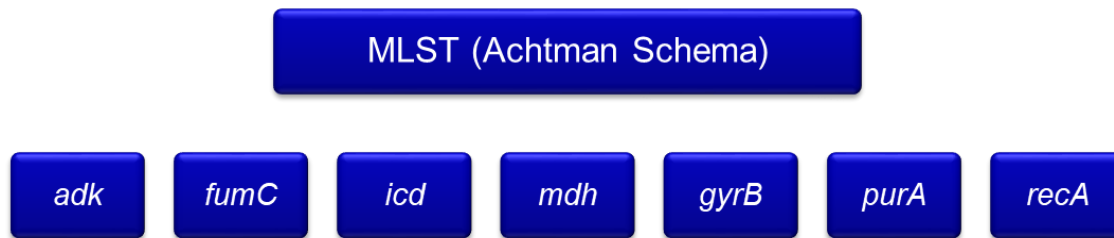


Abbildung 1-10: Gene des MLST-Schemas nach Achtman (nach: Wirth et al. 2006).

Aus den einzelnen Sequenzen der Gene werden die entsprechenden Allele für jedes Gen ermittelt (Genbezeichnung und Nummer), indem die entsprechenden Bereiche sequenziert werden. Aus der Kombination der jeweiligen Allele wird dann der zugehörige ST bestimmt. Dies ist in Abbildung 1-11 für einen *E. coli* vom *Sequence Type* 131 (ST131) dargestellt.

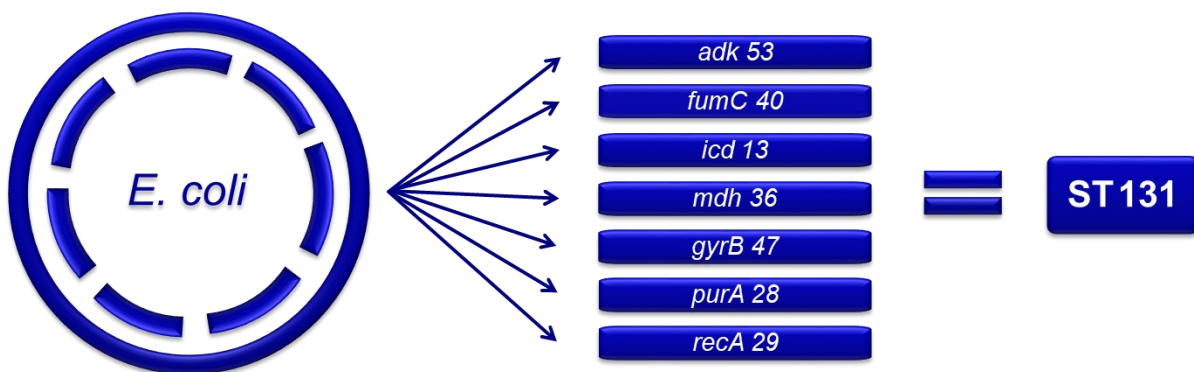


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der MLST-Bestimmung nach Achtman, über die Sequenzierung der einzelnen Housekeeping-Gene (links) zu den Allelen mit Genbezeichnung und Allel-Nummer (mittig) und dem resultierenden *Sequence Type* (ST-Nr.) (rechts) am Beispiel eines *E. coli* ST131. Allelkombination für ST 131 (nach: Jolley et al. 2018).

Mit der wachsenden Anzahl verfügbarer Sequenzdaten ist die MLST-Plattform stetig gewachsen und wurde in die Datenbank Enterobase überführt, die nun diverse Gen- und Genomsequenzen von Enterobakterien, insbesondere auch von *Escherichia coli*, beinhaltet (Zhou et al. 2020). Alle bekannten Allele der Housekeeping-Gene sind in der Datenbank beschrieben und nummeriert. Sie können dort referenziert, betrachtet und heruntergeladen werden. Es ist ebenfalls möglich, ermittelte Sequenzen auswerten zu lassen, Allele zu vergleichen, Daten hochzuladen und zu prüfen welchem Sequenztypen sie entsprechen oder mit welchem sie verwandt sind, sowie neue Sequenzen hinzuzufügen. Im Weiteren wurde für die MLST Typisierung eine eigene Seite, pubMLST, eingeführt (Jolley et al. 2018). Wird bei Isolaten der ST ohne nähere Bezeichnung benannt, ist immer der global am meisten verwendete *Sequence Type* nach Achtman gemeint.

1.5.3.2 MLST - Pasteur Schema (Institut Pasteur)

Für die MLST-Bestimmung bei *E. coli* gibt es eine weitere Nomenklatur, die von den Wissenschaftlern des Institut Pasteur entwickelt wurde (Jaureguy *et al.* 2008). Analog der Datenbank Enterobase beheimatet das Institut Pasteur ebenfalls eine Datenbank für Sequenzen und eine Online-Plattform zum Sequenzabgleich (Institut Pasteur MLST databases and software 2023). Diese beruht auf dem alternativen MLST-Schema des Institut Pasteur zur Typisierung von *Escherichia coli* und beinhaltet andere Housekeeping-Gene, die in Abbildung 1-12 dargestellt sind.

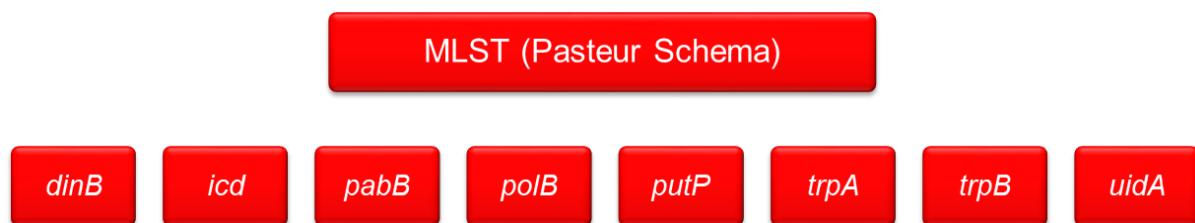


Abbildung 1-12: Gene des MLST-Schemas des Institut Pasteur (nach: Jaureguy *et al.* 2008).

Nach dem gleichen Prinzip wie im Achtman Schema werden hier auch wieder aus den einzelnen Sequenzen die jeweiligen Allele bestimmt (Genbezeichnung und Nummer) und aus diesen dann wiederum der ST nach Pasteur, wie in Abbildung 1-13 dargestellt.

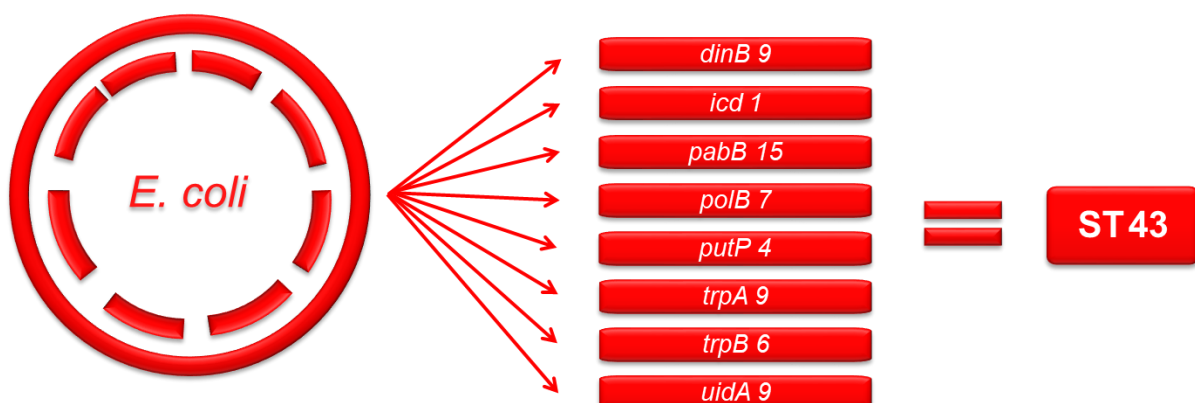


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der MLST-Bestimmung nach Pasteur, über die Sequenzierung der Housekeeping-Gene (links) zu den einzelnen Allelen (Genbezeichnung und Allel-Nummer), (mittig) und über die Kombination zum Sequence Type (ST mit Nummer), (rechts) für *E. coli* ST43 nach dem Schema des Institut Pasteur (nach: Jaureguy *et al.* 2008).

1.5.3.3 Vergleich der verschiedenen MLST-Schemata

Neben den beiden aufgeführten MLST-Schemata nach Achtman und Pasteur gibt es noch einige weitere, die allerdings wesentlich weniger verwendet werden. Die verschiedenen MLST-Schemata sind an sich erst einmal komplett unabhängig voneinander und resultieren in unterschiedlichen ST-Nummern. Da sie keinen direkten Bezug zueinander haben, sind sie nur schwer vergleichbar. Eine Gegenüberstellung der verschiedenen STs in den gängigsten MLST-Schemata für *E. coli* bietet eine Übersicht von Clermont *et al.* 2015, in der auch ST131 Isolate aufgeführt sind. Da verschiedene Gene abgeglichen werden, stimmen die STs eines Schemas, mit denen eines zweiten Schemas nicht immer überein: Ein ST131 nach Achtman Schema entspricht in der Regel, wie z. B. bei *E. coli* NA114, einem ST43 nach dem Schema des Institut Pasteur; für den frühen ST131 Stamm *E. coli* SE15 entspricht er aber einem ST506 nach dem Schema des Institut Pasteur (Clermont *et al.* 2015). Ein ST nach Institut Pasteur wird in dieser Arbeit fortan zur Unterscheidung immer auch als solcher benannt. Ohne nähere Bezeichnung ist stets der ST nach dem Achtman Schema gemeint.

1.5.4 Genomsequenzierung

Unter der Genomsequenzierung versteht man die Sequenzierung der gesamten DNA eines Organismus, seines Genoms. Diese war mit den älteren Methoden, wie der Sanger-Sequenzierung, etc. zunächst sehr aufwendig und langwierig, wurde aber mit den neueren Sequenziermethoden der nächsten Generation revolutioniert (Pareek *et al.* 2011). Über sehr lange Leseweiten oder das Zusammensetzen sehr vieler kurzer Sequenzen wird das Genom anhand einer Vorlage aus den vielen einzelnen Sequenzen wie ein Puzzle zusammengesetzt, entweder *de novo* oder anhand einer nah verwandten Referenzsequenz (Metzker 2010). Die Ganzgenomsequenzierung wird auch als WGS (*whole genome sequencing*) bezeichnet und stellt für die Analyse von Bakteriengenomen den „*state of the art*“ dar (Dark 2013). Im Hinblick auf bakterielle Resistenzen kann WGS für die Detektion von Resistenzgenen und Mutationen, sowie zur Untersuchung der Entstehung von Resistenzen und zur Kontrolle von Infektionsgeschehen eingesetzt werden, insofern geeignete Analyseplattformen für den breiten Einsatz der Technik verfügbar werden (Köser *et al.* 2014).

1.5.4.1 Next-Generation Sequencing

Methoden des Next-Generation Sequencing (NGS) sind unter anderem Verfahren, bei denen sehr viele Sequenzen auf einmal generiert werden, wobei in einem Ansatz etliche Sequenzierreaktionen parallel ablaufen (Behjati und Tarpey 2013). Über die Menge der einzelnen Sequenzen kann dann in Summe ein ganzes Genom abgedeckt werden, indem die generierten Tausend bis Millionen Sequenzen an sich und eine Referenz angelegt bzw. an dieser ausgerichtet werden (Behjati und Tarpey 2013). Sie werden dabei per Software anhand eines Referenzstamms oder anhand ihrer überlappenden Sequenzen zusammengesetzt (Metzker 2010). Die Grenzen der Systeme liegen in den Kapazitäten der Sequenziertechnik, die sich in der Menge sowie Qualität und Länge der einzelnen Reads (ein Read = eine gelesene Sequenz) niederschlägt (Liu *et al.* 2012). Bekannte NGS-Verfahren sind die von Pacific Biosciences, Illumina und Life (Ion Torrent™ Technologie) (Metzker 2010).

1.5.4.2 Sequenzanalyse

Die Sequenz der DNA oder eines Gens ist die Abfolge der einzelnen Nukleotid-Basen in der sie angeordnet sind. Im Bakteriengenom sind diverse Gene mit ihren regulatorischen Bereichen in verschiedenen Orientierungen und unterschiedlichen Abständen hintereinander angeordnet (Reyes-Lamothe *et al.* 2008). Während die Sequenzen einzelner Gene oder Genabschnitte (wie beim MLST) noch manuell betrachtet und abgeglichen werden können, sind für die Analyse von großen Datenmengen spezielle Programme und Plattformen nötig um die NGS- und Genomsequenzdaten zu ordnen und auszuwerten, die es erst ermöglichen, effizient mit den Sequenzen zu arbeiten (Köser *et al.* 2014; Pareek *et al.* 2011).

2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, Antibiotikaresistenzen und die ihnen zugrundeliegenden Mechanismen bei *Escherichia coli* ST131 zu untersuchen. *E. coli* ST131 ist aufgrund von multipler Antibiotikaresistenz und globaler Verbreitung von hoher klinischer Relevanz. Der Fokus lag dabei insbesondere auf den für *E. coli* ST131 charakteristischen, kombiniert auftretenden Resistenzen gegen Fluorchinolon- und β -Lactam-Antibiotika, den diesen zugrunde liegenden Resistenzursachen, sowie darauf deren Entwicklung und Verbreitung zu evaluieren.

Neben bekannten *E. coli* ST131 Stämmen sollten auch bis dato unbekannt identifiziert und charakterisiert werden. Dazu sollte ein geeignetes klinisches Kollektiv pathogener *E. coli* Isolate untersucht werden. Aufgrund des ersten beschriebenen Auftretens von *E. coli* ST131 im Zeitraum 2000-2006 (vgl. Kap. 1.4.1) war die Frage ob dieser ST in einem von 2001 bis 2004 in England gesammelten Kollektiv Bakteriämie verursachender *E. coli* Isolate bereits vertreten war und mit welchen Eigenschaften. Im Kontrast dazu sollte ein neueres Kollektiv von HWI und Bakteriämie verursachenden *E. coli* Isolaten von 2016 aus Deutschland aktuelle Daten zu *E. coli* ST131 liefern.

Weil die Bestimmung des *Sequence Type* (ST) über die Standardmethode des Multilocus Sequence Typing (MLST) für viele Isolate wenig effizient war, sollte eine neue auf Next-Generation-Sequencing (NGS) basierenden Anwendung entwickelt werden. Weiter wurde angestrebt, diese Methode parallel auch auf die Resistenzgen- und Mutations-Analyse anzupassen und als „*Proof of principle*“ auf ein großes Kollektiv anzuwenden.

Die molekularen Ursachen von *E. coli* ST131s Antibiotikaresistenz waren aufzuklären. Welche Resistenzgene, Mutationen und Resistenzfaktoren tragen einzelne Isolate? Gibt es Unterschiede und neue Faktoren? Welche Eigenschaften zeigen ältere und neuere Isolate?

Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich zudem die Frage, welche Rolle (Resistenz)-Plasmide bei *E. coli* ST131 spielen und ob dieser Erreger die Fähigkeit zur Weitergabe seiner Resistenzen über Konjugation besitzt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von *E. coli* Isolaten aus der BSAC-Studie 2001-2004

Das erste und zeitlich frühe Stammkollektiv, das in dieser Arbeit untersucht wurde entstammte einer Sammlung klinischer Isolate der *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC), die im Rahmen des damals in England neu eingerichteten *Bacteraemia Resistance Surveillance Programme* ab 2001 gesammelt wurden (Reynolds *et al.* 2008).

Die von der BSAC gesammelten pathogenen *E. coli* Isolate aus Bakteriämien wurden von Kliniklaboren aus ganz Großbritannien und Irland als klinisch relevant bewertet und eingeschickt (Reynolds *et al.* 2008). Aus den dort insgesamt von 2001 bis 2004 gesammelten 991 *E. coli* Stämmen wurden 175 mit einer MHK von $\geq 0,06 \mu\text{g/mL}$ für Ciprofloxacin ausgewählt, um die molekularen Ursachen der Fluorchinolonresistenz zu untersuchen. Die Stämme waren von der BSAC initial auf Resistenz untersucht worden (Reynolds *et al.* 2008). Das Kollektiv umfasste sowohl für Ciprofloxacin sensible (MHK $< 0,25 \mu\text{g/mL}$), als auch resistente Isolate (MHK $\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$), insgesamt lagen die MHKs im Bereich von 0,06-256 $\mu\text{g/mL}$. Es deckte die unterschiedlichen Jahre mit einer Anzahl an Isolaten wie folgt ab: 2001 (n=31), 2002 (n=36), 2003 (n=44) und 2004 (n=64).

In dieser Arbeit sollten dieses Stammkollektiv auf das Vorkommen von *E. coli* ST131 untersucht werden um die Prävalenz dieses Erregers zu dieser Zeit zu ermitteln.

Da über *E. coli* ST131 bereits bekannt war, dass diese Linie pathogener *E. coli* Klone der Phylogruppe B2 entstammt (Woodford *et al.* 2009) und angehört, wurde zunächst eine Eingrenzung der Isolate nach ihrer Phylogenie vorgenommen (vgl. Kap. 3.1.1).

3.1.1 Phylogenie der klinischen *E. coli* Isolate aus England von 2001-2004

Die insgesamt 175 *E. coli* Stämme aus der BSAC-Stammsammlung mit MHK-Werten von 0,06-256 $\mu\text{g/mL}$ für Ciprofloxacin wurden zunächst hinsichtlich ihrer Phylogenie untersucht. Die Bestimmung der Phylogruppe erfolgte nach der von Clermont *et al.* 2000 veröffentlichten Methode mittels Triplex-PCR auf die Gene *chuA*, *yjaA* und TspE4.C2 (Kap. 6.2.6.3) mit

anschließender Einteilung in die Phylogruppen A, B1, B2 und D (Clermont *et al.* 2000). Die zur Typisierung der Isolate nötigen PCRs nach Clermont waren bereits durchgeführt worden (Dr. A. Heisig und A. Schnasse, persönliche Mitteilung). Diese Daten bildeten die Grundlage zur Bestimmung der Phylogruppe und ermöglichten die Identifizierung der B2 Isolate in diesem Kollektiv (Poster # P1133, ECCMID 2015, Kopenhagen). Die Ergebnisse dieser Phylogenie-Bestimmung der Isolate für die Jahre 2001-2004 sind in Abbildung 3-1 aufgeführt.

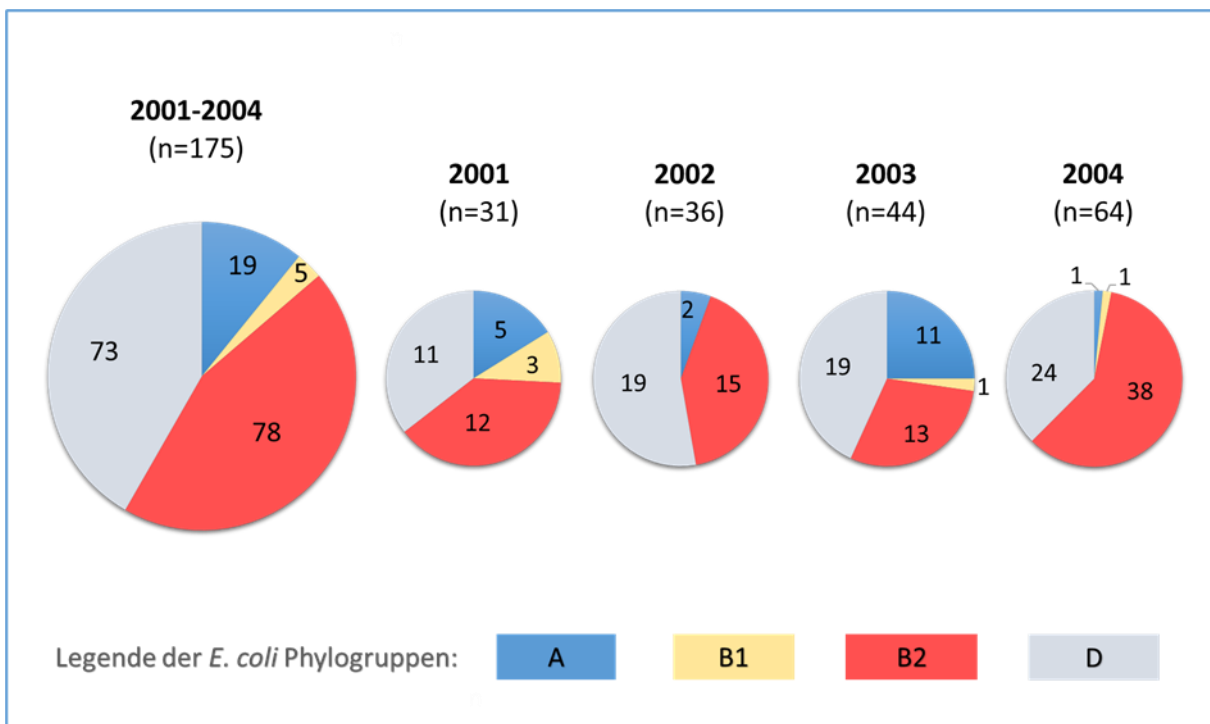


Abbildung 3-1: Verteilung der BSAC-Isolate nach Phylogruppen für die Jahre 2001-2004 insgesamt und jeweils.

Legende: Die Tortendiagramme zeigen farblich den Anteil der Phylogruppen und numerisch die Anzahl der Isolate; n gibt die Gesamtanzahl getesteter Isolate im jeweiligen Jahr an.

Insgesamt waren unter den 175 getesteten Isolatzen der Jahre 2001-2004 19 Isolate aus der Phylogruppe A, 5 Isolate aus B1, 78 Isolate aus B2 und 73 Isolate aus der Gruppe D. Die Isolate, die der Phylogruppe B2 zugeordnet wurden, stellten das Ausgangskollektiv für die Identifikation der *E. coli* ST131 Stämme dar. Von den 78 *E. coli* B2 Isolatzen stammen 12 aus dem Jahr 2001, 15 aus 2002, 13 aus 2003 und 38 aus dem Jahr 2004. Das Jahr benennt den Zeitpunkt der Probenname und entspricht damit dem klinischen Auftreten des Isolats.

Das Schema der phylogenetischen Testung und Einteilung wurde, ebenfalls von Clermont *et al.*, noch einmal erweitert. Im neueren Schema kommen zusätzlich zu den ursprünglichen vier A, B1, B2 und D noch C, E, F und *Clade I* hinzu. Die Bestimmung beruht weiterhin auf dem Vorhandensein bestimmter Gene, nur dass das neuere Schema neben den ursprünglichen Genen *chuA*, *yjaA* und *TspE4.C2* zusätzlich das Gen *arpA* umfasst (Clermont *et al.* 2012). Die Betrachtung der Neuerungen im erweiterten Schema ergab schon theoretisch keine potentiell zu berücksichtigenden Veränderungen für die Untersuchung im Hinblick auf *E. coli* ST131 (Phylogruppe B2), da die Zugehörigkeit zur Gruppe B2 von dem erweiterten Analyseschema um *arpA* nicht betroffen war. Die exemplarische Überprüfung der BSAC-Isolate der verschiedenen Phylogruppen, parallel nach der Triplex-PCR von Clermont *et al.* 2000 und Quadruplex-PCR nach Clermont *et al.* 2012 ergab für die getesteten Isolate aus dem BSAC-Kollektiv der Phylogruppe B2 ebenfalls keinen Unterschied in der Einteilung.

3.1.2 Screening der klinischen *E. coli* Isolate aus England auf *E. coli* ST131-O25b

3.1.2.1 Detektion von *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs in *pabB* nach Clermont

Zur schnellen Identifizierung von *E. coli* ST131-O25b Isolaten wurde 2009 von Clermont *et al.* eine Methode publiziert, die auf einer Duplex-PCR-basiert. Dabei werden zwei für *E. coli* ST131-O25b spezifische SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) im Housekeeping-Gen *pabB* detektiert (Clermont *et al.* 2009). Nach Clermont werden die Gene *trpA* und *pabB* in einer PCR erfasst. Bei dieser Duplex-PCR ist jeweils die letzte Position beider *pabB*-Primer so gewählt, dass sie nur auf den ST131-O25b Typ des *pabB*-Gens passt und somit beide spezifischen SNPs erfasst (Clermont *et al.* 2009). Diese Screening-Methode basiert also auf einer ARMS-PCR. Das Fragment aus dem Gen *pabB* soll dabei nur amplifiziert werden, wenn zwei spezifische SNPs vorhanden sind. Die beiden Polymorphismen um die es sich handelt sind in *pabB* an Position 267: T (anstatt C) und Position 573: A (anstatt G) lokalisiert. (Clermont *et al.* 2009). Die für *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs zeigt Abbildung 3-2.

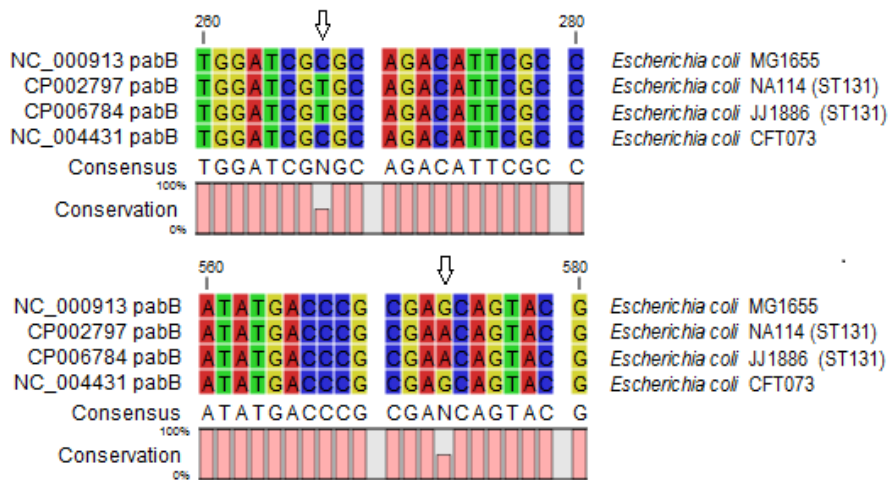


Abbildung 3-2: Sequenzalignment der relevanten Positionen des Gens *pabB* der vier *E. coli* Stämmen MG1655 (*E. coli* K-12) (NC_000913), NA114 (CP002797), JJ1886 (CP006784), und CFT073 (NC_004431). Erstellt mit CLC Sequence Viewer.

Legende: Die für *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs an den Positionen 267 und 573 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die ST131 Stämme NA114 und JJ1886 haben an der Position 267 ein Thyminnukleotid anstatt eines Cytosinnukleotids und an Position 573 ein Adeninnukleotid anstatt eines Guaninnukleotids.

Für die BSAC-Isolate und die ST131, sowie nicht-ST131 Referenzstämmen wurde die *trpA-pabB* Duplex-PCR nach Clermont *et al.* 2009, wie in Kap. 6.2.8.1 beschrieben, durchgeführt und nach Elektrophorese und Färbung ausgewertet. Es zeigte sich, dass das 426 bp große *trpA*-Fragment, welches als Positivkontrolle für die PCR dient, wie erwartet in allen Stämmen unabhängig vom ST131 Status amplifiziert wurde. Das 347 bp große *pabB*-Fragment wurde allerdings unspezifisch in ST131 sowie auch in nicht-ST131 Stämmen gebildet. Das dürfte nicht der Fall sein, wenn die Primer spezifisch binden und dadurch nur die SNP-enthaltenden Genabschnitte amplifiziert werden. Anpassungen der PCR-Bedingungen zur Optimierung um die Spezifität zu erhöhen, hinsichtlich Annealing-Temperatur, Temperaturprofil, Menge der eingesetzter DNA, mit dem Ziel einer den SNP selektiv erfassende Primerbindung, führten zu keinem ausreichend belastbaren Ergebnis. Die Methode nach Clermont *et al.* 2009 wurde daraufhin unter verschiedenen Gesichtspunkten modifiziert.

3.1.2.2 Modifizierung der Duplex-PCR zum Nachweis der für *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs in *pabB*

Die für *E. coli* ST131-O25b beschriebenen spezifischen SNPs in *pabB* (Clermont *et al.* 2009), sollten weiterhin mittels ARMS-PCR nachgewiesen werden. Ziel war es, die in der Literatur

beschriebenen Primer zu modifizieren, um eine robuste und zugleich spezifischere PCR zu etablieren. Die zu analysierenden SNPs in *pabB* liegen 306 bp auseinander.

Die Duplex-PCR wurde beibehalten, jedoch wurde als Positivkontrolle ein 526 bp großes Fragment des Gens *gyrA* ausgewählt, welches mit den Primern der *gyrA* PCR (vgl. Kap. 6.2.6.4) robust amplifiziert werden konnte. Zur selektiven Amplifizierung des Fragments zwischen den SNPs wurden die Primer (*forward* und *reverse*) angepasst. Beide wurden so modifiziert, dass die SNP-Position an zweitletzter Position lag und sie für die die SNPs tragenden Stämme (ST131) exakt passen (vgl. Kap. 6.2.8.2). So sollte nur ein Produkt gebildet werden, wenn beide SNPs vorliegen, wobei die Konzentration der *gyrA*-Primer zu Gunsten der *pabB*-(ARMS) Primer für das Analyt-Fragment reduziert wurde (vgl. Kap. 6.2.8.2). Die *pabB* (ARMS)-*gyrA*-Duplex-PCR wurde zunächst für die Referenzstämme durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3-3.

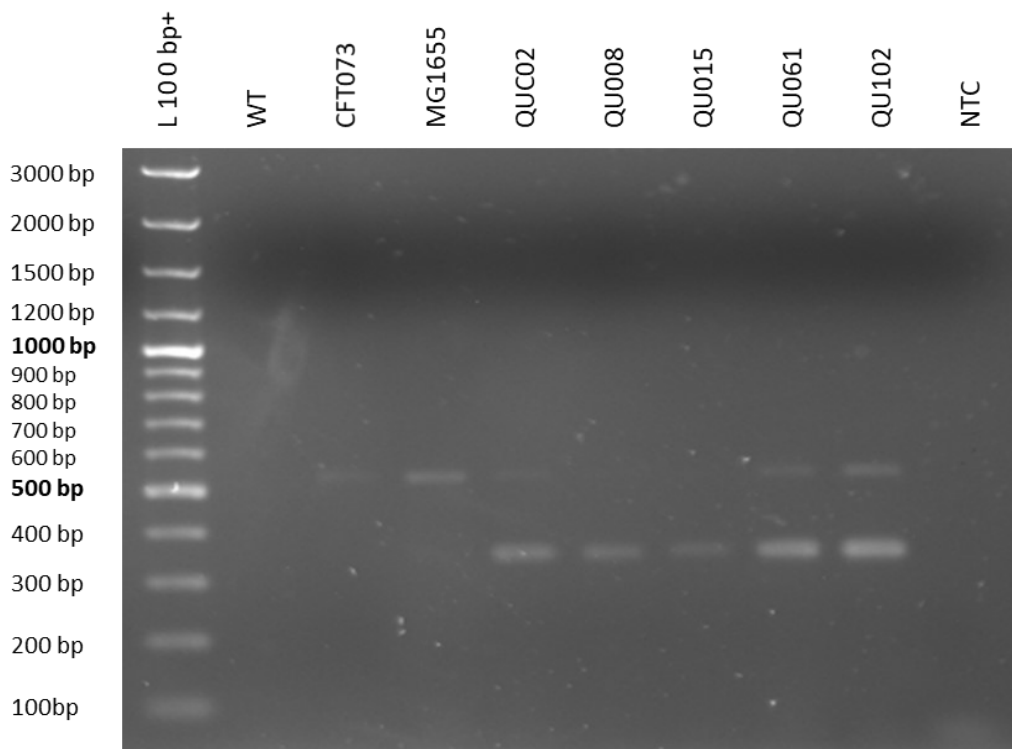


Abbildung 3-3: Ergebnis der *pabB* (ARMS)-*gyrA* Duplex-PCR nach Auftrennung der Produkte von *pabB* (347 bp) und *gyrA* (526 bp) in einem 1,6 %igen Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid. Zu sehen sind die DNA-Leiter GeneRuler 100 bp+ (L 100bp+), die drei nicht-ST131 Stämme (WT, CFT073 (Negativkontrolle) und MG1655, die fünf ST131-Stämme (QUC02, QU008, QU0015, QU061 und QU102 (Positivkontrolle), sowie die Negativkontrolle der PCR (NTC).

Unter den etablierten Bedingungen (vgl. Kap. 6.2.8.2) zeigte sich das 348 bp große Analyt-Fragment von *pabB* bei den ST131-O25b positiven (QU-) Stämmen und nicht in den nicht-

ST131 Stämmen. Dies war hinsichtlich des Analyt-Fragments ein sicheres Ergebnis, das das *pabB* Produkt spezifisch nur bei ST131 gebildet wurde. Das 526 bp große Fragment von *gyrA* wurde nur schwach gebildet und war in einigen Fällen nicht vorhanden. Dieser Effekt trat unerwartet auf, da sich das Fragment mit der für *gyrA* beschriebenen einzelnen PCR (T_{an} : 58° C) gut amplifizieren ließ (vgl. Kap. 6.2.6.4). Mögliche Gründe liegen in der veränderten Annealing-Temperatur der *pabB* (ARMS)-*gyrA*-Duplex-PCR bei 65° C (vgl. Kap. 6.2.8.2), oder in einer eventuell gegebenen Bindung der Duplex-PCR Primer untereinander (Primer-Dimere). Die Problematik bestand folglich darin, dass es kein Ergebnis gab, wenn keines der beiden Fragmente gebildet wurde, wie hier im Falle von WT (Abbildung 3-3), wobei ein gebildetes *pabB* Fragment (positive PCR) an sich bereits den Nachweis erbrachte. Da die ARMS-PCR auf *pabB* hier für alle ST131 Isolate positiv und für alle nicht-ST131 Stämme negativ war, und das beste Ergebnis vorangegangener Optimierungen darstellte, wurde sie für das Screening auf ST131-O25b verwendet. Waren entweder das *pabB*-Fragment oder beide Fragmente der Duplex-PCR vorhanden handelt es sich somit um einen ST131-O25b positiven *E. coli* Stamm. War nur das Kontrollfragment *gyrA* vorhanden um einen ST131-O25b negativen Stamm, wurde kein Fragment gebildet, war der Test nicht aussagekräftig.

3.1.2.3 Detektion von *E. coli* ST131-O25b mit der modifizierten *pabB* (ARMS)-*gyrA* Duplex-PCR

Unter den so etablierten Bedingungen wurde anschließend das Screening der klinischen Isolate auf *E. coli* ST131-O25b durchgeführt. Für 54 der insgesamt 78 Isolate war das Screening auswertbar, da die Kontrolle und / oder daneben das Analyt-Fragment amplifiziert wurde. Danach gab es 34 ST131-O25b positive Isolate und 20 negative (nicht-ST131) Isolate. Dementsprechend wurden 34 Stämme als ST131 Stämme detektiert. Die weiteren 24 Proben konnten nicht sicher ausgewertet werden, da das Kontrollfragment nicht oder nur sehr schwach amplifiziert wurde. Selbiges hatte sich bereits zuvor schon bei der Durchführung der *trpA-pabB* Duplex-PCR nach Clermont *et al.* 2009 gezeigt, die auch in vielen Fällen keine validen Ergebnisse lieferte (vgl. Kap. 3.1.2.1). Die Screening-Ergebnisse der Duplex PCR befinden sich zusammen mit den Ergebnissen des Pyrosequencings auf die für *E. coli* ST131 spezifischen SNPs im Anhang (Kap. 8.1.1 und 8.1.2).

Insgesamt zeigte sich beim Screening der B2 Isolate des BSAC-Kollektivs auch die optimierte Methode der *pabB* (ARMS)-*gyrA* Duplex-PCR für die Testung der klinischen Isolate als nicht ausreichend robust. Es konnten durch die Modifizierung zwar deutlich mehr Stämme typisiert werden, als nach Clermont *et al.* 2009, aber in vielen Fällen gab es kein Ergebnis. Daher wurde im Weiteren Pyrosequencing® für den direkten Nachweis der SNPs eingesetzt, sowohl um den ST131-O25b Status abzusichern als auch um die restlichen Isolate zu typisieren.

3.1.3 Bestimmung der *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs in *pabB*

Für einen direkten Nachweis der für *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs in *pabB* sollte die DNA-Sequenz an den relevanten Nukleotid-Positionen 267 und 573 des Gens bestimmt werden. Die zwei separaten Positionen innerhalb des Gens *pabB* konnten aufgrund ihrer Nähe zueinander in einer PCR gemeinsam amplifiziert werden. Für die Sequenzierung wurde als Methode Pyrosequencing® gewählt, da durch die Wahl geeigneter Sequenzierprimer die beiden SNPs jeweils direkt vom gleichen Template ausgehend bestimmt werden konnten. Die Versuchsanordnung zur Sequenzierung wurde mit dem PSQ-Assay Design Tool entworfen. Abbildung 3-4 zeigt den relevanten Abschnitt des Gens *pabB*, die verwendeten Primer für die Amplifikation des Templates und die Sequenzierung, sowie die Positionen der SNPs.

1	TACACTCCGG	CTATGCCGAT	CATCCGTATA	GCCGCTTTGA	TATTGTGGTC	GCCGAGCCGA	TTTGCACTTT	AACCACTTTC	GGTAAAGAAA	CCGTTGTAG
	ATGTGAGGCC	GATACGGCTA	GTAGGCATAT	CGGCGAAACT	ATAACACCAG	CGGCTCGGCT	AAACGTGAAA	TTGGTGAAAG	CCATTTCTTT	GGCAACAATC
			pabBAssaj1rv_223 100.0%			pabB_pyro-SNP_267 100.0%				
101	TGAAAGCGAA	AAACGCACAA	CGACCACTGA	TGACCCGCTA	CAAGGTGCTCC	AGCAGGTGCT	GGATGCGCA	GACATTCGCC	CAACGCATAA	CGAAGATTG
	ACITTCGCTT	TTTGCCTGTT	GCTGGTGACT	ACTGGGCGAT	GTCCACGAGG	TGTGCCAGGA	CCTAGCCGT	CTGTAAGCGG	GTTGCGTATT	GCTICTAAAC
201	CCATTTACAG	GCGGCGCACT	GGGTTGTTT	GGCTACGATC	TGGGCCGCGG	TTTTGAGTCA	CTGCCAGAAA	TTGCCGAAAC	AGATATCGTT	CTGCCGGATA
	GGTAAAGTCC	CGCCGCGTGA	CCCCAACAAA	CCGATGCTAG	ACCCGCGCGC	AAAACCTCAGT	GACGGTCTTT	AACGCCTTGT	TCTATAGCAA	GACGGCCTAT
301	TGSCAGTGGG	TATCTACGAT	TGGGCGCTCA	TTGTCCGACCA	CCAGCGTCAT	ACAGTTCTTT	TGCTGAGTCA	TAATGATGTC	AATGCCCGTC	GGGCCTGGCT
	ACCGTCACCC	ATAGATGCTA	ACCCGCGAGT	AACAGCTGGT	GGTCCGAGTA	TGTCAAAGAA	ACGACTCAGT	ATTACTACAG	TTACGGGCGAG	CCCGGACCGA
						pabB_pyro-SNP_573 100.0%				
401	GGAAAGCCAG	CAATTCTCGC	CGCAGGAAGA	TTTCACGCTC	ACTTCCGACT	GGCAATCCAA	TATGACCGC	GAACAGTACG	GCGAAAAATT	TGCCCAGGTA
	CCTTTCGGTC	GTTAAGAGCG	GCGTCCTTCT	AAAGTCCGAG	TGAAGGCTGA	CCGTTAGGTT	ATACTGGGCG	CTGTCATGC	CGCTTTTAA	AGCGGTCCAT
501	CAGGAATATC	TGCACAGCGG	TGATTGCTAT	CAGGTGAATC	TGCCCCAACG	TTTTCATGCG	ACCTATTCTG	GCGATGAATG	GCAGGCATTG	CTTCAGCTTA
	GTCCCTATAG	ACGTGTCGCC	ACTAACGATA	GTCCACTTAG	AGCGGGTTGC	AAAAGTACGC	TGGATAAGAC	CGTACTTAC	CGTCCGTAAG	GAAGTCGAAT
			pabBAssaj1a_630_rv-Biotin 100.0%							

Abbildung 3-4: Ausschnitt aus der Gensequenz von *pabB*. Die Binderegionen der PCR-Primer sind blau hinterlegt, dabei ist der reverse-Primer biotinyliert. Der mittels PCR amplifizierte Teil des Gens ist gelb markiert, die Bereiche der eingesetzten Sequenzierprimer rot und die zu analysierenden SNPs sind in pink hinterlegt.

Das Pyrosequencing® wurde für die relevanten Positionen der SNPs *pabB* 267 und *pabB* 573, wie in Kap. 6.2.13.1 beschrieben, durchgeführt. Zur Prüfung der Methode und zur Kontrolle wurden Referenzstämme mit bekannter Sequenz verwendet. Die *E. coli* Stämme MG1655 und

CFT073 dienten als Beispiele für nicht-ST131 Stämme und die Isolate QU008 und QU102 als Referenzstämme für *E. coli* ST131.

Bei den zu untersuchenden SNPs handelt es sich um *pabB*_267 (C/T) und *pabB*_573 (G/A). Die beiden *E. coli* Stämme CFT073 und MG1655 (nicht-ST131), wurden als Referenzproben verwendet und zeigten die erwarteten Nukleotide Cytosin an Position 267 und Guanin an Position 573. Der Stamm QU102 diene als Referenz für einen ST131 Stamm (Platell *et al.* 2011) und damit stets auch als Kontrollstamm. Die Pyrosequencing-Assays wurden nach Amplifikation des Target-Gens *pabB* der einzelnen Stämme für die zu testenden Stämme, Kontrollen und Referenzstämme durchgeführt. Die Pyrogramme des klinischen Isolats QU102 vom Typ ST131 zeigten an Position 267 das Vorhandensein eines Thyminnukleotids und an Position 573 das eines Adeninnukleotids (vgl. Abbildung 3-5), wie es in der Literatur für *E. coli* ST131-O25b beschrieben ist (Clermont *et al.* 2009). Die *pabB* SNPs der unbekanntenen Isolate aus der BSAC-Sammlung konnten im Folgenden ebenso mittels Pyrosequencing® bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die Isolate entweder keinen der für ST131-O25b spezifischen SNP aufwiesen oder beide SNPs. Eine Mischvariante kam nicht vor. So konnten eindeutig identifiziert werden, ob der ST131-O25b Typ vorliegt oder nicht. Einige der erhaltenen Pyrogramme sind exemplarisch in Abbildung 3-5 dargestellt.

SNP *pabB*_267 (C/T)

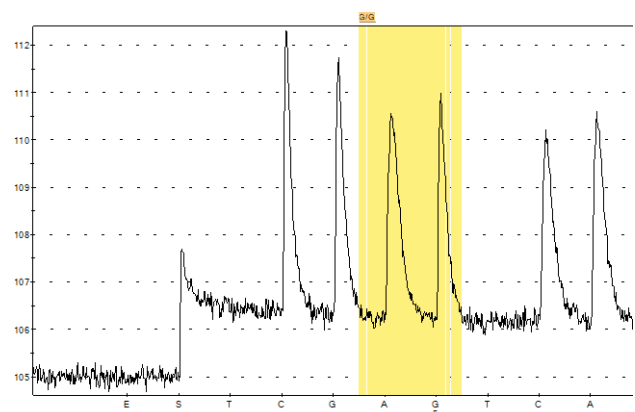
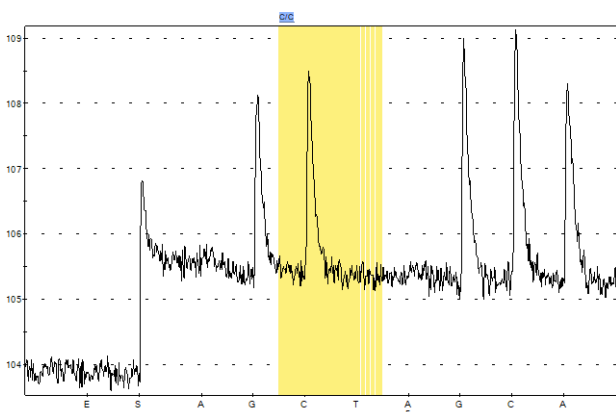
SNP *pabB*_573 (G/A)

A.1.

A.2.

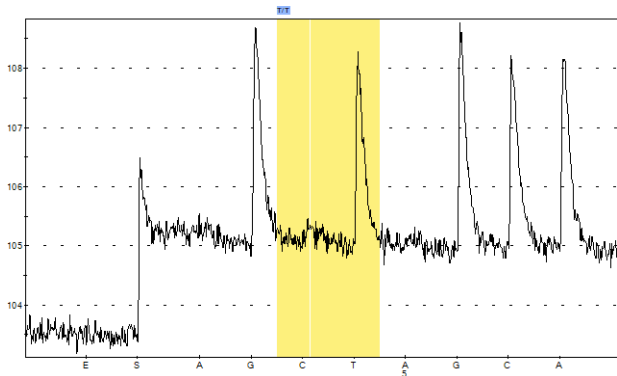
Entry: *pabB* SNP Position 267. Sample: MG1655. Position 1: C/C (Passed)

Entry: *pabB* SNP Position 573. Sample: MG1655. Position 1: G/G (Check)



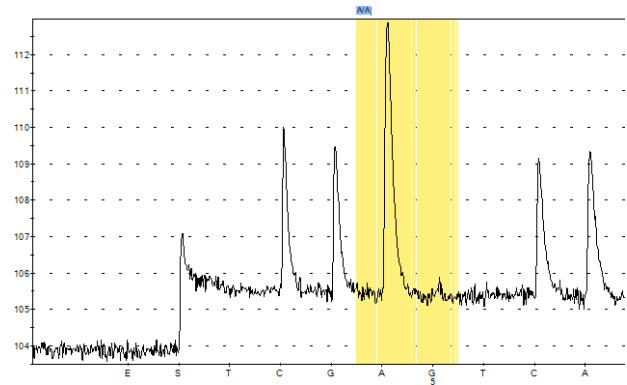
B.1.

Entry: *pabB* SNP Position 267. Sample: QU102. Position 1: T/T (Passed)



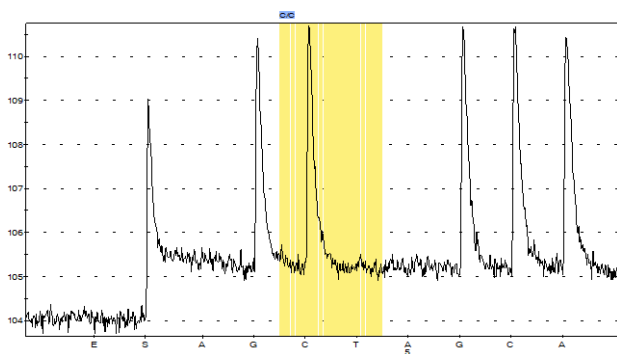
B.2.

Entry: *pabB* SNP Position 573. Sample: QU102. Position 1: A/A (Passed)



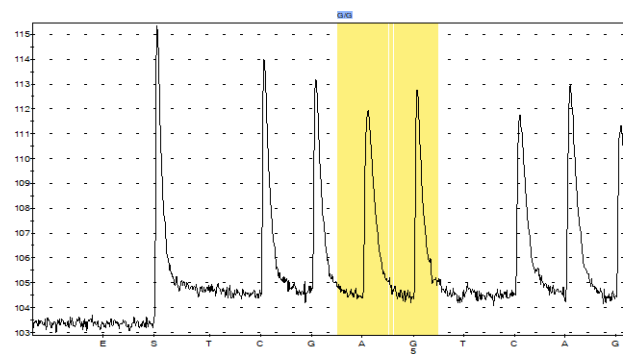
C.1.

Entry: *pabB* SNP Position 267. Sample: GK 2861. Position 1: C/C (Passed)



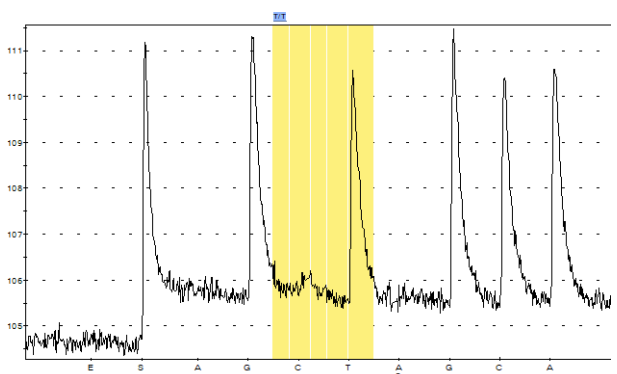
C.2.

Entry: *pabB* SNP Position 573. Sample: GK 2861. Position 1: G/G (Passed)



D.1.

Entry: *pabB* SNP Position 267. Sample: GK 2867. Position 1: T/T (Passed)



D.2.

Entry: *pabB* SNP Position 573. Sample: GK 2867. Position 1: A/A (Passed)

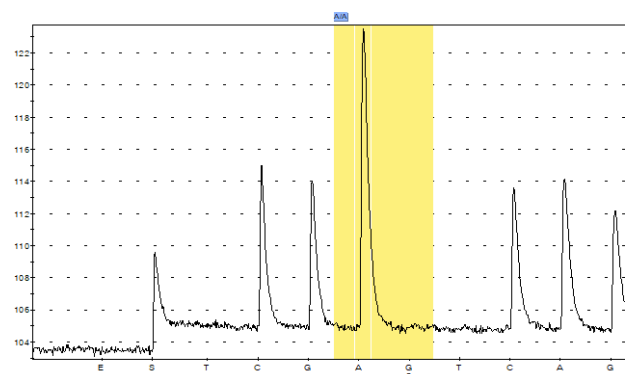


Abbildung 3-5: Dargestellt sind die Pyrogramme des Pyrosequencing® der beiden untersuchten SNPs in *pabB* für je zwei Referenz- und zwei Teststämme. Auf der jeweils linken Seite für die 1. Nukleotidposition 267 und auf der jeweils rechten Seite für die 2. Nukleotidposition 573. Die Diagramme A.1. und A.2. sind von *E. coli* MG1655, einem nicht-ST131 Stamm, die Diagramme B.1. und B.2. von *E. coli* QU102, einem klinischen ST131-O25b Isolat, die von C.1. und C.2 sowie D.1. und D.2. von zwei klinischen Isolaten mit den GK-Nummern 2861, welcher als nicht-ST131 identifiziert wurde sowie 2867, der beide SNPs aufwies und so eindeutig als ST131-O25b bestimmt wurde. Zur SNP-Auswertung sowie zur resultierenden *E. coli* ST131-O25b (positiv) oder nicht-ST131-O25b (negativ) Identifizierung vgl. Tabelle 3-1.

Die Pyrogramme für beide SNP-Positionen der Referenzstämme *E. coli* MG1655 (nicht-ST131) und QU102, als *E. coli* ST131 Isolat, sind in A.1. und A.2. bzw. B.1. und B.2. dargestellt. Die Nukleotide an den entsprechenden Stellen (gelb) konnten eindeutig bestimmt werden. Für die untersuchten Isolate sind die Ergebnisse ebenfalls eindeutig. Bei GK 2861 handelt es sich nicht und bei GK 2867 eindeutig um ein *E. coli* ST131-O25b Isolat. Das Pyrosequencing® wurde für die Referenzstämme und Isolate, sowie in der Breite vor allem für diejenigen Stämme durchgeführt, für die mittels der *pabB* (ARMS)-*gyrA* Duplex-PCR der ST131-O25b Status nicht bestimmt werden konnten. In Tabelle 3-1 sind exemplarisch die Ergebnisse der SNP-Analyse und entsprechende Zuordnung zu ST131-O25b (positiv) oder nicht-ST131-O25b (negativ) ausgewählter Stämme aufgeführt. Die Ergebnisübersicht aller getesteten Stämme befindet sich im Anhang (Kap. 8.1.2).

Tabelle 3-1: Exemplarische Ergebnisse des Pyrosequencing® einiger repräsentativer Stämme und Kontrollen für die einzelnen SNPs sowie die resultierende *E. coli* ST131-O25b Identifizierung (positiv) oder nicht-ST131-O25b (negativ).

<i>E. coli</i>	Stammdaten / Status	<i>pabB</i> _267 SNP (C/T)	<i>pabB</i> _573 SNP (G/A)	ST131-O25b
MG1655	Nicht-ST131 Referenz	C	G	negativ
CFT073	Nicht-ST131 Referenz	C	G	negativ
WT	Nicht-ST131 Referenz	C	G	negativ
QU008	ST131-O25b Referenz	T	A	positiv
QU102	ST131-O25b Referenz	T	A	positiv
-	Kontrolle Seq.-primer 251	no signal	no signal	-
-	Kontrolle Seq.-primer 533	no signal	no signal	-
-	No Template Kontrolle (NTC)	no signal	no signal	-
GK 2929	Klinisches <i>E. coli</i> B2-Isolat	T	A	positiv
GK 2867	Klinisches <i>E. coli</i> B2-Isolat	T	A	positiv
GK 2876	Klinisches <i>E. coli</i> B2-Isolat	C	G	negativ
GK 2861	Klinisches <i>E. coli</i> B2-Isolat	C	G	negativ
GK 2833	Klinisches <i>E. coli</i> B2-Isolat	C	G	negativ

Der Pyrosequencing®-Assay funktionierte zuverlässig, war eindeutig in der Auswertung und eignete sich optimal zur Bestimmung der SNPs in den klinischen Isolaten. Er wurde verwendet, um die Stämme erstmals zu bestimmen bzw. das Resultat aus dem Screening zu bestätigen.

Dabei zeigte sich für alle positiv auf das ST131-O25b spezifische *pabB*-Fragment getesteten Stämme (vgl. Kap. 3.1.2.2) das Vorliegen beider SNPs. Die für das *pabB*-ARMS PCR-Fragment negativ getesteten Stämme wurden alle als ST131-O25b negativ bestätigt (Wildtyp-Variante, kein SNP). Die 24 im *pabB* (ARMS)-*gyrA* Duplex-PCR Screening nicht auswertbaren Isolate konnten so bestimmt werden. Von diesen waren weitere fünf ST131-O25b positiv, die anderen 19 waren negativ, also nicht-ST131-O25b (vgl. Tabelle 8-1 im Anhang). Insgesamt waren so von den 78 Stämmen der Phylogruppe B2 39 Isolate positiv und 39 negativ.

3.2 *E. coli* ST131-O25b im BSAC-Kollektiv 2001-2004

Aus den insgesamt 175 *E. coli* Isolaten der BSAC-Studie aus den Jahren 2001-2004 waren insgesamt 78 *E. coli* Isolate aus der Phylogruppe B2 (vgl. Kap. 3.1.1). Diese 78 B2 Isolate wurden, wie zuvor beschrieben, auf die für ST131-O25b spezifischen SNPs analysiert. Dabei waren 39 Isolate positiv und 39 Isolate negativ (je 50 %). Die Ergebnisse sind insgesamt und nach Jahren aufgeschlüsselt in Tabelle 3-2 zusammengestellt. Aufgezeigt ist jeweils die absolute Anzahl der Isolate [N] sowie ihr Anteil [%] in Bezug auf das Gesamtkollektiv (175 Isolate) sowie auf die Stämme der Phylogruppe B2 (78 Isolate).

Tabelle 3-2: Prävalenz von *E. coli* ST131-O25b Isolaten im untersuchten Kollektiv aus dem BSAC Surveillance Programm. Dargestellt sind die Ergebnisse der ST131-O25b-Zugehörigkeit absolut und prozentual in Bezug auf die Gesamtmenge der Isolate sowie auf die Isolate der Phylogruppe B2 über die Jahre 2001-2004.

<i>E. coli</i> Isolate nach Jahr	2001	2002	2003	2004	2001-2004
<i>E. coli</i> Isolate insgesamt [N]	31	36	44	64	175
<i>E. coli</i> Phylogruppe B2 Isolate [N]	12	15	13	38	78
<i>E. coli</i> ST131-O25b Isolate [N]	0	4	7	28	39
ST131-O25b Anteil an B2	0 %	26,7 %	53,9 %	73,7 %	50 %
ST131-O25b Anteil gesamt	0 %	11,1 %	15,9 %	43,8 %	22,3 %
B2-Nicht-ST131-O25b Isolate [N]	12	11	6	10	39
B2-Nicht-ST131-O25b Anteil an B2	100 %	73,3 %	46,2 %	26,3 %	50 %
Nicht-ST131-O25b Isolate [N]	31	32	37	36	136
Nicht-ST131-O25b Anteil gesamt	100 %	88,9 %	84,1 %	26,3 %	77,7 %

Die Anteile der ST131 Stämme an den B2-Stämmen und am Gesamtkollektiv sind in Kap. 4.1.2 nochmal graphisch dargestellt.

3.2.1 Fluorchinolonresistenz der *E. coli* ST131-O25b Stämme im Vergleich zu nicht-ST131

Die MHK-Werte der 39 identifizierten *E. coli* ST131-O25b Isolate für Ciprofloxacin lagen im Bereich von 0,25-256 µg/mL. Somit waren alle *E. coli* ST131-O25b Isolate (100 %) resistent gegen Ciprofloxacin (MHK Cip ≥ 0,25 µg/mL). Die nicht-ST131 Isolate zeigten insgesamt deutlich niedrigere MHK-Werte, sie waren nur zu 28 % resistent und zu 72 % empfindlich für Ciprofloxacin (MHK Cip < 0,25 µg/mL). Detaillierte Werte sind Tabelle 3-3 zu entnehmen.

Tabelle 3-3: Verteilung der Ciprofloxacin MHK-Werte der ST131-O25b und nicht-ST131 Stämme des BSAC-Kollektivs

MHK Ciprofloxacin [µg/mL]*	ST131-O25b Isolate [N]	nicht-ST131 Isolate [N]
256	3	-
128	7	-
64	6	-
32	15	-
16	3	1
8	1	-
4	-	1
2	-	-
1	-	-
0,5	1	-
0,25	3	9
< 0,25	-	28
Isolate Gesamt	39	39

Legende: -: kein Isolat. * MHKs Bestimmt durch AG Heisig, vgl. auch Pub.-Liste: ECCMID 2015.

3.3 Rapid-Parallel Multilocus Sequencing Typing (RP-MLST)

Mit der in dieser Arbeit etablierten Anwendung des Rapid-Parallel MLST (RP-MLST) wurde, wie in Kapitel 6.2.15.2.3 beschrieben, die DNA der ausgewählten *E. coli* Isolate mittels NGS sequenziert. Ziel der Sequenzierung war es, die Housekeeping-Gene für die ST-Bestimmung nach Achtman bzw. Pasteur sowie einige Target-Gene analysieren zu können.

Das global am weitesten verbreitete MLST-Schema nach Achtman vergleicht Sequenzabschnitte der Housekeeping-Gene *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, und *recA* (Wirth *et al.* 2006). Beim zweit-populärsten Schema des Institut Pasteur werden dagegen Sequenzen von *dinB*, *icd*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* und *uidA* analysiert (Jaureguy *et al.* 2008). Die Bestimmung aller Sequenzen beider Schemata liefert dementsprechend mehr Informationen (vgl. Kap. 1.5.3.3). Aus diesem Grund wurden beide MLST-Schemata eingeschlossen und daneben eine Auswahl an Resistenzgenen, resistenzassoziierten Genen sowie Genen, in denen Resistenz vermittelnde Mutationen auftreten könnten (Target-Gene), um molekulargenetische Ursachen der vorliegenden Resistenzen zu ermitteln. Untersucht wurden *gyrA*, *parC*, *acrRAB*, *marRA*, *ompC*, *ompF*, *envZ*, *ompR* und wenn präsent *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* und *bla_{CTX-M}*. Die Ergebnisse für die jeweils untersuchten Kollektive (BSAC- und QU-Stämme bzw. PEG-Studie 2016) sind in den Kapiteln 3.4: RP-MLST I bzw. 3.6.4: RP-MLST II beschrieben.

3.3.1 Fragmentierung der DNA-Pools

Ausgangsmaterial für die RP-MLST NGS-Sequenzierung war der gereinigte DNA-Fragment Pool eines Stammes (vgl. Kap. 6.2.16.1.3). Dieser enthielt PCR-Produkte unterschiedlicher Größe, die für die Sequenzierung auf dem Ion Torrent™ System weiter fragmentiert werden mussten. Wie in Abbildung 3-6 zu sehen ist, lagen die DNA-Fragmente der MLST-Pools in einer Größenordnung von ca. 400-2000 bp, in einigen Fällen sogar bei bis zu 2800 bp. Durch Fragmentierung sollte die richtige Größe für die NGS-Sequenzierung erreicht werden und gleichzeitig alle amplifizierten Bereiche in den Fragmenten auch abgebildet sein. Ziel war eine homogene Verteilung der Fragmente bei optimaler Fragmentierung im Zielbereich von 200 bp-550 bp Größe (grün dargestellt in Abbildung 3-6).

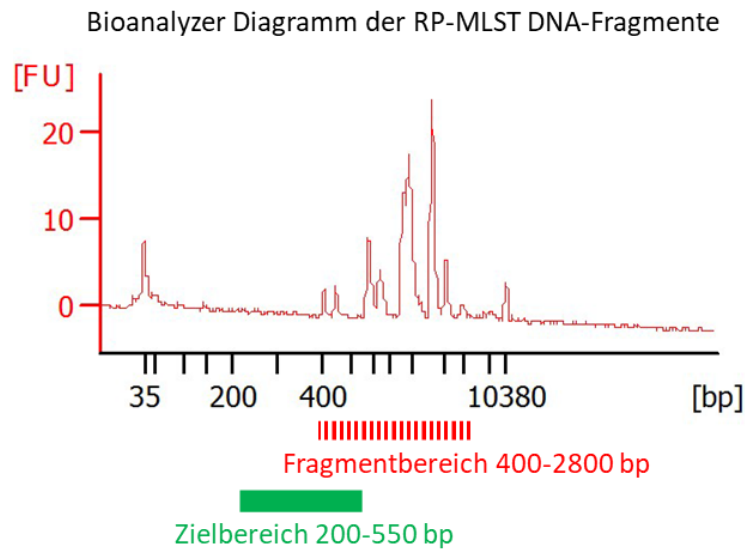


Abbildung 3-6: Bioanalyser-Diagramm der DNA-Fragmente eines ungescherten RP-MLST-Pools. Dargestellt sind die Fluoreszenzeinheiten [FU] gegen die Größe der DNA in Basenpaaren [bp]. Der rote gestrichelte Balken markiert den Bereich der Ausgangsgrößen der DNA-Fragmente im Pool (400-2800 bp), der grüne Balken den Bereich der Zielgrößen für die Sequenzierung (200-550 bp).

Die Zerkleinerung der DNA-Fragmente wurde zunächst mit Ultraschall durchgeführt. Dies wird aufgrund der wirkenden Scherkräfte auch Scherung genannt.

3.3.1.1 Scherung mit Ultraschall

Die DNA-Pools für das RP-MLST wurden zur Zerkleinerung in 10 Zyklen à 30 s mit je 30 s Pause im Ultraschallbad mit Ultraschall behandelt (Kap. 6.2.16.1.4) und anschließend mittels hochauflösender Mikrokapillarelektrophorese (Bioanalyser) analysiert (vgl. Kap. 6.2.12.3). Die resultierenden Ergebnisse dieser Scherung sind in Abbildung 3-7 zu sehen.

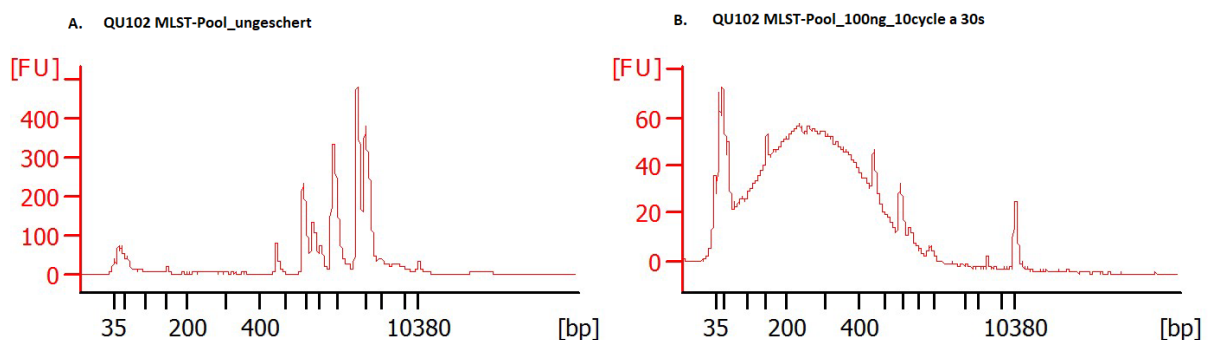


Abbildung 3-7: Bioanalyser Diagramme von 100 ng DNA-Fragmenten des MLST-Pools von QU102 (GK 3443). Links in A. ist das Profil der ungescherten DNA-Fragmente zu sehen und rechts in B. das mit Ultraschall (10 Zyklen à 30 s, mit 30 s Pause) behandelte.

Unter diesen Bedingungen wurde für QU102 (GK 3443) initial ein guter Zerkleinerungsgrad erreicht. Auf weitere Proben angewandt zeigte sich für einige MLST-Pools, wie z. B. denen von GK 2881 und GK 2922 eine gute Zerkleinerung auf die Zielgrößen von 200-400 bp. Für andere Proben waren die Ergebnisse unter diesen Parametern allerdings nicht ausreichend, wie bei QU015 und GK 2826, deren Resultate einer nicht gescherten Probe nahekommen. Die Ergebnisse einiger gescherteter Proben sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

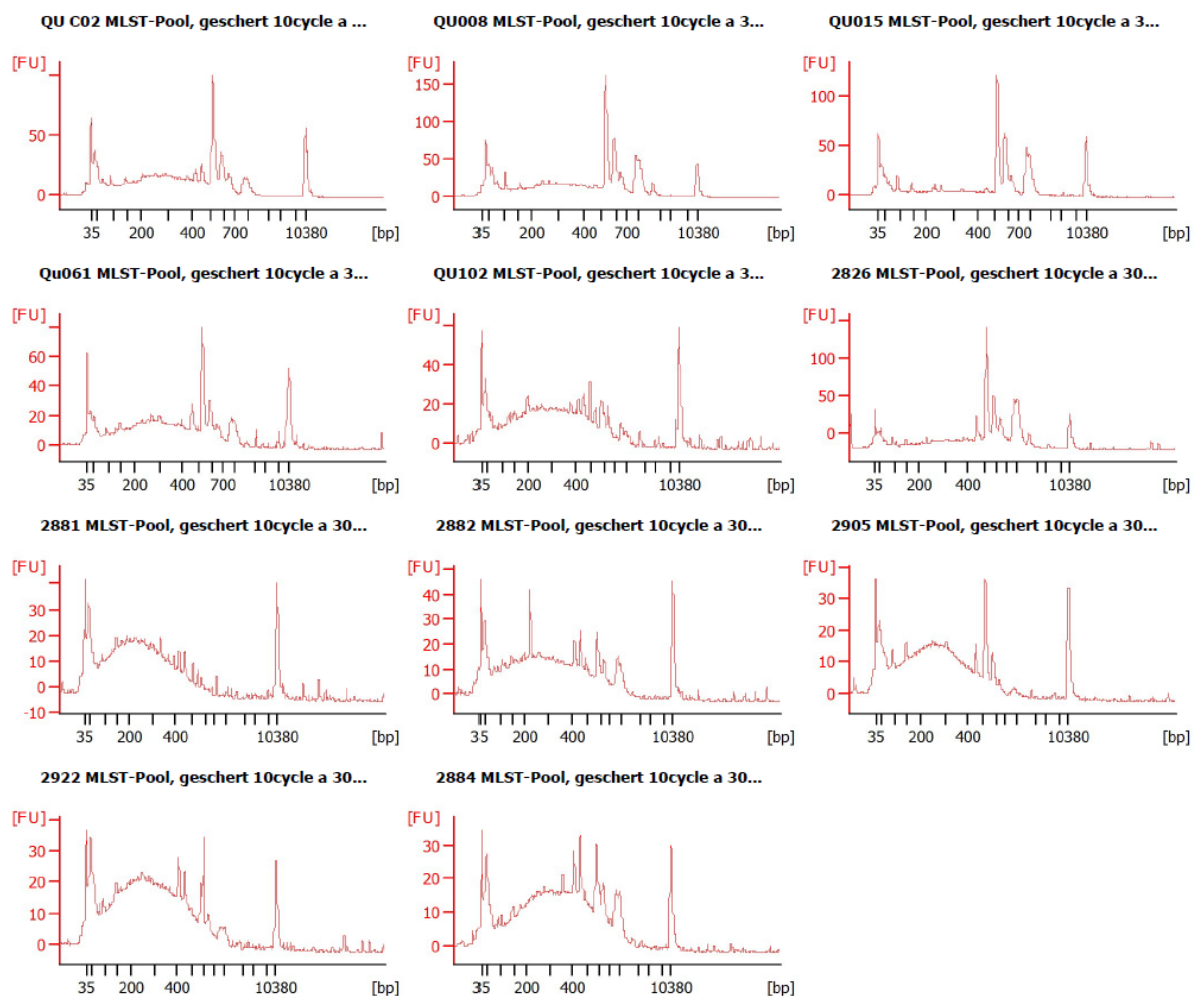


Abbildung 3-8: Bioanalyser Diagramme von 11 unter gleichen Bedingungen (10 Zyklen à 30 s, mit 30 s Pause) gescherten RP-MLST DNA-Fragment Pools. Dargestellt ist die detektierte DNA-Menge in [FU] gegen die Verteilung nach Größe in [bp].

Der Grad der Zerkleinerung und die Verteilung der Fragmentgrößen der einzelnen Proben war nach einheitlicher Behandlung mit Ultraschall insgesamt sehr unterschiedlich. Bei einigen Proben wurde eine gleichmäßige Verteilung erreicht, wie z. B. bei GK 2881 und QU102. Bei anderen, wie z. B. bei QU008, QU015 und 2826, resultierten zu viele große Fragmente.

Die Profile der Proben waren insgesamt sehr unterschiedlich, teilweise unzureichend und zudem nicht zuverlässig reproduzierbar. Aufgrund dessen wurde die Zerkleinerung der DNA-Fragmente von der Scherung mit Ultraschall auf die enzymatische Fragmentierung umgestellt.

3.3.1.2 Enzymatische Fragmentierung

Da die Scherung mit Ultraschall unzureichende Ergebnisse lieferte, sollte eine Methode der enzymatischen Fragmentierung etabliert werden. Ziel war es dabei, die PCR-Produkte homogen zu zerkleinern und den benötigten Grad der Zerkleinerung zu erreichen.

Die Fragmentierung der PCR-Produkt-Pools wurde mit dem Enzym Fragmentase durchgeführt (vgl. Kap. 6.2.11.2). Die zu zerkleinernden DNA-Fragmente reichten von ca. 400-1210 bp, bzw. je nach Größe der Target-Gene sogar bis 2000 bp (*envZ*), (vergleiche Kap. 3.7.1). Der gewünschte Zerkleinerungsgrad war so gewählt, dass Fragmente mit einer Länge von 200-400 bp und bis zu 550 bp erreicht würden, der Leistung des Sequenzierungssystems (Ion Torrent™) und den verwendeten Kits entsprechend (vgl. Kap. 6.1.6). Eine den Anforderungen entsprechende Fragmentierung konnte mit der DNA-Fragmentase erreicht werden. Die Ergebnisse zweier fragmentierter Proben mit hinzugegebenen, nicht fragmentierten PCR-Produkten von *gyrA* und *parC* zeigen die Bioanalyzer Diagramme in Abbildung 3-9.

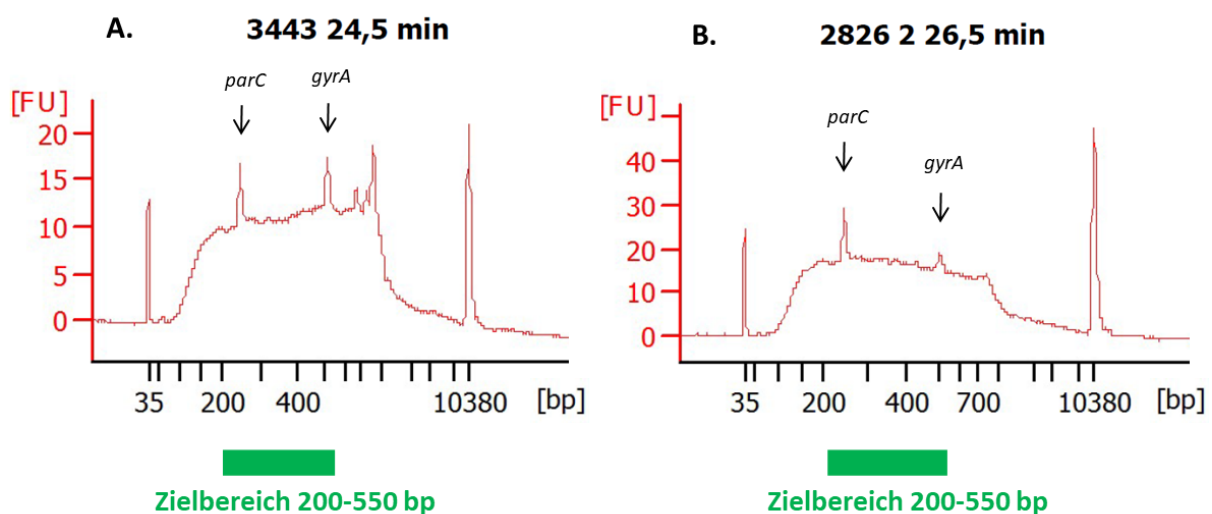


Abbildung 3-9: Bioanalyzer Diagramme der mit Fragmentase gescherten RP-MLST DNA-Pools von A.: QU102 (GK 3443), geschert für 24,5 Minuten und B. GK 2826, geschert für 26,5 Minuten. Jeweils mit den zugefügtem PCR-Produkten von *parC* (236 bp) und *gyrA* (526 bp). Aufgetragen sind Fluoreszenzunits [FU] gegen die Fragmentgrößen in Basenpaaren [bp]. Unter den Diagrammen ist in Grün der Bereich der DNA-Zielgrößen von 200-550 bp markiert.

Fragmente, die aufgrund ihrer Ausgangsgröße nicht weiter zerkleinert werden mussten, wie das PCR-Produkt von *parC* (236 bp) und *gyrA* (526 bp), wurden nach der Fragmentierung in einer Menge von ca. 1 ng zum Ansatz hinzugegeben, da ihre Größen von vornherein in den sequenzierbaren Bereich fielen. Sie erscheinen in den Diagrammen an entsprechender Stelle meist als Peaks (vgl. Abbildung 3-9, Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11).

Weitere Ergebnisse dieser Fragmentierungen sind in Abbildung 3-10 zu sehen.

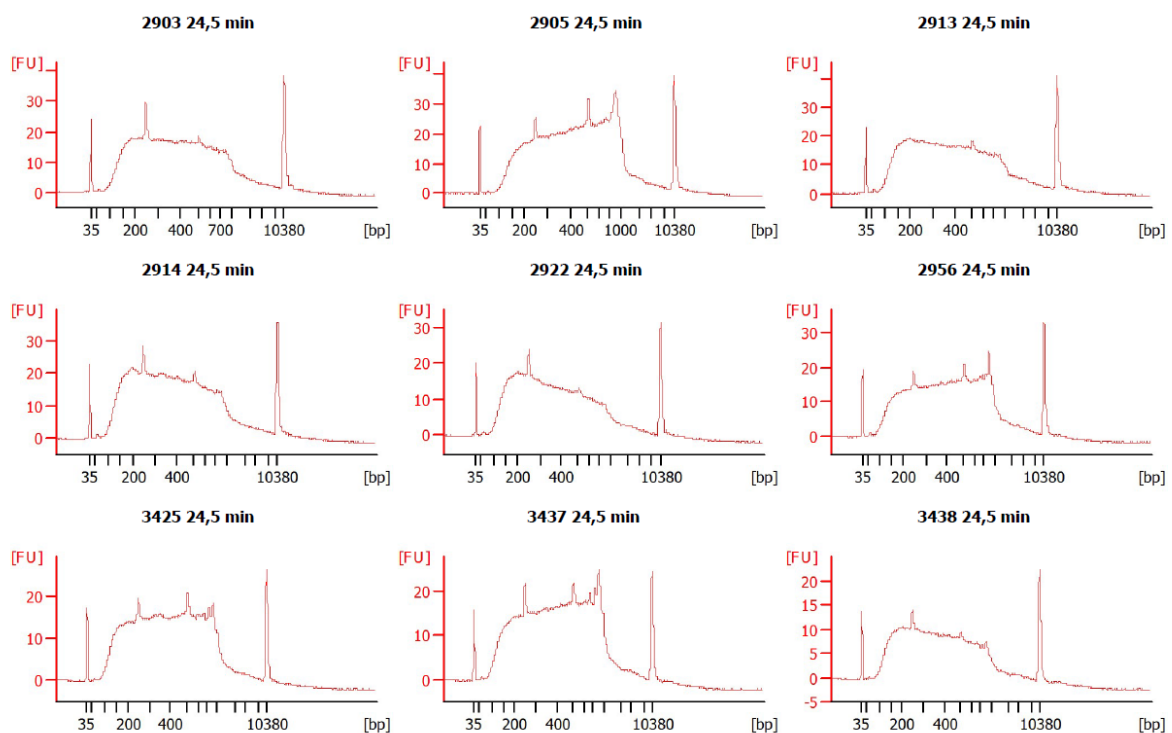


Abbildung 3-10: High Sensitivity DNA Assay der enzymatisch für 24,5 min gescherten DNA-Fragment-Pool Proben für das RP-MLST. Abgebildet sind die Diagramme von neun verschiedenen Proben. Sie zeigen die Fluoreszenzunits [FU] der detektierten DNA in Abhängigkeit der Fragmentgröße [bp], nach Auftrennung in Gelkapillaren auf dem Bioanalyzer Instrument.

Ein gutes Ergebnis mit dem gewünschten Zerkleinerungsgrad stellte sich für die verschiedenen Proben unter Einsatz von 1 μ L Fragmentase ab einer Inkubationszeit von 24,5 Minuten ein, Zeit und Bedingungen wurden in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die Proben wurden so zur Präparation der Library verwendet.

Da einige Proben bei diesen Bedingungen allerdings noch eine relativ starke Verteilung im höheren Größenbereich zeigten, wurde die Inkubationszeit für die weiteren Pools zur RP-

MLST Sequenzierung im Folgenden noch erhöht. Die Ergebnisse der Fragmentierung mit 1 µL Fragmentase für dann 26,5 Minuten sind in Abbildung 3-11 dargestellt.

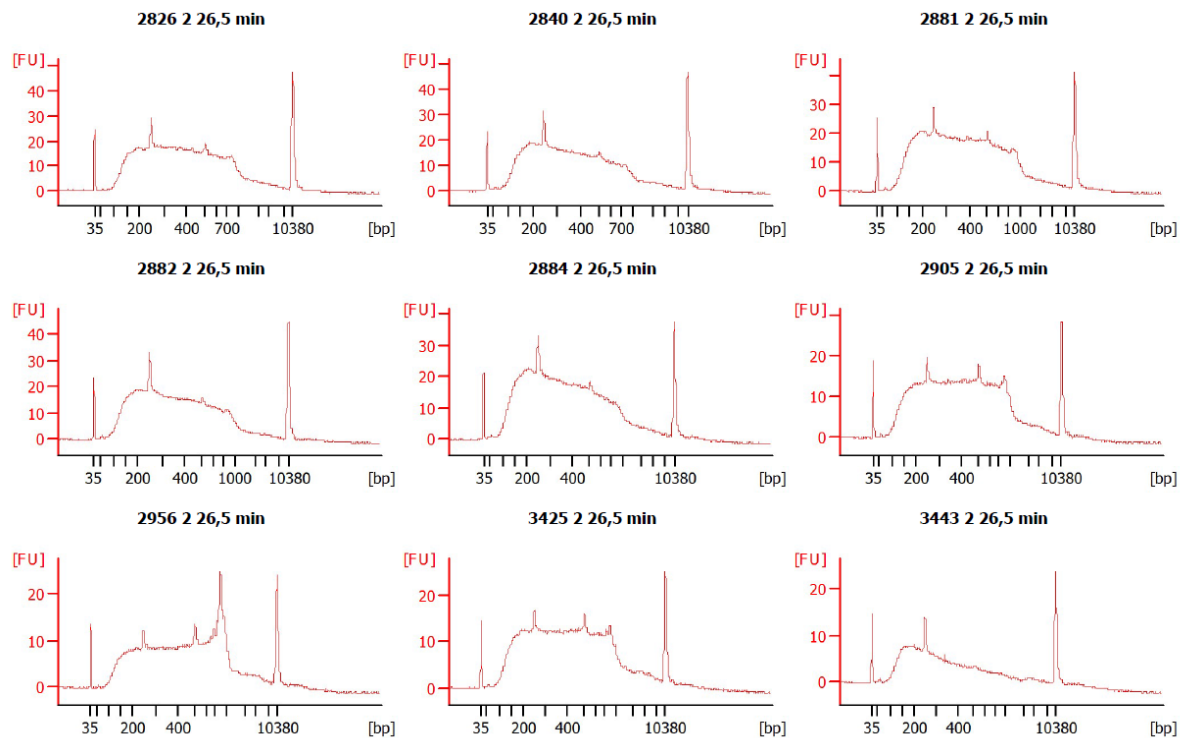


Abbildung 3-11: High Sensitivity DNA Assay der enzymatisch für 26,5 min gescherten DNA-Fragment Pools für das RP-MLST. Abgebildet sind neun Diagramme verschiedener Proben nach Auftrennung in Gelkapillaren mit den Fluoreszenzunits [FU] der auf dem Bioanalyser Instrument detektierten DNA in Abhängigkeit ihrer Größe in Basenpaaren [bp].

Es zeigte sich bis auf einzelne Abweichung, wie z. B. bei Probe 2956 2, die eher schwach geschert ist, und bei 3443 2, die schon sehr weit verdaut ist, ein relativ homogenes Bild. Insgesamt entsprachen die Ergebnisse den Anforderungen an Schergrad, Verteilung und Konzentration der Fragmente im Zielbereich. Die resultierenden, fragmentierten und aufbereiteten Pools wurden im Anschluss so für die Präparation der NGS-Library verwendet.

3.3.2 Präparation der NGS-Library

Die gescherten PCR-Pools wurden einer Größenselektion mit magnetischen Beads unterzogen (vgl. Kap. 6.2.16.2.1), bei der diejenigen DNA-Fragmente, die sich im Zielgrößenbereich befanden, isoliert wurden. Von diesen ausgehend wurde von jeder Probe eine NGS-Library mit einem Barcode erstellt. Dieser Barcode (BC) mit Nummer (1-16) ist eine spezielle Sequenz, die der Zuordnung der Proben dient und bei der Präparation an jedes Fragment adaptiert wird.

Die fertigen Libraries der einzelnen Proben wurden auf dem Bioanalyzer auf ihre Qualität hin kontrolliert und quantifiziert. Das Ergebnis von QU102 (GK 3443) zeigt Abbildung 3-12.

Library 3443 BC: 15

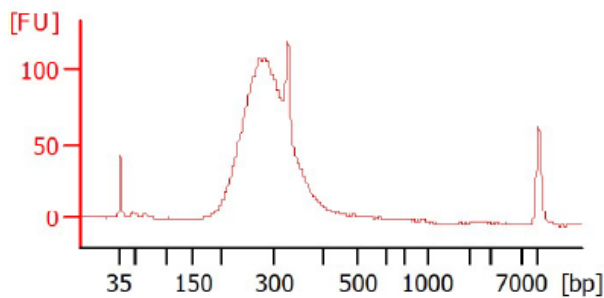


Abbildung 3-12: Bioanalyzer Diagramm der präparierten Library von QU102 (GK 3443), versehen mit dem Barcode Nr. 15 (BC: 15). Aufgetragen sind Fluoreszenzeinheiten [FU] gegen die DNA-Fragmentgröße in Basenpaaren [bp].

Die Bioanalyzer-Diagramme weiterer Libraries der BSAC-/ und Queensland-Stämme, sowie von Stämmen aus der PEG-Studie 2016 sind in Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14 dargestellt.

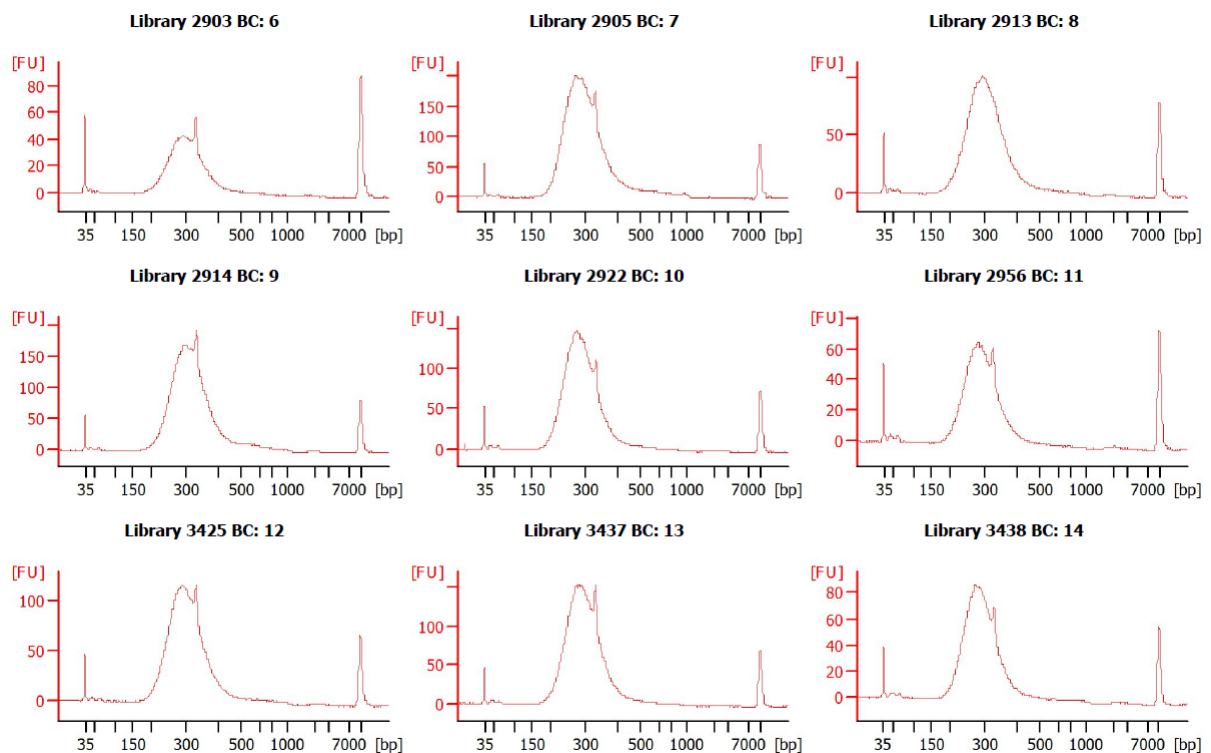


Abbildung 3-13: Bioanalyzer Diagramme der Libraries nach Präparation mit den Barcode-Adaptoren von 9 Proben der BSAC-/ und Queensland-Stämme auf *E. coli* ST131 Isolate. Aufgetragen sind Fluoreszenzeinheiten [FU] gegen die Fragmentgrößen in Basenpaaren [bp].

Ergebnisse

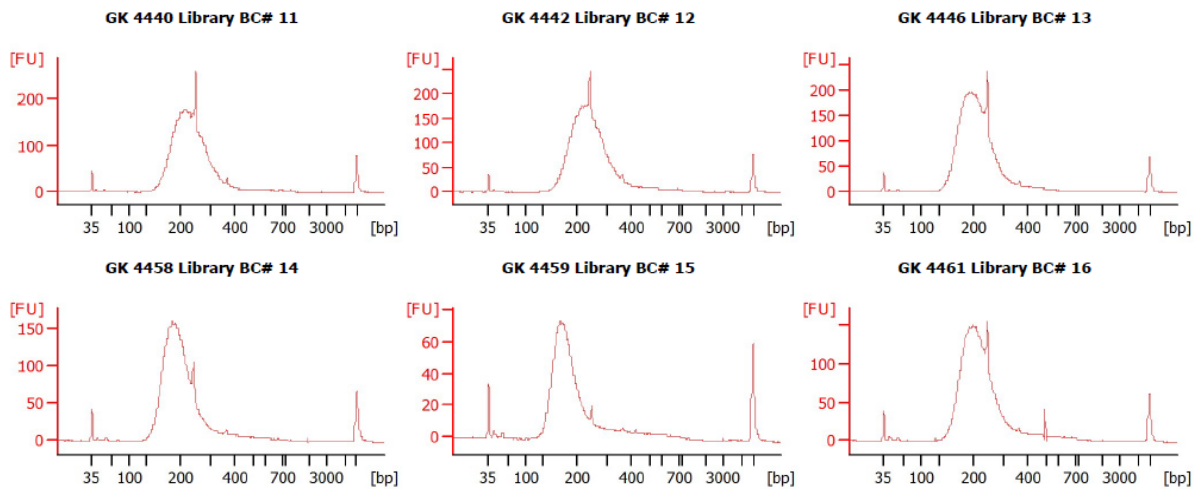


Abbildung 3-14: Bioanalyzer Diagramme der Libraries nach Präparation mit den Barcode-Adapttern von 6 Stämmen aus der PEG-Studie 2016. Aufgetragen sind Fluoreszenzunits [FU] gegen die Fragmentgrößen in Basenpaaren [bp].

Die auf diese Weise erstellten, mit je einem Barcode versehenen Libraries der RP-MLST Proben entsprachen den Anforderungen in Beschaffenheit und Konzentration. Sie wurden im Folgenden auf dem Ion Torrent™ parallel sequenziert. Die Libraries wiesen in allen Fällen die richtige Größenverteilung auf und in fast allen Fällen eine hohe Qualität. Lediglich bei drei Proben war die Library sehr gering konzentriert, sie sind in Abbildung 3-15 zu sehen.

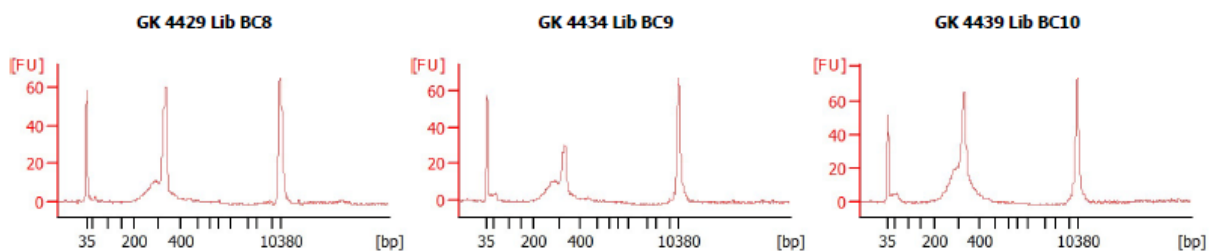


Abbildung 3-15: Bioanalyzer Diagramme dreier schwach konzentrierter Libraries der Stämme GK 4429, GK 4434 und GK 4439. Aufgetragen sind Fluoreszenzunits [FU] gegen die Fragmentgrößen in Basenpaaren [bp].

Im Verhältnis zur gesamten DNA-Menge war bei ihnen der *parC* Peak überproportional stark und nahm einen Großteil der gesamten DNA-Menge ein, insbesondere bei GK 4429. Diese Proben wurden trotzdem verwendet, um zu testen ob sie in der Parallel-Sequenzierung noch ausreichende Ergebnisse erzielen oder nicht.

Die Ergebnisse der dieser RP-MLST NGS-Sequenzierungen auf dem Ion Torrent™ sind in den Kapiteln 3.4 (RP-MLST I) bzw. 3.7 (RP-MLST II) für die verschiedenen Kollektive aufgeführt.

3.4 RP-MLST I – Analyse eines Kollektivs der BSAC- und QU-Stämme

Das für die RP-MLST Sequenzierung ausgesuchte Kollektiv bestand aus 16 *E. coli* Stämmen aus England und Queensland, die auf Basis der Ergebnisse des *pabB* SNP-Screenings im Hinblick auf ST131 ausgewählt wurden (vgl. Kap. 3.1.2.3). Unter ihnen waren fünf der QU-Stämme aus Australien (Platell *et al.* 2010) und elf der BSAC-Stämme aus England (Reynolds *et al.* 2008; The British Society for Antimicrobial Chemotherapy 2023). Mit der Analyse dieses Kollektivs sollte untersucht werden, ob in England bereits 2001-2004 *E. coli* ST131 Isolate als Erreger von klinischen Infektionen auftraten. Daneben diene sie auch als „*Proof of principle*“ für die Identifizierung von *E. coli* ST131 Stämmen mit RP-MLST.

Die fünf QU-Stämme waren bereits vorher als Isolate der Phylogruppe B2 charakterisiert und aufgrund von spezifisch gefundenen SNPs in *mdh* und *gyrB* sowie der ST131-O25b assoziierten *rfb* Variante als *E. coli* ST131 Isolate beschrieben (Platell *et al.* 2010). Sie dienten daher als Referenzen und Positiv-Kontrollen für ST131. Außerdem wurden gerade diese fünf ST131 Isolate ausgesucht, da sie sich in ihren Resistenzeigenschaften sehr unterschieden (vgl. Kap. 3.12), um vorhandene Mutationen in resistenzassoziierten Genen zu detektieren.

Die elf BSAC-Stämme wurden *de novo* MLST bestimmt und durch das RP-MLST gleichzeitig ihre Resistenz- und Target-Gene untersucht. Von ihnen waren zuvor neun positiv auf die *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs gescreent worden und zwei negativ (vgl. Kap. 3.1.2.3). Diese Ergebnisse wiesen bereits auf das Vorkommen von *E. coli* ST131 hin.

3.4.1 MLST-Analyse nach Achtman

Die durch RP-MLST erhaltenen Sequenzen wurden mit einem *E. coli* ST131 Referenzstamm wie *E. coli* NA114 oder *E. coli* JJ1886 (vgl. Kap. 6.1.1.4) abgeglichen und anschließend ausgewertet. Dazu wurden die Abweichungen von der Referenz für alle Genloci ermittelt. Keine Abweichung (0) bedeutet, dass die Sequenz genau der des Sequenz Type (ST) 131 entspricht. Trifft dies für alle der sieben definierten Genabschnitte zu, ist der ST131 schon allein durch den Sequenzabgleich bestätigt, da eine vollständige Übereinstimmung vorliegt. Bei Abweichungen von der Referenz wurden alle Sequenzen der einzelnen Gene mit der MLST

Datenbank (Enterobase 2023) abgeglichen und der *Sequence Type* aus der jeweiligen Kombination ermittelt.

Die vergleichende Analyse gegen einen *E. coli* ST131 Referenzstamm ließ die vorhandenen Abweichungen von dieser Referenz sehr schnell erkennen. In Tabelle 3-4 sind, beispielhaft für zwei ST131 Isolate und zwei nicht-ST131 Isolate, die Anzahl der Sequenzunterschiede numerisch (abweichende Nukleotide) für alle MLST relevanten Genloci zu dem ST131 Referenzstamm *E. coli* NA114 bzw. *E. coli* JJ1886 dargestellt. Eine Darstellung der MLST-Sequenzen mit den jeweiligen Abweichungen findet sich im Anhang, in Kap. 8.4.2.

Tabelle 3-4: Exemplarische Darstellung für vier der RP-MLST sequenzierten Stämme im Vergleich zur Referenzsequenz von E. coli NA114 bzw. E. coli JJ1886 (ST131 Referenzstämme). Dargestellt sind die Unterschiede der erhaltenen Sequenzen als Anzahl (N) der Abweichungen je Gen, sowie der resultierende Sequence Type in Bezug auf ST131. Isolat eo791 zeigte keine Abweichung zur Referenzsequenz und ist dementsprechend ein ST131, ebenso das Isolat QUC02. Dagegen zeigen die Isolate eo393 und eo979 bis zu 6 Abweichungen in den Genloci und sind somit nicht-ST131.

Isolat	GK-Nr.	<i>adk</i>	<i>purA</i>	<i>fumC</i>	<i>recA</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>gyrB</i>	ST131
		Anzahl abweichender Basen zur Referenzsequenz [N]							
eo393	2840	2	4	5	5	1	1	2	nicht-ST131
eo791	2913	0	0	0	0	0	0	0	ST131
eo979	2956	4	4	6	6	0	1	6	nicht-ST131
QUC02	3425	0	0	0	0	0	0	0	ST131

Entsprachen die zur Analyse abgeglichenen Sequenzen der des ST131 Referenzstamms exakt, wurde das Isolat als ST131 identifiziert. Im untersuchten Kollektiv konnten so 14 der 16 untersuchten Isolate dem ST131 zugeordnet werden. Diejenigen Stämme, die nicht der Referenz entsprachen (GK 2840 und GK 2956), wurden anhand der Allelbestimmung und anschließender Zuordnung über die Sequenzdatenbank und *E. coli* MLST Plattform Enterobase (Jolley *et al.* 2018) zugeordnet (vgl. Tabelle 3-5). Mittels der MLST-Datenbank wurden die Sequenzen mit den hinterlegten Allelen der Housekeeping-Gene abgeglichen. Alle sequenzierten Housekeeping-Gene entsprachen bekannten Referenzen und ließen sich eindeutig zuordnen. Die sich aus ihnen ergebenden, resultierenden *Sequence Types* nach Achtman sind in Tabelle 3-5 gezeigt. Dargestellt sind für jeden Stamm die MLST-relevanten Genloci mit ihren jeweiligen Allel Nummern, nach Achtman Schema (Enterobase).

Tabelle 3-5: Ergebnisse der RP-MLST-Bestimmung des MLST nach Achtman (MLST (A)). Aufgeführt sind für jeden Stamm, Name des Isolats, GK-Nr., die aus Sequenzen ermittelten Allele (Allel-Nr.) der Housekeeping-Gene, sowie der sich aus diesen ergebende Sequence Type (ST).

Isolat	GK-Nr.	<i>adk</i>	<i>purA</i>	<i>fumC</i>	<i>recA</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>gyrB</i>	MLST (A)
eo307	2826	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo393	2840	14	7	14	10	14	17	10	ST14
eo658	2881	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo677	2882	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo682	2884	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo760	2903	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo769	2905	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo791	2913	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo795	2914	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo827	2922	53	28	40	29	13	36	47	ST131
eo979	2956	36	11	24	25	13	17	9	ST73
QUC02	3425	53	28	40	29	13	36	47	ST131
QU008	3437	53	28	40	29	13	36	47	ST131
QU015	3438	53	28	40	29	13	36	47	ST131
QU061	3441	53	28	40	29	13	36	47	ST131
QU102	3443	53	28	40	29	13	36	47	ST131

Die ausgewählten Isolate QUC02, QU008, QU015, QU061 und QU102 wurden über den Sequenzabgleich der Housekeeping-Gene in ihren tatsächlich vorliegenden STs abgesichert und damit definitiv als ST131 (nach Achtman) bestätigt. Zur Absicherung wurde QU102 auch mit Cycle Sequencing MLST sequenziert. Unter den mit RP-MLST bestimmten elf BSAC-Isolaten waren neun ST131 Isolate, ein ST14 Isolat und ein ST73 Isolat. Alle ausgewählten, vorher positiv gescreenten Stämme erwiesen sich demnach als ST131 Isolate, die beiden negativ gescreenten bestätigten sich als nicht-ST131 Isolate.

3.4.2 MLST-Analyse nach Pasteur Schema

Die MLST-Analyse anhand des Schemas des Instituts Pasteur basiert auf dem gleichen Grundprinzip wie die nach Achtman, dem Vergleich der Sequenzabschnitte essentieller Gene, analysiert aber andere Housekeeping-Gene (vgl. Kap. 1.5.3). Die mit RP-MLST generierten Sequenzdaten des Pasteur-Schemas wurden mittels Sequenzabgleich für alle Gene über die Datenbank des Instituts Pasteur (*Escherichia coli* Sequence Typing Home Page, 2019) ausgewertet (vgl. Kap. 6.2.16.3.1). Die Kombination der verschiedenen Allele für alle acht Gene ergibt den *Sequence Type* (ST). Der ST131 Referenzstamms *E. coli* NA114 (ST131 nach Achtman) entspricht einen ST43 im Pasteur-Schema mit der Allel-Kombination *dinB9*, *icd1*, *pabB15*, *polB7*, *putP4*, *trpA9*, *trpB6* und *uidA9* (vgl. Kap. 1.5.3.2). Ein ST43 nach Pasteur korreliert dabei, bis auf einige Ausnahmen (vgl. Kap. 1.5.3.3) in der Regel mit dem ST131 nach Achtman. Die Ergebnisse der MLST-Bestimmung nach dem Pasteur Schema und der entsprechend resultierende ST sind für die untersuchten Isolate in Tabelle 3-6 dargestellt.

Tabelle 3-6: Ergebnisse der RP-MLST-Bestimmung nach dem Pasteur-Schema (MLST (P)). Aufgeführt sind für jeden Stamm die aus Sequenzen ermittelten Allele (Allel-Nr.) der Housekeeping-Gene, sowie der sich aus diesen ergebende Sequence Type (ST).

Isolat	GK-Nr.	<i>dinB</i>	<i>icd</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>	MLST (P)
eo307	2826	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo393	2840	1	7	1	9	2	20	1	6	ST6
eo658	2881	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo677	2882	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo682	2884	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo760	2903	9	1	15 (1 V)	7	4	9	6	9	Variation von ST43
eo769	2905	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo791	2913	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo795	2914	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo827	2922	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
eo979	2956	2	27	6 (1 V)	4	1	6	1	1	Variation von ST30

QUC02	3425	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
QU008	3437	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
QU015	3438	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
QU061	3441	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
QU102	3443	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43

Legende: 1 V.: Eine Variation (Abweichung der Sequenz von der des angegeben Allels).

Von den 16 nach dem Pasteur-Schema untersuchten Isolate sind 13 vom ST43. Ein Isolat, eo393 (GK 2840), ist ein ST6 und bei zwei Isolaten gab es je eine Variation zu den bisher bekannten STs. Für diese wurde der nächstgleiche ST unter Angabe der Variation benannt.

Die Analyse zeigt, dass alle, bis auf eines, der zuvor als *E. coli* ST131 nach Achtman bestimmten Isolate dem ST43 nach Pasteur zuzuordnen sind. Die eine Ausnahme ist Isolat eo760 (GK 2903), welches eine Variation in *pabB* zeigt, ansonsten aber ebenfalls einem ST43 entspricht. Bei der Variation handelt es sich um die Veränderung eines Adeninnukleotids zu einem Cytosinnukleotid (A -> C) an Position 802 der Nukleotidabfolge von *pabB*. Diese Variante ist bisher nicht in der MLST-Datenbank erfasst und stellt daher ein neues Allel dar. In diesem Fall führt die Variation zudem zu einem Aminosäure (AS)-Austausch von Isoleucin zu Leucin (I -> L) an Position 268 in PabB. Sie ist in Kapitel 8.2.3 im Anhang dargestellt.

Die zweite Variation befindet sich im Stamm eo979 (GK 2956). Dessen Housekeeping-Gene entsprechen in ihrer Sequenz alle einem ST30, bis auf eine Variation in *pabB*. Diese befindet sich an Position 943 des Gens *pabB*, stellt einen Nukleotidaustausch (G -> A) dar und bewirkt einen Aminosäureaustausch (G -> S) an Position 315 in PabB. Bisher ist auch diese Variante noch nicht in der MLST-Datenbank gelistet und beschreibt somit ebenfalls ein neues Allel für *pabB*. Innerhalb der Allel-bestimmenden Teil-Sequenz von *pabB* liegt die Mutation an Position 325 und entspricht ansonsten *pabB6* (*Escherichia coli* Sequence Typing Home Page, 2019). Die Sequenzen der beiden neuen *pabB* Allele befinden sich im Anhang (Kap. 8.3.1 und 8.3.2).

3.4.3 Mutationen in den Target- und resistenzassoziierten Genen

Die Sequenzen aus dem RP-MLST wurden mit dem empfindlichen Referenzstamm *E. coli* MG1655 verglichen. Sie zeigten Mutationen in der QRDR (*quinolone resistance determining region*), Variationen der *mar* (*multiple antibiotic resistance*) Region, aber auch in den Genen des *acrRAB*-Operons, der Porine sowie deren Regulationsgenen. Da kein FQ-sensibler *E. coli* ST131-O25b Stamm publiziert ist, und somit keine entsprechende Sequenz als Referenz zur Verfügung steht, wurde gegen *E. coli* MG1655 (K-12) verglichen, einen standardisiert verwendeten Referenzstamm mit sehr guter Annotierung, sowie gegen *E. coli* WT, ein FQ-sensibles Wildtyp-Isolat (vgl. Kap. 6.1.1.3). Die Sequenzen der klinischen Isolate zeigten, wie für wenig verwandte Stämme erwartbar, diverse Abweichungen zu *E. coli* MG1655. Daher wurden Variationen in der Sequenz, die nicht zu Veränderungen der Aminosäureabfolge führen, hier nicht weiter betrachtet und sind nicht aufgeführt. Die in den Target-Genen *gyrA* und *parC* gefundenen Mutationen und die in den resistenzassoziierten Genen *marR*, *marA*, *acrA*, *acrR*, *envZ*, *ompR*, *ompC* und *ompF* gefundenen Variationen, die zu Veränderungen von Aminosäuren führen sind in Tabelle 3-7 aufgeführt.

Tabelle 3-7: Mutationen in der QRDR und Variationen in den resistenzassoziierten Genen im Vergleich zu *E. coli* MG1655 der BSAC- und QU-Stämme. Variationen die nur einmal vorkamen und sich von *E. coli* WT unterscheiden sind **fett** hervorgehoben.

Stamm GK-Nr.	Mutationen in den QRDR (<i>gyrA</i> , <i>parC</i>)	Variationen in <i>marR</i> , <i>marA</i> , <i>acrA</i> und <i>acrR</i>	Variationen in <i>envZ</i> , <i>ompR</i> , <i>ompC</i> und <i>ompF</i>
eo307 2826	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> M.++ fs*
eo393 2840	<i>gyrA</i> S83L	<i>marR</i> S3N +G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A A156T A167S	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> +Δdel.
eo658 2881	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> M.++ fs*
eo677 2882	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> M.++ fs*
eo682 2884	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> M.++ fs*

eo760 2903	<i>gyrA</i> S83L+ D87Y <i>parC</i> S80R +E84V	marR P13R+G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
eo769 2905	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
eo791 2913	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
eo795 2914	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A acrR fm1	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
eo827 2922	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
eo979 2956	-	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A acrR I16T	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*+ Δdel.
QUC02 3425	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> M.+ fs* Seq. ØompF1
QU008 3437	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
QU015 3438	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V ompR A35D <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
QU061 3441	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*
QU102 3443	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N <i>acrA</i> T104A	<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.+ fs*

Legende: -: keine Mutation; M.+ : mehr als eine Mutation; M.++ : mehr als zwei Mutationen; ≥ 10 M.: mehr als 10 Mutationen; fs*: frameshift; Δdel: Deletion; Ø ompF1: vorderer Teil von *ompF* nicht amplifizierbar (PCR); **fett**: Mutationen die nur einmal detektiert wurden, sowie Variationen die sich in der Sequenz von einem sensiblen Wildtyp (*E. coli* WT) unterscheiden.

Die Auswertung der QRDR-Regionen der Resistenzgene *gyrA* und *parC* ergab, dass 14 von den 16 Stämmen Doppelmutationen in *gyrA* und *parC* tragen, diese 14 sind alle vom Typ ST131. Betroffen sind die Aminosäurepositionen 83 und 87 in GyrA sowie 80 und 84 in ParC. Von diesen 14 Stämmen tragen 13 die Mutationen *gyrA* S83L und D87N sowie *parC* S80I und E84V. Ein ST131 Stamm (GK 2903) trägt zwei andere Mutationen, *gyrA* S83L und D87Y sowie *parC* S80R und E84V. Es handelt sich dabei um den Stamm, der auch schon in der Bestimmung des ST nach Pasteur auffiel, weil er eine neue Variation in *pabB* aufweist (vgl. Kap. 3.4.2).

In den zwei für Ciprofloxacin empfindlichen nicht-ST131 Stämmen eo393 und eo979 finden sich keine Doppelmutationen in den QRDR (vgl. Kap. 3.4.3). Der Stamm eo393 (GK 2840) mit einer Ciprofloxacin MHK von 0,12 µg/mL trägt lediglich eine Mutation, bei der es sich um den Aminosäureaustausch S83L in GyrA handelt. Der zweite nicht ST131 Stamm eo979 (GK 2956) mit einer Ciprofloxacin MHK von 0,06 µg/mL weist keine Mutation in den QRDR auf.

Der Stamm QU015 (GK 3438) zeigte als einziger eine Mutation in *ompR*, und zwar *ompR* A35D. Sie führt zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Aspartat an Position 35. Dieser Stamm weist eine erhöhte MHK von 64 µg/mL für Ciprofloxacin auf und eine MHK von 32 µg/mL für Cefotaxim. Außerdem konnte für ihn bereits zuvor eine erhöhte Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln (Wachstum in Gegenwart von Hexan) festgestellt werden, die Effluxpumpenaktivität indiziert (Platell *et al.* 2011) (vgl. Kap. 3.12). Alle 16 Stämme (ST131 und nicht-ST131) zeigten im Vergleich zu *E. coli* MG1655 die Variation A25V in EnvZ. Diese findet sich auch in *E. coli* WT. Solche Variationen und SNPs sind zwischen kaum verwandten Stämmen wie Wildtyp-Isolaten und *E. coli* K-12 Stämmen allerdings auch zu erwarten.

In den Genen von *ompC* und *ompF* fanden sich diverse Abweichungen zu der Referenzsequenz von *E. coli* MG1655, darunter diverse Variationen (stille Mutationen) aber auch mehr als 10 Variationen bzw. Mutationen, die in anderen Aminosäuren resultieren oder zu einem *Frameshift* führen. Für *ompF* fand sich darüber hinaus in zehn Stämmen die Variation *ompF* N52D und in zwei Stämmen trat eine Deletion auf.

Bei zwei Stämmen fand sich eine Mutation in *acrR*. Unter diesen ist eine Mutation *acrR* M11 (\triangleq *acrR* fM1), im Stamm eo795 (GK 2914), besonders auffällig, denn durch einen

Nukleotidaustausch an der dritten Position des ersten Triplets von G zu A in *acrR* verändert sich dieses Triplet von ATG zu ATA. Dieses stellt kein alternatives Startcodon dar, sondern codiert für Isoleucin (I). Da die Mutation in *acrR* aber die erste AS-Position betrifft, an welcher bei Bakterien N-Formyl-Methionin (*f*-Met) vorkommt und es sich weiter um eine Mutation unbekannter Auswirkung handelt, wird sie mit *acrR fM1* bezeichnet, (vgl. Kap. 4.4.5). Die zweite Mutation *acrR* I16T wurde im Stamm eo979 (GK 2956) gefunden und bewirkt einen Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin. In *acrA* zeigte sich in allen 16 Stämmen die Mutation T104A, sowohl in ST131, sowie in nicht ST131. Bei eo393 (GK 2840) fanden sich darüber hinaus noch zwei weitere Mutationen, *acrA* A156T und A167S.

Für das *mar*-Regulon zeigten sich im Vergleich zu *E. coli* MG1655, dass alle Stämme im Operatorbereich die gleiche Sequenz aufwiesen, die bis auf drei abweichende Nukleotide der Referenzsequenz entsprach. Für *marR* zeigten alle Stämme die zwei Variationen G103S und Y137H. Zusätzlich dazu fand sich bei zwei Stämmen eine weitere Mutation, zum einen *marR* S3N bei eo393 (GK 2840) und zum anderen *marR* P13R bei eo760 (GK 2903). Darüber hinaus zeigten alle 16 Stämme die Variation S127N in *marA*.

3.4.4 Datenvalidität von RP-MLST im Vergleich zu anderen Methoden

Um die Validität der Methode zu beurteilen, wurden die aus dem RP-MLST gewonnenen Daten mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit anderen Methoden verglichen. In diesem Fall waren die BSAC-Stämme in der Arbeitsgruppe zuvor bereits mittels Pyrosequencing® auf Punktmutationen in *gyrA* und *parC* untersucht worden, die zu Aminosäureaustauschen an den Positionen GyrA 83 und GyrA 87 sowie ParC 80 und ParC 84 führen (Dr. A. Heisig, A. Schnasse, persönliche Mitteilung). Für alle in dieser Arbeit mit RP-MLST sequenzierten Stämme des BSAC-Kollektivs stimmten die Ergebnisse zu 100 % mit denen des Pyrosequencings® überein. Die MLST-Bestimmung wurde für den Stamm QU102 neben RP-MLST auch über Cycle-Sequencing durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen der Housekeeping-Gene stimmten erwartungsgemäß überein. Die Daten des RP-MLST wurden daher als valide angesehen. Die untersuchten Queensland-Stämme waren bereits in der Literatur als *E. coli* ST131 typisiert beschrieben (Platell *et al.* 2011), und wurden mit RP-MLST definitiv als ST131 nachgewiesen.

3.4.5 RP-MLST Sequenz-Analyse mittels CLC Genomics Workbench

Mittels der im Verlauf der Arbeit möglich gewordenen automatischen Auswertung der RP-MLST Daten über die CLC Genomics Workbench wurden die STs nach Achtman und Pasteur durch das Software-Plugin „Type a known species“ automatisch aus den Ion Torrent™ Daten bestimmt (vgl. Kap. 6.2.16.3.2). Danach wurden alle STs ebenso zugeordnet, wie nach dem Alignment gegen einen ST131 Referenzstamm und der manuellen Analyse im IGV mit Abgleich der Sequenz über die pubMLST Datenbanken.

Die Resultate der „Type a known species“ MLST-Analyse bestätigten die Ergebnisse der manuellen Auswertung in allen Punkten. Bei den Stämmen, für die sich bisher nicht gelistete Abweichungen im Pasteur Schema gezeigt hatten, wurden diese auch in der Analyse durch CLC identifiziert. Die beiden Variationen von *pabB* in GK 2903 und GK 2956 wurden durch die Software erkannt, wie folgend in Tabelle 3-8 und Tabelle 3-9 dargestellt.

Tabelle 3-8: Ausschnitt aus dem CLC MLST (Pasteur Schema) Typing Report für GK 2956.

Typing result GK 2956: Inconclusive. Most likely ST30							
<i>dinB_2</i>	<i>icdA_27</i>	<i>pabB_novel_allele</i>	<i>polB_4</i>	<i>putP_1</i>	<i>trpA_6</i>	<i>trpB_1</i>	<i>uidA_1</i>

Für den *E. coli* Stamm eo979 (GK 2956) wurde auf Basis der Abweichung ein neues *pabB*-Allel identifiziert (Stand: 08.06.2023).

Tabelle 3-9: Ausschnitt aus dem CLC MLST (Pasteur Schema) Typing Report für GK 2903.

Typing result GK 2903: Inconclusive. Most likely ST43							
<i>dinB_9</i>	<i>icdA_1</i>	<i>pabB_15</i> (inconclusive)	<i>polB_7</i>	<i>putP_4</i>	<i>trpA_9</i>	<i>trpB_6</i>	<i>uidA_9</i>

In *E. coli* eo760 (GK 2903) wurde das *pabB* Allel als *pabB_15* und als *inconclusive* klassifiziert. Es handelt es sich dabei um die bereits in Kapitel 3.4.2 beschriebene Mutation an Position 802 in *pabB*, die zu einem Austausch der Aminosäure (I -> L) an Position 268 in PabB führt. Die Sequenzen der beiden neuen *pabB* Allele sowie die CLC Ergebnis Reports befinden sich im Anhang (Kap. 8.3.1, 8.3.2 und 8.4.5).

3.5 β -Lactamasen in *E. coli* Isolaten der BSAC- und QU-Stämme

3.5.1 β -Lactamase Screening und Nachweis

In der phänotypischen Resistenztestung der 16 *E. coli* Isolate der BSAC (eo-)/ und der QU-Stämme zeigten 15 Wachstum auf Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und von diesen sechs auch auf Cefotaxim (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Für die Stämme wurde ein Screening auf β -Lactamase-Gene *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, und *bla*_{CTX-M} durchgeführt. Die einzelnen Ergebnisse zeigt Tabelle 3-10.

Tabelle 3-10: Ergebnisse der Wachstumsversuche und des β -Lactamase Screenings der ausgewählten BSAC und Queensland Stämme. Aufgeführt sind die Isolate mit Namen, GK-Nr., Wachstum (+/-) auf Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Amp₁₀₀) und Cefotaxim 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CTX₂₅) sowie den detektierten β -Lactamase-Genen.

Stamm	GK-Nr.	Amp ₁₀₀	CTX ₂₅	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	Konsens
eo307	2826	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo393	2840	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo658	2881	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo677	2882	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo682	2884	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo760	2903	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo769	2905	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo791	2913	+	+	<i>bla</i> _{TEM}	-	<i>bla</i> _{CTX-M} Gr. 1	✓
eo795	2914	+	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	✓
eo827	2922	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
eo979	2956	-	-	-	-	-	✓
QUC02	3425	+	+	<i>bla</i> _{TEM}	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	✓
QU008	3437	+	-	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	✓
QU015	3438	+	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	✓
QU061	3441	+	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	✓
QU102	3443	+	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	✓

Legende: Amp₁₀₀: Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; CTX₂₅: Cefotaxim 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; +: Wachstum, -: kein Wachstum;
 β -Lactamase-Gene: *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-ges} = gesamt und *bla*_{CTX-M-uni} = universal;
 Konsens: ✓: Phänotyp stimmt zu *bla*-Genen.

In elf Stämmen wurde ein TEM-Typ β -Lactamase-Gen gefunden, in fünf Stämmen eins vom Typ CTX-M-15 und in einem Stamm eins vom Typ CTX-M-Gr. 1 identifiziert. Ein Stamm wies kein β -Lactamase-Gen auf. Zwei Stämme wiesen zwei β -Lactamase-Gene auf, zum einen eo791 (GK 2913) neben bla_{TEM} auch $bla_{CTX-M-Gr. 1}$ und QUC02 (GK 3425) bla_{TEM} und $bla_{CTX-M-15}$.

Auf die Cefotaximasen wurde mit verschiedenen Primerpaaren, auf das universales Fragment $bla_{CTX-M-uni}$ innerhalb des Gens, sowie auf das $bla_{CTX-M-15}$ vollständig umfassende Fragment $bla_{CTX-M-gesamt}$ getestet (vgl. Kap. 6.2.9.2). Es wurde in fünf Stämmen das Produkt $bla_{CTX-M-gesamt}$ ($bla_{CTX-M-ges}$) amplifiziert (vgl. Tabelle 3-10). Von einem Stamm, eo791 (GK 2913), der eine Cefotaximresistenz aufwies, wurde weder das Produkt $bla_{CTX-M-gesamt}$ noch $bla_{CTX-M-uni}$ gebildet. Daher wurde für diesen Stamm zusätzlich ein etabliertes CTX-M-Gruppen Screening nach Woodford *et al.* (Kap. 6.2.9.2) durchgeführt, um das bla_{CTX-M} -Gen näher zu bestimmen. Dabei zeigte sich für GK 2913 ein Fragment für die CTX-M-Gr. 1 spezifische PCR (vgl. Kap. 8.1.4 im Anhang). Die gefundenen β -Lactamase-Gene lieferten für alle Stämme eine stimmige Erklärung für die vorhandenen β -Lactam-Resistenzen und erklärten die detektierten Phänotypen in allen Fällen vollständig (vgl. Konsens in Tabelle 3-10).

3.5.2 Bestimmung des CTX-M-Enzyms

Die im vorherigen Screening detektierten β -Lactamase-Gene vom CTX-M Typ in den Stämmen eo791, eo795 QUC02, QU015, QU061 und QU102 wurden teils zunächst mittels Cycle Sequencing (QU-Stämme) und später im Rahmen des RP-MLST (eo-/ und QU-Stämme) sequenziert. Die Cycle Sequencing Sequenzdaten zeigten die CTX-M-15 Variante für die klinischen Stämme QUC02, QU015, QU061 und QU102, sowie die CTX-M-Varianten der Referenzstämme *E. coli* M1 (CTX-M-1), und *E. coli* E3 (CTX-M-15), (vgl. Kap. 6.1.1.3). Die Ergebnisse des RP-MLST der Lactamase-Gene bestätigten erneut $bla_{CTX-M-15}$ für QUC02, QU015, QU061 und QU102, was auch eine zusätzliche Kontrolle darstellte, und erbrachten die Daten für die Stämme eo791 ($bla_{CTX-M-Gr.1}$) und eo795 ($bla_{CTX-M-15}$) des BSAC-Kollektivs. Das Alignment der Sequenzen aus dem RP-MLST gegen *E. coli* JJ1886, der $bla_{CTX-M-15}$ chromosomal trägt, mit eingeblendetem Stammnamen sowie identifizierten CTX-M Typ ist in Abbildung 3-16 dargestellt. Eine reine Sequenzansicht aus IGV befindet sich im Anhang in Kap. 8.4.3.

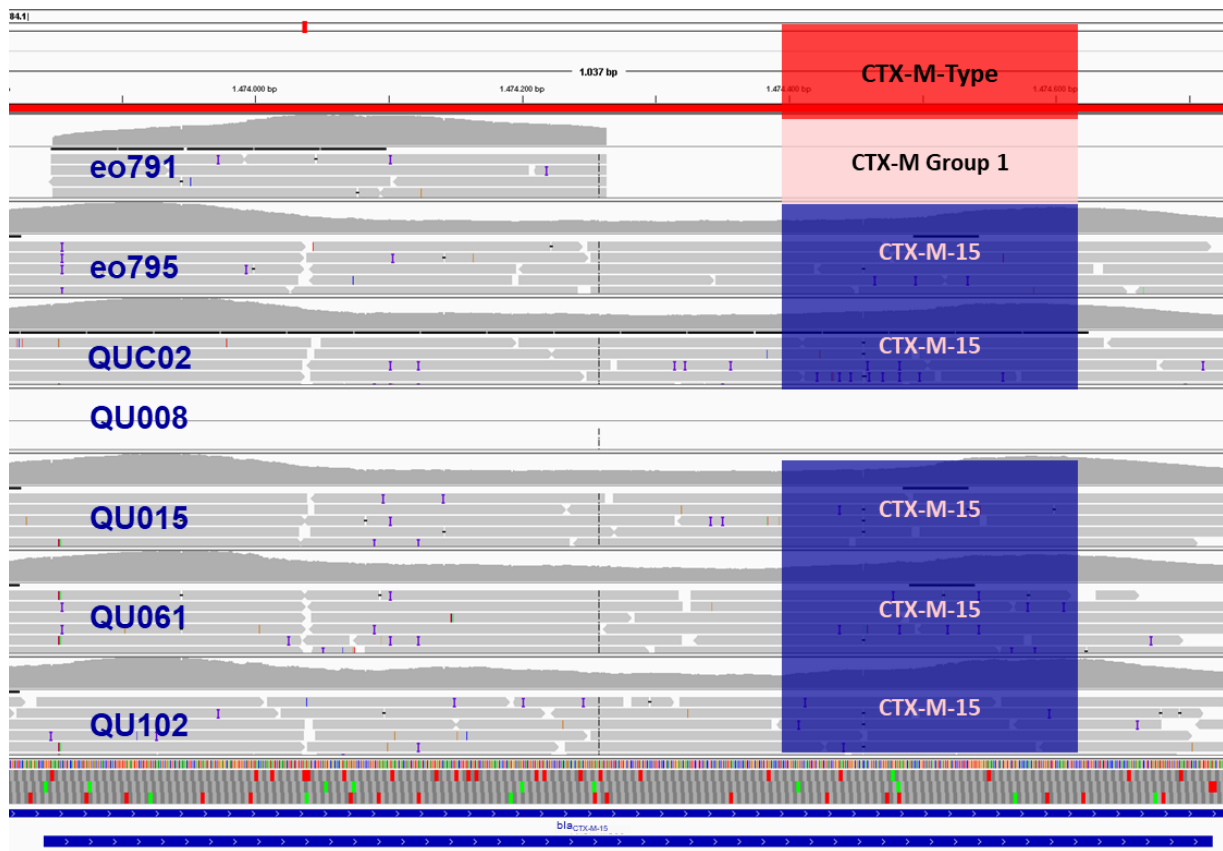


Abbildung 3-16: Darstellung der mit RP-MLST generierten Sequenzen im Bereich von $bla_{CTX-M-15}$ (blauer Balken unten) als Alignments angelegt an *E. coli* JJ1886. Dargestellt sind die einzelnen Reads unter der jeweiligen Consensus-Sequenz (in Grau, wenn keine Abweichung vorliegt) für die Stämme eo791, eo795, QUC02, QU008, QU015, QU061 und QU102 im Bereich des Lactamase-Gens $bla_{CTX-M-15}$ des und gegen den Referenzstamm *E. coli* JJ1886 der $bla_{CTX-M-15}$ ins Genom integriert trägt. Die Stammmamen (in blau) und der CTX-M-Typ (CTX-M-Type in blau-rosa/rosa-schwarz) sind eingeblendet. In eo791 wurde ein bla_{CTX-M} Gen der Gruppe 1 (Group 1) detektiert, in QU008 wurde kein bla_{CTX-M} Gen detektiert. In eo795, QUC02, QU015, QU061 und QU102 wurden ein $bla_{CTX-M-15}$ Gen detektiert. Darstellung aus Integrative Genome Viewer (IGV).

Die Sequenzdaten zeigten, dass die Stämme eo795, QUC02, QU015, QU061 und QU102 ein β -Lactamase-Gen vom Typ CTX-M-15 besitzen (100 % Homologie zu $bla_{CTX-M-15}$ in *E. coli* JJ1886; keine Abweichung ist in Abbildung 3-16 in grau dargestellt). Für diese Stämme wurde das gesamte $bla_{CTX-M-15}$ Gen über die PCR CTX-M_{ges} (vgl. Kap.6.2.9.2) erfasst. Da für eo791 das bla_{CTX-M} Gen nicht vollständig amplifiziert werden konnte, wurde nur der Teil des Gens aus dem CTX-M-Gruppen Screening (vgl. Kap. 3.5.1) sequenziert. Dessen Sequenz stimmt im 415 bp großen Teilstück, welches durch die Primer der CTX-M_{Gr.1} PCR definiert ist (vgl. Kap.6.2.9.2) zu 100 % mit der Sequenz von $bla_{CTX-M-15}$ überein (vgl. Abbildung 3-16) und entspricht somit der eines $bla_{CTX-M-Gr.1}$ Gens. Von einem intakten vorhandenen bla_{CTX-M} Gen ist für eo791 auszugehen, da der Stamm gegen Cefotaxim resistent ist (MHK_{CTX}: 128 μ g/mL). Die $bla_{CTX-M-15}$ tragenden Isolate wiesen MHKs für CTX von 64-1024 μ g/mL auf.

3.6 Charakterisierung von *E. coli* Isolaten aus der PEG-Studie 2016

Im Rahmen der PEG-Resistenzstudie werden seit 2001 regelmäßig, alle drei Jahre, klinisch relevante Infektionserreger aus dem Raum Deutschland, Österreich, Schweiz gesammelt, um die Resistenzsituation zu erfassen. Die Isolate werden in der Studie in ihrer Spezies identifiziert und ihre Empfindlichkeit bestimmt. Das Kollektiv aus der PEG-Studie 2016 umfasste neben vielen anderen Erregern insgesamt 1068 *E. coli* Stämme, davon 578 aus dem stationären Versorgungsbereich und 460 aus dem ambulanten Bereich (Resistenzdaten - PEG 2019).

In dieser Arbeit wurden insgesamt 99 *E. coli* Stämme, darunter 48 Urinkulturisolate und 51 Blutkulturisolate, aus dem Kollektiv der PEG-Resistenzstudie von 2016 untersucht. Die Isolate wurden aus der Gesamtzahl vorhandener Isolate zufällig ausgewählt um einen Überblick zu erhalten. Ziel der Untersuchungen war es, die klinischen Stämme zu typisieren, ihre Empfindlichkeit gegen bestimmte Antibiotika zu bestimmen und ihre vorhandenen Resistenzen sowie im Weiteren auch deren Ursachen zu identifizieren.

3.6.1 Resistenztestungen

Die Stämme wurden mittels Disk-Test auf vorhandene Resistenzen untersucht. Getestet wurde auf Ciprofloxacin (Cip), Gentamicin (Gen), Cefotaxim (CTX), Ceftazidim (CAZ), sowie die Kombination Ceftazidim/Clavulansäure (CAZ/CLV). Die Isolate wurden nach oder angelehnt an die EUCAST *breakpoints* Version v. 9.0 in resistent (R), empfindlich bei erhöhter Exposition (I) und sensibel (S) eingeteilt (vgl. Kap. 6.2.2.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-11 aufgeführt.

Tabelle 3-11: Anzahl der jeweiligen Isolate der PEG-Stämme, die für die verschiedenen Wirkstoffe resistent (R), empfindlich bei erhöhter Exposition (I) und sensibel (S) getestet wurden, sowie eine ESBL-Charakteristik aufweisen.

Anzahl (N) der PEG-Stämme in Empfindlichkeits-Kategorie (insgesamt 99 Isolate)						
Wirkstoff:		Cip [5µg]	Gen [10 µg]	CTX [30µg]	CAZ [30µg]	ESBL*
Kategorie	R	27	4	12	12	9
	I	6	1	-	-	-
	S	66	94	87	87	-

Legende: CIP 5=Ciprofloxacin (Disk-Gehalt 5 µg), GEN 10=Gentamicin (Disk-Gehalt 10 µg), CTX 30=Cefotaxim (Disk-Gehalt 30 µg), CAZ 30=Ceftazidim (Disk-Gehalt 30 µg), CAZ+CLV= Ceftazidim plus Clavulansäure (Disk-Gehalt 30/10 µg). Kategorien: R =resistent; I =empfindlich bei erhöhter Exposition; S =empfindlich; *ESBL: ESBL-Inhibitor-sensibel (vgl. Kap. 6.2.2.5.3).

Für Ciprofloxacin zeigten sich 66 Isolate empfindlich, sechs waren empfindlich bei erhöhter Exposition und 27 resistent, unter den resistenten waren 16 Blut- und 11 Urinkulturisolate. Gegen Gentamicin waren vier Isolate resistent, davon je zwei aus Blut und Urin, außerdem entsprach ein Isolat der Kategorie (I). Für Cefotaxim und Ceftazidim waren je zwölf Isolate resistent gegen Cefotaxim sowie gegen Ceftazidim, davon zehn gegen Cefotaxim und Ceftazidim, zwei Isolate nur gegen Cefotaxim und weitere zwei Isolate nur gegen Ceftazidim (vgl. dazu auch Tabelle 3-12).

Die Testung von Ceftazidim und Clavulansäure (β -Lactamase Inhibitor) lieferte in neun Fällen einen Hinweis auf eine Inhibitor-sensible ESBL. Für die Ceftazidim/Clavulansäure Disks wurde an den ATCC-Kontrollstämmen ein Rückgang des Hemmhofdurchmessers um 4-5 mm gemessen, unter dessen Berücksichtigung die Ergebnisse bewertet wurden (vgl. dazu Kap. 6.2.2.5.3). Bei einer Patiententestung wäre dies natürlich nicht zulässig und hochgradig riskant. Für die reine *in vitro* Testung als Indikator im Rahmen des ESBL-Screenings wurde es als ausreichend erachtet. Ein späterer Nachweis der CTX-M-Typ β -Lactamasen bestätigte die detektierten ESBLs in allen Fällen (vgl. Kap. 3.6.4). Detaillierte Ergebnisse der resistenten Stämme (Hemmhofdurchmesser der Antibiotika) zeigt auch Tabelle 3-12 in Kap. 3.6.2.

Zwei Stämme zeigten Abweichungen in ihrem morphologischen Erscheinungsbild. Zum einen zeigte PEG-16-23-40 (GK 4464) eine stärkere weiße Färbung als die anderen Isolate und zum anderen zeigte das Isolat PEG-16-94-1 (GK 4508), welches für alle getesteten Substanzen resistent war, unterschiedliche große Kolonien, von denen einige im ausgeprägten Hemmhof wuchsen. Beide Stämme wurden mit dem Micronaut E System als *E. coli* identifiziert (99,96 % bzw. 100 %). Insbesondere bei PEG-16-94-1 bestand allerdings der Verdacht, dass es sich eventuell um eine Mischkultur handelte, da der Stamm bei mehrmaligem Ausstreichen die unterschiedlichen Kolonien zeigte. Er konnte daher nicht eindeutig bestimmt werden. Beide Stämme wurden aufgrund der Abweichungen nicht weiter analysiert. Ein Isolat PEG-16-47-73 (GK-Nr. 4449) erwies sich später als nicht *E. coli* (vgl. Kap. 3.7.1) und wurde ausgeschlossen.

Danach waren insgesamt 31,6 % der Isolate (31/98) gegen mindestens ein Antibiotikum resistent und 8,2 % der Isolate (8/98) multiresistent im Sinne eines 3MRGN.

3.6.2 Einteilung in Resistotypen

In Bezug auf die Ausprägung der Resistenzen, sollten die einzelnen Isolate hier detaillierter verglichen werden, um Unterschiede und Abstufungen zu erkennen. Dafür wurden gemäß den Ergebnissen der Disk-Tests alle Stämme, die Resistenzen aufwiesen, nach der Größe ihrer Hemmhöfe für die einzelnen Substanzen geordnet, beginnend für (CIP 5) aufsteigend, von dem kleinsten bis zum größten Hemmhof, gefolgt von (GEN 10), (CTX 30), (CAZ 30) und (CAZ+CLV), ein Hinweis auf eine ESBL wurde dunkelrot hervorgehoben (vgl. Tabelle 3-12).

Das Ergebnis dieser Aufstellung ist dem linken Bereich Tabelle 3-12 (unter der Überschrift Resistente Isolate) zu entnehmen. Die rechte Hälfte der Tabelle 3-12 zeigt die Gruppierung der Isolate. Um die Resistenzausprägung feiner abzustufen, wurde dabei die Kategorie R für die Substanzen Cip, CTX und CAZ noch durch R+ (hochresistent) erweitert, wenn der Hemmhof für Cip 5 bei ≤ 10 mm, für CTX 30 ≤ 8 mm und bei CAZ 30 ≤ 12 mm betrug. Dabei erfolgte die Einteilung in R für resistent, R+ für hochresistent, (I) für „intermediär“ und S für sensibel (empfindlich), wobei die sensiblen, bis auf eine Ausnahme (Hemmhof von 40 mm: hochsensibel S+) für Ciprofloxacin, nicht weiter unterschieden wurden. Die Stämme wurden so den jeweils gleichen Resistenzeigenschaften zugeordnet und danach frei als „Resistotypen“ bezeichnet und fortlaufend nummeriert. So fanden sich insgesamt 17 verschiedene Resistotypen. Darunter war Resistotyp Nr. 5 mit 13 Isolaten am häufigsten vertreten, gefolgt von Resistotyp Nr. 3 mit drei Isolaten und den Resistotypen Nr. 10, 11, 13, 14, und 16 mit jeweils zwei Isolaten; die übrigen Resistotypen (Nr. 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 15 und 17) traten je nur einmal auf (vgl. Tabelle 3-12). Tabelle 3-12 zeigt die beschriebene Einteilung.

Tabelle 3-12: Darstellung der resistenten Isolate mit ihren Ergebnissen des Agardiffusions (Disk)-tests, Kennzeichnung der Resistenzen, Gruppierung nach Resistenz und Einteilung in „Resistotypen“. Im linken Teil der Tabelle sind die sortierten Hemmhofdurchmesser für die einzelnen Stämme mit ihren Namen, Quellen und ihrer GK-Nr. angegeben, nach Ausprägung der Resistenzen aufsteigend dargestellt. Kennzeichnung: empfindliche Werte in Weiß, erhöhte Werte in Gelb, schwach resistente Werte in Orange und Werte für hohe Resistenz in Rot. Erhöhung oder Gleichbleiben des kombinierten Wertes für CAZ/CLV gegenüber resistenten CAZ-Werten als Hinweis auf Vorliegen einer ESBL in Dunkelrot. Im rechten Teil der Tabelle sind die Resistenzen der Stämme, bei ähnlicher Ausprägung farblich gleich, dargestellt. Eine Farbe zeigt ein Resistenzmuster, dem ein Resistotyp zugeordnet ist. Die verschiedenen Resistotypen sind durchnummeriert und in der letzten Spalte dargestellt. Gleichen Typen haben dieselbe Nummerierung. Die farbliche Hervorhebung dient der Anschaulichkeit. Mehrfach vorkommende Resistotypen sind in der letzten Spalte mit eingerückter Nr. dargestellt.

Resistente Isolate										Gruppierung						
Name	Quelle	CIP 5	GEN 10	CTX 30	CAZ 30	CAZ + CLV	GK-Nr.	Resistotyp							Nr.	
PEG-16-93-80	Blut	6	11	10	23	19	4506	Cip R+	Gen R	CTX R	CAZ R	CAZ R	1			
PEG-16-84-29	Blut	6	16	10	22	20	4501	Cip R+	Gen I	CTX R	CAZ R	CAZ R	2			
PEG-16-7-20	Urin	6	18	13	21	22	4424	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3			
PEG-16-24-12	Urin	6	18	24	25	21	4439	Cip R+		CTX I	CAZ I		4			
PEG-16-33-20	Blut	6	18	26	27	22	4471	Cip R+					5			
PEG-16-41-25	Blut	6	18	30	28	22	4475	Cip R+					5			
PEG-16-62-20	Urin	6	19	6	16	20	4459	Cip R+		CTX R+	CAZ R	ESBL	6			
PEG-16-2-30	Urin	6	19	12	20	23	4417	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3			
PEG-16-88-35	Blut	6	19	26	26	21	4505	Cip R+					5			
PEG-16-79-14	Blut	6	19	27	27	22	4496	Cip R+					5			
PEG-16-72-25	Urin	6	20	6	11	19	4461	Cip R		CTX R+	CAZ R+	ESBL	7			
PEG-16-100-4	Blut	6	20	26	26	22	4511	Cip R+					5			
PEG-16-68-32	Blut	6	20	27	26	23	4488	Cip R+					5			
PEG-16-24-22	Urin	6	20	28	27	22	4440	Cip R+					5			
PEG-16-48-7	Urin	7	18	28	27	23	4451	Cip R+					5			
PEG-16-78-54	Blut	7	19	11	21	21	4494	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3			
PEG-16-76-26	Blut	7	19	27	27	24	4492	Cip R+					5			
PEG-16-59-31	Urin	8	18	28	27	23	4456	Cip R+					5			
PEG-16-23-35	Blut	8	20	30	27	24	4463	Cip R+					5			
PEG-16-65-64	Blut	9	18	30	28	26	4484	Cip R+					5			
PEG-16-81-42	Blut	10	17	27	27	23	4498	Cip R+					5			
PEG-16-42-49	Urin	10	19	26	24	21	4446	Cip R+			CAZ I		8			
PEG-16-51-43	Blut	11	19	9	15	20	4479	Cip R		CTX R	CAZ R	ESBL	9			
PEG-16-3-48	Urin	12	19	30	27	23	4419	Cip R					10			
PEG-16-55-32	Blut	15	18	29	26	23	4481	Cip R					10			
PEG-16-47-73	Urin	22	18	22	24	18	4449	Cip I		CTX I	CAZ I		11			
PEG-16-58-20	Blut	22	18	28	24	19	4482	Cip I			CAZ I		11			
PEG-16-101-31	Blut	22	19	28	28	22	4512	Cip I					12			
PEG-16-4-70	Urin	24	9	32	28	24	4422		Gen R				13			
PEG-16-4-60	Urin	26	9	28	30	23	4421		Gen R				13			
PEG-16-78-59	Blut	26	17	15	26	23	4495			CTX R			14			
PEG-16-42-5	Blut	32	17	30	24	22	4477				CAZ I		15			
PEG-16-5-80	Urin	34	19	31	22	23	4423				CAZ R	ESBL	16			
PEG-16-15-65	Urin	34	20	15	28	25	4434			CTX R			14			
PEG-16-60-81	Urin	34	20	26	21	23	4458				CAZ R	ESBL	16			
PEG-16-94-3	Blut	40	19	28	24	23	4509	Cip S+			CAZ I		17			

Ergebnisse

Legende: CIP 5=Ciprofloxacin (Disk-Gehalt 5 µg), GEN 10=Gentamicin (Disk-Gehalt 10 µg), CTX 30=Cefotaxim (Disk-Gehalt 30 µg), CAZ 30=Ceftazidim (Disk-Gehalt 30 µg), CAZ+CLV= Ceftazidim plus Clavulansäure (Disk-Gehalt 30/10 µg). *ESBL-Indikator positiv. Farbliche Unterlegung: Weiß= empfindlich (S); Gelb= empfindlich bei erhöhter Exposition (I); Rot= resistent (R), dunkelrot: ESBL-Inhibitor-sensibel (vgl. Kap. 6.2.2.5.3).

3.6.3 Auswahl von Isolaten aus der PEG-Studie 2016 für das RP-MLST

Von den auf die zuvor beschriebene Art eingruppierten Isolaten wurde eine Auswahl für die RP-MLST Sequenzierung getroffen, wobei sowohl die verschiedene Resistotypen abgedeckt, als auch häufig vorkommende Typen mehrfach berücksichtigt wurden. Weiter wurden drei sensible Stämme ausgesucht. Die ausgewählten Isolate sind in Tabelle 3-13 zusammengestellt.

Tabelle 3-13: Übersicht der für das RP-MLST ausgewählten Stämme der PEG-Studie 2016, mit Namen, Quelle, GK-Nr., ihren Resistenzen, sowie ihrer Resistotyp-Nummern. Mehrfach ausgewählte Resistotypen sind mit eingerückter Nr. dargestellt.

Name	Quelle	GK-Nr.	Resistotyp					Nr.
PEG-16-93-80	Blut	4506	Cip R+	Gen R	CTX R	CAZ R		1
PEG-16-84-29	Blut	4501	Cip R+	Gen I	CTX R	CAZ R		2
PEG-16-7-20	Urin	4424	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3
PEG-16-2-30	Urin	4417	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3
PEG-16-78-54	Blut	4494	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3
PEG-16-24-12	Urin	4439	Cip R+		CTX I	CAZ I		4
PEG-16-33-20	Blut	4471	Cip R+					5
PEG-16-41-25	Blut	4475	Cip R+					5
PEG-16-24-22	Urin	4440	Cip R+					5
PEG-16-81-42	Blut	4498	Cip R+					5
PEG-16-62-20	Urin	4459	Cip R+		CTX R+	CAZ R	ESBL	6
PEG-16-72-25	Urin	4461	Cip R		CTX R+	CAZ R+	ESBL	7
PEG-16-42-49	Urin	4446	Cip R+			CAZ I		8
PEG-16-51-43	Blut	4479	Cip R		CTX R	CAZ R	ESBL	9
PEG-16-3-48	Urin	4419	Cip R					10
PEG-16-55-32	Blut	4481	Cip R					10
PEG-16-47-73	Urin	4449	Cip I		CTX I	CAZ I		11
PEG-16-58-20	Blut	4482	Cip I			CAZ I		11
PEG-16-101-31	Blut	4512	Cip I					12
PEG-16-4-70	Urin	4422		Gen R				13
PEG-16-4-60	Urin	4421		Gen R				13
PEG-16-78-59	Blut	4495			CTX R			14
PEG-16-15-65	Urin	4434			CTX R			14
PEG-16-42-5	Blut	4477				CAZ I		15
PEG-16-5-80	Urin	4423				CAZ R	ESBL	16
PEG-16-60-81	Urin	4458				CAZ R	ESBL	16
PEG-16-94-3	Blut	4509	Cip S+			CAZ I		17
PEG-16-9-20	Urin	4429					sensibel	18
PEG-16-27-35	Blut	4465					sensibel	19
PEG-16-34-30	Urin	4442					sensibel	20

Drei weitere Stämme, die bereits in der vorigen RP-MLST Sequenzierung (vgl. Kap. 3.4) bestimmt wurden, wurden als Kontrollstämme ausgewählt. Dies waren das ST14 Isolat eo393 (GK 2840) und die zwei ST131 Isolate eo791 (GK 2903) und QU102 (GK 3443), von den letzteren wurde jeweils einmal das Genom parallel zu den RP-MLST Proben sequenziert.

3.6.4 Nachweis von β -Lactamasen

Für die cefotaximresistenten und alle weiteren zur RP-MLST Untersuchung ausgewählten Isolate aus der PEG-Studie 2016 (vgl. Kap. 3.6.3) wurde mittels PCR-Screening auf vorhandene β -Lactamase-Gene geprüft. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 3-14 aufgeführt. Elf Isolate waren positiv für bla_{TEM} und neun Isolate waren positiv für bla_{CTX-M} ($bla_{CTX-M-uni}$ und $bla_{CTX-M-gesamt}$), sechs davon für beide Fragmente. Unter den bla_{CTX-M} positiven zeigten drei nur $bla_{CTX-M-uni}$ (vgl. Tabelle 3-14). Ein Stamm, PEG-16-58-20 (GK 4482), war positiv für bla_{SHV} .

Für den Stamm PEG-16-93-80 (GK 4506), der bereits durch seine hohe Resistenz aufgefallen war (Resistotyp Nr. 1), (vgl. Kap. 3.6.2) und PEG-16-84-29 (GK 4501) mit multipler Resistenz wurden je eine TEM- sowie eine CTX-M-Typ β -Lactamase nachgewiesen.

Tabelle 3-14: Übersicht über die Ergebnisse des β -Lactamase PCR-Screenings der für das RP-MLST ausgewählten PEG-Stämme.

Stamm	GK-Nr.	bla_{TEM}	bla_{SHV}	$bla_{CTX-M-ges}$	$bla_{CTX-M-uni}$	Cefotaxim Resistotyp [R+/R/I/S]
PEG-16-2-30	4417	-	-	-	$bla_{CTX-M-uni}$	R
PEG-16-3-48	4419	-	-	-	-	S
PEG-16-4-60	4421	bla_{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-4-70	4422	bla_{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-5-80	4423	-	-	-	-	S
PEG-16-7-20	4424	-	-	-	$bla_{CTX-M-uni}$	R
PEG-16-9-20	4429	bla_{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-15-65	4434	-	-	-	-	R
PEG-16-24-12	4439	-	-	-	-	I
PEG-16-24-22	4440	bla_{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-34-30	4442	bla_{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-42-49	4446	bla_{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-60-81	4458	-	-	-	-	S
PEG-16-62-20	4459	-	-	$bla_{CTX-M-ges}$	$bla_{CTX-M-uni}$	R +
PEG-16-72-25	4461	-	-	$bla_{CTX-M-ges}$	$bla_{CTX-M-uni}$	R +

PEG-16-27-35	4465	-	-	-	-	S
PEG-16-33-20	4471	-	-	-	-	S
PEG-16-41-25	4475	-	-	-	-	S
PEG-16-42-5	4477	-	-	-	-	S
PEG-16-51-43	4479	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	<i>bla</i> _{CTX-M-uni}	R
PEG-16-55-32	4481	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-58-20	4482	-	<i>bla</i> _{SHV}	-	-	S
PEG-16-78-54	4494	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-uni}	R
PEG-16-78-59	4495	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	<i>bla</i> _{CTX-M-uni}	R
PEG-16-81-42	4498	-	-	-	-	S
PEG-16-84-29	4501	<i>bla</i> _{TEM}	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	<i>bla</i> _{CTX-M-uni}	R
PEG-16-93-80	4506	<i>bla</i> _{TEM}	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	<i>bla</i> _{CTX-M-uni}	R
PEG-16-94-3	4509	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	-	S
PEG-16-101-31	4512	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	-	S
eo760 (Ref)	2903	<i>bla</i> _{TEM}	-	-	-	
QU102 (Ref)	3443	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-ges}	<i>bla</i> _{CTX-M-uni}	R

Legende: *bla*_{TEM}: Screening-PCR für TEM-Typ β -Lactamasen; *bla*_{CTX-M-ges}: *bla*_{CTX-M-15} gesamt umfassende PCR; *bla*_{CTX-M-uni}: universale Screening-PCR für CTX-M-Typ β -Lactamasen, (PCRs vgl. Kap. 6.2.9.2); -: negativ; Resistotyp: S: Sensibel, I: Intermediär, R: Resistent, R+: Hochresistent; (Ref): Referenzstamm.

3.7 RP-MLST II – Analyse von Stämmen aus der PEG-Studie 2016

Mit der etablierten Methode des RP-MLST wurden weitere 29 der insgesamt 98 *E. coli* Stämme aus dem Kollektiv der PEG-Isolate von 2016 untersucht. Ziel dessen war es, Daten über ein zeitlich jüngeres Kollektiv zu generieren. Die STs der resistenten Stämme sollten ermittelt werden, wobei wieder insbesondere *E. coli* ST131 von Interesse war.

3.7.1 Besonderheiten einzelner Stämme

Die Housekeeping-Gene ließen sich in allen Isolaten einwandfrei amplifizieren bis auf zwei Ausnahmen. Erstens entstanden für PEG-16-47-73 (GK-Nr. 4449) keine PCR-Produkte. Dieses Isolat wurde daraufhin mit dem Micronaut E System überprüft und als *Enterobacter cloacae* identifiziert und von der RP-MLST-Analyse ausgeschlossen. Dies reduzierte das ursprüngliche PEG-Kollektiv von 99 auf 98 *E. coli* Stämme. Zweitens wurde von zwei Stämmen, GK 4479 und GK 4481, das Fragment für *putP*, auch nach Wiederholung, nicht amplifiziert.

Bei der PCR der resistenzassoziierten Gene zeigten sieben Stämme für *envZ* ein mit ca. 2000 bp anstatt der erwarteten 1200 bp deutlich größeres Amplifikat. Dieses war zuvor bereits beim Stamm *E. coli* eo979 (GK 2596), ST73 (vgl. Kap. 3.4.1) aufgefallen, und ebenso verhielt sich auch der Referenzstamm ATCC 25922, was anhand seiner veröffentlichten Sequenz geprüft wurde. Dabei zeigte sich, dass in diesem Stamm innerhalb der Bindestellen der verwendeten Primer tatsächlich eine Sequenz entsprechender Größe liegt. Ein Isolat, PEG-16-93-80 (GK 4506), zeigte zusätzlich auch noch ein vergrößertes Produkt für *ompF*. Dieser Stamm war insgesamt auffällig, denn er war als einziger gegen alle getesteten Antibiotika resistent und trug zudem zwei verschiedene β -Lactamase-Gene (vgl. Kap. 3.6.4). Ein weiteres Isolat (GK 4494) lieferte kein Fragment für den vorderen Teil von *ompF* in der PCR von *ompF1* (Nukleotide *ompF*: -161 bis +502, vgl. Tabelle 6-28).

3.7.2 RP-MLST Sequenzierung

Die Sequenzierungsergebnisse der mit Barcodes versehenen parallel sequenzierten RP-MLST Libraries der PEG-Stämme (jeweils 16 Proben, davon ein Genom und 15 RP-MLST Proben), zeigten eine geringe Beladung der Sequenzierchips. Sie war wesentlich geringer als bei den Sequenzierungsläufen zuvor und lag beim schlechtesten Lauf bei nur 35 % (zuvor bei 86-87 %). Die Run Reports der zwei PGM-Sequenzierungsläufe, denen mit bester und schlechtester Beladung der Sequenzier-Chips, sind exemplarisch im Anhang (Kap. 8.4.1) dargestellt. Im besten Lauf mit 87 % Beladung (MLST I) waren die RP-MLST Proben mit 45-77 Tsd. Reads aus der Sequenzierung abgedeckt. Für die einzelnen Gene zeigte sich ebenfalls eine sehr hohe Abdeckung von meistens ca. 50, aber in Spitzen auch bis zu 250 Reads. Die Ausbeute an Sequenzen im schlechtesten Lauf (MLST II) mit 35 % Chip-Beladung lag für 12 Proben bei 1,5-2,8 Tsd. Reads, und zeigte eine zumeist noch ausreichende Abdeckung (> 5 Reads) der Housekeeping-/ und Target-Gene. Für drei Proben (GK 4429, GK 4434 und GK 4439) lag die Ausbeute insgesamt bei nur 687-945 Reads und die generierten Sequenzen waren aufgrund der sehr schwachen und lückenhaften Abdeckung der Gene nicht ausreichend. Für die zwei genomsequenzierten Proben lag die Abdeckung über die gesamte Sequenz bei 0-25 Reads, in einigen Bereichen wiesen sie gar keine Reads auf, im Mittel ca. zwei bis drei. Das Genom aus dem schlechtesten Lauf war mit insgesamt 96 Tsd. Reads abgedeckt.

3.7.3 MLST-Analyse nach Achtman

Von den 29 RP-MLST sequenzierten PEG-Isolaten konnten 26 hinsichtlich ihrer Sequenzen nach dem Achtman-Schema typisiert werden. Unter ihnen befanden sich sechs ST131 Isolate, zwei ST12 Isolate, zwei ST69 Isolate, zwei ST117 Isolate, zwei ST744 Isolate und ein ST88 sowie ein weiteres ST88-verwandtes Isolat. Daneben gab es noch zehn weitere Stämme, die mit unterschiedlichen STs je einmal vertreten waren. Diese waren im Einzelnen ST10, ST58, ST73, ST156, ST162, ST357, ST361, ST393, ST491 und ST5891. Drei Isolate waren aufgrund von zu geringer Sequenzabdeckung nicht auswertbar. Die einzelnen Ergebnisse zeigt Tabelle 3-15.

Tabelle 3-15: Ergebnistabelle der RP-MLST-Bestimmung nach Achtman der ausgewählten 29 Stämme aus der PEG-Studie 2016. Aufgeführt sind für jeden Stamm die entsprechenden Allele der Housekeeping-Gene, sowie der sich aus der Allel-Kombination ergebende Sequence Type nach Achtman (MLST (A)). Gemeinsamkeiten sind farblich hervorgehoben.

Isolat	GK-Nr.	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	MLST (A)
PEG-16-2-30	4417	53	40	47	13	36	28	29	ST131
PEG-16-3-48	4419	10	11	135	8	8	8	2	ST744
PEG-16-4-60	4421	21	35	27	6	5	5	4	ST69
PEG-16-4-70	4422	21	35	27	6	5	5	4	ST69
PEG-16-5-80	4423	20	45	41	43	5	32	2	ST117
PEG-16-7-20	4424	53	40	47	13	36	28	29	ST131
PEG-16-9-20	4429	n. a.	40	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
PEG-16-15-65	4434	n. a.	52	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
PEG-16-24-12	4439	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
PEG-16-24-22	4440	53	40	47	13	36	28	29	ST131
PEG-16-34-30	4442	6	4	4	16	24	8	14	ST58
PEG-16-42-49	4446	10	11	4	8	8	8	2	ST10
PEG-16-60-81	4458	13	40	13	13	23	25	66	ST357
PEG-16-62-20	4459	53	40	47	13	36	28	29	ST131
PEG-16-72-25	4461	10	99	5	91	8	7	2	ST361
PEG-16-27-35	4465	13	13	9	13	16	10	9	ST12

PEG-16-33-20	4471	6	4	12	1	20	n. d.	7	v. ST88*
PEG-16-41-25	4475	53	40	47	13	36	28	29	ST131
PEG-16-42-5	4477	339	4	33	18	9	8	14	ST5891
PEG-16-51-43	4479	10	11	135	8	8	8	2	ST744
PEG-16-55-32	4481	9	65	5	1	9	13	6	ST162
PEG-16-58-20	4482	36	24	9	13	17	11	25	ST73
PEG-16-78-54	4494	53	40	47	13	36	28	29	ST131
PEG-16-78-59	4495	13	39	19	36	30	14	82	ST491
PEG-16-81-42	4498	18	106	17	6	5	5	4	ST393
PEG-16-84-29	4501	6	29	32	16	11	8	44	ST156
PEG-16-93-80	4506	6	4	12	1	20	12	7	ST88
PEG-16-94-3	4509	13	13	9	13	16	10	9	ST12
PEG-16-101-31	4512	20	45	41	43	5	32	2	ST117
eo393	2840	14	14	10	14	17	7	10	ST14

Legende: n. a.: nicht auswertbar, aufgrund nicht ausreichender Sequenz-Daten. n. d.: nicht bestimmt. v. ST88*: verwandt mit, oder wie ST88, aber aufgrund des nicht bestimmten *mdh*-Allels 36 verschiedene STs möglich.

Für ein Isolat, PEG-16-33-20 (GK 4471), war der ST aufgrund des nicht amplifizierten Housekeeping-Gens *mdh* nur näherungsweise zu bestimmen. Für drei Isolate GK 4429, GK 4434 und GK 4439 (vgl. Tabelle 3-15) konnte der ST aufgrund nicht ausreichender Sequenzdaten nicht bestimmt werden. Diese Proben waren, wie auch erwartbar war, exakt die mit den sehr schwach konzentrierten Librarys (vgl. Kap. 3.3.2 und Abbildung 3-15). Für alle anderen RP-MLST Proben, deren Library höher konzentriert war, wurden wie erwartet ausreichend Sequenzen generiert.

Der Stamm eo393 (GK 2840) wurde bereits zuvor RP-MLST sequenziert (vgl. Kap. 3.4) und hier als Kontrolle mitgeführt. Für ihn bestätigte sich wie erwartet der ST14 nach Achtman.

3.7.4 MLST-Analyse nach Pasteur Schema

Unter den 29 RP-MLST sequenzierten PEG-Isolaten befanden sich nach dem Pasteur-Schema fünf ST43 Isolate (ST131 nach Achtman), zwei ST3 Isolate, sowie je ein ST2, ST4, ST19, ST35, ST66, ST74, ST87, ST375, ST397, ST404, ST494 und ST650 Isolat. Außerdem fand sich ein Isolat, PEG-16-3-48 (GK 4419), mit einer neuen Allel-Kombination (neuer ST), diese war am nächsten verwandt mit ST2. Für vier Stämme konnte aufgrund von unzureichender Sequenzabdeckung der ST nicht definitiv bestimmt werden, darunter zwei, die keine vollständige Sequenz für *icd* aufwiesen. Für diese ergaben sich auf Basis der vorhandenen Allele für PEG-16-5-80 (GK 4423) die Möglichkeiten ST48, ST641 und ST706 und für das Isolat PEG-16-7-20 (GK 4424) entsprechend ST9, ST43 und ST621. Insgesamt konnten 20 der 29 untersuchten PEG-Isolate anhand der Sequenzen ihrer Housekeeping-Gene einwandfrei identifiziert werden. Die Ergebnisse der MLST-Bestimmung nach Pasteur sind in Tabelle 3-16 aufgeführt.

Tabelle 3-16: Ergebnistabelle der RP-MLST-Bestimmung der Stämme aus der PEG-Studie 2016. Aufgeführt sind für jeden Stamm die entsprechenden Allel-Nummern der Housekeeping-Gene und der sich daraus ergebene Multilocus Sequence Type (MLST) nach dem Pasteur-Schema (P). Gemeinsamkeiten sind farblich hervorgehoben.

Isolat	GK-Nr.	<i>dinB</i>	<i>icd</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>	MLST (P)
PEG-16-2-30	4417	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
PEG-16-3-48	4419	8	2	7	35	7	1	4	2	Neuer ST (v. ST2)**
PEG-16-4-60	4421	3	8	5	11	8	3	5	3	ST3
PEG-16-4-70	4422	3	8	5	11	8	3	5	3	ST3
PEG-16-5-80	4423	2	n. a.	23	15	10	15	10	12	ST48/ ST641/ ST706
PEG-16-7-20	4424	9	n. a.	15	7	4	9	6	9	ST9/ST43/ ST621
PEG-16-9-20	4429	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
PEG-16-15-65	4434	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	4	n. a.	n. a.	23 STs*** nicht ST43
PEG-16-24-12	4439	6	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	4	27 STs*** nicht ST43
PEG-16-24-22	4440	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
PEG-16-34-30	4442	7	33	18	2	5	8	2	2	ST87

PEG-16-42-49	4446	8	2	7	3	7	1	4	2	ST2
PEG-16-60-81	4458	88	161	74	112	4	19	1	27	ST404
PEG-16-62-20	4459	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
PEG-16-72-25	4461	11	169	148	17	18	164	4	147	ST650
PEG-16-27-35	4465	4	25	1	6	2	<i>trpA</i> 2* (1 V)	1	1	v. ST35** ** <i>trpA</i> n. Allel
PEG-16-33-20	4471	6	5	4	2	6	7	2	4	ST74
PEG-16-41-25	4475	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
PEG-16-42-5	4477	32	65	3	10	16	7	4	57	ST397
PEG-16-51-43	4479	8	2	7	3	-	1	4	2	11 STs*** nicht ST43
PEG-16-55-32	4481	25	3	107	10	-	109	2	57	v.ST355 *****
PEG-16-58-20	4482	2	4	6	4	1	6	1	1	ST4
PEG-16-78-54	4494	9	1	15	7	4	9	6	9	ST43
PEG-16-78-59	4495	2	48	73	82	127	18	46	1	ST375
PEG-16-81-42	4498	18	8	124	20	66	136	56	32	ST494
PEG-16-84-29	4501	7	37	4	10	26	7	4	2	ST19
PEG-16-93-80	4506	6	5	3	2	6	7	2	4	ST66
PEG-16-94-3	4509	4	25	1	6	2	2	1	1	ST35
PEG-16-101-31	4512	<i>dinB</i> 200* (2 V)	237	23	15	10	15	10	12	v.ST641 ***** <i>dinB</i> n. Allel
eo393	2840	1	7	1	9	2	20	1	6	ST6

Legende: n. Allel: neues Allel. v.: verwandt. n. a.: nicht auswertbar, aufgrund nicht ausreichender Sequenz-Daten. -: Sequenz nicht vorhanden aufgrund von negativer PCR. *: Variationen zu bekannten Allelen. (N V): Anzahl (N) der Variationen (V) von der nächstverwandten bekannten Sequenz. **: Neue Allel-Kombination, bisher nicht gelistet, für 7 Gene Allele wie bei ST2, bis auf *poI*B35. ***: Aufgrund unvollständiger Sequenzen der Housekeeping-Gene sind 27/23/11/ verschiedene STs möglich. ****: *trpA*2 mit 1 Variation (1 V.), entspricht ansonsten ST35. *****: Aufgrund fehlender Daten für *putP* nicht absolut bestimmbar, aufgrund der 7 anderen Allele ST355. *****: *dinB* 200 mit 2 Variationen (2 V.), entspricht sonst ST641.

Der Stamm eo393 (GK 2840) diente auch hier als Kontrolle. Für ihn ergab sich ein ST6 nach Pasteur, was sich zu 100 % mit den Ergebnissen aus vorigen RP-MLST Untersuchungen deckte.

Neue Allele oder Abweichungen zu bekannten Allelen wurden bei zwei Isolaten festgestellt. Für PEG-16-101-31 (GK 4512) ergab sich ein ST641 nach Pasteur, jedoch wies die Sequenz von *dinB* zwei Variationen auf, die von Allel 200 abwichen. Der Stamm PEG-16-27-35 (GK 4465) entsprach, bis auf die Sequenz von *trpA*, für die kein übereinstimmendes Allel gefunden wurde, einem ST35.

Fünf Stämme konnten nicht definitiv bestimmt werden, zwei weil sie kein Fragment für *putP* lieferten (vgl. Kap. 3.7.1) und drei aufgrund nicht ausreichender Sequenzdaten, wobei es sich erwartbar um die gleichen Proben handelte wie in der MLST (A) Auswertung zuvor (vgl. Kap. 3.7.3). Aus den vorhandenen Sequenzdaten ergaben sich für PEG-16-51-43 (GK 4479) 11 verschiedene STs, darunter nicht ST43, für PEG-16-55-32 (GK 4481) aufgrund der Kombination der anderen Allele ST355, für PEG-16-15-65 (GK 4434) 23 verschiedene STs und für PEG-16-24-12 (GK 4439) 27 verschiedene, letztere beide nicht ST43 (vgl. Tabelle 3-16).

3.7.5 RP-MLST-Analyse mit CLC Genomics

Zur Auswertung der Ion Torrent™ NGS-Daten aus der RP-MLST Sequenzierung wurde auch die CLC Genomics Workbench genutzt. Die MLST-Analyse mit dem CLC-Plugin „Type a known species“ - „Type with MLST Scheme“ resultierte in deckungsgleichen Ergebnissen wie die manuelle Auswertung mit IGV (vgl. Tabelle 3-15 und Tabelle 3-16). Eindeutig bestimmte Isolate wurden als *Conclusive* angegeben, unvollständig bestimmte dagegen als *Inconclusive*. Die CLC-Analyse war allerdings bei den manuell als nicht auswertbar definierten Allelen der Housekeeping-Gene differenzierter, da sie auch teilweise vorhandene Gensequenzen abgleicht. Aufgrund dieser wurde der Stamm PEG-16-7-20 (GK 4424), mit nicht vollständigen abgedeckten *icd* Gen, der ohne Berücksichtigung der Teilsequenzen ein ST9, ST43 oder ST621 hätte sein können, durch die CLC-Analyse definitiv als ST43 bestimmt, da die vorhandenen Sequenzen des Gens eine Zuordnung erlaubten.

Die detaillierten Resultate (Typing Reports) der CLC Sequence Auswertung „Type with MLST Scheme“ sind im Anhang (Kap. 8.4.5) zu finden. Eine Übersicht der RP-MLST-Ergebnisse nach Achtman und Pasteur, die die CLC-Auswertung ergab, ist folgend in Abbildung 3-17 dargestellt.

Sample name	Typing	Sequence types (Achtman)	Typing	Sequence types (Pasteur)
GK4417 typing report	Conclusive	ST131	Conclusive	ST43
GK4419 typing report	Conclusive	ST744	Inconclusive	ST2
GK4421 typing report	Conclusive	ST69	Conclusive	ST3
GK4422 typing report	Conclusive	ST69	Conclusive	ST3
GK4423 typing report	Conclusive	ST117	Inconclusive	ST706, ST641, ST48
GK4424 typing report	Conclusive	ST131	Inconclusive	ST43
GK4429 typing report	Inconclusive	ST14685, ST14607, ST14602, ST14600, ST14560, ST14208, ST13801, ST13510, ST13456, ST13381, ST13355, ST13003, ST12876, ST12681, ST12402, ST12210, ST11801, ST11711, ST11362, ST11259, ST11253, ST11093, ST10815, ST10750, ST10440, ST10424, ST10323, ST9748, ST9213, ST8514, ST8460, ST8051, ST7399, ST6252, ST6221, ST6100, ST6086, ST5941, ST5896, ST5562, ST5432, ST5387, ST3565, ST3563, ST3460, ST3027, ST2666, ST2268, ST131	Inconclusive	ST566, ST506
GK4434 typing report	Inconclusive	ST10935, ST6374, ST4299, ST1784, ST1506, ST141, ST4508	Inconclusive	ST796, ST134, ST129, ST27, ST26, ST10
GK4439 typing report	Inconclusive	ST13742, ST12804, ST11928, ST10296, ST8909, ST8431, ST8030, ST7614, ST7310, ST6029, ST5706, ST4795, ST4780, ST4603, ST2272, ST2066, ST1425, ST1424, ST1088, ST974, ST851, ST791, ST88	Inconclusive	ST986, ST74, ST66
GK4440 typing report	Conclusive	ST131	Conclusive	ST43
GK4442 typing report	Conclusive	ST58	Conclusive	ST87
GK4446 typing report	Conclusive	ST10	Conclusive	ST2
GK4458 typing report	Conclusive	ST357	Conclusive	ST404
GK4459 typing report	Conclusive	ST131	Conclusive	ST43
GK4461 typing report	Conclusive	ST361	Conclusive	ST650
GK4465 typing report	Conclusive	ST12	Inconclusive	ST35
GK4471 typing report	Inconclusive	ST13160, ST13113, ST13055, ST12984, ST12948, ST12274, ST12241, ST11631, ST10808, ST9862, ST9451, ST9307, ST9172, ST8753, ST8693, ST8242, ST6960, ST6914, ST6332, ST6325, ST5456, ST5291, ST4520, ST4404, ST3593, ST3564, ST3221, ST2940, ST1390, ST861, ST410, ST367, ST360, ST90, ST88, ST23	Conclusive	ST74
GK4475 typing report	Conclusive	ST131	Conclusive	ST43
GK4477 typing report	Conclusive	ST5891	Inconclusive	ST397
GK4479 typing report	Conclusive	ST744	Inconclusive	ST1174, ST1171, ST1006, ST889, ST390, ST191, ST164, ST153, ST16, ST15, ST2
GK4481 typing report	Conclusive	ST162	Inconclusive	ST355
GK4482 typing report	Conclusive	ST73	Conclusive	ST4
GK4494 typing report	Conclusive	ST131	Conclusive	ST43
GK4495 typing report	Conclusive	ST491	Conclusive	ST375
GK4498 typing report	Conclusive	ST393	Conclusive	ST494
GK4501 typing report	Conclusive	ST156	Conclusive	ST19
GK4506 typing report	Conclusive	ST88	Conclusive	ST66
GK4509 typing report	Conclusive	ST12	Conclusive	ST35
GK4512 typing report	Conclusive	ST117	Inconclusive	ST641
GK2840 typing report	Conclusive	ST14	Conclusive	ST6

Abbildung 3-17: Ergebnisse der CLC-Auswertung „Type a known species“ - „Type with MLST Scheme“ nach Achtman und Pasteur-Schema der RP-MLST Sequenzen der Isolate aus der PEG-Studie 2016. Unvollständige (Inconclusive) in Pink.

Die automatische Typisierung mit dem MLST-Plugin ging deutlich schneller und war dadurch sehr effizient. Die Ergebnisse bestätigten sich vollständig. Die CLC MLST Typing Analyse identifizierte die bereits zuvor mittels manueller MLST-Analyse (vgl. Kap. 3.7.4) gefundenen neuen Allele für *trpA* in GK 4465 und *dinB* in GK 4512 (vgl. Kap. 8.4.5, Abbildung 8-24). Ihre Sequenzen befinden sich im Anhang (Kap. 8.3.3 und 8.3.4).

3.7.6 Mutationen in den Target- und resistenzassoziierten Genen

Innerhalb des untersuchten Kollektivs der 29 PEG-Stämme fanden sich mittels der RP-MLST Sequenzierung auch einige Mutationen in den untersuchten Target-Genen. Eine Übersicht aller detektierten Mutationen und Variationen befindet sich in der folgenden Tabelle 3-17.

Tabelle 3-17: Übersicht über die gefundenen Mutationen und Variationen im Vergleich zu E. coli MG1655. Aufgeführt sind der jeweilige Stamm mit Namen und GK-Nr., MLST nach Achtman (A), die Mutationen in den QRDR, weitere Mutationen in gyrA und parC und Variationen in den resistenzassoziierten Genen marR, marA, acrR, acrA, envZ, ompR, ompC und ompF.

Stamm GK-Nr.	MLST (A)	Mutationen in den QRDR (<i>gyrA</i> , <i>parC</i>)	Variationen in <i>marR</i> , <i>marA</i> , <i>acrR</i> und <i>acrA</i>	Variationen in <i>envZ</i> , <i>ompR</i> , <i>ompC</i> und <i>ompF</i>
PEG-16-2-30 4417	ST131	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V		<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> M.++ Δdel. <i>ompF</i> N52D
PEG-16-3-48 4419	ST744	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> A56T+S80I		<i>ompC</i> M.++ Δdel.
PEG-16-4-60 4421	ST69	<i>gyrA</i> S83L		<i>ompC</i> M.++ Δdel.
PEG-16-4-70 4422	ST69			<i>ompC</i> M.++ Δdel.
PEG-16-5-80 4423	ST117		<i>acrR</i> A212S+T213I+N214T	<i>ompC</i> M.++ Δdel.
PEG-16-7-20 4424	ST131	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N	<i>ompC</i> M.++ Δdel. <i>ompF</i> N52D
PEG-16-9-20 4429	n. a.	n. a.		
PEG-16-15-65 4434	nicht ST131	n. a.		
PEG-16-24-12 4439	nicht ST131	n. a.		
PEG-16-24-22 4440	ST131	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V		<i>ompC</i> M.++ Δdel. <i>ompF</i> N52D
PEG-16-34-30 4442	ST58	-	<i>marR</i> G103S+Y137H	<i>ompC</i> M.++ Δdel. <i>ompF</i> K102N T219I
PEG-16-42-49 4446	ST10	<i>gyrA</i> S83L <i>parC</i> S80I		

PEG-16-60-81 4458	ST357	-		<i>ompC</i> div. M.++ Δdel.
PEG-16-62-20 4459	ST131	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V		<i>envZ</i> A25V <i>ompC</i> M.++ Δdel. <i>ompF</i> N52D, M.++, fs*(AS224-229)
PEG-16-72-25 4461	ST361	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I		<i>ompC</i> M.++ Δdel. <i>ompF</i> M.++
PEG-16-27-35 4465	ST12	-	<i>marA</i> S127N	<i>envZ</i> T446M <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> A224fs*, G228fs*, N229K
PEG-16-33-20 4471	v. ST88*	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I		<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> Thr187fs*
PEG-16-41-25 4475	ST131	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marA</i> S127N	<i>ompC</i> M.++ fs* <i>ompF</i> N52D M.++ fs*(AS224-229)
PEG-16-42-5 4477	ST5891	-	<i>marR</i> G103S+Y137H	<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs*
PEG-16-51-43 4479	ST744	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> A56T+S80I		<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs*
PEG-16-55-32 4481	ST162	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I		<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs*
PEG-16-58-20 4482	ST73	<i>gyrA</i> S83L	<i>marA</i> S127N	<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs*
PEG-16-78-54 4494	ST131	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84V	<i>marA</i> S127N	<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> N52D M.++ fs*(AS224-229)
PEG-16-78-59 4495	ST491	<i>gyrA</i> S83L	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>marA</i> S127N	<i>envZ</i> A25V+T446M <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> M.++ fs*(AS224- 229)
PEG-16-81-42 4498	ST393	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S57T+S80I	<i>marR</i> G103S+Y137H <i>acrR</i> T213I+N214T	<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> T269I
PEG-16-84-29 4501	ST156	<i>gyrA</i> S83L+D87N <i>parC</i> S80I+E84G	<i>marR</i> G103S+Y137H	<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs*
PEG-16-93-80 4506	ST88	<i>parC</i> S80I		<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs* <i>ompF</i> Insertion
PEG-16-94-3 4509	ST12	-	<i>marA</i> S127N	<i>envZ</i> A25V+T446M <i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs*
PEG-16-101-31 4512	ST117	-	<i>acrR</i> A163E+A212S+T 213I+N214T	<i>ompC</i> ≥ 10 M. inkl. fs*

Legende: n. a.: nicht auswertbar, aufgrund unvollständiger Sequenz; M.+ : mehr als eine Mutation; M.++: mehr als zwei Mutationen; ≥ 10 M: mehr als 10 Mutationen; fs*: frameshift; Δdel.: Deletion; v.: verwandt; v. ST88*: verwandt mit oder ST88, aufgrund des nicht bestimmten *mdh*-Allels 36 verschiedene STs möglich. **fett**: nicht in der QRDR liegende Mutationen in *gyrA* und *parC*, abweichend von Sequenz eines sensiblen Wildtyp Isolats (*E. coli* WT).

In 13 Stämmen fand sich innerhalb der QRDR die Doppelmutation *gyrA* S83L / D87N und in weiteren fünf die einzelne Mutation *gyrA* S83L. In *parC* fanden sich in sieben Stämmen eine Doppelmutation, davon sechsmal S80I / E84V und einmal S80I / E84G. Daneben gab es noch drei Stämme mit einer anderen Doppelmutation in *parC*, wovon je eine Mutation auch außerhalb der QRDR liegt, nämlich zweimal A56T / S80I und einmal S57T / S80I. Im Weiteren zeigten sechs Stämme die Mutation S80I, die allerdings alleinig (wie bei PEG-16-93-80) ohne weitere Mutationen in *gyrA* oder *gyrB* keinen Einfluss auf die FQ-Resistenz hat (Heisig 1996).

In *marR* fanden sich in sechs Stämmen die Mutationen G103S und Y137H. Im Falle von *marA* trat in sieben Stämmen die Variation S127N auf. Es fanden sich keine Variationen die zu Veränderungen von Aminosäuren führten in *acrA*, aber vier verschiedene in *acrR*, welche zu den Austausch der Aminosäuren A163E, A212S, T213I und N214T in AcrR führten. Diese kamen in drei Stämmen in unterschiedlichen Kombinationen vor, und zwar je einmal als Doppel-, Dreifach- und Vierfach-Mutation (vgl. Tabelle 3-17).

Für *envZ* fand sich in vier Stämmen wieder die Variationen A25V und T446M, davon zweimal in Kombination. In *ompC* und *ompF* zeigten sich erneut diverse Abweichungen, darunter auch *frameshift*-Mutationen, insbesondere in *ompC*, wie bereits zuvor (vgl. Kap. 3.4.3).

Die Auswertung war in einigen Bereichen der Target-/ und resistenzassoziierten Gene aufgrund einer nicht vollständig abgedeckten Sequenz nicht möglich. Vorhandene Daten mit ausreichender Abdeckung wurden jedoch vollständig ausgewertet. Insofern sind die hier gelisteten Variationen als sicher anzusehen, aber nicht unbedingt als vollständig.

3.7.7 Resistenzdetektion mit CLC Genomics

Die sequenzierten Stämme wurden im Weiteren mit dem CLC Genomics Workbench Tool „Find resistance“ analysiert (vgl. Kap. 6.2.16.3.2) und darüber die vorhandenen *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} Gene auf Basis der PCR-Fragmente aus dem Screening bestimmt. Für zwei Stämme konnte das *bla*_{TEM}-Gen anhand der Teilsequenz von *bla*_{TEM}, die aus dem Screening vorlag, in seiner Variante eindeutig bestimmt werden, dies war TEM-135 in PEG-16-42-49 (GK 4446) und TEM-198 in PEG-16-9-20 (GK 4429). Für weitere neun Stämme wurden alle Varianten von

*bla*_{TEM} aufgeführt, um die es sich dabei handeln könnte. Dies war auch für *bla*_{SHV} in GK 4482 der Fall. Die Ergebnisse der „Find resistance“ Analyse befinden sich im Anhang (Kap. 8.4.6).

Für den Stamm QU102 (GK 3443) analysierte die Software erwartungsgemäß auch Gene, die nicht Teil des RP-MLST waren. Als Ausgangsmaterial lag hier die gesamte DNA von QU102 vor und die Probe wurde mit Barcode versehen neben 15 RP-MLST Proben (1/16 Anteil, vgl. Kap. 6.2.16.2.3) in einem Lauf sequenziert. Sie zeigte eine zwar erwartbar geringere Sequenzabdeckung, als die RP-MLST Proben, diese war allerdings teils zu gering und dadurch unvollständig. Trotzdem wurden für QU102 insgesamt 12 weitere Gene detektiert, die Resistenz vermitteln. Darunter war auch *aac(6′)-Ib-cr* (vgl. Kap. 3.12), was für eine Aminoglykosid-Acetyl-Transferase codiert, die auch die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin acetyliert (vgl. Kap. 1.2.3.2.1), sowie das Gen der *E. coli* AmpC β-Lactamase, dies allerdings erwartbar, da *E. coli* Stämme das *ampC* Gen chromosomal tragen. Daneben fanden sich Gene, die den Efflux von Antibiotika beeinflussen wie das Gen *mdtG*, welches für das *Multidrug resistance protein* MdtG ein Transporter-Protein (Wirkstoff-Export) codiert und, als Teil des *marA-soxS-rob* Regulons überexprimiert, Efflux für Fosfomycin vermittelt (Fàbrega *et al.* 2010; Nishino und Yamaguchi 2001) und *bacA*, das über eine Undecaprenyl Pyrophosphat Phosphatase Resistenz gegenüber Bacitracin vermittelt (Cain *et al.* 1993; El Ghachi *et al.* 2004).

Für das *E. coli* Isolat eo791 (GK 2913) wurde ebenfalls eine AmpC β-Lactamase detektiert, sowie Efflux vermittelnde Gene für diverse Antibiotika und in diesem Fall *mdtH*, welches überexprimiert Resistenz gegenüber Fluorchinolone vermittelt (Alcock *et al.* 2023). Die aus CLC generierten Resistenzgen-Tabellen befinden sich im Anhang (Kap. 8.4.6).

3.8 Vergleich von Resistotyp, SNP und Sequence Type nach Achtman und Pasteur der PEG-Stämme

Die sequenzierten Stämme (n=29) aus dem PEG-Kollektiv 2016 sind in Tabelle 3-18 hinsichtlich ihres Resistenzmusters, dem Resistotyp (vgl. Kap. 3.6.2), dem SNP *pabB_573* (G/A) und den ermittelten STs nach Achtman und Pasteur (vgl. Kap. 3.6.2 bis 3.7.5) aufgeführt. Gemeinsamkeiten sind farblich hervorgehoben und *E. coli* ST131 Isolate sind in Rot markiert.

Ergebnisse

Tabelle 3-18: Übersicht über die untersuchten Isolate aus der PEG-Studie 2016 mit ihren Resistenzeigenschaften (Resistotyp), Resistotypen-Nummer (Nr.), dem SNP *pabB*₅₇₃ und Sequence Type nach MLST Achtman (A) und Pasteur (P). Gemeinsamkeiten in ST und deren Resistotypen-/Nr. sind farblich herausgestellt, *E. coli* ST131 Stämme in Rot.

Name (GK-Nr.)	Resistotyp					Nr.	SNP <i>pabB</i> ₅₇₃	MLST (A)	MLST (P)
PEG-16-93-80 (4506)	Cip R+	Gen R	CTX R	CAZ R		1	G	ST88	ST66
PEG-16-84-29 (4501)	Cip R+	Gen I	CTX R	CAZ R		2	G	ST156	ST19
PEG-16-2-30 (4417)	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3	A	ST131	ST43
PEG-16-7-20 (4424)	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3	A	ST131	ST43
PEG-16-78-54 (4494)	Cip R+		CTX R	CAZ R	ESBL	3	A	ST131	ST43
PEG-16-24-12 (4439)	Cip R+		CTX I	CAZ I		4	G	nicht ST131	27 STs mögl.
PEG-16-24-22 (4440)	Cip R+					5	A	ST131	ST43
PEG-16-33-20 (4471)	Cip R+					5	G	v. ST88*	ST74
PEG-16-41-25 (4475)	Cip R+					5	A	ST131	ST43
PEG-16-81-42 (4498)	Cip R+					5	G	ST393	ST494
PEG-16-62-20 (4459)	Cip R+		CTX R+	CAZ R	ESBL	6	A	ST131	ST43
PEG-16-72-25 (4461)	Cip R+		CTX R+	CAZ R+	ESBL	7	G	ST361	ST650
PEG-16-42-49 (4446)	Cip R+			CAZ I		8	G	ST10	ST2
PEG-16-51-43 (4479)	Cip R		CTX R	CAZ R	ESBL	9	G	ST744	11 STs m. nicht ST43
PEG-16-3-48 (4419)	Cip R					10	G	ST744	Neuer ST (v. ST2)**
PEG-16-55-32 (4481)	Cip R					10	G	ST162	ST355****
PEG-16-58-20 (4482)	Cip I			CAZ I		11	G	ST73	ST4
PEG-16-101-31 (4512)	Cip I					12	G	ST117	v.ST641 *****
PEG-16-4-60 (4421)		Gen R				13	G	ST69	ST3

PEG-16-4-70 (4422)	Gen R	13	G	ST69	ST3
PEG-16-15-65 (4434)	CTX R	14	n. a.	nicht ST131	23 STs mögl.
PEG-16-78-59 (4495)	CTX R	14	G	ST491	ST375
PEG-16-42-5 (4477)	CAZ I	15	G	ST5891	ST397
PEG-16-5-80 (4423)	CAZ R ESBL	16	G	ST117	ST48/641/ 706****
PEG-16-60-81 (4458)	CAZ R ESBL	16	G	ST357	ST404
PEG-16-94-3 (4509)	Cip S+ CAZ I	17	G	ST12	ST35
PEG-16-9-20 (4429)	sensibel	18	G	n. a.	n. a.
PEG-16-27-35 (4465)	sensibel	19	G	ST12	ST35 mit trpA-Var.
PEG-16-34-30 (4442)	sensibel	20	G	ST58	ST87

Legende: n. a.: nicht auswertbar. v.: verwandt. v. ST88*: nicht bestimmtes, daher undefiniertes *mdh* Allel, ansonsten wie ST88. **: Neue Allel-Kombination, für 7 Gene Allele wie bei ST2, mit *polB35* = neue Kombination. ***: fehlende *putP* Daten, aufgrund der anderen Allele sehr wahrscheinlich ST355. ****: *icd* unvollständig, ST48, ST641, ST706 möglich. *****: wie ST641 mit 2 *dinB* Variationen.

Unter diesen 29 RP-MLST Isolaten waren sechs vom Typ *E. coli* ST131, in allen Fällen vom ST43 nach Pasteur und entstammten dem Resistotyp Nr. 3, Nr. 5 und Nr. 6. Davon waren drei, einem 3MRGN entsprechend, Resistotyp Nr. 3 (Cip R+, CTX R, CAZ R, ESBL+), zwei vom Resistotyp Nr. 5 (Cip R+) und ein Isolat vom Resistotyp Nr. 6 (Cip R+, CTX R+, CAZ R, ESBL+). Allen ST131 Isolaten gemeinsam war die hohe Resistenz gegen Ciprofloxacin. Außerdem war zusätzlich in vier von sechs Fällen (66%) die Resistenz gegen Cefotaxim und Ceftazidim mit Hinweis auf eine ESBL vorhanden. Von den sechs ST131 Isolaten entstammten vier Urinkulturen und zwei Blutkulturen (vgl. Tabelle 3-12). Die zwei ST69 Stämme waren beide ST3 nach Pasteur und die ST12 Stämme bis auf eine *trpA* Variation ST35 nach Pasteur.

Bei den Isolaten PEG-16-62-20 (GK 4459) und PEG-16-72-25 (GK 4461), die bis auf einen geringen Unterschied in der Ausprägung der Ceftazidim-Resistenz die gleichen Eigenschaften aufwiesen, wurden ganz andere STs (ST131 und ST361) nach Achtman (A) ermittelt. Im Detail

haben diese beiden Isolate für keines der Housekeeping-Gene ein gleiches Allel (vgl. Kap. 3.7.3). Die zwei Isolate des Resistotyps Nr. 13, PEG-16-4-60 (GK 4421) und PEG-16-4-70 (GK 4422), waren dagegen in beiden Fällen ein ST69 (A), eine ähnliche Resistenzausprägung ging hier mit dem gleichen *Sequence Type* einher (vgl. Kap. 3.8). Andererseits zeigten verwandte Stämme, wie PEG-16-93-80 (GK 4506) und PEG-16-33-20 (GK 4471), ST88 und ST88 verwandt, unterschiedliche Resistenzprofile.

Sehr unterschiedliche Resistenzeigenschaften zeigten auch die beiden Isolate vom ST744: PEG-16-51-43 (GK 4479) mit (Cip R, CTX R, CAZ R, ESBL+) und PEG-16-3-48 (GK 4419) mit (Cip R), sowie auch PEG-16-101-31 (GK 4512) mit (Cip I) und PEG-16-5-80 (GK 4423) mit (CAZ R, ESBL+), beide vom ST117 (vgl. Tabelle 3-12). In diesen Fällen bedingte derselbe *Sequence Type* nicht die gleichen Resistenzen.

3.8.1 Anteil von *E. coli* ST131 im Kollektiv aus der PEG-Studie 2016

Die drei Isolate des Resistotyps Nr. 3 (Cip R+, CTX R, CAZ R, ESBL+) waren alle *E. coli* ST131 Isolate (100 %). Demnach korrelierte diese Kombination der Resistenzen absolut mit ST131. Von den 13 als Resistotyp Nr. 5 (Cip R+) charakterisierten Stämmen wurden vier zufällig für die Sequenzierung ausgewählt. Zwei dieser Stämme (50 %) waren *E. coli* ST131. Die beiden anderen Isolate des Resistotyps Nr. 5 waren ST393 und ST88-verwandt. Insgesamt kam der Resistotyp Nr. 5 im untersuchten Kollektiv der aus der PEG-Studie am häufigsten vor, er war mit n=13 Isolaten in den 98 *E. coli* Stämmen vertreten (vgl. Kap. 3.6.2). Basierend auf dem Ergebnis (50 % ST131) der sequenzierten Isolate (n=4) von Resistotyp Nr. 5, müssten unter den verbliebenen, nicht sequenzierten neun Isolaten noch vier bis fünf ST131 Stämme sein. Der Resistotyp Nr. 6 (Cip R+, CTX R+, CAZ R, ESBL+), 3MRGN mit stärker ausgeprägter Cefotaximresistenz, war nur einmal vertreten. Seine Korrelation mit ST131 lag somit bei 100 %. Da aus der Literatur im Kontext mit Infektionen kaum vollständig sensible *E. coli* ST131 Isolate bekannt sind (vgl. Kap. 1.4.4), kann davon ausgegangen werden, dass sich unter den empfindlichen Stämmen dieser Studie keine ST131 Isolate befinden. Von diesen Daten ausgehend errechnet sich ein Anteil von 10,7 % an *E. coli* ST131 Isolaten für das Kollektiv aus der PEG-Studie von 2016.

3.8.1.1 Korrelation des SNPs an Position 573 in *pabB* mit *E. coli* ST131

Von den beiden SNPs *pabB*_267 (C/T) und *pabB*_573 (G/A), die nach Clermont *et al.* die schnelle Identifizierung von ST131-O25b ermöglichen (Clermont *et al.* 2009), vgl. auch Kap. 3.1.2, liegt *pabB*_573 (G/A) innerhalb der Sequenz, die auch für den MLST von Pasteur relevant ist. Der andere SNP *pabB*_267 (C/T) liegt upstream der für das MLST relevanten und untersuchten Sequenz in *pabB*. So wurde also *pabB*_573 (G/A) im RP-MLST mitbestimmt und betrachtet inwieweit dieser als Indikator für *E. coli* ST131 zutrifft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-18 dargestellt. Es zeigte sich, dass dieser SNP in *pabB* in seiner für ST131 typischen Variante *pabB*_573 (A) bei sechs der Isolate vorlag und diese sechs waren alle ST131 Isolate (nach Achtman). Von den 22 Isolaten, die den SNP für *pabB*_573 nicht aufwiesen, waren 19 eindeutig andere STs. Zwei weitere Isolate konnten aufgrund abweichender *fumC*, bzw. *dinB* und *uidA* Allele nicht ST131 bzw. ST43 nach Pasteur sein und daher als nicht-ST131 identifiziert werden. Für ein Isolat konnte aufgrund fehlender Sequenzabdeckung an der betroffenen Position in *pabB* der SNP *pabB*_573 nicht bestimmt werden (vgl. Tabelle 3-18). Zusammenfassend war festzustellen, dass es sich beim Vorliegen des SNPs *pabB*_573 (A) in allen Fällen um einen ST131 nach Achtman handelte und in allen anderen Fällen *pabB*_573 (G) nicht um einen ST131 (vgl. Tabelle 3-18). Somit war in diesem Kollektiv die Bestimmung dieses SNPs ein zu 100 % zutreffender Indikator für *E. coli* ST131.

3.9 Resistenz von *E. coli* ESBL Isolaten gegen Ceftolozan/Tazobactam

Für die Wirkstoffkombination Ceftolozan/Tazobactam wurden einige der neueren *E. coli* Isolate auf Resistenz untersucht, die bereits eine oder mehrere Resistenzen gegen Cephalosporin-Antibiotika aufwiesen. Von diesen waren acht Isolate aus der PEG-Studie 2016, das Isolat QU102 (GK 3443), und der *Klebsiella pneumoniae* Stamm NRZ-00103 vom nationalen Referenzzentrum, der ein KPC-2 Enzym trägt, aufgrund dessen Resistenz gegen Ceftolozan/Tazobactam erwartet wurde (vgl. Kap. 6.1.1.3). Alle Isolate wurden mit den MHK-Teststreifen von Liofilchem® auf Resistenz getestet (vgl. Kap. 6.2.2.3). Diese Teststreifen beinhalten Ceftolozan in einer graduell verlaufenden Konzentration von 0,016-256 µg/mL und Tazobactam mit konstanten 4 µg/mL. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung mit den Teststreifen sind in Tabelle 3-19 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 3-19: Ergebnisse der Resistenztestung ausgewählter klinischer *E. coli* Isolate. Die Stämme sind mit Namen, MLST Sequence Type (ST) nach Achtman (A), ihren Resistenzen, β -Lactamasen und der MHK für Ceftolozan mit 4 μ g/mL Tazobactam angegeben. Sensible MHK-Werte sind in Grün, grenzwertige in Gelb und Resistenz entsprechende in Rot dargestellt.

GK-Nr.	Stamm	Name Isolat	ST (A)	Resistenzen	β -Lactamase Typ	MHK [μ g/mL] Ceftolozan / Tazobactam [4]
4423	<i>E. coli</i>	PEG-16-5-80	ST117	CAZ	-	0,25
4424	<i>E. coli</i>	PEG-16-7-20	ST131	CIP, CTX, CAZ,	CTX-M	0,19
4459	<i>E. coli</i>	PEG-16-62-20	ST131	CIP, CTX, CAZ	CTX-M	0,25
4461	<i>E. coli</i>	PEG-16-72-25	ST361	CIP, CTX, CAZ, KAN	CTX-M	0,50
4479	<i>E. coli</i>	PEG-16-51-43	ST744	CIP, CTX, CAZ, CLM, KAN, STR,	CTX-M	0,75
4495	<i>E. coli</i>	PEG-16-78-59	ST491	CTX	CTX-M	0,38
4501	<i>E. coli</i>	PEG-16-84-29	ST156	CIP, CTX, CAZ, CAZ+CLA, GEN (I)	TEM, CTX-M	0,38
4506	<i>E. coli</i>	PEG-16-93-80	ST88	CIP, CTX, CAZ, CAZ+CLA, GEN, CLM, STR	TEM, CTX-M	1,5
3443	<i>E. coli</i>	QU102	ST131	CIP, CTX, TET, KAN	CTX-M-15	0,25
3699	<i>K. pneumoniae</i>	NRZ-00103	-	β -Lactame, inkl. Carbapeneme	KPC-2	64

Legende der Resistenzen: CAZ: Ceftazidim, CIP: Ciprofloxacin, CLM: Chloramphenicol, CLV: Clavulansäure, CTX: Cefotaxim, GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, STR: Streptomycin, TET: Tetracyclin.

E. coli QU102 (GK 3443) trägt eine β -Lactamase vom Typ CTX-M-15, ist resistent gegen Cefotaxim, aber sensibel für Cefotaxim/Clavulansäure (vgl. Kap. 3.12). Mit einer MHK von 0,25 μ g/mL für Ceftolozan mit 4 μ g/mL Tazobactam ist er auch für diese Kombination sensibel. GK 3699 dagegen ist mit einer MHK von 64 μ g/mL wie erwartet resistent. Die klinischen Isolate zeigten Empfindlichkeit, mit MHKs von 0,1 μ g/mL (n=1), 0,25 μ g/mL (n=2), 0,38 μ g/mL (n=2), 0,5 μ g/mL (n=1) und 0,75 μ g/mL (n=1). Ein Isolat mit einer MHK von 1,5 μ g/mL lag über dem ursprünglichen Grenzwert der EUCAST von $R \geq 1$ μ g/mL, nicht aber über dem der CLSI von $R \geq 2$ μ g/mL (vgl. Kap. 6.2.2.5). Von den hier getesteten klinischen *E. coli* Isolaten von 2016 zeigt keines Resistenz gegen Ceftolozan/Tazobactam.

3.10 Resistenzen und Plasmide in *E. coli* ST131 Isolaten der Literatur

In diesem Kapitel werden die *E. coli* ST131 Isolate, die bis 2016 inklusive ihrer Genomsequenzen publiziert waren, verglichen (vgl. Kap. 6.1.1.4). Eine Übersicht der Stämme mit ihren Eigenschaften, Resistenzgenen und Plasmiden zeigt Tabelle 3-20.

Tabelle 3-20: Übersicht der *E. coli* ST131 Stämme der Literatur, ihrer Herkunft nach Jahr und Land, ihren β -Lactamase-/ und sonstigen Resistenzgenen (vgl. III. Abkürzungsverzeichnis), ausgewählten Charakteristika, Plasmiden und Referenzen.

Isolat Jahr Land	Phylogenie Serotyp / ST (Clade)	β -Lactamase-/ Resistenzgene	Plasmide mit Größe [kbp]	Referenzen
<i>E. coli</i> SE15 2009 JP	B2 O150:H5 ST131 (Clade A)		pSE15 [122]	(Toh <i>et al.</i> 2010; Forde <i>et al.</i> 2014)
<i>E. coli</i> NA114 2009 IN	B2 ST131 H30 (Clade C)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} plasmidcodiert / in Plasmid integriert	p (1) [3,5]	(Avasthi <i>et al.</i> 2011; Forde <i>et al.</i> 2014)
<i>E. coli</i> EC958 2005 GB	B2 O25b:H4 ST131 H30 (Clade C)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , andere Resistenzgene und <i>tra</i> - Genen auf pEC958	pEC958 [135,6] pEC958B [4,08]	(Forde <i>et al.</i> 2014)
<i>E. coli</i> JJ1886 2007 US	B2 ST131 H30-Rx (Clade C)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} chromosomal in Tn3 Transposon, lambda- like Prophage; <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>bla</i> _{OXA-30} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>catB3</i> auf pJJ1886-5	pJJ1886-1 [1,6] pJJ1886-2 [5,2] pJJ1886-3 [5,6] pJJ1886-4 [56] pJJ1886-5 [110]	(Andersen <i>et al.</i> 2013)
<i>E. coli</i> JJ1887 2007 US	B2 ST131 H30-Rx (Clade C)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} chromosomal in Prophagenregion; <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>aac(6')-Ib</i> auf pJJ1887-4; und <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>mphA</i> , <i>tetB</i> , <i>dfrB4</i> , <i>sul1</i> , <i>qepA</i> auf pJJ1887-5	pJJ1887-1 [1,6] pJJ1887-2 [5,2] pJJ1887-3 [5,6] pJJ1887-4 [108] pJJ1887-5 [130]	(Johnson <i>et al.</i> 2016a)
<i>E. coli</i> MNCRE44 2012 US	B2 ST131 H30-R (Clade C)	<i>sul2</i> , <i>aph(3')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA9} , <i>aadA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>2*bla</i> _{KPC-3} , <i>bla</i> _{SHV-12} auf pMNCRE44-5; und <i>bla</i> _{TEM-1} auf pMNCRE44-6;	pMNCRE44-1 [1,5] pMNCRE44-2 [4,0] pMNCRE44-3 [5,1] pMNCRE44-4 [30] pMNCRE44-5 [116] pMNCRE44-6 [122]	(Johnson <i>et al.</i> 2015)

Die Resistenzgene der *E. coli* ST131 Isolate SE15, NA114, EC958, JJ1886, JJ1887 und MNCRE44 sind, soweit bekannt, mit ihrer Lokalisation in Spalte drei der Tabelle 3-20 aufgeführt. Das Cefotaximresistenz vermittelnde Gen *bla*_{CTX-M-15} wird für *E. coli* SE15, NA114 und EC958 als plasmidcodiert beschrieben, für *E. coli* JJ1886 und JJ1887 dagegen als chromosomal.

3.11 Plasmide und Resistenzen in MDR *E. coli* ST131 Isolaten

In der Literatur sind *E. coli* ST131 Stämme als multiresistente Erreger, die *bla*_{CTX-M-15} entweder plasmidcodiert oder chromosomal tragen, beschrieben (vgl. Kap. 1.4.6). Daher stellte sich die Frage, ob die in dieser Arbeit analysierten cefotaximresistenten *E. coli* ST131 Isolate entsprechende ESBL-Resistenz vermittelnde Plasmide besitzen und ob sie diese auf empfindliche Stämme übertragen können. Bedeutend ist dies, da eine solche Übertragung, falls zutreffend, ein potentiell erhebliches Risiko für die Verbreitung dieser Resistenz darstellt.

Die klinischen *E. coli* ST 131 Isolate dieser Arbeit sollten daher auf die Übertragbarkeit der Resistenz vermittelnden Plasmide untersucht werden. Zunächst wurden die Stämme dafür generell auf das Vorhandensein von Plasmiden geprüft und danach auf die *in vivo* Übertragbarkeit ihrer Resistenzplasmide (vgl. Kap. 3.13).

3.11.1 Plasmide in *E. coli* ST131-O25b Isolaten

Die *E. coli* ST 131 Isolate dieser Arbeit wiesen unterschiedliche Resistenzen auf, die auch in verschiedenen Kombinationen auftraten (vgl. Tabelle 3-21). Für die Untersuchungen zur Übertragung der Plasmide, insbesondere im Hinblick auf CTX-M Enzyme, wurden vorrangig diejenigen *E. coli* ST131 Isolate ausgesucht, die auch eine Resistenz gegen Cefotaxim aufwiesen. Eine Übersicht der untersuchten Stämme, ihrer Resistenzen und detektierten Plasmide befindet sich in „Charakteristika, Resistenzen und Plasmide der MDR *E. coli* ST131 Isolate“, Kap. 3.12, Tabelle 3-21.

Zur Untersuchung, ob die gegen Cefotaxim resistenten Stämme Plasmide tragen, wurden die Isolate in Gegenwart von Cefotaxim über Nacht angezogen, anschließend eine Plasmidisolierung durchgeführt (vgl. Kap. 6.2.5) und die Plasmide elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-18 zu sehen.

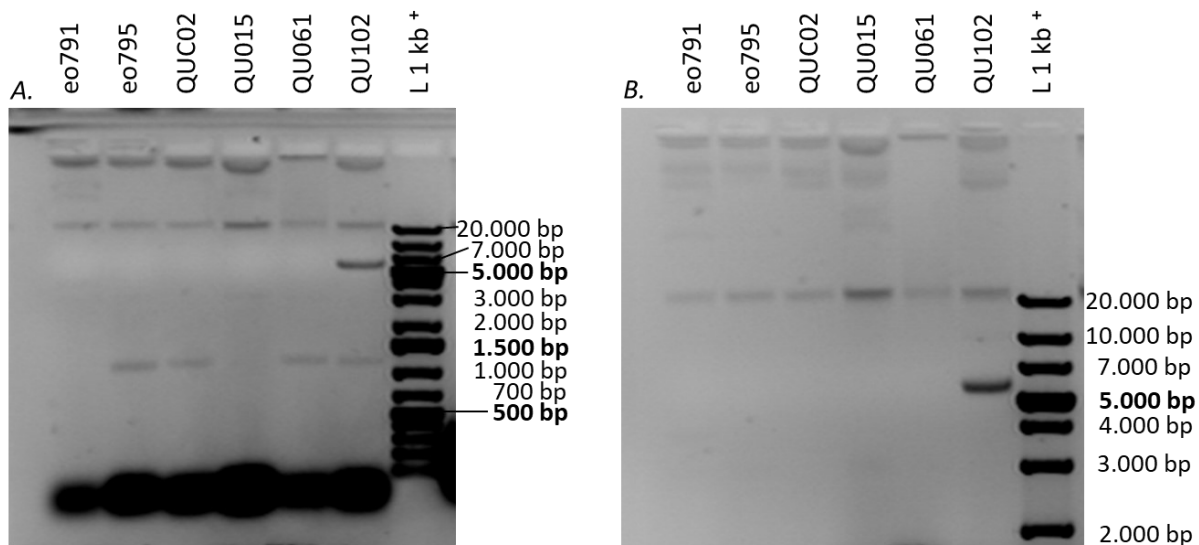


Abbildung 3-18: Isolierte Plasmide von sechs cefotaximresistenten *E. coli* ST131 Isolatzen, nach Auftrennung in einem 0,9%igen Agarosegel, aufgetragen neben der DNA-Leiter GeneRuler 1 kbp Plus (*). Das linke Bild (A.) zeigt das Gel nach ca. einer Stunde Laufzeit bei 120 Volt und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid. Rechts (B.): Dasselbe Gel nach einer weiteren Stunde Laufzeit.

Abbildung 3-18 A. lässt in den Stämmen eo795, QUC02, QU061 und QU102 jeweils ein kleines Plasmid erkennen, mit einer Bande, die auf etwa gleicher Höhe zwischen der 1.000 bp und 1.500 bp Bande der 1 kb Plus DNA Leiter läuft. Bei QU015 zeigt sich eine sehr schwache Bande auf Höhe der 3.000 bp Leiterbande, die nach längerer Laufzeit allerdings nicht mehr deutlich zu erkennen ist (vgl. Abbildung 3-18 B.). Bei QU102 zeigt sich neben der kleinen Bande noch eine stark ausgeprägte auf Höhe zwischen 5.000 bp und 7.000 bp der Leiter, die ein Plasmid mittlerer Größenordnung (etwa ≥ 6.000 bp) indiziert. Bei allen Stämmen finden sich weit oberhalb der größten Bande der DNA-Leiter, noch weitere Banden. Um diese zu differenzieren, wurden sie weiter aufgetrennt. Abbildung 3-18 B. zeigt dasselbe Gel nach weiterer Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid nach längerer Trennzeit und lässt bei einigen Stämmen bis zu fünf weitere Banden sichtbar werden, die weit oberhalb der 20.000 bp Bande der DNA-Leiter liegen. Dabei muss beachtet werden, dass sich das Laufverhalten von Plasmiden in der Gegenwart von Ethidiumbromid verändert. Plasmid-DNA kommt generell in verschiedenen Konformationen vor, der superspiralisierten (*supercoiled*) Form, die auch als *covalently closed-circular* (ccc) Form bezeichnet wird, und der relaxierten *open-circular* (oc) oder *nicked* Form (Brown 2010). Aufgrund ihrer Kompaktheit passiert die *supercoiled* Form ein Agarosegel schneller als die relaxierte Form, wodurch sich für ein Plasmid verschieden

große Banden zeigen können (Higgins und Vologodskii 2015). Daneben können auch Plasmid-Dimere oder Multimere sichtbar sein, die eine vielfache Größe aufweisen (Croizat *et al.* 2014). Zu unterscheiden sind diese Formen theoretisch noch von der linearisierten Form des Plasmids, die am besten mit einer linearen DNA-Leiter verglichen werden kann. Aufgrund der unbekanntem Plasmidsequenzen wurde aber kein enzymatischer Verdau zur Linearisierung durchgeführt und die Größe der Plasmide daher nur näherungsweise durch den Vergleich mit den linearen Banden der DNA-Leiter abgeschätzt. Theoretisch unter Berücksichtigung dessen, dass die zirkuläre Plasmid DNA in superspiralierter Form kompakter ist als linearisierte oder relaxierte Plasmid-DNA und dadurch ggf. kleiner erscheint. Beachtet werden musste außerdem, dass in einem Lauf mit Ethidiumbromid, dieses in die doppelsträngige DNA interkaliert, der positive Ladungseffekt des Ethidium-Kations, der negativen Ladung der DNA entgegenwirkt, und dass die Beladung der superspiralisierten Form des Plasmids, aufgrund der räumlichen Enge, weniger stark ist, als in linearer oder relaxierter DNA.

Das Ergebnis der Plasmidisolierung aus den *E. coli* ST131 Isolaten zeigte, dass alle mehrere Plasmide tragen. Ein Vergleich der Plasmidbanden zeigte, dass sich die Profile von eo791 und QU015 ähnelten, sie schienen mehrere (ca. 4-5) große Banden zu enthalten und ließen auf das Vorhandensein mehrerer Plasmide mit Größen von geschätzten 40.000-100.000 bp schließen. Auch eo795 und QUC02 ähnelten sich, sie wiesen beide zwei bis drei große Banden auf. Der Stamm QU061 zeigte im oberen Bereich allerdings nur eine Bande direkt unterhalb der Geltasche. Die *E. coli* ST131 Stämme wiesen somit unterschiedliche Plasmidprofile auf, in denen sowohl kleine Plasmide (von einigen Tausend Basenpaaren) als auch sehr große (von einigen Zehntausend Basenpaaren) vorkamen. Abgesehen davon zeigte sich bei allen Stämmen eine Bande oberhalb der 20 kbp Leiterbande. Diese war zu erwarten, da bei der Isolierung mittels alkalischer Lyse auch chromosomale DNA mit isoliert wird (Birnboim und Doly 1979). Um die Plasmidprofile dieser *E. coli* ST131 Stämme genauer zu bestimmen, wurden Plasmidisolierungen paralleler Ansätze der Stämme mit den der jeweiligen Antibiotika, gegen die sie resistent waren, durchgeführt. Ziel war es, alle vorhandenen (Resistenz-) Plasmide zu detektieren und Unterschiede im Plasmidprofil zu erkennen. Die isolierten Plasmide sind nach der Auftrennung im Agarosegel in Abbildung 3-19 zu sehen.

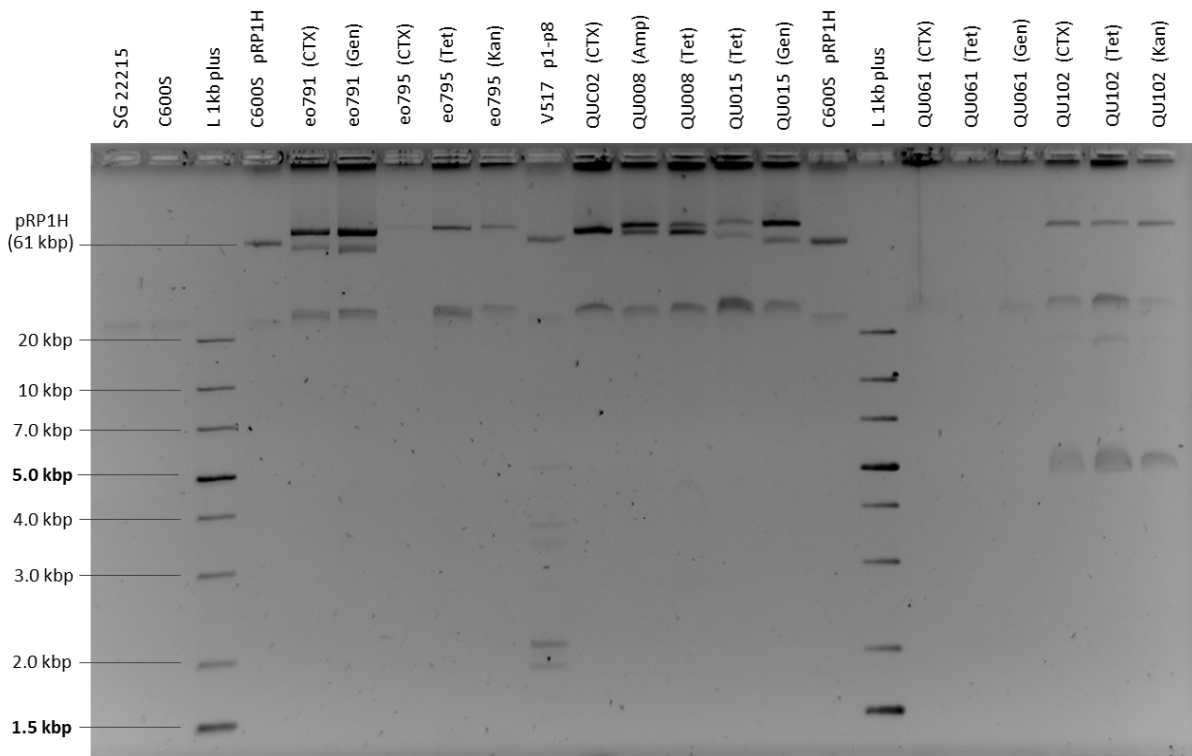


Abbildung 3-19: Isolierte Plasmide der *E. coli* ST131 Isolate und Referenzstämme nach Auftrennung in 0,9%iger Agarose bei 120 Volt für 6 Stunden und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid. Die einzelnen Spuren auf dem Gel sind mit dem Stammnamen der aufgetragenen Isolate und (der Abkürzung des für die Anzucht verwendeten Antibiotikums) beschriftet. Als DNA-Leiter wurde der GeneRuler 1 kb Plus (L 1kb plus) verwendet. Der Stamm *E. coli* C600S trägt das 61 kbp große Plasmid pRP1H, er dient als zusätzlicher Größen-Marker. Der Stamm *E. coli* V517 gilt als Referenz für Plasmide definierter Größen (Macrina *et al.* 1978).

Auf dem Gelbild sind die isolierten Plasmide der jeweiligen Kulturen eines Stammes nach Anzucht mit unterschiedlichen Antibiotika zu sehen. Aufgrund der langen Laufzeit ist die Auftrennung im oberen Bereich sehr gut. Aus diesem Grund ist der untere Bereich, mit DNA-Fragmenten bis zu 1.000 bp, bereits durchgelaufen und nicht mehr zu sehen. Um die Größen der Plasmide abschätzen zu können, wurde zweimal die DNA-Leiter GeneRuler 1 kb Plus (1-20 kbp) aufgetragen. Als Referenz und Marker-Plasmid wurde aus dem Stamm *E. coli* C600S pRP1H das Plasmid pRP1H (61 kbp) isoliert und aufgetragen. Zusätzlich wurde der *E. coli* Stamm V517 verwendet, welcher acht Plasmide definierter Größe trägt, die als Referenz für bestimmte Plasmidgrößen herangezogen werden können (Macrina *et al.* 1978). Das größte Plasmid dieses Stammes wird von Macrina *et al.* mit einem Molekulargewicht von $32 \pm 3,6$ MDa beschrieben, was einer ungefähren Größe von 55 kbp entspricht. Es läuft in der Spur des V517 (vgl. Abbildung 3-19) auf der gleichen Höhe wie das Plasmid pRP1H mit einer Größe von 61 kbp. Demnach wäre ein Unterschied von 6 kbp, was hier ca. 10 % der

Gesamtgröße entspricht, nicht zu erkennen. Dies zeigt, dass die absoluten Größen der Plasmide im betreffenden Größenbereich nur schwer genau zu bestimmen sind aber in etwa geschätzt werden können. Aufgrund dieser Gegebenheiten wurden die Größen im Folgenden anhand von pRP1H abgeschätzt.

Der Stamm *E. coli* C600S, der kein Plasmid trägt, wurde in der Plasmidisolierung als Kontrolle mitgeführt. Ebenso wurde der Stamm *E. coli* SG22215 mitgeführt, der als Abkömmling von *E. coli* MC4100 entsprechend der Literatur ebenfalls kein Plasmid trägt (Casadaban 1976; Peters *et al.* 2003). Im Falle von *E. coli* SG22215 diene dies auch der Überprüfung der Nichtanwesenheit von Plasmiden für die spätere Verwendung als Rezipient (vgl. Kap. 3.12). Erwartungsgemäß zeigte *E. coli* SG22215 keine Banden, die auf Plasmide hindeuten. Die Plasmidisolierung wurde für diesen Stamm mehrfach neben anderen Stämmen mit Plasmiden durchgeführt und bestätigte das negative Ergebnis in jedem Fall.

Der Stamm eo791 (GK 2913) wurde für die Plasmidisolierung mit Cefotaxim und Gentamicin angezogen. Beide Kulturen zeigten deutlich zwei definierte große Banden, je eine knapp unter und über der pRP1H Bande, wobei die obere stärker ausgeprägt war. Außerdem zeigte sich noch eine Bande ganz oben im Bild, direkt unterhalb der Geltasche. Daraus lässt sich ableiten, dass der Stamm zwei große Plasmide mit ca. 60 kbp und ca. 70 kbp trägt, sowie ein weiteres noch größeres mit schätzungsweise mindestens 100 kbp. Für das Isolat eo795 (GK 2914), welches mit Cefotaxim, Tetracyclin und Kanamycin angezogen wurde, zeigte sich ein anderes Bild. In allen drei Isolierungen war eine Bande bei ca. 70 kbp zu sehen, wobei diese im Ansatz mit Cefotaxim deutlich schwächer erschien. Die im Vergleich zu den anderen Proben, geringere Menge an verbliebener genomischer DNA indizierte eine insgesamt geringere Ausbeute der Präparation. Auch für eo795 war eine sehr große Bande unterhalb der Geltasche zu sehen, was die Anwesenheit eines sehr großen Plasmids vermuten ließ. Stamm QUC02 (GK 3425) zeigt nur eine Resistenz gegen Cefotaxim und wurde daher ausschließlich unter Zusatz dieses Antibiotikums angezogen. Die isolierte DNA aus dieser Kultur zeigte eine deutliche Bande auf der Höhe knapp oberhalb von pRP1H, sowie die sehr stark ausgeprägte Bande direkt unterhalb der Geltasche. Stamm QU008 (GK 3437) wurde mit Ampicillin und Tetracyclin angezogen und zeigte zwei sehr nahe beieinanderliegende Banden oberhalb von

61 kbp. Dabei fiel auf, dass sich in diesem Fall die Intensität der Banden je nach Antibiotikum veränderte. In dem Ansatz mit Ampicillin ist die obere der beiden Banden stärker ausgeprägt, im Ansatz mit Tetracyclin dagegen die untere. In beiden Fällen war die größte Bande unterhalb der Geltasche ebenfalls deutlich sichtbar. Diese ist in ihrer absoluten Größe sehr schwer bestimmbar, wird aber auf mindestens 100 kbp geschätzt. Anhand des reziproken Laufverhaltens von DNA-Fragmenten im Agarosegel wird die höchste Bande unter der Geltasche in diese Größenordnung eingruppiert, allerdings könnte das Plasmid auch noch um einiges größer sein, weil es die Tasche kaum verlassen hat. Es scheint auch keinesfalls abwegig zu sein, dass es in dieser Größenordnung liegt, da für ST131 Stämme bereits solche Plasmide von > 100 kbp beschrieben sind (vgl. Kap. 3.10). Daneben wurden Kulturen des Stammes QU015 (GK 3438) aufgetragen, jeweils einmal mit Tetracyclin und einmal mit Gentamicin angezogen. Der Stamm zeigte ebenfalls zwei nah beieinander liegende Banden gleicher Größenordnung, wobei in der Anzucht mit Gentamicin die obere deutlich stärker ausgeprägt war. Es fand sich auch die sehr große Bande von etwa > 100 kbp unterhalb der Geltasche wieder, die bereits bei dem Stamm eo791 detektiert wurde. Neben dem rechten DNA-Größenmarker wurden die Stämme QU061 (GK 3441) und QU102 (GK 3443) aufgetragen. Deren Plasmide wurden entsprechend der Resistenzeigenschaften jeweils aus drei Ansätzen isoliert, einem mit Cefotaxim, einem mit Tetracyclin und einem mit Gentamicin für QU061 bzw. Kanamycin für QU102. Für den Stamm QU061 zeigte sich in diesem Bereich kein Plasmid, im unterem Größenbereich war bereits eins von 1.000 -1.500 bp detektiert worden (vgl. Kap. 3.11). Für QU102 zeigten sich drei Plasmide, eins mit der Größe von ca. 5 kbp, eins mit ca. 18 kbp, welches bei der Tetracyclin Probe besonders stark erschien, und eins mit ca. 70 kbp. Dazu kam auch wieder die ca. 100 kbp große Bande, die ein weiteres großes Plasmid indiziert. Aus vorangegangener Isolierung (vgl. Kap. 3.11, Abbildung 3-18) war bereits bekannt, dass eo795, QUC02, QU061 und QU102 noch eine weitere kleinere Bande im Bereich des Größenmarkers bei 1,2 kbp zeigen. So ergab sich ein Gesamtbild der Plasmidprofile der untersuchten Stämme aus der Zusammenstellung der Daten aus den verschiedenen Isolierungen. Die Tabelle 3-21 im folgenden Kapitel bietet eine Übersicht zur Anzahl der detektierten Plasmide und ihrer geschätzten Größe der hier untersuchten Stämme.

3.12 Charakteristika, Resistenzen und Plasmide der MDR *E. coli* ST131 Isolate

Die wesentlichen Erkenntnisse der ausgewählten multiresistenten *E. coli* ST131-O25b Isolate inklusive der Ergebnisse aus der Plasmidanalyse sind in Tabelle 3-21 schematisch zusammengestellt. Sie zeigt die jeweiligen Stämme, den ST131-Typ, die Resistenzen, QRDR-Mutationen, weitere Charakteristika, Resistenzgene und das Plasmidprofil.

Tabelle 3-21: *E. coli* ST131-O25b Isolate und ihre charakteristischen Eigenschaften: FQ-Resistenz: Ciprofloxacin (*Cip*^R) MHK, QRDR-Mutationen (QRDR-Mut.) und PMQR, *lac*-Phänotyp, β -Lactamasen (β -Lact.), neuen Mutationen (neue Mut.), weiteren Antibiotikaresistenzen (Resistenzen), und soweit bestimmt den MHKs [μ g/mL] und Plasmiden mit Größenangaben.

Stamm (Jahr) GK-Nr.	ST131 Typ	<i>Cip</i> ^R MHK [μ g/mL] (QRDR-Mut.) PMQR	<i>lac</i> ^{+/-} β -Lact. neue Mut.	Resistenzen [MHK (μ g/mL)]	Plasmide
<i>E. coli</i> eo791 (2004) GK 2913	ST131- O25b	<i>Cip</i> ^R MHK: 32 (<i>gyrA</i> S83L+ D87N, <i>parC</i> S80I+E84V)	<i>lac</i> ⁺ TEM CTX-M (Gr. 1)	Amp ^R CTX ^R [128] Gen ^R	peo791-1 (ca. 50-60 kbp) peo791-2 (ca. 60-70 kbp) peo791-3 (ca. 100 kbp)
<i>E. coli</i> eo795 (2004) GK 2914	ST131- O25b	<i>Cip</i> ^R MHK: 256 (<i>gyrA</i> S83L+ D87N, <i>parC</i> S80I+E84V) <i>aac(6')-Ib-cr</i>**	<i>lac</i> ⁺ CTX-M-15 <i>acrR fM1</i>	Amp ^R CTX ^R Kan ^R Tet ^R	peo795-1 (1,2 kbp) peo795-2 (ca. 70 kbp) peo795-3 (ca. 100 kbp)
<i>E. coli</i> QUC02 (2008) GK 3425	ST131- O25b	<i>Cip</i> ^R MHK: 64 (<i>gyrA</i> S83L+ D87N, <i>parC</i> S80I+E84V) <i>qnrB</i>*	<i>lac</i> ⁺ TEM CTX-M-15	CTX ^R [1024] CAZ ^R [32]	pQUC02-1 (1,2 kbp) pQUC02-2 (ca. 65 kbp) pQUC02-3 (ca. 100 kbp)
<i>E. coli</i> QU008 (2008) GK 3437	ST131- O25b	<i>Cip</i> ^R MHK: 32 (<i>gyrA</i> S83L+ D87N, <i>parC</i> S80I+E84V)	<i>lac</i> ⁺ TEM	Amp ^R Tet ^R	pQU008-1 (ca. 65 kbp) pQU008-2 (ca. 70 kbp) pQU008-3 (ca. 100 kbp)
<i>E. coli</i> QU015 (2008) GK 3438	ST131- O25b	<i>Cip</i> ^R MHK: 64 (<i>gyrA</i> S83L+ D87N, <i>parC</i> S80I+E84V) OST*	<i>lac</i> ⁺ CTX-M-15 <i>ompR A35D</i>	Amp ^R CTX ^R [64] CAZ ^R [8] Tet ^R	pQU015-1 (3 kbp) pQU015-2 (ca. 60 kbp) pQU015-3 (ca. 70 kbp) pQU015-4 (ca. 100 kbp)

<i>E. coli</i> QU061 (2008) GK 3441	ST131- O25b	Cip ^R MHK: 64 (<i>gyrA</i> S83L+ D87N, <i>parC</i> S80I+E84V) <i>aac(6')-Ib-cr*</i>	<i>lac</i> ⁺ CTX-M-15	Amp ^R CTX ^R [512] CAZ ^R [8] Gen ^R Tet ^R	pQU061-1 (1,2 kbp)
<i>E. coli</i> QU102 (2008) GK 3443	ST131- O25b	Cip ^R MHK: 64 (<i>gyrA</i> S83L+ D87N, <i>parC</i> S80I+E84V) <i>aac(6')-Ib-cr*</i> <i>qnrB*</i>	<i>lac</i> ⁺ CTX-M-15	Amp ^R CTX ^R [128] CAZ ^R [16] Kan ^R Tet ^R	pQU102-1 (1,2 kbp) pQU102-2 (ca. 5 kbp) pQU102-3 (ca. 18 kbp) pQU102-4 (ca. 70 kbp) pQU102-5 (ca. 100 kbp)

Legende: Cip: Ciprofloxacin; Cip^R: Ciprofloxacinresistenz, *lac*⁺: Lactose-positiv, Amp^R: Ampicillinresistenz, CTX^R: Cefotaximresistenz, Kan^R: Kanamycinresistenz, Gen^R: Gentamicinresistenz Tet^R: Tetracyclinresistenz; OST: *Organic solvent tolerance* (Wachstum in Gegenwart von Hexan); *bestimmt durch J. Platell (Platell *et al.* 2011); **bestimmt durch N. Emrich (Emrich 2011).

Die aufgeführten *E. coli* ST131 Isolate wiesen unterschiedliche klinisch relevante Resistenzeigenschaften auf, insbesondere hinsichtlich Anzahl der Resistenzen sowie ihrer Kombination, waren aber alle empfindlich für die Kombination Cefotaxim/Clavulansäure, sowie auch für Meropenem. Die Analyse der Plasmide zeigte Unterschiede in Anzahl und Größe, sowie verschiedene Kombinationen (vgl. Tabelle 3-21). Insofern bilden die hier untersuchten Isolate ein breites Spektrum an *E. coli* ST131 Stämmen mit verschiedensten Resistenz-/Gen und Plasmid-Kombination ab.

3.13 Übertragbarkeit von Resistenzplasmiden durch *E. coli* ST131 Isolate

Es stellte sich die Frage, ob die multiresistenten klinischen *E. coli* ST131 Isolate in der Lage sind, ihre Resistenzen über Plasmide auf empfindliche *E. coli* Stämme zu übertragen. Dazu wurde analysiert, ob Plasmide und Resistenzen via Konjugation auf einen antibiotikasensiblen Stamm transferiert werden und wenn, welche Resistenzgene dabei weitergeben werden.

Für die Konjugationsversuche wurden die *E. coli* ST131-O25b Isolate eo791, eo795, QUC02, QU008, QU015, QU061 und QU102 ausgewählt. Sie eigneten sich aufgrund ihrer nachgewiesenen Plasmide (vgl. 3.11.1) und da sie bereits typisiert waren (vgl. Kap. 3.4) als potenzielle Donorstämme für die Konjugationsexperimente.

3.13.1 Etablierung von *E. coli* SG22215 als Rezipient

Als Rezipient für die Konjugation wurde der Stamm *E. coli* SG22215 gewählt, da dieser in Bezug auf die zu testenden Antibiotika empfindlich ist und geeignete genetische Marker zur Selektion besitzt. Dieser Stamm wurde ausgehend von *E. coli* MC4100 durch gezielte Mutagenese von S. Gottesman am *National Institutes of Health* (NIH) konstruiert und von J. R. Hoskins zur Verfügung gestellt (Hoskins *et al.* 2000). In *E. coli* SG22215 ist das Gen *cat* für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase innerhalb des Gens *clpP in frame* eingefügt (Insertion *clpP::cat*), sodass das von diesem Gen codierte Enzym, die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), richtig translatiert wird. Dies führt dazu, dass CAT exprimiert wird und die Resistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt. Durch diese Insertion ist ein Amplifikat des Gens *clpP* deutlich verlängert, was zur Detektion des genetischen Hintergrunds genutzt wurde. Bei der PCR zur Amplifikation des Gens *clpP* entsteht durch *clpP::cat* anstatt eines Fragments von 588 bp ein circa 1.500 bp großes Produkt. Daneben wurde die fehlende Fähigkeit von *E. coli* SG22215 Lactose zu verstoffwechseln (*lac*⁻) als weiterer genomischer Marker für diesen Stamm verwendet. Entsprechend seiner Beschreibung in der Literatur besitzt *E. coli* SG22215 keine Plasmide, was auch durch mehrfach durchgeführte Plasmidisolierung in dieser Arbeit bestätigt wurde (vgl. Kap. 3.11.1).

In einem Vorversuch wurde die Fähigkeit von *E. coli* SG22215 Plasmide aufzunehmen und somit als Rezipient zu fungieren getestet. Dafür wurde ein Konjugationsexperiment mit dem Stamm *E. coli* C600SN, der die Plasmide pRP1H und pBP507 trägt (vgl. Kap. 6.1.1.3), als Donor durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl nur pRP1H einzeln als auch beide Plasmide von *E. coli* C600SN auf *E. coli* SG22215 übertragen wurden. Somit war die generelle Funktionalität des Stamms als Rezipient für die Konjugationsversuche gegeben.

E. coli SG22215 ist nicht in der Lage Lactose abzubauen (*lac*⁻) und wächst entsprechend auf Chinablau-Lactose Agar in kleinen weißen Kolonien. Die klinischen *E. coli* ST131 Isolate wuchsen dagegen als große blaue Kolonien auf diesem Selektivagar und waren demnach in der Lage Lactose abzubauen (*lac*⁺). Aus verdünnter Mischkultur auf Chinablau-Lactose Agar ausplattiert waren die beiden Stämme nach Inkubation über Nacht visuell anhand ihrer Farbe

und Größe eindeutig zu unterscheiden. Da alle ausgewählten klinischen ST131 Isolate Lactose abbauen konnten und zudem empfindlich gegen Chloramphenicol waren, eignete sich *E. coli* SG22215 als Rezipient und wurde als solcher für die Konjugationsversuche verwendet.

3.13.2 Konjugation von *E. coli* ST131 Isolaten mit *E. coli* SG22215

Für die klinischen *E. coli* ST131 Isolate eo791, eo795, QUC02, QU008, QU015, QU061 und QU102 wurden jeweils einzeln die Konjugationsexperimente mit *E. coli* SG22215 durchgeführt (vgl. Kap. 6.2.3). Ausgehend von dem jeweiligen Konjugationsansatz wurde jeweils auf diejenigen Antibiotika in Kombination mit Chloramphenicol selektiert, gegen die das eingesetzte Isolat resistent war (vgl. Kap. 3.12). Lediglich auf eine übertragbare Tetracyclinresistenz konnte aufgrund der bereits bestehenden Resistenz des Rezipienten *E. coli* SG22215 nicht getestet werden. Von den Isolaten eo795, QUC02, QU008, QU015, QU061 und QU102 wurden für keines der getesteten Antibiotika Transkonjuganden selektiert, auch nicht nach Wiederholung der Experimente mit verlängerter Inkubationszeit. Diese *E. coli* ST131 Isolate gaben ihre Resistenzen unter den getesteten Bedingungen nicht weiter.

In den Experimenten mit *E. coli* ST131 Isolat eo791 entstanden Transkonjuganden, die im folgenden Kapitel beschrieben werden.

3.14 Plasmidtransfer von *E. coli* ST131 Isolat eo791

3.14.1 Konjugation von *E. coli* ST131 Isolat eo791 mit *E. coli* SG22215

Bei dem *E. coli* Stamm eo791 handelt es sich um ein ST131-O25b Isolat aus England aus dem Jahr 2004. Wie zuvor gezeigt war *E. coli* eo791 (GK 2913) resistent gegen Ampicillin, Cefotaxim, Ciprofloxacin und Gentamicin (vgl. Kap. 3.12), jedoch empfindlich gegen Chloramphenicol und in der Lage Lactose abzubauen (*lac*⁺), (vgl. 3.13.1). Er trägt drei Plasmide der Größen von ca. 60 kbp, 70 kbp und 100 kbp (vgl. Kap. 3.12).

Die relevantesten Eigenschaften der verwendeten Stämme: *E. coli* ST131-O25b Isolat eo791 als Donor und *E. coli* SG22215 als Rezipient sind in Abbildung 3-20 dargestellt.

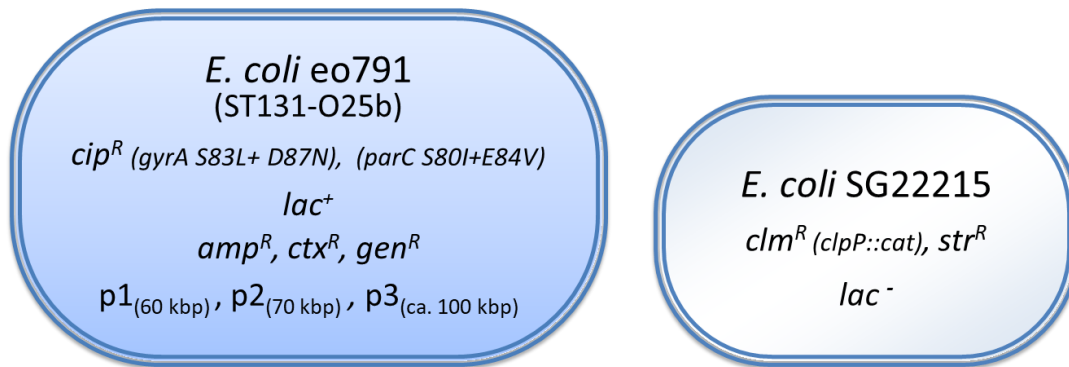


Abbildung 3-20: Schematische Darstellung des *E. coli* ST131-O25b Isolats eo791 (GK 2913) mit seinen genetischen Markern für Ciprofloxacinresistenz (*cip^R*), Lactosestoffwechselstatus (*lac⁺*) und den Resistenzen für Ampicillin (*amp^R*), Cefotaxim (*ctx^R*) und Gentamicin (*gen^R*) (links) und dem potentiellen Rezipienten *E. coli* SG22215 mit seinem genomischen Marker für Chloramphenicolresistenz (*clm^R*), Streptomycinresistenz (*str^R*) und Lactosestoffwechselstatus (*lac⁻*).

Diese beiden Stämme wurden in einem Konjugationsexperiment für drei Stunden co-inkubiert (vgl. Kap. 6.2.3.1). Unter diesen Bedingungen konnten Transkonjuganden für die Antibiotikakombinationen Chloramphenicol/Ampicillin und Chloramphenicol/Gentamicin, jedoch nicht für Chloramphenicol/Cefotaxim isoliert werden.

Die Konjugationsexperimente wurden in gleicher Weise auch mit fünf Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Aus diesen Ansätzen wurden wiederum Transkonjuganden mit Resistenz gegen Chloramphenicol/Ampicillin sowie Chloramphenicol/Gentamicin selektiert und darüber hinaus zusätzlich auch solche mit Resistenz gegen Chloramphenicol/Cefotaxim.

3.14.1.1 Transkonjuganden auf Ampicillin/- und Gentamicin/Chloramphenicol

In der weiteren Testung der Transkonjuganden wurde festgestellt, dass die auf Ampicillin/Chloramphenicol selektierten Transkonjuganden ebenfalls Resistenz gegen Gentamicin aufwiesen. Selbiges bestätigte sich auch andersrum für die auf Gentamicin/Chloramphenicol selektierten Transkonjuganden. Von den aus der Selektion mit Ampicillin/Chloramphenicol erhaltenen Transkonjuganden (TKs) wurden zwei, mit den Nummern 1 und 2 ausgewählt, um diese auf vorhandene Plasmide, erworbene Resistenzeigenschaften (phänotypisch) sowie die dafür verantwortlichen Gene zu untersuchen. Aus der Selektion mit Gentamicin/Chloramphenicol wurden drei Transkonjuganden, mit den Nummern 4, 9 und 10, zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Auswahl der Transkonjuganden erfolgte zufällig aus der Menge der TKs mit bestätigtem Resistenz-Muster nach Vereinzelung.

Aus dem Ansatz mit einer Inkubationszeit von fünf Stunden entstanden ebenfalls Transkonjuganden auf Ampicillin/Chloramphenicol sowie Gentamicin/Chloramphenicol. Von diesen wurden die TKs mit den Nummern 14 und 16 aus der Selektion mit Ampicillin/Chloramphenicol, sowie die TKs mit den Nummern 17, 18 und 20 aus der Selektion mit Gentamicin/Chloramphenicol für weitere Untersuchungen ausgewählt.

3.14.1.2 Transkonjuganden auf Cefotaxim/Chloramphenicol

Für die Kombination Cefotaxim/Chloramphenicol ließen sich von *E. coli* ST131 Isolat eo791 und *E. coli* SG22215 in den Konjugationsexperimenten mit einer Inkubationszeit von drei Stunden keine Transkonjuganden selektieren, aber wohl für den Ansatz mit einer Inkubationszeit von fünf Stunden. Das Wachstum weißer Kolonien bestätigte den (*lac*⁻) Phänotyp von *E. coli* SG22215 mit Resistenz gegen Cefotaxim und Chloramphenicol. Die Transkonjuganden mit den Nummern 23, 105, 109 und 110 wurden weiter untersucht.

Für die entstandenen Transkonjuganden wurde angenommen, dass in allen Fällen von neu erworbenen Resistenzen ein Plasmid, welches die entsprechenden Resistenzgene trägt, von *E. coli* ST131 eo791 auf *E. coli* SG22215 übertragen wurde. Dies sollte später durch den Nachweis übertragener Plasmide bestätigt werden (vgl. Kap. 3.14.3).

3.14.2 Empfindlichkeitsbestimmung der Transkonjuganden

Die Transkonjuganden von *E. coli* SG22215 aus dem Konjugationsversuch mit *E. coli* eo791 wurden hinsichtlich ihrer erworbenen Resistenzen untersucht. Die stammspezifischen chromosomal codierten Resistenzen waren Ciprofloxacin für den Donor *E. coli* eo791 und Chloramphenicol für den Rezipienten *E. coli* SG22215. Für diese Substanzen wurde auf Resistenz (R) oder Sensibilität (S) geprüft und für die potentiell erworbenen Resistenzen Ampicillin, Gentamicin und Cefotaxim wurden die MHKs bestimmt (vgl. Kap. 6.2.2.2.1). Im Falle des hier untersuchten *E. coli* ST131 Isolats eo791 gab es verschiedene Transkonjuganden die auf Ampicillin (Amp), Gentamicin (Gen) oder Cefotaxim (CTX) selektiert worden waren. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind nachfolgend in Tabelle 3-22 aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 3-22: Aufgelistet sind die Ausgangsstämme *E. coli* eo791 und *E. coli* SG22215 sowie die nach Konjugation selektierten Transkonjuganden (TK-Nr.) von SG22215. Die Transkonjuganden sind mit ihren Nummern angegeben sowie mit dem Antibiotikum, mit dem sie selektiert wurden. In den Spalten sind die Ergebnisse der Resistenztestung angegeben, dabei wurde im Fall von Ciprofloxacin und Chloramphenicol in resistent (R) und sensibel (S) unterschieden. Für Gentamicin, Ampicillin und Cefotaxim sind die Werte der MHK-Bestimmung angegeben.

Stamm TK-Nr. (Selektionsantibiotikum)	Cipro- floxacin [S/R]	Gentamicin MHK [µg/mL]	Ampicillin MHK [µg/mL]	Cefotaxim MHK [µg/mL]	Chloram- phenicol [S/R]
<i>E. coli</i> eo791 ST131-O25b	R*	64	> 2048	128	S
<i>E. coli</i> SG22215	S	0,125	4	≤ 1 (0,016)	R **
<i>E. coli</i> SG22215 TK-1 (Amp)	S	32	1024	≤ 1	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-2 (Amp)	S	32	1024	≤ 1	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-4 (Gen)	S	32	1024	≤ 1	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-9 (Gen)	S	32-64	1024	≤ 1	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-10 (Gen)	S	32	1024	≤ 1	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-14 (Gen)	S	16	1024	≤ 1	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-20 (Gen)	S	32	2048	≤ 1	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-23 (CTX)	S	0,125	2048	32	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-105 (CTX)	S	0,125	2048	16	R
<i>E. coli</i> SG22215 TK-109 (CTX)	S	0,125	2048	32	R

Legende: empfindlich (S) und resistent (R), nach EUCAST für Ciprofloxacin (S: MHK ≤ 0,25 µg/mL und R: MHK > 0,5 µg/mL) und für Chloramphenicol (S: MHK ≤ 8 µg/mL und R: MHK > 8 µg/mL). Selektionsantibiotika Ampicillin (Amp), Gentamicin (Gen) oder Cefotaxim (CTX). * *E. coli* eo791: MHK_{Ciprofloxacin} = 32 µg/mL.
** *E. coli* SG22215: MHK_{Chloramphenicol} = 240 µg/mL.

Die *E. coli* SG22215 Transkonjuganden zeigten jeweils eine deutliche Erhöhung der MHK gegen diejenigen Antibiotika, auf denen sie selektiert wurden. Auffällig war, dass alle Transkonjuganden, die auf Ampicillin selektiert wurden auch resistent gegen Gentamicin waren, so wie auch umgekehrt (MHK-Werte sind Tabelle 3-22 zu entnehmen). Insofern wurde eine Übertragung der Resistenzen für Ampicillin, Gentamicin und Cefotaxim von *E. coli* eo791 auf *E. coli* SG22215 bestätigt.

3.14.3 Nachweis übertragener Plasmide von *E. coli* ST131 Isolat eo791

Die Transkonjuganden von *E. coli* SG22215 aus der Konjugation mit *E. coli* eo791 (GK 2913) mit Selektion auf Ampicillin/Chloramphenicol, Gentamicin/Chloramphenicol und Cefotaxim/Chloramphenicol wurden auf die Anwesenheit von Plasmiden geprüft. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Anzucht der TKs unter Zusatz von Chloramphenicol mit entsprechend entweder Ampicillin (Amp), Gentamicin (Gen) oder Cefotaxim (CTX), durch alkalische Lyse mit Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-Fällung (vgl. Kap. 6.2.5). Die Plasmide wurden aufgrund der erwarteten Größen von *E. coli* eo791 (60- > 100 kbp) durch lange Elektrophorese stark aufgetrennt (vgl. Kap. 3.11.1). Das Ergebnis zeigt Abbildung 3-21.

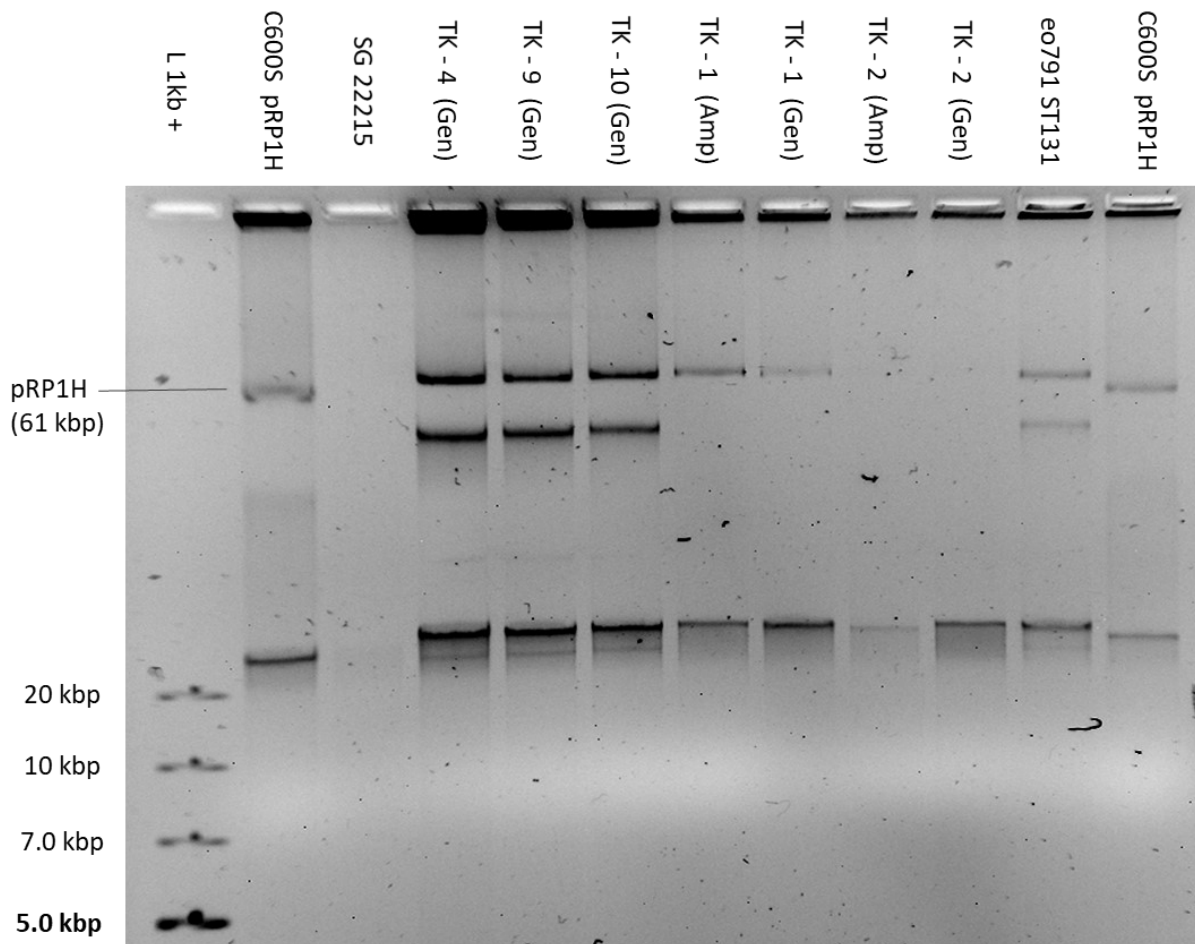


Abbildung 3-21: Ergebnis der Plasmidisolierung der Transkonjuganden (TKs) von SG22215 mit eo791 nach Elektrophorese auf einem 0,8%igen Agarosegel und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid. Aufgetragen wurden v. l. n. r. die DNA-Leiter, *E. coli* C600S mit dem Markerplasmid pRP1H (Spur 2 und 12), der Ausgangsstamm *E. coli* SG22215, die Transkonjuganden (mit Angabe des für die Anzucht zur Plasmidisolierung verwendeten Antibiotikums, entweder Ampicillin (Amp) oder Gentamicin (Gen), und der ST131 Stamm eo791. Zu sehen ist der obere Bereich des Gels auf dem sich die Banden befinden. Von der DNA-Leiter GeneRuler 1 kb plus (L1kb+) sind noch die obersten vier Banden (mit 5-20 kbp) zu sehen.

Die Plasmidisolierung zeigte für *E. coli* ST131 eo791 erneut die beiden großen Plasmide, die sich etwas unterhalb und fast auf Höhe der Bande des Referenz-Plasmids pRP1H (61 kbp) aus *E. coli* C600S befinden. An diesem abgeschätzt, sind die Plasmide von eo791 in etwa 60 kbp und 70 kbp groß. *E. coli* SG22215 zeigte keine Plasmide. Dafür zeigten sich in den Transkonjuganden (TKs) Nr. 4, 9 und 10 die beiden großen Plasmide. In Transkonjugand (TK) Nr. 1 war nur die Bande des ca. 70 kbp Plasmids und in TK Nr. 2 keine der beiden Banden aus *E. coli* eo791 zu sehen. Die TKs Nr. 4, 9 und 10, die auf Gentamicin/Chloramphenicol selektiert wurden, zeigten das gleiche Plasmidmuster (vgl. Abbildung 3-21), welches dem von *E. coli* eo791 (Ausgangsstamm) entspricht. Die TKs Nr. 1 (TK-1) und Nr. 2 (TK-2) zeigten in zwei Isolierungen, für die sie einmal mit Ampicillin und einmal mit Gentamicin angezogen wurden, das gleiche Muster, das sich allerdings von dem der anderen Transkonjuganden unterscheidet. Außerdem zeigten alle Transkonjuganden, sowie *E. coli* eo791 und auch *E. coli* C600S eine Bande direkt unterhalb der Geltasche, die geschätzt ≥ 100 kbp ist. Dabei könnte es sich um chromosomale DNA, ein Dimer des ca. 60 kbp Plasmids oder ein sehr viel größeres (ca. ≥ 100 kbp) Plasmid handeln. *E. coli* SG22215, der kein Plasmid trägt, zeigt eine solche Bande nicht, was dagegenspricht, dass es sich dabei um chromosomale DNA handelt. Daneben zeigten auch alle Stämme, bis auf SG22215, eine weitere Bande, die sich etwas oberhalb der größten Bande der DNA-Leiter von 20 kbp befindet. In diesem Bereich treten auch Bruchstücke chromosomaler DNA auf, die bei *E. coli* aufgrund der Nukleoid-Organisation eine solche Größe von etwa 20 kbp aufweisen (Verma *et al.* 2019) und bei der Alkalischen Lyse mitisoliert werden. Bei den TKs Nr. 4, 9 und 10 sowie eo791 zeigten sich in diesem Bereich sogar zwei Banden, von grob geschätzten 22 und 30 kbp wobei die obere deutlich stärker ausgeprägt war. Die auf Gentamicin/Chloramphenicol selektierten Transkonjuganden wiesen drei Plasmide mit einer Größe von schätzungsweise ≤ 60 kbp, ≤ 70 kbp und > 100 kbp auf und zeigten dabei alle das gleiche Muster. Die auf Ampicillin selektierten Transkonjuganden zeigten dagegen nur ein bis zwei Plasmide. Für TK-1 zeigte sich bei Isolierung mit Ampicillin und Gentamicin ein Plasmid bei ≥ 60 kbp und ein sehr großes von > 100 kbp. Bei TK-2 war das Muster für beide Selektionsantibiotika gleich und zeigte kein Plasmid im Bereich von 60 kbp und ≥ 70 kbp. Allerdings war hier auch die Bande bei weit > 100 kbp zu erkennen, welche auch für TK-2 ein sehr großes Plasmid indizierte.

3.14.3.1 Plasmidprofile verschiedener Transkonjuganden im Vergleich

Die Plasmidisolierung weiterer Transkonjuganden ist in Abbildung 3-22 zu sehen. Sie erfolgte ebenfalls nach Anzucht mit den Selektionsantibiotika, für die TKs mit Nr. 14 und 16 Ampicillin, für die TKs Nr. 17, 18 und 20 Gentamicin und bei den TKs Nr. 105, 109 und 110 Cefotaxim.

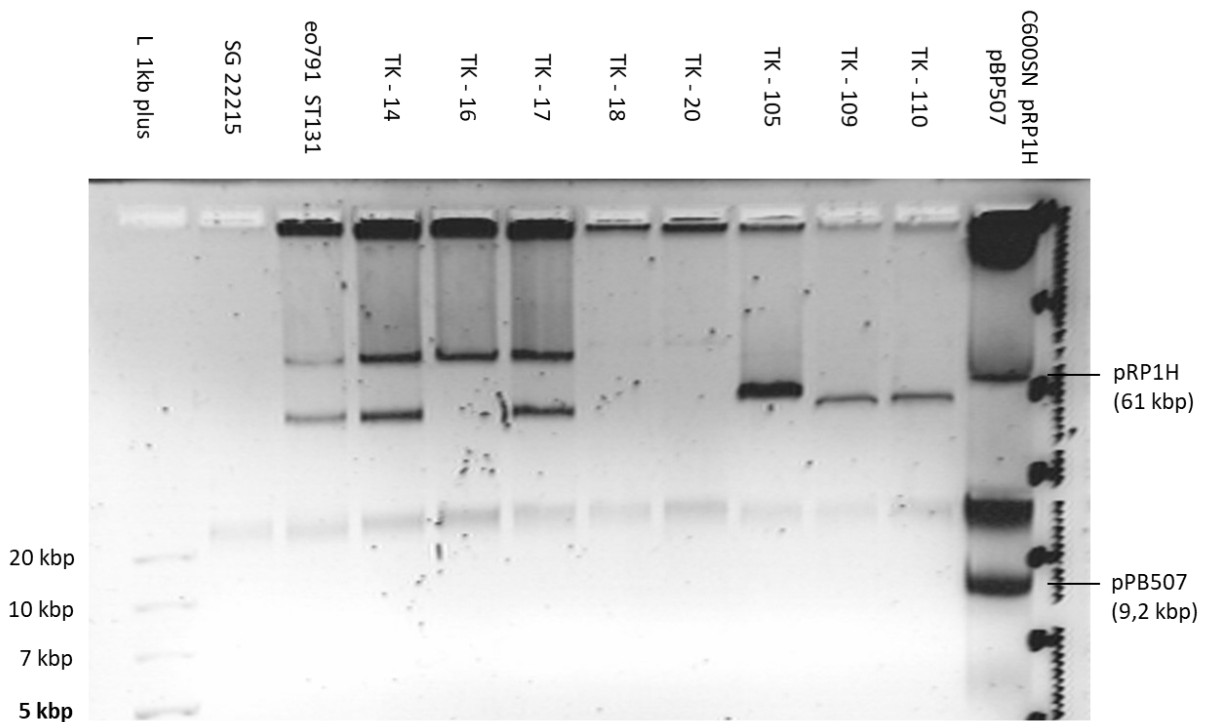


Abbildung 3-22: Ausschnitt des oberen Gelabschnitts der aufgetragenen isolierten Plasmide (Fotographie auf Gelschlitten). Es zeigt v. l. n. r. die DNA-Leiter (L) GeneRuler 1kb plus, *E. coli* SG22215, *E. coli* ST131 Isolat eo791, Transkonjuganden (TK-Nr.) und Referenzstamm *E. coli* C600SN, der die Plasmide pBP507 und pRP1H mit Größen von 9,2 kbp und 61 kbp trägt.

Die Plasmidisolierung zeigte für den Rezipienten *E. coli* SG22215, wie auch in allen vorherigen Isolierungen, nur eine diffuse Bande über 20 kbp und keine Plasmide. Bei dieser Auftrennung zeigt der Donor *E. coli* eo791 drei deutlich sichtbare Banden im geschätzten Größenbereich von 50-60 kbp, \geq 60-70 kbp und $>$ 100 kbp. Der hier als Referenz verwendete Stamm *E. coli* C600SN mit pBP507 (9,2 kbp) und pRP1H (61 kbp) zeigte 3-4 Banden, wovon die größte allerdings undefiniert erscheint und nicht als konkrete Bande. Die Banden von ca. 10 kbp und 20 kbp sind wohl auf pBP507 und eventuell auf sein Dimer (geschätzte Größe 18,4 kbp) zurückzuführen, die Banden, weit oberhalb von 20 kbp, auf pRP1H (61 kbp) und analog eventuell auf dessen Dimer (geschätzte Größe 122 kbp). Die geschätzten Größen dienten als Anhaltspunkt zur Größenabschätzung der sehr großen Plasmide von *E. coli* eo791 und den

Ergebnisse

Transkonjuganden, da kein Marker oder Plasmide in dieser Größenordnung verfügbar waren. Zur Evaluierung der sehr großen Plasmide und des pRP1H-Dimers wurden sie sehr weit aufgetrennt. Das Resultat ist in Abbildung 3-23 zu sehen.

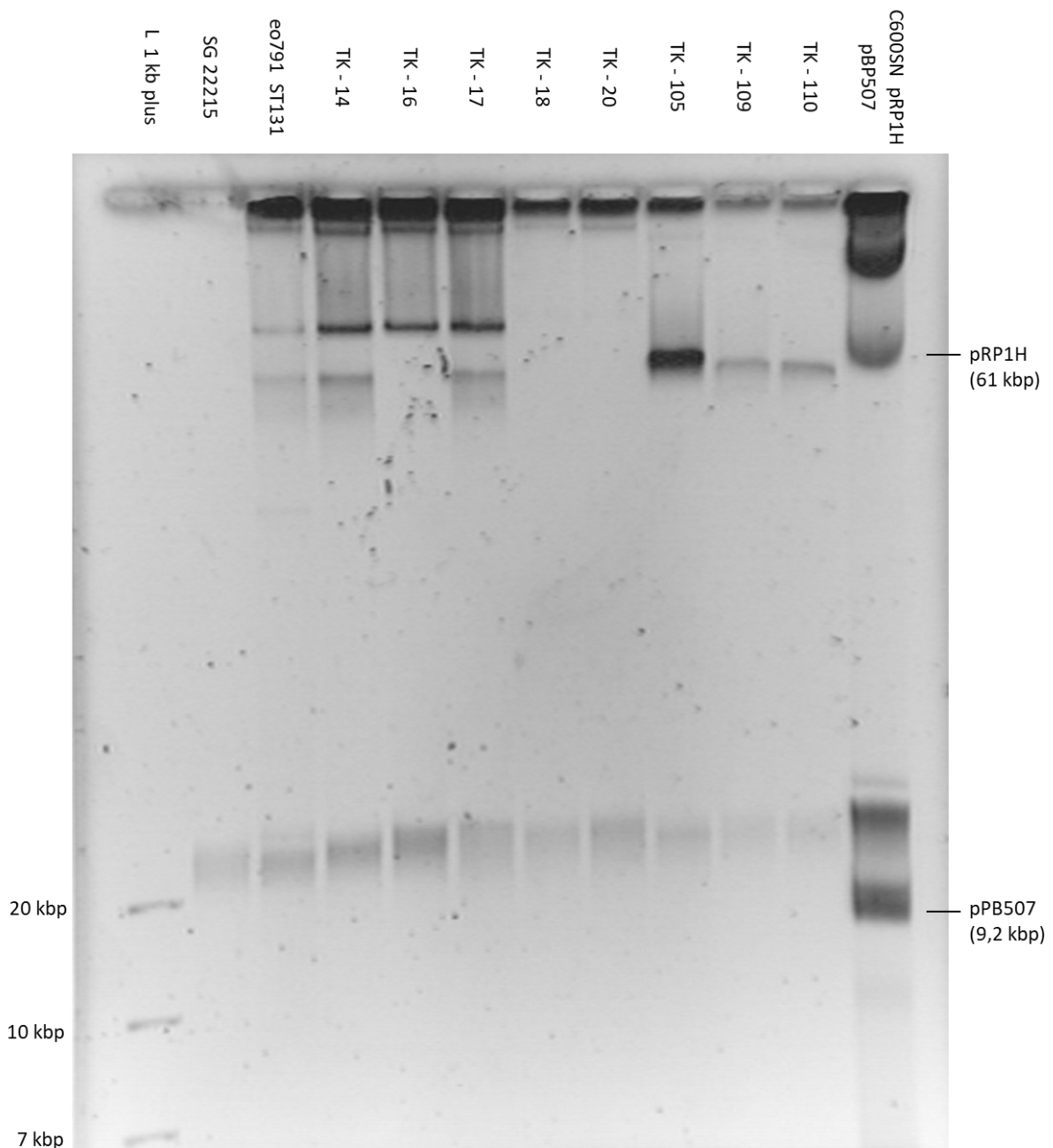


Abbildung 3-23: Bild der sehr stark aufgetrennten, isolierten Plasmide der Konjugationsstämme nach Agarose-Gelelektrophorese (weiterentwickelt ausgehend von Abbildung 3-22). Es zeigt v. l. n. r. die Spur der DNA-Leiter GeneRuler 1kb plus, des Rezipienten E. coli SG22215, des Donors E. coli ST131 eo791, der verschiedenen Transkonjuganden (TK-Nr.) und des Referenzstamms E. coli C600SN, der die Plasmide pBP507 und pRP1H mit Größen von 9,2 kbp und 61 kbp trägt.

Nach fortgesetzter Elektrophorese zeigte sich nun eine weitere definierte Bande in C600SN pRP1H pBP507 von hoher Größe. Auf der Grundlage, dass C600SN neben pBP507 mit 9,2 kbp nur das Plasmid pRP1H mit 61 kbp trägt, wird angenommen, dass es sich bei der noch größeren Bande, die erst nach der sehr langen Auftrennung sichtbar wurde, um ein Dimer der doppelten Größe von pRP1H, also 122 kbp handelt. Es war erstmalig bei dieser sehr hohen Auftrennung richtig zu sehen. Außerdem wurde nach dieser Zeit auch in *E. coli* eo791 noch eine weitere definierte Bande sichtbar. Diese sehr große Bande erschien noch weiter oben im Gel und indiziert somit ein sehr großes Plasmid mit einer Größe von mehr als 122 kbp (geschätzt anhand des Dimers von pRP1H). Dieses Plasmid findet sich sowohl im Ausgangsstamm *E. coli* eo791 sowie auch in den Transkonjuganden Nr. 14, 16, 17, 18 und 20 wieder. Davon tragen die TKs Nr. 14 und 17 die zuvor beschriebenen zwei weiteren Banden; TK-16 dagegen nur eine, die von ca. 70 kbp. In TK Nr. 105 zeigt sich ebenfalls eine schwache Bande in diesem Größenbereich, die allerdings geringfügig darunter läuft, und somit etwas kleiner ist. Die TKs Nr. 18 und 20 zeigten dagegen nur eine, und zwar die ganz große Bande von > 122 kbp. Die TKs mit den Nummern 105, 109 und 110 dagegen zeigten je eine leicht abweichend liegende Bande im Bereich von ca. 60 kbp, die besonders in TK Nr. 105 sehr stark ausgeprägt war. Diese lief allerdings etwas höher als die von *E. coli* eo791. Zudem zeigte TK Nr. 105 die bereits erwähnte sehr hoch laufende Bande ganz oben im Gel.

3.14.4 Nachweis übertragener Resistenzgene von *E. coli* ST131 Isolat eo791

Die einzelnen Resistenzen, die für die verschiedenen Transkonjuganden phänotypisch gefunden wurden, sollten auch genotypisch nachgewiesen werden, um den Transfer der Resistenzgene auf den Rezipienten zu verifizieren. Dazu wurden die DNA der einzelnen Transkonjuganden isoliert (vgl. Kap. 6.2.4.1) und die Resistenzgene mittels PCR nachgewiesen. Als Kontrollen wurden dabei jeweils der Donor sowie der Rezipient mitgeführt.

3.14.4.1 Nachweis der TEM-Typ β -Lactamase

Die Transkonjuganden TK-1 und TK-2, die auf Ampicillin selektiert wurden, wurden einerseits auf das Vorhandensein des β -Lactamase-Gens aus *E. coli* eo791 geprüft, sowie andererseits auf ihren genetischen Stammhintergrund. Dazu wurde einerseits ein Teil aus dem Gen *bla*_{TEM}

Ergebnisse

amplifiziert und andererseits eine charakterisierende PCR auf *clpP* durchgeführt. Der Stammhintergrund des Rezipienten mit der spezifischen Eigenschaft *clpP::cat* ist durch die Integration des ca. 900 bp großen Gens *cat* innerhalb von *clpP* charakterisiert (Hoskins *et al.* 2000). Bei der Amplifikation von *clpP*, entsteht in einem Wildtyp-Stamm ein 588 bp großes Fragment (vgl. Kap. 6.2.3.3.1) und in SG22215 durch die Insertion dagegen ein deutlich größeres PCR-Produkt von ca. 1500 bp. Die Abbildung 3-24 zeigt die Ergebnisse der beiden identifizierenden PCRs auf *clpP* (links) und *bla_{TEM}* (mittig), sowie deren Duplex-PCR (rechts).

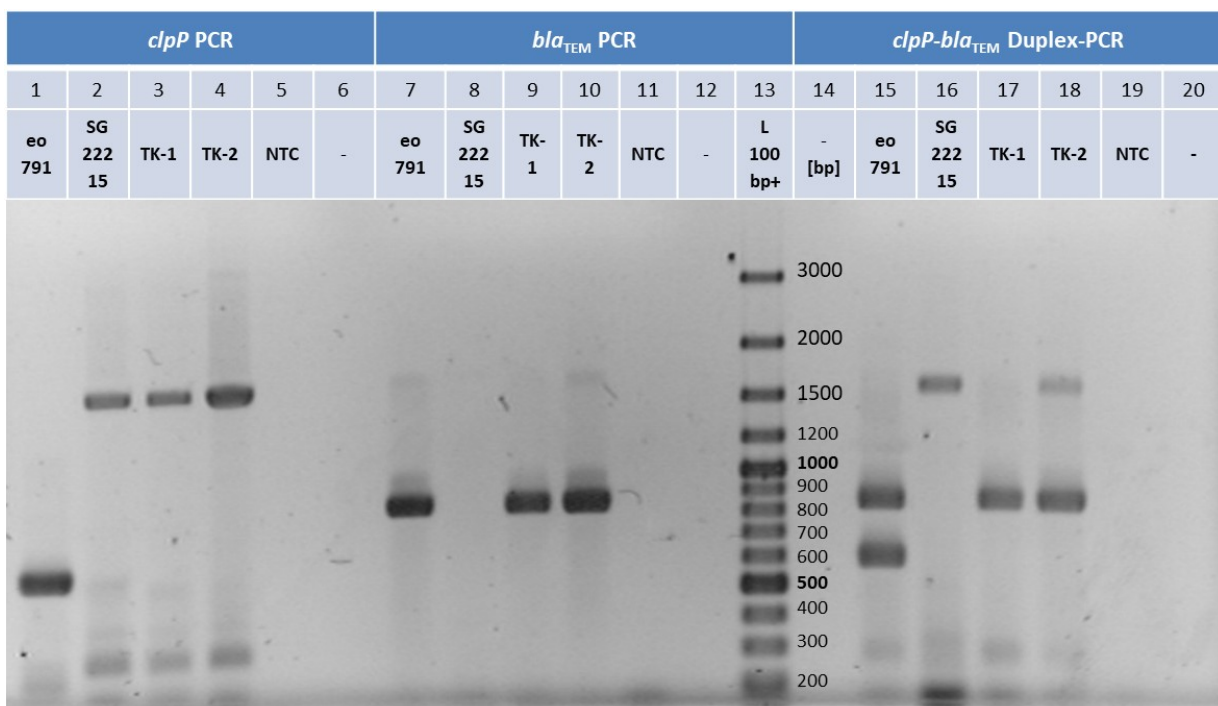


Abbildung 3-24: PCR-Produkte der Gene *clpP* und *bla_{TEM}* von Donor, Rezipient und Transkonjuganden nach Elektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid. Zu sehen sind in den Spuren 1-5 die Produkte der *clpP*-PCR für die Stämme eo791, SG22215, TK-1 und TK-2, sowie die NTC. Die Spuren 7-11 zeigen die Produkte der *bla_{TEM}*-PCR für dieselben Stämme in gleicher Reihenfolge. Spur 13 beinhaltet die DNA-Leiter, Spur 6, 12, 14 und 20 sind leer (-), wobei auf Spur 14 die Größen der DNA-Leiter in bp über dem Bild eingblendet wurden. In Spur 15-19 befinden sich die Produkte der *clpP-bla_{TEM}* Duplex-PCR, ebenfalls in gleicher Stammreihenfolge.

Der Vergleich des PCR-Produkts von *clpP* zeigte für *E. coli* eo791 ein ca. 600 bp großes Fragment und für SG22215 sowie die Transkonjuganden Nr. 1 und Nr. 2 ein Fragment von ca. 1500 bp. Der Stammhintergrund von *E. coli* SG22215 wurde somit für die Transkonjuganden bestätigt. In der PCR auf *bla_{TEM}*, welches die Resistenz gegen Ampicillin vermittelt, zeigte sich ein Fragment von 838 bp für eo791, sowie für die beiden Transkonjuganden; jedoch nicht im Ausgangsstamm SG22215. Damit wurde neben der phänotypischen Resistenz auch die

Übertragung des Resistenzgens bla_{TEM} auf den Rezipienten *E. coli* SG22215 nachgewiesen. Für bla_{TEM} sind mittlerweile über 250 verschiedene Varianten bekannt (Stand: 07/2024), (Naas *et al.* 2017), weshalb eine PCR genutzt wurde, die einen universalen Teil des Gens nachweist (vgl. Kap. 6.2.9.4).

3.14.4.2 Nachweis der CTX-M-Typ β -Lactamase

Die auf Cefotaxim selektierten Transkonjuganden wurden auf das Vorhandensein des im Donorstamm *E. coli* eo791 vorhandenen β -Lactamase-Gens $bla_{CTX-M-Gr.1}$ der CTX-M Gruppe 1 (vgl. Kap. 3.5 und 8.1.4) analysiert. Der Nachweis des $bla_{CTX-M-Gr.1}$ Gens erfolgte mittels PCR zum Nachweis der Gene der verschiedenen CTX-M-Gruppen nach Woodford *et al.* (vgl. 6.2.9.2). Die Ergebnisse der PCR auf $bla_{CTX-M-Gr.1}$ sind in Abbildung 3-25 dargestellt.

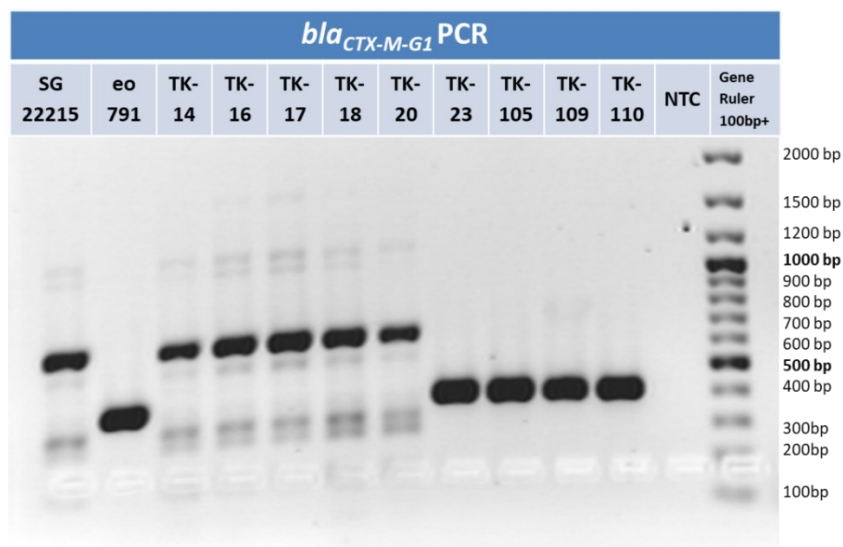


Abbildung 3-25: Ergebnisse der PCR auf $bla_{CTX-M-Gr.1}$ der auf Ampicillin, Gentamicin und Cefotaxim selektierten Transkonjuganden und Ausgangsstämme nach Elektrophorese mit Ethidiumbromid; aufgetragen wurden v. l. n. r. die Ausgangsstämme SG22215 und eo791, die Transkonjuganden (TKs) Nr. 14, 16, 17, 18, 20, 23, 105, 109, 110, die NTC und die DNA-Leiter GeneRuler 100bp plus.

Im Stamm eo791 sowie den Transkonjuganden (TK-) Nr. 23, 105, 109 und 110 zeigte sich eine starke Bande in der für das $bla_{CTX-M-Gr.1}$ Fragment erwarteten Größe von 410 bp (Woodford *et al.* 2006). Der Nachweis des $bla_{CTX-M-Gr.1}$ Gens wurde somit in allen cefotaximresistenten Transkonjuganden erbracht. Die TKs Nr. 14, 16, 17, 18 und 20 und der Ausgangsstamm SG22215, die alle empfindlich für Cefotaxim sind, zeigten kein Fragment auf Zielgröße des $bla_{CTX-M-Gr.1}$ Fragments, aber mindestens sechs andere Banden mit verschiedenen Größen (vgl.

Ergebnisse

Abbildung 3-25). Dies lässt schließen, dass sich in der PCR bei Nichtvorhandensein der Zielstruktur sehr viele Nebenprodukte bilden und sie somit nicht sehr spezifisch ist. Der Stammhintergrund von *E. coli* SG22215 wurde für alle Transkonjuganden durch PCR geprüft und nachgewiesen, sie zeigten wie erwartet alle das SG22215 entsprechende *clpP*-Fragment.

Im Weiteren wurde für diese Transkonjuganden ebenfalls die PCR zum Nachweis des Gens *bla*_{TEM} durchgeführt, um auf dessen Übertragung zu prüfen. Das *bla*_{TEM}-Fragment wurde in den Transkonjuganden Nr. 14, 16, 17, 18 und 20, welche resistent gegen Ampicillin und Gentamicin waren nachgewiesen und auch in Transkonjugand Nr. 105 mit Resistenz gegen Cefotaxim. Für die weiteren cefotaximresistenten Transkonjuganden Nr. 23, 109 und 110 fiel die PCR negativ aus. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-26 zu sehen.

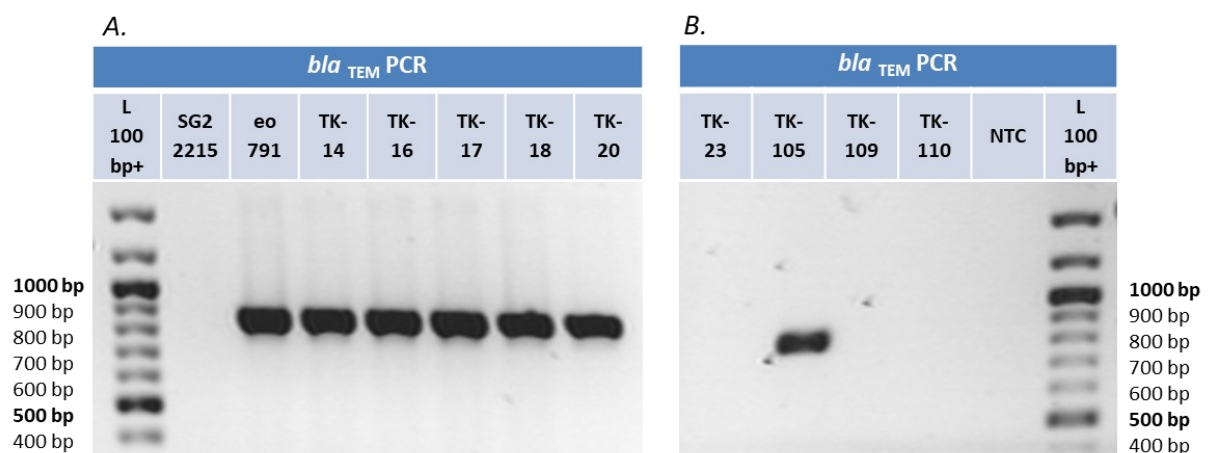


Abbildung 3-26: Resultate der *bla*_{TEM} PCR der Transkonjuganden auf Ampicillin, Gentamicin und Cefotaxim nach Agarose-Gelelektrophorese und Visualisierung mit Ethidiumbromid. Aufgetragen wurden jeweils v. l. n. r. auf Gel A.: Die DNA-Leiter GeneRuler 100bp plus, die Stämme SG22215 und eo791, die Transkonjuganden Nr. 14, 16, 17, 17, 18 und 20 und auf Gel B.: Die Transkonjuganden 23, 105, 109 und 110, sowie die NTC und die DNA-Leiter GeneRuler 100bp plus.

Diese Ergebnisse lassen in Summe darauf schließen, dass von *E. coli* eo791 sowohl die TEM-Typ als auch die CTX-M-Typ β -Lactamase durch Konjugation auf den empfindlichen Stamm *E. coli* SG22215 übertragen wurden. Im Fall des Transkonjuganden Nr. 105 (TK-105), welcher auf Cefotaxim selektiert wurde, waren es zwei β -Lactamase-Gene aus den Gruppen *bla*_{TEM} und *bla*_{CTX-M-Gr.1}, wogegen die anderen cefotaximresistenten TKs nur *bla*_{CTX-M-Gr.1} allein aufwiesen.

4 Diskussion

4.1 Auftreten und Entwicklung von *E. coli* ST131

4.1.1 Erstes Auftreten pathogener *E. coli* ST131 Isolate in den 2000er Jahren

Nachdem die Aufmerksamkeit für den globalen Risikoklon *E. coli* ST131 seit 2008 stetig zunahm (vgl. Kap. 1.4.1.3), erreichte sie um 2014 einen Höhepunkt und es stellte sich zunehmend auch die Frage nach seiner Herkunft. Die ersten Beschreibungen von *E. coli* ST131 als pathogenen, weit verbreiteten Klon stammten aus 2008 (vgl. Kap. 1.4.1.2). Dabei gab es zu dieser Zeit bereits erste Hinweise darauf, dass der Ursprung dieses Stammes früher lag und eventuell auch in einem nicht resistenten Stamm. So zeigte z. B. eine Studie aus dem Großraum Paris, dass auch nicht CTX-M-15 produzierende *E. coli* ST131 Isolate (Phylogruppe B2 und Serotyp O25:H4) bereits 2006 in 7 % der gesunden Bevölkerung vorkamen (Leflon-Guibout *et al.* 2008). Auch in nicht ESBL produzierenden Isolaten aus der BSAC Resistance Surveillance Studie wurden 2008 unter den FQ-resistenten, *aac(6')*-*lb-cr* tragenden *E. coli* Isolaten aus 2004-2005 welche vom Typ O25-ST131 gefunden, diese besaßen aber keine CTX-M Enzyme (Jones *et al.* 2008).

Die meisten Untersuchungen zu und Beschreibungen von *E. coli* ST131 in Patientenkollektiven finden sich in einem Zeitraum ab 2006 (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Studien vergleichend, die auch retrospektiv ältere Kollektive untersuchten, schlussfolgerten die Autoren, dass *E. coli* ST131 zuerst im Jahr 2000 und dann um 2003 die ESBL positiven *E. coli* ST131 Isolate auftraten, welche später den extremen Anstieg ab 2007 zeigten (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Johnson *et al.* fanden *E. coli* ST131 in Urinkultur-Isolaten aus Kanada der Jahre 2002-2004, unter den gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol- und FQ-resistenten Stämmen. *E. coli* ST131 war dabei mit 23 % insgesamt der prävalente Erreger, wobei er unter den FQ-R Isolaten sogar 44 % ausmachte. Sie beschrieben weiter, dass unter den ST131 Isolaten bereits 97 % resistent gegen Fluorchinolone waren, aber 98 % noch sensibel gegenüber den Cephalosporinen. (Johnson *et al.* 2009). Insofern scheint der Beginn dieses Zeitraums besonders interessant.

4.1.2 Prävalenz von *E. coli* ST131-O25b in England 2001-2004 (BSAC-Kollektiv)

Insgesamt wurden von 2001-2004 im Rahmen der *Bacteraemia Resistance Surveillance Programmes* 991 als klinisch relevant bewertete *E. coli* Isolate von Kliniklaboren aus ganz Großbritannien und Irland eingesendet und von der BSAC gesammelt (Reynolds *et al.* 2008).

Aus diesem Kollektiv wurden 175 *E. coli* Stämme aus den Jahren 2001 (n=31), 2002 (n=36), 2003 (n=44) und 2004 (n=64) ausgewählt, die eine MHK für Ciprofloxacin von $\geq 0,06 \mu\text{g/mL}$ aufwiesen, und in dieser Arbeit auf das Vorkommen von *E. coli* ST131 untersucht. Die Auswahl war ursprünglich zum Zweck der Untersuchung molekularer Ursachen von Fluorchinolonresistenz erfolgt und alle Stämme waren von der BSAC initial auf Resistenz getestet worden (Reynolds *et al.* 2008). Sie wurden ab einer MHK von $0,25 \mu\text{g/mL}$ für Ciprofloxacin als resistent bewertet, weil sich diese MHK von der eines sensiblen Wildtyps unterscheidet und auf einen klinisch relevanten Resistenzmechanismus hinweist (Andrews 2007). Die ausgewählten Stämme umfassten sowohl sensible (MHK $< 0,25 \mu\text{g/mL}$) als auch resistente Isolate (MHK $\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$) und insgesamt den MHK-Bereich von $0,06\text{-}256 \mu\text{g/mL}$ für Ciprofloxacin.

Da *E. coli* ST131 in der Literatur bereits von Beginn an charakteristisch als FQ-R beschrieben war (vgl. Kap. 1.4.4), und sein Auftreten ab 2000-2006 festgestellt wurde (vgl. Kap. 4.1.1), erschien dieses Kollektiv, aufgrund der erhöhten Ciprofloxacin MHKs und des Zeitraums in dem es gesammelt wurde (2001-2004), sehr interessant. Es wurde als vielversprechend für die Untersuchung auf *E. coli* ST131 und das Auftreten verschiedener ST131 Subtypen erachtet und daher ausgewählt.

Von den 175 untersuchten Stämmen der BSAC-Sammlung mit Ciprofloxacin MHKs im Bereich von $0,06\text{-}256 \mu\text{g/mL}$ waren 78 Stämme B2 Isolate, und von denen waren wiederum 39 *E. coli* ST131-O25b Isolate (vgl. Kap. 3.1.1 und 3.1.3). Damit beläuft sich der Anteil von *E. coli* ST131 Isolaten am gesamten untersuchten Kollektiv auf insgesamt 22,3 %. Betrachtet man nur die Isolate der Phylogruppe B2 (n=78) sind es sogar 50 % (vgl. Kap. 3.2). Für die Zeitspanne der vier Jahre 2001-2004, in denen die Erreger gesammelt wurden, zeigt sich bei Betrachtung der einzelnen Jahre ein detailliertes Bild der Entwicklung. Im Kollektiv war unter

den Isolaten aus dem Jahr 2001 kein einziges *E. coli* ST131 Isolat. 2002 waren es vier, 2003 sieben und 2004 waren es 28 *E. coli* ST131-O25b Isolate. Die Zahl sowie der Anteil der ST131 Isolate stiegen über die Jahre stetig an. Die Daten sind in Abbildung 4-1 dargestellt.

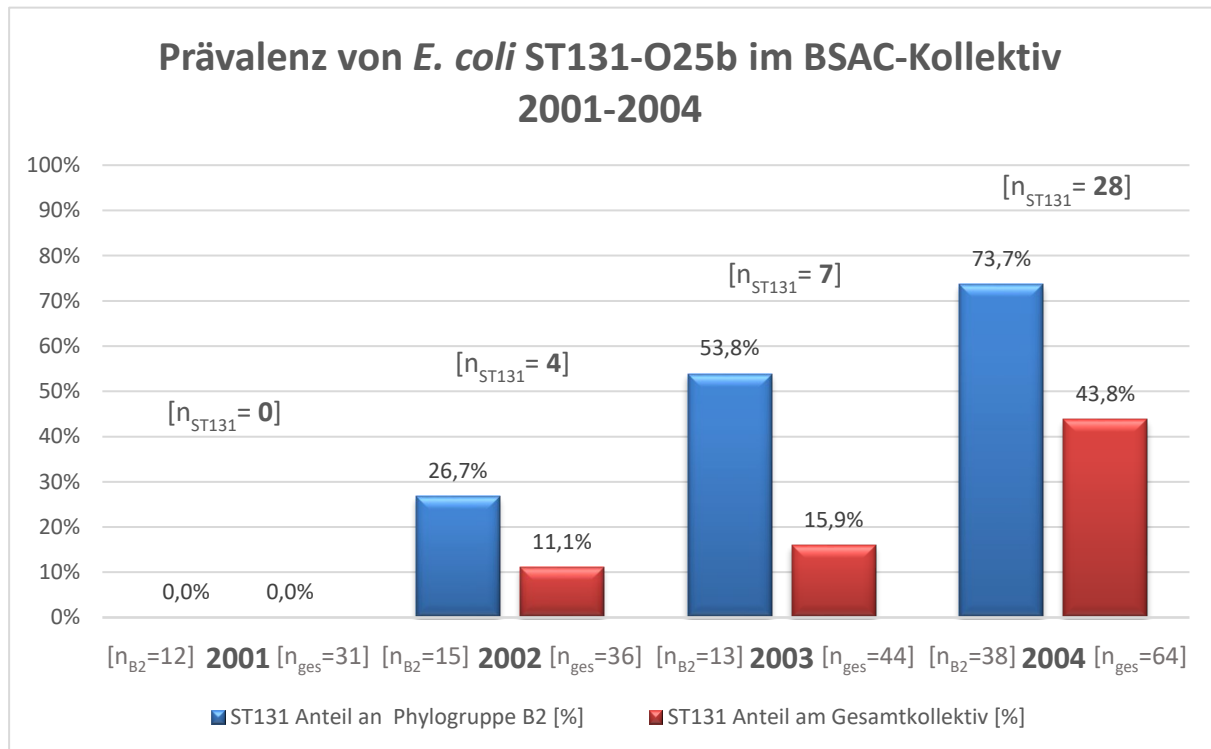


Abbildung 4-1: Dargestellt sind die absoluten Zahlen und der prozentuale Anteil der identifizierten *E. coli* ST131-O25b Isolate aus dem BSAC-Kollektiv klinischer Infektionserreger für die Jahre 2001 bis 2004. Die blauen Balken geben den Anteil an ST131 Isolaten in der Phylogruppe B2 an. Die roten Balken zeigen den Anteil der ST131 Isolate am gesamten Kollektiv der entsprechenden Jahre. Die Menge der Isolate ist je Jahr mit n_{ges} : alle Isolate, n_{B2} : Isolate aus Phylogruppe B2 und n_{ST131} : Anzahl der ST131 Isolate angegeben.

E. coli ST131 Isolate traten im ausgewählten Kollektiv erstmals im Jahr 2002 auf. Von da an stieg der ST131-Anteil der klinischen Isolate bis zum Jahr 2004 stetig bis auf 43,8 % an. Betrachtet man nur die *E. coli* Isolate der Phylogruppe B2, dann ist der Anstieg von ST131 noch ausgeprägter; von 0 % im Jahr 2001 bis auf 73,7 % im Jahr 2004 (vgl. Abbildung 4-1).

Zeitlich scheint diese Stichprobe damit genau den Anfang der Verbreitung von *E. coli* ST131 in Großbritannien zu treffen, da im Jahr 2001 kein Isolat gefunden wurde, im darauffolgenden Jahr 2002 erstmals vier ST131 Isolate und ihr Anteil dann kontinuierlich ansteigt. Zur Verifizierung, dass dies wirklich der Beginn der Ausbreitung war, fehlen jedoch Daten aus den vorangegangenen Jahren. Die BSAC-Studie begann erst 2001. Die beobachtete Zunahme an *E. coli* ST131 Isolaten lässt aber auf eine starke Ausbreitung ab 2002 schließen, da die Isolate

aus geographisch weit über Großbritannien und Irland verteilten Kliniklaboren stammten, die in den vier Jahren je 245 (2001), 250 (2002), 248 (2003) und 248 (2004) *E. coli* Isolate aus Bakteriämien einsendeten (Reynolds *et al.* 2008).

4.1.3 *E. coli* ST131 in anderen frühen Kollektiven 2002-2004

Der Gesamtanteil an *E. coli* ST131 Stämmen im BSAC-Kollektiv lag wie beschrieben bei 22,3 %. Dieser Wert ist dem aus der kanadischen Studie von Johnson *et al.* (vgl. Kap. 4.1.1) mit einem *E. coli* ST131 Anteil von 44 % in den Jahren 2002-2004 ähnlich, wobei in dieser allerdings nicht zwischen den einzelnen Jahren unterschieden wurde (Johnson *et al.* 2009). Es lässt sich daher aus dieser kein Hinweis auf einen Anstieg ableiten. Vergleicht man die Werte mit einer Studie aus Europa, zeigt sich eine ähnliche Größenordnung. So fanden Cagnacci *et al.* in einem Kollektiv von insgesamt 158 FQ-resistenten *E. coli* Isolaten aus den Jahren 2003 bis 2006 einen Anteil von 24 % an *E. coli* ST131, wobei sie auch nicht nach den einzelnen Jahren unterschieden (Cagnacci *et al.* 2008).

Jaureguy *et al.* untersuchten 161 *E. coli* Blutkultur Isolate aus Pariser Krankenhäusern, gesammelt von 2002 bis 2003. Unter diesen fanden sie *E. coli* ST43 Isolate (Pasteur Schema), es waren insgesamt fünf Isolate aus dem *Clonal complex* 43 (= ST43 oder maximal ein Allel abweichend) vertreten, was 3,1 % der Isolate entspricht (Jaureguy *et al.* 2008). Die Studie von Jaureguy *et al.* 2008 war von hoher Relevanz, da sie MLST berücksichtigte und das Schema nach Pasteur mit etablierte. Für den Vergleich mit der BSAC-Studie eignet sie sich insofern, als dass sie im Nachbarland und zu einer ähnlichen Zeit durchgeführt wurde. Auf der anderen Seite ist ein Vergleich nur bedingt möglich, weil sie das andere MLST-Schema verwendet und die Isolate nicht auf ihre Resistenzen hin charakterisierte. Dennoch zeigen ihrer Ergebnisse, dass *E. coli* ST131 (ST43 nach Pasteur Schema) 2003 in Frankreich prävalent war. Ebenso verhielt es sich in England, wie zuvor belegt.

4.1.4 *E. coli* ST131 H30-Rx in Kollektiven von 2010-2015

Kanamori *et al.* veröffentlichten eine Studie, in der sie klinisch relevante MDR *E. coli* Stämme von 2010-2015 aus hospitalisierten Patienten in Nordamerika untersuchten und WGS

unterzogen. Unter den Isolaten fanden sie 62 % ST131 Stämme, darunter 69 % vom Typ H30-Rx und 10 % vom Typ H30-R1. Insbesondere die ST131 H30-Rx Stämme waren ausschließlich ExPEC Stämme mit charakteristischer FQ-Resistenz, CTX-M-15 sowie einer hohen Prävalenz der Resistenz gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Kanamori *et al.* 2017). Weiterhin stellten sie fest, dass die ST131 H30-Rx Stämme besonders mit CTX-M-15 assoziiert waren und viele spezifische Virulenzgene trugen, die andere Stämme nicht in solchen Maßen aufwiesen. Aber noch keiner der H30-Rx Stämme war resistent gegen die getesteten Carbapeneme Imipenem und Ertapenem (Kanamori *et al.* 2017).

In *E. coli* Stämmen aus Australien und Singapur, welche von 2014-2015 gesammelt wurden, Bakteriämie (BSI) verursachten und Drittgenerations-Cephalosporin resistent (3.GC-R) waren, war *E. coli* ST131 (H30-Rx) mit einem Anteil von 64 % vertreten (Harris *et al.* 2018). Diese ST131 Stämme trugen zu 95 % *bla*_{CTX-M}, darunter hauptsächlich *bla*_{CTX-M-15}, woneben verschiedene weitere Resistenzen in unterschiedlichen Kombinationen auftraten (Harris *et al.* 2018). Insgesamt waren die dort untersuchten BSI Erreger aber noch zu 97 % empfindlich gegen Piperacillin/Tazobactam und zu 100 % gegen Meropenem (Harris *et al.* 2018).

Verglichen mit den in dieser Arbeit untersuchten *E. coli* Stämmen aus der PEG-Studie, waren im Jahr 2016 in Deutschland unter den hier untersuchten 3.GC-R Stämmen nur 33 % vom Typ ST131. Diese sind aufgrund ihrer Charakteristika der ST131 H30-Rx Linie zuzuordnen. Betrachtet man nur die 3.GC-R Blutkulturisolate, liegt der Anteil sogar nur bei 20 %. Der Anteil an *E. coli* ST131 H30-Rx scheint also in Deutschland deutlich geringer zu sein, als nach Harris *et al.* im vergleichbaren Zeitraum in Australien. Allerdings ist der quantitative Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Auswahlkriterien der Isolate schwierig, da in der deutschen Population insgesamt nur 14 % der Stämme aus der Studie (n = 14) überhaupt eine 3.GC-Resistenz aufwiesen, welche in der australischen Studie das zentrale Auswahlkriterium und somit bei 100 % der Stämme (n = 70) der Fall war. Von den identifizierten ST131 Isolaten aus der PEG-Studie zeigten 66 % einen H30-Rx Phänotyp (CTX-R und CIP-R) wie in der australischen Untersuchung und 33 % entsprachen einem H30-R Phänotyp (CIP-R) und waren weiterhin empfindlichen für die Cephalosporine der 3. Generation (vgl. Kap. 3.8).

4.1.5 Prävalenz von *E. coli* ST131 in Deutschland in 2016 (PEG-Kollektiv)

Im untersuchten Kollektiv der klinischen Isolate aus der PEG-Studie von 2016, die Isolate aus Deutschland, Österreich und der Schweiz umfassen, ergab sich eine 100 %ige Korrelation von Isolaten mit dem Resistenzmuster (Cip R+, CTX R/R+, CAZ R, ESBL⁺) mit *E. coli* ST131. Eine kombinierte hohe Resistenz gegen Ciprofloxacin, Cefotaxim und Ceftazidim sowie der Hinweis auf eine ESBL stellten einen sehr starken Indikator für *E. coli* ST131 dar. Daneben fanden sich unter den *E. coli* ST131 Isolaten auch solche mit alleiniger hoher Ciprofloxacinresistenz (Cip R+) und hochgerechnet, auf Basis der analysierten Stichprobe ergab sich ein Anteil von 10,7 % *E. coli* ST131 Isolate (vgl. Kap. 3.8.1). Bezogen auf diejenigen Isolate, die mindestens eine der getesteten Resistenzen (Cip-R) aufwiesen, waren rund 34 % der Isolate vom Typ ST131. Unter den 3MRGN Isolaten lag der *E. coli* ST131 Anteil bei 50 % und unter den 3MRGN mit β -Lactamase-Inhibitor Sensibilität bei 66 % (vgl. Kap. 3.8). Sie befanden sich somit, entsprechend der in der Literatur beschriebenen Charakteristik von *E. coli* ST131 (vgl. Kap. 1.4.2) unter den multiresistenten Stämmen mit FQ-Resistenz (H30-R Linie) sowie mit kombinierter FQ- und β -Lactam-Resistenz inklusive 3.GC-R (H30-Rx Linie).

Die Ergebnisse unterstreichen, dass *E. coli* ST131 aufgrund seines Vorkommens und seiner Resistenzen in Deutschland 2016 ein weiterhin relevanter Erreger ist. Neben diesem fanden sich in dieser Arbeit weitere hochresistente *E. coli* Isolate anderer *Sequence Types*: ST88 und ST156, die eine stärker ausgeprägte Multiresistenz zeigten (vgl. Kap. 3.8).

4.1.6 Entwicklung von CTX-M in *E. coli* und speziell bei *E. coli* ST131

CTX-M-15 war damals für die sogenannte „ESBL-Epidemie“ bei *E. coli* verantwortlich (Price *et al.* 2013), (vgl. dazu auch Kap. 1.4.1.1). Dies trifft insbesondere für Cefotaxim resistente *E. coli* Stämme zu, bei welchen CTX-M-15 eine hoch verbreitete Variante ist und die häufigste bei *E. coli* ST131 (Peirano und Pitout 2019). Die Entwicklung der Cefotaximresistenz wurde innerhalb der ST131 Linie durch den Erwerb der plasmidcodierten CTX-M-15 Variante vorangetrieben (Koraimann 2018) und auch weiterhin sind CTX-M Enzyme der ausschlaggebende Faktor für die hohe Prävalenz von *Extended*-Spektrum β -Lactamresistenz bei gramnegativen Bakterien (Castanheira *et al.* 2021).

Die in dieser Arbeit gefundenen cefotaximresistenten *E. coli* ST131 Isolate des untersuchten BSAC-Kollektivs aus 2004 (*E. coli* eo791 und *E. coli* eo795) besaßen CTX-M Enzyme, einer der Stämme CTX-M-15 und der andere ein Enzym aus der CTX-M-Gruppe 1, welches auch via Konjugation auf einen empfindlichen Rezipienten übertragen werden konnte (vgl. Kap. 3.5 und 3.14.3). Für die Cefotaximresistenz deckt sich dies mit Erkenntnissen von Nicolas-Chanoine *et al.* 2014, die das Auftreten ESBL positiver *E. coli* ST131 ab 2003 beschreiben und bedingt mit denen von Johnson *et al.* 2009, die noch zu 98 % Cephalosporin sensible *E. coli* ST131 aus 2002-2004 in Kanada identifizierten. Die CTX-Resistenz trat in den hier untersuchten Stämmen der BSAC aus England bis 2003 noch nicht, dann aber bei Isolaten aus 2004 auf. Das weist darauf hin, dass sich der CTX-M positive Subklon der *E. coli* ST131 Linie (H30-Rx) in England ab 2004 neben (oder aus) dem FQ-R Typ (H30-R) manifestierte.

4.1.6.1 Entwicklung von CTX-M bei *E. coli* ST131 in Deutschland

Die *E. coli* ST131 Linien entwickeln sich stetig weiter und mit ihnen auch die Resistenzen. So veröffentlichten Ghosh *et al.* 2017 einen Artikel über 953 untersuchte Sequenzen von *E. coli* Isolaten, die von 2009-2016 in Deutschland gesammelt und sequenziert wurden; unter diesen fanden sie 159 vom ST131 (17 %). Diese ST131 Stämme analysierten sie weiter bezüglich der Gensequenzen ihrer ESBL-Enzyme und es zeigte sich, dass *bla*_{CTX-M-15} das mit 46 % meistprävalente Enzym war, gefolgt von *bla*_{CTX-M-27} (15 %), *bla*_{CTX-M-1} (11 %) und *bla*_{CTX-M-14} (9 %). Weiterhin zeigten sie, dass sich unter den humanen klinischen Isolaten insbesondere die multiresistente *E. coli* ST131 Linie C1-M27 in Deutschland verbreitet hat, die das bis dato weitaus seltener vorkommende ESBL-Enzym CTX-M-27 trägt, dessen Anteil von 0 % im Jahr 2009 auf 45 % im Jahr 2016 anstieg (Ghosh *et al.* 2017). Diesbezüglich wäre es besonders interessant, die Analysen auf CTX-M-27 auszuweiten, da die hier untersuchten Stämme aus der PEG-Studie 2016 nicht explizit auf CTX-M-27 hin untersucht wurden. Dessen Anwesenheit könnte jedoch für die Fälle verantwortlich sein, in denen sich die Resistenz gegenüber den detektierten β -Lactamasen nicht erklären ließ (GK 4434), (vgl. Kap. 3.6.4).

4.2 Diversität der (Multi-) Resistenz bei *E. coli* ST131

In den in dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten *E. coli* ST131 Isolaten wurden diverse Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika unterschiedlicher Klassen gefunden, darunter Ciprofloxacin, Tetracyclin, Gentamicin, Kanamycin, Ampicillin und Cefotaxim (vgl. Kap. 3.12). Die Resistenzen traten dabei in verschiedenen Kombinationen auf (vgl. Kap. 3.12).

Eine so breite Variation an verschiedenen Resistenzmustern zwischen *E. coli* ST131 Stämmen, wie für die untersuchten *E. coli* ST131 Isolate dieser Arbeit (vgl. Kap. 3.12) festgestellt wurde, war nicht unbedingt erwartet worden. Da die Isolate dem gleichen *Sequence Type* (ST) angehören, teilweise den gleichen zeitlichen und lokalen Hintergrund besaßen, wie z. B. die QU-Stämme und die frühen CTX-M positiven *E. coli* ST131 Isolate aus England (vgl. Kap. 6.1.1.1), schien es zunächst überraschend, dass sich die Resistenzeigenschaften so sehr unterschieden. Hinzu kam, dass sich auch die Plasmidmuster der einzelnen Stämme sehr stark unterschieden (vgl. Kap. 3.11.1), wie in Kapitel 4.6.1 diskutiert.

In der Literatur zeigt sich allerdings ein ähnliches Bild. So waren z. B. bereits unter den 2008 von Nicolas-Chanoine *et al.* beschriebenen *E. coli* Isolaten diejenigen vom ST131 alle resistent gegen Ciprofloxacin und Cefotaxim, unterschieden sich darüber hinaus aber auch. Einige der Stämme besaßen eine zusätzliche Resistenz gegen Gentamicin, Amikacin und / oder Trimethoprim/Sulfamethoxazol, wobei diese in unterschiedlichen Kombinationen auftrat (Nicolas-Chanoine *et al.* 2008). Und auch Clark *et al.* beschrieben nach genetischer Analyse, dass *E. coli* ST131 Isolate sich oft genetisch sehr ähnlich (Chromosom) aber phänotypisch (Resistenz) divers sind (Clark *et al.* 2012).

Ein Vergleich von 22 verschiedenen *E. coli* ST131 Isolaten aus den Jahren 2001-2003 und 2010 von Doumith *et al.* zeigten allerdings ebenfalls, dass einzelne ST131 Stämme sehr unterschiedliche Kombinationen an Resistenzen und Resistenz vermittelnden Genen aufweisen, wobei besonders die Resistenz gegen Ampicillin präsent ist, gefolgt von der gegen Ciprofloxacin. Sie treten jeweils einzeln und in Kombination mit weiteren Resistenzen auf, wie die gegen Cefotaxim mit oder ohne Ceftazidim und die gegen Gentamicin allein oder in Kombination mit Cefotaxim und Ceftazidim, sowie weiteren Substanzen (Doumith *et al.* 2015).

Bezüglich solcher Unterschiede gaben Ranjan *et al.* nach einem ST131 Vergleich allerdings zu bedenken, dass die ST131 Stämme oft analysiert wurden, ohne zwischen den *H30-R* und *H30-Rx* Subklonen zu unterscheiden. Nach ihren eigenen Analysen waren Virulenz und Resistenzen innerhalb der *H30-Rx* Stämme vergleichbar (Ranjan *et al.* 2015). Diese Unterscheidung wäre eine logische Erklärung für die unterschiedlichen Resistenzprofile, der lokal und zeitlich zusammen auftretenden Stämme. Für die in dieser Arbeit untersuchten *E. coli* ST131 Isolate trifft dies insofern zu, als dass z. B. QU008 als nicht gegen Cefotaxim resistenter *E. coli* ST131 Stamm CTX-M-15 nicht aufweist und somit in die *H30-R* Sublinie einzuordnen ist, wogegen QUC02, QU015, QU061 und QU102 positiv für CTX-M-15 sind und damit der *H30-Rx* Linie angehören. Aber auch diese vier *E. coli* ST131 *H30-Rx* Isolate unterschieden sich darüber hinaus deutlich in ihren Resistenzen und Charakteristika; z. B. wiesen je zwei die Gene *qnrB* sowie *aac(6')-Ib-cr* auf, die jeweils anderen aber nicht und sie trugen alle Plasmide, aber jeder unterschiedlich viele, mit entsprechend anderen Größen (vgl. Kap. 3.11.1 und 3.12). Gemeinsam waren den *E. coli* ST131 *H30-Rx* Stämmen die Mutationen in den QRDR (vgl. Kap. 3.4.3 und 3.7.6) und das Vorkommen des Enzyms CTX-M-15 (vgl. Kap. 3.5 und 3.6.4), genau die beiden essentiellen Charakteristika, die spezifisch für die *H30-Rx* Linie sind (vgl. Kap. 1.4.4.5). Unter den Stämmen aus dem BSAC-Kollektiv fanden sich dagegen mehrheitlich solche vom *H30-R* Subtyp, die nur die QRDR-Mutationen aufwiesen und zwei Isolate mit zusätzlichem CTX-M-15, also aus der *H30-Rx* Linie (vgl. Abbildung 1-9), die in diesem Kollektiv erst ab 2004 auftraten (vgl. Kap. 4.1.2). Dass in einem dieser Stämme das *bla*_{CTX-M} Gen plasmidcodiert vorlag, welches auch via Konjugation übertragen wurde, indiziert mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die Zugehörigkeit zur frühen *H30-Rx* Linie. Die *E. coli* ST131 Stämme aus der PEG-Studie 2016 zeigten zu zwei Dritteln die für *H30-Rx* typische Charakteristik und zu einem Drittel die eines *H30-R* Subklons, ihre Resistenzprofile unterschieden sich zwar deutlich zwischen den beiden Gruppen, aber kaum innerhalb der jeweiligen, wie es auch Ranjan *et al.* 2015 postulierten, (vgl. Kap. 4.2).

4.2.1 Ceftolozan/Tazobactam Resistenz bei *E. coli* ST131

Bei Ceftolozan/Tazobactam handelt es sich um die Kombination eines Cephalosporins der vierten Generation mit zugesetztem β -Lactamase Inhibitor. Diese Kombination kam mit dem

2015 neu zugelassenem Antibiotikum Zerbaxa® erstmals auf den Markt. Sie umfasst ein erweitertes Wirkspektrum, welches, im Gegensatz zu den Cephalosporinen der 3. Generation, die ESBL-bildenden Enterobakterien einschließt.

Die in dieser Arbeit getesteten gegen Drittgenerations-Cephalosporine resistenten (3.GC-R) Isolate aus den Jahren 2008 bzw. 2016, darunter *E. coli* ST131 und nicht-ST131 Isolate, waren alle empfindlich gegen die Antibiotika-Kombination Ceftolozan/Tazobactam, (vgl. Kap. 3.8.1.1). Diese neue Kombination stellt damit eine sehr gute Therapieoption für Infektionen mit diesen multiresistenten, meist ESBL positiven Erregern dar. Dies steht im Einklang mit anderen Untersuchungen, wie der von Johnston *et al.* an Isolaten aus 2011. Diese zeigten ebenfalls, dass Ceftolozan/Tazobactam noch eine gute Wirksamkeit gegen *E. coli* ST131 besitzt, sowohl bei H30-R1 als auch bei H30-Rx. Es zeigte sich eine Prävalenz der Ceftolozan/Tazobactam Resistenz von 3 % in den H30R1 und von 16 % in den H30Rx-Stämmen (Johnston *et al.* 2018). Daneben zeigten die Autoren, dass Stämme die bereits Resistenz gegen ein anderes Antibiotikum aufwiesen auch eine höhere Prävalenz für Ceftolozan/Tazobactam Resistenz hatten, und dass diese Co-Resistenz zu 9 % bei Resistenz gegen Levofloxacin (\cong Ciprofloxacin), zu 12 % bei Gentamicin und zu wesentlich höheren Anteilen von 21 % bei Resistenz gegen Ceftazidim und 38 % gegen Piperacillin/Tazobactam auftrat (Johnston *et al.* 2018). An anderer Stelle zeigte sich, dass CTX-M-15 tragende *E. coli* Isolate gegen Ceftolozan allein resistent waren und nur für die Kombination Ceftolozan/Tazobactam empfindlich (La Ortiz de Rosa *et al.* 2019). Allerdings gibt es auch neue β -Lactamase-Typen (GES, PER und BEL), die gegen die Kombination resistent sind (La Ortiz de Rosa *et al.* 2019).

Ceftolozan/Tazobactam kann als Alternative der Carbapenem-sparenden Therapie gegen MDR *E. coli* ST131 Infektionen eingesetzt werden (Johnston *et al.* 2018). Allerdings werden global immer mehr gegen Carbapeneme resistente *E. coli* ST131 Stämme beschrieben, die OXA-48, aber auch OXA-244, verschiedene NDM-Varianten und KPC-Typ Carbapenemasen aufweisen (Peirano *et al.* 2014). Gegen diese ist auch Ceftolozan/Tazobactam nicht wirksam, da es in Gegenwart der entsprechenden Enzyme versagt, wie auch für KPC-2 in dieser Arbeit gezeigt (vgl. Kap. 3.8.1.1). In Deutschland tritt seit 2019 auch vermehrt ein *E. coli* ST131 Stamm mit OXA-244 (einer neuen Variante von OXA-48) auf (Welker *et al.* 2020). Insgesamt

wird Resistenz gegen Ceftolozan/Tazobactam bei *E. coli* zunehmend häufiger beschrieben, in den meistens Fällen aufgrund von Carbapenemasen (Perovic *et al.* 2023).

4.3 Detektion von *E. coli* ST131 anhand des SNPs *pabB*_573

In der Literatur sind für *E. coli* ST131-O25b spezifische SNPs beschrieben (Clermont *et al.* 2009). Nur die auf diese SNPs positiv getesteten und RP-MLST sequenzierten Isolate dieser Arbeit bestätigten sich alle als *E. coli* ST131. Die auf diese SNPs negativ getesteten Isolate bestätigten sich wie erwartet alle als andere STs (vgl. Kap. 3.4.1). Die SNPs in *pabB* stellen damit anscheinend einen sicheren Marker für *E. coli* ST131 dar.

Da beschrieben ist, dass die für *E. coli* ST131-O25b charakteristischen SNPs in *pabB* gleichzeitig auftreten (Johnson *et al.* 2014), ist es für das Screening auf ST131-O25b im Prinzip ausreichend nur einen dieser SNPs zu bestimmen. Der SNPs (*pabB*_573 G/A) liegt innerhalb der MLST-Sequenz von *pabB* (Pasteur Schema) und wird daher bei der MLST-Bestimmung miterfasst. Auf die Aussagekraft der Bestimmung von nur einem SNPs wiesen hier bereits die Ergebnisse aus Screening und Pyrosequencing, bzw. Sequenzierung der BSAC und QU-Stämme hin (vgl. Kap. 3.1.3). Bei ihnen korrelierte das Auftreten des SNP an Position 573 in *pabB* (*pabB*_573 A) zu 100 % mit dem Vorliegen eines ST131. Daher wurde bei der Untersuchung der neueren Stämme des PEG-Kollektivs nicht mehr gescreent, sondern der in der MLST-Sequenz liegende SNP direkt analysiert. Die Auswertung des SNPs (*pabB*_573) ergab auch für die positiven PEG-Stämme mit *pabB*_573 A eine 100 %ige Korrelation mit ST131 (vgl. Kap. 3.8.1.1). Die Detektion des SNPs *pabB*_573 eignet sich somit sehr gut als Indikator für *E. coli* ST131.

4.4 Mutationen in *E. coli* ST131 Isolaten

4.4.1 Mutationen in der QRDR

Die untersuchten klinischen *E. coli* ST131 Isolate mit FQ-Resistenz wiesen Resistenz vermittelnde Mutationen in der QRDR der Topoisomerasegene *gyrA* und *parC* auf, in denen Einzel- und Doppelmutationen gefunden wurden. Darunter waren *gyrA* S83L, *gyrA* S83L+D87N und bei einem Isolat die Variante *gyrA* S83L+D87Y, sowie *parC* S80I, *parC* S80I+E84V und bei demselben Isolat wie zuvor die Variante *parC* S80R+E84V (vgl. Kap. 3.4.3). Diese Mutationen sind für die Stämme mit FQ-R auch erwartet, denn sie sind alle bereits in der Literatur beschrieben und für *E. coli* als FQ-Resistenz vermittelnd bekannt (Friedman *et al.* 2001; Park *et al.* 1998; Huseby *et al.* 2017). Die in den analysierten Isolaten gefundenen Mutationen erklärten die FQ-Resistenzen hinreichend. In den neuen Stämmen aus dem PEG-Kollektiv zeigten sich, neben den bereits oben beschriebenen die weiteren Doppelmutationen *parC* A56T+S80I bzw. *parC* S57T+S80I (vgl. Kap. 3.7.6), die auch bereits für resistente Isolate beschrieben sind (Aworh *et al.* 2023; Friedman *et al.* 2001). Speziell für *E. coli* ST131 sind die Mutationen *gyrA* S83L+D87N/Y zusammen mit einer einzelnen oder doppelten Mutation in *parC* S80I +/-E84K/V/G/A beschrieben (Johnson *et al.* 2013). Für die *E. coli* ST131 Stämme dieser Arbeit wurden die schon von Johnson *et al.* 2013 publizierten Mutationen *gyrA* S83L+D87N/Y und *parC* S80I +/-E84V detektiert. In den *E. coli* ST131 Isolaten mit hohen MHK-Werten für Ciprofloxacin waren neben den QRDR-Mutationen zusätzlich noch weitere FQ-Resistenz vermittelnde Gene wie *aac(6')-Ib-cr* und *qnrB* vorhanden (vgl. Kap. 3.12), was die hohen MHK-Werte schlüssig erklärt. Eine Ausnahme bildet das ST88 Isolat PEG-16-93-80 (GK 4506), welches bei ausgeprägter Ciprofloxacinresistenz (vgl. Kap. 3.6.2) nur eine Mutation in der QRDR aufwies (*parC* S80I), die diese hohe Resistenz nicht erklärt. Allerdings unterschied sich dieses Isolat auch deutlich durch seine multiple Resistenz (Resistotyp Nr. 1: Cip R+, Gen R, CTX R, CAZ R) von den anderen Stämmen, sodass hier noch eine weitere Resistenzursache zugrunde liegen muss. Die in diesem Stamm nachgewiesenen β -Lactamase-Gene vom TEM- und CTX-M-Typ (vgl. Kap. 3.6.4) erklären zwar die Resistenz gegen CTX, aber nicht die hohe Ausprägung der Resistenz, weshalb anzunehmen ist, dass dafür weitere Faktoren eine Rolle spielen. Das vergrößerte *ompF*-Gen (größeres PCR-Produkt für *ompF*, vgl. Kap. 3.7.1) liefert

neben den mehr als zehn Mutationen in *ompC* (inkl. *frameshift*) (vgl. Kap. 3.7.6) einen Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen, da eine Insertion in *ompF* zu einem mindestens veränderten, eventuell nicht funktionalem *ompF* Porin führt, was einen Einfluss auf die Resistenz gegen diverse Antibiotika, darunter FQs, Tetracycline, Chloramphenicol und β -Lactame und somit sowohl Ciprofloxacin, als auch insbesondere Cefotaxim hat (Lou *et al.* 2011; Delcour 2009; Nikaido 2003), (vgl. auch Kap. 1.2.1.1).

4.4.2 Mutationen in resistenzassoziierten Genen

Bei der Untersuchung der Target-Gene des *marRAB*-Operons sowie des *acrRAB*-Operons, deren Veränderungen mit Multiresistenz assoziiert sind (vgl. Kap. 1.2.1.1), fanden sich in einigen der klinischen Isolate Mutationen, die im Vergleich zu dem empfindlichen *E. coli* Stamm MG1655 als Referenz zu Veränderungen der AS-Sequenz führen (vgl. Kap. 3.4.3). In fast allen Isolaten der QU- und BSAC-Stämme zeigten sich Doppelmutation in MarR. Die gefundene Kombination *marR* G103S+Y137H ist in multiresistenten klinischen Isolaten beschrieben und tritt sowohl bei *E. coli* ST131 als auch in anderen STs auf (Sadeghi 2019). Zusätzlich zeigten zwei weitere Stämme die Mutation *marRS3N*, die, wie auch die zuvor genannten, zwar in resistenten Stämmen gefunden werden aber wohl die Repressor-Aktivität von MarR nicht beeinflussen (Vinué *et al.* 2018). Daneben trat noch *marR* P13R auf, sowie *marA* S127N, sowohl unter den QU- und BSAC- als auch bei den PEG-Isolaten.

In *acrA* fanden sich die Mutation T104A, die als neutral angenommen wird (Galardini *et al.* 2017) und daneben die Kombination von T104A+A156T+A167S (vgl. Kap. 3.4.3).

Das Gen *acrR* betreffend, fand sich die Mutation *acrR* fM1, die das Startcodon betrifft. Diese scheint besonders interessant zu sein und wird in Kapitel 4.4.4 gesondert beschrieben. Die weiteren gefundenen Mutationen waren *acrR* I16T (GK 2956), *acrR* A212S+T213I+N214T (GK 4423), *acrR* T213I+N214T (GK 4498) und *acrR* 163E+A212S+T213I+N214T (GK 4512). Sie liegen nicht innerhalb der DNA bindenden Domäne von AcrR im Bereich der AS an Position 33-52 (UniProt -acrR). Alle sind bereits in Zusammenhang mit FQ-Resistenz, entweder genauso (A212S+T213I+N214T) oder mit der einem anderen Austausch (I16F) beschrieben (Komp

Lindgren *et al.* 2003; Vinué *et al.* 2018). Daneben sind noch einige weitere *acrR*-Mutationen in *E. coli* als zu FQ-Resistenz führend beschrieben (Webber *et al.* 2005).

4.4.3 Mutationen in den Porinen und Porin-regulierenden Genen

Bei der Sequenzierung der Porin Gene *ompC* und *ompF* in den klinischen Isolaten war die Anzahl an Abweichungen in der Sequenz im Vergleich zur Referenz *E. coli* MG1655 hoch. Die Sequenzen unterschieden sich oftmals in mehreren Bereichen (> 2 bis > 10 Mutationen) mit diversen Auswirkungen von Aminosäureänderung über Deletion und *frameshift* (vgl. Kap. 3.4.3). Ein Vergleich verschiedener Referenzstämme wie *E. coli* MG1655 (Laborstamm) und CFT073 (Wildstamm) zeigt bereits diverse Unterschiede in den Sequenzen und resultierenden Aminosäuren (Art und Anzahl). Auch die *E. coli* ST131 Stämme der Literatur zeigen diverse Abweichungen zu *E. coli* MG1655 (K-12). Dennoch ist dieser Stamm eine viel genutzte Referenz, mit der auch viele Versuche zu Porindefekten durchgeführt wurden, wie bspw. bei Lou *et al.* 2011 (vgl. Kap.1.2.1.1). Bei den getesteten *E. coli* ST131 Isolaten traten in den meisten Fällen die gleichen Veränderungen in *ompC* und *ompF* auf. Ein Vergleich der sequenzierten Isolate mit dem ST131 Referenzstamm *E. coli* JJ1886 zeigte dagegen für die meisten Stämme keine Abweichungen. Die Sequenzen der QU-/ und BSAC-Stämme entsprachen der *ompF* Sequenz von *E. coli* JJ1886, bis auf einen Stamm, der kein Fragment des vorderen Teils von *ompF* lieferte (vgl. Kap. 3.4.3). Für die nicht-ST131 Isolate zeigten sich sechs bzw. acht Sequenzvariationen zu diesem. Weil für *E. coli* JJ1886 keine Porinveränderungen beschrieben sind, wird angenommen, dass die im Vergleich zu *E. coli* MG1655 gesehenen Variationen der für *E. coli* ST131 normalen Ausprägung der Porin Gene entsprechen.

Mutationen die zu einer Veränderung der Expression von OmpC und OmpF führen, vermitteln Resistenz gegen antibakterielle Stoffe (vgl. Kap. 1.2.1.1). In diesem Kontext sind auch Mutationen in den *ompC* und *ompF* regulierenden Genen von Interesse. Im Hinblick auf *E. coli* ST131 wurde z. B. von Suelter und Hanson gezeigt, dass sich die Regulation von OmpC zwischen klinischen *E. coli* ST131 Isolaten und *E. coli* nicht-ST131 Isolaten unterscheidet. Die antisense RNA MicC ist in *E. coli* ST131 erhöht, was in einem geringeren OmpC Proteinlevel resultiert als bei nicht-ST131 Isolaten (Suelter und Hanson 2020). Auch eine durch Repression

der Transkription verminderte Expression von OmpF wurde schon als Resistenz gegen Cefalexin vermittelnd beschrieben (Alzayn *et al.* 2021).

Betrachtet man die an der Regulierung der Porine beteiligten Gene, so fanden sich in den untersuchten *E. coli* Isolaten im Gen der Sensorkinase *envZ* zwei Variationen, *envZ* A25V und *envZ* T446M (vgl. Kap. 3.7.6). Alle Stämme des ersten mit RP-MLST untersuchten Kollektivs der BSAC-/ und QU-Stämme zeigten *envZ* A25V sowie auch einige der späteren Stämme aus der RP-MLST Untersuchung des PEG-Kollektivs. Diese hier vielfach gefundene Variation ist wahrscheinlich wieder durch die abweichende Sequenz von *E. coli* MG1655 als Referenz bedingt. Dies bestätigte sich wiederum durch Vergleich mit *E. coli* JJ1886, der die Variationen auch aufweist. Es handelt sich wohl um eine Abweichung zu *E. coli* K-12, die bei *E. coli* ST131 und anderen Wildtyp-STs sowie auch *E. coli* WT (GK 571) vorkommt. Ihr Effekt bleibt unklar. In einigen der neueren Stämme trat daneben *envZ* T446M auf (vgl. Kap. 3.7.6). Diese nicht in Literatur beschriebene Mutation liegt C-terminal, vier AS vor Ende der Proteins, nach der Histidin-Kinase Domäne von EnvZ, welches insgesamt nur 450 AS groß ist (Uniprot -*envZ*). Außerdem zeigte sich bei einigen nicht-ST131 Stämmen eine Größenvariation für das PCR-Produkt von *envZ* (mit 2000 bp anstatt 1353 bp, vgl. Kap. 3.7.1). An der veröffentlichten Sequenz des Referenzstamms ATCC 25922 konnte evaluiert werden, dass in diesem Stamm innerhalb der Bindestellen der verwendeten Primer tatsächlich eine Sequenz entsprechender Größe liegt. In den ST131 Stämmen der Literatur (vgl. Kap. 6.1.1.4) ist *envZ* in der kleineren Variante (mit 450AS für EnvZ) vorhanden, und so zeigte es sich auch für die hier untersuchten Stämme. Es handelt sich demnach wahrscheinlich um eine Variation von *envZ* bei *E. coli*. In *ompR* fand sich nur in einem Stamm eine Mutation, *ompR* A35D, diese wird in Kapitel 4.4.4 ausführlich diskutiert.

Die Kombination verschiedener Mutationen in den mit Resistenz assoziierten Genen führt oft zu ausgeprägter Resistenz. Dies zeigten z. B. Adler *et al.*, die nach Carbapenem Selektion eines OmpC und OmpF defekten Stammes mehrere Klone isolierten, deren MHK für Ertapenem von 0,25 mg/L auf 32 mg/L bzw. 6 mg/L anstieg, in denen, neben weiteren, Mutationen in *acrB*, *acrR* und *envZ* in Kombination auftraten. Darunter waren *envZ* T29K und *acrR* M11 (\triangleq *acrR* fM1), *envZ* A175E und *acrR* V29G (MHK 32 mg/L), sowie *envZ* A38E und *acrR* V29G (MHK

6 mg/L). Übergreifend befanden sie, dass die Effekte einer *envZ* Mutation in Kombination mit Targetmutationen, die den AcrAB-TolC vermittelten Transport aus der Zelle betreffen, in hoher Resistenz gegen Carbapeneme resultieren. (Adler *et al.* 2016).

4.4.4 Die *ompR* Mutation A35D in *E. coli* QU015

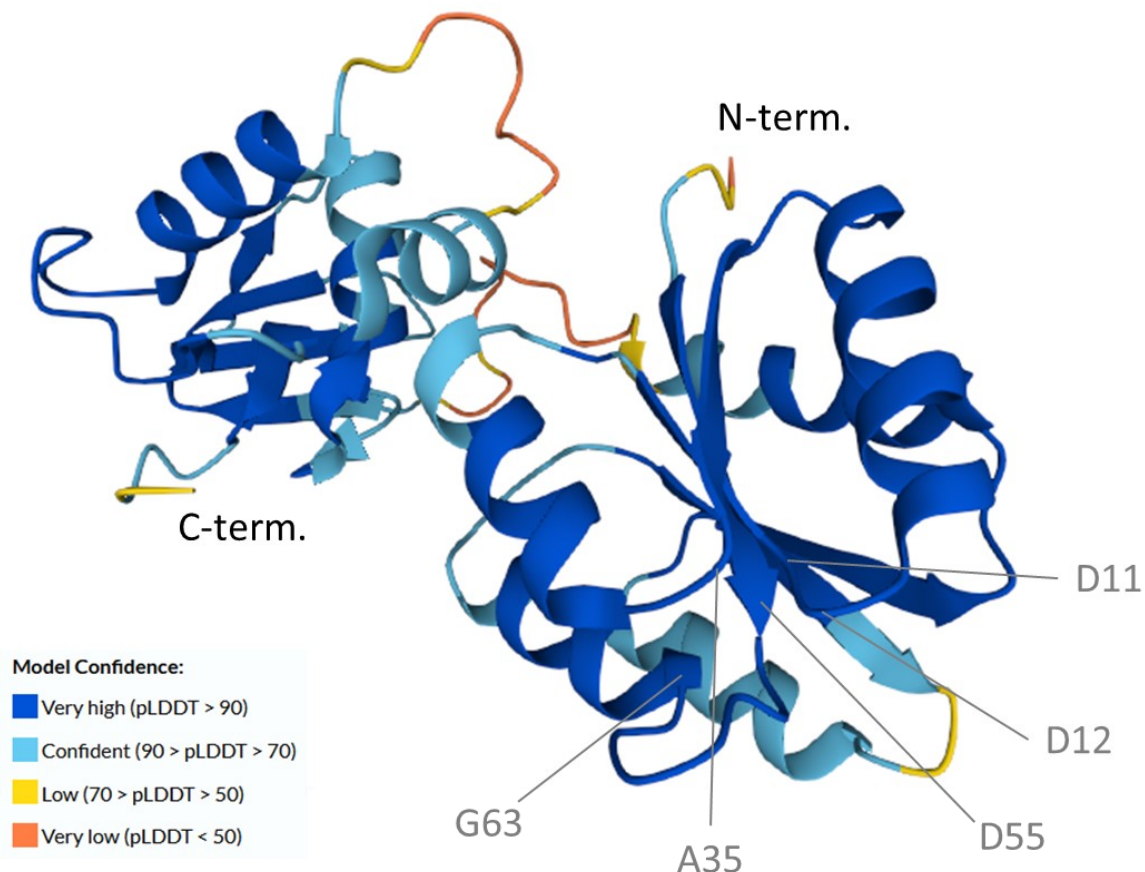
Die Funktion von OmpR und seiner phosphorylierten Form OmpR-P besteht in der Regulation der Porine OmpC und OmpF (vgl. Kap. 1.2.1.1). In dieser Arbeit wurde im Stamm QU015 (GK 3438) eine bisher unbeschriebene Mutation im Gen *ompR* identifiziert: *ompR* A35D (vgl. Kap. 3.4.3). Diese Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Aspartat.

Strukturell besteht OmpR aus zwei Domänen, der modulierbaren N-terminalen Domäne, die durch EnvZ phosphoryliert werden kann, und der C-terminalen Domäne, die an die DNA bindet (Kenney *et al.* 1995). Delgado *et al.* beschreiben, dass die Phosphorylierung von OmpR nur an Aspartat-Resten erfolgt und dass dafür vor allem zwei der drei Aspartat Positionen (D11, D12 und D55) relevant sind. Von diesen war D55 die primär phosphorylierte Position und D11 sekundär relevant (Delgado *et al.* 1993).

Die Mutation *ompR* A35D ist interessant, weil durch den Aminosäureaustausch ein zusätzliches Aspartat im N-terminalen Bereich von OmpR hinzukommt (phosphorylierbare Domäne). Noch dazu liegt die Position genau in dem Bereich, in dem die Positionen nach Delgado *et al.* liegen. Insofern stellt das durch die Mutation *ompR* A35D entstandene zusätzliche Aspartat auch eine potentielle neue Phosphorylierungs-Position dar. Andererseits könnte die veränderte AS auch Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben und so zu einer veränderten bis gar nicht mehr vorhandenen Funktion führen. Um zu beurteilen, ob diese von Relevanz sein könnte und zudem zugänglich wäre, wurde die Lage der Aminosäuren in der 3D-Struktur von OmpR in Abbildung 4-2 (Übersicht) und Abbildung 4-3 (Detailansicht) näher analysiert.

Die im Hinblick auf die Phosphorylierung relevanten natürlichen Aspartat-Positionen von OmpR (D11, D12 und D55) sowie die Position A35 (der Mutation in QU015) und die Position der in der Literatur beschriebenen Mutation G63V (Dupont *et al.* 2017), auf die folgend noch

eingegangen wird, sind in Abbildung 4-2 dargestellt. Es wird die Struktur von OmpR in *E. coli* und die Lage der relevanten AS innerhalb der Proteinstruktur gezeigt.

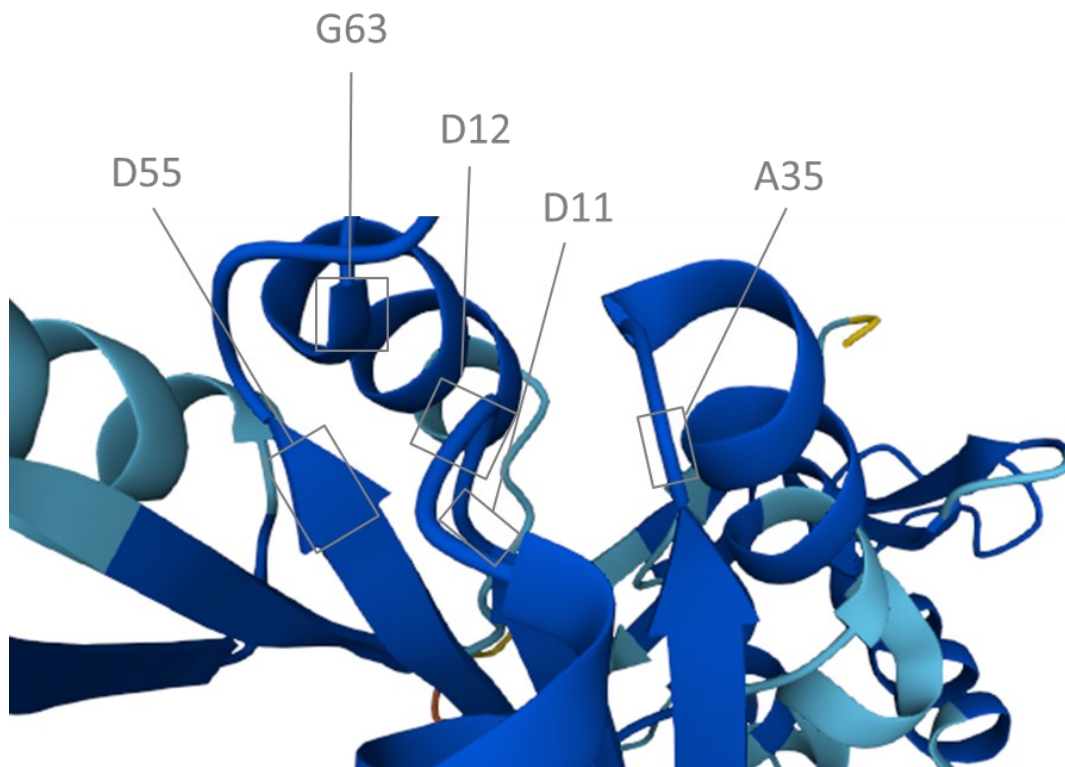


Quelle: UniProt, P0AA16 OMPR_ECOLI, AlphaFold Structure: AF-P0AA16-F1 (ompR - DNA-binding dual transcriptional regulator OmpR - Escherichia coli (strain K12) | UniProtKB | UniProt 2023)

Model Confidence: zeigt farblich die Sicherheit des Modelles in der Einheit pLDDT mit einer Scala von 0 (nicht sicher) bis 100 (sehr sicher). Die Abstufungen sind farblich dargestellt: sehr hoch (> 90): dunkelblau, sehr hoch (> 70): hellblau, zuverlässig (> 50): gelb, gering (< 50): orange (Varadi *et al.* 2022)

Abbildung 4-2: Übersichtsdarstellung der vorhergesagten Proteinstruktur von OmpR (UniProt) und der Lage der AS-Positionen von D11, D12 und D55 sowie A35 und G63.

Abbildung 4-2 lässt erkennen, dass die Position von A35 in räumlicher Nähe zu der Position von D55 sowie auch von D11 und D12 und G63 liegt. Betrachtet man die Positionen aus einer anderen Perspektive als Detailansicht, lässt sich erkennen, dass die Aminosäuren zueinander in einer Ebene und relativ nah beieinander liegen, siehe Abbildung 4-3.



Quelle: UniProt, P0AA16 OMPR_ECOLI, AlphaFold Structure: AF-P0AA16-F1 (ompR - DNA-binding dual transcriptional regulator OmpR - Escherichia coli (strain K12) | UniProtKB | UniProt 2023)

Zuverlässigkeit des Modells: dunkelblau: sehr hoch, hellblau: zuverlässig, gelb, gering, orange; siehe auch Abbildung 4-2.

Abbildung 4-3: Detailansicht mit veränderter Perspektive auf die Lage der AS-Positionen Asp. 11, Asp. 12 und Asp. 55 sowie Ala. 35 innerhalb der OmpR-Proteinstruktur (UniProt).

In der Detailansicht der 3D-Struktur lässt sich erkennen, dass sich die Aminosäuren 11, 12, 35 und 55 von OmpR innerhalb des Proteins räumlich sehr nahe sind und sich in einer Ebene befinden. Außerdem ist die Lage von außen zugänglich. Die durch die Mutation *ompR* A35D veränderte Aminosäure 35 (Alanin zu Aspartat) befindet sich somit von der Position und Lage her im gleichen Bereich, wie die anderen phosphorylierbaren Aspartate an D11, D12 und D55. Insofern erzeugt die Mutation einen neuen potentiellen Phosphorylierungspunkt in OmpR. Eine mögliche Auswirkung solch einer Veränderung wäre eine schnellere Aktivierung durch die zusätzliche, eventuell affinere Phosphorylierungsstelle, durch die sich die OmpR-P Effekte zeigen. Auch eine zusätzliche (doppelte) Phosphorylierung wäre denkbar. Yoshida *et al.* konnten 2006 zeigen, dass die Regulation von *ompF* und *ompC* nur über mehrere OmpR-P

Bindestellen *upstream* der Promotoren, vermutlich schrittweise, gesteuert wird (Yoshida *et al.* 2006). Ein verändertes OmpR-P könnte hier somit einen modulierenden Einfluss haben.

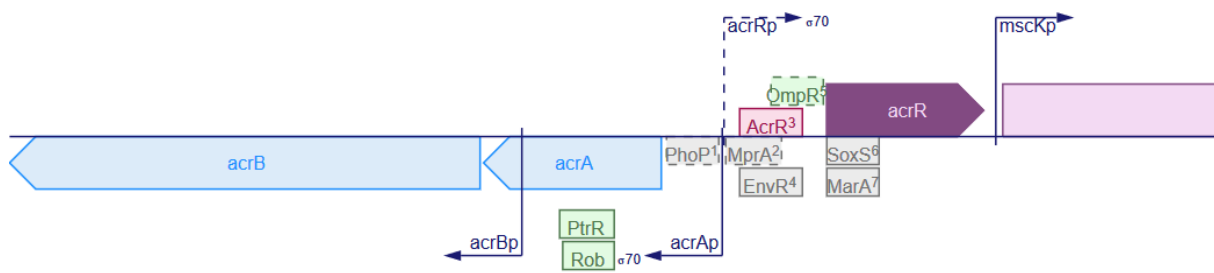
Auch in Bezug auf die Resistenzentwicklung gegen β -Lactame könnte diese *ompR* A35D Mutation eine Rolle spielen. In 2017 untersuchten Dupont *et al.* ein ESBL-positives *E. coli* ST131 Isolat, welches CTX-M-15 sowie eine TEM-1 β -Lactamase aufwies und außerdem resistent gegen Ertapenem war. Sie fanden eine Mutation in *ompR* (G63V) (vgl. Abbildung 4-2), die eine Delokalisation der Phosphorylierungsstelle hervorruft und in der Folge zu einer herabgesetzten *ompC* und *ompF* Expression führte. Den Autoren nach war das die Erstbeschreibung einer klinisch entstandenen Ertapenemresistenz, die auf dem Mechanismus einer veränderten OmpR-Aktivität beruht (Dupont *et al.* 2017). Das von Dupont *et al.* untersuchte Isolat war ein *E. coli* ST131 Isolat mit einer CTX-M-15 β -Lactamase, ebenso wie QU015 aus dieser Arbeit. Allerdings zeigte QU015 keine Resistenz gegen Carbapeneme und die gefundene *ompR* Mutation ist von anderer Natur. Dennoch handelt es sich in beiden Fällen um Mutationen, die die Phosphorylierungsstelle für OmpR betreffen. Im Falle der Mutation aus der Literatur (G63V) war die Lage von D55 verändert, wogegen bei der in dieser Arbeit gefundenen Mutation eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle entstanden sein könnte. Daher erscheint eine weitere Untersuchung ihrer Auswirkungen nicht uninteressant.

Neuere Literatur zeigt, dass eine durch OmpR Aktivierung vermittelte OmpF *down*-Regulation Resistenz gegen Cefalexin *in vivo* hervorruft (Alzayn *et al.* 2021), womit eine Resistenzentwicklung durch eine veränderte *ompR* Regulation auch für ein aktuell vielfach eingesetztes Cephalosporin gezeigt wäre. Alzayn *et al.* fanden ebenfalls die Mutation *ompR* G63V, die mit der Reduktion der Expression von *ompC* einherging. Die Tatsache, dass *ompR* Mutationen in neueren klinischen Isolaten gefunden wurden, unterstreicht die Relevanz und den Einfluss der (EnvZ-) OmpR gesteuerten Regulation von *ompC* und *ompF* in Bezug auf die Resistenzentwicklung.

4.4.5 Die *acrR* Mutation *fM1* in *E. coli* eo795

Unter den in dieser Arbeit detektierten Mutationen in den *E. coli* ST131 Isolaten ist eine besonders interessant, da sie das Gen *acrR* betrifft. Die im Stamm eo795 (GK 2914) gefundene

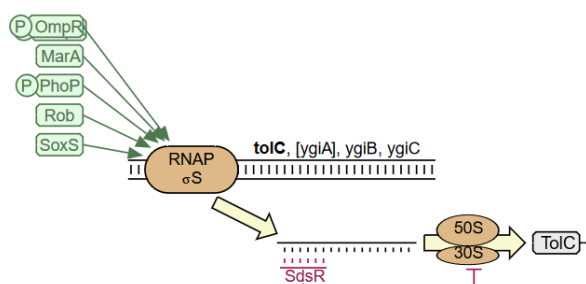
Mutation bewirkt eine Veränderung des dritten Nukleotids in *acrR* (c.3T>A). Aufgrund dieser Mutation wird das Startcodon von *acrR* verändert. Die Veränderung des Basentriplets von ATG zu ATA (c.3T>A) würde innerhalb eines Gens dazu führen, dass eine andere Aminosäure eingebaut wird (M>I). Da sie sich allerdings innerhalb des Startcodons ATG des Gens befindet, welches auf der mRNA-Ebene als UAG für N-formyl-Methionin (*f*-Met) codiert, wirkt sie sich anders aus. Da *f*-Met ein Initiationsfaktor für die Bildung des Initiationskomplexes der Translation ist (Adams und Capecchi 1966), führt sein Ausfall wahrscheinlich dazu, dass die mRNA nicht translatiert wird. Das entstandene Triplett ATA (AUA) stellt auch kein wesentliches alternatives Startcodon dar, es kommt in Bakterien nur bei 0,004 % der annotierten Gene vor (Hecht *et al.* 2017) und zeigt eine Expression von 1 % (Sussman *et al.* 1996) bzw. eine Translationsinitiation von 0,1-1 % der von AUG in *E. coli* (Hecht *et al.* 2017). Im betroffenen Stamm findet sich auch kein weiteres Startcodon in der näheren Umgebung (≥ 20 AS). Insofern kann erstmal davon ausgegangen werden, dass *acrR* nicht oder nur in sehr geringem Maße translatiert wird. Die Mutation wird folgend auf Aminosäureebene mit *acrR fM1* bezeichnet, da das *formyl-Methionin* an Position **1** betroffen ist und eine Mutation unbekannter Auswirkung (*unknown*) entsteht (Dunnen und Antonarakis 2001). Aufgrund der zuvor beschriebenen Funktion von *f*-Met wäre anzunehmen, dass die Translation so gut wie nicht stattfindet und somit AcrR nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil gebildet wird. Das Gen *acrR* liegt in umgekehrter Orientierung in einem Operon mit *acrAB* (siehe Abbildung 4-4), welches durch AcrR selbst reprimiert wird. Dabei fungiert AcrR als Repressor sowohl für das Gen *acrR* selbst, ist also autoreguliert, als auch für die Gene *acrAB*. AcrR wirkt dementsprechend einer Überexpression von *acrAB* entgegen (Ma *et al.* 1996). Die AcrR-Bindestelle liegt im Bereich des Promoters von *acrAB* (Su *et al.* 2007). Das *acrRAB*-Operon ist in Abbildung 4-4 schematisch dargestellt. Es ist anzunehmen, dass sich die Mutation *acrR fM1*, in deren Folge AcrR nicht oder nur in sehr geringem Maß gebildet wird, auf die Transkription der Gene *acrA* und *acrB* auswirkt, die ohne ihren Repressor theoretisch dauerhaft transkribiert würden. Allerdings wird das *acrRAB*-Operon weiter auch durch OmpR/-P, MarA, SoxS und Rob aktivierend reguliert, sowie durch EnvR und PhoP reprimierend reguliert, wie in Abbildung 4-4 dargestellt (nach: Keseler *et al.* 2021).



Quelle: EcoCyc: Gen *acrR*, in *acrRAB*-Operon (*Gene Local Context*), Ausschnitt. Database: *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 reference genome (EcoCyc), (Keseler et al. 2021).

Abbildung 4-4: Darstellung des *acrRAB*-Operons in *E. coli* MG1655 (EcoCyc)

Da es sich bei AcrR um den Repressor handelt, der die Transkription von *acrAB* inhibiert, würde bei dessen Nichtvorhandensein *acrAB* ständig transkribiert und in der Folge vermehrt AcrA und AcrB gebildet. Bei diesen beiden Proteinen handelt es sich um zwei Funktionseinheiten der Effluxpumpe AcrAB-TolC, deren vermehrtes Vorkommen bei Überexpression in einer erhöhten Anzahl an Effluxpumpen und dadurch gesteigerter Efflux-Aktivität resultiert (vgl. Kap. 1.2.1.2). Dazu müsste allerdings auch das Membranprotein TolC in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Die Transkription von *tolC* wird wiederum durch OmpR-P, MarA, PhoP-P, Rob und SoxS aktiviert (vgl. Abbildung 4-5) (nach: Keseler et al. 2021).



Quelle: EcoCyc: Gen *tolC*, Regulation, Database: *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 reference genome (EcoCyc), (Keseler et al. 2021).

Abbildung 4-5: Ausschnitt aus der Regulation von *tolC* (EcoCyc)

AcrR fungiert im Weiteren auch als Repressor für *marR*, *micF*, *soxS*, und *soxR* (Keseler et al. 2021). Bei verringerter oder fehlender Expression von *acrR* würden alle diese Gene in der Folge stärker transkribiert, wodurch es wiederum zu erhöhten Mengen der jeweiligen Genprodukte käme. Da MarR als Autorepressor des *marRAB*-Operons die Expression von

marA reprimiert (Sulavik *et al.* 1995), müsste eine erhöhte Menge an MarR zu einer stärkeren Repression von *marA* führen. MarA wiederum aktiviert die Transkription von *tolC* (vgl. Abbildung 4-5), was bei der Repression von *marA* zur Folge hätte, dass zunächst weniger MarA und in der Folge auch weniger TolC gebildet würde. SoxS begünstigt ebenfalls eine stärkere Transkription von *tolC* und führt dadurch ebenfalls zu einer gesteigerten Expression (vgl. Abbildung 4-5). Insofern führt der Ausfall des Repressors AcrR in der Folge zu einer erhöhten Expression aller Komponenten der Effluxpumpe AcrAB-TolC und die Überexpression von AcrAB-TolC wiederum zu einer gesteigerten Efflux-Aktivität (vgl. Kap. 1.2.1.2.1). Diese verringert die intrazelluläre Konzentration diverser Antibiotika (Tetracycline, Chloramphenicol, β -Lactame, Fluorchinolone, etc.) und erzeugt in der Folge Resistenz (Munita und Arias 2016). Für diesen Effekt spricht, dass der Stamm eo795 (GK 2914) eine MHK von 256 mg/L für Ciprofloxacin aufweist (vgl. Kap. 3.12), die nochmal deutlich höher liegt als bei den anderen ansonsten vergleichbaren Isolaten mit den gleichen QRDR-Mutationen (Doppelmutation in *gyrA* und *parC*), die eine MHK von 64 mg/L zeigen. Da in dem Stamm aber zusätzlich auch noch ein *aac(6')-Ib-cr* Gen gefunden wurde (Emrich 2011) (vgl. Kap. 3.12), könnte auch dieses die hohe MHK für Ciprofloxacin begründen. Emrich konnte zeigen, dass durch das Vorhandensein dieser Variante in *E. coli* die MHK für Ciprofloxacin um ein bis zwei Stufen ansteigt. Weitere Informationen zu relevanten Mutationen in diesen Stämmen liegen allerdings nicht vor, weshalb die abschließende Beurteilung des Effekts der Mutation *acrR fM1* an dieser Stelle noch nicht möglich ist, aber weiterführend untersucht werden könnte.

Betrachtet man den weiteren Kontext, ist AcrR auch als globaler Regulator und Repressor des *mar-sox-rob*-Regulons beschrieben (Lee *et al.* 2014). Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Genen, die über MarA reguliert werden (Barbosa und Pomposiello 2005; Martin und Rosner 2002). Diese wiederum regulieren auch die Expression der Gene *ompC* und *ompF*, indem über MarA und Rob unabhängig voneinander die *micF* Transkription aktiviert wird, was zu einer reduzierten Expression von *ompF* führt (Chubiz und Rao 2011). Für MarA wurde daneben ebenfalls eine von *micF* unabhängige Repression von *ompF* festgestellt (Chubiz und Rao 2011). Wenn die Mutation *acrR fM1* einen Wegfall des Repressors AcrR bewirkt, würde dadurch mehr AcrA und darüber mehr *micF* gebildet werden. Dieser Effekt würde sich

zusätzlich über die Aktivierung durch MarA noch verstärken, da dessen Repressor ebenfalls AcrR ist. Ungeachtet möglicher anderer Regulationsmechanismen käme es bei einem erhöhten Vorkommen der Antisense-RNA *micF* zu einer Inhibition der Transkription und somit zu weniger OmpF in der Zelle (Andersen *et al.* 1989). Dieses bedingte in der Folge eine relative Steigerung der Expression von *ompC*, da *ompF* und *ompC* reziprok über den gleichen Transkriptionsaktivator OmpR-P reguliert werden (Yoshida *et al.* 2006). Diese wiederum führte dann zu einer weiteren Ausprägung der Resistenz gegen Stoffe und Antibiotika, die Substrate von OmpF und nicht oder weniger von OmpC sind (vgl. Kap. 1.2.1.1). Weiterhin wurde bereits festgestellt, dass es eine Korrelation zwischen der Menge an AcrR und dem Zellwachstum gibt (Parisutham *et al.* 2022). Insofern wäre auch zu prüfen, ob ein Stamm mit dieser Mutation, aufgrund seiner stark verringerten AcrR Menge langsamer wächst.

4.4.6 Zusammenhang von *acrR* und OmpR-P

Die Transkription von *acrR* wird durch OmpR-P aktiviert (Shimada *et al.* 2015), was auch bereits bei der Betrachtung der Regulation von *acrR* auffiel (vgl. Kap. 4.4.5 und Abbildung 4-4). Dies scheint im Hinblick auf die weitere in dieser Arbeit gefundene Mutation in *ompR* interessant, da sie eventuell auf einen Zusammenhang der beiden Mutationen *ompR* A35D und *acrR* fM1 hinweist. Diese wurden in verschiedenen *E. coli* ST131 Isolaten identifiziert. Die erste Mutation *ompR* A35D stellt eine potentielle weitere Phosphorylierungsstelle in OmpR dar, die möglicherweise zu mehr OmpR-P führt (vgl. Kap. 4.4.4). OmpR-P führt zur Transkriptionsaktivierung von *acrR* und folglich zu mehr AcrR in der Zelle. Die zweite Mutation *acrR* fM1 verursacht sehr wahrscheinlich den Ausfall von AcrR und die daraus resultierenden Effekte (vgl. Kap. 4.4.4). Die beiden Mutationen scheinen somit in Bezug auf AcrR genau gegenteilige Auswirkungen zu haben. Allerdings kommt es im Fall der *acrR* Mutation fM1 durch den Wegfall von AcrR zu mehr AcrA und MarA und darüber zu erhöhter Bildung von *micF* in der Zelle, welche in verhältnismäßig weniger OmpF resultiert (Andersen *et al.* 1989). Die postulierten Auswirkungen der Mutation *ompR* A35D (vgl. Kap. 4.4.4) würden über OmpR-P ebenfalls zu weniger OmpF führen und hätten somit den gleichen Effekt.

Über die beschriebenen Mechanismen könnten insofern die hier in den *E. coli* ST131 Stämmen gefundenen Mutationen auch über die verringerte Expression von OmpF FQ-Resistenz vermitteln. Zumindest liefern die Überlegungen einen starken Hinweis darauf. Die MHK-Werte der beiden Isolate für Ciprofloxacin liegen bei 64 µg/mL für *E. coli* QU015 (*ompR* A35D) und bei 256 µg/mL für *E. coli* eo795 (*acrR* fM1), (vgl. Kap. 3.12). Insofern zeigt *E. coli* eo795 mit der Mutation *acrR* fM1 eine um zwei Stufen höhere MHK als QU015. Ansonsten sind sich die beiden Isolate sehr ähnlich: ST131-O25b Stämme aus der Phylogruppe B2, die bezüglich der Resistenz gegen Ciprofloxacin die gleichen Doppelmutationen in der QRDR (*gyrA* S83L und D87N sowie *parC* S80I und E84V) aufweisen, eine CTX-M-15 β-Lactamase, Resistenz gegen Cefotaxim und Tetracyclin sowie vier bzw. drei Plasmide (vgl. Kap. 3.12). *E. coli* eo795 war zusätzlich noch resistent gegen Kanamycin und trägt das Resistenzgen *aac* (6')-Ib-cr (Emrich 2011) das die hohe MHK gegen Ciprofloxacin mitbegründet (vgl. Kap. 3.12). Das *aac* (6')-Ib-cr ist aber wahrscheinlich nicht allein für den hohen MHK Unterschied verantwortlich, da ein vergleichbares ST131 Isolat, QU061, welches neben den QRDR-Mutationen auch *aac* (6')-Ib-cr trägt eine MHK von 64 µg/mL für Ciprofloxacin zeigt. Dies lässt vermuten, dass die zwei Stufen höher MHK bei *E. coli* eo795 durch die Mutation *acrR* fM1 zustande kommt. Die beschriebenen Auswirkungen der Mutation, durch welche die AcrAB-TolC Effluxpumpe konstitutiv exprimiert sein müsste (vgl. Kap. 4.4.5), lieferten dafür eine plausible Erklärung. In wie weit und wie stark die beiden Mutationen, *ompR* A35D und *acrR* fM1 tatsächlich zu Resistenz und welche Effekte sie haben, wäre Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

4.5 Rapid-Parallel MLST (RP-MLST)

4.5.1 RP-MLST als Methode

4.5.1.1 Enzymatische Fragmentierung der DNA-Fragment-Pools

Ausgangsmaterial der richtigen Größe für die RP-MLST Sequenzierung zu erzeugen, welches die Gesamtheit der zu sequenzierenden Bereiche abbildet, war, bedingt durch die Leseweite des Ion Torrent™, essentiell. Für die enzymatische Zerkleinerung der DNA-Pools wurde das

Enzym Fragmentase gewählt, weil es bereits für die Fragmentierung von Genomen zur Sequenzierung erprobt war (Gautreau und NEB 2015). Die Fragmentase-Reaktion erwies sich auch zur Fragmentierung von PCR-Produkten als bestens geeignet, robust, einfach durchzuführen und reproduzierbar. Zwar variierten die resultierenden Fragmentgrößen geringfügig (vgl. Kap. 3.3.1.2, Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11), waren aber insgesamt wesentlich konstanter und reproduzierbarer als bei der Scherung mit Ultraschall. Sie lieferte die gewünschten Ergebnisse und funktionierte für die Weiterverarbeitung mit den Library-Kits. Die enzymatische Fragmentierung hat auch den Vorteil, dass Aufwand und Gerätekosten der physikalischen Scherung vermieden werden (Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit 2023).

Für die NGS-Sequenzierung stehen allerdings mittlerweile auch Systeme mit deutlich längeren Leseweiten zur Verfügung wie z.B. das MinIon™ System (Satam *et al.* 2023), bei welchem RP-MLST auch ohne Zerkleinerung des DNA-Ausgangsmaterials auskäme. Als Alternative der *short-read* Sequenzierung wäre auch die viel genutzte Illumina-Technik anwendbar, für deren Verwendung die DNA aber ebenfalls fragmentiert werden müsste (Hu *et al.* 2021).

4.5.1.2 Sequenzabdeckung und Qualität der NGS-Library

Für insgesamt 43 von 46 der RP-MLST Proben waren die auf dem Ion Torrent™ generierten Sequenzen in Qualität und Quantität sehr gut bis ausreichend. Für drei Proben, deren Library sehr schwach konzentriert gewesen war (vgl. Kap. 3.3.2), waren sie es nicht. Bei diesen zeigte sich eine ungenügende Abdeckung der Sequenz (vgl. Kap. 8.4.1). Diese Proben wurden im Prozess verwendet, um zu evaluieren ob die Methode in solchen Fällen noch gute Ergebnisse erzielt oder an ihre Grenzen stößt. Das eigentliche Problem scheint dabei aber nicht die geringe Konzentration der Library zu sein, da diese über die Anpassung der Menge der Proben (vgl. Kap. 6.2.16.2.3) ausgeglichen werden kann, sondern ihre relative Zusammensetzung. Bei den Libraries der GKs 4434, 4439 und 4429 war die Gesamtheit aller zu analysierende Gene im Verhältnis zu einem einzigen, hier *parC*, sehr gering. Für *parC* wurde ein Anteil von ca. 1 % angestrebt, sodass in den übrigen 99 % der Library die anderen Sequenzen vertreten sein sollten. Dies war für die drei Libraries der GKs 4429, 4434 und 4439 allerdings nicht der Fall. Anhand der Bioanalyser-Diagramme dieser drei Proben (vgl. Abbildung 3-15) ließ sich

erkennen, dass der *parC*-Peak ca. $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ der Fläche einnahm. Über die quantitativen Bioanalyser Daten konnte das Verhältnis der DNA-Mengen in etwa abgeschätzt werden. Der *parC* Anteil lag danach bei circa 28 % für GK 4434, ca. 30 % für GK 4439 und ca. 45 % für GK 4429 (vgl. Abbildung 3-15), sodass sich der Anteil der übrigen RP-MLST Gene entsprechend auf ca. 55-82 % verringerte. Dies war im Vergleich zu den anderen Librarys, mit ca. 95-99 % Anteil der anderen RP-MLST Gene, sehr viel weniger und potenzierte sich noch durch die anschließende Amplifizierung der Library auf dem Ion OneTouch. Vergleicht man die vorhandenen Reads mit den prozentualen Anteilen der MLST-Gene an der gesamten Library und betrachtet die Sequenzabdeckung, so waren bei GK 4439 und GK 4434 noch etwas mehr Reads im Bereich der Zielsequenzen vorhanden als bei GK 4429. Der wiederum wies mit ca. 45 % *parC* das extremste Verhältnis zur übrigen Library auf und zeigte auch eine sehr hohe Abdeckung für *parC* (160-250 Reads), aber auch die wenigsten Sequenzen für die MLST-Gene. Dies stützt die Vermutung, dass bei einer schwach konzentrierten Library die Menge von 1 ng für ein PCR-Produkt überproportional hoch ist und sich daher negativ auf die Abdeckung der anderen Gene auswirkt. Dies ist im Grunde auch so zu erwarten und folglich das Ausgangsmaterial an DNA, in welchem die zu sequenzierenden Gene gut repräsentiert sind, essentiell.

Die Sequenzierung eines *E. coli* Genoms mit einem Sechzehntel Anteil auf dem Sequenzierchip, zeigte trotz sehr guter Library Qualität keine vollständige Abdeckung. Diese beruht auf insgesamt zu wenig generierten Sequenzen, wobei auch die Beladung der Sequenzierchips einen Einflussfaktor darstellt (vgl. Kap. 3.7.2).

4.5.1.3 Sequenzanalyse nach RP-MLST und Genomsequenzierung

Die MLST-Analyse aus den mit RP-MLST gewonnenen Sequenzdaten war einwandfrei manuell in IGV und mittels Datenbankabgleich (Methode 6.2.16.3.1) sowie automatisiert durch Einsatz des CLC-Plugins „type a known species“ (Methode 6.2.16.3.2) durchzuführen, wobei letzteres die Ergebnisse sehr schnell lieferte.

Die Analyse der Resistenzgene aus der RP-MLST Sequenzierung funktionierte sowohl manuell als auch mit dem „Find resistance“ Analyse-Tool der CLC (Methode 6.2.16.3.2) Genomics Workbench. Letztere war vor allem für die Genome von enormem Vorteil, da viele der nicht

im RP-MLST berücksichtigen Resistenzgene mit detektiert wurden (vgl. Kap. 3.7.7). Nur die Resistenz vermittelnden Mutationen, wie jene in der QRDR, die bekanntermaßen zu FQ-Resistenz führen (Correia *et al.* 2017), wurden durch die CLC-Software nicht als solche detektiert, jedoch in der Sequenz als veränderte Aminosäuren dargestellt. Für diese Targets war daher eine manuelle Auswertung nötig (vgl. Kap. 8.4.6).

4.5.2 Bewertung von RP-MLST

Im Gegensatz zur klassischen Sequenzierung aller Housekeeping- und Target-Gene, die relativ lange dauert, sollte die NGS-basierten Methode RP-MLST die Sequenzierung vieler Stämme parallel ermöglichen und dabei wesentlich mehr Daten auf einmal generieren. Dieses Ziel wurde erreicht (vgl. Kap. 3.4 und 3.7). RP-MLST lieferte die gefragten Ergebnisse, war einfach auswertbar und konnte leicht auf neue Inhalte sowie individuelle Fragestellungen angepasst werden. Ein großer Vorteil lag darin, dass durch die Reduzierung auf die Gene von Interesse, enorme Mengen an Daten nicht produziert und verarbeitet werden mussten, was die parallele Sequenzierung diverser Proben auf einem Sequenzierchip ermöglichte. In Bezug auf Zeit, Materialeinsatz und Kosten war die RP-MLST Sequenzierung effizienter als die nicht NGS-basierte (Cycle-) Sequenzierung und weit günstiger als die Genomsequenzierung der Isolate.

Allerdings wurden einzelne Isolate mit dieser Methode nicht vollumfänglich erfasst (vgl. Kap. 3.7). Die Amplifikation der Housekeeping-Gene funktionierte nur soweit einwandfrei, wie die entsprechenden Stämme in den Bereichen in denen die Primer binden, keine Abweichungen zeigten. Selbst Housekeeping-Gene, die der Definition nach in allen *E. coli* Stämmen vorhanden und essentiell sind, sind variabel. Wie variabel sie sind, zeigt schon die Menge an beschriebenen Allelen in den MLST-Datenbanken (Jolley *et al.* 2018). Generell sind solche Variationen, wie sie zwischen verschiedenen Stämmen auftreten, eine prinzipiell kaum zu behebbende Einschränkung für solch spezifische Methoden wie MLST bzw. RP-MLST. Um alle möglichen Abweichungen zu berücksichtigen und zu erfassen, müsste stets eine Genomsequenzierung durchgeführt werden.

4.5.3 RP-MLST im Vergleich zur Genomsequenzierung

Der Hauptgrund, aus dem das RP-MLST unter Fragmentierung in dieser Arbeit etabliert wurde, war, durch die Reduzierung auf die Gene von Interesse viele Proben, zeit- und kosteneffizient parallel sequenzieren zu können. Das Fortschreiten der NGS-Technik begünstigt mittlerweile die Sequenzierung größerer Fragmente und im Kontext der Ganzgenomsequenzierung (WGS) vor allem Systeme mit langen Leseweiten (*long-reads*) (Satam *et al.* 2023). Für die auf bestimmte Targets ausgerichteten Analysen, werden allerdings immer noch Systeme mit kurzen Leseweiten (*short-reads*) verwendet (Satam *et al.* 2023), wozu auch das hier verwendete RP-MLST gehört.

Vergleicht man RP-MLST als Methode mit der Genomsequenzierung ist sie bei weitem weniger umfangreich, dafür aber viel einfacher in der Datenanalyse und Auswertung. RP-MLST ist in sich abgeschlossen und nach der Durchführung erschöpft, wogegen bei der Genomsequenzierung generell alle Daten generiert werden und später je nach Bedarf betrachtet werden können. Allein die Masse dieser Daten, die analysiert werden muss, ist pro Genom relativ hoch. Allerdings wird die Genomsequenzierung immer kostengünstiger (Satam *et al.* 2023) und auch die Datenauswertung mit Sequenzanalyseprogrammen wie der CLC Genomics Workbench (vgl. Kap. 3.7.5 und 3.7.7) oder BioNumerics (Blanc *et al.* 2020) mit ihren entsprechenden Tools für z. B. die (MLST-) Typisierung immer einfacher. Aus der Gesamtheit der Daten aus der Genomanalyse kann das Maximum an Informationen gewonnen werden und Bereiche, die zunächst nicht von Interesse waren, noch nachträglich analysiert werden. So steht die gezielte Analyse der gefragten Sequenzdaten aus dem RP-MLST der umfassenden Genomanalytik gegenüber. In Bezug auf die sich ebenfalls erweiternde MLST-Analytik, mit den neueren Analysen des *core genome* (cg) MLST und des *whole genome* (wg) MLST sowie cg-SNPs-Analysen, die immer häufiger verwendet werden (Blanc *et al.* 2020; Miro *et al.* 2019) ist die Genomsequenzierung von entscheidendem Vorteil, da sie auch die dafür nötigen Daten liefert. Im klinischen Bereich wird auch zunehmend WGS mittels NGS Methoden zur Identifikation von Pathogenen und antibakteriellen Resistenzen bzw. Resistenzmechanismen verwendet (Hilt und Ferrieri 2022). Insofern geht der Trend insgesamt eindeutig zur Genomsequenzierung.

4.6 Plasmide in *E. coli* ST131 Stämmen

4.6.1 Plasmide der genomsequenzierten *E. coli* ST131 Stämme der Literatur

Bereits in der ersten veröffentlichten Genomsequenz eines *E. coli* ST131 Isolats (*E. coli* NA114), fanden sich Gene für Plasmidmobilisationsproteine (*mobA2*) und konjugative Transferproteine für Plasmide (*traD*, *tral*) wieder (Avasthi *et al.* 2011). Das frühe ST131 Isolat *E. coli* EC958, welches bereits 2005 isoliert wurde, trägt neben anderen Resistenz-/ und *tra*-Genen ebenfalls *bla*_{CTX-M-15} auf einem Plasmid (Forde *et al.* 2014). Die Analyse der neueren genomsequenzierten *E. coli* ST131 Stämme ab 2007 zeigte dazu, dass die Stämme meistens mehrere, sowie sehr große Plasmide (von bis zu 130 kbp) besitzen, auf denen sich mehrere Resistenzgene kombiniert befinden. Insbesondere treten verschiedene Resistenzgene gegen Aminoglykoside und β -Lactame kombiniert auf (vgl. Kap. 3.10, Tabelle 3-20).

Interessant sind besonders die Plasmide aus den sich sehr ähnlichen *E. coli* ST131 Isolaten *E. coli* JJ1886 und *E. coli* JJ1887 (vgl. Kap. 1.4.5.4 und 1.4.5.5), bei denen wahrscheinlich eine direkte Übertragung von einer Person auf die andere (ihre Schwester) stattfand (Owens *et al.* 2011). *E. coli* JJ1886 trägt fünf Plasmide, darunter zwei große Plasmide: eins mit 56 kbp, welches *tra*-Gen-Elemente trägt, und eins mit 110 kbp, welches mehrere Resistenz vermittelnde Gene für Aminoglykoside, Aminopenicilline, Extended-Spektrum- β -Lactame sowie *tra*-Gene, Gene für Konjugationsproteine und Transposon-Strukturen trägt, (vgl. Kap. 3.10, Tabelle 3-20) (Andersen *et al.* 2013). *E. coli* JJ1887 trägt ebenfalls fünf Plasmide, wobei die drei kleinen Plasmide die gleichen sind, wie bei JJ1886 (Johnson *et al.* 2016a). Die zwei großen Plasmide unterscheiden sich, eins aber nur in 2 kbp Größe und zwei codierenden Sequenzen (CDS). Diese beiden Plasmide tragen die gleichen Resistenzgene (*bla*_{TEM-1} und *aac-6'-Ib-cr*), unterscheiden sich jedoch in der Variante der β -Lactamase *bla*_{OXA-1} bzw. *bla*_{OXA-30}. JJ1887 unterscheidet sich weiter durch ein 130 kbp großes Plasmid (158 CDS) mit weiteren Resistenzgenen, darunter *tetB* (Tetracyclinresistenz) und *qepA*, welches für eine Fluorchinolon-spezifische Effluxpumpe codiert, trägt. Beide „Schwester-Isolate“ tragen das *bla*_{CTX-M-15} Gen chromosomal innerhalb eines (unvollständigen) Tn3 Elements, eingebettet in eine Lambda-like 58-kb Prophagenregion (Andersen *et al.* 2013). Im Weiteren finden sich bei

E. coli ST131 CTX-M-1, CTX-M-15, sowie auch CTX-M-27 Enzyme auf Plasmiden von z.B. 110 kbp und 145 kbp Größe, die oft in Kombination mit TEM-1 und/oder OXA-1 Enzymen auf demselben Plasmid vorkommen (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014). Die in der Literatur beschriebenen Stämme zeigen damit insgesamt eine große Variabilität ihrer Plasmide und der auf diesen liegenden Resistenzgene.

4.6.2 Plasmide in den charakterisierten *E. coli* ST131 Stämmen dieser Arbeit

In den in dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten *E. coli* ST131 Isolat, wurden diverse Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika unterschiedlicher Klassen gefunden, darunter Ciprofloxacin, Tetracyclin, Gentamicin, Kanamycin, Ampicillin und Cefotaxim (vgl. Kap. 3.12). Die Resistenzen traten in den Stämmen in verschiedenen Kombinationen auf und auch die Plasmidmuster der einzelnen Stämme unterschieden sich stark. Dabei zeigten sich in den Stämmen Plasmide von ca. 1-1,5 kbp, 3 kbp, ca. 6 kbp und in vielen Stämmen sehr große Plasmide von ca. 60 kbp und ca. 70 kbp, sowie auch noch größere mit ≥ 100 kbp (vgl. Kap. 3.11.1). Diese Plasmide sind von den Größenordnungen her, denen der in der Literatur beschriebenen *E. coli* ST131 Isolate sehr ähnlich (vgl. Kap. 4.6.1). Die jüngeren der dort beschriebenen Stämme von 2007 und 2012, weisen ebenfalls diverse verschiedene Resistenzgene auf (vgl. Kap. 3.10). In diesem Kontext scheint es dann wiederum stimmig, dass die Plasmidmuster und Resistenzeigenschaften der hier untersuchten Stämme so unterschiedlich sind. Insgesamt spricht es für eine sehr hohe Variabilität der Resistenzen und Plasmide innerhalb der ST131 Linie. Dies beschreiben auch Lanza *et al.* nach Plasmidanalyse mittels PLACNET auf Basis von WGS-Daten verschiedener *E. coli* ST131 Stämme. Sie zeigten, dass in den untersuchten ST131 Stämmen, die alle wesentlichen Linien umfassen, die Anzahl der Plasmide, selbst innerhalb einer einzigen Linie, zwischen eins und sieben schwankt, im Mittel aber bei vier liegt. Sie fanden in zehn untersuchten Stämmen 39 Plasmide, wobei jeder Stamm mindestens ein F-(like) Plasmid vom Typ $MOB_{F12}/IncF$ besaß. Weitere 28 nicht F-Plasmide waren präsent, darunter zehn große (> 18 kb), wahrscheinlich konjugierbare Plasmide, 17 kleinere (< 12 kb) sowie ein IME (*integrative and mobilizable element*) (Lanza *et al.* 2014). Diese Untersuchung zeigt, wie hoch die Variabilität der vorkommenden Plasmide innerhalb der ST131 Stämme ist und indiziert, dass darunter zahlreiche übertragbar sind.

Insofern stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Erkenntnissen von Lanza *et al.* überein. Eine weitere Studie von Stoesser *et al.* zeigte 2016 detailliert die Entwicklung verschiedener mobiler Resistenz vermittelnder Gene, darunter insbesondere auch das für CTX-M-15. Die chromosomale Integration dieser Resistenzgene sowie der Erwerb von zusätzlichen mobilen Resistenzelementen sind demnach bei *E. coli* ST131 insgesamt und speziell innerhalb bestimmter Sublinien entscheidende Ursachen für die komplexe Entwicklung dieser multiresistenten Linie (Stoesser *et al.* 2016).

Nach Sequenzierung der Plasmide verschiedener ST131 Isolate fanden Johnson *et al.* 2016 nach vergleichenden Analysen unter den Plasmiden Übereinstimmungen, wonach verschiedene F-Typ Plasmide die Entwicklung der ST131 H30R Linie beeinflusst haben, wobei ein F1:A2:B20 Plasmid stark mit H30R/C1 (*Clade C1*) assoziiert ist, und ein anderes F2:A1 Plasmid dagegen mit der H30-Rx/C2 (*Clade C2*). Das Plasmid F2:A1 war dabei wohl schon vor dem Erwerb der FQ-Resistenz in der frühen Linie vorhanden (Johnson *et al.* 2016b). Sie schlussfolgerten, wie zuvor schon Smet *et al.* 2010 (vgl. Kap. 1.4.8), dass wahrscheinlich unter Beteiligung des Insertionselements IS26 eine Serie von neu gewonnenen oder neu angeordneten sowie verlorenen Genen zu den resultierenden Plasmiden der verschiedenen ST131 H30 Sublinien geführt haben, da sie in Teilen übereinstimmende Gen-Cluster mit Eigenschaften für Virulenz und Fitness tragen (Johnson *et al.* 2016b).

In diesem Kontext interessant ist der Befund, dass sich zwei der hier untersuchten Isolate sehr stark ähneln. So weisen *E. coli* eo795 (GK 2914), isoliert in England im Jahr 2004, und *E. coli* QU102 (GK 3443), isoliert im Jahr 2008 in Queensland (Australien), das gleiche Resistenzmuster auf (Ciprofloxacin, Cefotaxim, Tetracyclin und Kanamycin). Außerdem finden sich in beiden Isolaten zwei, nach ihrer Größe gleiche Plasmide mit ca. 1,2 kbp bzw. ca. 70 kbp wieder. Während eo795, neben den genannten, keine weiteren Plasmide aufweist, hat der Stamm QU102 noch zwei weitere Plasmide mit den Größen 5 kbp und 18 kbp. Diese könnte er womöglich im Lauf der Zeit aufgenommen haben, da der Erwerb von Plasmiden über horizontalen Gentransfer ein gut beschriebener Prozess ist (Mayr *et al.* 2007). Diesem Gedanken folgend könnte es sich bei eo795 eventuell um einen direkten oder indirekten Vorfahren von QU102 handeln, dessen Plasmidprofil sich über die Jahre nur wenig verändert

hat. Um eine generelle Verwandtschaft zu evaluieren, müssten allerdings weiterführende Analysen der chromosomalen DNA-Anteile durchgeführt werden, wie z. B. cgMLST, welches für *E. coli* circa 2.500 Genloci vergleicht (Escherichia coli cgMLST 2023) oder direkt wgMLST mit allen, ca. 25.000 Loci (Enterobase 2023).

4.6.3 Fitness von *E. coli* ST131 mit und ohne Plasmide

Bei der Untersuchung der Plasmide in *E. coli* ST131, führten Johnson *et al.* auch Experimente zur allgemeinen Fitness und dem Fitnessverlust der Stämme durch, wenn sie Plasmide tragen. Dabei stellte sich heraus, dass erstens die Fitness innerhalb der ST131 Sublinien von *H30S* über *H30-Rx* zu *H30-R1* sank und zweitens mit Einführung der Plasmide aus dem *H30-Rx*-Stamm *E. coli* JJ1886 in andere Stämme die Fitnessverluste beim Tragen der Plasmide für die fortgeschrittenen *H30-R1* Isolate der ST131 Linie geringer ausfiel als bei *H30S* und *E. coli* MG1655 (Johnson *et al.* 2016b). Daher wird vermutet, dass die *H30-R1/Rx* Linie sich im Vergleich zu ihrem Vorgänger *H30S* so angepasst hat, dass das Tragen von Plasmiden bei ihnen zu geringeren Fitnessverlusten führt (Johnson *et al.* 2016b).

4.7 Transfer von Resistenzplasmiden (R-Faktoren) durch *E. coli* ST131

Die ersten Untersuchungen zu Plasmiden in *E. coli* ST131 Stämmen auf Sequenzebene fanden bereits Insertionselemente, Transposons und unter anderem die Resistenzgene *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} und *bla*_{OXA-1}, sowie *aac6'-Ib-cr* (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014), (vgl. Kap. 1.4.8). Dies ließ vermuten, dass *E. coli* ST131 Stämme über sehr wahrscheinlich via Konjugation übertragbare Multiresistenz-Plasmide verfügen.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Konjugationsexperimente bestätigen diese Vermutung insofern, als dass sie die Übertragung der Resistenzplasmide für einen *E. coli* ST131 tatsächlich zeigen. Das betreffende klinische *E. coli* ST131 Isolat eo791 wurde 2004 in England isoliert. Im Vergleich zu dem frühesten *E. coli* ST131 Referenzisolat, *E. coli* EC958, das 2005 ebenfalls in England isoliert wurde, ist es ein Jahr früher isoliert worden, aber im Prinzip in die gleiche Zeit einzuordnen.

4.7.1 Transfer von Resistenzplasmiden durch MDR *E. coli* ST131 Isolate

Für den in dieser Arbeit untersuchten *E. coli* ST131 Stamm eo791 (GK 2913) aus dem BSAC-Kollektiv von 2004 wurde gezeigt, dass er in der Lage ist, seine Resistenzen über Plasmide auf empfindliche *E. coli* Stämme zu übertragen (vgl. Kap. 3.14). Dabei überträgt er seine Resistenzen nicht alle simultan, sondern in verschiedenen Kombinationen, was den Schluss zulässt, dass sich mehrere verschiedene Resistenzplasmide in der Zelle befinden, die unabhängig voneinander übertragbar sind. Die unterschiedlichen Transkonjuganden zeigten sowohl bei gleichen als auch bei verschiedenen Resistenzeigenschaften unterschiedliche Plasmidmuster (vgl. Kap. 3.14.3 und 3.14.3.1). Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon für den verwendeten Kontrollstamm *E. coli* C600SN beobachtet, der als Donor sowohl nur eines seiner Plasmide (pRP1H) einzeln als auch beide (pRP1H und pBP507), dies aber mit unterschiedlichem Resistenzmuster, auf *E. coli* SG22215 übertragen hatte (vgl. Kap. 3.13.1). Dies erscheint auch nicht weiter ungewöhnlich, denn Enterobakterien tragen häufig mehrere Plasmide (Sherley *et al.* 2003), die sowohl allein (selbstübertragende Plasmide), als auch in Kombination (mobilisierbare Plasmide, Co-Transfer) übertragen werden, weshalb Rezipienten oft mehrere Plasmide simultan erhalten, wobei sich die Transfer-Effizienzen unterscheiden können (Dionisio *et al.* 2019).

Die weiteren getesteten *E. coli* ST131 Stämme zeigten in den Konjugationsexperimenten keine Weitergabe ihrer Resistenzen. Für solch ein Ergebnis sind mehrere Ursachen denkbar. Eine logische Erklärung wäre, dass die Resistenzgene bei diesen Isolaten chromosomal anstatt plasmidcodiert vorliegen, dann wäre eine horizontale Übertragung via Konjugation *per se* nicht möglich. Unabhängig davon könnte es sich um Plasmide handeln, die zwar Resistenzen tragen, aber nicht übertragbar sind oder nur mit sehr geringer Effizienz. Für *E. coli* ST131 sind solche nicht übertragbaren großen IncF-Plasmide beschrieben, genauso wie auch große übertragbare IncF-Plasmide, die CTX-M-15 tragen, (Nicolas-Chanoine *et al.* 2014).

Die Resistenz gegen Cefotaxim betreffend könnte das *bla*_{CTX-M-15} Gen in den hier getesteten QU-Stämmen auch bereits ins Genom integriert sein, wie es auch bei den *E. coli* ST131 Stämmen JJ1886 und JJ1887 der Fall ist (Andersen *et al.* 2013; Johnson *et al.* 2016a).

Zeitlich gesehen passen die Ergebnisse mit der in der Literatur beschriebenen Entwicklung insofern überein, als dass die hier untersuchten jüngeren Isolate von 2008 aus Queensland ihre Resistenz gegen Cefotaxim nicht durch Konjugation übertragen. Dies bedeutet, dass die Resistenzgene entweder nicht plasmidcodiert vorliegen, oder zumindest nicht auf übertragbaren Plasmiden. In der Literatur ist ebenfalls beschrieben, dass *E. coli* ST131 Stämme neueren Datums ihre Cefotaximresistenz nicht mehr übertragen, da sie bereits ins Genom integriert ist (Price *et al.* 2013). Das hier untersuchte frühe *E. coli* ST131-O25b Isolat eo791 von 2004 wäre demnach in die frühe H30-Rx Linie einzuordnen (vgl. Kap. 1.4.4.5), denn es zeigt eine ebensolche Weitergabe von Resistenzgenen über Plasmide. Insofern entsprechen die Ergebnisse sowohl den in der Literatur beschriebenen plasmidcodierten, übertragbaren als auch den im Genom verankerten, nicht übertragbaren Resistenzen in der *E. coli* ST131 Linie.

Johnson *et al.* führten ebenfalls *in vitro* Experimente zum Plasmidtransfer durch, bei denen sie feststellten, dass *E. coli* ST131 Stämme ihre Plasmide nur mit einer geringen Übertragungsrates weitergeben, was sie mit der unterbrochenen Sequenz der Transferregion des F-Plasmids in Verbindung bringen (Johnson *et al.* 2016b). Generell fehlen allerdings Informationen über den horizontalen Gentransfer (HGT) und seine Frequenz bei *E. coli* ST131, was eine gewisse Unvorhersehbarkeit mit sich bringt, auch weil es kein entsprechendes Modell dafür gibt (Pitout und Finn 2020). Dabei brächte das Verständnis eben dieser Faktoren neben Fitnessaspekten einen Vorteil „im Rennen gegen den *status quo*“ (Pitout und Finn 2020). In dieser Hinsicht liefert die vorliegende Arbeit einige Erkenntnisse zu generellen und zeitlichen Aspekten der Konjugation von R-Faktoren durch *E. coli* ST131 H30-Rx Isolate.

Die primäre Fragestellung, nach der Übertragung von Multiresistenz mittels Plasmidtransfer durch *E. coli* ST131 ist damit in ihrem Kern beantwortet. Die Übertragung der Resistenzen gegen Ampicillin, Cefotaxim und Gentamicin durch horizontalen Gentransfer (Konjugation) auf einen empfindlichen Empfängerstamm wurde für eins der ausgewählten *E. coli* ST131-O25b Isolate gezeigt. Der Erwerb der Resistenzen stand dabei direkt in Verbindung mit aufgenommenen Plasmiden (vgl. Kap. 3.14.3).

4.7.2 Transfer der Resistenzplasmide von *E. coli* ST131-O25b Isolat eo791

4.7.2.1 Konjugation der Plasmide von *E. coli* ST131-O25b Isolat eo791

Die relevanteste Erkenntnis aus den Konjugationsexperimenten ist, dass das *E. coli* ST131 Isolat eo791 seine Resistenzgene über Plasmidtransfer via Konjugation auf einen anderen *E. coli* Stamm überträgt. Auffällig dabei war, dass eine Zeit von drei Stunden ausreichte, um die Resistenz gegen Ampicillin und Gentamicin zu übertragen, die Übertragung der Cefotaximresistenz aber erst bei einer Inkubationszeit von fünf Stunden erfolgte.

Dürrenberger *et al.* konnten 1991 den Konjugationsvorgang visualisieren und bestimmten die Zeit zum DNA-Austausch zwischen *E. coli* Zellen mit 100-150 Minuten (Dürrenberger *et al.* 1991). Danach sollte die Inkubationszeit mit drei Stunden ausreichend lang gewesen sein. Es ist allerdings auch beschrieben, dass Plasmide mit unterschiedlichen Transfer-Frequenzen übertragen werden (Andrup und Andersen 1999) und jüngere Daten beschreiben, dass auch physikochemische Faktoren Einfluss auf die Konjugation haben (Headd und Bradford 2018). Daher wurden die Konjugationsexperimente auch mit einer höheren Inkubationszeit durchgeführt. Tatsächlich konnten Transkonjuganden auf Cefotaxim erst nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden selektiert werden (vgl. Kap. 3.14.1.2). Ein möglicher Grund dafür wäre, dass das Gen für die Cefotaximresistenz auf dem sehr großen Plasmid (> 122 kbp) liegt (vgl. Kap. 3.14.3.1), so wie es auch mehrfach in der Literatur beschrieben ist (vgl. Kap. 3.10). Daher wäre denkbar, dass für einen erfolgreichen und vollständigen Plasmidtransfer eine längere Zeit benötigt wird, oder dass ein solcher insgesamt seltener vorkommt, denn unterschiedliche Effizienzen beim Plasmidtransfer sind weitgehend beschrieben (Dionisio *et al.* 2019). Innerhalb der Inkubationszeit von drei, aber insbesondere auch von fünf Stunden finden natürlicherweise auch mehrere Zellteilungen statt, durch die ein konjugativer Transfer gestört oder unterbrochen werden könnte, was ein logischer Grund für die Verzögerung wäre. Außerdem wäre ebenfalls denkbar, dass der Rezipient nach der Konjugation länger braucht, um ein sehr großes Plasmid zu etablieren und danach gegebenenfalls mit dem Plasmid langsamer wächst. Außerdem beschrieben Headd und Bradford 2020 nach Experimenten an *E. coli*-K12, dass sich die Konjugation bevorzugt in einem

gewissen Zeitfenster abspielt, welches sie mit „nach der Teilung und vor dem Übergang in die stationäre Phase“ mit der höchsten Konjugations-Frequenz zwischen vier und acht Stunden beschreiben (Headd und Bradford 2020). Gemessen wurde dies unter antibiotikafreien Bedingungen, für einen ähnlichen Stamm wie er in dieser Arbeit verwendet wurde und unter etwa vergleichbaren Bedingungen. Die Erkenntnisse von Headd und Bradford liefern eine mögliche Erklärung für die beobachtete Konjugation der Cefotaximresistenz vermittelnden Plasmide nach längerer Inkubationszeit.

4.7.2.2 Plasmid-vermittelte Resistenz gegen Ampicillin und Gentamicin

Dass alle bei der Selektion auf Gentamicin und Ampicillin erhaltenen Transkonjuganden (TKs) die gleichen MHKs für diese Stoffe aufweisen (vgl. Kap.3.14.2) und die simultane Übertragung beider Resistenzen ließen vermuten, dass sie auf dem gleichen Plasmid liegen. Eine andere Möglichkeit wäre ein co-Transfer zweier Plasmide mit je einem Resistenzgen (Dionisio *et al.* 2019). Zunächst ließ sich weder das eine noch das andere anhand der Plasmidprofile von Donor und Transkonjuganden bestätigen, da sich kein Plasmid ausschließlich nur einer Resistenz zuordnen ließ. Bei sehr hoher Auftrennung der isolierten Plasmide zeigte sich allerdings für alle TKs mit kombinierter Resistenz gegen Ampicillin und Gentamicin, ebenso wie *E. coli* eo791 selbst, ein sehr großes Plasmid (vgl. Abbildung 3-23). Dieses Plasmid erscheint über 122 kbp groß und zeigt sich im Ausgangsstamm *E. coli* eo791 ebenso wie in allen Amp^R, Gen^R TKs. Dafür, dass die Resistenzgene für Ampicillin und Gentamicin auf einem Plasmid liegen, spricht, dass kein Transkonjugand gefunden wurde, der eine dieser Resistenzen allein trägt (vgl. Kap. 3.14), was bei unabhängig voneinander übertragbaren Plasmiden aber mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu erwarten wäre. Ob die Resistenzgene für Ampicillin und Gentamicin wirklich kombiniert auf einem Plasmid liegen, könnte durch Vereinzelung der Plasmide nach Isolierung und Trennung und anschließendem z. B. molekularem Nachweis der entsprechenden Gene bewiesen werden.

4.7.2.3 Plasmid-vermittelte Resistenz gegen Cefotaxim

Die von *E. coli* ST131 eo791 übertragene Cefotaximresistenz wurde unabhängig von den anderen Resistenzen übertragen. Die Transkonjuganden, die Resistenz gegen Ampicillin und

Gentamicin erworben hatten, waren empfindlich für Cefotaxim (vgl. Kap.3.14.2). Daher können die Resistenzgene für Cefotaxim in diesem Stamm nicht auf dem gleichen Plasmid liegen wie die für Gentamicin und Ampicillin. Die Transkonjuganden auf Cefotaxim zeigen alle auch eine hohe Resistenz gegen Ampicillin (MHK: 2048 µg/mL). Diese war auch höher als die der auf Ampicillin und Gentamicin/Chloramphenicol selektierten Transkonjuganden, mit einer TEM-Typ β-Lactamase (MHK: 1024 µg/mL). Dies war aber erwartbar, da CTX-M Enzyme natürlicherweise neben den 3.GC ebenfalls sehr effektiv Ampicillin umsetzen (Bush und Jacoby 2010). Anders ist es bei der Resistenz gegen Gentamicin, da sie durch spezielle Aminoglykosid-modifizierende Enzyme wie unter anderem denen vom AAC-Typ vermittelt wird (Mayer 1986).

Einen besonderen Fall unter den cefotaximresistenten Transkonjuganden stellt TK-105 dar, bei dem sich sowohl ein *bla*_{CTX-M-Gr.1} als auch ein *bla*_{TEM} Gen nachweisen ließen, der aber sensibel für Gentamicin ist (vgl. Kap. 3.14.4). Diese Tatsache widerspricht zunächst der vorangegangenen These, dass das *bla*_{TEM} Gen auf dem gleichen Plasmid liegt wie das Resistenzgen für Gentamicin. Allerdings spielten hier neben der Konjugation womöglich noch andere Vorgänge eine Rolle, wie z. B. rekombinatorische Ereignisse in der Zelle. Diese sind nicht auszuschließen, da die in der Literatur beschriebenen *E. coli* ST131 Isolate Transposase-Gene und Integron Strukturen aufweisen (vgl. Kap. 3.10), die eine Rekombination und Insertion der Resistenzgene ermöglichen (Stokes und Hall 1989). Gene für TEM-Typ β-Lactamasen kommen bekanntermaßen häufig in Transposons vor, sind insbesondere mit Tn3 assoziiert (Partridge und Hall 2005) und es wurden bereits rekombinatorische Vorgänge durch replikative Tn3-Transposons beschrieben (Nicolas *et al.* 2015). Insofern erscheint eine Rekombination des *bla*_{TEM} Gens auch für den hier getesteten *E. coli* ST131 Stamm plausibel. Eine solche Rekombination von *bla*_{TEM} und Integration in das Plasmid würde auch erklären, warum das Plasmid von TK-105 geringfügig größer ist als die in den anderen cefotaximresistenten Transkonjuganden (vgl. Kap. 3.14.3.1). Daneben besteht theoretisch auch die Möglichkeit, dass mehrere unterschiedlich lokalisierte *bla*_{TEM} Gene im Ausgangsstamm vorlagen, die unabhängig voneinander übertragen wurden. *E. coli* ST131 Stämme, die mehrere β-Lactamase-Gene auf unterschiedlichen Plasmiden tragen, sind ebenfalls beschrieben (Johnson *et al.* 2015; Johnson *et al.* 2016a).

Über große Resistenzplasmide ist außerdem bekannt, dass sie oft mehrere Resistenzgene in Clustern, sogenannten *gene-cassettes*, kombiniert tragen (Partridge *et al.* 2009). Speziell im Fall von *E. coli* ST131 zeigt sich dies zum Beispiel bei dem Isolat *E. coli* JJ1668, in dem das 110 kbp große Plasmid pJJ1886-5 die Resistenzgene *aac(6′)-Ib* und *aac(6′)-Ib-cr* trägt, welche Aminoglykosidresistenz und Ciprofloxacinresistenz vermitteln, sowie die β -Lactamase-Gene *bla_{OXA-30}* bzw. *bla_{TEM-1}* und das Gen *catB3* für Chloramphenicolresistenz (Andersen *et al.* 2013), (vgl. auch Kap. 3.10). Wenn Rekombinase- oder Transposase-Gene auf den Plasmiden liegen, kommt es in Regel sogar zu einer gezielten Anhäufung solcher Gene in den prädisponierten Bereichen (Stokes und Gillings 2011). Insofern könnten auch noch weitere sehr große Plasmide in *E. coli* ST131 eo791 vorhanden sein, die hier nicht detektiert wurden und die andere ESBL-Resistenzgene tragen, ähnlich wie sie in *E. coli* JJ1886 und *E. coli* JJ1887 vorkommen. So trägt *E. coli* JJ1887 *bla_{CTX-M-15}* chromosomal, die Resistenzgene *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-1}*, *aac(6′)-Ib* auf dem Plasmid pJJ1887-4 (108 kbp) und *bla_{TEM-1B}*, *aac(3)-IIa*, und viele mehr auf dem Plasmid pJJ1887-5 (130 kbp) (vgl. Kap. 3.10), (Johnson *et al.* 2016a). In den beschriebenen Fällen liegen allerdings neben *bla_{TEM}* auch *bla_{OXA}* Gene auf den Plasmiden, zusammen mit Gentamicinresistenzgenen. Die verschiedenen OXA-Enzyme sind sehr heterogen und erfassen unterschiedliche Spektren an β -Lactamen, einige lassen sich durch β -Lactamase-Inhibitoren wie Clavulansäure hemmen, andere allerdings nicht (Antunes und Fisher 2014). *E. coli* eo791 wurde allerdings nicht speziell auf das Vorkommen von OXA-Enzymen geprüft.

4.7.2.4 Effekte parallel vorliegender β -Lactamasen auf die Resistenz

In diesem Kapitel wird der in der Arbeit beobachtete Effekt der unterschiedlich ausgeprägten Resistenz gegen Cefotaxim bei Vorliegen der beiden β -Lactamase-Gene *bla_{TEM}* und *bla_{CTX-M}* im Gegensatz zum alleinigen Vorliegen von *bla_{CTX-M}* in den Transkonjuganden von *E. coli* SG22215 diskutiert. Die im Konjugationsexperiment entstandenen TKs von *E. coli* SG22215 auf Cefotaxim/Chloramphenicol wiesen unterschiedlich hohe MHKs für Cefotaxim auf (vgl. Kap. 3.14.2). Es stellte sich die Frage nach dessen Ursache.

Das CTX-M Enzym umfasst das Wirkspektrum der β -Lactam-Antibiotika bis hin zu Cefotaxim, was Aminopenicilline einschließt (vgl. Kap. 1.2.5.4). Für die Resistenz gegen Cefotaxim wäre dagegen anzunehmen, dass für deren Ausprägung nur das CTX-M Enzym verantwortlich ist, da nur dieses den Wirkstoff hydrolysiert. Eine einfache TEM-Typ β -Lactamase (TEM-1, TEM-2, etc.) erzeugt keine Resistenz gegen Cefotaxim (Bush und Jacoby 2010) und dürfte demnach keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit haben. Im Gegensatz dazu steht die hier beobachtete niedrigere MHK von 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für Cefotaxim für den Transkonjuganden Nr. 105, bei dem zwei verschiedene β -Lactamase-Gene (bla_{TEM} und $bla_{\text{CTX-M}}$) vorliegen. Die anderen auf Cefotaxim selektierten TKs weisen eine MHK von 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf. In diesen TKs wurde nur das $bla_{\text{CTX-M}}$ Gen nachgewiesen (vgl. Kap. 3.14.4.2). Dies lässt vermuten, dass TEM neben CTX-M die Cefotaxim Empfindlichkeit beeinflusst. In diesem konkreten Fall verringerte sich die MHK um eine Stufe. Der Unterschied von nur einer MHK-Stufe ist nicht besonders hoch, und liegt genau im Schwankungsbereich der Messmethode, aber er wurde auch nicht unbedingt erwartet und liefert daher Anlass, über die möglichen Ursachen nachzudenken. Mechanistisch könnte dieser Effekt dadurch begründet sein, dass TEM auch eine, wenn auch geringere, Affinität zu Cefotaxim besitzt. Eine gewisse Affinität von TEM-1 zu Cefalexin und Cefoxitin wurde bereits gezeigt (Chen *et al.* 2017). TEM hydrolysiert den Cephalosporinring allerdings nicht. Ursächlich dafür ist die erweiterte Seitenkette, die bedingt, dass β -Lactamasen der Klasse 2b (TEM-1, TEM-2, und SHV-1) die Oximino- β -Lactame wie Cefotaxim nicht spalten können (Bush und Jacoby 2010). Liegen nun beide Lactamasen gemeinsam in der Zelle vor, konkurrieren sie um das Target, wodurch womöglich der Zugang von CTX-M zu Cefotaxim reduziert sein könnte und dies zu einer langsameren Umsetzung des Wirkstoffs führte. CTX-M wäre dann durch die Anwesenheit von TEM im Zugang zu Cefotaxim gehindert, wodurch der Wirkstoff Cefotaxim etwas länger in der Zelle verweilte, bevor er hydrolysiert würde und könnte so länger wirken.

Aufgrund der zeitabhängig bakteriziden Wirkung der β -Lactam-Antibiotika (Eagle *et al.* 1953), führt eine Verlängerung der Wirkdauer zu einer gesteigerten bakteriziden Wirkung (Tilanus und Drusano 2023), die zu einer niedrigeren MHK führen müsste. Eben diesen Effekt zeigt der Cefotaxim-Transkonjugand Nr. 105. Da es sich allerdings nur um die Beobachtung in einen Fall handelt, wäre diese Theorie unbedingt durch weitere Experimente zu überprüfen.

4.7.3 Fazit zu *E. coli* ST131-O25b Isolat eo791

Dass von den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen das *E. coli* Isolat eo791 aus dem Jahr 2004 seine Resistenzgene und Plasmide via Konjugation überträgt ist ein Indiz dafür, dass dieses Isolat aus einer früheren Linie der *E. coli* ST131 H30-Rx stammt, die das CTX-M Enzym plasmidcodiert trägt (vgl. Kap. 1.4.6). Wie die vergleichende Plasmidanalyse aus Kap. 3.10 der *E. coli* ST131 Stämme der Literatur zeigt, trugen die zuerst sequenzierten ST131 Stämme, wie NA114 das *bla*_{CTX-M-15} Gen auf Plasmiden. Im Gegensatz dazu tragen die später isolierten und genomsequenzierten Stämme *E. coli* JJ11186 und JJ1187 das Gen *bla*_{CTX-M-15} chromosomal, eingebettet in eine lambda-like 58 kb Prophagenregion (Andersen *et al.* 2013). Dafür, dass sich *E. coli* eo791 grundlegend von diesen und den anderen in dieser Arbeit untersuchten Isolaten unterscheidet, sprechen zum einen die Übertragbarkeit seiner Resistenzplasmide (vgl. Kap. 4.7.1) und zum anderen die Unterschiede in der Umgebung des β -Lactamase-Gens, dessen sequenzierter Abschnitt aber CTX-M-15 entsprach (vgl. Kap. 3.5). Der Stamm besitzt ein *bla*_{CTX-M} Gen aus der CTX-M Gruppe 1, wozu auch CTX-M-15 gehört, welches sich aber nicht mit den an *bla*_{CTX-M-15} entwickelten Primern amplifizieren ließ. Die verwendeten Primer wurden an der Sequenz des *E. coli* ST131 Stamms NA114 so ausgerichtet, dass sie außerhalb des Gens liegen (vgl. Kap. 6.2.9.2). Sie sind daher für die direkte Umgebung von *bla*_{CTX-M-15}, wie in der benannten Referenzsequenz spezifisch. Woodford *et al.* fanden auf einem Plasmid (pEK516) aus einem *E. coli* ST131 Isolat auch *bla*_{CTX-M-15} und *bla*_{TEM-1}. Dessen Sequenz nach würde sich der verwendete fw-Primer in einem Bereich des Insertionselements IsEcp1, 48 bp *upstream* von *bla*_{CTX-M-15} befinden (Woodford *et al.* 2009). Der andere Primer läge *downstream* innerhalb eines neuen *open reading frame (orf)*. Mit diesen Primern konnte in den anderen *E. coli* ST131 Stämmen das *bla*_{CTX-M-15} Gen nachgewiesen und sequenziert werden, nicht aber in *E. coli* eo791, dort banden nur die CTX-M-Gr.1 Primer (vgl. Kap. 8.1.4). Dies indiziert, dass die Umgebung des *bla*_{CTX-M} Gens in diesem Stamm anders ist. Insofern scheint sich dieser Stamm deutlich von den anderen *E. coli* ST131 zu unterscheiden. In dieser Hinsicht und vor dem Hintergrund der via Konjugation übertragbaren Cefotaximresistenz wäre es interessant sein Genom und vor allem auch die Plasmide zu sequenzieren.

5 Ausblick

Um hinsichtlich der Entwicklung der *E. coli* ST131 Linie weitere Erkenntnisse zu gewinnen, könnte die Genomsequenzierung einzelner Isolate wie z. B. von *E. coli* eo791 umfangreichere Daten, insbesondere auch über die Resistenzplasmide liefern. Seine Analyse lieferte eventuell Hinweise dazu, wie die Rekombination von Resistenzgenen ins Genom bei *E. coli* ST131 ablief und würde in Kombination mit den Literaturdaten eventuell zum Verständnis der Multiresistenzentwicklung beitragen. Andererseits liegt die bisher noch unbeantwortete Frage für *E. coli* ST131 eher darin, warum sich genau dieser Erreger so stark ausgebreitet und durchgesetzt hat (Pitout und Finn 2020). Dies zu ergründen ist auch für die Zukunft relevant, da bereits weitere Risikokeime an Relevanz gewinnen und auch zu erwarten ist, dass Erreger sich immer wieder weiterentwickeln und einige wenige besonders relevant werden. Ein solch neuer sich in jüngerer Zeit durchsetzender MDR Hochrisiko Klon ist *E. coli* ST1193, der in einigen Gebieten bereits stärker verbreiteter ist als *E. coli* ST131 und der quasi „in seine Fußstapfen tritt“ (Pitout *et al.* 2022). Diesen zu untersuchen wäre im Sinne der Resistenzüberwachung von höchstem Interesse. Auf solche aufkommenden Risikokeime, ihre Resistenzeigenschaften und Verbreitung sollte der Fokus in Zukunft gerichtet werden.

Die in dieser Arbeit in den *E. coli* ST131 Isolaten gefundenen und bisher nicht näher untersuchten Mutationen *acrR* fM1 und *ompR* A35D stellen einen spannenden Aspekt und Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar. Für sie stellt sich die Frage nach ihren generellen Auswirkungen und dem Einfluss auf die Resistenz, da die Produkte der betroffenen Gene in Bezug auf Antibiotikaresistenz regulatorisch relevant sind (vgl. Kap. 4.4.4 bis 4.4.6).

Die Resistenzplasmide betreffend, wäre weiterführend vorausschauend zu prüfen, ob *E. coli* ST131 diese auch auf andere MDR-Erreger von hoher klinischer Relevanz (vgl. Kap. 1.1.5) übertragen kann. Unter Aspekten der Resistenzüberwachung wäre dies zu untersuchen um Strategien dagegen zu entwickeln, da die Eindämmung der (Multi-) Resistenzentwicklung pathogener Bakterien im Kontext der Gesamtgesundheit aller essentielle Bedeutung hat (One Health 2023).

6 Experimenteller Teil (Material und Methoden)

6.1 Material

6.1.1 Bakterienstämme

6.1.1.1 Klinische Isolate

Die in dieser Arbeit untersuchten klinischen Isolate sind in Tabelle 6-1 aufgeführt.

Tabelle 6-1: Klinische Isolate mit ihren Speziesbezeichnungen, Stammnamen, interner Nummer (GK Nr.), Eigenschaften, Jahr der Isolation, Herkunft und Quelle

Spezies	Stamm	GK-Nr.	Eigenschaften	Jahr	Herkunft	Quelle
<i>E. coli</i>	eo32	2787	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo33	2788	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo36	2789	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo72	2790	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo147	2804	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo163	2806	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo165	2808	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo166	2809	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo167	2810	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo175	2811	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo220	2813	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo225	2815	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo249	2819	klinisches Isolat	2001	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo256	2820	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo267	2822	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo307	2826	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo309	2827	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo355	2832	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo357	2833	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo362	2834	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo370	2836	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo380	2838	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo393	2840	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo415	2842	klinisches Isolat	2002	England	BSAC

<i>E. coli</i>	eo417	2843	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo436	2845	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo450	2846	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo471	2850	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo499	2856	klinisches Isolat	2002	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo561	2861	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo576	2867	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo593	2874	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo608	2876	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo650	2878	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo658	2881	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo677	2882	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo681	2883	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo682	2884	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo704	2892	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo723	2897	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo731	2898	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo746	2900	klinisches Isolat	2003	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo753	2901	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo756	2902	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo760	2903	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo768	2904	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo769	2905	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo776	2907	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo778	2908	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo779	2909	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo780	2910	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo788	2912	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo791	2913	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo795	2914	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo804	2917	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo814	2918	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo823	2921	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo827	2922	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo871	2929	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo872	2930	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo886	2933	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo905	2936	klinisches Isolat	2004	England	BSAC

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

<i>E. coli</i>	eo909	2937	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo919	2938	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo920	2939	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo933	2942	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo942	2944	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo944	2945	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo948	2946	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo949	2947	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo951	2948	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo952	2949	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo953	2950	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo954	2951	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo977	2955	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo979	2956	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo988	2959	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo991	2960	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo994	2962	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	eo999	2964	klinisches Isolat	2004	England	BSAC
<i>E. coli</i>	QUC02	3425	hündisches Isolat	2008	Australien	J. Platell
<i>E. coli</i>	QU008	3437	humanes Isolat	2008	Australien	J. Platell
<i>E. coli</i>	QU015	3438	humanes Isolat	2008	Australien	J. Platell
<i>E. coli</i>	QU061	3441	humanes Isolat	2008	Australien	J. Platell
<i>E. coli</i>	QU102	3443	humanes Isolat	2008	Australien	J. Platell
<i>E. coli</i>	PEG-16-1-10	4415	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-1-20	4416	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-2-30	4417	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-2-39	4418	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-3-48	4419	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-3-58	4420	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-4-60	4421	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-4-70	4422	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-5-80	4423	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-7-20	4424	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-7-30	4425	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-8-40	4426	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-8-50	4427	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-9-10	4428	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-9-20	4429	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG

<i>E. coli</i>	PEG-16-10-20	4430	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-10-30	4431	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-11-50	4432	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-11-60	4433	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-15-65	4434	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-15-75	4435	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-16-81	4436	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-17-6	4437	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-17-16	4438	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-24-12	4439	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-24-22	4440	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-24-31	4441	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-34-30	4442	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-38-20	4443	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-38-30	4444	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-42-40	4445	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-42-49	4446	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-43-60	4447	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-43-70	4448	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-47-73	4449	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-47-81	4450	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-48-7	4451	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-52-4	4452	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-52-13	4453	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-52-23	4454	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-59-23	4455	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-59-31	4456	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-60-71	4457	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-60-81	4458	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-62-20	4459	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-62-30	4460	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-72-25	4461	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-72-35	4462	Urinkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-23-35	4463	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-23-40	4464	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-27-35	4465	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-27-37	4466	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-30-63	4467	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG

<i>E. coli</i>	PEG-16-30-72	4468	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-31-1	4469	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-31-3	4470	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-33-20	4471	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-33-21	4472	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-34-1	4473	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-34-8	4474	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-41-25	4475	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-41-26	4476	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-42-5	4477	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-42-6	4478	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-51-43	4479	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-55-30	4480	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-55-32	4481	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-58-20	4482	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-65-32	4483	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-65-64	4484	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-66-2	4485	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-66-11	4486	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-68-30	4487	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-68-32	4488	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-71-22	4489	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-75-45	4490	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-75-46	4491	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-76-26	4492	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-76-41	4493	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-78-54	4494	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-78-59	4495	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-79-14	4496	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-79-18	4497	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-81-42	4498	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-81-48	4499	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-84-28	4500	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-84-29	4501	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-85-1	4502	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-85-7	4503	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-88-24	4504	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-88-35	4505	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG

<i>E. coli</i>	PEG-16-93-80	4506	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-93-81	4507	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-94-1	4508	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-94-3	4509	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-99-15	4510	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-100-4	4511	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-101-31	4512	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG
<i>E. coli</i>	PEG-16-101-32	4513	Blutkulturisolat	2016	Deutschland	PEG

Referenzen: *E. coli* QU-Stämme (Platell *et al.* 2010); BSAC-Stämme (Reynolds *et al.* 2008; The British Society for Antimicrobial Chemotherapy 2023); PEG-Stämme: PEG-Resistenzstudie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Infektionstherapie e.V..

6.1.1.2 In dieser Arbeit entstandene Stämme

Die aus den Konjugationsversuchen hervorgegangenen Transkonjuganden (TK) sind in Tabelle 6-2 aufgeführt. Sie basieren alle auf *E. coli* SG22215 (vgl. Referenzstämme) und entstanden aus der Co-Inkubation mit dem *E. coli* ST131 Stamm eo791 (vgl. klinische Isolate).

Tabelle 6-2: In der Arbeit entstandene Transkonjuganden mit Stammhintergrund und Benennung, Beschreibung der Abstammung, Selektionsantibiotikum und Herkunft.

Stamm und TK-Nr.	TK-Beschreibung	Selektionsantibiotika	Herkunft
<i>E. coli</i> SG22215 TK-1	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Ampicillin 50 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-2	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Ampicillin 50 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-4	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Gentamicin 5 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-9	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Gentamicin 5 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-10	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Gentamicin 5 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit

<i>E. coli</i> SG22215 TK-14	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Gentamicin 5 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-20	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Gentamicin 5 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-23	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Cefotaxim 2 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-105	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Cefotaxim 2 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-109	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Cefotaxim 2 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> SG22215 TK-110	Transkonjugand von <i>E. coli</i> SG22215 mit <i>E. coli</i> eo791	Cefotaxim 2 µg/mL + Chloramphenicol 30 µg/mL	Diese Arbeit

6.1.1.3 Referenzstämme

In der Literatur beschriebene Stämme, die in der Arbeit verwendet und als Referenzen genutzt wurden sind im Folgenden in Tabelle 6-3 aufgeführt.

Tabelle 6-3: Referenzstämme mit ihrer Bezeichnung, GK-Nr., ihren Eigenschaften, Verwendungszwecken und Referenzen

Stamm	GK-Nr.	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> ATCC 8739	737	<i>Escherichia coli</i> Referenzstamm	Kontrollstamm non ST131	(<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers - 8739 ATCC 2022)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1114	<i>Escherichia coli</i> Referenzstamm für Antibiotika-Sensibilitätstests	Kontrollstamm bei MHK-Bestimmung	(<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers - 25922 ATCC 2022)

<i>E. coli</i> ATCC 35218	1113	<i>Escherichia coli</i> Referenzstamm für β-Lactam-Antibiotika- Sensibilitätstestungen	Kontrollstamm bei MHK- Bestimmung	(<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers - 35218 ATCC 2022)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	1237; 3302	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (rB ⁻ mB ⁻) gal <i>dcm</i> (DE3)	Laborstamm	Novagen; M.Abu Mraheil
<i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>omp3</i>	3923	<i>E. coli</i> BL21(DE3), Δ <i>lamB</i> , <i>ompF::Tn5</i>	Referenz, OmpF-defekt	(Prilipov <i>et al.</i> 1998)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>omp6</i>	3924	<i>E. coli</i> BL21(DE3,) Δ <i>lamB</i> , Δ <i>ompC</i>	Referenz, OmpC-defekt	(Prilipov <i>et al.</i> 1998)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>omp8</i>	3925	<i>E. coli</i> BL21(DE3), Δ <i>lamB</i> , <i>ompF::Tn5</i> , Δ <i>ompC</i> (<i>omp8</i>)	Referenz, OmpC-, OmpF-defekt	(Prilipov <i>et al.</i> 1998)
<i>E. coli</i> C600S	269	K-12 Stamm ohne Plasmide	Referenz	Labstock P. Heisig
<i>E. coli</i> C600S pRP1H	191	K-12 Stamm mit Plasmid pRP1H (61 kbp)	Plasmid- pRP1H	Labstock P. Heisig
<i>E. coli</i> C600SN pRP1H pBP507	538	K-12 Stamm mit Plasmiden pRP1H (61 kbp) und pBP507 (9,2 kbp)	Plasmid pRP1H, pBP507	Labstock P. Heisig
<i>E. coli</i> CFT073	3495	genomsequenziertes klinisches <i>E. coli</i> Isolat (UPEC) (NCBI Ref.-Seq.: NC_004431) GenBank accession no. AE014075.1	Referenz, Analyse, Primerdesign	(Welch <i>et al.</i> 2002)
<i>E. coli</i> JF 568	1154	Ausgangsstamm für JF 701 und JF 703	Referenz	(Foulds und Chai 1979)
<i>E. coli</i> JF 701	274	Von JF 568 ausgehend, isogen (OmpC ⁻)	Referenz OmpC-defekt	(Foulds und Chai 1979)
<i>E. coli</i> JF 703	275	Von JF 568 ausgehend, isogen (OmpF ⁻)	Referenz OmpF-defekt	(Foulds und Chai 1979)
<i>E. coli</i> MG1655	2110	genomsequenzierter <i>E. coli</i> K-12 Stamm (NCBI Ref.-Seq.: NC_000913.3) GenBank accession no. U00096.2	Referenz, <i>E. coli</i> Genom, Annotierung, NGS-Analyse	(Blattner <i>et al.</i> 1997)

<i>E. coli</i> SG22215	4260	<i>clpP::cat (clmR), lac,</i>	Rezipient für Konjugation	(Hoskins <i>et al.</i> 2000)
<i>E. coli</i> V517	1217	<i>E. coli</i> Stamm, mit 8 definierten Plasmiden	Referenz für Plasmide	(Macrina <i>et al.</i> 1978)
<i>E. coli</i> M1	3217 BT106	<i>E. coli</i> Stamm mit CTX-M-1 (CTX-M Gruppe-1)	Referenz für <i>bla</i> _{CTX-M-1}	Dr. Irith Wiegand, Bonn
<i>E. coli</i> E2	3218 BT107	<i>E. coli</i> Stamm mit CTX-M-2 (CTX-M Gruppe-2)	Referenz für <i>bla</i> _{CTX-M-2}	Dr. Irith Wiegand, Bonn
<i>E. coli</i> E3	3730, BT108	<i>E. coli</i> Stamm mit CTX-M-15 (CTX-M Gruppe-1)	Referenz für <i>bla</i> _{CTX-M-15}	Dr. Irith Wiegand, Bonn
<i>E. coli</i> E6	BT109	<i>E. coli</i> Stamm mit CTX-M-27 (CTX-M Gruppe-9)	Referenz für <i>bla</i> _{CTX-M-27}	Dr. Irith Wiegand, Bonn
<i>E. coli</i> M8	BT112	<i>E. coli</i> Stamm mit CTX-M-8 (CTX-M Gruppe-8)	Referenz für <i>bla</i> _{CTX-M-8}	Dr. N. Woodford London
<i>E. coli</i> M25/26	BT113	<i>E. coli</i> Stamm mit CTX-M-Gr. 25/26 (CTX-M Gruppe-25/26)	Referenz für <i>bla</i> _{CTX-M-Gr.25/26}	Dr. N. Woodford London
<i>E. coli</i> W3110	3214	<i>Escherichia coli</i> K-12 Derivat mit TEM-1 β -Lactamase	Referenz für <i>bla</i> _{TEM-1}	Dr. Irith Wiegand, Bonn
<i>E. coli</i> WT	571	Wildtyp <i>Escherichia coli</i> Isolat	Wildtyp-Referenz	(Heisig und Tschorny 1994)
<i>E. coli</i> XL1-blue pBP507	1060	<i>Escherichia coli</i> K12 Stamm mit pBP507 (9,2 kbp)	Plasmid pBP507	Stratagene
<i>K. Pneumonie</i> ATCC 700603	2451	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolat mit SHV-18 β -Lactamase	Referenz für <i>bla</i> _{SHV-18}	Microbiologics
<i>K. Pneumonie</i> 14	BT006	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolat mit SHV-5 und TEM-1b	Referenz für <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{TEM}	Dr. Irith Wiegand, Bonn
<i>K. Pneumonie</i> NRZ-00103	3699	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolat mit KPC-2-Typ Carbapenemase	Referenz für <i>bla</i> _{KPC-2}	(Kaase 2012), NRZ, RUB

6.1.1.4 *E. coli* ST131 Referenzstämme und Sequenzen

E. coli ST131 Isolate, die als Referenz, zum Vergleich oder als Vorlage bei der Bestimmung des *E. coli* Sequence Type 131 verwendet wurden und deren Sequenzen in der NCBI Datenbank verfügbar waren, sind in Tabelle 6-4 aufgeführt.

Tabelle 6-4: Sequenzbasiert betrachtete *E. coli* ST131 Stämme der Literatur (*E. coli* ST131 Referenzstämme)

Stamm	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> SE15	<i>E. coli</i> ST131 Isolat (<i>E. coli</i> B2-ST131 clade A) GenBank accession no. AP009378 (Chromosom) und AP009379 (Plasmid)	Sequenzbasierte Analyse der Resistenzfaktoren und Plasmide	(Toh <i>et al.</i> 2010)
<i>E. coli</i> NA114	<i>E. coli</i> ST131 Isolat (<i>E. coli</i> B2-ST131-H30 clade C, FQ ^r , ESBL: <i>bla</i> _{CTX-M-15}) GenBank accession no. CP002797 und MIPU00000000.1 (WGS)	Referenz für MLST- und NGS-Sequenz, Analyse der Resistenzfaktoren und Plasmide	(Avasthi <i>et al.</i> 2011)
<i>E. coli</i> EC958	<i>E. coli</i> ST131 Isolat aus 2005 (<i>E. coli</i> B2- O25b:H4-ST131-H30 clade C, FQ ^r , ESBL: <i>bla</i> _{CTX-M-15}) European Nucleotide Archive (ENA) accession no. HG941718 (Chromosom), HG941719 und HG941720 (2 Plasmide)	Referenzstamm für sequenzbasierte Untersuchungen, NGS, Analyse der Resistenzfaktoren und Plasmide	(Forde <i>et al.</i> 2014)
<i>E. coli</i> JJ1886	<i>E. coli</i> ST131 Isolat aus 2007 (<i>E. coli</i> B2-ST131-H30-Rx clade C, FQ ^r , ESBL: <i>bla</i> _{CTX-M-15}). Assoziiert mit JJ1887 GenBank accession no. CP006784 (Chromosom), CP006785, CP006786, CP006787, CP006788 und CP006789 (5 Plasmide)	Referenz für MLST- Typisierung und NGS- Sequenzierung, Analyse der Resistenzfaktoren und Plasmide	(Andersen <i>et al.</i> 2013)
<i>E. coli</i> JJ1887	<i>E. coli</i> ST131 Isolat aus 2007 (<i>E. coli</i> B2-ST131-H30-Rx FQ ^r , ESBL: <i>bla</i> _{CTX-M-15}). Assoziiert mit JJ1886 GenBank accession no. CP014316 (Chromosom), CP014317,	Referenz für MLST- und NGS-Sequenz, Analyse der Resistenzfaktoren und Plasmide	(Johnson <i>et al.</i> 2016a)

	CP014318, CP014319, CP014320 und CP014321 (5 Plasmide)		
<i>E. coli</i> MNCRE44	<i>E. coli</i> ST131 Isolat aus 2012 (<i>E. coli</i> B2-ST131-H30-R, FQ ^r , Carbapenem ^R : <i>bla</i> _{OXA-9} <i>bla</i> _{KPC-3}) GenBank accession no. CP010876 (Chromosom), CP010877, CP010878, CP010879, CP010880, CP010881, CP010882 (6 Plasmide)	Sequenzbasierte Analyse der Resistenzfaktoren und Plasmide	(Johnson <i>et al.</i> 2015)

6.1.2 Oligonukleotide

Die in der Arbeit als Primer verwendeten Oligonukleotide sind mit ihrer Bezeichnung, Sequenz, Länge, Verwendung und Referenzen in Tabelle 6-5 aufgeführt. Umbenannte Primer sind zusätzlich mit ihrer ursprünglichen Bezeichnung [Originalname] in eckigen Klammern angeführt. Die Oligonukleotide lagen in einer Stammlösung von 100 pmol/μL vor und wurden, wenn nicht anders angegeben in einer Konzentration von 10 pmol/μL verwendet.

Tabelle 6-5: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	N [bp]	Verwendung	Referenz
AceK_f_Eco [AceK.f]	AACGCTATTCGCCA GCTTGC	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
acrA_[acrA_BOXdel fw_5 -161]_5'_-161_E.coli	AGAAGCGCAAGAA ACGCGCCAACACAT CCTCGATGTGGC	39	MLST Target-PCR Sequenzierung	(Anhorn 2017)
acrR_[acr_Seq1]_3'_+126_SalTyph	GCCAGCAGCGTTCCG CAATCT	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	(Schmidt 2007)
acrR_[acrR1]_3'_+728_EcoK12	CCGCAAGAATATCA CGACGC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	(Matthiesse n 2007)
acrR_[ACRR2a2]_EcoK12	GTCGTCACATCCTG TTAGG	19	MLST Target-PCR Sequenzierung	(Matthiesse n 2007)
acrR_[acrR2b]_EcoK12	GGACACTCGAGGTT TACAT	19	MLST Target-PCR Sequenzierung	(Matthiesse n 2007)
adk_3_593_Eco_MG165 5 [adk R]	CCGTCAACTTTCGC GTATTT	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
adk_3_628_Eco_MG165 5 [adk R1]	CCAGATCAGCGCG AACTTCA	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)

adk_5_10_Eco_MG1655 [adk F]	ATTCTGCTTGGCGC TCCGGG	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
adk_5_138_Eco_MG165 5 [adk F1]	TCATCATCTGCACTT TCCGC	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
ArpA1_r_Eco [ArpA1.r]	TCTCCCCATACCGT ACGCTA	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
ArpAgpE_f_Eco [ArpAgpE.f]	GATTCCATCTTGTC AAAATATGCC	24	Phylotyping nach Clermont revisited	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
ArpAgpE_r_Eco [ArpAgpE.r]	GAAAAGAAAAAGA ATTCCCAAGAG	24	Phylotyping nach Clermont revisited	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
chuA_3+523_Eco [ChuA.2]	TGCCGCCAGTACCA AAGACA	20	Phylotyping nach Clermont 2000 und 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2000)
chuA_5_+245_Eco [ChuA.1]	GACGAACCAACGG TCAGGAT	20	Phylotyping nach Clermont 2000	(Clermont <i>et al.</i> 2000)
chuA_1b_Eco [chuA.1b]	ATGGTACCGGACG AACCAAC	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
clpP_3_592_MG1655	GACCGTATTCCACC GCTTCA	20	PCR <i>clpP</i>	Diese Arbeit
clpP_5_5_MG1655	CATACAGCGGCGA ACGAGAT	20	PCR <i>clpP</i>	Diese Arbeit
ctx-m15_3+899_Eco	GTTTCCCCATTCCG TTTCCG	20	CTX-M-PCR, Sequenzierung	Diese Arbeit
ctx-m15_5+-66_Eco	ACACACGTGGAATT TAGGGACTA	23	CTX-M-PCR, Sequenzierung	Diese Arbeit
ctxM_[CTX-M- Uni_fwd]_[CTX-MU1]_5'	ATGTGCAGYACCAG TAARGT	20	CTX-M-Primer	(Pagani <i>et al.</i> 2003)
ctxM_[CTX-M- Uni_rev]_[CTX-MU2]_3'	TGGGTRAARTARGET SACCAGA	21	CTX-M-Primer	(Pagani <i>et al.</i> 2003)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 1 PCR-F]_5'	AAAAATCACTGCGC CAGTTC	20	Primer CTX-M Gruppe 1	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 1 PCR-R]_3'	AGCTTATTCATCGC CACGTT	20	Primer CTX-M Gruppe 1	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 2 PCR-F]_5'	CGACGCTACCCCTG CTATT	19	Primer CTX-M Gruppe 2	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 2 PCR-R]_3'	CCAGCGTCAGATTT TTCAGG	20	Primer CTX-M Gruppe 2	(Woodford <i>et al.</i> 2006)

ct-m_[CTX-M Gruppe 8 PCR-F]_5'	TCGCGTTAAGCGGA TGATGC	20	Primer CTX-M Gruppe 8	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 8/25 PCR-R]_3'	AACCCACGATGTGG GTAGC	19	Primer CTX-M Gruppe 8 und 25	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 9 PCR-F]_5'	CAAAGAGAGTGCA ACGGATG	20	Primer CTX-M Gruppe 9	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 9 PCR-R]_3'	ATTGGAAAGCGTTC ATCACC	20	Primer CTX-M Gruppe 9	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
ctx-m_[CTX-M Gruppe 25 PCR-F]_5'	GCACGATGACATTC GGG	17	Primer CTX-M Gruppe 25	(Woodford <i>et al.</i> 2006)
dinB_3_703_EcoB	TAACGTCGCGTTCG TCAATG	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
dinB_5_-14_EcoB	TTGAGAGGTGAGC AATGCGT	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
envZ_3_+1448_EcoB	GGCTGGTCCGAAG CTGTAAT	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
envZ_3_+379_Eco	TAACCTCGACGCGA ACTTCC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
envZ_5_238_EcoB	ATCTACCGTGAGCT GGGGAT	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
fumC_5_47_Eco_MG165 5 [fumC R1]	TCCCGGCAGATAAG CTGTGG	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
fumC_5_815_Eco_MG16 55 [fumC R]	GTACGCAGCGAAA AAGATTC	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
fumC_3_10_Eco_MG165 5 [fumC F]	TCACAGGTCGCCAG CGCTTC	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
gyrA_[gyrA 5-1]_5'_-35_EcoK12	CCGAATTCGGGATA CAGTAGAGGGATA GC	29	<i>gyrA</i> PCR, <i>gyrA-pabB</i> Duplex-PCR	P. Heisig, (nach Heisig <i>et al.</i> 1993)
gyrA_[gyrA 3-1]_3'_+491_EcoK12	GGAATTTTGGTTGG CATGACGTCCGGA	27	<i>gyrA</i> PCR, <i>gyrA-pabB</i> Duplex-PCR	(Heisig <i>et al.</i> 1993)
gyrB_3_894_Eco_MG165 5 [gyrB R1]	GTCCATGTAGGCGT TCAGGG	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
gyrB_3_959_Eco_MG165 5 [gyrB R]	ATCAGGCCTTCACG CGCATC	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
gyrB_5_80_Eco_MG1655 [gyrB F]	TCGGCGACACGGA TGACGGC	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)

icd_3_878_Eco_MG1655 [icd R]	GGACGCAGCAGGA TCTGTT	19	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
icd_5_1_Eco_MG1655 [icd F]	ATGGAAAGTAAAG TAGTTGTTCCGGCA CA	29	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
icdA_3_1232_EcoB	GCGTCACCAAACCTC TGAACATTTTC	24	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
icdA_5_479_EcoB	ATGCGGGTATCGA ATGGAAAGC	22	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
marA_[mar5]_5'+111_ EcoK12	CTCCAAATGGCACC TGCAACGG	22	MLST Target-PCR Sequenzierung	A. Schulte
marA_[marA 5'+2]_5' +2_Eco	TGTCCAGACGCAAT ACTGAC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	A. Danschke AG Heisig
marB_[marA 3'+492]_3' +492_Eco	TGCGTGGTTTGTTTC CGCAAC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	A. Danschke AG Heisig
marR_[3R4]_3'+715_ Eco	ACTCGAAGCCATAT CGTTCT	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	P. Heisig
marR_[mar175- 1]_5'+98_EcoK12	TGTCTCCGCTGGAT ATTACCGC	22	MLST Target-PCR Sequenzierung	A. Schulte
marR_[marR -17 rev WT]_3'-17_EcoWT	TCATACCTCTTTTTT GTTTACGGC	24	MLST Target-PCR Sequenzierung	(Arntjen 2011)
marR_[marR 5R3]_5'- 277_EcoK12	ATCTAACATTGGTG GTTGTTATCCTG	26	MLST Target-PCR Sequenzierung	P. Heisig
marR_[marR_for(RT)]_5' +272_SalTyph	ATGACAAACGCGG CGTACT	19	MLST Target-PCR Sequenzierung	(Schmidt 2007)
mdh_3_875_Eco_MG165 5 [mdh F1]	AGCGCGTTCTGTTC AAATGC	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
mdh_5_77_Eco_MG1655 [mdh R1]	CAGGTTCAGAACTC TCTCTGT	21	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
ompC_[ompC Gram neg 3_+1197]_3'+1197	GAACGGTCGCAAG AGTACAC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Carstens
ompC_[ompC Gram neg 5_-654]]_5'-654	GATGATTCTCTATT CTCCCGTG	22	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Carstens
ompC_[ompC Gram neg 5'+31]_5'+31	CAGCTCTGCTGGTA GCAG	18	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Carstens
ompC_[ompC Gram neg 5'+451]]_5'+451	CCTACCGTAACACT GACTTC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Carstens

ompC_3'_+711_EcoK12	CCAGTGTAGGTTTC AGCACGG	21	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
ompC_3_711_EcoK12	CCAGTGTAGGTTTC AGCACGG	21	PCR-Primer <i>ompC</i>	Diese Arbeit
ompF_[ompF E.coli 5Ž- 161]_5'_-161_Eco	TGTAGCACTTTCAC GGTAGCG	21	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Carstens
ompF_[ompF_A]_3_+50 2_EcoK12]_3'_+502_Eco	CCAAAGAAGTTGG AGTTACG	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Bahr
ompF_[ompF_ [ompF_B]_5_+441_EcoK 12]_5'_+441_EcoK12	CGATGACTTCTTCG TTGGTC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Bahr
ompF_[ompF_[ompF_B] _3_+1347_EcoK12]_3'_+ 1347_EcoK12	CGTTCATCGGCACG AAACAG	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	K. Bahr
ompF_3_683_EcoB	CCAAGGGGAGACT CTTCCTGC	21	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
ompF_3_724_EcoB	ACTTCAGACCAGTA GCCCAC	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
ompF_5_-52_EcoB	CAGAAACAAAATTT GGCAGGTGT	23	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
ompF_5_624_EcoK12	TATCGTTGGTGCTT ATGGT	19	PCR-Primer <i>ompF</i>	Diese Arbeit
ompF_5_-87_EcoB	AAGAAGATTTTGTG CCCGGTCG	22	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
ompR_3_+715_EcoCFT0 73	CTTTAGAACCGTCC GGTACAA	21	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
ompR_5_+1_EcoCFT073	ATGCAAGAGAACT ACAAGATTC	22	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
ompR_5_-70_Eco	TGGTGACGAACGT GAGCTTT	20	MLST Target-PCR Sequenzierung	Diese Arbeit
pabB_3_1151_EcoB	TAATGGTAGTCAGC GTGCGGATAGT	25	MLST nach Pasteur Schema	Diese Arbeit
pabB_5_418_EcoB	CAATTCTCCCCGCA GGAAGATTC	24	MLST nach Pasteur Schema	Diese Arbeit
pabB_Eco_248_5 [O25pabBspe.F]	TCCAGCAGGTGCTG GATCGT	20	<i>trpA-pabB</i> -Duplex- PCR	(Clermont <i>et al.</i> 2009)
pabB_Eco_248'_2_5	TCCAGCAGGTGCTG GATCGTC	21	<i>trpA-/gyrA-pabB</i> - Duplex-PCR	Diese Arbeit

pabB_Eco_594_3 [O25pabBspe.R]	GCGAAATTTTCGC CGTACTGT	22	<i>trpA-pabB</i> -Duplex-PCR	(Clermont <i>et al.</i> 2009)
pabB_Eco_595_3	GGCGAAATTTTCG CCGTACTGTT	24	<i>trpA-/gyrA-pabB</i> -Duplex-PCR	Diese Arbeit
pabB_pyro-SNP_267 [pabB_5_251_Seq_Eco]	AGCAGGTGCTGGA TC	15	<i>pabB</i> SNP Pos.267 Pyrosequencing®	Diese Arbeit
pabB_pyro-SNP_573 [pabB_5_553_Seq_Eco]	AATCCAATATGACC CG	16	<i>pabB</i> SNP Pos.573 Pyrosequencing®	Diese Arbeit
pabBAssay1fw_223 [pabB_5_223_Eco]	ACCACTGATGACCC GCTACA	20	<i>pabB</i> PCR für Pyrosequencing®	Diese Arbeit
pabBAssay1a_630_rv- Biotin[pabB_3_630_ Biotin_Eco]	Biotin- ATAGCAATCACCGC TGTGCA	20	<i>pabB</i> PCR für Pyrosequencing®	Diese Arbeit
parC_[parC U]_3_+373	ACCGGGATTCGGT GTAACGCATTGC	25	<i>parC</i> PCR, RP-MLST	(Heisig 1996)
parC_S_[parC S]_5_+138	GTATGCGATGTCTG AACTGGGCCTG	23	<i>parC</i> PCR, RP-MLST	(Heisig 1996)
polB_3_1814_EcoB	GTTGGCATCAGAAA ACGGCA	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
polB_3_1875_EcoB	GTCGCCCTCCTGAA TCAGTCCGGC	24	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
polB_5_1012_EcoB	CTGGTGACGCAGAT CTTCCA	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
polB_5_1057_EcoB	CTCGAACGGGCGA CGGTGAACGGC	24	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
purA_3_1050_Eco_MG1 655 [purA R]	CATACGGTAAGCCA CGCAGA	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
purA_5_206_Eco_MG16 55 [purA F1]	TCGGTAACGGTGTT GTGCTG	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
purA_5_234_Eco_MG16 55 [purA F]	CGCGCTGATGAAA GAGATGA	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
putP_3_1464_EcoB	AGCCGAATGATAGT GCGCATCG	22	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
putP_3_1492_EcoB	CTTACCCTTCCTGCA ACCGT	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
putP_5_693_EcoB	CATTATCTCGCTGA TGGGTTGGG	23	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit

putP_5_750_EcoB	GCGTTTTATGGCGG CAGATT	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
recA_3_888_Eco_MG165 5 [recA F1]	ACCTTTGTAGCTGT ACCACG	20	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
recA_3_918_Eco_MG165 5 [recA F]	CGCATTCGCTTTAC CCTGACC	21	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
recA_5_185_Eco_MG165 5 [recA R]	TCGTGAAATCTAC GGACCGGA	22	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
recA_5_254_Eco_MG165 5 [recA R1]	AGCGTGAAGGTAA AACCTGTG	21	MLST (Achtman)	(Wirth <i>et al.</i> 2006)
shv_[SHV total PCR-F]/ [SHV duplex PCR-F] _5'_+11_Eco	TTCGCCTGTGTATT ATCTCCC	21	TEM-SHV duplex- PCR	(Timmerbeil 2007)
shv_[SHV total PCR-R]/ [SHV duplex PCR-R]_ 3'_+756_Eco	CTCTGCTTTGTTATT CGGGC	20	TEM-SHV duplex- PCR	(Timmerbeil 2007)
tem_[TEM total PCR- F]/[TEM duplex PCR- F]_5'_+16_Eco	TTTCGTGTCGCCCT TATCCC	21	Primer TEM-SHV duplex-PCR	(Timmerbeil 2007)
tem_[TEM duplex PCR- R]/[TEM total PCR-R]_3'	GCTTAATCAGTGAG GCACCT	20	Primer TEM-SHV duplex-PCR	(Timmerbeil 2007)
trpA_3_795_EcoB	AGTGGCTTTCATCG GTTGTACAAAA	25	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
trpA_5_41_EcoB	GTTTGCCCAGTTGA AGGAGCG	21	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
trpA_Eco_433_3 [trpA2.R]	GCAACGCGGCCTG GCGGAAG	20	<i>trpA-pabB</i> -Duplex- PCR	(Clermont <i>et al.</i> 2009)
trpA_Eco_8_5 [trpA.F]	GCTACGAATCTCTG TTTGCC	20	<i>trpA-pabB</i> -Duplex- PCR	(Clermont <i>et al.</i> 2009)
trpAgpC_1_Eco [trpAgpC.1]	AGTTTTATGCCAG TGCGAG	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
trpAgpC_2_Eco [trpAgpC.2]	TCTGCGCCGTCAC GCC	18	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
trpB_3_1215_EcoB	ACAGAGATTCGTAG CGTTCCAT	22	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
trpB_3_1274_EcoB	ATCACCGAGGGTG ACGAAAG	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit

trpB_5_429_EcoB	GCCTAACGTTTTCC GGATGC	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
trpB_5_464_EcoB	AAGTGATCCCGGTG CATAGC	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
trpBA.r [trpBA.r]	GCAACGCGGCCTG GCGGAAG	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
trpBA_f_Eco [trpBA.f]	CGGCGATAAAGAC ATCTTAC	21	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
tsp_5_fw_Eco [TspE4C2.1]	GAGTAATGTCGGG GCATTCA	20	Phylotyping nach Clermont 2000	(Clermont <i>et al.</i> 2000)
tsp_3_rv_Eco [TspE4C2.2]	CGCGCCAACAAAGT ATTACG	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2000)
TspE4C2.1b_Eco [TspE4C2.1b]	CACTATTCGTAAGG TCATCC	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
TspE4C2.2b_Eco [TspE4C2.2b]	AGTTTATCGCTGCG GGTCGC	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
uidA_3_1001_EcoB	GCGTAAGGGTAAT GCGAGGT	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
uidA_5_239_EcoB	CGGGCCAGCGTATT GTACTG	20	MLST nach Pasteur	Diese Arbeit
yjaA_5_+66_fw_EcoK12 [YjaA.1]	TGAAGTGTCAGGA GACGCTG	20	Phylotyping nach Clermont 2000	(Clermont <i>et al.</i> 2000)
yjaA_3_+276_rev_EcoK1 2 [YjaA.2]	ATGGAGAATGCGTT CCTCAAC	21	Phylotyping nach Clermont 2000	(Clermont <i>et al.</i> 2000)
yjaA_1b_Eco [yjaA.1b]	CAAACGTGAAGTGT CAGGAG	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
yjaA_2b_Eco [yjaA.2b]	AATGCGTTCCTCAA CCTGTG	20	Phylotyping nach Clermont 2012	(Clermont <i>et al.</i> 2012)
recA_[recA959R] 5'_+104_EcoK12	CCATGGATGTGGA AACCATCTC	22	PCR-Primer für MLST Fragmente	(Grüger 2004)

6.1.3 Größenstandards

6.1.3.1 Größenstandards für DNA

Zur Einschätzung der Größe von DNA-Fragmenten nach Auftrennung im Agarosegel wurden die in Tabelle 6-6 aufgelisteten DNA-Leitern als Größenstandards verwendet. Sie wurden stets

neben den Proben als Referenz aufgetragen. Weiterhin wurde für die Proben stets eine beschwerende Ladelösung (*Loading Dye*) verwendet, die Farbstoffe definierter Größe enthält, welche es ermöglichen die Auftrennung während der Elektrophorese zu verfolgen.

Tabelle 6-6: DNA-Leitern (*Ladder*) und Lade-Lösungen (*Loading Dye*), mit ihren Fragmentgrößen und Herstellern

DNA-Leiter (<i>Ladder</i>) / Marker- und Ladelösungen (<i>Loading Dye</i>)	Größenbereiche und Bandengrößen	Hersteller
DNA Loading Dye	ca. 300 bp und ca. 4000 bp	Eigene Herstellung
6X DNA Loading Dye	ca. 300 bp und ca. 4000 bp	Thermo Scientific
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	50 bp - 1.000 bp (Bandengrößen: 50, 100, 150, 200, 250 , 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900, 1000)	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	100 bp - 1.000 bp (Bandengrößen: 100, 200, 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900, 1000)	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (kurz: Ladder/L 100 bp plus, L 100 bp+, oder L 100 bp ⁺)	100 bp - 3.000 bp (Bandengrößen: 100, 200, 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900, 1000 , 1200, 1500, 2000, 3000)	Thermo Scientific
GeneRuler 1kb DNA Ladder	250 bp - 10.000 bp (Bandengrößen: 250, 500, 750, 1000 , 1500, 2000, 2500, 3000 , 3500, 4000, 5000, 6000 , 8000, 10.000)	Thermo Scientific
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (kurz: Ladder/L 1 kb plus, L 1 kb+/ ⁺)	75 bp - 20.000 bp (Bandengrößen: 75, 200, 300, 400, 500 , 700, 1000, 1500 , 2000, 3000, 4000, 5000 , 7000, 10.000, 20.000)	Thermo Scientific
O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	100 bp - 3.000 bp (Bandengrößen: wie beim 100 bp plus))	Thermo Scientific
6X Orange DNA Loading Dye	ca. 50 bp und ca. 4000 bp	Thermo Scientific

6.1.3.2 Größenstandards für Zellsuspensionen

Für die Einstellung einer Bakteriensuspension anhand der optischen Trübung wurde ein McFarland-Standard, in der Regel McFarland Standard 0,5 der Firma bioMérieux verwendet. Die McFarland-Standards sind folgend in Tabelle 6-7 aufgeführt (bioMérieux).

Tabelle 6-7: McFarland Standards und ihre entsprechenden Zelldichten für E. coli

McFarland Standard Nr.	0,5	1	2	3	4	5
Zellen pro mL	$1,5 \times 10^8$	3×10^8	6×10^8	9×10^8	12×10^8	15×10^8
OD ₅₅₀	0,125	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25

6.1.4 Wasser, Lösungen und Puffer

6.1.4.1 Wasser

In der Arbeit verwendetes Wasser ist in Tabelle 6-8 aufgeführt.

Tabelle 6-8: Verwendetes Wasser mit Kategorie, Erzeugung und Anbieter

Wasser	Kategorie	Anlage/Abfüllung	Anbieter
Millipore® Wasser	RO-Wasser (Typ III)	Millipore® RiOs™	Merck
Milli-Q® Wasser	Reinstwasser (Typ I)	Milli-Q®-Anlage	Merck
LiChrosolv® Wasser	Hochreines Wasser (LC-MS Grade)	Direktbezug in Flaschen	Merck

6.1.4.2 Lösungen und Puffer

Die in der Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind in mit ihren Zusammensetzungen in Tabelle 6-9 dargestellt.

Tabelle 6-9: Lösungen, Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anbieter/Quelle
6x Loading Dye	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM EDTA, 0.03 % Bromophenolblau, 0.03 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerol	Thermo Scientific
AE-Puffer (1:10)	AE-Puffer (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen) 1:10 verdünnt in H ₂ O	eigene Herstellung

ATL-/ AL-/ AW-1-/ AW-2-/ und AE-Puffer	DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen
dNTPs	100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP, in H ₂ O	aus Thermo Scientific dNTP-Set
EB-Puffer (1:10)	EB-Puffer (Qiagen) 1:10 verdünnt in H ₂ O	eigene Herstellung
EDTA-Lösung 0,1 M	0,1 M EDTA, H ₂ O, NaOH (pH 7,0)	eigene Herstellung
EDTA-Lösung 0,5 M	1 mL EDTA-Lösung (5 M), 9 mL H ₂ O	eigene Herstellung
EDTA-Lösung 5 M	5 M EDTA, H ₂ O, (pH 8,0)	eigene Herstellung
Ethanol 70 % (V/V)	7 Teile abs. Ethanol, 3 Teile Wasser	eigene Herstellung
Glucose-Lösung 1 M	1 M Glucose in H ₂ O, autoklaviert	eigene Herstellung
Glykogen	20mg/mL in H ₂ O	
GTE-Puffer	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 200µg/mL RNase, in H ₂ O	eigene Herstellung
HEPES-Puffer	10mM HEPES in H ₂ O; pH 7,4	eigene Herstellung
Isopropanol 70 % (V/V)	7 Teile abs. Isopropanol, 3 Teile Wasser	eigene Herstellung
Kaliumacetatlösung 5 M	5 M Kalium-Acetat, H ₂ O	eigene Herstellung
Kochsalzlösung 0,9 %, steril	9 g NaCl ad 1 L H ₂ O _{Millipore} , autoklaviert	eigene Herstellung
Low-TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, in H ₂ O; pH: 8,0	eigene Herstellung
Lysepuffer	0,2 M NaOH, 1%SDS in H ₂ O	eigene Herstellung
Magnesiumchloridlösung	50 mM MgCl ₂ , H ₂ O	Thermo Scientific
NaCl-Lösung 1 M	1 M NaCl in H ₂ O	eigene Herstellung
Natriumacetatlösung 3 M	3 M Natrium-Acetat, H ₂ O	eigene Herstellung
Natriumhydroxidlösung 0,2 M	0,2 M NaOH, H ₂ O	eigene Herstellung
Natriumsarkosylatlösung 2 %	2g Natriumsarkosylat, 100 mL HEPES- Puffer	eigene Herstellung
Natriumhydroxidlösung 1 M	1 M NaOH, H ₂ O	eigene Herstellung
Neutralisationspuffer	3 M Ka-Acetat in H ₂ O, Eisessig; pH 4,8	eigene Herstellung
PBI-/, PE-/ und EB-Puffer	aus QIAquick PCR Cleanup Kit	Qiagen
PBS-Puffer	0,58 M Na ₂ HPO ₄ ; 0,17 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,68 M NaCl, in H ₂ O; pH 7,4	eigene Herstellung
Proben-Ladelösung für Agarosegele	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen- cyanol, 15 % Polysucrose in H ₂ O	eigene Herstellung
PyroMark® Annealing Buffer	20 mM Tris, 2 mM Mg-Acetat, in H ₂ O, mit Eisessig pH 7,6 einstellen	Qiagen®

PyroMark® Binding Buffer	10 mM Tris, 2 NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Tween 20, in H ₂ O, mit HCl ad pH 7,6	Qiagen®
QG-/ , PE-/ und EB-Puffer	aus QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen®
Salzsäure 0,1 M	100 mM Salzsäure, H ₂ O	eigene Herstellung
Salzsäure 1 M	1 M Salzsäure, H ₂ O	eigene Herstellung
SDS-Lösung 10 %	10 g H ₂ O ad 100 mL	eigene Herstellung
STE-Puffer	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, in H ₂ O	eigene Herstellung
TAE(TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Acetat 1 mM EDTA, in H ₂ O; pH 8	eigene Herstellung
TAE-Puffer 0,5 x	20 mM Tris, 10 mM Acetat 0,5 mM EDTA, in H ₂ O; pH 8	eigene Herstellung
TAE-Puffer 50 x	2 M Tris, 1 M Acetat, 50 mM EDTA, in H ₂ O; pH 8 mit Eisessig eingestellt	eigene Herstellung
TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borat, 2 mM EDTA, in H ₂ O	eigene Herstellung
TBE-Puffer 10 x	0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20mM EDTA, in H ₂ O	eigene Herstellung
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, in H ₂ O; pH 8,0	eigene Herstellung
TE-Puffer (1:10)	TE-Puffer 1:10 verdünnt in H ₂ O	eigene Herstellung
Tris-Puffer	1 M Tris-HCl in H ₂ O; pH 8,0	eigene Herstellung
Wasch-Puffer	10 mM Tris, in H ₂ O, Eisessig, pH 7,6	eigene Herstellung

6.1.5 Nährmedien und Antibiotika

6.1.5.1 Nährmedien

Die zur Anzucht von Bakterien verwendeten Nährmedien und Agar sind in Tabelle 6-10 aufgeführt. Sie wurden nach Herstellerangaben mit Millipore® Wasser angesetzt und umgehend autoklaviert.

Tabelle 6-10: Nährmedien und Agar

Medium	Art	Hersteller
Chinablau-Lactose-Agar	Nährboden (Agarplatten)	Oxoid®
LB-Agar (Luria/Miller)	Nährboden Luria-Bertani (Agarplatten)	Carl Roth®
LB-Medium (Luria/Miller)	Flüssigmedium Luria-Bertani	Carl Roth®

Medium für Glycerinkulturen	2 Teile Standard N1-Medium, 1 Teil Glycerin	eigene Herstellung
Müller-Hinton-Agar	Nährboden (Agarplatten)	Carl Roth®
Müller-Hinton-Boullion	Flüssigmedium	Carl Roth®
Standard N1-Medium	Flüssigmedium	Carl Roth®

6.1.5.2 Antibiotika

Die in der Arbeit verwendeten Antibiotika, sowie verwendeten Stammlösungen der einzelnen Stoffe sind mit Konzentration und Lösungsmittel in Tabelle 6-11 aufgeführt.

Für Stoffe die als Salze vorlagen oder Kristallwasser enthielten, wurde stets der Einwaage-Korrekturfaktor berücksichtigt. Die hier angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den Wirkstoff.

Tabelle 6-11: Verwendete Antibiotika und ihre Stammlösungen

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration in Medium/Agar	Selektions-Konzentration (SG22215 TKs)
Amoxicillin	5 mg/mL, 10 mg/mL	Wasser	-	-
Ampicillin	10 mg/mL	Wasser	50/ 100 µg/mL	50 µg/mL
Cefepim	5 mg/mL	Wasser	-	-
Cefotaxim	5 mg/mL, 10 mg/mL	Wasser	5/ 25/ 50 µg/mL	2/ 25 µg/mL
Cefoxitin	5 mg/mL	Wasser	-	-
Ceftazidim	5 mg/mL	Wasser	-	-
Chloramphenicol	50 mg/mL, 100 mg/mL	Ethanol	30/ 50 µg/mL	30 µg/mL
Ciprofloxacin	10 mg/mL	Wasser	-	-
Clavulansäure	10 mg/mL	Wasser	-	-
Gentamicin	5 mg/mL	Wasser	25/ 50 µg/mL	5/ 25 µg/mL
Imipenem	10 mg/mL	Wasser	-	-
Kanamycin	10 mg/mL	Wasser	50 µg/mL	25/ 50 µg/mL
Meropenem	10 mg/mL	Wasser	5 µg/mL	-
Tetracyclin	4 mg/mL, 10 mg/mL, 100 mg/mL	Ethanol 60 % Ethanol 100 %	10 µg/mL	10 µg/mL

6.1.5.3 Disks und Teststreifen

Für die Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien gegen antibakterielle Wirkstoffe stehen fertige Systeme zur Verfügung. Die in dieser Arbeit eingesetzten kommerziell erhältlichen Disks und Teststreifen sind in Tabelle 6-12 mit Wirkstoff, Wirkstoffgehalt beziehungsweise Konzentrationsbereich und ihrem Hersteller aufgeführt.

Tabelle 6-12: Antibiotika-Disks und Teststreifen

Eingesetztes Material	Wirkstoffgehalt	Hersteller
Cefotaxim-Disks	30 µg	Oxoid®
Ceftazidim-Disks	30 µg	Oxoid®
Ceftazidim/Clavulansäure-Disks	30/10 µg	Oxoid®
Ciprofloxacin-Disks	5 µg	Oxoid®
Gentamicin-Disks	10 µg	Oxoid®
Penicillin	10 µg	Oxoid®
Tetracyclin	30 µg	Oxoid®
MTS™ Ceftolozan/Tazobactam (MHK-Teststreifen)	0,016/4 µg/mL - 256/4 µg/mL	Liofilchem®

6.1.6 Kits und Enzyme

6.1.6.1 Kits

Die in dieser Arbeit genutzten Kits und ihre Verwendung sind in Tabelle 6-13 aufgeführt.

Tabelle 6-13: Kits mit Verwendung und Hersteller

Name	Verwendung	Hersteller
Agencourt AMPureXP	DNA-Aufreinigung, NGS-Seq.	Beckman Coulter
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Bioanalyzer DNA-Analytik	Agilent Technologies
CEQ™ DTCS Quick Start Kit	GeXP Sequenzierung (Sanger)	Beckman Coulter
DNeasy Blood & Tissue Kit	DNA-Isolierung	Qiagen®
Ion Express™ Barcode Adapters 1-16 Kit	Ion-Torrent™-Barcode-Adapter	Life Technologies
Ion One Touch ES Kit	Ion-Torrent™ Sequenzierung	Life Technologies
Ion PGM™ Template OT2 200 Kit	Ion-Probenanreicherung	Life Technologies
Ion PGM™ Hi-Q OT2 Kit	Ion-Probenanreicherung	Life Technologies

Ion PGM™ Sequencing Kit v2	Ion-Torrent™-Sequenzierung	Life Technologies
Ion PGM™ Hi-Q Sequencing Kit	Ion-Torrent™-Sequenzierung	Life Technologies
Ion Torrent™ PGM Chip316-Kit	Ion-Torrent™-Sequenzierung	Life Technologies
Ion Torrent™ PGM Chip314-v2 Kit	Ion-Torrent™-Sequenzierung	Life Technologies
NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent™	NGS-Library Erstellung für Ion-Torrent™ Sequenzierung	NEB
PyroMark® PCR Kit	Pyrosequencing®-PCR	Qiagen®
PyroMark® Gold Q96 Reagents Kit	Pyrosequencing®	Qiagen®
QIAquick Gel Extraction Kit	Gel-Extraktion von PCR-Produkten	Qiagen®
QIAquick PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten	Qiagen®
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	DNA-Quantifizierung	Invitrogen

6.1.6.2 Enzyme

Die Enzyme, die in der Arbeit verwendet wurden sind mit ihrer Konzentration und den zugehörigen, verwendeten Puffern sowie Herstellern in Tabelle 6-14 aufgeführt.

Tabelle 6-14: Enzyme und verwendete Puffer

Enzym	Konzentration	Puffer	Hersteller
DreamTaq Polymerase	5 U/μl	10X DreamTaq Buffer	Thermo Scientific
Exonuklease I (Exo I)	20 U/μl	10X Reaction Buffer	Thermo Scientific
FastAP Thermosensitive Alkalische Phosphatase	1 U/μL	10X FastAP Buffer	Thermo Scientific
NEBNext® dsDNA Fragmentase®	0,5 reactions/μL	10X Fragmentase Reaction Buffer v2	NEB
Phusion HF DNA Polymerase	2 U/μL	5X Phusion HF Buffer 5X Phusion GC Buffer	Thermo Scientific
Proteinase K	20 mg/mL (> 600 mAU/mL)	Diverse Puffer, Bedingungen bei pH=8	Qiagen®
RNAse A Pulver	90 U/mg	Tris Puffer	AppliChem
RNAse A	100 mg/mL (7000 U/mL)	Resuspensionspuffer P1	Qiagen®

6.1.7 Chemikalien

In Tabelle 6-15 sind die in der Arbeit verwendeten Chemikalien mit ihren jeweiligen Herstellern aufgeführt. Eine Auflistung der Gefahrstoffe findet sich im Anhang (Kap. 8.5).

Tabelle 6-15: Verwendete Chemikalien und Hersteller

Stoff, Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidlösung 30 % (Rotiphorese® Gel A)	Carl Roth
Agarose, PeqGold Universal	Peqlab
Amoxicillin-Trihydrat	GlaxoSmithKline
Ampicillin-Natrium	Sigma-Aldrich
Bis-Acrylamidlösung 2 % (Rotiphorese® Gel B)	Carl Roth
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Bio-Rad
Cefepim	Bristol-Myers Squibb
Cytiva Streptavidin-Sepharose™	Pyrosequencing®
Cefotaxim-Natrium	Aventis
Cefoxitin-Natrium	MSD Sharp
Ceftazidim-Pentahydrat	GlaxoSmithKline
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin-Hydrochlorid	Bayer
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Finnzymes, Thermo Scientific
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merk
Essigsäure (Eisessig)	VWR
Ethanol 96 %	Merck
Ethanol absolut 99,8%	VWR
Ethidiumbromidlösung 1 % in Wasser	Merck, Carl Roth
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth
Ficoll 400®	Carl Roth
Formamid	Beckmann Coulter (DTCS Kit)
Gentamicinsulfat	Sigma-Aldrich
Glucose-Monohydrat	Merck
Glycerin (Rotipuran® 99,5 %)	Carl Roth
Harnstoff	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
Imipenem	European Pharmakopoeia CRS

Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	VWR
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich
Kristallviolett	Carl Roth
Lithium-Clavulanat	GlaxoSmithKline
Magnesiumchlorid	Thermo Scientific
Meropenem-Trihydrat	AstraZeneca & Grünenthal
Methanol	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid	Grüssing
PeqGold Universal Agarose	Peqlab
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v)	Acros, Sigma-Aldrich
Polysucrose	Sigma-Aldrich
Salzsäure konzentriert	Geyer
Sample Loading Solution (SLS)	Beckmann Coulter (DTCS Kit)
Separation Buffer (GenomeLab™ GeXP)	Beckmann Coulter
Separation Gel LPA (GenomeLab™ GeXP)	Beckmann Coulter
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
TRIS ((Trishydroxymethyl)-aminomethan) (Pufferan® 99,3 %)	Carl Roth
TRIS-Hydrochlorid (Pufferan® 99 %)	Carl Roth
Xylencyanol	Merck

6.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

6.1.8.1 Geräte

Die in der Arbeit genutzten Geräte sind im Folgenden in Tabelle 6-16 aufgeführt.

Tabelle 6-16: Geräte mit Originalbezeichnung und Hersteller

Funktion	Name	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius analytic A200S	Sartorius AG
Analysenwaage	LA124i	VWR

Applikator Stempel	Disc-Dispenser	Oxoid®
Autoklav	Systec 3870 ELV	Systec
Autoklav	Systec 2540 ELV	Systec
Autoklav	Systec V-95	Systec
Bechergläser	Messbecher (10mL, 25mL, 50mL, 100mL, 250mL, 500mL)	Schott, Brand
Bioanalysegerät für DNA/RNA	Bioanalyzer 2100	Agilent Technologie
Brutschrank	Heraeus function line B12	Heraeus
Brutschrank	Heraeus function line B20	Heraeus
Dispensierpipette	Dispensette® Organic	Brand
Sequenziergerät (Sanger-Sequenzierung)	GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System	Beckman Coulter
Erlenmeyerkolben	Erlenmeyerkolben (100mL, 250mL, 300mL, 400mL, 500mL)	Schott, Brand
Fluorometer für DNA und RNA	Qubit® 2.0	Invitrogen
Gaskartuschenbrenner	Labogaz® 206	Campingaz®
Gel-Dokumentationsanlage	Transilluminator, Weiß, UV 312nm	PeqLab
Geldokumentationssystem	BioDoc Analyze	Biometra
Gelelektrophoresekammer	ComPhor Mini	Biozym
Gelelektrophoresekammer	ComPhor Midi	Biozym
Gelelektrophoresekammer	ComPhor Mt Maxi	Biozym
Gelelektrophoresekammer	Paqlab mini	Peqlab/VWR
Gelelektrophoresekammer	Peqlab midi	Peqlab/VWR
Gelelektrophoresekammer	Peqlab maxi	Peqlab/VWR
Glaskolben mit Deckel	Duran® Kolben (100mL, 250mL, 500mL) mit Kappen	Schott
Glaspetrischalen	Steriplan® 100x20 mm	Schott
Glasröhrchen mit Deckel	Kulturröhrchen 10mL mit Kappen	Schott
Glasstäbe zum Ausstreichen	Glasstäbe	Glasbläserei UHH
High-Speed Mikrozentrifuge	Scanspeed 1524M	LaboGene
Hitzesterilisation und Trocknung	Wärmeschrank	Heraeus
Ion Torrent™ Amplifikationsgerät	Ion OneTouch™	Life Technologies
Ion Torrent™ Probenvorbereitung	Ion OneTouch™ ES Modul	Life Technologies
Ion Torrent™ Amplifikationsgerät	Ion One Touch™ 2	Life Technologies
Ion Torrent™ Sequenziergerät	Ion Torrent™ PGM™	Life Technologies
Ion Torrent™ Server	Ion PGM™ Torrent Server	Life Technologies
Kolbenhubpipetten	Labmate Pro 2 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Abimed

Kolbenhubpipetten	Pipetman P100, P200, P1000	Gilson
Kolbenhubpipetten	Labmate Discovery 2 µl, 20 µ	Abimed
Kolbenhubpipette 0,02-1,0 µL	Gilson Pipette 1 µL	Gilson
Kolbenhubpipette 0,02-2,0 µL	Labmate Pro 2 µL	Abimed
Kolbenhubpipette 0,5-10 µL	Labmate Pro 10 µL	Abimed
Kolbenhubpipette 0,5-10 µL	Gilson Pipette 10 µL	Gilson
Kolbenhubpipette 100-1000 µL	Labmate Pro 1000 µL	Abimed
Kolbenhubpipette 100-1000 µL	Gilson Pipette 1000 µL	Gilson
Kolbenhubpipette 10-100 µL	Labmate Pro 100 µL	Abimed
Kolbenhubpipette 10-100 µL	Gilson Pipette 100 µL	Gilson
Kolbenhubpipette 20-200 µL	Gilson Pipette 200 µL	Gilson
Kühlschrank -20°C	GSN36VW30	Bosch
Kühlschrank -20°C	Comfort GS 5203	Liebherr
Kühlschrank -20°C	Comfort G1221	Liebherr
Kühlschrank 2-8°C	KTR1572	Bosch
Kühlschrank 2-8°C	KSR34V00	Bosch
Kühlschrank 2-8°C	ÖKO_SANTO electronic 4043-6KG	AEG Electrolux
Kühlschrank -80°C	HERA freeze HFU 486 basic	Heraeus
Kühlschrank -80°C	U410 HEF	New Brunswick Sc.
Laborwaage	Sartorius laboratory LA120S	Sartorius AG
Live Zellen-Bildgebungssystem	oCelloscope™	Biosense Solutions
Magnetrührer	MR2	Heidolph
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph
Magnetrührer mit Heizung	MR 3001	Heidolph
Magnetrührer mit Heizung	RCT basic	IKA
Mehrkanalpipette 12x	Transferpette-12®	BRAND
Mehrkanalpipette 8x	Transferpette-8®	BRAND
Messzylinder	Labsolute® (10mL, 25mL, 50mL, 100mL, 500mL, 1000mL)	Th. Geyer
Mikroskop	S200	Hund
Mikroskop-Fotosystem	EOS 450D Kamerasystem	Hund, Canon
Multistep-Pipette	HTL Labopette	Abimed
NGS-Ultraschall-System	Bioruptor® UCD-600 NGS Sonication System	Diagenode
pH Meter	inoLab pH Level 1	WTW
Plattformschüttler	Unimax 2010	Heidolph
Pyrosequencing® Kartusche	PyroMark® Q96 Cartridge	Qiagen®

Pyrosequencing® Probenaufbereitungsgerät	PSQ™96MA System Worktable	Biotage
Pyrosequencing® Gerät	PSQ™96MA System	Biotage
Schottflaschen mit Deckel	Duran® Verschluss Laborflaschen (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)	Schott
Schüttelinkubator	Certomat® R	B. Braun Biotech
Schüttelinkubator	Certomat® IS	Sartorius
Schüttelinkubator	C25 incubator shaker	New Brunswick Sc.
Sicherheitswerkbank	Hera guard®	Heraeus
Sicherheitswerkbank	Hera safe®	Heraeus
Spannungsgeber	PS 304 Power Supply	Biometra
Spannungsgeber	Power Supply EV231	peqLab
Spülmaschine	G 7883	Miele professional
Sterilisator	Wärmeschrank bis 300 °C	Heraeus
Thermocycler	Biometra® T Professional	Analytik Jena
Thermocycler	Biometra® T personal	Analytik Jena
Thermocycler	Biometra® T3	Analytik Jena
Thermocycler	Biometra® T Gradient	Analytik Jena
Thermocycler	Peqlab primus 25 advanced®	peqlab
Tischzentrifuge	Microcentrifuge	Labnet
Tischzentrifuge	Sprout™	Heathrow Scientific
Ultraschallgerät	Bioruptor® Sonication System	Diagenode
Ultraschallstab	Bandelin Sonopuls	Bandelin
UV-Vis Aufnahmesystem	Providoc Cab UVIS (254 , 366 nm)	Sarstedt und Canon
UV-Vis-Spektralphotometer	Cary 50 Bio	Varian
UV-Vis-Spektralphotometer	Cary 100 UV-Vis	Agilent Technologie
UV-Vis-Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific
UV-Vis-Spektralphotometer	Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Vortexer	IKA® MS 3	IKA
Vortexer	Reax top	Heidolph
Waage	Navigator™	Ohaus Corporation
Waage	Kern PLJ 2100-2M	Kern & Sohn
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore® RiOs™ 5	Merck Millipore
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q® Reference System A+	Merck Millipore
Wasserbad	Julabo MWB	Julabo Labortechnik
Wasserbad	Wasserbad mit Heizung	Haake
Wasserbad-Schüttelinkubator	Julabo SW23	Julabo Labortechnik

Zentrifuge	Biofuge stratos	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge pico	Biometra
Zentrifuge	Minifuge T	Sepatech
Zentrifuge	Pico 17 Centrifuge	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus

6.1.8.2 Verbrauchsmaterialien

Die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 6-17 aufgeführt.

Tabelle 6-17: Materialien zum Verbrauch nach ihrer Funktion und Bezeichnung mit Hersteller

Material	Bezeichnung	Hersteller
Autoklavierbeutel	Vernichtungsbeutel	Sarstedt
Einmalspritzen	Omnifix 5 mL, 10 mL, 20 mL	B. Braun
Falcons, steril, verschließbar	Schraubrohrengefäß 15 mL, 50 mL	Sarstedt
Flächendesinfektionsmittel	Bacillol® AF	Paul Hartmann
Gaskartuschen	Gaskartuschen C 206 GLS	Campinggaz®
Gerätedesinfektionsmittel	Korsolex®	Paul Hartmann
Halbmikroküvetten	Einmal-Küvetten UV/Vis	Brand
Hautdesinfektionsmittel	Sterillium®	BODE-Chemie
Holzstäbchen	Zahnstocher	Edeka
Impfösen	Sterile polystyrene loop 10 µl	Kuhnle GmbH
Kryo-Gefäß	CryoPure Tubes	Sarstedt
Labortücher	Kimtech® Science Lab Wipes	Kimberly-Clark®
Mikrokapillaren	Separation Capillary Array	Beckman Coulter
Mikrotiterplatten (MHK)	96-Well-Mikrotiterplatten	VWR
Mikrotiterplatten plan	NUNC™ Platten, 96-Well	Thermo Fischer
Mikrotiterplatten für GeXP-Sequenzierung	Sample Microtiter Plates 96-Well Plates	Beckman Coulter
Mikrotiterplatten für Pyro-Sequenzierung	PyroMark® Q96 Plate PyroMark® Q96 Plate Low	Qiagen®
Nitrilhandschuhe	Nitrile M	VWR
Parafilm	Parafilm „M“	Bemis
Perlen für Glycerinkulturen	Glasperlen	Knorr prandell
Petrischalen	Petrischalen 92 x 16 mm	Sarstedt
Pipettenspitzen	Pipet Tips 2 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt

Pipettenspitzen gestopft	Biosphere Filter Tips 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Analytik Jena
Präzisionstücher	Kimtech® Science Precision Wipes	Kimberly-Clark®
Pyrosequencing Vakuum Filter	PyroMark® Vacuum Prep Filter Probe	Qiagen®
Pyrosequencing Analyseplatte	PyroMark® Q96 plate low	Qiagen®
Pyrosequencing Probenplatte	PyroMark® Q96 sample plate	Qiagen®
Reaktionsgefäße	MultiPLY Biosphere Pro® 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Safe Seal Gefäße 1,5 mL, 2,0 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße für Beads	DNA LoBind® Tubes 1,5 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße für Qubit®	Qubit™ Assay Tubes 0,5 mL	Life Technologies
Sterilfilter	Minisart™ Plus/NML Ø 0,2 µm	Sartorius
Sterilfilter	Sepatech Minisart Ø 0,2 µm	Sartorius
Wattestäbchen	Watteträger 15 cm	Dr. Junghans

6.1.9 Datenbanken und Software

6.1.9.1 Datenbanken

In dieser Arbeit wurde mit Datenbanken und Onlineplattformen gearbeitet um Literatur zu finden, sowie auch Referenzen und veröffentlichte Sequenzen. Die in der Arbeit verwendeten Sequenzdaten entstammen den im Folgenden in Tabelle 6-18 aufgeführten anerkannten internationalen Datenbanken, die für Forschungszwecke frei verfügbar sind. Einige Plattformen stellen auch webbasierte Anwendungen und Analysewerkzeuge für Sequenzen bereit, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 6-18: Datenbanken und internetbasierte Anwendungen mit Verwendung und Referenz

Datenbank	Anwendung	Verwendung	Referenz
Enterobase	Datenbank, Plattform	Datenbank für MLST, Enterobakterien, MLST-Analysetools	(Zhou <i>et al.</i> 2020)
Institut Pasteur MLST Database	Datenbank, Plattform	MLST-Datenbank Sequenz-Analysetools	(Jaureguy <i>et al.</i> 2008)

NCBI - National Center of Biotechnology Information	Datenbank, Plattform	Datenbank für biotechnologische Informationen	(Database resources of the National Center for Biotechnology Information 2016)
NCBI RefSeq	Datenbank	Referenzsequenzen	(O'Leary <i>et al.</i> 2016)
GenBank	Datenbank	Gen-/ Genomsequenzen	(Clark <i>et al.</i> 2016)
BLAST, Primer-BLAST	Plattform, Werkzeug	Sequenzanalyse, Primerdesign,	(Madden <i>et al.</i> 1996)
PubMed	Literatur-Datenbank	Literaturrecherche	U.S. National Library of Medicine (NLM) (PubMed 2022)
PubMed Central (PMC)	Literatur-Datenbank	Literatur, Volltextzugang	U.S. National Institutes of Health (NIH), (Roberts 2001)
UniProt	Datenbank	Proteinstrukturen	(UniProt: the universal protein knowledgebase 2021)

6.1.9.2 Software

Die in der Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 6-19 aufgeführt.

Tabelle 6-19: Software mit Verwendung und Anbieter

Software	Version	Verwendung	Anbieter
Adobe Acrobat	kontinuierlich aktualisiert	PDF Verarbeitung	Adobe Systems Inc.
Agilent Bioanalyser 2100	2100 Expert	Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies
BioDocAnalyse	Ti5	BioDocAnalyse, Geldokumentation	Biometra
Cary WinUV Read Applications	1.0	Cary 50/100 UV-Vis Photometer Messungen	Varian/ Agilent Technologies
Chem Draw	11 Pro	Zeichnen chemischer Strukturformeln	CambridgeSoft
Citavi	6	Literaturverwaltung, Zitation	Swiss Academic Software GmbH
CLC Genomics Workbench	20.0-23.0	Sequenzanalyse	CLC bio - Qiagen®

CLC Main Workbench	20.0	Sequenzanalyse	CLC bio - Qiagen®
CLC Sequence Viewer	7.0.2, 8.0	Sequenzanalyse	CLC bio - Qiagen®
EOS Utilities	-	Kameraaufnahmen Mikroskopie	Canon
GenomeLab™ GeXP	-	GenomeLab™ GeXP Sequenzierung	Beckman Coulter Inc.
IGV - Integrative Genome Viewer	2.3.86, 2.8.0	NGS Datenauswertung	Broad Institute and the Regents of the University of California
Torrent Suite™ Software	kontinuierlich aktualisiert	Ion Torrent™ PGM Server	Thermo Fisher Scientific
MS Office Access	2010, 2016	Datenverwaltung	Microsoft® corp.
MS Office Excel	2010, 2016	Tabellenkalkulation	Microsoft® corp.
MS Office PowerPoint	2010, 2016	Präsentationen, Poster	Microsoft® corp.
MS Office Word	2010, 2016	Textverarbeitung	Microsoft® corp.
NanoDrop™ 2000/2000c	1.6.0	NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific
NanoDrop™ ND-1000	V3.5.2	NanoDrop™ ND-1000	Thermo Scientific
PSQ® Assay Design	1.0.6	Pyrosequencing® Designsoftware	Biotage AB
PyMOL™	1.5.0.4 - 1.8.6.2	Proteinstruktur- darstellung	Delano Scientific LLC, Schrödinger
Uni Explorer	5.0 - 8.0	oCelloscope™	Philips Biocell
Vector NTI Advance™	11	Arbeiten mit Sequenzen	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific
VisionCapt	15.08	Bio-Vision Geldokumentation	Vilber Lourmat
PyroQ-CpG®	1.0	Pyrosequencing®	Biotage

6.2 Methoden

6.2.1 Arbeiten mit Bakterien

6.2.1.1 Grundlegendes

6.2.1.1.1 Aseptische Bedingungen

Die Arbeit mit Bakterien und Nährlösungen wurde stets in einem sterilen Umfeld durchgeführt, entweder unter einer Sicherheitswerkbank oder in direkter Nähe einer Bunsenbrennerflamme. Vor wie nach den Arbeiten wurden die angrenzenden Flächen mit Flächendesinfektionsmittel behandelt und Hautdesinfektionsmittel für die Hände verwendet.

Als Materialien zum Arbeiten mit Bakterien wurden entweder sterile Einmalprodukte verwendet oder geeignete Geräte aus Glas, Metall oder Plastik, die vor ihrer Verwendung gereinigt und mittels Hitze oder Wasserdampf sterilisiert wurden.

6.2.1.1.2 Hitzesterilisation

Glas und Metallgeräte wurden sterilisiert indem sie luftdurchlässig verschlossen für 3 h bei 200 °C im Hitzeschrank erhitzt wurden. Impfösen und andere Geräte aus Metall wurden vor ihrer Verwendung zur Sterilisation in der Bunsenbrennerflamme ausgeglüht. Glasspatel wurden in 70 %igen Ethanol eingetaucht und anschließend abgeflammt.

6.2.1.1.3 Wasserdampfsterilisation

Die Wasserdampfsterilisation erfolgte in Autoklaven für 20 min bei 121 °C und 2 bar im gesättigten, gespannten Wasserdampf. Alle Gebrauchsmaterialien aus Plastik sowie Puffer, Lösungen und Nährmedien zur Verwendung mit Bakterien wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert, Nährmedien unmittelbar nach dem Ansetzen. Im Weiteren wurden nach den Arbeiten wiederum alle Kulturen, verwendeten Nährlösungen, Nährböden, Puffer, Gefäße, verwendete Einmalprodukte und Abfälle autoklaviert, um die Bakterien sicher abzutöten.

6.2.1.2 Kultivieren von Bakterien

6.2.1.2.1 Ausimpfen

Mittels einer Impföse oder mit einem sterilen Glasstab wurde eine Bakterienkolonie oder eine Glasperle oder sonstiges Trägermaterial mit Bakterien auf einer Agarplatte aufgebracht und ausgestrichen. Die Platte wurde anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert.

6.2.1.2.2 Dauerkulturen

Zur Herstellung einer dauerhaften Bakterienkultur wurden 5-10 Kolonien, die zuvor 8-16 h Stunden bei 37 °C auf einer Agarplatte gewachsen waren oder 100 µL einer Übernachtskultur verwendet. Die Zellen wurden in ein steriles Kryo-Gefäß mit Glasperlen und einer Mischung aus Standard-N1-Medium und Glycerin suspendiert. Nach 60 min Inkubation wurde die Flüssigkeit unter sterilen Bedingungen abgesaugt, das Gefäß fest verschlossen und bei -80 °C gelagert.

Die erneute Anzucht der Zellen aus der Dauerkultur erfolgte durch Entnahme einer Perle mittels einer sterilen Impföse, Ausstrich auf einer Agarplatte und Inkubation bei 37 °C.

6.2.1.2.3 Übernachtskulturen

Von einer Agarplatte wurden ein bis drei Bakterienkolonien mit einem sterilen Glasstab aufgenommen und in ein steriles Reagenzglas mit Deckel (= Kulturröhrchen) mit 3-5 mL Nährmedium suspendiert. Dieses wurde 12-16 h über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Alternativ wurde eine Perle aus der Dauerkultur in ein solches Kulturröhrchen gegeben und dieses über Nacht inkubiert.

6.2.1.2.4 Tageskulturen

Ein bis drei Bakterienkolonien einer frisch bebrüteten Platte oder 10-50µL (1:100 Verdünnung) einer Übernachtskultur wurden in ein steriles Kulturröhrchen mit 3-5 mL Nährmedium suspendiert. Die Kultur wurde im Schüttelinkubator bei 37°C und 130 rpm bis zur benötigten Dichte inkubiert.

6.2.1.2.5 Bestimmung der Keimzahl

Die Dichte einer Bakterienkultur wird anhand der Koloniebildenden Einheiten (KBE) in einem definierten Volumen, z.B. pro Milliliter (KBE/mL) angegeben. Sie gibt an, wie viele lebende Zellen, die in der Lage sind wieder neue Kolonien zu bilden, sich in einem Milliliter befinden. Um die einzelnen Bakterienkolonien zählen zu können wird die Kultur seriell in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. In dieser Arbeit wurde schrittweise mit serieller 10-facher Verdünnung gearbeitet. Dazu wurden je 500 µL der zu bestimmenden Zellsuspension zu 4,5 mL steriler 0,9 %ige NaCl-Lösung gegeben, vermischt und von der so entstandenen (10^{-1}) Verdünnung ausgehend weitergearbeitet. Von dieser wurden erneut 500 µL zu 4,5 mL NaCl-Lösung hinzugegeben und so weiter bis zur 10^{-x} Verdünnung. Von den Verdünnungen wurden jeweils 20 µL oder 50 µL auf einer oder einer halben Agarplatte ausplattiert und die nach Inkubation bei 37°C über Nacht gewachsenen Kolonien gezählt. Die geringste Verdünnung die noch eindeutig zählbar war, wurde zur Berechnung der KBE herangezogen.

$$\text{KBE/mL} = \frac{N \text{ (Anzahl Kolonien)}}{\text{mL (eingesetztes Volumen)} * 10^{-x} \text{ (Verdünnungsstufe)}}$$

Für die KBE-Bestimmung mehrerer Proben im kleineren Maßstab wurde die serielle Verdünnung in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Dabei wurden zu 90 µL NaCl-Lösung je 10 µL Bakteriensuspension hinzugegeben, die so entstandene 10^{-1} Verdünnung durch pipettieren vermischt und von dieser ebenso bis zur 10^{-x} Verdünnung weiter verfahren.

6.2.1.3 Messung der Optischen Dichte

Die Messung der Dichte einer Bakterienkultur erfolgt näherungsweise durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) im UV-Vis-Spektralphotometer. Die Bakteriensuspension wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) in Einmal-Küvetten gegen das verwendete Medium als Leerwert vermessen. Dabei korreliert die OD im Bereich von 0,2-0,8 mit der Zelldichte der Suspension. Eine OD_{600} von 0,5 entspricht in etwa einer Konzentration von $7,2 \times 10^8$ KBE/mL bei 600 nm.

6.2.1.4 Einstellung einer Bakteriensuspension auf McFarland 0,5

Der McFarland Standard ist eine definierte Suspension von Bariumsulfat in Wasser, die einer bestimmten optischen Dichte, gemessen bei 550 nm (OD_{550}) entspricht. Die McFarland Standards einer Reihe stehen für unterschiedliche Dichten der Suspension, definierten Zelldichten entsprechen und anhand ihrer Trübung bewertet werden können (McFarland 1907). Nach Durchmischung kann die Trübung im Weißlicht vor geeignetem weiß-schwarzen Hintergrund verglichen werden. Sie korreliert mit der Bakterienzeldichte, die über den optischen Vergleich mit dem Standard bis zur optischen Gleichheit eingestellt wird. Ein McFarland 0,5 entspricht dabei einer OD_{550} von 0,125 und für *E. coli* in etwa einer Bakterienzeldichte von $1,5 \times 10^8$ KBE/mL (bioMérieux).

Zur Einstellung der Bakteriensuspension wurden die Zellen von einer über Nacht inkubierten Agarplatte mit einem sterilen Glasstab in physiologische Kochsalzlösung suspendiert, bis die Trübung der Suspension dem McFarland Standard entsprach. Alternativ wurde die benötigte Suspension aus einer Übernachtskultur durch Verdünnung mit Kochsalzlösung erstellt. Das Inokulum für Empfindlichkeits-Bestimmungen wurde stets ausgehend von einer auf McFarland 0,5 eingestellten Suspension erzeugt (vgl. Kap.6.2.2.2-6.2.2.4).

6.2.2 Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung - Detektion von Resistenz

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Bakterienstämmen gegen antibakterielle Wirkstoffe und zur Detektion von Resistenzen wurden grundlegende Standardmethoden der antibakteriellen Empfindlichkeitstestung, kurz AST (Antimicrobial Susceptibility Testing), verwendet. Grundsätzlich wurde dabei nach den Richtlinien des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) und des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) der *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) verfahren. Die verschiedenen Methoden (MHK-Bestimmung, Disk-Tests, E-Test, etc.) sind in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

6.2.2.1 Wachstum in Gegenwart von Antibiotika

Als Basistest dafür ob ein Bakterium Resistenz gegenüber bestimmten Stoffen aufweist, wurde der zu testende Stamm dem Antibiotikum in einer Konzentration ausgesetzt, die die Kriterien für Resistenz erfüllt. Die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an den Grenzwert-Tabellen klinisch relevanter Antibiotikaresistenz bei Enterobakterien der EUCAST. (EUCAST Clinical Breakpoint Table *Enterobacteriaceae* v 5.0 sowie *Enterobacterales* v. 8.0). Der betreffende Stamm wurde in Gegenwart der zu untersuchenden Substanz über Nacht inkubiert, entweder auf einer Agarplatte oder in Flüssigmedium mit dem Antibiotikum in entsprechender Konzentration. Sichtbares Wachstum des Stamms wurde als Resistenz gegenüber dem Stoff gewertet, kein Wachstum als Empfindlichkeit. Bekanntermaßen resistente bzw. sensible (empfindliche) Stämme wurden als Kontrolle verwendet.

6.2.2.1.1 Herstellung von Antibiotika-Stammlösungen

Die Herstellung und Verwendung der Antibiotika-Lösungen orientierte sich an den Standards und Guidelines der CLSI (CLSI 2014). Es wurden zunächst konzentrierte Stammlösungen der Antibiotika hergestellt. Dafür wurden die benötigten Mengen der Substanzen (oder Salze) unter Berücksichtigung ihres Einwaage-Korrekturfaktors abgewogen und in definiertem Volumen Wasser höchster Qualität oder, falls unlöslich in Wasser, in Ethanol gelöst. Die eingesetzten Antibiotika und verwendeten Lösungsmittel sind in Tabelle 6-11 aufgeführt. Anschließend wurden die Antibiotika-Lösungen steril filtriert und bei geeigneten Bedingungen von 2-8 °C oder -20 °C gelagert. Aus der Stammlösung wurden dann, gegebenenfalls nach auftauen, die benötigten Mengen an Antibiotikum für Medien und Versuche entnommen.

6.2.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ist ein Standardverfahren der Mikrobiologie zur Bestimmung der bakteriellen Resistenz gegenüber Antibiotika. Dabei wird eben diejenige geringste Konzentration eines Stoffes ermittelt, in deren Gegenwart das Wachstum eines Bakteriums eindeutig gehemmt ist.

Die Methodik der MHK-Bestimmung ist ausführlich in den Guidelines der CLSI und EUCAST beschrieben. Sie wurden nach den Vorgaben dieser Standardanweisungen, den CLSI *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* M100 und M100-S24. (CLSI 2014) durchgeführt. Die Bewertung hinsichtlich Resistenz und Sensibilität/Empfindlichkeit wurde stets nach den aktuellen Grenzwerten aus „*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*“ (ESCMID) der EUCAST vorgenommen. Dabei wurde berücksichtigt, dass sich die Grenzen für Empfindlichkeit und Resistenz der EUCAST im Verlauf der Arbeit geändert haben. Die in dieser Arbeit zur Bewertung von Resistenz herangezogenen Grenzwerte sind in Kap. 6.2.2.5 (Bewertung von Empfindlichkeit und Resistenz) aufgeführt.

6.2.2.2.1 Mikrodilution – MHK-Bestimmung

Die MHK-Bestimmung wurde mittels des Verfahrens der Mikrodilution in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Im Prinzip wurde das Wachstum eines Bakterienstamms bei verschiedenen Konzentrationen eines Antibiotikums gemessen. In Schritt eins wurde das Antibiotikum als Verdünnungsreihe in Medium vorgelegt. Dazu wurde die Testsubstanz ausgehend von der Stammlösung in Müller-Hinton Medium verdünnt. Die erste Ausgangslösung wurde so hergestellt, dass Sie die doppelte Konzentration der höchsten zu testenden Konzentration aufwies. Von dieser aus wurde dann stets im Verhältnis 1:1 mit Müller-Hinton Medium weiterverdünnt, sodass eine geometrische Konzentrationsreihe erhalten wurde. Von jeder einzelnen der Konzentrationen wurden dann der Reihe nach je 50 µL in eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert, zusätzlich wurde eine Kavität mit antibiotikafreiem Medium befüllt (Wachstumskontrolle). In Schritt zwei wurden die Kavitäten mit 50 µL eingestellter Bakteriensuspension in Müller-Hinton Medium bestückt. Durch die 1:1 Beschickung der Kavitäten mit 50 µL Medium doppelter Testkonzentration und 50 µL antibiotikafreien Mediums wurde die finale Testkonzentration erreicht. Das Inokulum der Bakteriensuspension wurde eingestellt indem zunächst eine Bakteriensuspension der optischen Dichte von McFarland 0,5 hergestellt wurde, welcher für den Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922 einer Zelldichte von $1-2 \times 10^8$ KBE/mL entspricht. Ausgehend davon wurde diese Suspension 1:100 (seriell, zweimal 1:10) in Müller-Hinton Medium verdünnt. Die

Bakteriensuspension entsprach dann circa $1-2 \times 10^6$ KBE/mL und die finale Konzentration in der Mikrotiterplatte $5-10 \times 10^5$ KBE/mL. Unmittelbar nach dem Beschicken mit Bakteriensuspension wurden die Platten abgedeckt für 16-20 h bei 36 °C inkubiert. Anschließend wurden sie anhand des sichtbaren Wachstums in den einzelnen Kavitäten bewertet und so die MHK bestimmt (*CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition*). Als Qualitätskontroll- und Referenzstamm wurde *E. coli* ATCC® 25922 verwendet. Die MHK-Bestimmung wurde stets als Doppel oder Mehrfachbestimmung durchgeführt.

6.2.2.2 Makrodilution

Die Bestimmung mittels Makrodilution entspricht im Prinzip generell der der Mikrodilution, mit dem Unterschied, dass sie in Kulturröhrchen in einem größeren Maßstab durchgeführt wird. Das Antibiotikum wurde in den zu testenden Konzentrationen (berechnet auf das Endvolumen), in 2,97 mL Müller-Hinton Medium vorgelegt. Die Beschickung mit Bakterien erfolgte anschließend durch Zugabe von 30 µL einer auf McFarland 0,5 eingestellten Suspension. Alternativ wurden auch 300 µL einer 1:100 verdünnten ÜNK zu 2,7 mL auf das Endvolumen berechnete antibiotikahaltige Müller-Hinton Medium gegeben. Die Röhrchen wurden für 16-20 h bei 37 °C und 130 rpm inkubiert und anschließend das Bakterienwachstum in den Röhrchen anhand der aufgetretenen Trübung bewertet. Die Makrodilution diente auch als Kontrolle zu den Wachstumsversuchen im oCelloscope™ (vgl. Kap. 6.2.2.6).

6.2.2.3 MHK-Bestimmung durch Agardiffusion mit Teststreifen (E-Test)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine MHK-Bestimmung auf einer Agarplatte, die mit antibiotikabeladenen Papierstreifen durchgeführt wird. Die Streifen enthalten dabei das zu testende Antibiotikum in einem Gradienten. Das Antibiotikum diffundiert in den Agar und hemmt das Bakterienwachstum dort, wo es in ausreichend hoher Konzentration vorliegt. Dabei bildet sich ein in der Regel ellipsenartiger, mit abnehmender Konzentration zulaufender Hemmhof. Die Methode beruht auf dem 1988 von Bromström und Ericsson entwickeltem Epsilometertest, kurz E-Test. Die E-Test Streifen wurden zuerst 1992 von AB BIODISK auf den Markt gebracht und seit 2008 unter dem Namen ETEST® von bioMérieux vermarktet.

In dieser Arbeit wurden die MST[®] MHK-Teststreifen von Liofilchem[®] verwendet. Anhand dieser wurden die MHK-Werte für Ceftolozan/Tazobactam ermittelt. Ceftolozan liegt auf dem Streifen in graduell steigender Konzentration von 0,016-256 µg/mL vor, Tazobactam dagegen konstant bei 4 µg/mL. Zur Bestimmung der MHK wurde eine Müller-Hinton Agarplatte mittels eines Wattestäbchens mit einer auf McFarland 0,5 eingestellten Bakteriensuspension inokuliert. Anschließend wurde ein Teststreifen auf die Agarplatte aufgebracht und diese mit dem Boden nach oben für 16-20 h bei 36 °C inkubiert. Die gebildete Hemmzone um den Streifen indiziert die Empfindlichkeit. Entlang des Gradienten wurde die MHK an der entsprechenden Linie des Streifens abgelesen, die sich als letzte innerhalb des Hemmhofs befand. Die so ermittelten MHK-Werte wurden anhand der Grenzwerte der EUCAST bewertet.

6.2.2.4 Agardiffusion (Disk-Test)

Eine weitere Methode um die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen zu testen ist die Agardiffusion. Sie wird aufgrund der eingesetzten die Testsubstanz tragenden Disks auch Disk-Test oder Disk-Diffusionstest genannt. Sie ist ebenfalls eine Standardmethode zur Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber antibakteriell wirksamen Substanzen und wurde nach den entsprechenden Anweisungen der „EUCAST *Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing*“ - Version 5.0 und 6.0 durchgeführt (ESCMID 2019).

Beim Disk-Test wird das Wachstum eines Bakterienstamms gegen verschiedene Antibiotika getestet, die in Form der mit definiertem Gehalt einer Substanz beladenen Disks vorliegen. Dazu wurde eine Müller-Hinton-Agarplatte mit Bakteriensuspension des zu testenden Stamms inokuliert indem eine eingestellte McFarland 0,5 Suspension mit einem sterilen Wattestäbchen aufgesaugt und unter leichtem Druck auf der Platte ausgerollt wurde. Der Vorgang wurde noch zweimal um 60° versetzt durchgeführt, sodass die gesamte Oberfläche der Platte mit Bakteriensuspension benetzt war. Nach 3-10 min wurden die wirkstoffhaltigen Disks von Oxoid[®] mit Hilfe des Disk-Applikator Stempels auf die Agarplatten aufgebracht. Diese wurden anschließend 16-18 h bei 36 °C mit dem Boden nach oben inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Hemmhöfe der einzelnen Disks mittels eines Lineals in Millimetern ausgemessen und anhand der EUCAST Breakpoint-Tabellen bewertet.

6.2.2.5 Bewertung von Empfindlichkeit und Resistenz

Die Bewertung eines *E. coli* Stammes anhand seiner MHK-Werte oder der Hemmhofbestimmung erfolgte anhand der Breakpoint-Tabellen der EUCAST. Die Einteilung erfolgte in (S) für empfindlich, engl. *Susceptible* (S), oder in (R) für resistent, engl. *Resistant* (R). Bei Werten zwischen den Grenzen für (R) und (S) wurde in die Kategorie (I), empfindlich bei erhöhter Exposition, engl. *Susceptible, increased exposure* (I) eingeteilt. Diese ist seit 2019 so definiert und ersetzt die vorangegangene Kategorie *Intermediär* (I). (EUCAST *Clinical Breakpoint tables* v. 8.0-v. 12.0). Als empfindlicher Referenzstamm und zur Kontrolle wurde ebenfalls entsprechend der EUCAST Vorgaben *E. coli* ATCC® 25922 verwendet. Die Referenzwerte für diesen Stamm wurden der entsprechenden Tabelle der CLSI entnommen (CLSI *Reference tables for QC-strains*).

Die der Bewertung zugrundeliegenden Grenzwerte aus der Breakpoint-Tabelle der EUCAST für *Enterobacterales* (neue Taxonomie seit Version v. 8.0, vormals *Enterobacteriaceae*) sind in Tabelle 6-20 auszugsweise für die in der Arbeit verwendeten Antibiotika aufgelistet. Die Grenzwerte für die hier beschriebenen Substanzen haben sich in den neuern Versionen der *Breakpoint Tables* für Imipenem, Gentamicin und Ciprofloxacin teilweise geändert. Die neueren Grenzwerte die bis Version v. 12.0 für 2022 für sie galten sind in einer extra Zeile aufgeführt. Für die anderen Substanzen haben sich die Grenzwerte nicht verändert.

Für Ceftolozan/Tazobactam unterschieden sich zunächst die jeweiligen Breakpoints der Organisationen CLSI und EUCAST (EUCAST *clinical breakpoints tables* v 8.0). Während die CLSI einen Wert bis 2 µg/mL als sensibel kategorisiert ($S \leq 2$), war es bei der EUCAST nur bis 1 µg/mL sensibel ($S \leq 1$) und ab 1 µg/mL resistent ($R \geq 1$). Inzwischen wurden die Werte der EUCAST angepasst und definieren ebenfalls eine MHK bis zu 2 µg/mL als sensibel und eine darüber liegende als resistent (EUCAST *clinical breakpoints tables* v. 12.0).

Für Kanamycin und Tetracyclin werden von der EUCAST keine Breakpoints angegeben. Daher wurden die beiden Substanzen im Vergleich zu sensitiven Stämmen für Kanamycin ab einer MHK von 50 µg/mL und für Tetracyclin ab einer MHK von 10 µg/mL als resistent bewertet.

Tabelle 6-20: Übersicht der Grenzwerte für die Empfindlichkeitsbestimmung bei Enterobacterales für die in der Arbeit verwendeten Antibiotika und ihre Grenzen für Empfindlichkeit - Sensibilität (S) und Resistenz (R). Entnommen aus „Clinical Breakpoint Tables v. 8.0-v 12.0“ der EUCAST. Referenzwerte für den Qualitätskontrollstamm *E. coli* ATCC® 25922 aus „MIC-Ranges for the QC reference strains given by CLSI“

Substanz	Breakpoints MHK (mg/L), oder (µg/mL)		Disk-Test Breakpoints Zonen-Durchmesser (mm)			<i>E. coli</i> ATCC® 25922 QC (MHK)
	S ≤	R >	Gehalt (µg)	S ≥	R <	
Ampicillin	8	8	10	14	14	2-8
Amoxicillin	8	8	-	-	-	2-8
Amoxicillin + Clavulansäure (2 mg/L)	8	8	20 + 10	19	19	2-8
Cefepim	1	4	30	27	24	0,03-0,06
Cefotaxim	1	2	5	20	17	0,03-0,12
Ceftazidim	1	4	10	22	19	0,125-0,25
Ceftolozan + Tazobactam (4 mg/L) Neu ab v. 12.0 (2022)	1 2	1	30 + 10	23	23	-
Imipenem v. 8.0 Neu nach v. 9.0 (2019) Neu ab v. 11.0 (2021)	2	8 4	10	22	16 17 19	0,125
Meropenem	2	8	10	22	16	0,016-0,03
Aztreonam	1	4	30	26	21	0,125
Ciprofloxacin v. 8.0 Neu ab v. 9.0 (2019)	0,25	0,5	5	26 25	24 22	0,004-0,015
Gentamicin v. 8.0 Neu ab v. 10.0 (2020)	2	4 2	10	17	14 17	0,25-1
Chloramphenicol	8	8	30	17	17	2-8
Kanamycin	-	-	-	-	-	-
Tetracyclin	-	-	-	-	-	0,25-0,5

6.2.2.5.1 Bewertung der Disk-Tests

Die Ergebnisse der Agardiffusion (Disk-Tests) für Ciprofloxacin und Gentamicin wurden nach den standardisierten EUCAST Kriterien bewertet (vgl. Kap. 6.2.2.5). Die Bewertung der PEG-Stämme von 2016 entspricht v. 9.0 und v. 10.0 für Ciprofloxacin. Für Gentamicin entspricht sie v. 9.0, wonach ein Wert von 16 mm als (I) eingestuft war, der nach v. 10.0 (R) resistent ist.

6.2.2.5.2 Bewertung der Cefotaxim und Ceftazidim Disk-Tests

Für die getesteten Cephalosporine Cefotaxim und Ceftazidim wichen die verwendeten Disks mit je 30 µg Wirkstoff von der standardisierten Antibiotikabeladung der EUCAST ab, welche 5 µg für Cefotaxim und 10 µg für Ceftazidim beträgt (ESCMID 2019). Die Werte wurden daher angelehnt an die entsprechenden Kriterien bewertet, wobei sich Empfindlichkeit an den Werten der sensiblen (empfindlichen) ATCC-Referenzstämmen bemaß. Dieses Problem wurde durch den Vergleich der verschiedenen Versionen der EUCAST *breakpoint tables* mit den Werten nach v. 9.0 und v. 10.0 und unter Mitbestimmung der ATCC-Stämme gelöst. Anhand deren Ergebnisse und der Referenzwerte wurde in resistent und empfindlich eingestuft (vgl. Kap. 6.2.2.5.1). Da sich Resistenz am Hemmhofes in Millimeter bemisst, wie er laut der EUCAST angegeben ist und dort für eine Beladung von 5 µg für Cefotaxim ein Wert von < 17 mm als R definiert, wurde dieser Wert bei einer höheren Disk-Beladung auch als resistent bewertet. In den Abstufungen des Hemmhofes größer als 17 mm wurde keine Einteilung vorgenommen, bis die Werte für empfindliche Stämme im Bereich um 27 mm erreicht wurden, wie sie für die sensiblen ATCC-Referenzstämmen ermittelt wurden. Für Ceftazidim, bei einer Beladung von 30 µg anstatt 10 µg wurden die Hemmhöfe auf Basis von ATCC 25922 so bewertet, dass empfindliche Stämme im Bereich von 26 mm und darüber lagen und resistente Stämme bei unter 17 mm und bis zu 23 mm.

6.2.2.5.3 Bewertung der β -Lactamase-Inhibitor Aktivität

Für diese Testung mussten aufgrund von Nichtverfügbarkeit der kommerziellen Disks mit einer Beladung von 30 µg Ceftazidim/10 µg Clavulansäure, auf ebensolche einer älteren, das Verfalldatum überschritten habenden Charge verwendet. Bei den ATCC-Stämmen, die

Kontrollstämme der standardisierten Disk-Testung sind, zeigte sich ein Rückgang um 4-5 mm des Hemmhofdurchmessers für die verwendeten Disks mit dem Nennwert von 30 µg Ceftazidim/10 µg Clavulansäure gegenüber den Disks mit 30 µg Ceftazidim. Da diese Referenzstämme keine β -Lactamasen besitzen, und daher theoretisch kein Effekt zu erwarten ist, wurde der tatsächlich gemessene Rückgang bei der Auswertung der Teststämme berücksichtigt, da er wahrscheinlich auf einen Wirkstoffverfall zurückzuführen ist (vgl. dazu Kap. 3.6.1). Es wurde nur ein Anstieg des Hemmhofdurchmessers von mehr als (die für die Kontrollstämme festgestellten) 4-5 mm Differenz als Hemmung der (ESBL)- β -Lactamase durch den β -Lactamase Inhibitor Clavulansäure als positiv bewertet. Diese Testung wurde lediglich unter Vorbehalt als Hinweis auf eine ESBL gewertet.

6.2.2.6 Wachstumskurven (oCelloscope™)

Für die Aufnahme von Wachstumskurven wurden die Zellen im oCelloscope™ vermessen. Die Messung beruht auf Lichtmikroskopie-Kameraaufnahmen, die in einer Mikrotiterplatte Schichtweise durch die Probe gemacht werden und zur Empfindlichkeitsbestimmung genutzt werden können (Fredborg *et al.* 2013). Die vermessene Probe wird anhand der Bilder analysiert und das Zellwachstum als Kurve im Verlauf der Zeit aus den einzelnen Messpunkten berechnet und dargestellt.

Für die Messungen wurde eine Mikrotiterplatte (Nunc™) mit planem Boden verwendet und mit einer wie bei der MHK-Bestimmung (vgl. Kap 6.2.2.2.1) eingestellten Bakteriensuspension in Medium beschickt. Es wurde standardmäßig Müller-Hinton Medium verwendet, mit den zu vermessenden antibakteriellen Substanzen versetzt, dann mit der Bakteriensuspension und anschließend in die Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wurde unmittelbar nach Beschickung im Gerät platziert und für die gewünschte Zeit vermessen. Standardisiert wurde ein Messintervall alle 20 min oder alle 30 min gewählt und die Messung für 8 h, 12 h 16 h oder 20 h aufgenommen. Für die Auswertung wurde die *background corrected Absorption* (BCA)-Kurve verwendet. Negativkontrollen beinhalteten nur Medium. Als Kontrolle der MHK-/Wachstumsversuche wurde parallel eine Makrodilution durchgeführt (vgl. Kap. 6.2.2.2.2).

6.2.3 Konjugationsexperimente

6.2.3.1 Konjugation

Für die Experimente zur Konjugation wurden jeweils zwei Bakterienstämme in Mischkultur co-inkubiert und anschließend auf erworbene Resistenzen hin selektiert und untersucht.

Als Donor-Stämme wurden der Referenzstamm *E. coli* C600SN, der die Plasmide pRP1H und pBP507 trägt, zur Etablierung des Versuchs und die klinischen *E. coli* ST131 Isolate eo791, eo795, QUC02, QU008, QU015, QU061 und QU102 verwendet. Als Rezipient wurde *E. coli* SG22215 verwendet, welcher die spezifischen genomischen Marker (*clpP::cat*, *clmR*, *lac-*) trägt. Bei den Markern handelt es sich um eine *in frame* Insertion des Gens *cat* in *clpP*, welches für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase codiert, die Resistenz gegen Chloramphenicol (*clmR*) vermittelt und die Unfähigkeit Lactose abzubauen (*lac-*).

Die Stämme wurden jeweils als Übernachtskulturen in Gegenwart der relevanten Antibiotika angezogen. Von diesen ÜNKs wurde je 1 mL Bakterienkultur zentrifugiert, das Nährmedium verworfen, die Zellen in neuem antibiotikafreiem Medium resuspendiert und dann zu gleichen Teilen, in ein steriles Glasröhrchen gegeben und vermischt. Pro Versuch wurde jeweils ein klinisches *E. coli* ST131 Isolat mit dem Rezipienten *E. coli* SG22215 zusammengebracht. Die so entstandene Mischkultur wurde anschließend in Ruhe, ohne Schütteln im Brutschrank bei 37 °C standardmäßig für 3 Stunden inkubiert. Daneben wurden die Versuche auch mit einer Inkubationszeit von 5 Stunden durchgeführt. Nach der Inkubation wurde auf potentielle Transkonjuganden von *E. coli* SG22215 mit dem jeweiligen *E. coli* ST131-O25b Isolat selektiert.

6.2.3.2 Selektion von Transkonjuganden

Nach der Inkubation wurde die Mischkultur mit Kochsalzlösung seriell verdünnt. Von der 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} Verdünnung wurden je 50µL auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion potentieller Transkonjuganden ausgebracht. Der Rezipienten-Stamm *E. coli* SG22215 wurde stets mit Chloramphenicol selektiert, da diese enzymvermittelte Resistenz bei diesem Stamm im Genom verankert ist. Auf die potentiell übertragene Resistenz wurde mit den entsprechenden Antibiotika, gegen die der Donor-Stamm resistent war sowie

Chloramphenicol für den Rezipienten selektiert. Die verwendeten Selektionskonzentrationen sind in Tabelle 6-11 dargestellt. Dazu wurden die Antibiotika der potentiell durch Konjugation hinzugewonnen Resistenzen Ampicillin, Cefotaxim, Gentamicin und Kanamycin jeweils in Kombination mit Chloramphenicol, dem genetischen Marker für *E. coli* SG22215 eingesetzt. Die verschiedenen Verdünnungen der Mischkultur wurden auf den entsprechenden Antibiotika enthaltenden Nährböden ausplattiert. Die Selektionsplatten und alle Kontrollplatten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert und anschließend auf das Wachstum von Kolonien überprüft. Die gewachsenen Kolonien potentieller Transkonjuganden (TKs) wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, erneut auf Selektionsplatten mit den entsprechenden Antibiotika in Kombination mit Chloramphenicol vereinzelt und wieder über Nacht bei 37° C inkubiert. Zur Unterscheidung der Stämme und Verifizierung des Phänotyps wurden die TKs zusätzlich auf Chinablau-Lactose-Agar mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Die Zellen, die einen weißen Phänotyp zeigten und somit ein nur für TKs mögliches Wachstumsverhalten, wurden dauerhaft kultiviert und weiter untersucht.

6.2.3.3 Charakterisierung der Transkonjuganden

Die Transkonjuganden von *E. coli* SG22215 (*clpP::cat*, *clmR*, *lac*-) wurden zunächst auf Chinablau-Lactose und Chloramphenicol-haltigem Agar ausgestrichen um zu sichern, dass sie den stammspezifischen Eigenschaften *clmR* und *lac*- von *E. coli* SG22215 entsprachen. Weiter wurde durch Ausimpfen (Tüpfeln) und Inkubation auf antibiotikahaltigen Agarplatten geprüft, welche weiteren Resistenzen die Transkonjuganden besaßen.

6.2.3.3.1 Nachweis des Stammhintergrunds von *E. coli* SG22215

Die Transkonjuganden von *E. coli* SG22215 (*clpP::cat*, *clmR*, *lac*-) wurden auf die Charakteristika des Gen *cat*, welchen in diesem Stamm *in frame* in *clpP* liegt geprüft. Es bedingt, dass das Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) exprimiert wird (Hoskins *et al.* 2000), welches die Resistenz gegen Chloramphenicol erzeugt und daher als phänotypischer und genotypischer Marker genutzt werden kann.

Der Nachweis des Stammhintergrunds von *E. coli* SG22215 wurde anhand des charakteristischen Markers (*clpP::cat*, *clmR*, *lac*-) phänotypisch über die Chloramphenicolresistenz (*clmR*) Lactoseabbau-Negativität (*lac*-) geführt. Dazu wurde er in Gegenwart von Chloramphenicol und auf Chinablau-Lactose-Agar angezogen, wo er im Gegensatz zu den untersuchten klinischen Stämmen weiße Kolonien bildet.

Genotypisch wurde der Stamm über seinen spezifischen genomischen Marker *clpP::cat* identifiziert. Durch die Insertion in *clpP* vergrößert sich das amplifizierte Genprodukt von ursprünglich 588 bp auf ca. 1500 bp. Die Reaktionsbedingungen für die PCR auf *clpP* sind in Kap. 6.2.9.4 beschrieben. Die PCR-Produkte wurde nach Trennung im Agarosegel beurteilt.

6.2.3.3.2 Bestätigung der Resistenz

Zur Messung der erworbenen Resistenzen der Transkonjuganden, wurden die entsprechenden MHKs der jeweiligen Substanzen bestimmt, wie in Kap. 6.2.2.2 beschrieben. Die MHKs wurden jeweils für Donor, Rezipienten und Transkonjuganden parallel bestimmt.

6.2.3.3.3 Nachweis übertragener Plasmide von *E. coli* ST131 Isolat eo791

Für den Nachweis der übertragenen (R-) Plasmide von *E. coli* ST131 eo791 auf den empfindlichen Stamm *E. coli* SG22215, wurden Donor, Rezipient und Transkonjuganden in Gegenwart ihrer Selektionsantibiotika in Übernachtskultur angezogen. Für *E. coli* SG22215 wurde Chloramphenicol und für *E. coli* eo791 Ampicillin, Gentamicin, oder Cefotaxim verwendet. Die Transkonjuganden wurden mit der entsprechenden Kombination von Chloramphenicol mit einem weiteren Antibiotikum angezogen, entweder Ampicillin, Gentamicin oder Cefotaxim. Anschließend wurden die Plasmide mittels alkalischer Lyse, Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanolfällung (vgl. Kap. 6.2.5) präpariert. Die Plasmidisolierung wurde stets vergleichend unter Mitführen des *E. coli* ST131 Ausgangsstamms (Donor) und *E. coli* SG22215 (Rezipient) durchgeführt. Als Referenz zur Abschätzung der Größen wurde stets einer der Stämme *E. coli* C600S bzw. C600SN (vgl. Kap. 6.1.1.3) mitgeführt, die das 61 kbp große Plasmid pRP1H, bzw. bei C600SN pRP1H und pBP507 (9,2 kbp) tragen, und als Marker verwendet. Die Proben wurden anschließend

elektrophoretisch auf einem 0,8-1,0 %igen Agarosegel getrennt, bis eine hohe Auftrennung im oberen Größenbereich erzielt war. Sie wurden anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt (Kap. 6.2.12.4.3) und die Plasmidprofile verglichen.

6.2.3.3.4 Nachweis übertragener Resistenzgene von *E. coli* ST131 eo791

Für den molekularen Nachweis der Resistenzgene von *E. coli* ST131 eo791 in den TKs von *E. coli* SG22215 wurden die Gene mittels PCR nachgewiesen. Für die Ampicillinresistenz wurde ein Teil aus dem Gen *bla_{TEM}* amplifiziert. Der Nachweis der Cefotaximresistenz erfolgte durch die Amplifizierung eines Teils aus dem Gen *bla_{CTX-M}*. Für *E. coli* eo791 wurde die *bla_{CTX-M-Gr.-1}* PCR verwendet. Daneben wurde stets mit einer PCR auf *clpP* auf den genetischen Marker (Größe von *clpP*, s.o.) geprüft. Der Nachweis der Lactamase (*bla*) Gene wurde neben dem genetischen Marker *clpP* erbracht, entweder mit zwei einzelnen PCRs oder mittels einer Duplex-PCR auf *clpP* und *bla_{TEM}*. Die Reaktionsbedingungen der PCRs zeigt Kap. 6.2.9.

6.2.4 Isolierung von DNA

6.2.4.1 Gewinnung von DNA mit der Kochmethode

Zur schnellen Gewinnung der bakteriellen DNA wurde die Kochmethode verwendet. Dazu wurden 3-5 Bakterienkolonien mit einem sterilen Glasstab von einer Agarplatte gepickt, in 100 µL Reinstwasser suspendiert und für 15 min bei 99 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der die DNA enthaltende klare Überstand abgenommen. Dieser wurde bei -20 °C eingefroren. Die so erhaltene DNA liegt darin neben diverse andere Zellbestandteilen und Salzen vor, und wurde stets zeitnah für Anwendungen wie z. B. Nachweisreaktionen verwendet, die mit einer geringen Reinheit auskommen.

6.2.4.2 DNA-Isolierung mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit

Für eine qualitativ hochwertige DNA-Isolierung wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurde 1 mL frischer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstamms für 10 min bei 7.500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 180 µL PBS oder ATL-Puffer resuspendiert. Mit 20 µL Proteinase K versetzt wurde für

10 min bei 56 °C und nach Zugabe von 200 µg RNase für weitere 2 min bei RT inkubiert. Nach jeweils sehr gutem Durchmischen wurden zunächst 200 µL AL-Puffer, dann 200 µL Ethanol zugegeben und alles auf die Mini Spin-Säule überführt. Nach jeweiligem Zugeben, Zentrifugieren und Verwerfen der Lösung des AW1-Puffers nach 1 min bei 8.000 rpm sowie anschließend des AW2-Puffers für 3 min bei 14.000 rpm wurde die DNA mittels 200 µL des 1:10 verdünnten AE-Puffers nach 1 min Inkubation durch Zentrifugieren für 1 min bei 8.000 rpm von der Säule eluiert. Die so isolierte DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

6.2.4.3 Einstellen der Konzentration isolierter DNA

Die isolierte DNA der Bakterienstämme wurde mittels NanoDrop™ oder Qubit® vermessen und hinsichtlich ihrer Konzentration und Reinheit kontrolliert (vgl. Kap. 6.2.12). Waren die Anforderungen an DNA-Qualität, Konzentration und Reinheit, sowie Salzgehalt erfüllt, wurde die DNA hinsichtlich ihrer Konzentration für alle Teststämme normiert. Dazu wurde von jeder einzelnen Probe die Menge (in µL), die 100ng DNA enthält, mit der entsprechenden Menge 1:10 verdünntem AE-Puffer zu 100 µL ergänzt, sodass die resultierende DNA-Konzentration auf 1 ng/µL eingestellt war.

Ausgehend von Menge und Konzentration der Isolierten DNA ergibt sich:

$$100 \text{ ng DNA} = 100 \text{ µL} * 1 \frac{\text{ng DNA}}{\text{µL}} = x \text{ µL} * y \frac{\text{ng DNA}}{\text{µL}}$$

wobei y die nach Qubit® oder NanoDrop™ gemessene DNA-Konzentration in ng/µL ist.

6.2.5 Isolierung von Plasmiden

Zur selektiven Isolierung der Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Diese wurde 1979 zuerst von Birnboim und Doly beschrieben (Birnboim und Doly 1979). Sie ist heute ein Standardverfahren zur Plasmidisolierung und wurde in dieser Arbeit auf Basis der Standardmethode (Green and Sambrook 2012) wie folgend beschrieben durchgeführt.

6.2.5.1 Alkalische Lyse

Als Ausgangsmaterial wurden 1-3mL einer frischen Übernachtskultur verwendet. Sie wurden bei 13.000 rpm zentrifugiert, die Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung oder STE-Puffer versetzt, gewaschen, erneut zentrifugiert und in 100 µL Resuspensionspuffer oder GTE-Puffer mit RNase-Zusatz aufgenommen. Sie wurden durch vortexen resuspendiert und 2 min inkubiert. Anschließend wurden sie mit 200 µL eiskaltem Lysepuffer versetzt, 10-mal invertiert, auf Eis gelagert, nach 2 min mit eiskaltem Neutralisationspuffer versetzt und wieder 10-mal invertiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe 3 min mit 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid DNA abgenommen. An diesem Punkt wurde, wenn nötig eine Behandlung mit Phenol-Chloroform durchgeführt, um die reine Plasmid DNA zu erhalten. War dies nicht nötig, so folgte anschließend direkt die Ethanol-Fällung der DNA.

6.2.5.2 Phenol-Chloroform Extraktion

Die wässrige DNA-Probe aus der alkalischen Lyse wurde mit dem ihr gleichen Volumen einer fixen Mischung 25:24:1 (v/v) aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol versetzt, auf dem Vortex gemischt und anschließend 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Diese Phenol-Chloroform Extraktion wurde ein bis zweimal in gleicher Weise wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase separiert und mit einem Zehntel ihres Volumens an 3 M Natrium-Acetatlösung versetzt.

6.2.5.3 Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-Probe wurde mit dem zweifachen ihres Volumens an absolutem Ethanol versetzt, für 2 min inkubiert und anschließend 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Probe mit 1 mL 70 %igem Ethanol versetzt, 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls wiederholt. Anschließend wurde das DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet und in 10-30 µL 1:10 verdünntem EB-Puffer oder 1:10 verdünntem TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

6.2.6 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Untersuchung und Sequenzierung einzelner Gene mussten diese erst vervielfältigt werden. Dafür wurde die 1983 von Mullis entdeckte und 1985 erstmals beschriebene Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt (Saiki *et al.* 1985). Dabei wird ein Teil der DNA durch eine DNA-Polymerase amplifiziert. Die Methode wurde durch den Einsatz einer thermostabilen Polymerase (Saiki *et al.* 1988) weiterentwickelt und ist heute die Standardmethode zur DNA-Amplifizierung. Ihr Prinzip beruht auf der selektiven Vervielfältigung eines durch zwei spezifische Primer definierten DNA-Abschnitts durch die Polymerase und kann durch Temperatur, Zeit und Zyklen gesteuert werden.

6.2.6.1 PCR mit der DreamTaq und Phusion Polymerase

Die grundlegende Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PCR und Wahl der Temperatur für die Reaktionen orientierte sich an den Herstellerangaben der verwendeten DNA-Polymerasen. Standardmäßig wurde die DreamTaq-Polymerase verwendet. Für eine fehlerfreie Amplifikation und fürs RP-MLST-II wurde die Phusion Polymerase verwendet.

Die generellen Ansätze für die PCR-Ansätze mit der DreamTaq und Phusion Polymerase von Thermo Scientific für einen 50 µL Ansatz sind in Tabelle 6-21 aufgeführt.

Tabelle 6-21: Zusammensetzung der Bestandteile der Standard PCR-Ansätze (50 µL) mit DreamTaq und Phusion.

PCR-Ansatz mit DreamTaq Polymerase	
Komponenten	Menge
10x DreamTaq Puffer	5 µL
dNTP Mix [je 2 mM]	1,5-5,0 µL
Forward Primer [10 pmol/µL]	1,0 µL
Reverse Primer [10 pmol/µL]	1,0 µL
Template DNA [10 pg - 1 µg]	1,0-2,5 µL
DreamTaq Polymerase [5 U/µL]	0,25 µL
DMSO (optional)	0-5,0 µL
Wasser (Reinstwasser)	ad 50 µL
Gesamtvolumen	50 µL

PCR-Ansatz mit Phusion Polymerase	
Komponenten	Menge
5x HF oder GC Puffer	10 µL
dNTP Mix [je 2 mM]	1,5-5,0 µL
Forward Primer [10 pmol/µL]	1,0 µL
Reverse Primer [10 pmol/µL]	1,0 µL
Template DNA [10 pg - 1 µg]	1,0-2,5 µL
Phusion Polymerase [20 U/µL]	0,05 µL
DMSO (optional)	0-5,0 µL
Wasser (Reinstwasser)	ad 50 µL
Gesamtvolumen	50 µL

Die für die PCR verwendeten Reagenzien wurden stets in den hier angeführten Konzentrationen verwendet, die in später beschriebenen spezifischeren PCR-Bedingungen

nicht mehr aufgeführt werden, außer wenn abweichend. Je nach benötigter Gesamtmenge wurde der Ansatz proportional entsprechend hoch oder runter skaliert und so auf 10 µL, 20 µL, 25 µL oder 100 µL angepasst. Für den Ansatz einer PCR für N Proben und eine Negativkontrolle/*no template control* (NTC) wurde stets ein Mastermix (MM) für N+2 Proben angesetzt, dieser nach Homogenisierung auf einzelne Gefäße aufgeteilt und diesen dann jeweils die DNA einer Probe bzw. Wasser in der NTC zugegeben.

Alle benötigten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, kurz gemischt und zentrifugiert. Sie wurden dann nacheinander in einem sterilen, DNA-freien Reaktionsgefäß zusammengegeben, beginnend mit Wasser, gefolgt von Puffer, den Primern sowie dNTPs und dann sonstigen weiteren Bestandteilen wie DMSO angesetzt. Zuletzt wurde das Enzym hinzugegeben, der Ansatz gut vermischt und zentrifugiert. Anschließend wurde die Reaktion im Thermocycler in einem auf das Produkt abgestimmten Temperaturprogramm durchgeführt. Nach Ende der Reaktion wurde der Ansatz für kurze Zeit bei 4 °C und dauerhaft bei -20 °C gelagert.

Das Temperaturprogramm wurde nach der Polymerase und hinsichtlich der spezifischen Temperatur der Primer-Anlagerung (Annealing) angepasst. Wenn nötig wurde die optimale Annealing-Temperatur der PCR über einen Temperaturgradienten ermittelt, um eine hohe Spezifität zu erreichen. Die Dauer der Verlängerung (Elongation) wurde an die Länge des Produkts angepasst. Die eingesetzte Menge an dNTPs und Primern wurde analog den Empfehlungen des Herstellers für längere Produkte oder bei höherer Anzahl an Zyklen erhöht.

6.2.6.2 Primerdesign

Die für die PCRs benötigten Primer wurden in Vector NTI durch Analyse der Sequenzen bekannter Referenzstämme wie *E. coli* MG1655 und *E. coli* CFT073 designt. Die Sequenzen der einzelnen Gene stammten aus der NCBI-Datenbank. An diesen wurden geeignete Bereiche für die Primer ausgewählt und mit Vector NTI auf Loop-Strukturen geprüft. Weitere Bindestellen innerhalb des Genoms wurden über BLAST (NCBI) identifiziert. Im Hinblick auf Sequenzen, die auf *E. coli* ST131 Isolate abzielen, wurden die in Kap. 6.1.1.4 aufgeführten Referenzsequenzen für ST131 Stämme verwendet.

Das Design der Primer für das MLST erfolgte auf Basis der Sequenzen des ST131 Stamms NA114 mit Vector NTI und dem Primer BLAST Tool der NCBI (Ye *et al.* 2012). Diese Primer wurden fortan zur Amplifikation der MLST-Produkte verwendet. Für die MLST Genloci des Pasteur Schemas wurden die Primer von Anfang an mit BLAST designt und geprüft.

6.2.6.3 Amplifizierung der Housekeeping-Gene

Im Folgenden sind die Bedingungen zur Amplifikation der Housekeeping-Gene für die RP-MLST-Sequenzierung der beiden in der Arbeit verwendeten MLST-Schemata beschrieben.

6.2.6.3.1 Housekeeping-Gene des MLST Achtman-Schemas

Die Housekeeping-Gene nach Achtman wurden mit den in Tabelle 6-22 angegebenen Primern amplifiziert. Tabelle 6-22 zeigt außerdem die Größen der resultierenden PCR-Produkte und die Anlagerungstemperaturen ($T_{An.}$) für die Taq (T) und Phusion (P) Polymerasen. Die verwendete Proben-DNA hatte standardisiert eine Konzentration von 0,1 ng/μL. Bei verhältnismäßig stark amplifizierten PCR-Produkten wurde auf 0,01 ng/μL eingestellte DNA verwendet, bei relativ schwachen Produkten DNA mit einer Konzentration von 1 ng/μL.

Tabelle 6-22: MLST-Gene des Achtman-Schemas und der verwendeten Primer zur Amplifikation der MLST-relevanten Bereiche (vgl. Tabelle 6-5), den resultierenden Größen der PCR-Produkte und den Primer-Anlagerungstemperaturen.

Gen:	<i>adk</i>	<i>purA</i>	<i>fumC</i>	<i>recA</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>gyrB</i>
Pr. for	adk_5_-138	purA_5_234	fumC_5_47	[recA959R]*	icd_5_1	mdh_5_77	gyrB_5_80
Pr. rev	adk_3_628	purA_3_1050	fumC_3_10	recA_3_918	icd_3_878	mdh_3_875	gyrB_3_959
Größe	766 bp	817 bp	769 bp	815 bp	878 bp	799 bp	879 bp
$T_{An.}(T)$	57°	61°	59°	59°	60°	61°	61°
$T_{An.}(P)$	59°/60°	59°/60°	61°/60°	59°/60°	59°/60°	59°/60°	69°/60°

Legende: Pr.: Primer; for: *forward*; rev: *reverse*; * gekürzt [Originalname], vgl. Kap. 6.1.2.; ($T_{An.}$): Annealingtemperatur in °C im Programm der PCR mit der Taq-Polymerase (T), sowie der Phusion-Polymerase (P).

Die verwendeten Reaktionsbedingungen und Temperaturprogramme sind in Tabelle 6-23 aufgeführt. Verwendet wurde Proben-DNA mit einer Konzentration von 0,1 ng/μL.

Tabelle 6-23: Reaktionsansätze und Temperaturprogramme für die PCRs mit Taq-Polymerase (Taq) links, sowie der Phusion-Polymerase (Phusion) rechts.

PCR-Ansatz (Taq)		Menge [μL]	PCR-Ansatz (Phusion)		Menge [μL]
Wasser		17,63	Wasser		11,75
Taq-Puffer 10x		2,5	HF-Puffer 5x		4
Primer for [10 pmol/ μL]		0,5	Primer for [10 pmol/ μL]		0,5
Primer rev [10 pmol/ μL]		0,5	Primer rev [10 pmol/ μL]		0,5
dNTPs [je 2 mM]		0,75	dNTPs [je 2 mM]		0,75
DreamTaq [5 U/ μL]		0,125	Phusion [20 U/ μL]		0,1
DMSO		2	DMSO		1,6
DNA		1	DNA		0,8
Gesamtvolumen		25	Gesamtvolumen		20

PCR-Programm (Taq)		T [$^{\circ}\text{C}$]; t [min/s]	PCR-Programm (Phusion)		T [$^{\circ}\text{C}$]; t [min/s]
Initiation		95° ; 5'	Initiation		98° ; 30''
Denaturierung		95° ; 30''	Denaturierung		98° ; 10''
Annealing		$T_{\text{an}}(\text{T})^{\circ}$; 30''	Annealing		$T_{\text{an}}(\text{P})^{\circ}$; 15''
Elongation		72° ; 40''	Elongation		72° ; 15''
Zyklen		29x	Zyklen		29x
finale Elongation		72° ; 5'	finale Elongation		72° ; 5'
Ende		4°	Ende		4°

6.2.6.3.2 Housekeeping-Gene des MLST-Schemas des Institut Pasteur

Die Housekeeping-Gene des Pasteur-Schemas wurden mit den in Tabelle 6-24 angegebenen Primern amplifiziert, die Tabelle zeigt auch die Größen der resultierenden PCR-Produkte und die Anlagerungstemperaturen.

Tabelle 6-24: MLST-Gene des Pasteur-Schemas und der zur Amplifikation der relevanten Bereiche verwendeten Primer (vgl. Tabelle 6-5), den resultierenden Größen der PCR-Produkte und den Primer-Anlagerungstemperaturen (T_{An}), die im Temperaturprogramm der PCR mit der Taq-Polymerase (T), sowie der Phusion-Polymerase (P) verwendet wurden.

Gen	<i>dinB</i>	<i>icd</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>
Primer for	dinB_5_- 14	icdA_5 _352	pabB_5 _418	polB_5_ 1012	putP_5 _693	trpA_5 _41	trpB_5 _464	uidA_5 _239
Primer rev	dinB_3 _703	icdA_3 _1232	pabB_3 _1151	polB_3_ 1875	putP_3 _1464	trpA_3 _795	trpB_3 _1274	uidA_3 _1001
Produkt	717 bp	881 bp	734 bp	863 bp	772 bp	753 bp	810 bp	763 bp

T _{An.} (T)	57,0 °C	55,0 °C	55,0°C	57,0°C	57,0°C	55,0°C	60,0°C	60,0°C
T _{An.} (P)	60,0°C	60,0°C	60,0°C	60,0°C	60,0°C	60,0°C	60,0°C	60,0°C

Reaktionsbedingungen und Temperaturprogramme sind in Tabelle 6-25 abgebildet. Die eingesetzte Proben-DNA war auf eine Konzentration von 0,1 ng/μL eingestellt.

Tabelle 6-25: Reaktionsansätze und Temperaturprogramme für die PCRs mit Taq-Polymerase (Taq) links, sowie der Phusion-Polymerase (Phusion) rechts der Gene des MLST-Pasteur Schema.

PCR-Ansatz (Taq)		Menge [μL]	PCR-Ansatz (Phusion)		Menge [μL]
Wasser		19,225	Wasser		16,8/16,4/15,8*
Taq-Puffer 10x		2,5	HF-Puffer 5x		5
Primer for [10 pmol/μL]		0,5	Primer for [10 pmol/μL]		0,5/0,7/1,0*
Primer rev [10 pmol/μL]		0,5	Primer rev [10 pmol/μL]		0,5/0,7/1,0*
dNTPs [je 2 mM]		0,75	dNTPs [je 2 mM]		0,75
DreamTaq [5 U/μL]		0,125	Phusion [20 U/μL]		0,05
DMSO		0,4	DMSO		0,4
DNA [0,1 ng/μL]		1	DNA [0,1 ng/μL]		1,0
Gesamtvolumen		25	Gesamtvolumen		25

PCR-Programm (Taq)		T [°C]; t [min/s]	PCR-Programm (Phusion)		T [°C]; t [min/s]
Initiation		95° ; 5'	Initiation		98° ; 30''
Denaturierung		95° ; 30''	Denaturierung		98° ; 10''
Annealing		T _{An.} (T)° ; 30''	Annealing		60° ; 15''
Elongation		72° ; 40''	Elongation		72° ; 15''
Zyklen		29x	Zyklen		29x
finale Elongation		72° ; 5'	finale Elongation		72° ; 5'
Ende		4°	Ende		4°

*Zur Amplifikation wurden für *icd*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* und *uidA* je 0,5 μL der Primer (for und rev) verwendet. Im Ansatz von *dinB* wurden je 0,7 μL beider Primer eingesetzt und bei *pabB* je 1,0 μL, wobei der Wasseranteil im Ansatz entsprechend reduziert wurde.

6.2.6.4 Amplifizierung der Target- und resistenzassoziierten Gene

Die Target-Gene für das RP-MLST wurden mit den in Tabelle 6-26 und Tabelle 6-28 angegebenen Primern amplifiziert. Reaktionsbedingungen und Temperaturprogramme sind in Tabelle 6-27 und Tabelle 6-29 abgebildet. Die eingesetzte Proben-DNA entsprach ebenfalls einer Konzentration von 0,1 ng/μL.

Tabelle 6-26: RP-MLST Target-Gene, die zur Amplifikation verwendeten Primer (vgl. Tabelle 6-5), resultierende Größen der PCR-Produkte und Primer-Anlagerungstemperaturen ($T_{An.}$), die im Temperaturprogramm der PCR mit der Taq-Polymerase (T), sowie der Phusion-Polymerase (P) verwendet wurden.

Gen	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>ompC1_n</i>	<i>ompF2</i>	<i>envZ2</i>	<i>acrA</i>	<i>marRA</i>
Primer for	<i>gyrA</i> _ [5-1]_5' -35	<i>parC</i> S_5_ +138	<i>ompC</i> _5 +31	<i>ompF</i> _5 +441	<i>envZ</i> _5_238	<i>acrR</i> _5_R2b	<i>marR</i> _5' -277
Primer rev	<i>gyrA</i> _ [3-1]_3' +491	<i>parC</i> _3_ +373	<i>ompC</i> 3_ +711	<i>ompF</i> _3 +1347	<i>envZ</i> _3_1448	<i>acrR</i> _3_ +2280	<i>marB</i> _3' +492
Produkt	526 bp	236 bp	700 bp	907 bp	1210 bp	1204 bp	1167 bp
$T_{An.}(T)$	58,0°	55,0°	56,1°	62,0°	60,0°	-	-
$T_{An.}(P)$	60,0°	58,0°	56,0°	62,0°	62,0°	58,0°	64,0°

* Primer in gekürzte Schreibweise, vgl. Kap. 6.1.2.

Tabelle 6-27: Reaktionsansätze und Temperaturprogramme für die PCRs der Target-Gene mit Taq-Polymerase (Taq) links, sowie der Phusion-Polymerase (Phusion) unter Verwendung von HF-Puffer rechts.

PCR-Ansatz (Taq)	Menge [μ L]	PCR-Ansatz (Phusion)	Menge [μ L]
Wasser	19,625/19,225/17,625*	Wasser	16,8/16,75**
Taq-Puffer 10x	2,5	HF-Puffer 5x	5
Primer for [10 pmol/ μ L]	0,5	Primer for [10 pmol/ μ L]	0,5
Primer rev [10 pmol/ μ L]	0,5	Primer rev [10 pmol/ μ L]	0,5
dNTPs [je 2 mM]	0,75	dNTPs [je 2 mM]	0,75
DreamTaq[5 U/ μ L]	0,125	Phusion [20 U/ μ L]	0,05/0,1**
DMSO	0/0,4/2*	DMSO	0,4
DNA [1 ng/ μ L]	1	DNA [0,1 ng/ μ L]	1,0
Gesamtvolumen	25	Gesamtvolumen	25

PCR-Programm (Taq)	T [°C]; t [min/s]	PCR-Programm (Phusion)	T [°C]; t [min/s]
Initiation	95° ; 5'	Initiation	98° ; 30''
Denaturierung	95° ; 30''	Denaturierung	98° ; 10''
Annealing	$T_{An.}(T)$ ° ; 30''	Annealing	$T_{An.}(P)$; 15''
Elongation	72° ; 40''	Elongation	72° ; 15''
Zyklen	29x	Zyklen	29x
finale Elongation	72° ; 5'	finale Elongation	72° ; 5'
Ende	4°	Ende	4°

* Für *ompF2* wurden 0,4 μ L DMSO zugesetzt, für *gyrA* 2 μ L DMSO. **Zur Amplifikation von *acrA*, und *marRA* wurden je 1,0 μ L Phusion Polymerase eingesetzt, wobei der Wasseranteil im Ansatz entsprechend reduziert wurde.

Weitere Target-Gene wurden, wie in Tabelle 6-28 und Tabelle 6-29 beschrieben, amplifiziert.

Tabelle 6-28: Fortsetzung RP-MLST Target-Gene, die zur Amplifikation verwendeten Primer (vgl. Tabelle 6-5), resultierende Größen der PCR-Produkte und Primer-Anlagerungstemperaturen ($T_{An.}$), die im Temperaturprogramm der PCR mit der Taq-Polymerase (T), sowie der Phusion-Polymerase (P) verwendet wurden.

Gen	<i>ompF1</i>	<i>ompC3</i>	<i>ompR-envZ1</i>	<i>micF</i>	<i>acrR</i>
Primer for	ompF_5-161	ompC_5+451	ompR_5_-70	ompC_5-654	acrR_5_2a2
Primer rev	ompF_3+502	ompC-3+1197	envZ_3_379	ompC_3+105	acrR_3_+728
Produkt	664 bp	746 bp	1165 bp	759 bp	950 bp
$T_{An.}(T)$	62,0°	58,6°	60,0°	58,6°	54,0°
$T_{An.}(P)$	55,0°	55,0°	55,0°	55,0°	55,0°

Tabelle 6-29: Reaktionsansätze und Temperaturprogramme für die PCRs der Target-Gene mit Taq-Polymerase (Taq) links, sowie der Phusion-Polymerase (Phusion) unter Verwendung von GC-Puffer rechts.

PCR-Ansatz (Taq)	Menge [µL]	PCR-Ansatz (Phusion)	Menge [µL]
Wasser	19,625/19,225*	Wasser	16,8
Taq-Puffer 10x	2,5	HF-Puffer 5x	5
Primer for [10 pmol/µL]	0,5	Primer for [10 pmol/µL]	0,5
Primer rev [10 pmol/µL]	0,5	Primer rev [10 pmol/µL]	0,5
dNTPs [je 2 mM]	0,75	dNTPs [je 2 mM]	0,75
DreamTaq [5 U/µL]	0,125	Phusion [20 U/µL]	0,05
DMSO	0/0,4*	DMSO	0,4
DNA [0,1 ng/µL]	1	DNA [0,1 ng/µL]	1,0
Gesamtvolumen	25	Gesamtvolumen	25

PCR-Programm (Taq)	T [°C]; t [min/s]	PCR-Programm (Phusion)	T [°C]; t [min/s]
Initiation	95° ; 5'	Initiation	98° ; 30''
Denaturierung	95° ; 30''	Denaturierung	98° ; 10''
Annealing	$T_{An.}(T)$ ° ; 30''	Annealing	$T_{An.}(P)$; 15''
Elongation	72° ; 40''	Elongation	72° ; 15''
Zyklen	29x	Zyklen	29x
finale Elongation	72° ; 5'	finale Elongation	72° ; 5'
Ende	4°	Ende	4°

*Für *ompF1* und *ompR-envZ1* wurden 0,4 µL DMSO zugesetzt und der Wasseranteil entsprechend verringert.

6.2.7 Phylogenie-Bestimmung bei *E. coli* (nach Clermont)

Die PCRs zur Bestimmung der Phylogruppe nach Clermont 2000 waren für die Stämme des BSAC-Kollektivs bereits vor Beginn der Arbeit von A. Heisig und A. Schnasse durchgeführt worden (persönliche Mitteilung). Die Zuordnung in die verschiedenen phylogenetischen Gruppen erfolgte nach dem veröffentlichten Schema (Clermont *et al.* 2000). Die revidierte Methode der Phylogruppen Bestimmung nach Clermont (Clermont *et al.* 2012) wurde mit der ursprünglichen verglichen, insbesondere hinsichtlich der daraus resultierende Einteilung. Bestätigend wurden die Typisierung nach beiden Schemata vergleichend an 12 *E. coli* Isolaten der BSAC-Stämme (je drei der Phylogruppen A, B1, B2 und D) und den Referenzen *E. coli*: MG1655, CFT073, ATCC 8739, ATCC 25922, ATCC 35218 durchgeführt.

Triplex PCR nach (Clermont *et. al* 2000)

Bestandteil	Menge
DNA	2,0
10x Puffer	2,0
<i>chuA.1</i>	1,0
<i>chuA.2</i>	1,0
<i>yjaA.1</i>	1,0
<i>yjaA.2</i>	1,0
<i>TspE4.C2.1</i>	1,0
<i>TspE4.C2.2</i>	1,0
dNTPs	1,0
Polymerase	0,2
H ₂ O	8,8
Gesamt	20,0

Quadruplex PCR (nach Clermont *et. al* 2013)

Bestandteil	Menge
DNA	2,0
10x Puffer	2,0
<i>chuA.1b</i>	1,0
<i>chuA.2</i>	1,0
<i>yjaA.1b</i>	1,0
<i>yjaA.2b</i>	1,0
<i>TspE4.C2.1b</i>	1,0
<i>TspE4.C2.2b</i>	1,0
<i>AceK.f</i>	2,0
<i>ArpA1.r</i>	2,0
dNTPs	1,0
Polymerase	0,2
H ₂ O	4,8
Gesamt	20,0

PCR-Programm der Triplex-PCR

94 °C	30 sec	} x 25
94 °C	5 sec	
61 °C	8 sec	
72 °C	5 min	
4 °C Pause		

PCR-Programm der Quadruplex-PCR

94 °C	30 sec	} x 29
94 °C	5 sec	
59 °C	8 sec	
72 °C	5 min	
4 °C Pause		

Die Trennung der Fragmente erfolgte anschließend gelelektrophoretisch in 1,6 %iger Agarose mit 0,5x TAE-Puffer. Als Kontrollstämmen dienten.

6.2.8 Screening auf *E. coli* ST131-O25b

6.2.8.1 Screening auf *E. coli* ST131-O25b nach Clermont *et al.* 2009

Für das Screening auf *E. coli* ST131-O25b anhand spezifischer SNPs in *pabB* wurde die *trpA-pabB* Duplex-PCR nach Clermont *et al.* 2009 durchgeführt. Tabelle 6-30 zeigt die verwendeten Primer, Zusammensetzung und das Programm der Duplex-PCR zum Screening auf ST131-O25b (Clermont *et al.* 2009).

Tabelle 6-30: Duplex PCR nach Clermont *et al.* 2009. Primer (vgl. Tabelle 6-5).

PCR	<i>trpA-pabB</i> Duplex PCR
Primer <i>trpA</i> forward	trpA_Eco_8_5 [trpA.F]
Primer <i>trpA</i> reverse	trpA_Eco_433_3 [trpA2.R]
Primer <i>pabB</i> forward	pabB_Eco_248_5 [O25pabBspe.F] (5'-TCCAGCAGGTGCTGGATCGI-3')
Primer <i>pabB</i> reverse	pabB_Eco_594_3 [O25pabBspe.R] (5'-GCGAAATTTTTCCCGTACTGTI-3')
Produktgröße:	<i>trpA</i>: 426 bp <i>pabB</i>: 347 bp
PCR-Ansatz (Taq)	Menge [µL]
Wasser	7,45
10x Taq Puffer	1
Primer fw [10 pmol/µL]	0,2 + 0,2
Primer rev [10 pmol/µL]	0,2 + 0,2
dNTPs [je 2 mM]	0,3
DreamTaq [5 U/µL]	0,05
DNA	0,4
Gesamtvolumen	10 µL
PCR-Programm (Taq)	T [°C]; t [min/s]
Initiation	95°; 5'
Denaturierung	95°; 5"
Annealing	65,0°; 10"
Elongation	
Zyklen	29 x
finale Elongation	72°; 5'
Ende	4°

6.2.8.2 Modifizierte *pabB* (ARMS)-*gyrA* Duplex-PCR zum Screening auf *E. coli* ST131-O25b

Die in der Arbeit etablierte *pabB* (ARMS)-*gyrA* Duplex-PCR zum Screening auf die *E. coli* ST131-O25b spezifischen SNPs ist in Tabelle 6-31 aufgeführt. Sie zielt ebenfalls auf den Nachweis der spezifischen SNPs in *pabB* ab, die nach Clermont *et al.* 2009 für ST131 beschrieben sind.

Tabelle 6-31: *pabB* (ARMS)-*gyrA*-Duplex-PCR zum Screening auf *E. coli* ST131-O25b. Primer (vgl. Tabelle 6-5).

PCR	<i>pabB</i> (ARMS)- <i>gyrA</i> Duplex PCR
Primer <i>gyrA</i> forward	<i>gyrA</i> _[<i>gyrA</i> 5-1]_5'_-35_EcoK12 (vgl. Tabelle 6-5)
Primer <i>gyrA</i> reverse	<i>gyrA</i> _[<i>gyrA</i> 3-1]_3'_+491_EcoK12 (Heisig <i>et al.</i> 1993)
Primer <i>pabB</i> forward	<i>pabB</i> _Eco_248'_2_5 (5'-TCCAGCAGGTGCTGGATCGTG-3')
Primer <i>pabB</i> reverse	<i>pabB</i> _Eco_595_3 (5'-GGCGAAATTTTCGCCGTACTGTT-3')
Produktgröße:	<i>gyrA</i>: 526 bp <i>pabB</i>: 348 bp

PCR-Ansatz (Taq)	Menge [µL]
Wasser	7,15
10x Taq Puffer	1
Primer fw [10 pmol/µL]	0,1 (<i>gyrA</i> fw) + 0,3 (<i>pabB</i> fw)
Primer rev [10 pmol/µL]	0,1 (<i>gyrA</i> rv) + 0,3 (<i>pabB</i> rv)
dNTPs [je 2 mM]	0,3
DreamTaq [5 U/µL]	0,05
DNA	0,7
Gesamtvolumen	10 µL

PCR-Programm (Taq)	T [°C]; t [min/s]
Initiation	95°; 5'
Denaturierung	95°; 5''
Annealing	70,0°; 10''
Elongation	72,0; 10''
Zyklen	30 x
finale Elongation	72°; 5'
Ende	4°

6.2.9 Nachweis von β -Lactamase-Genen

Die β -Lactamase-Gene bla_{TEM} , bla_{SHV} , und bla_{CTX-M} wurden mit den nachfolgend aufgeführten PCRs detektiert. Sie dienen zum Screening auf diese Gene, zum direkten Nachweis oder zur Amplifizierung für die spätere Sequenzierung.

6.2.9.1 Duplex-PCR zum Nachweis von bla_{TEM} und bla_{SHV}

Zur Detektion von β -Lactamasen vom TEM und SHV-Typ wurde eine Duplex-PCR nach den in Tabelle 6-32 aufgeführten Bedingungen, basierend auf (Timmerbeil 2007) durchgeführt.

Tabelle 6-32: Reaktionsbedingungen für die Duplex-PCR auf die β -Lactamase-Gene, bla_{SHV} und bla_{TEM} . Primer (vgl. Tabelle 6-5)

PCR	<i>SHV-TEM Duplex</i>	
Gen:	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>
Primer forward	[SHV duplex PCR-F]*	[TEM duplex PCR-F]*
Primer reverse	[SHV duplex PCR-R]*	[TEM duplex PCR-R]*
Produktgröße	746 bp	838 bp

PCR-Ansatz	Menge [μ L]	
Wasser	19,625	
Taq-Puffer 10x	2,5	
Primer for [10 pmol/ μ L]	0,4	0,4
Primer rev [10 pmol/ μ L]	0,4	0,4
dNTPs [je 2 mM]	0,75	
Taq-Polymerase [5 U/ μ L]	0,125	
DMSO	0,4	
DNA [1 ng/ μ L]	1	
Gesamtvolumen	25 μL	

PCR-Programm	T [$^{\circ}$ C]; t [min/s]
Initiation	95 $^{\circ}$; 5'
Denaturierung	95 $^{\circ}$; 30"
Annealing	55,0 $^{\circ}$; 30"
Elongation	72 $^{\circ}$; 40"
Zyklen	29x
finale Elongation	72 $^{\circ}$; 5'
Ende	4 $^{\circ}$

* Primerbezeichnung gekürzt, [Originalname], vgl. Kap. 6.1.2.

6.2.9.2 Nachweis von CTX-M-Typ β -Lactamasen

Zur Detektion von CTX-M wurden verschiedene PCRs auf *bla*_{CTX-M} Gene eingesetzt. Es wurde zum einen eine Screening PCR mit *wobble*-Primern auf einen universellen Teil des Gens durchgeführt, die viele Varianten detektiert (Pagani *et al.* 2003). Dieses universale PCR-Produkt *bla*_{CTX-M-uni} wurde mit CTX-M_{uni} bezeichnet. Die auf dem Gen *bla*_{CTX-M-15} basierende PCR CTX-M_{ges}, wurde mit außerhalb des Gens liegenden Primern anhand der Sequenz von *bla*_{CTX-M-15} in dem *E. coli* ST131 Stamm NA114 designt, und wird, weil sie das gesamte Gen erfasst, mit *bla*_{CTX-M-gesamt} oder kurz *bla*_{CTX-M-ges} bezeichnet. Darüber hinaus wurden außerdem sogenannte CTX-M-Gruppen-PCRs nach Woodford *et al.* durchgeführt, die für die jeweilige CTX-M-Gruppen spezifische Primerpaare nutzt (Woodford *et al.* 2006). Die hier mit *bla*_{CTX-M Gr. X} im gesamten bezeichneten Gruppen waren im Einzelnen Gr. 1, Gr. 2, Gr. 8, Gr. 9 und Gr. 25. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6-33 aufgeführt.

Tabelle 6-33: Reaktionsbedingungen der PCRs auf die β -Lactamase-Genfragmente von CTX-M Typ. Primer (vgl. Tabelle 6-5)

PCR	<i>CTX-M</i> _{ges}	<i>CTX-M</i> _{uni}	<i>CTX-M Gr. X</i> *
Gen:	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M Gr. X}
Gen/-abschnitt:	<i>bla</i> _{CTX-M-ges} (gesamt)	<i>bla</i> _{CTX-M-uni} (universal)	<i>bla</i> _{CTX-M} (Gruppe X)*
Primer forward	ctx-m15_5_-66	[CTX-M-Uni_fwd]_5'***	[CTX-M Gr. X-F]_5'*
Primer reverse	ctx-m15_3_+899	[CTX-M-Uni_rev]_3'***	[CTX-M Gr. X-R]_3'*
Produktgröße	965 bp	593 bp	Gr. 1: 415 bp Gr. 2: 552 bp Gr. 8: 666 bp Gr. 9: 205 bp Gr. 25: 327 bp

PCR-Ansatz (Taq)	Menge [μ L]	Menge [μ L]	Menge [μ L]
Wasser	7,85	7,25	7,85
10x Taq Puffer	1	1	1
Primer for [10 pmol/ μ L]	0,2	0,5	0,2
Primer rev [10 pmol/ μ L]	0,2	0,5	0,2
dNTPs [je 2 mM]	0,3	0,3	0,3
DreamTaq [5 U / μ L]	0,05	0,05	0,05
DNA [1 ng/ μ L]	0,4	0,4	0,4
Gesamtvolumen	10 μL	10 μL	10 μL

PCR-Programm (Taq)	T [°C]; t [min/s]	T [°C]; t [min/s]	T [°C]; t [min/s]
Initiation	95°; 5'	95°; 5'	95°; 5'
Denaturierung	95°; 30"	95°; 30"	95°; 30"
Annealing	55,0°; 30"	55,0°; 30"	55,0°; 30"
Elongation	72°; 40"	72°; 40"	72°; 40"
Zyklen	29 x	29 x	29 x
finale Elongation	72°; 5'	72°; 5'	72°; 5'
Ende	4°	4°	4°

PCR-Ansatz (Phusion)	Menge [µL]	Menge [µL]
Wasser	19,625	19,625
5x HF-Puffer	5	5
Primer for [10 pmol/µL]	0,4	0,4
Primer rev [10 pmol/µL]	0,4	0,4
dNTPs [je 2 mM]	1	1
Phusion [20 U/µL]	0,1	0,1
DMSO	0,4	0,4
DNA [1 ng/µL]	1,0	1,0
Gesamtvolumen	25 µL	25 µL

PCR-Programm (Phusion)	T [°C]; t [min/s]	T [°C]; t [min/s]
Initiation	95°; 5'	95°; 5'
Denaturierung	95°; 30"	95°; 30"
Annealing	55,0°; 30"	55,0°; 30"
Elongation	72°; 40"	72°; 40"
Zyklen	29 x	29 x
finale Elongation	72°; 5'	72°; 5'
Ende	4°	4°

* Primer/CTX-M-Gruppen Nachweis-PCR (Woodford *et al.* 2006), **[gekürzte Bezeichnung] (vgl. Kap. 6.1.2).

6.2.9.3 Triplex-PCR zum Nachweis von TEM, SHV und CTX-M-Typ β -Lactamase-Genen

Um die β -Lactamase-Gene *bla*_{CTX-M_{ges}}, *bla*_{SHV} und *bla*_{TEM} parallel zu amplifizieren und nachzuweisen wurde eine Triplex-PCR etabliert und verwendet, deren Bedingungen in Tabelle 6-34 beschrieben sind.

Tabelle 6-34: Reaktionsbedingungen der Triplex PCR auf die β -Lactamase-Gene $bla_{CTX-M_{ges}}$, bla_{SHV} und bla_{TEM} .

PCR				CTX-M_{ges}-SHV-TEM Triplex			
Gen:	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}		<i>bla</i> _{TEM}			
Primer forward	ctxm15_5_-66	[SHV duplex PCR-F]*		[TEM duplex PCR-F]*			
Primer reverse	ctx-m15_3_+899	[SHV duplex PCR-R]*		[TEM duplex PCR-R]*			
Produktgröße	965 bp	746 bp		838 bp			
PCR-Ansatz				Menge [μL]			
Wasser							19,625
HF-Phusion-Puffer 5x							5
Primer for [10 pmol/ μ L]	0,4					0,4	
Primer rev [10 pmol/ μ L]	0,4					0,4	
dNTPs [je 2 mM]							1
Phusion [20 U/ μ L]							0,1
DMSO							0,4
DNA [1 ng/ μ L]							1
Gesamtvolumen							25 μL
PCR-Programm				T [$^{\circ}$C]; t [min/s]			
Initiation							98 $^{\circ}$; 30"
Denaturierung							98 $^{\circ}$; 10"
Annealing							55,0 $^{\circ}$; 15"
Elongation							72 $^{\circ}$; 15"
Zyklen							29x
finale Elongation							72 $^{\circ}$; 5'
Ende							4 $^{\circ}$

* Primerbezeichnung gekürzt, [Originalname], vgl. Kap. 6.1.2, Tabelle 6-5: Oligonukleotide.

6.2.9.4 PCR zum Nachweis von bla_{TEM} *clpP::cat* in *E. coli* SG22215

Das Gen *clpP* wurde zum Nachweis des spezifischen genomischen Markers *clpP::cat*, mit der in Tabelle 6-35 unter *clpP* beschriebenen PCR amplifiziert. Das Gen *clpP* vergrößert sich durch das Insert *cat* um ca. 900 bp. Es diente dem Nachweis des Stammhintergrunds von *E. coli* SG22215, der diesen spezifischen Marker trägt. Bei der Prüfung der Transkonjuganden (vgl. Kap. 6.2.3.3.4) wurde parallel neben *clpP* auch bla_{TEM} amplifiziert, die dafür verwendete PCR ist in Spalte zwei der Tabelle dargestellt. Außerdem wurde noch eine Duplex-PCR zum

simultanen Nachweis von *clpP::cat* und *bla_{TEM}* durchgeführt, deren Bedingungen in Spalte drei von Tabelle 6-35 aufgeführt sind.

Tabelle 6-35: PCRs mit verwendeten Primern (vgl. Tabelle 6-5) und Produktgrößen zur Amplifikation von *clpP* und *bla_{TEM}*, sowie beiden Genen simultan in einer Duplex-PCR, aufgeführt mit Reaktionsbedingungen und Temperaturprogramm.

PCR	<i>clpP</i>	TEM	<i>clpP-TEM-Duplex</i>
Gen	<i>clpP</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>clpP</i> und <i>bla_{TEM}</i>
Primer forward	clpP_5_+5	[TEM total PCR-F]*	clpP_5_+5 und [TEM total PCR-F]*
Primer reverse	clpP_3_+592	[TEM total PCR-R]*	clpP_3_+592 und [TEM total PCR-R]*
Produktgröße:	WT: 588 bp +:<i>cat</i>≈ 1500 bp	838 bp	<i>bla_{TEM}</i>: - / 838 bp <i>clpP</i>: 588 bp <i>clpP::cat</i>: ≈1500 bp

PCR-Ansatz (Taq)	Menge [µL]	Menge [µL]	Menge [µL]
Wasser	7,85	7,85	7,45
10x Taq Puffer	1	1	1
Primer for [10 pmol/µL]	0,2	0,2	0,2 + 0,2
Primer rev [10 pmol/µL]	0,2	0,2	0,2 + 0,2
dNTPs [je 2 mM]	0,3	0,3	0,3
DreamTaq [5 U/µL]	0,05	0,05	0,05
DNA [1 ng/µL]	0,4	0,4	0,4
Gesamtvolumen	10 µL	10 µL	10 µL

PCR-Programm (Taq)	T [°C]; t [min/s]	T [°C]; t [min/s]	T [°C]; t [min/s]
Initiation	95°; 5'	95°; 5'	95°; 5'
Denaturierung	95°; 30"	95°; 30"	95°; 30"
Annealing	55,0°; 30"	55,0°; 30"	55,0°; 30"
Elongation	72°; 40"	72°; 40"	72°; 40"
Zyklen	29 x	29 x	29 x
finale Elongation	72°; 5'	72°; 5'	72°; 5'
Ende	4°	4°	4°

* Primerbezeichnung gekürzt, [Originalname], vgl. Kap. 6.1.2, Tabelle 6-5.

6.2.10 Reinigung und Konzentration von DNA und PCR-Produkten

6.2.10.1 Gelextraktion von PCR-Produkten

Waren mehrere Produkte in der PCR entstanden, aber nur eines einzeln benötigt, wurde es nach Auftrennung im Agarosegel daraus isoliert. Dies erfolgte mittels dem QIAQuick® Geextraktions-Kit. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell oder Ausstecher aus dem Gel ausgeschnitten und in ein tariertes Reaktionsgefäß überführt. Dies wurde mit dem dreifachen des Gelvolumens an QG-Puffer versetzt und unter gelegentlicher Durchmischung bei 50 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde mit dem einfachen Volumen an Isopropanol versetzt, durchmischt und der Ansatz auf eine Säule überführt. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min wurde das Filtrat verworfen, weitere 500 µL QG-Puffer auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Anschließend wurde mit 750 µL PE-Puffer für 3 min inkubiert, bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm. Zur Elution wurden 10-20 µL 1:10 verdünnter EB-Puffer auf die Säulenmembran pipettiert, 1 min inkubiert und ebenfalls bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und die Inkubation und Elution mit EB-Puffer wiederholt. Das gesammelte Filtrat wurde bei -20 °C gelagert.

6.2.10.2 Reinigung von DNA und PCR-Produkten über Silica Säulen

Nach erfolgreicher Amplifikation wurde der PCR-Ansatz vor nachfolgenden Reaktionen aufbereitet, insbesondere wenn die DNA zur Sequenzierung eingesetzt wurde um Enzyme, Primern und dNTPs zu entfernen. Diese Aufarbeitung erfolgte mit dem QIAQuick®-Kit zur DNA-Aufreinigung über Silica Membranen nach den Herstellerangaben.

6.2.10.3 Aufbereitung von PCR-Produkten zum Cycle Sequencing

Für die Sequenzierung eines Gens wurde dieses zunächst mittels PCR vermehrt. War das resultierende PCR-Produkt in ausreichender Menge und Konzentration entstanden und frei von Nebenprodukten, wurde es zur Sequenzierung aufbereitet. Die Aufbereitung erfolgte durch Zugabe der Enzyme: 0,5 µL Exo I und 1 µL FastAP auf 5 µL PCR-Produkt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 15 min inkubiert und anschließend für 15 min bei 80 °C inaktiviert.

6.2.10.4 Reinigung und Konzentration von DNA mittels AMPure® XP Beads

Zur selektiven DNA-Isolierung wurde mit dem AMPure® XP Kit von Agencourt® gearbeitet. Das Prinzip dieser Isolierung beruht auf der spezifischen Bindung der DNA an magnetische Trägerstoffe, die sogenannten Beads. In geeignetem Puffer bindet die DNA sehr gut aber reversibel an diese Beads. In einem magnetischen Ständer für das Reaktionsgefäß, werden die Beads sichtbar zum Magnet hingezogen und so an der Gefäßwand konzentriert. Auf diese Weise separieren die Beads die DNA, welche sich in geeignetem Puffer wieder von den Beads löst. Diese Aufreinigung wurde für die DNA-Pools der PCR-Produkte für das RP-MLST verwendet. Sie wurde den Herstellerangaben entsprechend wie folgt durchgeführt:

Die DNA-Probe wurde mit dem 1,8-fachen ihres Volumens an Beads versetzt, durch 10-maliges auf und ab pipettieren gemischt und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min im Magnetständer platziert und nach Separierung der Beads an der Wand die Flüssigkeit abgenommen. Es wurde zweimal mit je 500 µL 70 %igem Ethanol gewaschen, für je 30 s unter drehen des Reaktionsgefäß im Magnetständer um 360°. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und das Pellet bei RT ca. 2 min trocknen gelassen, bis restliches Ethanol verdampft war. Zur Elution wurde das Pellet dann außerhalb des Magnetständers mit 20-25 µL Low-TE Puffer von der Wand abgespült und 5 min inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß wieder 2 min im Magnetständer positioniert, bis die Beads sich separiert hatten und anschließend die DNA-enthaltende Flüssigkeit abgenommen. Die auf diese Weise gereinigte Probe wurde je nach Bedarf mittels Qubit® oder Bioanalyzer vermessen und anschließend direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

6.2.11 Scherung von DNA

6.2.11.1 Scherung von DNA mit Ultraschall

Die Zerkleinerung (Scherung) der genomischen DNA, sowie der PCR-Pools für das RP-MLST (vgl. Kap. 6.2.16.1.3) in unspezifische Bruchstücke wurde mit Ultraschall durchgeführt

Als Ausgangsmaterial für die Ultraschallscherung wurden 100 ng genomische DNA in Low-TE Puffer eingesetzt. Die benötigte Menge der DNA-Probe in µL wurde auf Basis der

Konzentrationsbestimmung am Qubit berechnet, in ein Reaktionsgefäß gegeben und entsprechend mit Puffer zu 100 µL ergänzt. Anschließend wurden sie im Ultraschallbad unter Rotation im 4° C kühlen Wasser beschallt. Als Bedingungen für die Ultraschallbehandlung wurden 10 Zyklen von je 30 s Beschallung bei hoher Intensität gefolgt von 30 s Pause gewählt. Anschließend wurden die Proben zur Kontrolle der Scherung auf dem Bioanalyzer analysiert.

Für die Scherung der PCR-Pools wurden wie zuvor beschrieben 100 ng DNA, später 200 ng DNA eingesetzt. Die Ultraschallbehandlung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Optimierung der Scherung wurden die Anzahl der Zyklen variiert sowie dadurch insgesamt auch die Dauer der Beschallungszeit.

6.2.11.2 Fragmentierung von PCR-Produkten mittels Fragmentase

Zur Fragmentierung der DNA-Proben, die aus mehreren PCR-Produkten verschiedener Größe bestanden (PCR-Produkt-Pools), wurde das Enzym Fragmentase von NEB verwendet. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das Doppelstrang-DNA unspezifisch und zufällig schneidet.

Die Fragmentase Reaktion wurde mit einer Menge von 200 ng DNA der aufbereiteten, konzentrierten PCR-Pools angesetzt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 6-42 beschrieben.

Tabelle 6-36: Reaktionsansatz für die enzymatischen Fragmentierung.

Bestandteil	Menge
Poolmenge für 200ng DNA	1-17µL
Fragmentase Puffer	2,0 µL
Fragmentase	1,0 µL
H ₂ O	ad 20,0 µL

Der Ansatz wurde für 5 s auf dem Vortex gemischt und anschließend direkt bei 37 °C für die gewählte Zeit im Thermocycler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µL 0,5 M EDTA und sofortigem Mischen gestoppt und anschließend auf Eis oder bei -20° C gelagert.

Für die Fragmentierung wurden zunächst einige Testverdaue der DNA-Pools durchgeführt, um die geeignete Reaktionszeit zu ermitteln. Getestet wurden dabei Bedingungen für die Inkubation von 20-30 min mit 1-2µL Fragmentase unter Einsatz von 200 ng DNA. Nach der

Fragmentierung wurden die Proben über die Beads des Agencourt AMPure Kits aufgereinigt und konzentriert, wie in Kap. 6.2.11.2 beschrieben. Zur Kontrolle der Fragmentierung wurden entweder 10 µL der resultierenden, aufbereiteten Probe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt oder 1 µL zur Analyse auf dem Bioanalyser verwendet. Die Ergebnisse wurden verglichen und weiter angepasst bis eine sehr gute Zerkleinerung der Proben mit resultierenden Fragmentgrößen im Zielbereich zwischen 200-550 bp erreicht wurde.

6.2.12 DNA-Analytik

6.2.12.1 Qualitative und Quantitative DNA-Bestimmung mittels Nanodrop™

Die isolierte DNA wurde zur Kontrolle ihrer Qualität, Reinheit und zur Gehaltsbestimmung spektralphotometrisch untersucht. Dazu wurde 1-2 µL der DNA- Probe auf dem NanoDrop™ gegen den verwendeten Puffer vermessen. Für DNA wurde das dsDNA Analyse-Programm der zugehörigen Software verwendet, welches die Absorption der Probe im Spektrum von 220 nm bis 350 nm misst und anhand der Absorption bei den spezifischen Wellenlängen die Konzentration und Reinheit der Probe berechnet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach modifizierter Lambert-Beer Gleichung aus der Absorption. Zur Analyse der Reinheit wurden die Absorptionsverhältnisse bei unterschiedlichen Wellenlängen betrachtet, wobei für das Wellenlängenverhältnis 260/280 ein Wert von 1,8 und für 260/230 von 1,8-2,2 als gut erachtet wurde. Auf diese Weise wurde auf Verunreinigungen mit RNA, Proteinen und Chemikalien geprüft, welche die Absorption der Wellenlängen bei 230 nm (Proteine, Phenole, etc.) und 280 nm (RNA) verändern (Thermo Scientific). Insbesondere zur weiteren Präparation und zur Sequenzierung wurde nur DNA von hoher Qualität verwendet.

6.2.12.2 Selektive quantitative DNA-Bestimmung mittels Qubit®

Zur quantitativen Bestimmung der DNA-Konzentration einer Probe wurde das Qubit® Fluorometer in Kombination mit dem Qubit® dsDNA BR Assay Kit verwendet. Dabei wurde eine definierte Menge Probe von 1-10 µL mit 199-190 µL frisch angesetztem Qubit™ Reagenz (1:200) in dsDNA BR Puffer zur DNA-Quantifizierung versetzt, sofort gemischt und nach einer Inkubationszeit von 2 min im Qubit®-Fluorometer vermessen. Präparation und Messung

wurden den Herstellerangaben im Kit entsprechend durchgeführt. Das Messprinzip beruht darauf, dass das eingesetzte Reagenz spezifisch an DNA nicht aber an RNA bindet und zudem nur Fluoreszenz aus dem Komplex der DNA mit gebundenem Reagenz emittiert wird. Die emittierte Fluoreszenz korreliert dabei mit der Menge an DNA (linearer Bereich: 0,2-100 ng). Die Fluoreszenz wurde dann im Fluorometer quantitativ erfasst und auf ihrer Grundlage die DNA-Konzentration berechnet. (Thermo Fisher Scientific 2023).

6.2.12.3 Hochauflösende DNA-Analytik mit dem Bioanalyzer

Für die DNA-Analyse auf dem Bioanalyzer wurde das High Sensitivity DNA Kit verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurde zunächst ein Mikrofluid-Chip mit Gelmatrix beladen. Anschließend wurden je 1-2 µL des Markers, der DNA-Leiter und den Proben aufgetragen. Der Chip wurde im Bioanalyzer-Instrument positioniert und der High Sensitivity DNA-Assay gestartet. Die Elektrophorese und Detektion der Fluoreszenz der DNA mit einem speziellen Farbstoff mittels Lasertechnik liefen dabei vollautomatisch für alle Proben nacheinander ab. Anschließend wurden anhand der erhaltenen Elektropherogramme die Mengen und Konzentrationen der einzelnen Fragmentgrößenbereiche sowie der DNA insgesamt mit der Bioanalyzer-Software berechnet.

Diese qualitative sowie quantitative Analyse der Proben wurde zur Bestimmung des Grades der Fragmentierung, zur Analyse des Größenspektrums und Ermittlung der DNA-Konzentrationen für die gescherten Pools und die präparierten NGS-Librarys durchgeführt. Sie dienten der Kontrolle der Qualität sowie der genauen Erfassung der Konzentration der Library.

Die Anteilsberechnung von Fragmenten an der gesamten Library wurde durchgeführt, indem der Anteil eines Bereichs oder im spezielleren Fall des *parC*-Peaks anhand der quantitativen Bioanalyzer-Daten berechnet wurde. Für den *parC* Anteil wurde der Peak über der Kurve anhand seiner Molarität abzüglich der Molarität der Kurve unter dem Peak als prozentualer Anteil der Molarität der Library berechnet. Die Größen und Mengen der entsprechenden Bereiche wurden über die Software errechnet.

$$\text{Anteil Peak X [\%]} = \frac{M_{\text{Peak X}} [\text{pmol/L}] - M_{\text{Kurve}} [\text{pmol/L}]}{M_{\text{Library}} [\text{pmol/L}]} \times 100 \%$$

6.2.12.4 Agarose Gelelektrophorese

Die Methode der Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung von DNA-Molekülen verschiedener Größe. Die dafür als Matrix verwendete Agarose bildet ein Polymernetz aus, welches die DNA-Moleküle passieren können. Dabei bestimmt die Dichte des Agarosenetzes wie groß die Zwischenräume in der Polymerstruktur sind. Die Fähigkeit der Moleküle das Netz zu durchdringen ist dabei höher, je kleiner sie selbst und je größer die Poren in der Agarose sind. Zur Trennung von PCR-Produkten und Plasmiden wurden Agarose-Gele von 0,8-2 % verwendet. Für größere DNA-Fragmente und Plasmide eher niedriger konzentrierte Gele (0,8-1 %) und für kleine Fragmente eher höherprozentige Gele (1-2 %). Die Gelkonzentration wurde entsprechend der Herstellerangaben nach den Analyten gewählt. War keine spezifische Trennung nötig, wurden in der Regel 1 %ige Gele eingesetzt.

6.2.12.4.1 Herstellung von Agarose-Gelen

Die Agarosegele wurden durch Einwaage einer entsprechende Menge Agarose in einen Messkolben eingewogen und mit dem nötigen Volumen an 0,5 x TAE-Puffer versetzt. Je nach Art der Proben wurden Gele verschiedener Agarosekonzentrationen von 0,8-2 % verwendet. Die Mischung aus Agarose und Puffer wurde in der Mikrowelle unter gelegentlichem Schwenken zum Aufkochen erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Agaroselösung wurde bis zur noch guten Gießfähigkeit unter Wasserkühlung des Kolbens abgekühlt. Bei Verwendung von Gelen mit Ethidiumbromid wurde sie unmittelbar vor dem Gießen mit 1 µL 1 %iger Ethidiumbromidlösung pro 100 mL Gel versetzt, vermischt, in die Gelvorrichtung gegeben und erkalten gelassen. Das feste Gel wurde auf seinem Träger in der Elektrophoresekammer positioniert und mit 0,5 x TAE-Puffer übergossen bis es vollständig bedeckt war. Anschließend wurden die Taschenkämme gezogen und die Geltaschen beladen.

6.2.12.4.2 Beladung und Entwicklung von Agarose-Gelen

Die Beladung der Geltaschen erfolgte mit 1-20 µL der DNA-Probe nach vorherigem Mischen mit einem Lade-Puffer. Dieser dient zum Beschweren der Probe und als Marker, da er farbige Bestandteile definierter Größe enthält, die das Voranschreiten der Moleküle während der

Elektrophorese sichtbar machen. Neben den Proben wurde stets auch ein DNA-Größenstandard in Leiterform (DNA-Leiter, bzw. Ladder) auf das Gel aufgebracht, welcher der Größenordnung der Fragmente diente. Die verwendeten Größenstandards sind in Kap. 6.1.3.1 aufgeführt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese durch Schließen der Kammer und Anlegen einer Spannung gestartet. Zum Einlaufen der Proben wurden erst 90 Volt für die ersten 10 min und anschließend 120-220 Volt, je nach Größe des Gels, für die Laufdauer angelegt. Unter gelegentlicher visueller Überprüfung wurde die Elektrophorese bis zur gewünschten Auftrennung der Proben im Gel fortgeführt.

6.2.12.4.3 Färbung und Fotografie von Agarose-Gelen

Die Visualisierung der Proben im Gel erfolgte unter UV-Licht mittels des Reagenzes Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert. Das Gel wurde entweder noch flüssig, unmittelbar vor dem Gießen mit Ethidiumbromid versetzt (vgl. Kap. 6.2.12.4.1), oder es wurde nach der Elektrophorese angefärbt. In diesem Fall erfolgte das Anfärben des Gels für 15 min, unter Schwenken in einem Ethidiumbromid haltigen Bad mit einer Konzentration von 40 µg/100 mL in 0,5x TAE-Puffer. Anschließend wurde das Gel für 15 min unter Schwenken in 0,5-fachen TAE-Puffer wieder entfärbt. Das Gel wurde dann mittels eines Geldokumentationssystems in einer Dunkelkammer unter UV-Licht betrachtet und fotografiert. Die Belichtungszeit wurde so gewählt, dass die DNA-Banden auf den Gelen bestmöglich zu erkennen waren. Die Gele wurden in positiv (dunkel, Fluoreszenz weiß dargestellt), sowie auch in invers/negativ (hell, Fluoreszenz schwarz dargestellt) aufgenommen und auch überbelichtet betrachtet.

6.2.13 Sequenzierung

6.2.13.1 Pyrosequencing® zur Detektion spezifischer SNPs in *pabB*

In dieser Arbeit wurden die klinischen Isolate mittels Pyrosequencing® auf zwei spezifisch in *E. coli* ST131 auftretenden SNPs im Gen *pabB* untersucht.

Ausgehend von isolierter genomischer DNA der Isolate wurde zunächst das Gen *pabB* unter Verwendung eines biotinylierten Primers amplifiziert. Dazu wurde eine PCR wie nachfolgend in Tabelle 6-37 (Standard-Ansatz) und Tabelle 6-38 (Ansatz mit dem PyroMark® PCR-Kit) beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 6-37: PCR-Ansatz zur Amplifizierung von *pabB* für das Pyrosequencing® Standard-Ansatz (links) und unter Verwendung des PyroMark®-Kits (rechts). Primer (vgl. Tabelle 6-5)

Standard PCR-Ansatz		PyroMark® Kit - PCR-Ansatz:	
Wasser	36,15 µL	Wasser	13,0 µL
10X Taq Puffer	5,0 µL	PyroMark® Mastermix	25,0 µL
Forward primer pabB_5_223_Eco	1,0 µL	Forward primer pabB_5_223_Eco	1,0 µL
Reverse primer pabB_3_630_Biotin_Eco	1,0 µL	Reverse primer pabB_3_630_Biotin_Eco	1,0 µL
dNTP Mix	1,6 µL	-	-
Taq DNA Polymerase	0,25 µL	Coral Load	5,0 µL
Template DNA	5,0 µL	Template DNA	5,0 µL
Volumen	50 µL	Volumen	50 µL

Tabelle 6-38: Temperaturprogramm der *pabB* PCR für das Pyrosequencing®

PCR-Programm:	Temperatur [°C]	Zeit [min], [s]	Zyklen
Initiation	95	15 min	
Denaturierung	95	30 s	←
Annealing	56	30 s	45x ↑
Elongation	72	40 s	→
finale Elongation	72	10 min	
Ende	4	∞	

Der Erfolg der PCR wurde mittels Visualisierung des PCR-Produkts nach Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Sofern erfolgreich wurde mit dem Produkt weitergearbeitet.

Anschließend wurden dann 20 µL das erhaltene PCR-Produkt gemäß den in der Herstelleranleitung (PSQ Manual) beschriebenen Vorbereitungen zum Pyrosequencing® behandelt. Dazu wurden 20 µL des PCR-Produkts in 60 µL Bindepuffer-Mix an Streptavidin-Beads gebunden und über ein Vakuum-Filter-Präparationsgerät nacheinander mit 70 %igem Ethanol, 0,2 M Natronlauge und Wasch-Puffer behandelt und dadurch so aufbereitet, dass ein DNA-Einzelstrang vorlag. Die so aufbereiteten Proben wurden dann für jeden SNP mit je einem geeigneten Pyrosequencing® Primer in Annealingpuffer versetzt. Die verwendeten Mixe sind in Tabelle 6-39 aufgeführt.

Tabelle 6-39: Zusammensetzung der verwendeten Pyrosequencing Binde-/ und Annealingpuffer-Mixe. Primer (vgl. Tabelle 6-5)

Bindepuffer Mix		Annealingpuffer Mix	
Binding Buffer	37 µL	Annealing Buffer	40 µL
Wasser	20 µL	Seq. Primer (5pmol)	8 µL
Streptavidin-Beads	3 µL	-	-
Gesamtvolumen	60 µL	Gesamtvolumen	48µL

Die verwendeten Reagenzien und Primer sind in Kap. 6.1.6, 6.1.2 und 6.1.4.2 aufgeführt.

Die Sequenzierplatte mit dem DNA-Einzelstrang und dem Sequenzierprimer wurde für 5-10 min bei 65°C erhitzt, kurz erkalten gelassen und unverzüglich auf dem PSQ™ 96 MA-System sequenziert. Die Pyrosequencing-Assays der beiden SNPs in *pabB* wurden unter den Entry-Namen: „*pabB* SNP Position 267“ mit der Analysesequenz AGCTAGCA und „*pabB* SNP Position 573“ mit der Analysesequenz TCGAGTCA durchgeführt. Der verwendete Pyrosequencing®-Assay wurde mit Hilfe der PSQ Assay Design-Software entworfen.

6.2.13.2 Cycle-Sequencing nach Sanger

Zur Sequenzierung einzelner Gene wurde die Kettenabbruchmethode verwendet. Dafür wurden die zu sequenzierende Gene zunächst mittels PCR amplifiziert, im Agarosegel kontrolliert und anhand des Vergleichs mit der DNA-Leiter quantifiziert. Die DNA wurde aufbereitet, entweder enzymatisch mittels Exo I und FastAP wie in Kap. 6.2.10.3 beschrieben, oder mithilfe des Gelextraktionskits, wie in Kap. 6.2.10.1.

Anschließend wurde für die Sequenzierung der PCR-Produkte, eine Menge von 5-100 ng der gereinigten DNA für das Cycle-Sequencing eingesetzt. Die genaue Menge wurde nach der Fragmentgröße den Herstellerangaben entsprechend adaptiert. Für den Cycle-Sequencing Ansatz wurde das DTCS Quick Start Kit von Beckmann Coulter verwendet und die Reaktion wie in Tabelle 6-40 und Tabelle 6-41 beschrieben gefahren.

Tabelle 6-40: Cycle-Sequencing Ansatz für PCR-Produkte mit dem Quick Start Kit nach Beckmann Coulter.

Sequenzier-Ansatz	Menge
Menge an PCR-Produkt für (30-100 ng)	1-15 µL
Sequenzierprimer (10 pmol)	1 µL
Sequenzierpuffer	1-3* µL
Quick Start Reagenz	1-3* µL
DMSO	0-0,5 µL
H ₂ O	ad 20 µL

* Sequenzierpuffer und Quick Start Reagenz ergänzen sich zu 4 µL.

Tabelle 6-41: Temperaturprogramm für die Cycle-Sequencing Reaktion der PCR-Produkte.

Sequenzier-Programm:	Temperatur	Zeit	Zyklen
Inkubation	96 °C	20 s	1.-3.
Annealing	T _{an} *, 45-60 °C	20 s	30x
Elongation	60 °C	4 min	zurück zu 1.
Ende	4 °C	∞	

* Primerspezifische Anlagerungstemperatur T_{an}. (T_{an} ≈ T_m - 5 °C)

Nach der Reaktion folgte eine Ethanol-fällung der DNA, bei der der Ansatz mit 2 µL 3M Natriumacetat, 2 µL 100 mM EDTA, 1 µL Glykogen vermischt, dann mit 60 µL absolutem Ethanol versetzt und anschließend 12 min bei 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das überstehende Ethanol verworfen und das Pellet mit 200 µL 70%igem Ethanol versetzt und 30 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wurde wiederum abgenommen, und dieser Schritt genauso noch einmal wiederholt. Anschließend wurde wiederum das restliche Ethanol entfernt und das Pellet bei RT getrocknet.

Das DNA-Pellet wurden in 30 µL SLS aufgenommen und anschließend auf dem Beckmann Coulter GeXP System kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Das erhaltene Elektropherogramm bildete die Sequenz ab und wurde anschließend mit der Vector NTI Software analysiert. Mehrere, sich überlappende Sequenzen des gleichen Gens aus verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Primern wurden mittels ContigExpress zu einer Gesamtsequenz zusammengesetzt.

6.2.13.3 NGS Sequenzierung Ion Torrent™

Die Methode der NGS-Sequenzierung auf dem Ion Torrent™ dient im Grunde zur Sequenzierung ganzer Genome. Die NGS-Sequenziertechnik wurde allerdings in dieser Arbeit auf die Sequenzierung von PCR-Produkten übertragen. Dazu wurde die Methode hinsichtlich der Probenvorbereitung bis zur Präparation der Library verändert und in der geänderten Weise angewendet um viele DNA-Fragmente parallel zu sequenzieren. Sie ist detailliert in Kap. 6.2.15.2.3 beschrieben.

6.2.14 Sequenzanalyse

In dieser Arbeit wurden verschiedene Programme verwendet um Sequenzen übersichtlich darzustellen, ihre Details zu erkennen, Gene und andere Strukturen sichtbar zu machen, einen Überblick über die Daten zu erhalten und mit den Sequenzen zu arbeiten. Die verwendeten Programme sind im Folgenden aufgeführt und mit ihrer Anwendung beschrieben.

6.2.14.1 Sequenzanalyse mit Vector NTI Advance®

Die Vector NTI Advance® Software wurde verwendet um Sequenzen darzustellen und mit ihnen zu arbeiten. Sie beinhaltet verschiedene Module, die in dieser Arbeit vor allem dazu genutzt wurden Referenzsequenzen aus der NCBI Datenbank sowie Daten aus eigenen Sequenzierungen zu visualisieren und zu analysieren. Der Vector NTI® Explorer wurde als lokale Datenbank für Sequenzen, Oligonukleotide und Restriktionsenzyme verwendet. AlignX® wurde zum Vergleich von entweder verschiedenen Genen untereinander oder auch gleichen Genen verschiedener Stämme nebeneinander verwendet. Das Alignment-Modul erlaubte verschiedene Sequenzen miteinander zu vergleichen und die homologen Bereiche

sowie die Abweichung sichtbar darzustellen. Das Design der in dieser Arbeit erstellten Primer wurde ebenfalls in der Vector NTI Advance® Software durchgeführt, wobei zusätzlich auch das Primer-design-Tool der NCBI Plattform verwendet wurde (Primer designing tool 2023). Die Analyse und Auswertung der in der Arbeit erhaltenen Sequenzen aus dem Cycle-Sequencing erfolgten mit dem ContigExpress Modul der Software. In diesem Modul wurden die einzelnen Elektropherogramme und daraus resultierende Sequenzen begutachtet, auf Lesefehler überprüft und die auswertbaren Sequenzbereiche ausgewählt. Mittels der Assemble Funktion konnten Teilstücke größerer Sequenzen anhand ihrer überlappenden Bereiche zu einer Consensus-Sequenz zusammengeführt werden.

6.2.14.2 Sequenzdaten-Alignments mit dem Ion Torrent™ System

Die auf dem Ion Torrent™ PGM generierten Sequenzen wurden auf dem zugehörigen Ion Torrent™ Server verarbeitet. Die Ion Torrent™ Software erfasst dabei die Rohdaten der Sequenzen und ordnet sie anhand des spezifischen Musters der Barcodes den einzelnen Proben zu. Außerdem werden die Sequenzen um die Marker bereinigt, sodass nach der Verarbeitung die einzelnen generierten Sequenzen der DNA-Fragmente, als sogenannte Contigs vorliegen. Die vielen Contigs einer Probe werden dann anhand der Vorlage eines Referenzgenoms an dieses angelegt. Je mehr einzelne Ablesungen (Reads) der Sequenz an einer DNA-Position vorliegen, desto höher ist die Abdeckung und sicherer die Sequenz. Die gesamte DNA-Sequenz wird erhalten, indem aus den einzelnen Contigs aus denen sie sich zusammensetzt, die Consensus-Sequenz gebildet wird. Als Referenzstämme für das Alignment dienten genomsequenzierte Stämme, deren Sequenzen auf NCBI zur Verfügung standen und bestenfalls bereits annotiert waren. Wenn möglich wurden Stämme verwendet, die den sequenzierten Isolaten ähnlich anzunehmen waren, oder dem Ziel der Untersuchung entsprachen. So wurden für die Untersuchung auf *E. coli* ST131 Isolate die *E. coli* Stämme NA114 und JJ1887 (vgl. Kap. 6.1.1.3 und 6.1.1.4) verwendet. Als generelle Referenz wurden *E. coli* MG1655 und *E. coli* CFT073 verwendet, da sie sehr gut annotierte und beschriebene Referenzstämme sind.

6.2.14.3 Vergleichende Genanalyse mit IGV

Der Integrative Genome Viewer (IGV) wurde verwendet um die Daten der NGS-Sequenzierung darzustellen. Die einzelnen Reads, wurden mittels der ION Torrent™ Software Anwendung anhand des Referenzstamms zusammengefügt (*align*) und mit IGV betrachtet. Anhand der Annotierung des Referenzstamms wurden die betreffenden Sequenzen im Genom bestimmt. In IGV wurden sowohl die einzelnen Reads der NGS-Sequenzierung angezeigt als auch die Consensus-Sequenz. Relevante Sequenzen wurden als Consensus-Sequenz extrahiert. Es wurden einzelne Position der Mutationen und ganze Gene oder Sequenzabschnitte der Stämme erfasst. Zum Vergleich mehrere Stämme untereinander sowie anhand der Referenz wurden die Sequenzen der verschiedenen Stämme gleichzeitig in die Ansicht geladen, was die Unterschiede direkt sichtbar machte.

6.2.14.4 Analyse von Sequenzen mit dem CLC Sequence Viewer

Die Software CLC Sequence Viewer zur Sequenzansicht wurde in der Arbeit vor allem zur Darstellung von Genen, Plasmiden und ganzen Genomen sowie zur Suche von bestimmten Sequenzen in Genomen verwendet. Dafür wurden gezielt die Suchfunktionen der Software genutzt. Außerdem wurde die Software zur Darstellung einzelner Sequenzen und insbesondere das Alignment Modul für den Vergleich der Gensequenzen verschiedener Stämme verwendet, um Unterschiede sichtbar zu machen. Die erweiterte Genomanalyse und die Analysen für das MLST wurden mit der CLC Genomics Workbench durchgeführt (vgl. Kap. 6.2.16.3.2).

6.2.15 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Für das Multilocus Sequence Typing (MLST) wurden die in den MLST-Schemata nach Achtman und Pasteur definierten Bereiche der in *E. coli* universell vorhandenen sogenannten Housekeeping-Gene sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit den bekannten Sequenzen der MLST-Datenbanken verglichen und der jeweiligen *Sequence Type* (ST) bestimmt. In dieser Arbeit wurde mit der klassischen Methode nur die MLST-Typisierung nach dem Achtman Schema durchgeführt. Sie diente zunächst dem Nachweis eines *E. coli* ST131

Isolats nach der Standardmethode und später als Kontrolle für die Bestimmung mit dem neu etablierten RP-MLST Verfahren (vgl. Kap. 6.2.15.2.3).

6.2.15.1 DNA-Amplifizierung, Aufreinigung und Sequenzierung

Um die MLST relevanten Bereiche der Housekeeping-Gene zu sequenzieren musste die DNA zunächst amplifiziert werden. Dafür wurden zunächst die in der Literatur benannten Primer (Wirth *et al.* 2006) für das Achtman Schema verwendet. Die PCR-Bedingungen wurden hinsichtlich der Annealing-Temperaturen für die einzelnen Produkte optimiert und schließlich, wie in Kap. 6.2.6.3.1 beschrieben, amplifiziert. In den Fällen, in denen sich in der PCR neben den gewünschten Produkten, weitere Nebenprodukte bildeten, wurde die Probe von der Sequenzierung mittels des QIAQuick® Gelextraktions-Kit, wie in Kap. 6.2.10.1 beschrieben, extrahiert, aufgereinigt und erneut auf ein Gel aufgetragen um die Konzentration abzuschätzen. Die isolierten PCR-Produkte der Housekeeping-Gene wurden anschließend mit der Cycle Sequencing Methode, wie in Kap. 6.2.13.2 beschrieben, sequenziert. Die resultierenden Sequenzen wurden mit Vector NTI ausgewertet und mit den Referenzen verglichen oder aus der MLST-Datenbank ermittelt.

6.2.15.2 MLST-Analyse

6.2.15.2.1 Achtman Schema

Die für *E. coli* ST131 spezifischen Sequenzen der Housekeeping-Gene des Achtman Schemas wurden zum direkten Vergleich z. B. zur Auswertung nach dem Cycle Sequencing und als Referenz von der MLST-Plattform der Warwick University heruntergeladen. Die Sequenzen der entsprechenden Allele dienten als Referenzen für die sequenzierten Teststämme.

Für die Auswertung der Sequenzdaten wurde, für alle unbekannt Stämme und insbesondere für die nicht-ST131 Isolate, die Analysefunktion der Plattform pubMLST (Jolley *et al.* 2018) verwendet. Dort wurde die erhaltenen Sequenzen eingegeben und durch die Software mit der Datenbank abgeglichen. Auf der Seite der *Escherichia typing database* (Escherichia typing 2023) wurden die Sequenzen über die Funktion *Single Sequence query* der

Allele der Housekeeping-Gene bestimmt. Anschließend wurde auf der Basis des resultierenden Allel-Profiles über die Funktion *Search by locus combinations* der Sequenztyp (ST) des Achtman Schemas bestimmt.

6.2.15.2.2 Pasteur Schema

Der Sequenztyp nach Pasteur wurde bestimmt, indem die entsprechenden aus der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen der Housekeeping-Gene dieses Schemas auf der Plattform des Instituts Pasteur (Institut Pasteur MLST databases and software 2023) abgeglichen und bestimmt wurden. Es wurden dafür die Funktionen *Sequence query* und *Search by locus combinations* des Datenbankabgleichs genutzt um die entsprechenden Allele und den Sequenztyp mit ST-Nummer zu bestimmen. Die Referenz Allele für den ST43 wurden von dort auch als Referenzen und für den manuellen Abgleich heruntergeladen.

6.2.15.2.3 Vergleich mit Referenzstämmen

Die MLST-Analyse und Zuordnung wurde, insbesondere für die ST131 Stämme, anhand eines Vergleichs mit einem bekannten Stamm mit definiertem *Sequence Type* (ST) vorgenommen. Dabei wurden die Sequenzen des Referenzstamms als Vorlage verwendet und die neuen Sequenzen des zu analysierenden Stamms mit ihnen verglichen. Gab es keine Abweichungen, entsprach der getestete Stamm eben jenem *Sequence Type* des Referenzstamms. Gab es Abweichungen in der relevanten Sequenz lag ein anderer ST vor. Dabei ließ sich für jedes einzelne Gen darstellen wie viele und welche Abweichungen vorhanden waren. Die vergleichende Analyse wurde vor allem für die Auswertung nach der NGS basierten RP-MLST-Bestimmung verwendet (vgl. Kap. 6.2.16.3.1). Als Referenzstämmen für den ST131 dienten die *E. coli* Stämme NA1114, EC985 und JJ1886. Ihre Genomsequenzen wurden auch als Referenz für das Alignment nach der RP-MLST Sequenzierung auf dem Ion Torrent™ System verwendet.

6.2.16 Rapid-Parallel Multilocus Sequence Typing (RP-MLST)

Beim Rapid-Parallel Multilocus Sequence Typing (RP-MLST) wurden diverse PCR-Produkte eines Stammes als Pool zu einer NGS-Library verarbeitet und als solche, unter Verwendung

von Barcodes, parallel zu diversen weiteren Proben in einem Lauf auf einmal sequenziert. Die einzelnen Schritte dazu sind folgend beschrieben.

6.2.16.1 RP-MLST Probenvorbereitung für NGS auf dem Ion Torrent™

6.2.16.1.1 Amplifizierung der Target-/ und Housekeeping-Gene für RP-MLST

Die für das RP-MLST ausgewählten DNA-Abschnitte der Target-/ und Housekeeping-Gene wurden mittels PCR amplifiziert. Die Reaktionsansätze und Bedingungen entsprachen denen aus Kap. 6.2.6.3, 6.2.6.4 und 6.2.9. Es wurde jeweils ein Mastermix für alle zu amplifizierenden Proben plus der Negativkontrolle plus Zugabe angesetzt und anschließend mit jeweils einer DNA eines Teststammes, bzw. Wasser für die NTC versetzt. Die Ansätze wurden gut durchmischt, kurz zentrifugiert und durchliefen das jeweilige Temperaturprogramm.

6.2.16.1.2 Abschätzung der Konzentration der PCR-Produkte

Anschließend wurden die Proben zu je 5 µL mit ca. 1-2 µL Loading Dye auf ein geeignetes, meist 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Neben den Proben wurde eine definierte Menge von 5 µL der DNA-Leiter aufgetragen. Dafür wurde entweder der GeneRuler 100 bp plus oder der 1 kb plus Ladder von Thermo Scientific verwendet. Die aufgetragenen Mengen an Probe und Ladder wurden, wenn nötig hinsichtlich der besseren Vergleichbarkeit der Banden, den Herstellerangaben folgend so variiert, dass ähnliche DNA-Mengen verglichen werden konnten. Die DNA wurde im Gel elektrophoretisch aufgetrennt bis die Marker eine gute Trennung indizierten und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und so fotografiert, dass der Intensitätsunterschied der verschiedenen Banden der DNA-Leiter gut zu erkennen war. Anhand der Intensität der DNA-Banden der aufgetragenen Proben im Verhältnis zu den Banden der DNA-Leiter mit ähnlicher Größe, wurde die DNA-Konzentration der PCR-Produkte abgeschätzt. Die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden tabellarisch erfasst.

6.2.16.1.3 Erstellung von DNA-Fragment-Pools

Um die zu sequenzierenden PCR-Produkte eines Stammes nebeneinander in einem Ansatz vorliegen zu haben, wurden sogenannten DNA-Fragment-/ oder PCR-Produkt-Pools erstellt,

die alle Gene eines Stammes enthielten. Um eine homogene Fragmentierung zu erreichen, wurden Produkte eines definierten Größenbereichs zusammengegeben. Diese entsprachen 500 bp - 1000 bp für Pool 1, 1000 bp - 2000 bp für Pool 2 und 200 bp - 500 bp für Pool 3.

Anhand der abgeschätzten Konzentrationen der einzelnen PCR-Produkte, wurde die jeweilige Menge pro Probe in μL berechnet, welche einer Menge von 20, 40 oder 60 ng DNA des Produkts entsprach. Es wurde eine Menge von je 40 ng pro PCR-Produkt eingesetzt. In Fällen, in denen die geschätzte DNA-Menge im PCR-Ansatz unter der anvisierten DNA-Menge lag, wurde die gesamte vorhandene Probe eingesetzt. So wurden die jeweiligen PCR-Produkte eines Stammes in den errechneten Mengen zusammengegeben, sodass aus ihnen ein DNA-Pool resultierte, in dem alle vorgegeben Produkte eines Größenbereichs nebeneinander vorlagen. Die PCR-Fragment-Pools waren von verhältnismäßig großem Volumen bei relativ geringer Konzentration. Daher wurden sie anschließend über die Agencourt AMPure[®] XP Beads nach Vorgabe des Kit-Protokolls (vgl. Kap. 6.2.10.4) aufgereinigt und konzentriert. Die DNA wurde anschließend in einem Volumen von 20 μL Low TE Puffer aufgenommen und direkt weiterverwendet oder eingefroren. Nach der Aufreinigung wurden die Proben fluorometrisch am Qubit[®] vermessen um ihre Konzentration zu bestimmen.

6.2.16.1.4 Fragmentierung der DNA-Pools

Als Ausgangsmenge wurden je 200 ng DNA der gereinigten und konzentrierten PCR-Pools für die Fragmentierung eingesetzt. Die entsprechenden Volumina der Proben wurden anhand der zuvor am Qubit gemessenen Konzentrationen berechnet. Der Reaktionsansatz wurde zusammengesetzt wie in Tabelle 6-42 aufgeführt.

Tabelle 6-42: Reaktionsansatz für den Fragmentase Verdau

Zusammensetzung	Menge
Menge der gereinigten Probe, die 200ng DNA enthält (berechnet anhand der gemessenen Konzentration)	1-17 μL
Fragmentase Puffer NEB	2 μL
Fragmentase NEB	1 μL
Wasser	ad 20 μL

Die Fragmentase wurde dem Ansatz als letztes zugegeben, dieser wurde homogenisiert, kurz zentrifugiert für die Reaktion 24,5, 26,5 oder 28 Minuten bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Für die Pools mit Fragmenten von 500-900 bp Größe wurden Inkubationszeiten von 24,5 min, bei 500-1000 bp 26,5 min und für die Pools mit Produkten von über 1000 bp Größe 28 min gewählt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion sofort durch Zugabe und Mischen mit 5 µL 0,5 M EDTA und gestoppt und auf Eis gelagert.

Im Falle dessen, dass mehrere Pools pro Probe fragmentiert worden waren, wurden sie an dieser Stelle zusammengegeben. Zusätzlich wurden diejenigen PCR-Produkte, die aufgrund ihrer Größe von 200 bp bis zu 550 bp nicht fragmentiert wurden, wie das Produkt von *parC* oder auch *gyrA* an dieser Stelle in einer Menge die ca. 1 ng DNA enthält zugegeben.

Anschließend wurden die Proben erneut über das Agencourt AMPure[®] XP Kit aufbereitet, wie in Kap. 6.2.10.4 beschrieben. Die gereinigte Probe wurde dann in einem Volumen von 21 µL Low-TE-Puffer aufgenommen. Der Erfolg der Fragmentierung wurde anschließend durch die Analyse der Probe auf dem Bioanalyzer überprüft. Gut fragmentierte Proben, die ausreichend zerkleinert waren und genug Material im Größenbereich von 200-400 bp, bzw. 200-550 bp aufwiesen wurden für die Präparation der NGS-Library weiterverwendet.

6.2.16.2 Präparation der NGS-Library und Sequenzierung auf dem Ion Torrent™

Im Falle der standardisierten Sequenzierung eines Genoms stellt die gescherte und aufgereinigte gesamte DNA-Probe eines Stammes das Ausgangsmaterial für die Präparation der Library dar. Als Ausgangsmaterial für die RP-MLST NGS-Sequenzierung wurden die fragmentierten und aufbereiteten Pools der DNA-Fragmente eingesetzt. Eine Menge von 100 ng DNA der fragmentierten Proben-Pools wurde für den *End Repair* Ansatz mit entsprechendem Puffer und Enzym der aus dem NEBNext[®] Library-Kit (vgl. Tabelle 6-13) zu 60 µL angesetzt. Anschließend folgte die Reaktion zur Adapter-Ligation, ebenfalls nach Kitbeschreibung, unter Einsatz eines der Barcode-Adapters (Ion Express™ Barcode Adapters) mit den entsprechenden Enzymen und Puffer zu 100 µL Volumen.

6.2.16.2.1 Selektion der Fragmente für die NGS-Library

Für die weitere Präparation der Library mussten zunächst die Fragmente der richtigen Größe (Größenbereich von 200-550 bp) vom Rest der Probe separiert werden. Dies wurde mittels des Agencourt AMPure®XP Kit durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Ion Torrent™ Protokolls zur Präparation der Library in Kombination mit dem Agencourt AMPure®XP Protokoll zur Aufreinigung (wie in Kap. 6.2.10.4 beschrieben), mit dem Unterschied der Größenselektion in zwei Schritten. Für die Größenselektion der benötigten Fragmente wurde ein 0,7-faches Volumen zur Selektion der Fragmente > 550 bp (ca.), in diesem Fall von 70 µL Beads zur 100 µL Probe gegeben. Die Produkte aus dieser Selektion wurden verworfen. Aus dem verbliebenen Ansatz wurden anschließend die Fragmente des Zielgrößenbereichs (200-550 bp) mit der 0,15-fachen Menge an Volumen, hier 15 µL Beads, selektiert. Die so erhaltene Library-DNA wurde in 25 µL Low-TE Puffer aufgenommen.

6.2.16.2.2 Präparation der NGS-Library

Anschließend an die Selektion der Fragmente erfolgte die Library Präparation mit dem NEB Next Library Präparation Kit in Kombination mit dem Ion Torrent™ Barcode Kit. Dabei wurden die DNA-Fragmente der einzelnen Proben jeweils mit einem speziellen Barcode-Adapter ligiert, welcher bei der Parallelsequenzierung eine Zuordnung zur jeweiligen Probe ermöglicht. Der Barcode sichert bei der parallelen Sequenzierung vieler Stämme auf einem Chip die Zuordnung der einzelnen Sequenzen zu den jeweiligen Proben. Anschließend erfolgte die weitere Präparation der Library anhand der Vorgaben des Kit-Herstellers.

6.2.16.2.3 Library Kontrolle und Proben-Pooling

Die erstellten NGS-Librarys der einzelnen Proben wurden auf dem Bioanalyzer auf ihre Qualität hin kontrolliert und quantifiziert. Die Analyse erfolgte mittels eines Bioanalyzer High Sensitivity DNA Assays (vgl. Kap. 6.2.12.3). Anhand der Ergebnisse wurde die Qualität der Librarys bewertet und diese bei Entsprechen weiterverwendet. Nach erfolgreicher Erstellung wurden die Librarys wie folgt äquivalent gepoolt: Auf Basis der quantitativen Werte der Library wurde jede einzelne Probe so mit Low-TE Puffer verdünnt, dass ihre finale Konzentration für

die Sequenzierung 100 pmol/L entsprach. Anschließend wurden 16 Proben mit ihren unterschiedlichen Barcodes in den errechneten Mengen äquivalent zu einem Ansatz zusammengegeben. In diesem lagen die präparierten Probenpools dann parallel nebeneinander für die Sequenzierung vor.

6.2.16.2.4 Ion OneTouch™ Amplifizierung

Die gepoolte Gesamtprobe, bestehend aus den 16 mit Barcode versehenen Stämmen wurde mittels des zugehörigen Kits auf dem Ion OneTouch amplifiziert. Die Durchführung richtete sich nach den Herstellerangaben. Anschließend wurde die Probe nach den Kit- und Herstellerangaben auf dem ES Modul aufgereinigt und auf den Sequenzierchips aufgebracht.

Nach dieser erneuten Amplifikation und Aufbereitung nach dem Standard Workflow des Ion Torrent™ PGM Systems wurde die Probe auf einen 314er oder 316er Chip geladen. Zwei solche Chips mit je 16 Proben wurden dann in zwei direkt aufeinander folgend Läufen parallel auf dem Ion Torrent™ PGM sequenziert.

6.2.16.2.5 Ion Torrent™ PGM Sequenzierung

Die eigentliche Sequenzierung auf dem Ion Torrent™ erfolgte unter Verwendung des zugehörigen Sequenzierungs-Kits mit Durchführung nach den Herstellerangaben. Die Speicherung, Steuerung und Verarbeitung der Daten aus der Sequenzierung erfolgte mittels der Ion Torrent™ Software über den Ion Torrent™ Server. Für das Alignment der Sequenzen wurden die in Kap. 6.1.1.3 und 6.1.1.4 aufgeführten Referenzgenome der *E. coli* ST131 Stämme *E. coli* NA114 und *E. coli* JJ1886 verwendet, sowie auch die der nicht-ST131 Referenzstämme *E. coli* MG1655 und *E. coli* CFT073.

6.2.16.3 RP-MLST-Analyse

Die Reads aus der Ion-Torrent™ Sequenzierung wurden mittels der Ion Torrent™ Software gegen einen Referenzstamm ausgerichtet (*align*) und die so erhaltenen Sequenzen anschließend mittels IGV und CLC Genomics betrachtet und ausgewertet.

6.2.16.3.1 MLST-Analyse der NGS-Daten mit IGV

Die MLST-Bestimmung der klinischen Isolate aus der Ion Torrent™ Sequenzierung wurde in IGV durchgeführt. Die bereits auf dem Ion Torrent™ Server an einen ausgewählten Referenzstamm angelegten Sequenzen wurden in IGV vergleichend betrachtet. Sie wurden für die Analyse auf *E. coli* ST131 direkt mit einem entsprechenden ST131 Referenzstamm verglichen, sodass Unterschiede in den Housekeeping-Genen sofort ersichtlich waren. Dazu wurden die Genome von *E. coli* NA114 und *E. coli* JJ1886 verwendet. Zur *de novo* Analyse der einzelnen Sequenzen wurde die Consensus Sequenz aller Reads des relevanten Genabschnitts aus IGV exzerpiert. Die so erhaltenen Sequenzen der Housekeeping-Gene wurden direkt auf der Plattformen Enterobase und der MLST-Datenbank des Institut Pasteur mit den entsprechenden MLST-Tools abgeglichen, um die Allele der Housekeeping-Gene zu bestimmen. Für jedes Schema wurde dann der jeweilige *Sequence Type* bestimmt, wie in Kap. 6.2.15.2 beschrieben.

6.2.16.3.2 RP-MLST-Analyse der NGS-Daten mit der CLC Genomics Workbench

Die Auswertung der RP-MLST Untersuchungen nach Achtman und Pasteur erfolgte in einem zweiten unabhängigen Durchgang softwarebasiert mithilfe der CLC Genomics Workbench unter Einsatz des MLST Typing Plugins für Genom und Ion Torrent™ Daten.

Innerhalb der Software CLC Genomics Workbench wurde ein Workflow aufgesetzt, der die *single read* Sequenzen aus der Ion Torrent™ Sequenzierung verwendet und diese mittels des *Microbial Genomics Module* Plugins auf Qualität trimmt und ein *read mapping* gegen den Referenzstamm *E. coli* MG1655 durchführt. Anschließend wurden unter Verwendung des „*Type a Known Species*“ Workflows mit „*Type With MLST Scheme*“ eine MLST-Bestimmung nach beiden Schemata durchgeführt und mit „*Find Resistance With Nucleotide DB*“ (kurz: „*Find Resistance*“) nach resistenzassoziierten Sequenzen gesucht, die Housekeeping-Gene der beiden MLST-Schemata analysiert und deren STs ermittelt. Eine Übersicht des verwendeten Workflows findet sich im Anhang (Kap. 8.4.4). Die verwendeten Datenbanken wurden über die CLC Genomics Workbench bezogen. Zusätzlich wurde auch das *Find Resistance with Nucleotide DB* Tool zur Resistenzdetektion bei *E. coli* verwendet. Die Ergebnisse der Analysen

wurden von der Software in Reports ausgegeben. Die angelegten Sequenzen wurden zusätzlich als Tracks der einzelnen Reads sowie der gesamten Sequenz in Konsens dargestellt. Alle Abweichungen und Mutationen in Bezug auf die Referenzsequenz von *E. coli* MG1655 wurden als Resultate innerhalb des Programms in Tracks dargestellt. Aus dem *Variant Track* wurden die dargestellten Abweichungen auf Sequenzebene und im *Aminoacid Track* die Änderungen auf Aminosäureebene ausgelesen.

6.2.16.4 RP-MLST Workflow zur Untersuchung der klinischen Isolate

Von den ausgewählten Isolaten wurde, wie in den vorherigen Kapiteln zur Methode RP-MLST beschrieben, DNA isoliert, von dieser aus die zur Analyse ausgewählten Gene amplifiziert, anschließend die PCR-Produkte abgeschätzt, gepoolt, konzentriert, geschert, aufbereitet und eine Library präpariert, die anschließend auf dem Ion Torrent™ sequenziert wurde, wie in den Kapiteln 6.2.16.1 und 6.2.16.2 beschrieben. Als Referenz für das Alignment der erhaltenen DNA-Sequenzen dienten die *E. coli* ST131 Stämme NA114 (GenBank: CP002797), *E. coli* JJ1886 (GenBank: CP006784) sowie *E. coli* MG1655 (GenBank: U00096.2). Die ersten beiden *E. coli* ST131 Isolate wurden für eine schnelle Detektion von *E. coli* ST131 ausgewählt, weil es sich einerseits, bei NA114, um den ersten vollständig sequenzierten *E. coli* ST131 Stamm handelte und zweitens bei JJ1886, um ein besser annotiertes *E. coli* ST131 Isolat. Die DNA-Sequenzdaten wurden mit dem Programm IGV (Robinson *et al.* 2011) dargestellt und ausgewertet (vgl. Kap. 6.2.16.3.1). Die jeweiligen Consensus-Sequenzen der einzelnen Gene wurden aus IGV extrahiert und aus ihnen über die spezifischen Allele der Housekeeping-Gene der ST ermittelt. Die Zuordnung anhand der beiden etablierten Schemata basierte auf den MLST Referenzsequenzen der Datenbanken nach Achtman (Wirth *et al.* 2006), und des Institut Pasteur (Jaureguy *et al.* 2008). Die Analyse des *Sequence Types* erfolgte im Hinblick auf ST131 entweder direkt durch den Sequenzabgleich mit einem Referenzstamm des gleichen ST-Typs oder durch Abgleich über die in Kap. 6.2.15.2 angeführten Datenbanken. Die Sequenzdaten wurden zusätzlich noch mit der CLC Genomics Software ausgewertet (vgl. Kap. 6.2.16.3.2).

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, E. P.; Newton, G. G. F.; Crawford, K.; Burton, H. S.; Hale, C. W. (1953): Cephalosporin N: a new type of penicillin. *Nature* 171 (4347), S. 343. DOI: 10.1038/171343a0.
- Adams, J. M.; Capecchi, M. R. (1966): N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55 (1), S. 147–155. DOI: 10.1073/pnas.55.1.147.
- Adler, Marlen; Anjum, Mehreen; Andersson, Dan I.; Sandegren, Linus (2016): Combinations of mutations in envZ, ftsI, mrdA, acrB and acrR can cause high-level carbapenem resistance in Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (5), S. 1188–1198. DOI: 10.1093/jac/dkv475.
- Aiba, H.; Mizuno, T. (1990): Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, stimulates the transcription of the ompF and ompC genes in Escherichia coli. *FEBS letters* 261 (1), S. 19–22. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80626-t.
- Aiba, H.; Nakasai, F.; Mizushima, S.; Mizuno, T. (1989): Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, results in stimulation of its DNA-binding ability. *Journal of biochemistry* 106 (1), S. 5–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122817.
- Alcock, Brian P.; Huynh, William; Chalil, Romeo; Smith, Keaton W.; Raphenya, Amogelang R.; Wlodarski, Mateusz A. et al. (2023): CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research* 51 (D1), D690–D699. DOI: 10.1093/nar/gkac920.
- Aldred, Katie J.; Kerns, Robert J.; Osheroff, Neil (2014): Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53 (10), S. 1565–1574. DOI: 10.1021/bi5000564.
- Alekshun, M. N.; Levy, S. B. (1997): Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41 (10), S. 2067–2075. DOI: 10.1128/AAC.41.10.2067.
- Alzayn, Maryam; Dulyayangkul, Punyawee; Satapoomin, Naphat; Heesom, Kate J.; Avison, Matthew B. (2021): OmpF Downregulation Mediated by Sigma E or OmpR Activation Confers Cefalexin Resistance in Escherichia coli in the Absence of Acquired β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 65 (11), e0100421. DOI: 10.1128/AAC.01004-21.
- Ambler, R. P. (1980): The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 289 (1036), S. 321–331. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049.
- Andersen, J.; Forst, S. A.; Zhao, K.; Inouye, M.; Delihias, N. (1989): The function of micF RNA. micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* 264 (30), S. 17961–17970.
- Andersen, Paal S.; Stegger, Marc; Aziz, Maliha; Contente-Cuomo, Tania; Gibbons, Henry S.; Keim, Paul et al. (2013): Complete Genome Sequence of the Epidemic and Highly Virulent

- CTX-M-15-Producing H30-Rx Subclone of Escherichia coli ST131. *Genome announcements* 1 (6). DOI: 10.1128/genomeA.00988-13.
- Andrews, J. M. (2007): BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 6). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (1), S. 20–41. DOI: 10.1093/jac/dkm110.
- Andrup, Lars; Andersen, Katja (1999): A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from Escherichia coli and plasmid pCF10 from Enterococcus faecalis. *Microbiology (Reading, England)* 145 (Pt 8), S. 2001–2009. DOI: 10.1099/13500872-145-8-2001.
- Anhorn, Alexander (2017): Untersuchungen zur Rolle des ramRA-Operons bei der Ausprägung multipler Antibiotikaresistenz in Citrobacter-Arten. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky; Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky. Online verfügbar unter <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/7274>.
- Antimicrobial Resistance Division (AMR) (2016): Global action plan on antimicrobial resistance. *World Health Organization*, 01.01.2016. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>, zuletzt geprüft am 17.03.2024.
- Antunes, Nuno T.; Fisher, Jed F. (2014): Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 3 (3), S. 398–434. DOI: 10.3390/antibiotics3030398.
- Arntjen, Birte (2011): Der Einfluss von multiple antibiotic resistance (mar) Mutationen auf die Fitness fluorochinolonresistenter Mutanten von Escherichia coli. Zugl.: Hamburg, Univ., FB Chemie, Diss., 2011. 1. Aufl. Herzogenrath: Shaker (Berichte aus der Pharmazie).
- Arpin, C.; Quentin, C.; Grobost, F.; Cambau, E.; Robert, J.; Dubois, V. *et al.* (2009): Nationwide survey of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63 (6), S. 1205–1214. DOI: 10.1093/jac/dkp108.
- Avasthi, Tiruvayipati Suma; Kumar, Narender; Baddam, Ramani; Hussain, Arif; Nandanwar, Nishant; Jadhav, Savita; Ahmed, Niyaz (2011): Genome of multidrug-resistant uropathogenic Escherichia coli strain NA114 from India. *Journal of bacteriology* 193 (16), S. 4272–4273. DOI: 10.1128/JB.05413-11.
- Aworh, Mabel Kamweli; Kwaga, Jacob K. P.; Hendriksen, Rene S.; Okolocha, Emmanuel C.; Harrell, Erin; Thakur, Siddhartha (2023): Quinolone-resistant Escherichia coli at the interface between humans, poultry and their shared environment- a potential public health risk. *One health outlook* 5 (1), S. 2. DOI: 10.1186/s42522-023-00079-0.
- Bagel, S.; Hüllen, V.; Wiedemann, B.; Heisig, P. (1999): Impact of gyrA and parC mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43 (4), S. 868–875. DOI: 10.1128/AAC.43.4.868.
- Banerjee, Ritu; Johnson, James R. (2014): A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of Escherichia coli sequence type 131. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (9), S. 4997–5004. DOI: 10.1128/AAC.02824-14.

- Barbosa, Teresa M.; Pomposiello, Pablo J. (2005): The mar Regulon. David G. White, Michael N. Alekshun, Patrick F. McDermott und Stuart B. Levy (Hg.): *Frontiers in antimicrobial resistance. A tribute to Stuart B. Levy*. Washington, D.C, Oxford: ASM Press; Blackwell distributor, S. 209–223.
- Bauernfeind, A.; Grimm, H.; Schweighart, S. (1990): A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18 (5), S. 294–298. DOI: 10.1007/BF01647010.
- Behjati, Sam; Tarpey, Patrick S. (2013): What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* 98 (6), S. 236–238. DOI: 10.1136/archdischild-2013-304340.
- Berche, Patrick (2022): The Spanish flu. *Presse medicale (Paris, France : 1983)* 51 (3), S. 104127. DOI: 10.1016/j.lpm.2022.104127.
- bioMérieux (Hg.): Tech.mat.DS, McFarland Standards, bioMérieux, BD.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7 (6), S. 1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
- Blair, Jessica M. A.; Webber, Mark A.; Baylay, Alison J.; Ogbolu, David O.; Piddock, Laura J. V. (2015): Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13 (1), S. 42–51. DOI: 10.1038/nrmicro3380.
- Blanc, Dominique S.; Magalhães, Bárbara; Koenig, Isabelle; Senn, Laurence; Grandbastien, Bruno (2020): Comparison of Whole Genome (wg-) and Core Genome (cg-) MLST (BioNumerics™) Versus SNP Variant Calling for Epidemiological Investigation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 11, S. 1729. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01729.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M. *et al.* (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)* 277 (5331), S. 1453–1462. DOI: 10.1126/science.277.5331.1453.
- Blondeau, Joseph M. (2004): Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology* 49 Suppl 2 (2, Supplement 2), S73-8. DOI: 10.1016/j.survophthal.2004.01.005.
- Bonnet, R. (2004): Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48 (1), S. 1–14. DOI: 10.1128/AAC.48.1.1-14.2004.
- Bonnin, Rémy A.; Poirel, Laurent; Carattoli, Alessandra; Nordmann, Patrice (2012): Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131. *PLOS ONE* 7 (4), e34752. DOI: 10.1371/journal.pone.0034752.
- Brown, Terence A. (2010): Gene cloning and DNA analysis. An introduction. 6. ed. Chichester: Wiley-Blackwell. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=530049>.

- Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. (1995): A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39 (6), S. 1211–1233. DOI: 10.1128/aac.39.6.1211.
- Bush, Karen (2018): Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62 (10). DOI: 10.1128/AAC.01076-18.
- Bush, Karen; Bradford, Patricia A. (2016): β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Bush, Karen; Jacoby, George A. (2010): Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (3), S. 969–976. DOI: 10.1128/AAC.01009-09.
- Cagnacci, Simone; Gualco, Laura; Debbia, Eugenio; Schito, Gian Carlo; Marchese, Anna (2008): European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *Journal of clinical microbiology* 46 (8), S. 2605–2612. DOI: 10.1128/JCM.00640-08.
- Cain, B. D.; Norton, P. J.; Eubanks, W.; Nick, H. S.; Allen, C. M. (1993): Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 175 (12), S. 3784–3789. DOI: 10.1128/jb.175.12.3784-3789.1993.
- Cantón, Rafael; Coque, Teresa M. (2006): The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology* 9 (5), S. 466–475. DOI: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Carattoli, Alessandra; Bertini, Alessia; Villa, Laura; Falbo, Vincenzo; Hopkins, Katie L.; Threlfall, E. John (2005): Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* 63 (3), S. 219–228. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- Casadaban, M. J. (1976): Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of molecular biology* 104 (3), S. 541–555. DOI: 10.1016/0022-2836(76)90119-4.
- Castanheira, Mariana; Simner, Patricia J.; Bradford, Patricia A. (2021): Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance* 3 (3), dlab092. DOI: 10.1093/jacamr/dlab092.
- Caugant, D. A.; Levin, B. R.; Orskov, I.; Orskov, F.; Svanborg Eden, C.; Selander, R. K. (1985): Genetic diversity in relation to serotype in *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 49 (2), S. 407–413. DOI: 10.1128/iai.49.2.407-413.1985.
- Chaudhuri, Roy R.; Henderson, Ian R. (2012): The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12 (2), S. 214–226. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.01.005.
- Chen, Shuo; Zhang, Aixia; Blyn, Lawrence B.; Storz, Gisela (2004): MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 186 (20), S. 6689–6697. DOI: 10.1128/JB.186.20.6689-6697.2004.
- Chen, Xiu; Li, Yuhua; Zhang, Yan; Yang, Jianting; Bian, Liujiào (2017): Binding of TEM-1 beta-lactamase to beta-lactam antibiotics by frontal affinity chromatography. *Journal of*

chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 1051, S. 75–83. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.03.013.

Christaki, Eirini; Marcou, Markella; Tofarides, Andreas (2020): Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* 88 (1), S. 26–40. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3.

Christensen, Søren Brøgger (2021): Drugs That Changed Society: History and Current Status of the Early Antibiotics: Salvarsan, Sulfonamides, and β -Lactams. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (19). DOI: 10.3390/molecules26196057.

Chubiz, Lon M.; Rao, Christopher V. (2011): Role of the mar-sox-rob regulon in regulating outer membrane porin expression. *Journal of bacteriology* 193 (9), S. 2252–2260. DOI: 10.1128/JB.01382-10.

Clark, David P.; Pazdernik, Nanette Jean; McGehee, Michelle R. (2019): Molecular biology. Third edition. London, San Diego, Cambridge, Oxford: Academic Press an imprint of Elsevier (Academic cell).

Clark, Gemma; Paszkiewicz, Konrad; Hale, James; Weston, Vivienne; Constantinidou, Chrystala; Penn, Charles *et al.* (2012): Genomic analysis uncovers a phenotypically diverse but genetically homogeneous Escherichia coli ST131 clone circulating in unrelated urinary tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (4), S. 868–877. DOI: 10.1093/jac/dkr585.

Clark, Karen; Karsch-Mizrachi, Ilene; Lipman, David J.; Ostell, James; Sayers, Eric W. (2016): GenBank. *Nucleic Acids Research* 44 (D1), D67-72. DOI: 10.1093/nar/gkv1276.

Clermont, Olivier; Bonacorsi, Stéphane; Bingen, Edouard (2000): Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (10), S. 4555–4558. DOI: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000.

Clermont, Olivier; Christenson, Julia K.; Denamur, Erick; Gordon, David M. (2012): The ClermontEscherichia coliphylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* 5 (1), S. 58–65. DOI: 10.1111/1758-2229.12019.

Clermont, Olivier; Dhanji, Hiran; Upton, Mathew; Gibreel, Tarek; Fox, Andrew; Boyd, David *et al.* (2009): Rapid detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli encompassing the CTX-M-15-producing strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64 (2), S. 274–277. DOI: 10.1093/jac/dkp194.

Clermont, Olivier; Gordon, David; Denamur, Erick (2015): Guide to the various phylogenetic classification schemes for Escherichia coli and the correspondence among schemes. *Microbiology (Reading, England)* 161 (Pt 5), S. 980–988. DOI: 10.1099/mic.0.000063.

Clermont, Olivier; Lavollay, Marie; Vimont, Sophie; Deschamps, Catherine; Forestier, Christiane; Branger, Catherine *et al.* (2008): The CTX-M-15-producing Escherichia coli diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (5), S. 1024–1028. DOI: 10.1093/jac/dkn084.

CLSI (2014): CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100-S24. CLSI M100 ED24:2014, zuletzt aktualisiert am 01.03.2023, zuletzt geprüft am 01.03.2023.

Cohen, S. P.; McMurry, L. M.; Hooper, D. C.; Wolfson, J. S.; Levy, S. B. (1989): Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 33 (8), S. 1318–1325. DOI: 10.1128/AAC.33.8.1318.

Colpan, Aylin; Johnston, Brian; Porter, Stephen; Clabots, Connie; Anway, Ruth; Thao, Lao *et al.* (2013): *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 57 (9), S. 1256–1265. DOI: 10.1093/cid/cit503.

Coque, Teresa M.; Novais, Angela; Carattoli, Alessandra; Poirel, Laurent; Pitout, Johann; Peixe, Luísa *et al.* (2008): Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging infectious diseases* 14 (2), S. 195–200. DOI: 10.3201/eid1402.070350.

Correia, Susana; Poeta, Patrícia; Hébraud, Michel; Capelo, José Luis; Igrejas, Gilberto (2017): Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of medical microbiology* 66 (5), S. 551–559. DOI: 10.1099/jmm.0.000475.

Couturier, M.; Bex, F.; Bergquist, P. L.; Maas, W. K. (1988): Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews* 52 (3), S. 375–395. DOI: 10.1128/mr.52.3.375-395.1988.

Crozat, Estelle; Fournes, Florian; Cornet, François; Hallet, Bernard; Rousseau, Philippe (2014): Resolution of Multimeric Forms of Circular Plasmids and Chromosomes. *Microbiology spectrum* 2 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.

Curtiss, R. (1969): Bacterial conjugation. *Annual review of microbiology* 23, S. 69–136. DOI: 10.1146/annurev.mi.23.100169.000441.

Darby, Elizabeth M.; Trampari, Eleftheria; Siasat, Pauline; Gaya, Maria Solsona; Alav, Ilyas; Webber, Mark A.; Blair, Jessica M. A. (2023): Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* 21 (5), S. 280–295. DOI: 10.1038/s41579-022-00820-y.

Dark, Michael J. (2013): Whole-genome sequencing in bacteriology: state of the art. *Infection and drug resistance* 6, S. 115–123. DOI: 10.2147/IDR.S35710.

Database resources of the National Center for Biotechnology Information (2016). *Nucleic Acids Research* 44 (D1), D7-19.

Delcour, Anne H. (2009): Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1794 (5), S. 808–816. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.

Delgado, J.; Forst, S.; Harlocker, S.; Inouye, M. (1993): Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional

- activator for ompF and ompC in Escherichia coli. *Molecular microbiology* 10 (5), S. 1037–1047. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00974.x.
- Delihias, N.; Forst, S. (2001): MicF: an antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress factors. *Journal of molecular biology* 313 (1), S. 1–12. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5029.
- Dionisio, Francisco; Zilhão, Rita; Gama, João Alves (2019): Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid* 102, S. 29–36. DOI: 10.1016/j.plasmid.2019.01.003.
- Doi, Yohei; Park, Yoon Soo; Rivera, Jesabel I.; Adams-Haduch, Jennifer M.; Hingwe, Ameet; Sordillo, Emilia M. *et al.* (2013): Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli infection in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 56 (5), S. 641–648. DOI: 10.1093/cid/cis942.
- Doumith, M.; Day, M.; Ciesielczuk, H.; Hope, R.; Underwood, A.; Reynolds, R. *et al.* (2015): Rapid identification of major Escherichia coli sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of clinical microbiology* 53 (1), S. 160–166. DOI: 10.1128/JCM.02562-14.
- Drawz, Sarah M.; Bonomo, Robert A. (2010): Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews* 23 (1), S. 160–201. DOI: 10.1128/CMR.00037-09.
- Drlica, Karl; Malik, Muhammad; Kerns, Robert J.; Zhao, Xilin (2008): Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52 (2), S. 385–392. DOI: 10.1128/AAC.01617-06.
- Du, Dijun; Wang, Zhao; James, Nathan R.; Voss, Jarrod E.; Klimont, Ewa; Ohene-Agyei, Thelma *et al.* (2014): Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 509 (7501), S. 512–515. DOI: 10.1038/nature13205.
- Dunnen, J. T. den; Antonarakis, S. E. (2001): Nomenclature for the description of sequence variations. (mutation nomenclature). *Hum Genet* 109(1): 121-124, 2001. Online verfügbar unter https://www.hgmd.cf.ac.uk/docs/mut_nom.html, zuletzt aktualisiert am 11.10.2012, zuletzt geprüft am 25.03.2024.
- Dupont, Hervé; Choinier, Pascaline; Roche, David; Adiba, Sandine; Sookdeb, Megan; Branger, Catherine *et al.* (2017): Structural Alteration of OmpR as a Source of Ertapenem Resistance in a CTX-M-15-Producing Escherichia coli O25b:H4 Sequence Type 131 Clinical Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61 (5). DOI: 10.1128/AAC.00014-17.
- Dürrenberger, M. B.; Villiger, W.; Bächli, T. (1991): Conjugational junctions: morphology of specific contacts in conjugating Escherichia coli bacteria. *Journal of structural biology* 107 (2), S. 146–156. DOI: 10.1016/1047-8477(91)90018-r.
- Eagle, H.; Fleischman, R.; Levy, M. (1953): "Continuous" vs. "discontinuous" therapy with penicillin; the effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. *The New England journal of medicine* 248 (12), S. 481–488. DOI: 10.1056/NEJM195303192481201.

El Ghachi, Meriem; Bouhss, Ahmed; Blanot, Didier; Mengin-Lecreulx, Dominique (2004): The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *Journal of Biological Chemistry* 279 (29), S. 30106–30113. DOI: 10.1074/jbc.M401701200.

Emrich, Nadine-Christine (2011): Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6′)-Ib-cr und deren Bedeutung für die Aktivität von Fluorchinolonen im Vergleich zu anderen plasmidkodierten und chromosomalen Fluorchinolone-Resistenzmechanismen. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky; Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky. Online verfügbar unter <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/4511>.

Enterobase. A Phylogenomic Database of Enteric Bacteria (2023). Online verfügbar unter <https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, zuletzt aktualisiert am 08.12.2023, zuletzt geprüft am 08.12.2023.

Escherich, T. (1886): Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur Physiologie der Verdauung. Ferdinand Enke, 1886.: Stuttgart: Verlag.

Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers - 25922 | ATCC (2022). Online verfügbar unter <https://www.atcc.org/products/25922>, zuletzt aktualisiert am 23.08.2022, zuletzt geprüft am 23.08.2022.

Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers - 35218 | ATCC (2022). Online verfügbar unter <https://www.atcc.org/products/35218>, zuletzt aktualisiert am 23.08.2022, zuletzt geprüft am 23.08.2022.

Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers - 8739 | ATCC (2022). Online verfügbar unter <https://www.atcc.org/products/8739>, zuletzt aktualisiert am 23.08.2022, zuletzt geprüft am 23.08.2022.

Escherichia coli cgMLST (2023). Online verfügbar unter <https://www.cgmlst.org/ncs/schema/5064703/>, zuletzt aktualisiert am 26.04.2023, zuletzt geprüft am 26.04.2023.

Escherichia typing (2023). Online verfügbar unter https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef, zuletzt aktualisiert am 24.07.2023, zuletzt geprüft am 24.07.2023.

ESCMID: "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Online verfügbar unter <http://www.eucast.org>.

ESCMID (2019): The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. Online verfügbar unter https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents, zuletzt aktualisiert am 01.03.2023, zuletzt geprüft am 01.03.2023.

European Centre for Disease Prevention and Control (2010): Antimicrobial resistance (AMR). Online verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance>, zuletzt aktualisiert am 30.01.2024, zuletzt geprüft am 02.04.2024.

- Ewing, W. H. (1953): Serological relationships between shigella and coliform cultures. *Journal of bacteriology* 66 (3), S. 333–340. DOI: 10.1128/jb.66.3.333-340.1953.
- Fàbrega, Anna; Madurga, Sergi; Giralt, Ernest; Vila, Jordi (2009): Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology* 2 (1), S. 40–61. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x.
- Fàbrega, Anna; Martin, Robert G.; Rosner, Judah L.; Tavio, M. Mar; Vila, Jordi (2010): Constitutive SoxS expression in a fluoroquinolone-resistant strain with a truncated SoxR protein and identification of a new member of the marA-soxS-rob regulon, mdtG. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (3), S. 1218–1225. DOI: 10.1128/AAC.00944-09.
- Fernandez-Lopez, Raul; Toro, Maria de; Moncalian, Gabriel; Garcillan-Barcia, M. Pilar; La Cruz, Fernando de (2016): Comparative Genomics of the Conjugation Region of F-like Plasmids: Five Shades of F. *Frontiers in Molecular Biosciences* 3, S. 71. DOI: 10.3389/fmolb.2016.00071.
- Fisher, Jed F.; Mobashery, Shahriar (2009): Three decades of the class A beta-lactamase acyl-enzyme. *Current protein & peptide science* 10 (5), S. 401–407. DOI: 10.2174/138920309789351967.
- Fleming, Alexander (1929): On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology* 10 (3), S. 226–236.
- Fleming, Alexander (1945): Penicillin. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945. Online verfügbar unter <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>, zuletzt aktualisiert am 01.04.2024, zuletzt geprüft am 02.04.2024.
- Forde, Brian M.; Ben Zakour, Nouri L.; Stanton-Cook, Mitchell; Phan, Minh-Duy; Totsika, Makrina; Peters, Kate M. *et al.* (2014): The complete genome sequence of Escherichia coli EC958: a high quality reference sequence for the globally disseminated multidrug resistant E. coli O25b:H4-ST131 clone. *PloS one* 9 (8), e104400. DOI: 10.1371/journal.pone.0104400.
- Foulds, J.; Chai, T. (1979): Isolation and characterization of isogenic E. coli strains with alterations in the level of one or more major outer membrane proteins. *Canadian journal of microbiology* 25 (3), S. 423–427. DOI: 10.1139/m79-065.
- Fredborg, Marlene; Andersen, Klaus R.; Jørgensen, Erik; Droce, Aida; Olesen, Tom; Jensen, Bent B. *et al.* (2013): Real-time optical antimicrobial susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology* 51 (7), S. 2047–2053. DOI: 10.1128/JCM.00440-13.
- Frère, J. M.; Nguyen-Distèche, M.; Coyette, J.; Joris, B. (1992): Mode of action: interaction with the penicillin binding proteins. Michael I. Page (Hg.): *The Chemistry of β-Lactams*. Dordrecht, s.l.: Springer Netherlands, S. 148–197.
- Friedman, S. M.; Lu, T.; Drlica, K. (2001): Mutation in the DNA gyrase A Gene of Escherichia coli that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45 (8), S. 2378–2380. DOI: 10.1128/AAC.45.8.2378-2380.2001.

Galardini, Marco; Koumoutsis, Alexandra; Herrera-Dominguez, Lucia; Cordero Varela, Juan Antonio; Telzerow, Anja; Wagih, Omar *et al.* (2017): Phenotype inference in an Escherichia coli strain panel. *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.31035.

Gautreau, I.; NEB (2015): Digestion with NEBNext dsDNA Fragmentase (M0348) v1.

Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M. H.; Nash, H. A. (1976): DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (11), S. 3872–3876. DOI: 10.1073/pnas.73.11.3872.

GESTIS-Stoffdatenbank (2022). Online verfügbar unter <https://gestis.dguv.de/>, zuletzt aktualisiert am 18.11.2022, zuletzt geprüft am 07.03.2023.

Ghosh, Hiren; Doijad, Swapnil; Falgenhauer, Linda; Fritzenwanker, Moritz; Imirzalioglu, Can; Chakraborty, Trinad (2017): blaCTX-M-27-Encoding Escherichia coli Sequence Type 131 Lineage C1-M27 Clone in Clinical Isolates, Germany. *Emerging infectious diseases* 23 (10), S. 1754–1756. DOI: 10.3201/eid2310.170938.

GHS pictograms | UNECE (2023). Online verfügbar unter <https://unece.org/transportdangerous-goods/ghs-pictograms>, zuletzt aktualisiert am 07.03.2023, zuletzt geprüft am 07.03.2023.

Giacobbo, Hans (2022): Die GHS-Gefahrenpiktogramme für Chemikalien, ihre Bedeutung und Anwendung. Online verfügbar unter <https://www.reach-compliance.ch/ghsclp/neuegefahrenpiktogramme/index.html>, zuletzt aktualisiert am 30.08.2022, zuletzt geprüft am 07.03.2023.

Green and Sambrook (2012): Molecular cloning. A laboratory manual. 4. ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Grieß, Eike (2018): tra-Gene. Lexikon der Biologie. Unter Mitarbeit von Grieß, Dr. Eike (E.G.). Hg. v. Spektrum. Online verfügbar unter <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/tra-gene/67172>, zuletzt aktualisiert am 04.09.2018, zuletzt geprüft am 27.04.2024.

Grüger, Thomas (2004): Die Rolle von Topoisomerase IV als Zielstruktur für Inhibitoren in E. coli sowie die Transkriptionskontrolle ihrer Strukturgene parC und parE. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky; Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky. Online verfügbar unter <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/769>.

Haensch, Stephanie; Bianucci, Raffaella; Signoli, Michel; Rajerison, Minoarisoa; Schultz, Michael; Kacki, Sacha *et al.* (2010): Distinct clones of Yersinia pestis caused the black death. *PLoS pathogens* 6 (10), e1001134. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001134.

Harmon, Dana E.; Ruiz, Cristian (2022): The Multidrug Efflux Regulator AcrR of Escherichia coli Responds to Exogenous and Endogenous Ligands To Regulate Efflux and Detoxification. *mSphere* 7 (6), e0047422. DOI: 10.1128/msphere.00474-22.

Harris, Patrick N. A.; Ben Zakour, Nouri L.; Roberts, Leah W.; Wailan, Alexander M.; Zowawi, Hosam M.; Tambyah, Paul A. *et al.* (2018): Whole genome analysis of cephalosporin-resistant Escherichia coli from bloodstream infections in Australia, New Zealand and Singapore: high

- prevalence of CMY-2 producers and ST131 carrying blaCTX-M-15 and blaCTX-M-27. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (3), S. 634–642. DOI: 10.1093/jac/dkx466.
- Headd, Brendan; Bradford, Scott A. (2018): Physicochemical Factors That Favor Conjugation of an Antibiotic Resistant Plasmid in Non-growing Bacterial Cultures in the Absence and Presence of Antibiotics. *Front. Microbiol.* 9, S. 2122. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02122.
- Headd, Brendan; Bradford, Scott A. (2020): The Conjugation Window in an Escherichia coli K-12 Strain with an IncFII Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 86 (17). DOI: 10.1128/AEM.00948-20.
- Hecht, Ariel; Glasgow, Jeff; Jaschke, Paul R.; Bawazer, Lukmaan A.; Munson, Matthew S.; Cochran, Jennifer R. *et al.* (2017): Measurements of translation initiation from all 64 codons in E. coli. *Nucleic Acids Research* 45 (7), S. 3615–3626. DOI: 10.1093/nar/gkx070.
- Hegde, Subray S.; Vetting, Matthew W.; Roderick, Steven L.; Mitchenall, Lesley A.; Maxwell, Anthony; Takiff, Howard E.; Blanchard, John S. (2005): A fluoroquinolone resistance protein from Mycobacterium tuberculosis that mimics DNA. *Science (New York, N.Y.)* 308 (5727), S. 1480–1483. DOI: 10.1126/science.1110699.
- Heisig, P. (1996): Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40 (4), S. 879–885. DOI: 10.1128/aac.40.4.879.
- Heisig, P.; Schedletzky, H.; Falkenstein-Paul, H. (1993): Mutations in the gyrA gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37 (4), S. 696–701. DOI: 10.1128/AAC.37.4.696.
- Heisig, P.; Tschorny, R. (1994): Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of escherichia coli selected in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38 (6), S. 1284–1291. DOI: 10.1128/AAC.38.6.1284.
- Hiasa, Hiroshi (2002): The Glu-84 of the ParC subunit plays critical roles in both topoisomerase IV-quinolone and topoisomerase IV-DNA interactions. *Biochemistry* 41 (39), S. 11779–11785. DOI: 10.1021/bi026352v.
- Higgins, N. Patrick; Vologodskii, Alexander V. (2015): Topological Behavior of Plasmid DNA. *Microbiology spectrum* 3 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0036-2014.
- Hilt, Evann E.; Ferrieri, Patricia (2022): Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. *Genes* 13 (9). DOI: 10.3390/genes13091566.
- Hooper, D. C. (2000): Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 2 (Supplement_2), S24-8. DOI: 10.1086/314056.
- Hooper, D. C. (2001): Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 1, S9-S15. DOI: 10.1086/319370.
- Hooper, David C.; Jacoby, George A. (2016): Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (9). DOI: 10.1101/cshperspect.a025320.

Hoskins, J. R.; Singh, S. K.; Maurizi, M. R.; Wickner, S. (2000): Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (16), S. 8892–8897. DOI: 10.1073/pnas.97.16.8892.

Hu, Bo; Khara, Pratick; Christie, Peter J. (2019): Structural bases for F plasmid conjugation and F pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (28), S. 14222–14227. DOI: 10.1073/pnas.1904428116.

Hu, Taishan; Chitnis, Nilesh; Monos, Dimitri; Dinh, Anh (2021): Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* 82 (11), S. 801–811. DOI: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.

Huseby, Douglas L.; Pietsch, Franziska; Brandis, Gerrit; Garoff, Linnéa; Tegehall, Angelica; Hughes, Diarmaid (2017): Mutation Supply and Relative Fitness Shape the Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli*. *Molecular biology and evolution* 34 (5), S. 1029–1039. DOI: 10.1093/molbev/msx052.

Igo, M. M.; Ninfa, A. J.; Stock, J. B.; Silhavy, T. J. (1989): Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes & development* 3 (11), S. 1725–1734. DOI: 10.1101/gad.3.11.1725.

Institut Pasteur MLST databases and software (2023). Online verfügbar unter <https://bigsd.b.pasteur.fr/ecoli/>, zuletzt aktualisiert am 15.02.2023, zuletzt geprüft am 01.03.2023.

Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (2023). Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4471269>, zuletzt aktualisiert am 14.11.2023, zuletzt geprüft am 14.11.2023.

Jahandeh, Nadia; Ranjbar, Reza; Behzadi, Payam; Behzadi, Elham (2015): Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Central European Journal of Urology* 68 (4), S. 452–458. DOI: 10.5173/cej.2015.625.

Jauregui, Françoise; Landraud, Luce; Passet, Virginie; Diancourt, Laure; Frapy, Eric; Guigon, Ghislaine *et al.* (2008): Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9 (1), S. 560. DOI: 10.1186/1471-2164-9-560.

Johnson, James R.; Clermont, Olivier; Johnston, Brian; Clabots, Connie; Tchesnokova, Veronika; Sokurenko, Evgeni *et al.* (2014): Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131. *Journal of clinical microbiology* 52 (5), S. 1358–1365. DOI: 10.1128/JCM.03502-13.

Johnson, James R.; Menard, Megan; Johnston, Brian; Kuskowski, Michael A.; Nichol, Kim; Zhanel, George G. (2009): Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (7), S. 2733–2739. DOI: 10.1128/AAC.00297-09.

Johnson, James R.; Tchesnokova, Veronika; Johnston, Brian; Clabots, Connie; Roberts, Pacita L.; Billig, Mariya *et al.* (2013): Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant

- strain of *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases* 207 (6), S. 919–928. DOI: 10.1093/infdis/jis933.
- Johnson, Timothy J.; Aziz, Maliha; Liu, Cindy M.; Sokurenko, Evgeni; Kisiela, Dagmara I.; Paul, Sandip *et al.* (2016a): Complete Genome Sequence of a CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Strain from the H30Rx Subclone of Sequence Type 131 from a Patient with Recurrent Urinary Tract Infections, Closely Related to a Lethal Urosepsis Isolate from the Patient's Sister. *Genome announcements* 4 (3). DOI: 10.1128/genomeA.00334-16.
- Johnson, Timothy J.; Danzeisen, Jessica L.; Youmans, Bonnie; Case, Kyle; Llop, Katharine; Munoz-Aguayo, Jeannette *et al.* (2016b): Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *mSphere* 1 (4). DOI: 10.1128/mSphere.00121-16.
- Johnson, Timothy J.; Hargreaves, Melissa; Shaw, Kristin; Snippes, Paula; Lynfield, Ruth; Aziz, Maliha; Price, Lance B. (2015): Complete Genome Sequence of a Carbapenem-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strain Belonging to the Sequence Type 131 H30R Subclade. *Genome announcements* 3 (2). DOI: 10.1128/genomeA.00272-15.
- Johnston, Brian D.; Thuras, Paul; Johnson, James R. (2018): Activity of ceftolozane-tazobactam against *Escherichia coli* isolates from U.S. veterans (2011) in relation to co-resistance and sequence type 131 (ST131) H30 and H30Rx status. *PloS one* 13 (7), e0200442. DOI: 10.1371/journal.pone.0200442.
- Jolley, Keith A.; Bray, James E.; Maiden, Martin C. J. (2018): Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open research* 3, S. 124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
- Jones, G. Ll; Warren, R. E.; Skidmore, S. J.; Davies, V. A.; Gibreel, T.; Upton, M. (2008): Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62 (6), S. 1245–1251. DOI: 10.1093/jac/dkn406.
- Kaase, M. (2012): Carbapenemasen bei gramnegativen Erregern in Deutschland. Daten des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 55 (11-12), S. 1401–1404. DOI: 10.1007/s00103-012-1552-x.
- Kahan, J. S.; Kahan, F. M.; Goegelman, R.; Currie, S. A.; Jackson, M.; Stapley, E. O. *et al.* (1979): Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics* 32 (1), S. 1–12. DOI: 10.7164/antibiotics.32.1.
- Kakkanat, Asha; Totsika, Makrina; Schaale, Kolja; Duell, Benjamin L.; Lo, Alvin W.; Phan, Minh-Duy *et al.* (2015): The role of H4 flagella in *Escherichia coli* ST131 virulence. *Sci Rep* 5 (1), S. 16149. DOI: 10.1038/srep16149.
- Kanamori, Hajime; Parobek, Christian M.; Juliano, Jonathan J.; Johnson, James R.; Johnston, Brian D.; Johnson, Timothy J. *et al.* (2017): Genomic Analysis of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* from North Carolina Community Hospitals: Ongoing Circulation of CTX-M-Producing ST131-H30Rx and ST131-H30R1 Strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61 (8). DOI: 10.1128/AAC.00912-17.

- Kaper, James B.; Nataro, James P.; Mobley, Harry L. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 2 (2), S. 123–140. DOI: 10.1038/nrmicro818.
- Kauffmann, F. (1944): Zur Serologie Der Coli-Gruppe. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 21 (1), S. 20–45. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1944.tb00031.x.
- Kenney, L. J.; Bauer, M. D.; Silhavy, T. J. (1995): Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19), S. 8866–8870. DOI: 10.1073/pnas.92.19.8866.
- Keseler, Ingrid M.; Gama-Castro, Socorro; Mackie, Amanda; Billington, Richard; Bonavides-Martínez, César; Caspi, Ron *et al.* (2021): The EcoCyc Database in 2021. *Front. Microbiol.* 12, S. 711077. DOI: 10.3389/fmicb.2021.711077.
- Khodursky, A. B.; Zechiedrich, E. L.; Cozzarelli, N. R. (1995): Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (25), S. 11801–11805. DOI: 10.1073/pnas.92.25.11801.
- Koch, Robert (1876): Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus Anthracis*. Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut und J. Schwalbe: Robert Koch-Institut.
- Komp Lindgren, Patricia; Karlsson, Asa; Hughes, Diarmaid (2003): Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47 (10), S. 3222–3232. DOI: 10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003.
- Koraimann, Günther (2018): Spread and Persistence of Virulence and Antibiotic Resistance Genes: A Ride on the F Plasmid Conjugation Module. *EcoSal Plus* 8 (1). DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2018.
- Köser, Claudio U.; Ellington, Matthew J.; Peacock, Sharon J. (2014): Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in Genetics* 30 (9), S. 401–407. DOI: 10.1016/j.tig.2014.07.003.
- KRINKO (2012): Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). *Bundesgesundheitsbl.* 55 (10), S. 1311–1354. DOI: 10.1007/s00103-012-1549-5.
- La Ortiz de Rosa, José-Manuel; Nordmann, Patrice; Poirel, Laurent (2019): ESBLs and resistance to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74 (7), S. 1934–1939. DOI: 10.1093/jac/dkz149.
- Lan, C. Y.; Igo, M. M. (1998): Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *Journal of bacteriology* 180 (1), S. 171–174. DOI: 10.1128/JB.180.1.171-174.1998.
- Lanza, Val F.; Toro, María de; Garcillán-Barcia, M. Pilar; Mora, Azucena; Blanco, Jorge; Coque, Teresa M.; La Cruz, Fernando de (2014): Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131

sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS genetics* 10 (12), e1004766. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004766.

Lau, Siu Ha; Reddy, Suganya; Cheesbrough, John; Bolton, Frederick J.; Willshaw, Geraldine; Cheasty, Tom *et al.* (2008): Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology* 46 (3), S. 1076–1080. DOI: 10.1128/JCM.02065-07.

Lederberg, J.; Tatum, E. L. (1946): Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158 (4016), S. 558. DOI: 10.1038/158558a0.

Lee, Jae Ok; Cho, Kyung-Suk; Kim, Ok Bin (2014): Overproduction of AcrR increases organic solvent tolerance mediated by modulation of SoxS regulon in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 98 (20), S. 8763–8773. DOI: 10.1007/s00253-014-6024-9.

Leflon-Guibout, Véronique; Blanco, Jorge; Amaqdouf, Karim; Mora, Azucena; Guize, Louis; Nicolas-Chanoine, Marie-Hélène (2008): Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *Journal of clinical microbiology* 46 (12), S. 3900–3905. DOI: 10.1128/JCM.00734-08.

Leshner, G. Y.; Froehlich, E. J.; Gruett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P. (1962): 1,8-Naphthyridine Derivates. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry* 5, S. 1063–1065. DOI: 10.1021/jm01240a021.

Liu, L. F.; Liu, C. C.; Alberts, B. M. (1980): Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* 19 (3), S. 697–707. DOI: 10.1016/S0092-8674(80)80046-8.

Liu, Lin; Li, Yinhu; Li, Siliang; Hu, Ni; He, Yimin; Pong, Ray *et al.* (2012): Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, S. 251364. DOI: 10.1155/2012/251364.

Lou, Hubing; Chen, Min; Black, Susan S.; Bushell, Simon R.; Ceccarelli, Matteo; Mach, Tivadar *et al.* (2011): Altered antibiotic transport in *OmpC* mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant *E. coli*. *PLoS one* 6 (10), e25825. DOI: 10.1371/journal.pone.0025825.

Ma, D.; Alberti, M.; Lynch, C.; Nikaido, H.; Hearst, J. E. (1996): The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Molecular microbiology* 19 (1), S. 101–112. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.357881.x.

Macrina, Francis L.; Kopecko, Dennis J.; Jones, Kevin R.; Ayers, Deborah J.; McCowen, Sara M. (1978): A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1 (3), S. 417–420. DOI: 10.1016/0147-619X(78)90056-2.

Madden, Thomas L.; Tatusov, Roman L.; Zhang, Jinghui (1996): [9] Applications of network BLAST server. Russell F. Doolittle (Hg.): *Computer methods for macromolecular sequence analysis*, Bd. 266. San Diego, Calif.: Acad. Press (Methods in Enzymology, 266), S. 131–141.

- Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G. *et al.* (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (3), S. 268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Maiden, M. C.; Bygraves, J. A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J. E.; Urwin, R. *et al.* (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6), S. 3140–3145. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3140.
- Maiden, Martin C. J. (2006): Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual review of microbiology* 60, S. 561–588. DOI: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121325.
- Mantengoli, Elisabetta; Luzzaro, Francesco; Pecile, Patrizia; Cecconi, Daniela; Cavallo, Annalisa; Attala, Letizia *et al.* (2011): Escherichia coli ST131 producing extended-spectrum β -lactamases plus VIM-1 carbapenemase: further narrowing of treatment options. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 (5), S. 690–691. DOI: 10.1093/cid/ciq194.
- Martin, R. G.; Jair, K. W.; Wolf, R. E.; Rosner, J. L. (1996): Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 178 (8), S. 2216–2223. DOI: 10.1128/jb.178.8.2216-2223.1996.
- Martin, Robert G.; Rosner, Judah L. (2002): Genomics of the marA/soxS/rob regulon of Escherichia coli: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Molecular microbiology* 44 (6), S. 1611–1624. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02985.x.
- Mathers, Amy J.; Peirano, Gisele; Pitout, Johann D. D. (2015a): Escherichia coli ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Advances in applied microbiology* 90, S. 109–154. DOI: 10.1016/bs.aambs.2014.09.002.
- Mathers, Amy J.; Peirano, Gisele; Pitout, Johann D. D. (2015b): The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews* 28 (3), S. 565–591. DOI: 10.1128/CMR.00116-14.
- Matthiessen, Nina (2007): Die Rolle der Expression und Regulation der AcrAB/- und AcrEF/TolC-Effluxpumpe bei der Entwicklung der Fluorchinolonresistenz in Escherichia coli. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky. Online verfügbar unter <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/1774>.
- Mayer, K. H. (1986): Review of epidemic aminoglycoside resistance worldwide. *The American Journal of Medicine* 80 (6B), S. 56–64. DOI: 10.1016/0002-9343(86)90480-8.
- Mayr, Anton; Rolle, Michael; Büttner, Mathias (Hg.) (2007): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 127 Tabellen. 8., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke.
- Mazel, Didier (2006): Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature reviews. Microbiology* 4 (8), S. 608–620. DOI: 10.1038/nrmicro1462.

- McFarland, Joseph (1907): The Nephelometer: an Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. *JAMA* XLIX (14), S. 1176. DOI: 10.1001/jama.1907.25320140022001f.
- Metzker, Michael L. (2010): Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11 (1), S. 31–46. DOI: 10.1038/nrg2626.
- Miro, Elisenda; Rossen, John W. A.; Chlebowicz, Monika A.; Harmsen, Dag; Brisse, Sylvain; Passet, Virginie *et al.* (2019): Core/Whole Genome Multilocus Sequence Typing and Core Genome SNP-Based Typing of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates From Spain. *Front. Microbiol.* 10, S. 2961. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02961.
- Mizuno, T.; Chou, M. Y.; Inouye, M. (1984): A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (7), S. 1966–1970. DOI: 10.1073/pnas.81.7.1966.
- Mojica, Maria F.; Bonomo, Robert A.; Fast, Walter (2016): B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand? *Current drug targets* 17 (9), S. 1029–1050. DOI: 10.2174/1389450116666151001105622.
- Morris, Dearbháile; Boyle, Fiona; Ludden, Catherine; Condon, Iris; Hale, James; O'Connell, Nuala *et al.* (2011): Production of KPC-2 carbapenemase by an *Escherichia coli* clinical isolate belonging to the international ST131 clone. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (10), S. 4935–4936. DOI: 10.1128/AAC.05127-11.
- Morris, Dearbháile; McGarry, Edel; Cotter, Meaghan; Passet, Virginie; Lynch, Maureen; Ludden, Catherine *et al.* (2012): Detection of OXA-48 carbapenemase in the pandemic clone *Escherichia coli* O25b:H4-ST131 in the course of investigation of an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56 (7), S. 4030–4031. DOI: 10.1128/AAC.00638-12.
- Munita, Jose M.; Arias, Cesar A. (2016): Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum* 4 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Mutschler, Ernst; Geisslinger, Gerd; Kroemer, Heyo Klaus; Menzel, Sabine; Ruth, Peter (2020): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Pharmakologie, klinische Pharmakologie, Toxikologie. S. 988-993 Antibiotika mit Angriff an der Zellwandsynthese. 11., völlig neu bearbeitete Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Naas, Thierry; Cuzon, Gaele; Gaillot, Olivier; Courcol, René; Nordmann, Patrice (2011): When carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase Kpc meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (10), S. 4933–4934. DOI: 10.1128/AAC.00719-11.
- Naas, Thierry; Oueslati, Saoussen; Bonnin, Rémy A.; Dabos, Maria Laura; Zavala, Agustin; Dortet, Laurent *et al.* (2017): Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32 (1), S. 917–919. DOI: 10.1080/14756366.2017.1344235.

Nicolas, Emilien; Lambin, Michael; Dandoy, Damien; Galloy, Christine; Nguyen, Nathan; Oger, Cédric A.; Hallet, Bernard (2015): The Tn3-family of Replicative Transposons. *Microbiology spectrum* 3 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014.

Nicolas-Chanoine, Marie-Hélène; Bertrand, Xavier; Madec, Jean-Yves (2014): Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews* 27 (3), S. 543–574. DOI: 10.1128/CMR.00125-13.

Nicolas-Chanoine, Marie-Hélène; Blanco, Jorge; Leflon-Guibout, Véronique; Demarty, Raphael; Alonso, Maria Pilar; Caniça, Maria Manuela *et al.* (2008): Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (2), S. 273–281. DOI: 10.1093/jac/dkm464.

Nikaido, Hiroshi (2003): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 67 (4), S. 593–656. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.

Nishino, K.; Yamaguchi, A. (2001): Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 183 (20), S. 5803–5812. DOI: 10.1128/JB.183.20.5803-5812.2001.

Nöllmann, Marcelo; Crisona, Nancy J.; Arimondo, Paola B. (2007): Thirty years of Escherichia coli DNA gyrase: from in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie* 89 (4), S. 490–499. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.02.012.

Ochman, H.; Selander, R. K. (1984): Evidence for clonal population structure in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (1), S. 198–201. DOI: 10.1073/pnas.81.1.198.

Okusu, H.; Ma, D.; Nikaido, H. (1996): AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of Escherichia coli multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of bacteriology* 178 (1), S. 306–308. DOI: 10.1128/jb.178.1.306-308.1996.

O'Leary, Nuala A.; Wright, Mathew W.; Brister, J. Rodney; Ciufu, Stacy; Haddad, Diana; McVeigh, Rich *et al.* (2016): Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research* 44 (D1), D733-45. DOI: 10.1093/nar/gkv1189.

Oliva, Mónica; Dideberg, Otto; Field, Martin J. (2003): Understanding the acylation mechanisms of active-site serine penicillin-recognizing proteins: a molecular dynamics simulation study. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 53 (1), S. 88–100. DOI: 10.1002/prot.10450.

ompR - DNA-binding dual transcriptional regulator OmpR - Escherichia coli (strain K12) | UniProtKB | UniProt (2023). Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0AA16/entry#function>, zuletzt aktualisiert am 14.11.2023, zuletzt geprüft am 21.11.2023.

One Health (2023). Online verfügbar unter <https://www.who.int/europe/initiatives/one-health>, zuletzt aktualisiert am 11.12.2023, zuletzt geprüft am 11.12.2023.

- Orskov, I.; Orskov, F.; Jann, B.; Jann, K. (1977): Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological reviews* 41 (3), S. 667–710. DOI: 10.1128/br.41.3.667-710.1977.
- Owens, Robert C.; Johnson, James R.; Stogsdill, Patricia; Yarmus, Lonny; Lolans, Karen; Quinn, John (2011): Community transmission in the United States of a CTX-M-15-producing sequence type ST131 *Escherichia coli* strain resulting in death. *Journal of clinical microbiology* 49 (9), S. 3406–3408. DOI: 10.1128/JCM.00993-11.
- Pagani, Laura; Dell'Amico, Emanuela; Migliavacca, Roberta; D'Andrea, Marco Maria; Giacobone, Ernesto; Amicosante, Gianfranco *et al.* (2003): Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *Journal of clinical microbiology* 41 (9), S. 4264–4269. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003.
- Pareek, Chandra Shekhar; Smoczynski, Rafal; Tretyn, Andrzej (2011): Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of applied genetics* 52 (4), S. 413–435. DOI: 10.1007/s13353-011-0057-x.
- Parisutham, Vinuselvi; Chhabra, Shivani; Ali, Md Zulfikar; Brewster, Robert C. (2022): Tunable transcription factor library for robust quantification of regulatory properties in *Escherichia coli*. *Molecular systems biology* 18 (6), e10843. DOI: 10.15252/msb.202110843.
- Park, Y. H.; Yoo, J. H.; Huh, D. H.; Cho, Y. K.; Choi, J. H.; Shin, W. S. (1998): Molecular analysis of fluoroquinolone-resistance in *Escherichia coli* on the aspect of gyrase and multiple antibiotic resistance (*mar*) genes. *Yonsei Medical Journal* 39 (6), S. 534–540. DOI: 10.3349/ymj.1998.39.6.534.
- Partridge, Sally R.; Hall, Ruth M. (2005): Evolution of transposons containing *bla*TEM genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (3), S. 1267–1268. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1267-1268.2005.
- Partridge, Sally R.; Kwong, Stephen M.; Firth, Neville; Jensen, Slade O. (2018): Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews* 31 (4). DOI: 10.1128/CMR.00088-17.
- Partridge, Sally R.; Tsafnat, Guy; Coiera, Enrico; Iredell, Jonathan R. (2009): Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS microbiology reviews* 33 (4), S. 757–784. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x.
- Patel, Preeti; Wermuth, Harrison R.; Calhoun, Chara; Hall, Gregory A. (2024): StatPearls. Antibiotics. Treasure Island (FL).
- Paton, J. H.; Reeves, D. S. (1988): Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. *Drugs* 36 (2), S. 193–228. DOI: 10.2165/00003495-198836020-00004.
- Peirano, Gisele; Bradford, Patricia A.; Kazmierczak, Krystyna M.; Badal, Robert E.; Hackel, Meredith; Hoban, Daryl J.; Pitout, Johann D. D. (2014): Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131. *Emerging infectious diseases* 20 (11), S. 1928–1931. DOI: 10.3201/eid2011.141388.

- Peirano, Gisele; Pitout, Johann D. D. (2019): Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* 79 (14), S. 1529–1541. DOI: 10.1007/s40265-019-01180-3.
- Peirano, Gisele; Schreckenberger, Paul C.; Pitout, Johann D. D. (2011): Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (6), S. 2986–2988. DOI: 10.1128/AAC.01763-10.
- Penicillin: the Oxford story | University of Oxford (2023). Online verfügbar unter <https://www.ox.ac.uk/news/science-blog/penicillin-oxford-story#>, zuletzt aktualisiert am 27.10.2023, zuletzt geprüft am 27.10.2023.
- Perovic, Olga; Singh-Moodley, Ashika; Lowe, Michelle (2023): In Vitro Activity of Ceftolozane-Tazobactam against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* Obtained from Blood Cultures from Sentinel Public Hospitals in South Africa. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 12 (3). DOI: 10.3390/antibiotics12030453.
- Peters, Joseph E.; Thate, Timothy E.; Craig, Nancy L. (2003): Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *Journal of bacteriology* 185 (6), S. 2017–2021. DOI: 10.1128/JB.185.6.2017-2021.2003.
- Ph. Eur. (2019): Europäisches Arzneibuch. 9. Ausgabe. amtliche deutsche Ausgabe: Deutscher Apotheker Verlag.
- Phan, Minh-Duy; Peters, Kate M.; Sarkar, Sohinee; Forde, Brian M.; Lo, Alvin W.; Stanton-Cook, Mitchell *et al.* (2015): Third-generation cephalosporin resistance conferred by a chromosomally encoded bla_{CMY-23} gene in the *Escherichia coli* ST131 reference strain EC958. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (7), S. 1969–1972. DOI: 10.1093/jac/dkv066.
- Piddock, Laura J. V. (2006): Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews* 19 (2), S. 382–402. DOI: 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006.
- Pitout, Johann D. D.; Campbell, Lorraine; Church, Deirdre L.; Gregson, Daniel B.; Laupland, Kevin B. (2009): Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from the Calgary Health Region. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (6), S. 2539–2543. DOI: 10.1128/AAC.00061-09.
- Pitout, Johann D. D.; Finn, Thomas J. (2020): The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 81, S. 104265. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104265.
- Pitout, Johann D. D.; Laupland, Kevin B. (2008): Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet. Infectious diseases* 8 (3), S. 159–166. DOI: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0.
- Pitout, Johann D. D.; Nordmann, Patrice; Laupland, Kevin B.; Poirel, Laurent (2005): Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in

- the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (1), S. 52–59. DOI: 10.1093/jac/dki166.
- Pitout, Johann D. D.; Peirano, Gisele; Chen, Liang; DeVinney, Rebekah; Matsumura, Yasufumi (2022): Escherichia coli ST1193: Following in the Footsteps of E. coli ST131. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 66 (7), e0051122. DOI: 10.1128/aac.00511-22.
- Pitout, Johann D.D.; DeVinney, Rebekah (2017): Escherichia coli ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research* 6, S. 195. DOI: 10.12688/f1000research.10609.1.
- Platell, Joanne L.; Cobbold, Rowland N.; Johnson, James R.; Heisig, Anke; Heisig, Peter; Clabots, Connie *et al.* (2011): Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal Escherichia coli isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (8), S. 3782–3787. DOI: 10.1128/AAC.00306-11.
- Platell, Joanne L.; Cobbold, Rowland N.; Johnson, James R.; Trott, Darren J. (2010): Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli among humans and companion animals in Australia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65 (9), S. 1936–1938. DOI: 10.1093/jac/dkq236.
- Prajapat, Mahendra Kumar; Jain, Kirti; Saini, Supreet (2015): Control of MarRAB Operon in Escherichia coli via Autoactivation and Autorepression. *Biophysical journal* 109 (7), S. 1497–1508. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.08.017.
- Price, Lance B.; Johnson, James R.; Aziz, Maliha; Clabots, Connie; Johnston, Brian; Tchesnokova, Veronika *et al.* (2013): The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio* 4 (6), e00377-13. DOI: 10.1128/mBio.00377-13.
- Prilipov, A.; Phale, P. S.; van Gelder, P.; Rosenbusch, J. P.; Koebnik, R. (1998): Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from E. coli. *FEMS microbiology letters* 163 (1), S. 65–72. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13027.x.
- Primer designing tool (2023). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, zuletzt aktualisiert am 13.04.2023, zuletzt geprüft am 13.04.2023.
- Pschyrembel (2024a): Pschyrembel Online | Bakteriostase. Bakteriostase. Online verfügbar unter <https://www.pschyrembel.de/Bakteriostase/K03CU/doc/>, zuletzt aktualisiert am 02.04.2024, zuletzt geprüft am 02.04.2024.
- Pschyrembel (2024b): Pschyrembel Online | Bakterizidie. Online verfügbar unter <https://www.pschyrembel.de/Bakterizidie/K03CX>, zuletzt aktualisiert am 02.04.2024, zuletzt geprüft am 02.04.2024.
- PubMed (2022): PubMed. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, zuletzt aktualisiert am 22.08.2022, zuletzt geprüft am 22.08.2022.

- Ramirez, Maria S.; Tolmasky, Marcelo E. (2010): Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 13 (6), S. 151–171. DOI: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
- Ranjan, Amit; Shaik, Sabiha; Hussain, Arif; Nandanwar, Nishant; Semmler, Torsten; Jadhav, Savita *et al.* (2015): Genomic and Functional Portrait of a Highly Virulent, CTX-M-15-Producing H30-Rx Subclone of Escherichia coli Sequence Type 131. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (10), S. 6087–6095. DOI: 10.1128/AAC.01447-15.
- Resistenzdaten - PEG (2019). Online verfügbar unter <https://www.p-e-g.org/resistenzdaten.html>, zuletzt aktualisiert am 23.08.2022, zuletzt geprüft am 23.08.2022.
- Reyes-Lamothe, Rodrigo; Wang, Xindan; Sherratt, David (2008): Escherichia coli and its chromosome. *Trends in microbiology* 16 (5), S. 238–245. DOI: 10.1016/j.tim.2008.02.003.
- Reynolds, Rosy; Hope, Russell; Williams, Laura (2008): Survey, laboratory and statistical methods for the BSAC Resistance Surveillance Programmes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62 Suppl 2, ii15-28. DOI: 10.1093/jac/dkn349.
- Rice, Louis B. (2008): Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases* 197 (8), S. 1079–1081. DOI: 10.1086/533452.
- Riley, L. W. (2014): Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (5), S. 380–390. DOI: 10.1111/1469-0691.12646.
- RKI (2015): Fachwörterbuch Infektionsschutz und Infektions-epidemiologie. Fachwörter - Definitionen - Interpretationen. RKI. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Service/Publikationen/Fachwoerterbuch_Infektionsschutz.html, zuletzt aktualisiert am 02.04.2024, zuletzt geprüft am 02.04.2024.
- RKI (2024): RKI - Antibiotikaresistenz. Antworten auf häufig gestellte Fragen zu Krankenhausinfektionen und Antibiotikaresistenz. Online verfügbar unter https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Krankenhausinfektionen-und-Antibiotikaresistenz/FAQ_Liste.html, zuletzt aktualisiert am 02.04.2024, zuletzt geprüft am 02.04.2024.
- RKI-NRZ (2023): RKI - Nationale Referenzzentren und Konsiliarlabore. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/nrz_node.html, zuletzt aktualisiert am 08.08.2023, zuletzt geprüft am 24.04.2024.
- Roberts, R. J. (2001): PubMed Central: The GenBank of the published literature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2), S. 381–382. DOI: 10.1073/pnas.98.2.381.
- Robicsek, Ari; Jacoby, George A.; Hooper, David C. (2006): The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 6 (10), S. 629–640. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70599-0.

- Robinson, James T.; Thorvaldsdóttir, Helga; Winckler, Wendy; Guttman, Mitchell; Lander, Eric S.; Getz, Gad; Mesirov, Jill P. (2011): Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology* 29 (1), S. 24–26. DOI: 10.1038/nbt.1754.
- Rode, C. K.; Melkerson-Watson, L. J.; Johnson, A. T.; Bloch, C. A. (1999): Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 67 (1), S. 230–236. DOI: 10.1128/IAI.67.1.230-236.1999.
- Rodríguez-Martínez, José Manuel; Machuca, Jesús; Cano, María Eliecer; Calvo, Jorge; Martínez-Martínez, Luis; Pascual, Alvaro (2016): Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 29, S. 13–29. DOI: 10.1016/j.drug.2016.09.001.
- Rogers, Benjamin A.; Sidjabat, Hanna E.; Paterson, David L. (2011): *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (1), S. 1–14. DOI: 10.1093/jac/dkq415.
- Russo, T. A.; Johnson, J. R. (2000): Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181 (5), S. 1753–1754. DOI: 10.1086/315418.
- Sadeghi, Mohammadreza (2019): Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates in Azerbaijan Hospitals. *Microbial Drug Resistance* 25 (9), S. 1287–1296. DOI: 10.1089/mdr.2019.0006.
- Saiki, Randall K.; Gelfand, David H.; Stoffel, Susanne; Scharf, Stephen J.; Higuchi, Russell; Horn, Glenn T. *et al.* (1988): Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239 (4839), S. 487–491. DOI: 10.1126/science.2448875.
- Saiki, Randall K.; Scharf, Stephen; Faloona, Fred; Mullis, Kary B.; Horn, Glenn T.; Erlich, Henry A.; Arnheim, Norman (1985): Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science (New York, N.Y.)* 230 (4732), S. 1350–1354. DOI: 10.1126/science.2999980.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4 (4), S. 406–425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- San Millan, Alvaro; MacLean, R. Craig (2017): Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiology spectrum* 5 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0016-2017.
- Santajit, Sirijan; Indrawattana, Nitaya (2016): Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international* 2016, S. 2475067. DOI: 10.1155/2016/2475067.
- Satam, Heena; Joshi, Kandarp; Mangrolia, Upasana; Waghoo, Sanober; Zaidi, Gulnaz; Rawool, Shravani *et al.* (2023): Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology* 12 (7). DOI: 10.3390/biology12070997.
- Schmidt, Silke (2007): Regulation der Expression von multiple drug resistance (mdr) Effluxpumpen in klinisch relevanten *Salmonella*-Stämmen. Staats- und Universitätsbibliothek

Hamburg Carl von Ossietzky. Online verfügbar unter <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/1777>.

Selander, R. K.; Musser, J. M.; Caugant, D. A.; Gilmour, M. N.; Whittam, T. S. (1987): Population genetics of pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis* 3 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/0882-4010(87)90032-5.

Sharma, Prateek; Haycocks, James R. J.; Middlemiss, Alistair D.; Kettles, Rachel A.; Sellars, Laura E.; Ricci, Vito *et al.* (2017): The multiple antibiotic resistance operon of enteric bacteria controls DNA repair and outer membrane integrity. *Nat Commun* 8 (1), S. 1444. DOI: 10.1038/s41467-017-01405-7.

Sherley, Miranda; Gordon, David M.; Collignon, Peter J. (2003): Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. *Plasmid* 49 (1), S. 79–85. DOI: 10.1016/S0147-619X(02)00107-5.

Shimada, Tomohiro; Takada, Hiraku; Yamamoto, Kaneyoshi; Ishihama, Akira (2015): Expanded roles of two-component response regulator OmpR in *Escherichia coli*: genomic SELEX search for novel regulation targets. *Genes to Cells* 20 (11), S. 915–931. DOI: 10.1111/gtc.12282.

Smet, Annemieke; van Nieuwerburgh, Filip; Vandekerckhove, Tom T. M.; an Martel; Deforce, Dieter; Butaye, Patrick; Haesebrouck, Freddy (2010): Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PloS one* 5 (6), e11202. DOI: 10.1371/journal.pone.0011202.

Smillie, Chris; Garcillán-Barcia, M. Pilar; Francia, M. Victoria; Rocha, Eduardo P. C.; La Cruz, Fernando de (2010): Mobility of plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 74 (3), S. 434–452. DOI: 10.1128/MMBR.00020-10.

Sokurenko, E. V.; Chesnokova, V.; Dykhuizen, D. E.; Ofek, I.; Wu, X. R.; Krogfelt, K. A. *et al.* (1998): Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15), S. 8922–8926. DOI: 10.1073/pnas.95.15.8922.

Stewart, Philip S.; White, Ben; Boegli, Laura; Hamerly, Timothy; Williamson, Kerry S.; Franklin, Michael J. *et al.* (2019): Conceptual Model of Biofilm Antibiotic Tolerance That Integrates Phenomena of Diffusion, Metabolism, Gene Expression, and Physiology. *Journal of bacteriology* 201 (22). DOI: 10.1128/JB.00307-19.

Stoesser, Nicole; Sheppard, Anna E.; Pankhurst, Louise; Maio, Nicola de; Moore, Catrin E.; Sebra, Robert *et al.* (2016): Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *mBio* 7 (2), e02162. DOI: 10.1128/mBio.02162-15.

Stokes, H. W.; Hall, R. M. (1989): A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular microbiology* 3 (12), S. 1669–1683. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x.

Stokes, Hatch W.; Gillings, Michael R. (2011): Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS microbiology reviews* 35 (5), S. 790–819. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x.

Su, Chih-Chia; Rutherford, Denae J.; Yu, Edward W. (2007): Characterization of the multidrug efflux regulator AcrR from *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* 361 (1), S. 85–90. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.175.

Subramanian, Gopalakrishnan Kaushik; Palani, Gnanasoundari; Vijayakumar, Ramanathan; Krishnan, Padma (2017): Draft genome sequence of an O25:H4-ST131 *Escherichia coli* harbouring blaNDM-1 on an IncHI3 plasmid: A first report. *Journal of global antimicrobial resistance* 8, S. 121–122. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.12.004.

Suelter, Corey S.; Hanson, Nancy D. (2020): OmpC regulation differs between ST131 and non-ST131 *Escherichia coli* clinical isolates and involves differential expression of the small RNA MicC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (5), S. 1151–1158. DOI: 10.1093/jac/dkz566.

Sulavik, Mark C.; Gambino, Laura F.; Miller, Paul F. (1995): The MarR Repressor of the Multiple Antibiotic Resistance (mar) Operon in *Escherichia coli*: Prototypic Member of a Family of Bacterial Regulatory Proteins Involved in Sensing Phenolic Compounds. *Mol Med* 1 (4), S. 436–446. DOI: 10.1007/BF03401581.

Sussman, J. K.; Simons, E. L.; Simons, R. W. (1996): *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. *Molecular microbiology* 21 (2), S. 347–360. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.6371354.x.

The British Society for Antimicrobial Chemotherapy (2023): Resistance Surveillance - The British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Online verfügbar unter <https://bsac.org.uk/resistance-surveillance/>, zuletzt aktualisiert am 26.01.2023, zuletzt geprüft am 16.08.2023.

Thermo Fisher Scientific (2023): Qubit Fluorometrische Quantifizierung | Thermo Fisher Scientific - DE. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>, zuletzt aktualisiert am 05.09.2023, zuletzt geprüft am 05.09.2023.

Thermo Scientific: Nucleic Acid Handbook. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. Online verfügbar unter <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Warranties/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf>, zuletzt geprüft am 07.09.2023.

Thomas, Christopher M.; Nielsen, Kaare M. (2005): Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 3 (9), S. 711–721. DOI: 10.1038/nrmicro1234.

Tilanus, Alwin; Drusano, George (2023): Optimizing the Use of Beta-Lactam Antibiotics in Clinical Practice: A Test of Time. *Open Forum Infectious Diseases* 10 (7), ofad305. DOI: 10.1093/ofid/ofad305.

Timmerbeil, Björn S. (2007): Entwicklung eines Pyrosequencing TM-basierten Verfahrens zum genetischen Nachweis der in Europa prävalenten extended-spectrum β -[Beta]lactamases (ESBLs) sowie Identifizierung und biochemische Charakterisierung der

neuen Blat Tem-Variante TEM-142. Zugl.: Hamburg, Univ., Dep. Chemie, Diss. 2007. Aachen: Shaker.

Tipper, D. J.; Strominger, J. L. (1965): Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54 (4), S. 1133–1141. DOI: 10.1073/pnas.54.4.1133.

Toh, Hidehiro; Oshima, Kenshiro; Toyoda, Atsushi; Ogura, Yoshitoshi; Ooka, Tadasuke; Sasamoto, Hiroyuki *et al.* (2010): Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. *Journal of bacteriology* 192 (4), S. 1165–1166. DOI: 10.1128/JB.01543-09.

Tooke, Catherine L.; Hinchliffe, Philip; Bragginton, Eilis C.; Colenso, Charlotte K.; Hirvonen, Viivi H. A.; Takebayashi, Yuiko; Spencer, James (2019): β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology* 431 (18), S. 3472–3500. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.

Tran, John H.; Jacoby, George A.; Hooper, David C. (2005): Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (1), S. 118–125. DOI: 10.1128/AAC.49.1.118-125.2005.

Tyndall, John; Pasteur, Louis (1878): Les microbes organisés. Leur rôle dans la fermentation, la putréfaction et la contagion: Gauthier-Villars.

UniProt -acrR: acrR - AcrR - *Escherichia coli* | UniProtKB | UniProt. Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q0QCK2/entry>, zuletzt geprüft am 26.07.2024.

Uniprot -envZ: envZ - Sensor histidine kinase EnvZ - *Escherichia coli* (strain K12) | UniProtKB | UniProt. Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0AEJ4/entry>, zuletzt geprüft am 09.06.2024.

UniProt: the universal protein knowledgebase (2021). *Nucleic Acids Research* 49 (D1), D480–D489.

Varadi, Mihaly; Anyango, Stephen; Deshpande, Mandar; Nair, Sreenath; Natassia, Cindy; Yordanova, Galabina *et al.* (2022): AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* 50 (D1), D439–D444. DOI: 10.1093/nar/gkab1061.

Ventola, C. Lee (2015): The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management* 40 (4), S. 277–283. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/#>.

Verma, Subhash C.; Qian, Zhong; Adhya, Sankar L. (2019): Architecture of the *Escherichia coli* nucleoid. *PLOS Genetics* 15 (12), e1008456. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008456.

Vetting, Matthew W.; Hegde, Subray S.; Fajardo, J. Eduardo; Fiser, Andras; Roderick, Steven L.; Takiff, Howard E.; Blanchard, John S. (2006): Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* 45 (1), S. 1–10. DOI: 10.1021/bi052130w.

- Vinué, Laura; Hooper, David C.; Jacoby, George A. (2018): Chromosomal mutations that accompany qnr in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents* 51 (3), S. 479–483. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.01.012.
- Webber, Mark A.; Talukder, Ashraf; Piddock, Laura J. V. (2005): Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to acrB expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (10), S. 4390–4392. DOI: 10.1128/AAC.49.10.4390-4392.2005.
- Wein, Tanita; Hülter, Nils F.; Mizrahi, Itzhak; Dagan, Tal (2019): Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. *Nat Commun* 10 (1), S. 2595. DOI: 10.1038/s41467-019-10600-7.
- Welch, R. A.; Burland, V.; Plunkett, G.; Redford, P.; Roesch, P.; Rasko, D. *et al.* (2002): Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26), S. 17020–17024. DOI: 10.1073/pnas.252529799.
- Welker, Sybille; Boutin, Sébastien; Miethke, Thomas; Heeg, Klaus; Nurjadi, Dennis (2020): Emergence of carbapenem-resistant ST131 *Escherichia coli* carrying blaOXA-244 in Germany, 2019 to 2020. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 25 (46). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001815.
- Wentzell, L. M.; Maxwell, A. (2000): The complex of DNA gyrase and quinolone drugs on DNA forms a barrier to the T7 DNA polymerase replication complex. *Journal of molecular biology* 304 (5), S. 779–791. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4266.
- WHO (2024): Antimicrobial resistance. Online verfügbar unter <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>, zuletzt aktualisiert am 02.04.2024, zuletzt geprüft am 02.04.2024.
- WHO-GLASS (2024): Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). Online verfügbar unter <https://www.who.int/initiatives/glass>, zuletzt aktualisiert am 24.04.2024, zuletzt geprüft am 24.04.2024.
- Wiedemann, B.; Heisig, P. (1994): Mechanisms of quinolone resistance. *Infection* 22 Suppl 2 (2), S73-9. DOI: 10.1007/BF01793570.
- Willmott, C. J.; Critchlow, S. E.; Eperon, I. C.; Maxwell, A. (1994): The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *Journal of molecular biology* 242 (4), S. 351–363. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1586.
- Wirth, Thierry; Falush, Daniel; Lan, Ruiting; Colles, Frances; Mensa, Patience; Wieler, Lothar H. *et al.* (2006): Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular microbiology* 60 (5), S. 1136–1151. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
- Wise, E. M.; Park, J. T. (1965): Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54 (1), S. 75–81. DOI: 10.1073/pnas.54.1.75.

- Wong, Felix; Wilson, Sean; Helbig, Ralf; Hegde, Smitha; Aftenieva, Olha; Zheng, Hai *et al.* (2021): Understanding Beta-Lactam-Induced Lysis at the Single-Cell Level. *Front. Microbiol.* 12, S. 712007. DOI: 10.3389/fmicb.2021.712007.
- Woodford, Neil; Carattoli, Alessandra; Karisik, Edi; Underwood, Anthony; Ellington, Matthew J.; Livermore, David M. (2009): Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (10), S. 4472–4482. DOI: 10.1128/AAC.00688-09.
- Woodford, Neil; Fagan, Elizabeth J.; Ellington, Matthew J. (2006): Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 57 (1), S. 154–155. DOI: 10.1093/jac/dki412.
- Woodford, Neil; Turton, Jane F.; Livermore, David M. (2011): Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews* 35 (5), S. 736–755. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.
- Xu, Li; Shabir, Sahida; Bodah, Thomas; McMurray, Claire; Hardy, Katie; Hawkey, Peter; Nye, Kathryn (2011): Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (3), S. 505–511. DOI: 10.1093/jac/dkq482.
- Ye, Jian; Coulouris, George; Zaretskaya, Irena; Cutcutache, Ioana; Rozen, Steve; Madden, Thomas L. (2012): Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* 13, S. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Yoshida, H.; Bogaki, M.; Nakamura, M.; Nakamura, S. (1990): Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34 (6), S. 1271–1272. DOI: 10.1128/aac.34.6.1271.
- Yoshida, Takeshi; Qin, Ling; Egger, Linda A.; Inouye, Masayori (2006): Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, *OmpR*. *The Journal of biological chemistry* 281 (25), S. 17114–17123. DOI: 10.1074/jbc.M602112200.
- Zhou, Zhemin; Alikhan, Nabil-Fareed; Mohamed, Khaled; Fan, Yulei; Achtman, Mark (2020): The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome research* 30 (1), S. 138–152. DOI: 10.1101/gr.251678.119.

8 Anhang

8.1 Detektion von *E. coli* ST131-O25b und β -Lactamasen

8.1.1 *gyrA-pabB* (ARMS) Duplex-PCR auf spezifische SNPs in *pabB*

Die Abbildung 8-1 zeigt die Ergebnisse der *gyrA-pabB* (ARMS) Duplex-PCR zur Detektion der SNPs in *pabB* (vgl. Kap. 3.1.2.3 und 6.2.8.2) der *E. coli* B2-Isolate aus dem BSAC-Kollektiv.

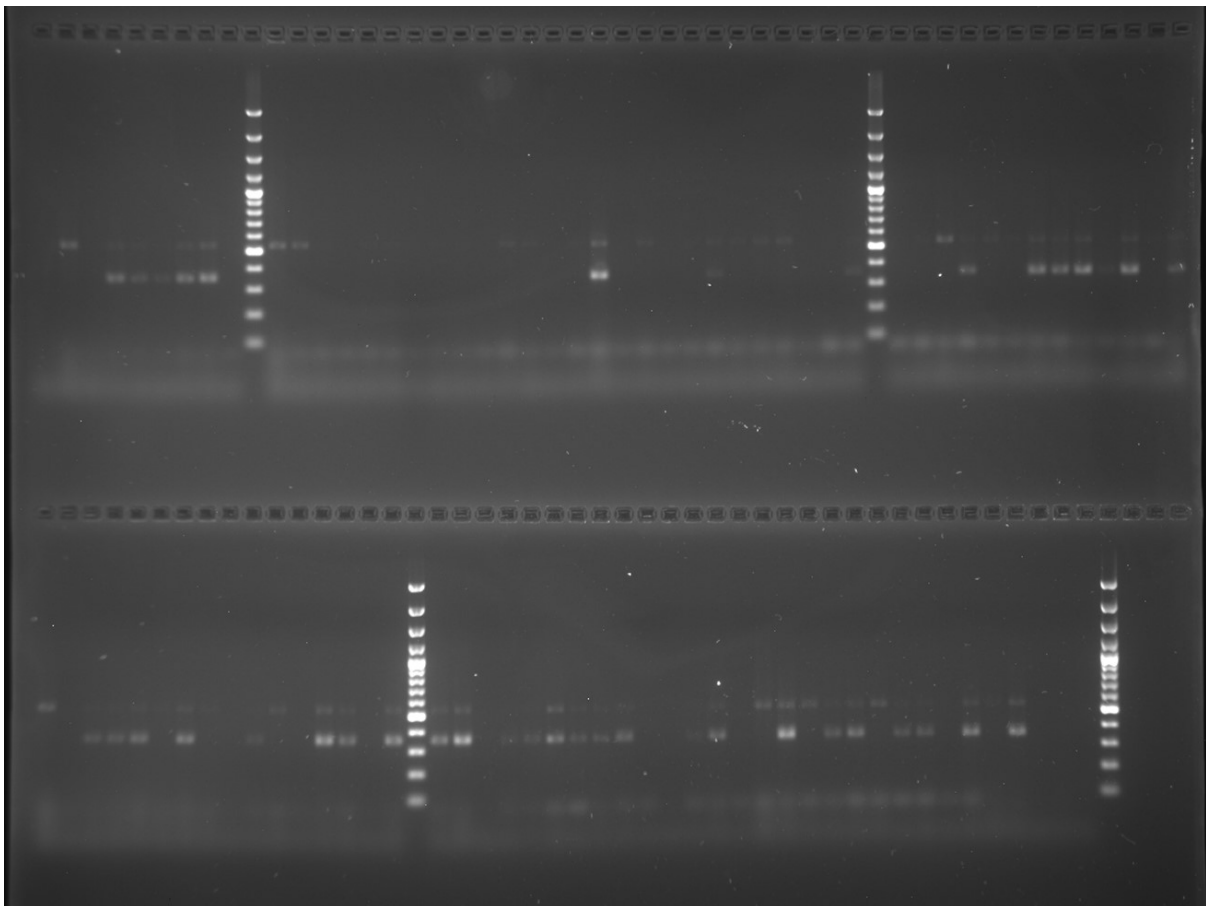


Abbildung 8-1: PCR-Produkte der *gyrA-pabB* (ARMS) Duplex-PCR nach Trennung in 1,6%iger Agarose. Aufgetragen sind oben v.l.n.r.: WT, MG1655, CFT073, QUC02, QU008, QU015, QU061, QU102, NTC, GeneRuler 100bp+, BSAC Proben Nr. 1-16, 16(2), 17-25, GeneRuler 100bp+, Proben Nr. 26-38 und unten v.l.n.r.: Proben Nr. 39-54, GeneRuler 100bp+, Proben Nr. 55-78, CFT073 (2), QU102 (2), NTC (2), GK 737, GK 1113, GeneRuler 100bp+, 3x leer.

8.1.2 Screening und Pyrosequencings auf *E. coli* ST131-O25b spezifische SNPs

Eine Übersicht der Ergebnisse des Screenings mittels PCR und der Detektion der SNPs in *pabB* mittels Pyrosequencing für die *E. coli* B2 Stämme des BSAC-Kollektivs zeigt Tabelle 8-1.

Tabelle 8-1: Übersicht über die SNPs spezifischen Testungen der *E. coli* Isolate der Phylogruppe B2 aus dem BSAC-Kollektiv mit den sich für ST131 ergebenden Resultaten.

Detektion von <i>E. coli</i> ST131-O25b Isolaten anhand spezifischer SNPs in <i>pabB</i>										
Stammdaten			PCR-Screening			Pyrosequencing			Ergebnis	Anzahl
<i>E. coli</i> B2-Isolate (BSAC-Kollektiv)			<i>pabB</i> (ARMS)- <i>gyrA</i> -Duplex PCR			<i>pabB</i> _267	<i>pabB</i> _573	SNPs	ST131-O25b	N ST131
Jahr	Nr.	GK-Nr.	<i>gyrA</i>	<i>pabB</i>	Ergebnis O25b	(C/T)	(G/A)	[N]	(pos./neg.)	N Andere
2001	1	2787	+	-	negativ	C	G	0	negativ	1
2001	2	2788	+	-	negativ				negativ	2
2001	3	2790	-	-	n. a.	C	n. d.	0	negativ	3
2001	4	2804	-	-	n. a.	C	n. d.	0	negativ	4
2001	5	2806	+	-	negativ				negativ	5
2001	6	2808	+	-	negativ				negativ	6
2001	7	2809	-	-	n. a.	C	n. d.	0	negativ	7
2001	8	2810	(+)	-	(neg)/n. a.	C	n. d.	0	negativ	8
2001	9	2811	(+)	-	(neg)/n. a.	C	G	0	negativ	9
2001	10	2813	-	-	n. a.	C	n. d.	0	negativ	10
2001	11	2815	+	-	negativ				negativ	11
2001	12	2819	+	-	negativ				negativ	12
2002	13	2820	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	13
2002	14	2822	(+)	-	(neg)/n. a.	C	G	0	negativ	14
2002	15	2826	+	+	positiv				positiv	1
2002	16	2832	+	-	negativ				negativ	15
2002	17	2833	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	16
2002	18	2834	(+)	-	(neg)/n. a.	C	G	0	negativ	17
2002	19	2836	+	+	positiv				positiv	2
2002	20	2838	+	-	negativ				negativ	18
2002	21	2840	+	-	negativ				negativ	19
2002	22	2842	+	-	negativ				negativ	20
2002	23	2843	-	-	n. a.	T	A	2	positiv	3
2002	24	2845	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	21
2002	25	2846	+	+	positiv				positiv	4
2002	26	2850	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	22
2002	27	2856	+	-	negativ				negativ	23
2003	28	2861	+	-	negativ	C	G	0	negativ	24
2003	29	2867	+	+	positiv	T	A	2	positiv	5
2003	30	2874	+	-	negativ				negativ	25

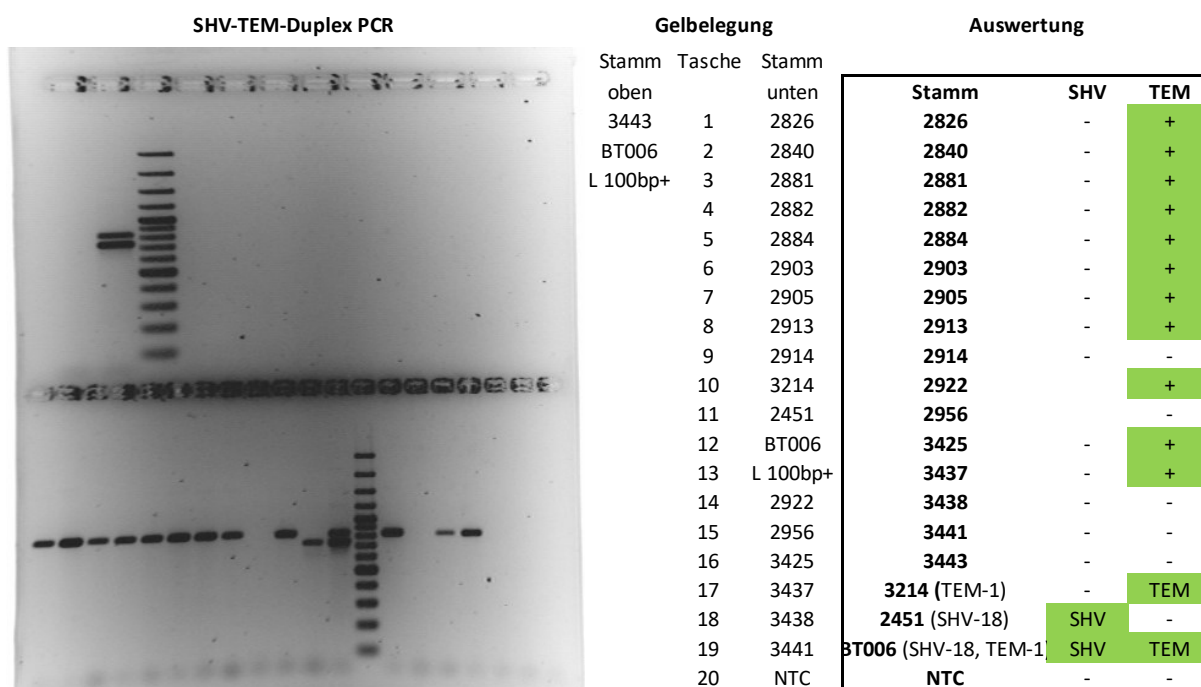
2003	31	2876	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	26
2003	32	2878	+	+	positiv				positiv	6
2003	33	2881	+	+	positiv	T	A	2	positiv	7
2003	34	2882	+	+	positiv				positiv	8
2003	35	2883	+	+	positiv	T	A	2	positiv	9
2003	36	2884	+	+	positiv				positiv	10
2003	37	2892	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	27
2003	38	2897	+	+	positiv				positiv	11
2003	39	2898	+	-	negativ				negativ	28
2003	40	2900	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	29
2004	41	2901	+	+	positiv				positiv	12
2004	42	2902	+	+	positiv				positiv	13
2004	43	2903	+	+	positiv				positiv	14
2004	44	2904	+	-	negativ				negativ	30
2004	45	2905	+	+	positiv				positiv	15
2004	46	2907	+	-	negativ				negativ	31
2004	47	2908	-	-	n. a.	n. d.	G	0	negativ	32
2004	48	2909	+	+	positiv				positiv	16
2004	49	2910	+	-	negativ				negativ	33
2004	50	2912	-	-	n. a.	C	G	0	negativ	34
2004	51	2913	+	+	positiv				positiv	17
2004	52	2914	+	+	positiv				positiv	18
2004	53	2917	-	-	n. a.	T	A	2	positiv	19
2004	54	2918	+	+	positiv				positiv	20
2004	55	2921	+	+	positiv				positiv	21
2004	56	2922	+	+	positiv				positiv	22
2004	57	2929	-	-	n. a.	T	A	2	positiv	23
2004	58	2930	+	+	positiv				positiv	24
2004	59	2933	+	+	positiv				positiv	25
2004	60	2936	+	+	positiv				positiv	26
2004	61	2937	+	+	positiv				positiv	27
2004	62	2938	+	+	positiv				positiv	28
2004	63	2939	+	+	positiv				positiv	29
2004	64	2942	-	-	n. a.	n. d.	G	0	negativ	35
2004	65	2944	-	-	n. a.	T	A	2	positiv	30
2004	66	2945	+	+	positiv				positiv	31
2004	67	2946	+	+	positiv				positiv	32
2004	68	2947	-	-	n. a.	n. d	A	1	positiv	33
2004	69	2948	+	-	negativ	C	G	0	negativ	36
2004	70	2949	+	+	positiv				positiv	34
2004	71	2950	+	-	neg				negativ	37
2004	72	2951	+	+	positiv				positiv	35
2004	73	2955	+	+	positiv				positiv	36
2004	74	2956	+	-	negativ				negativ	38

2004	75	2959	+	+	positiv			positiv	37	
2004	76	2960	+	+	positiv			positiv	38	
2004	77	2962	-	-	n. a.	C	G	negativ	39	
2004	78	2964	+	+	positiv		0	positiv	39	
2001-2004	78		(78 gescreente Isolate) Ergebnis: 34 positiv, 20 negativ, 24 n. a.			(30 pyroseq. Isolate) Ergebnis: 22 negativ, 8 positiv			Insgesamt ST131 nicht-ST131	78 39 39

n. a.: nicht auswertbar; n. d.: nicht bestimmt (*not determined*).

8.1.3 PCR-Screening auf SHV und TEM β -Lactamasen (BSAC-/ und QU-Stämme)

Abbildung 8-2 zeigt das Ergebnis der SHV-TEM Duplex-PCR (vgl. Kap. 6.2.9.1).

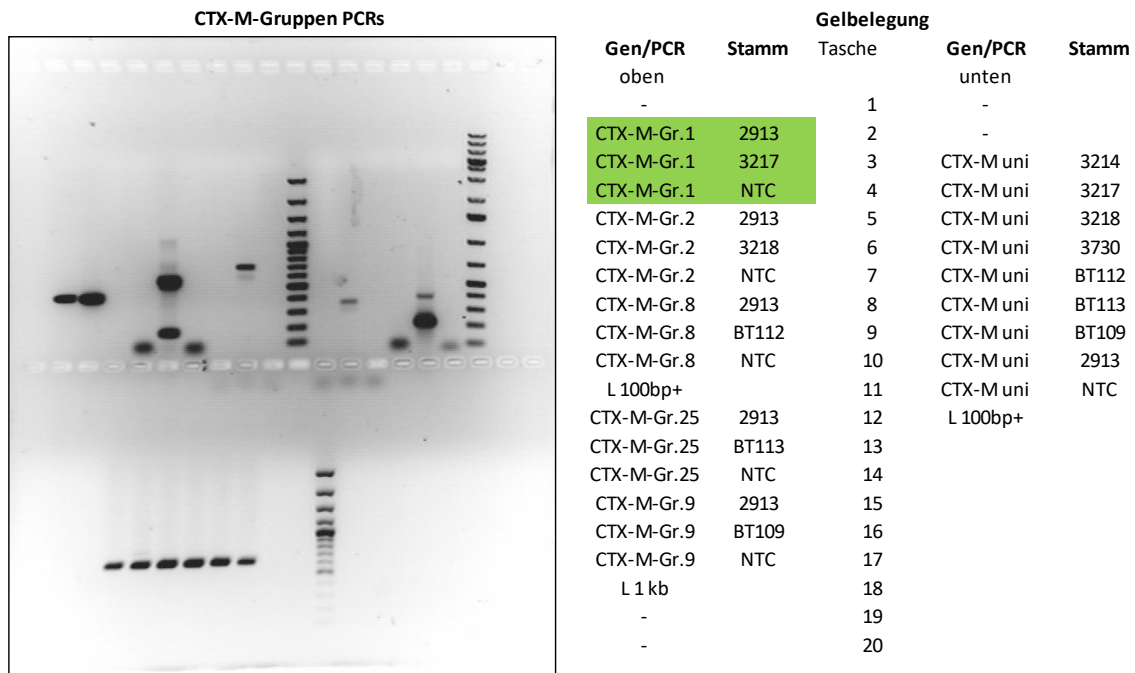


Agarose(2%)-Gelelektrophorese ; 0,5 TAE; L: Gene Ruler 100 bp plus; Screening PCR (Duplex) auf bla_{SHV} (746bp) und bla_{TEM} (838bp)

Abbildung 8-2: Ergebnis der Screening PCR auf die β -Lactamase-Gene bla_{SHV} und bla_{TEM} , links das Gelbild, mittig die Belegung, rechts eingerahmt die Auswertung. Positive Ergebnisse sind in grün unterlegt.

8.1.4 CTX-M-Gruppen PCR für *E. coli* eo971 (GK 2913)

Die Ergebnisse der *bla*_{CTX-M}-Gruppen-PCRs (vgl. Kap. 6.2.9.2) sind in Abbildung 8-3 dargestellt.



Agarose(2%)-Gelelektrophorese ; 0,5 TAE; Leiter: Gene Ruler 100 bp plus und 1kb; CTX-M-Gruppen PCR auf *bla*_{CTX-M-Gr.-X} und *bla*_{CTX-M-uni}

Abbildung 8-3: Ergebnis der *bla*_{CTX-M}-Gruppen-PCRs für GK 2913 und den Referenzstämmen der für die jeweiligen CTX-M Enzyme. Links das Bild der PCRs nach Trennung in Agarose 2 %. Rechts die Gelbelegung. Die CTX-M-Gr.1 PCR des detektierten Fragments ist in grün dargestellt.

8.3 Sequenzen neuer Allele

8.3.1 *pabB* in *E. coli* eo760 (GK 2903)

Consensus Sequence der *pabB* Sequenz von GK 2903, ausgerichtet (*align*) an *E. coli* JJ1886, aus IGV. Nächstverwandtes Allel: *pabB15*. Abweichungen zu *pabB15* sind in [blau](#) dargestellt. Der das Allel definierende Bereich ist unterstrichen.

gi|554510692|gb|CP006784.1|:1951936-1952676

GCAATTCTCCCCGCAGGAAGATTTCACTCACTTCCGACTGGCAATCCAATATGACCCGCG
AACAGTACGGCGAAAAATTTGCCAGGTACAGGAATATCTGCACAGCGGTGATTGCTATCAGGTGA
ATCTCGCCCAGCGTTTTTCATGCGACCTATTCTGGCGATGAATGGCAGGCATTCTTCAGCTTAATCAG
GCCAACCGCGCGCCGTTTAGCGCTTTTTTACGTCTTGAACAGGCTGCTATTTTAAGCCTTTCACCAGA
GCGGTTTATTCTTTGTGATAATGGTGAACTCCAGACCCGCCGATTAAGGCACGCTACCACGCCTGC
CCGATCTTCTGGAAGATAGCAAACAAGCAGAAAACTGGCGAACTCAACGAAAGATCGTGCCGAAA
ATCTGATGATTGTCGATTTAATGCGTAATGATATCGGTCGTGTTGCCGTAGCAGGTTTCGGTAAAAGT
ACCAGAGCTGTTCGTGGTGGAAACCTTCCCTGCCGTGCATCATCTGGTCAGCACCATAACGGCGCAA
CTACCAGAACAGTTACACGCCAGCGATCTGCTGCGCGCGGCTTTTCTTGGTGGCTCAATAACCGGGG
CTCCGAAAGTACGGGCTATGGAAATTATCGACGAACTGGAACCGCAGCGACGCAATGCCTGGTGGC
GCAGCATTGGCTATTTGAGCTTTTTCGCGCAACATGGACACCAGCATTACTATCCGCACGCTGACTACC
ATTAA

8.3.2 *pabB* in *E. coli* eo979 (GK 2956)

Consensus Sequence der *pabB* Sequenz von GK 2956, ausgerichtet (*align*) an *E. coli* JJ1886, aus IGV. Nächstverwandtes Allel: *pabB6*. Abweichungen zu *pabB6* sind in [blau](#) dargestellt. Der das Allel definierende Bereich ist unterstrichen.

gi|554510692|gb|CP006784.1|:1951934-1952673

CAATTCTCCCCGCAGGAAGATTTACGCTCACTTCCGACTGGCAATCCAATATGACCCGCGA
GCAGTACGGCGAAAAATTTGCCAGGTACAGGAATATCTGCACAGCGGTGATTGCTATCAGGTGAA
TCTCGCCCAGCGTTTTTCATGCGACCTATTCTGGCGATGAATGGCAGGCATTCTTCAGCTTAATCAGG
CCAACCGCGCGCCATTTAGCGCTTTTTTACGTCTTGAACAGAGTGCAATTTTAAGCCTTTCGCCAGAG

CGGTTTATTCTTTGTGATAATAGTGAAATCCAGACCCGCCGATTAAAGGCACGCTACCACGCCTGCC
CGATCCTCAGGAAGATAGCAAACAAGCAGAAAACTGGCGAACTCAGCGAAAGATCGTGCCGAAAA
TCTGATGATTGTCGATTTAATGCGTAATGATATCAAGTCGTGTTGCCGTAGCAGGTTCGGTAAAAAGTAC
CAGAGCTGTTCGTGGTGGAACCCTTCCCTGCCGTGCATCATCTGGTCAGCACCATAACGGCGCAACT
ACCAGAACAGTTACACGCCAGCGATCTGCTGCGCGCGGCTTTTCCTGGTGGCTCAATAACCGGGGCT
CCGAAAGTACGGGCTATGGAAATTATCGACGAACTGGAACCGCAGCGACGCAATGCCTGGTGCGGC
AGCATTGGCTATTTGAGCTTTTGCGGCAACATGGACACCAGCATTACTATCCGCACGCTGACTACCAT
TAA

8.3.3 *trpA* in *E. coli* PEG-16-27-35 (GK 4465)

Consensus Sequence (rc) der *trpA* Sequenz von GK 4465, ausgerichtet (*align*) an *E. coli* JJ1886, aus IGV. Nächstverwandtes Allel: *trpA2*. Abweichungen zu *trpA2* sind in [blau](#) dargestellt. Der das Allel definierende Bereich ist unterstrichen.

gi|554510692|gb|CP006784.1|:1494363-1495135

GTGGCTTTCATCGGTTGTACAAAAGCTTTCAGTGCCGCCAGCATTTTCTCTGGCTCATTAAATA
TGTTGCTCGATGATTTTAACGATGGCCGAACCAGAAATCGCGCCCGCAGCTCCTGCATCAATCGCTGC
TTTTACCTGATCCGGGGCGGAAATACCAAATCCCTGCAATGGAGGCGCAGCGTTGTACTCTTTCAGCT
TCGCAACCAGATGATTGAGGGGTAACGCGGCGCGGTTTTCTGCGCCGGTCACGCCCGCTCGCGACA
GCAAATAGGTGTAACCACGACCGTAAGAGGCTATCTGGCGCAGCAAATCATCGTCGGCATTAGGCG
GGCAAATAAAGATAGGTGCGACATTATGACGCAACGCGGCCTGGCGGAAGGGCGCGGACTCTTCCA
CGGGCACATCGGCAACCAGCACCGAATCGACGCCGACTTTCTCGCACTCGGCATAAAACTCATCAAT
GCCTTTGTAAACACCAGGTTGGCATAACATAAAAAGGCCGATGGGAATGGTCGGGTGCTTCTGGCGA
ATGAGTGCCAGCACCTCAAAGCACTGCGCCGGGTTACTCCCGCCGCAAAGCACGCAGTGTGGCG
TTTTGAATCGTCGGGCCATCCGCCAGTGGGTCGGAAAAGGGGATGCCTAACTCCAGCGCGTCAGCA
CCGGCTTCAATTAGCGTATCGATAATTTTCAACGACTGCTCAATGCCCGGATCACCGAGGGTGACGA
AAGGAACGAATGCGCCTTCTTTGCGCTCCTTCAACTGGG

8.3.4 *dinB* in *E. coli* PEG-16-101-31 (GK 4512)

Consensus Sequence der *dinB* Sequenz von GK 4512, ausgerichtet (*align*) an *E. coli* JJ1886, aus IGV. Nächstverwandtes Allel: *dinB200*. Abweichungen zu *dinB200* sind in [blau](#) dargestellt. Der das Allel definierende Bereich ist unterstrichen.

gi|554510692|gb|CP006784.1|:303515-304245

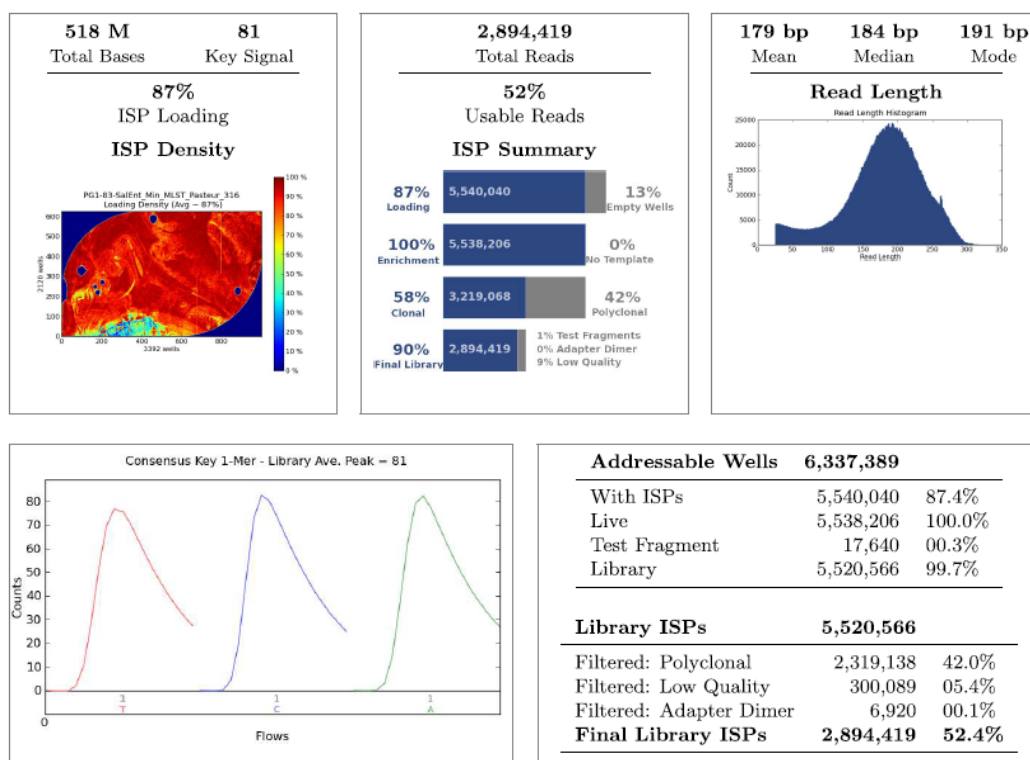
TTGAGAGGTGAGCAATGCGTAAAATCATTGATGGATATGGACTGCTTTTTCGCCGCGGTG
GAGATGCGCGACAATCCCGCCCTGCGCGATATCCCTATTGCTATTGGCGGCAGCCGCGAACGCCGG
GGGGTGATCAGCACCGCCAATTATCCCGCGCGTAAATTTGGCGTGCGTAGCGCAATGCCAACCGGC
ATGGCGCTCAAACTGTGTCCGCATCTCACCTTGCTTCCAGGGCGCTTTGACGCCTACAAAGAAGCGTC
AAATCATATCCGCGAAATCTTCTCTCGCTACACATCGCGTATTGAGCCGCTGTCGCTGGATGAAGCTT
ATCTCGACGTCACCGACAGCGTACATTGCCACGGTTCTGCGACCCTTAT[T](#)GCTCAGGAAATCCGTCAG
ACGATTTTCAACGAGCTGCAACTTACCGCCTCTGCGGGCATTGCGCCGGTCAAGTTTCTGCCAAAAT
CGCCTCTGATATGAATAAACCAACGGACAGTTTGTGATTACGCCGGCGGACGTCCCT[T](#)GCAATTTCTGC
AAACCTTACCGCTGGCAAAAATCCCGGTGTCGGCAAAGTCTCGGCGGCAAACTGGAAGCGATGG
GGCTACGAACCTGTGGCGATGTACAAAAGTGTGATCTGGTGACGTTGCTTAAACGCTTTGGCAAATT
TGGCCGCATTTTGTGGGAGCGTAGCCAGGGCATTGACGAACGCGACGTT

8.4 RP-MLST NGS-Sequenzierung und Analysen

8.4.1 Ion Torrent™ PGM Run Reports

Run Report for Auto_user_PG1-83-SalEnt_Min_MLST_Pasteur_316_128



Run Summary



Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	9,154,653	7,788,711	54,955	167 bp
IonXpress_001	GK2826_Pasteur	9,006,130	7,787,205	48,046	187 bp
IonXpress_002	GK2840_Pasteur	11,279,855	9,842,419	57,756	195 bp
IonXpress_003	GK2881_Pasteur	12,182,394	10,675,493	63,620	191 bp
IonXpress_004	GK2882_Pasteur	12,349,968	10,813,547	65,099	190 bp
IonXpress_005	GK2884_Pasteur	9,313,024	8,084,709	49,634	188 bp
IonXpress_006	GK2903_Pasteur	11,019,026	9,687,950	62,282	177 bp
IonXpress_007	GK2905_Pasteur	10,380,833	9,004,102	52,836	196 bp
IonXpress_008	GK2913_Pasteur	12,120,996	10,432,910	62,764	193 bp
IonXpress_009	GK2914_Pasteur	13,912,683	12,236,572	77,714	179 bp
IonXpress_010	GK2922_Pasteur	10,561,273	9,152,779	57,306	184 bp
IonXpress_011	GK2956_Pasteur	9,536,053	8,336,830	51,335	186 bp

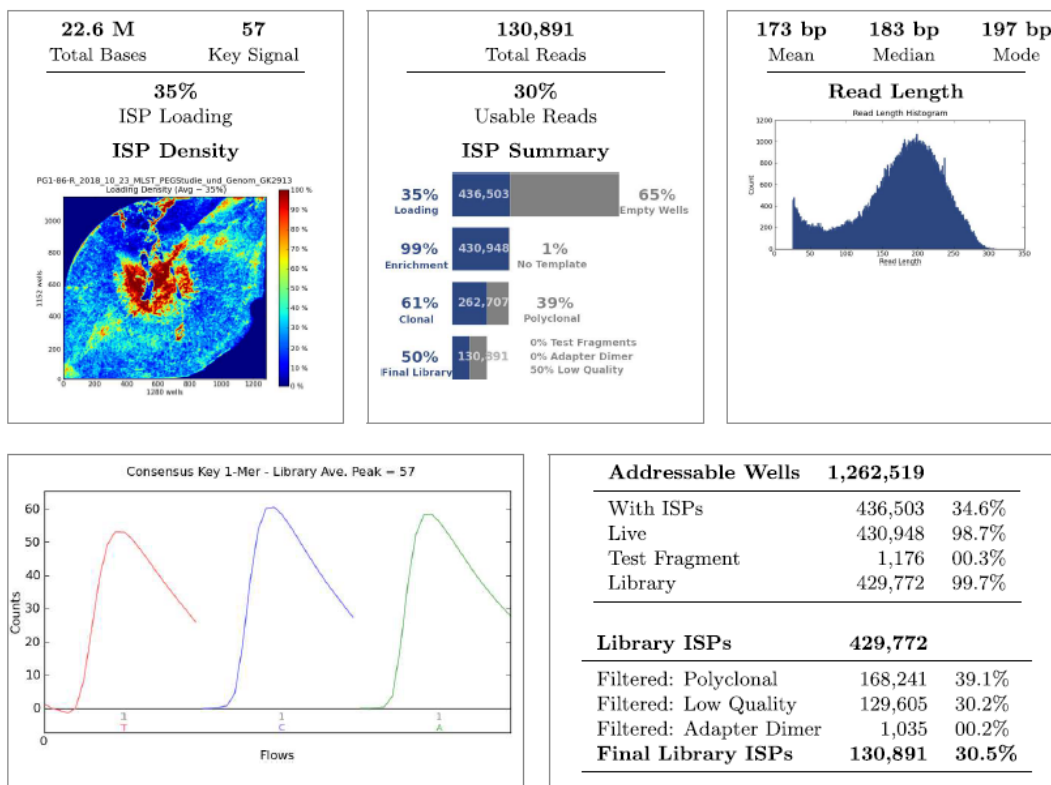
Run Report for Auto_user_PG1-83-SalEnt_Min_MLST_Pasteur_316_128

IonXpress_012	GK3425_Pasteur	9,038,565	7,899,617	46,694	194 bp
IonXpress_013	GK4318_Genom_SalEnt351,236,486	305,121,560	2,002,729		175 bp
IonXpress_014	GK3438_Pasteur	8,529,206	7,462,908	45,393	188 bp
IonXpress_015	GK3441_Pasteur	9,194,224	8,031,078	48,494	190 bp
IonXpress_016	GK3443_Pasteur	8,897,052	7,708,440	47,620	187 bp

Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF_A	3,176	86%	
TF_1	12,060	79%	


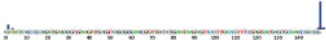
Run Report for
Auto_user_PG1-86-R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_und_Genom_GK2913_130

Run Summary



Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	775,360	659,779	5,159	150 bp
IonXpress_001	Eco eo 791 genome GK 2913	17,038,693	14,741,311	96,967	176 bp
IonXpress_002	Eco PEG2016 MLST GK 4417	344,936	302,444	1,904	181 bp
IonXpress_003	Eco PEG2016 MLST GK 4419	270,860	239,010	1,501	180 bp
IonXpress_004	Eco PEG2016 MLST GK 4421	309,296	272,271	1,722	180 bp
IonXpress_005	Eco PEG2016 MLST GK 4422	302,495	271,960	1,924	157 bp
IonXpress_006	Eco PEG2016 MLST GK 4423	317,913	279,689	1,829	174 bp
IonXpress_007	Eco PEG2016 MLST GK 4424	350,291	307,066	1,977	177 bp
IonXpress_008	Eco PEG2016 MLST GK 4429	111,297	96,142	687	162 bp
IonXpress_009	Eco PEG2016 MLST GK 4434	124,983	109,305	738	169 bp

Run Report for Auto_user_PG1-86-R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_und_Genom_GK2913_130					
IonXpress_010	Eco PEG2016 MLST GK 4439	159,706	138,726	945	169 bp
IonXpress_011	Eco PEG2016 MLST GK 4440	418,592	367,058	2,422	173 bp
IonXpress_012	Eco PEG2016 MLST GK 4442	457,118	403,680	2,572	178 bp
IonXpress_013	Eco PEG2016 MLST GK 4446	449,943	399,986	2,751	164 bp
IonXpress_014	Eco PEG2016 MLST GK 4458	423,021	382,952	2,644	160 bp
IonXpress_015	Eco PEG2016 MLST GK 4459	403,963	365,476	2,845	142 bp
IonXpress_016	Eco PEG2016 MLST GK 4461	387,632	342,681	2,285	170 bp

Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF_A	539	89%	
TF_1	577	81%	

8.4.2 Sequenzen der MLST Housekeeping-Gene

Im Folgenden sind die mittels RP-MLST erhaltenen Sequenzen der zur ST-Bestimmung relevanten Genabschnitte der Housekeeping-Gene nach Achtman für vier *E. coli* Isolate, je zwei ST131 und zwei nicht-ST131, angelegt an den *E. coli* ST131 Referenzstamm JJ1886 dargestellt (vgl. dazu auch Kap. 3.4.1). Abweichungen von der Referenz sind farbige dargestellt.

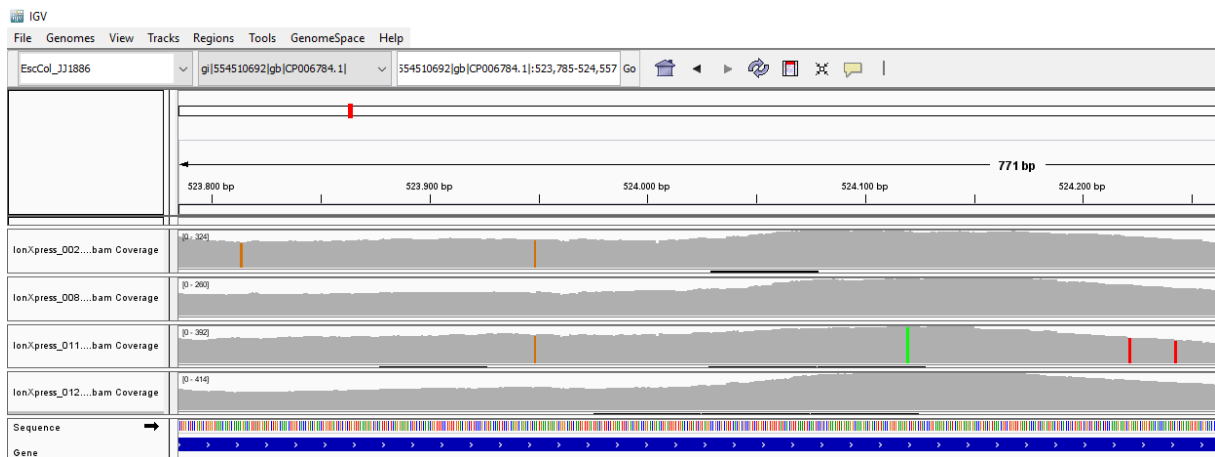


Abbildung 8-11: Sequenzen im MLST-Bereich von *adk*. Darstellung für vier Isolate gegen *E. coli* JJ1886 (ST131) in IGV.

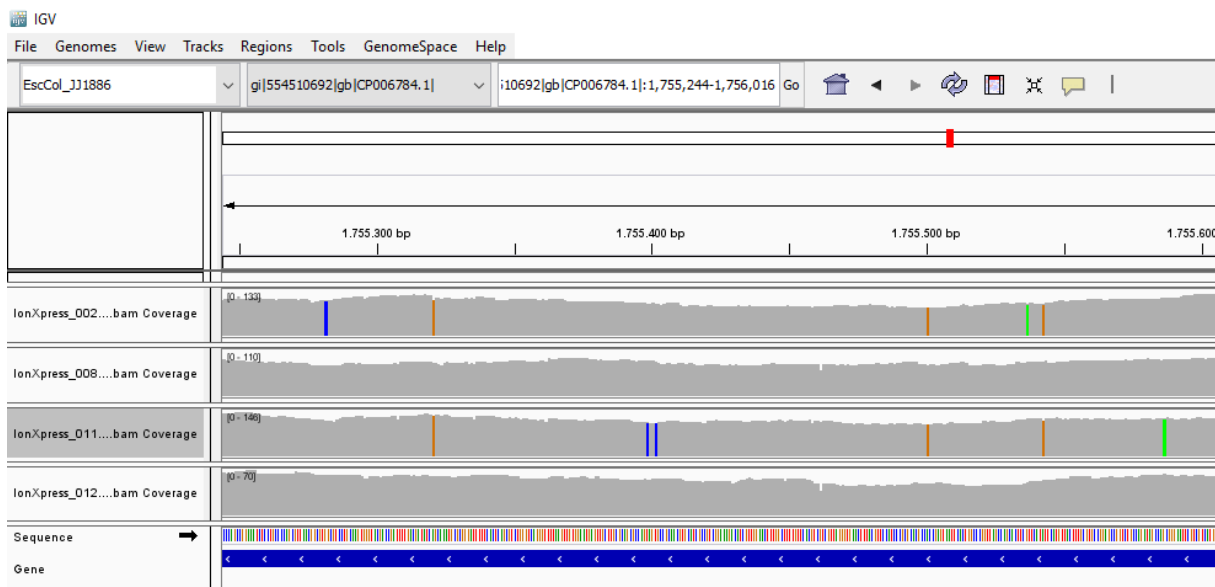


Abbildung 8-12: Sequenzen im MLST-Bereich von *fumC*. Darstellung für vier Isolate gegen *E. coli* JJ1886 (ST131) in IGV.

Legende: RP-MLST Sequenzen im ST-relevanten Bereich der jeweiligen Housekeeping-Gene. Dargestellt sind jeweils untereinander die Coverage Tracks der *E. coli* Isolate eo393 (GK 2840 = IonXpress_002), eo791 (GK 2913 = IonXpress_008), eo979 (GK 2956, = IonXpress_011) und QUC02 (GK 3425 = IonXpress_012). Sie zeigen die Abdeckung (Höhe) und Sequenz (Farbe) im Vergleich zur Referenzsequenz von *E. coli* JJ1886 (ST131). Farben: Grau: wie Referenz. Abweichende Basen: Rot (Thymin), Orange (Guanin), Grün (Adenin) oder Blau (Cytosin).

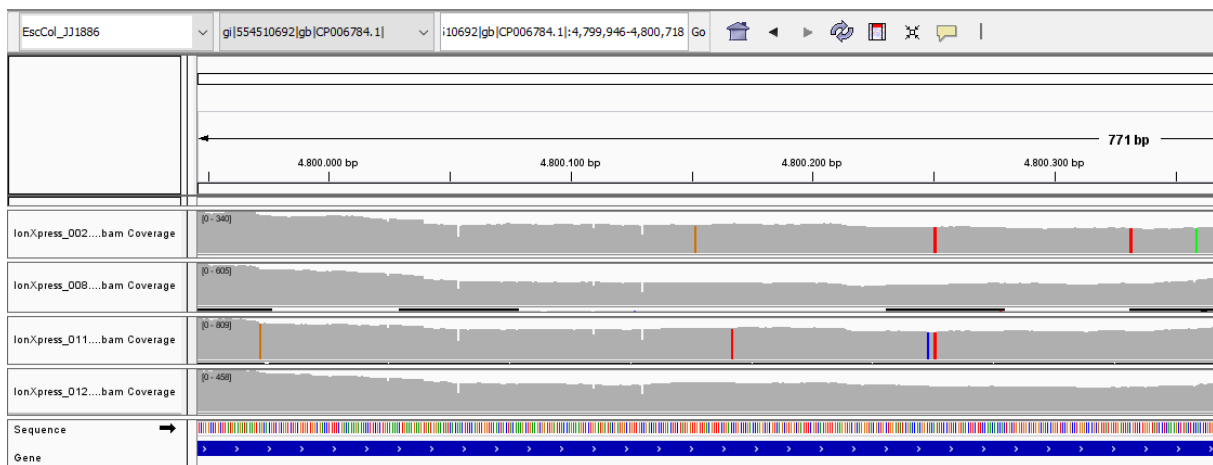


Abbildung 8-13: Sequenzen im MLST-Bereich von *purA*. Darstellung für vier Isolate gegen *E. coli* JJ1886 (ST131) in IGV.

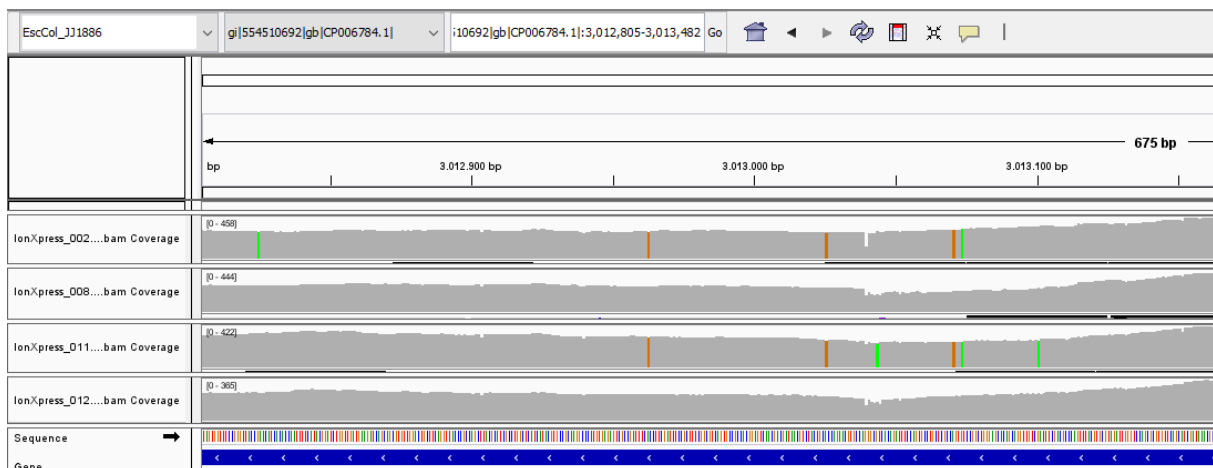


Abbildung 8-14: Sequenzen im MLST-Bereich von *recA*. Darstellung für vier Isolate gegen *E. coli* JJ1886 (ST131) in IGV.

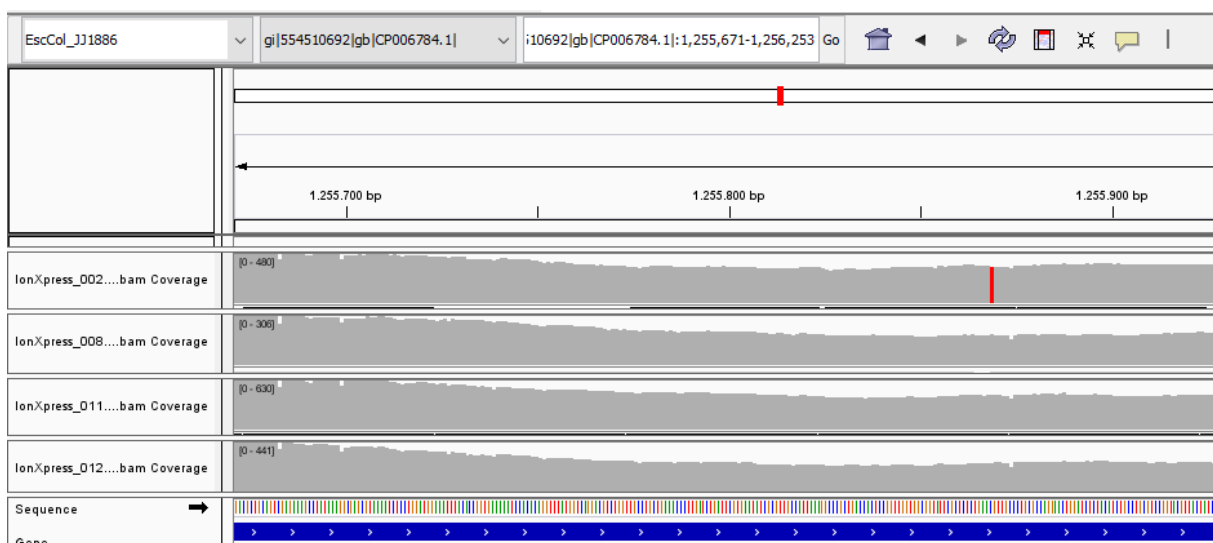


Abbildung 8-15: Sequenzen im MLST-Bereich von *icd*. Darstellung für vier Isolate gegen *E. coli* JJ1886 (ST131) in IGV.

Anhang

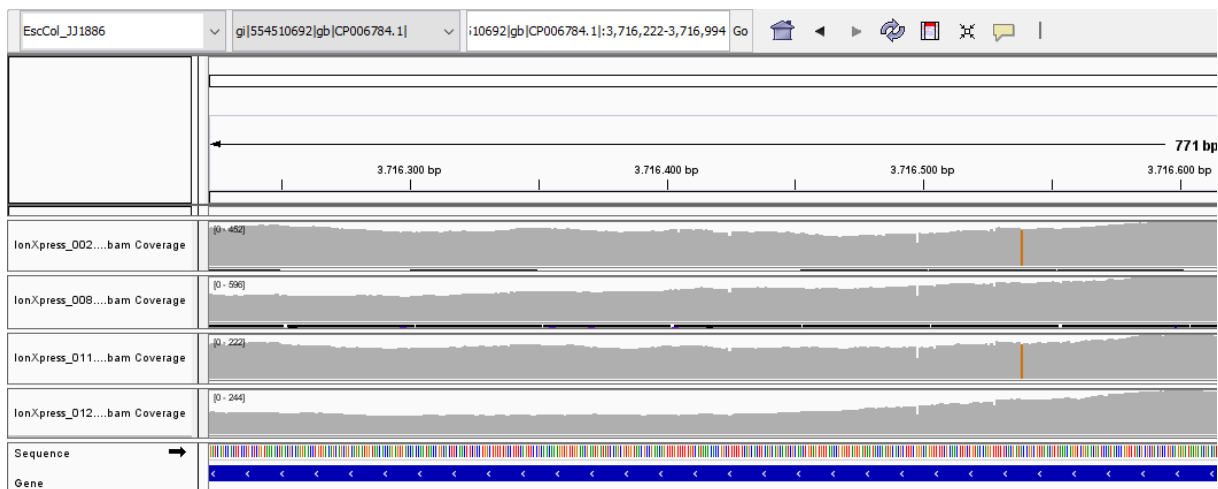


Abbildung 8-16: Sequenzen im MLST-Bereich von mdh. Darstellung für vier Isolate gegen *E. coli* JJ1886 (ST131) in IGV.

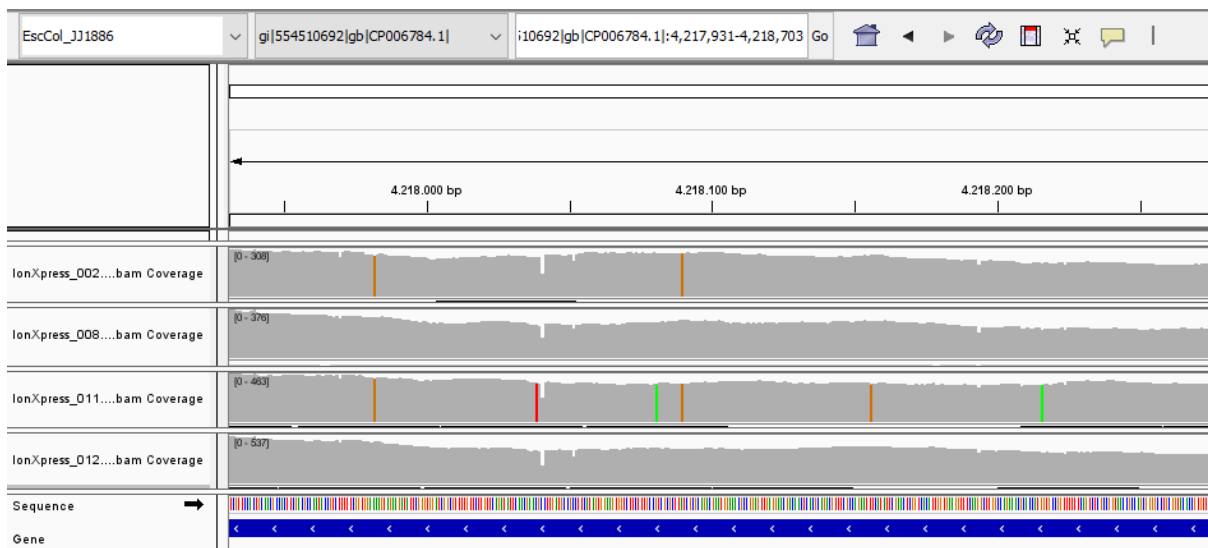


Abbildung 8-17: Sequenzen im MLST-Bereich von gyrB. Darstellung für vier Isolate gegen *E. coli* JJ1886 (ST131) in IGV.

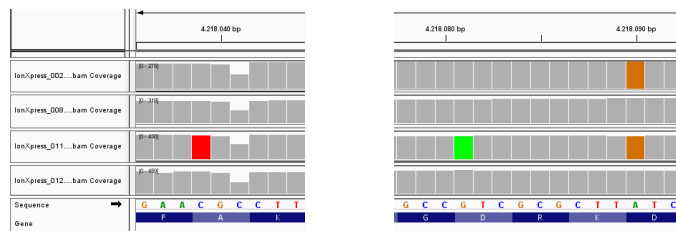


Abbildung 8-18: Detailansicht einzelner Abweichungen der Isolate aus Abbildung 8-17 in gyrB gegen *E. coli* JJ1886 (ST131).

Legende: RP-MLST Sequenzen im ST-relevanten Bereich der jeweiligen Housekeeping-Gene. Dargestellt sind jeweils untereinander die Coverage Tracks der *E. coli* Isolate eo393 (GK 2840 = IonXpress_002), eo791 (GK 2913 = IonXpress_008), eo979 (GK 2956, = IonXpress_011) und QU02 (GK 3425 = IonXpress_012). Sie zeigen die Abdeckung (Höhe) und Sequenz (Farbe) im Vergleich zur Referenzsequenz von *E. coli* JJ1886 (ST131). Farben: Grau: wie Referenz. Abweichende Basen: Rot (Thymin), Orange (Guanin), Grün (Adenin) oder Blau (Cytosin).

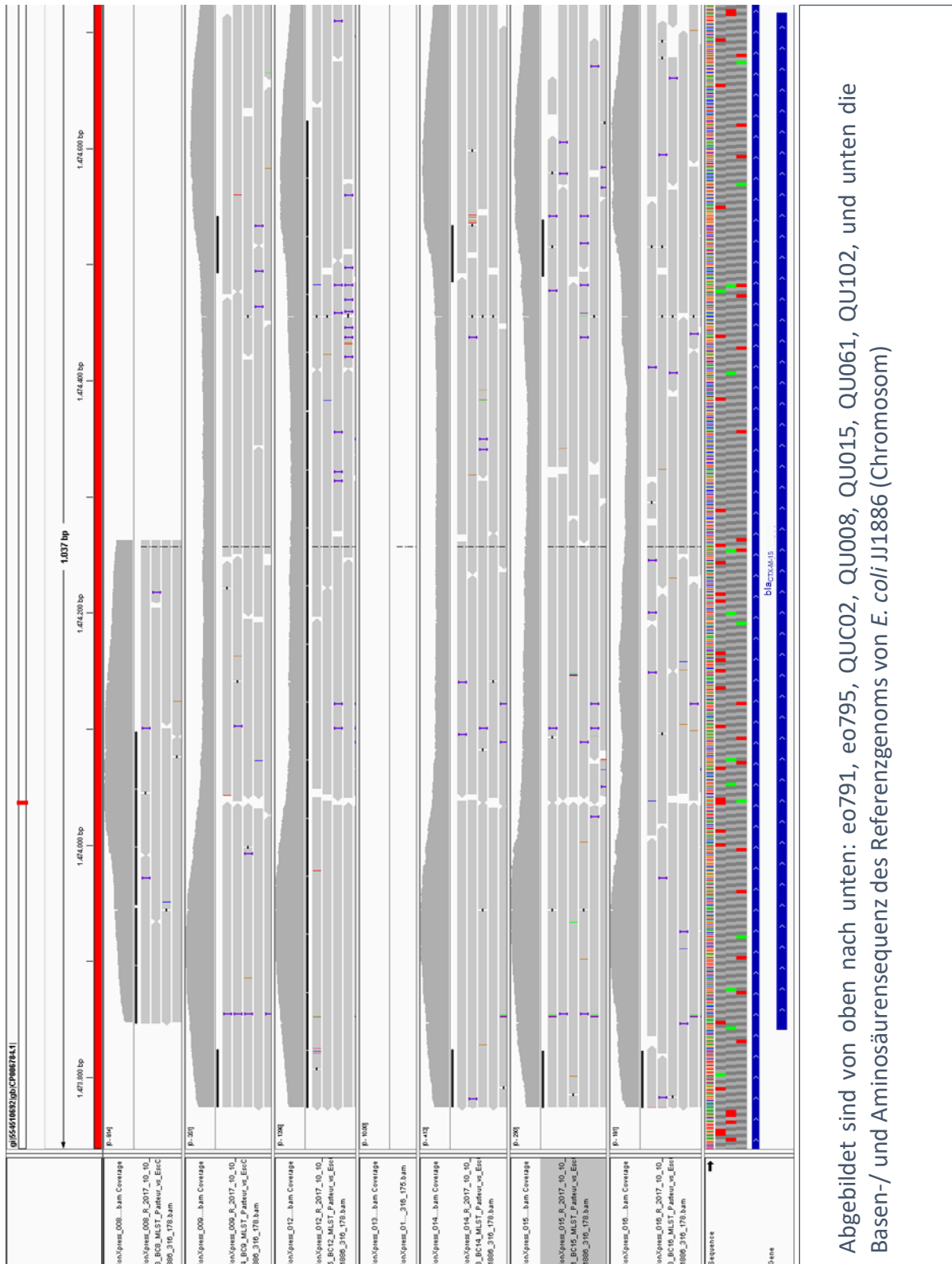
8.4.3 Sequenzen der *bla*_{CTX-M} Gene aus der RP-MLST-Analyse in IGV

Abbildung 8-19: Darstellung der RP-MLST Sequenzen im Bereich von *bla*_{CTX-M15} (vgl. Kap. 3.5.2), Alignment der Teststämme gegen *E. coli* JJ1886, Darstellung in IGV (Integrative Genome Viewer). (Querformat).

8.4.5 CLC „Type a known species“ Analyse der RP-MLST Daten

Die RP-MLST Ergebnisreports, Auswertung mit den CLC Analyse Tools „Type a known species“ und „Type with MLST Scheme“ sind folgend in Abbildung 8-21 bis Abbildung 8-24 aufgeführt.

Type with MLST scheme

The table is based on 16 samples.

MLST Achtman

Typing result and information MLST schemes and search summary

Sample name	Typing	Sequ nce types	Mean kmer fracti on	Mean # alleles identif ied	Mean # alleles called	Mean # alleles	Mean # alleles	# estim ated sample coverag e	# alleles with all kmers found	# novel alleles identi fied	Scheme name	# loci in MLST scheme
MLST_02_ST131_GK2826_IonXpress_001_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	128	47	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2840_IonXpress_002_190 typing report	Conclusive	ST14	1	7	7	7	7	230	78	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2881_IonXpress_003_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	181	90	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2882_IonXpress_004_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	192	73	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2884_IonXpress_005_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	177	68	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2903_IonXpress_006_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	231	84	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2905_IonXpress_007_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	174	54	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2913_IonXpress_008_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	152	61	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2914_IonXpress_009_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	185	78	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2922_IonXpress_010_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	180	52	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK2956_IonXpress_011_190 typing report	Conclusive	ST73	1	7	7	7	7	309	111	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK3425_IonXpress_012_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	186	50	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK3437_IonXpress_013_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	169	54	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK3438_IonXpress_014_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	160	46	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_01_ST131_GK3441_IonXpress_001 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	880	262	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
MLST_02_ST131_GK3443_IonXpress_015_190 typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	7	195	55	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7
Minimum			1	7	7	7	7	128	46	0		7
Median			1	7	7	7	7	183	64,5	0		7
Maximum			1	7	7	7	7	880	262	0		7
Mean			1	7	7	7	7	233,063	78,938	0		7
Standard deviation			0	0	0	0	0	177,234	52,058	0		0

Abbildung 8-21: Ergebnisse der CLC-Analyse "Type with MLST Scheme" - Achtman Schema, innerhalb der „Type a known species“ Analyse aus der RP-MLST NGS-Sequenzierung (nach Achtman) der ausgewählten England- und Queensland-Stämme auf dem Ion Torrent™. Abweichende Werte in Gelb.

Type with MLST scheme

The table is based on 16 samples.

MLST Pasteur

Typing result and information MLST schemes and search summary

Sample name	Typing	Sequ nce types	Mean kmer fracti on	Mean # alleles identif ied	Mean # alleles called	Mean # alleles	Mean # alleles	# estim ated sampl e	# alleles with all kmers found	# novel alleles identi fied	Scheme name	# loci in MLST schem e
IonXpress_001_2017-10-10T10_17_04Z_GK2826_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	353	19	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_002_2017-10-10T10_17_04Z_GK2840_Pasteur typing report	Conclusive	ST16	1	8	8	8	8	400	15	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_003_2017-10-10T10_17_04Z_GK2881_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	402	24	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_004_2017-10-10T10_17_04Z_GK2882_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	448	25	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_005_2017-10-10T10_17_04Z_GK2884_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	384	19	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_006_2017-10-10T10_17_04Z_GK2903_Pasteur typing report	Inconclusive	ST43	0,994	7	8	8	8	522	18	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_007_2017-10-10T10_17_04Z_GK2905_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	547	16	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_008_2017-10-10T10_17_04Z_GK2913_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	565	17	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_009_2017-10-10T10_17_04Z_GK2914_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	645	14	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_010_2017-10-10T10_17_04Z_GK2922_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	462	14	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_011_2017-10-10T10_17_04Z_GK2956_Pasteur typing report	Inconclusive	ST30	0,875	7	7	7	7	506	12	1	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_012_2017-10-10T10_17_04Z_GK3425_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	384	14	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_013_2017-10-11T09_09_41Z_GK3437_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	2212	64	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_014_2017-10-10T10_17_04Z_GK3438_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	803	25	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_015_2017-10-10T10_17_04Z_GK3441_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	570	23	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
IonXpress_016_2017-10-10T10_17_04Z_GK3443_Pasteur typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	8	452	22	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
Minimum			0,875	7	7	7	7	353	12	0		8
Median			1	8	8	8	8	484	18,5	0		8
Maximum			1	8	8	8	8	2212	64	1		8
Mean			0,992	7,875	7,9375	8	8	603,4	21,31	0,0625		8
Standard deviation			0,031	0,3416	0,25	0	0	444,1	12,15	0,25		0

Abbildung 8-22: Ergebnisse der CLC-Analyse "Type with MLST Scheme" - Pasteur Schema, innerhalb der „Type a known species“ Analyse aus der RP-MLST NGS-Sequenzierung (nach Pasteur) der ausgewählten England- und Queensland-Stämme auf dem Ion Torrent™. Abweichende Werte in Gelb, Unvollständige MLST-Bestimmung in Pink.

Type with MLST scheme		MLST Achtman										MLST schemes and search summary									
Typing result and information																					
The table is based on 32 samples.																					
Sample name	Typing	Sequence types	Mean kmer fraction	Mean # alleles identified	Mean # alleles called	Mean # alleles	# estimated sample coverage	# alleles with all kmers found	# novel alleles identified	Scheme name	# loci in MLST scheme										
lonXpress_001.R_2018_10_23_Genom_eo791_GK2913 (single) typing report	Inconclusive	ST9126	0,829535	1	7	7	7	1	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_002.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4417 (single) typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	15	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_003.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4419 (single) typing report	Conclusive	ST744	1	7	7	7	14	9	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_004.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4421 (single) typing report	Conclusive	ST69	1	7	7	7	11	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_005.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4422 (single) typing report	Conclusive	ST69	1	7	7	7	13	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_006.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4423 (single) typing report	Conclusive	ST117	1	7	7	7	15	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_007.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4424 (single) typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	14	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_008.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4429 (single) typing report	Inconclusive	ST14685, ST14	0,690528	1	7	7	14	1	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_009.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4434 (single) typing report	Inconclusive	ST10935, ST63	0,727544	1	7	7	1	1	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_010.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4439 (single) typing report	Inconclusive	ST13742, ST12	0,687924	0	6	7	2	0	1	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_011.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4440 (single) typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	16	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_012.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4442 (single) typing report	Conclusive	ST58	1	7	7	7	17	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_013.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4446 (single) typing report	Conclusive	ST10	1	7	7	7	21	10	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_014.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4458 (single) typing report	Conclusive	ST357	1	7	7	7	17	9	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_015.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4459 (single) typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	13	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_016.R_2018_10_23_MLST_PEGStudy_GK4461 (single) typing report	Conclusive	ST361	1	7	7	7	16	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_001.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4465 (single) typing report	Conclusive	ST12	1	7	7	7	16	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_002.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4471 (single) typing report	Inconclusive	ST13160, ST13	0,857143	6	6	7	27	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_003.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4475 (single) typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	19	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_004.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4477 (single) typing report	Conclusive	ST5891	1	7	7	7	21	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_005.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4479 (single) typing report	Conclusive	ST744	1	7	7	7	20	10	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_006.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4481 (single) typing report	Conclusive	ST162	1	7	7	7	16	9	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_007.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4482 (single) typing report	Conclusive	ST713	1	7	7	7	11	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_008.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4494 (single) typing report	Conclusive	ST131	1	7	7	7	17	8	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_009.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4495 (single) typing report	Conclusive	ST491	1	7	7	7	20	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_010.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4498 (single) typing report	Conclusive	ST393	1	7	7	7	23	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_011.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4501 (single) typing report	Conclusive	ST156	1	7	7	7	19	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_012.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4506 (single) typing report	Conclusive	ST88	1	7	7	7	17	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_013.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_4509 (single) typing report	Conclusive	ST12	1	7	7	7	19	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_014.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4512 (single) typing report	Conclusive	ST117	1	7	7	7	17	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_015.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK2840 (single) typing report	Conclusive	ST14	1	7	7	7	18	7	0	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
lonXpress_016.R_2018_10_24_Genom_QU102_GK3443 (single) typing report	Inconclusive	ST14602, ST14	0,849111	5	6	7	2	5	1	Escherichia spp. MLST (Achtman)	7										
Minimum			0,687924	0	6	7	1	0	0		7										
Median			1	7	7	7	16	7	0		7										
Maximum			1	7	7	7	27	10	1		7										
Mean			0,957556	6,125	6,90625	7	14,65625	6,84375	0,0625		7										
Standard deviation			0,095374	2,1060588	0,296145	0	6,6604726	2,5413912	0,2459347		0										

Abbildung 8-23: Ergebnisse der CLC-Analyse "Type with MLST Scheme" – MLST Achtman der Stämme aus der PEG-Studie 2016, sowie der Genome von GK 2913 und GK 3443. Abweichende Werte in Gelb, Unvollständige MLST-Bestimmung in Pink.

Type with MLST scheme
Typing result and information
 The table is based on 32 samples.

MLST Pasteur

MLST schemes and search summary

Sample name	Typing	Sequence types	Mean kmer fraction	Mean # alleles identified	Mean # alleles called	Mean # alleles	# estimated sample coverage	# alleles with all kmers found	# novel alleles identified	Scheme name	# loci in MLST scheme
lonXpress_001.R_2018_10_23_Genom_eo791_GK2913 (single) typing report	Inconclusive	ST690, ST568, ST43	0,653902	3	6	8	2	3	2	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_002.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4417 (single) typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	10	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_003.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4419 (single) typing report	Inconclusive	ST2	0,998837	7	8	8	8	7	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_004.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4421 (single) typing report	Conclusive	ST3	1	8	8	8	9	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_005.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4422 (single) typing report	Conclusive	ST3	1	8	8	8	8	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_006.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4423 (single) typing report	Inconclusive	ST706, ST641, ST43	0,926957	6	8	8	8	6	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_007.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4424 (single) typing report	Inconclusive	ST43	0,989667	7	8	8	8	7	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_008.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4429 (single) typing report	Inconclusive	ST566, ST506	0,639107	0	8	8	1	0	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_009.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4434 (single) typing report	Inconclusive	ST796, ST134, ST986, ST74, S	0,662459	1	8	8	1	1	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_010.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4439 (single) typing report	Inconclusive	ST986, ST74, S	0,728833	0	7	8	1	0	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_011.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4440 (single) typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	11	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_012.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4442 (single) typing report	Conclusive	ST87	1	8	8	8	8	12	8	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_013.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4446 (single) typing report	Conclusive	ST2	1	8	8	8	14	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_014.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4458 (single) typing report	Conclusive	ST404	1	8	8	8	11	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_015.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4459 (single) typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	12	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_016.R_2018_10_23_MLST_PEGStudie_GK4461 (single) typing report	Conclusive	ST650	1	8	8	8	8	12	8	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_001.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4465 (single) typing report	Inconclusive	ST35	0,875	7	7	8	11	7	1	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_002.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4471 (single) typing report	Conclusive	ST74	1	8	8	8	15	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_003.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4475 (single) typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	13	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_004.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4477 (single) typing report	Inconclusive	ST397	0,875	7	7	8	14	9	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_005.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4479 (single) typing report	Inconclusive	ST1174, ST117	0,875	7	7	8	15	7	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_006.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4481 (single) typing report	Inconclusive	ST355	0,914277	7	7	8	13	7	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_007.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4482 (single) typing report	Conclusive	ST14	1	8	8	8	11	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_008.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4494 (single) typing report	Conclusive	ST43	1	8	8	8	13	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_009.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4495 (single) typing report	Conclusive	ST375	1	8	8	8	16	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_010.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4498 (single) typing report	Conclusive	ST494	1	8	8	8	14	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_011.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4501 (single) typing report	Conclusive	ST19	1	8	8	8	15	9	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_012.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4506 (single) typing report	Conclusive	ST66	1	8	8	8	16	9	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_013.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_4509 (single) typing report	Conclusive	ST35	1	8	8	8	12	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_014.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK4512 (single) typing report	Inconclusive	ST641	0,875	7	7	8	14	7	1	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_015.R_2018_10_24_MLST_PEG-Studie.2_GK2840 (single) typing report	Conclusive	ST6	1	8	8	8	13	8	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
lonXpress_016.R_2018_10_24_Genom_QU102_GK3443 (single) typing report	Inconclusive	ST1125, ST110	0,841254	3	8	8	3	3	0	Escherichia spp. MLST (Pasteur)	8
Minimum			0,639107	0	6	8	1	0	0		8
Median			1	8	8	8	12	8	0		8
Maximum			1	8	8	8	16	9	2		8
Mean			0,932962	6,6875	7,78125	8	10,46875	6,8125	0,125		8
Standard deviation			0,112801	2,4288255	0,490844	0	4,5364785	2,5072476	0,4212118		0

Abbildung 8-24: Ergebnisse der CLC-Analyse "Type with MLST Scheme" – MLST Pasteur der Stämme aus der PEG-Studie 2016, sowie der Genome von GK 2913 und GK 3443. Abweichende Werte in Gelb, Unvollständige MLST-Bestimmung in Pink.

8.4.6 CLC „Find Resistance“ Analyse der RP-MLST Daten

Tabelle 8-2 und Tabelle 8-3 zeigen die CLC „Find antibiotic resistance“ Ergebnisse aus dem RP-MLST, die detektierten Resistenzgene mit Ihrer Identität in % und Beschreibung der Resistenz.

Tabelle 8-2: Ergebnisse der genomsequenzierten Stämme eo791 (GK 2913) und QU102 (GK 3443) aus der CLC Analyse „Type a known species (E. coli)“ in Kombination mit dem „Find antibiotic Resistance“ Tool der CLC Genomics Workbench.

GK Nr.	Gene	Identity %	Predicted phenotype	Compound class
2913	NCBI_204780 Escherichia coli ampC beta-lactamase	99,73	antibiotic inactivation enzyme	penicillin
2913	CARD_100350 mdtH	98,10	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	fluoroquinolon antibiotics
2913	CARD_101793 mdtE	98,54	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
2913	CARD_102045 gadW	99,57	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
2913	CARD_101173 H-NS	99,26	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
2913	CARD_101251 emrR	98,50	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
3443	RESF_300236 AAC(6')-Ib-cr6	100,00	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
3443	NCBI_204780 Escherichia coli ampC beta-lactamase	99,87	antibiotic inactivation enzyme	penicillin
3443	CARD_100564 mdtG	98,29	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	fosfomycin
3443	CARD_102633 qacEdelta1	100,00	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	acridine dye
3443	CARD_101811 marA	98,42	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
3443	CARD_100957 evgA	98,86	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
3443	CARD_101173 H-NS	99,10	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
3443	CARD_101251 emrR	98,31	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
3443	CARD_102045 gadW	100,00	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
3443	CARD_100488 AcrS	99,00	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
3443	CARD_100819 CRP	99,05	protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux	antibiotic molecule
3443	CARD_101716 bacA	98,05	protein(s) conferring antibiotic resistance via molecular bypass	bacitracin

Tabelle 8-3: Ergebnisse der RP-MLST sequenzierten Stämme der PEG-Studie 2016, analysiert mit dem CLC Genomics, „Type a known species (E. coli)“ and „Find resistance“ Tool.

GK Nr.	Gene	% Identity	Predicted phenotype	Compound class
4417	CARD_101811 marA	98,96	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4419	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,92	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	100,00	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4421	CARD_101666 TEM-1/X (N=26)	99,76	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	98,77	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,74	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4422	CARD_102861 TEM-X (N=26)	99,88	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,74	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4423	CARD_101811 marA	99,74	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4424	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,07	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,96	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4429	ARGA_400507 TEM-198	100,00	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
4434	CARD_101811 marA	98,44	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4439				
4440	CARD_101851 TEM-1/X (N=26)	99,88	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	98,72	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,96	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4442	CARD_100045 TEM-1/X (N=26)	99,88	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,83	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,48	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4446	CARD_101597 TEM-135	100,00	antibiotic inactivation enzyme	penicillin
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	100,00	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	100,00	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4458	CARD_102247 Escherichia coli acrA	98,78	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,70	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4459	CARD_102247 Escherichia coli acrA	98,90	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,96	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4461	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,91	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,74	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4465	CARD_101811 marA	98,18	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4471	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,73	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,48	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4475	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,07	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,96	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4477	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,64	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,74	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4479	CARD_102247 Escherichia coli acrA	100,00	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	100,00	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4481	CARD_102861 TEM-1/X (N=26)	99,88	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,75	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,48	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4482	CARD_100990 SHV-2/X (N=12)	99,87	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,70	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4494	CARD_102247 Escherichia coli acrA	98,46	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
4495	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,13	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,70	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4498	CARD_101811 marA	99,48	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4501	CARD_101851 TEM-1/X (N=26)	99,88	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,75	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,48	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4506	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,49	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,96	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4509	CARD_100197 TEM-1/X (N=26)	99,88	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,16	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,18	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
4512	CARD_101851 TEM-1/X (N=26)	99,88	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	98,49	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	99,74	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule
2840	CARD_102850 TEM-1/X (N=7)	99,76	antibiotic inactivation enzyme	antibiotic molecule
	CARD_102247 Escherichia coli acrA	99,07	efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance	antibiotic molecule
	CARD_101811 marA	98,44	protein modulating permeability to antibiotic	antibiotic molecule

8.5 Gefahrstoffverzeichnis

8.5.1 KMR-Stoffe

In Tabelle 8-4 sind die in der Arbeit verwendeten Stoffe mit kanzerogener, mutagener oder reproduktionstoxischer Wirkung (KMR-Stoffe) mit ihrer Wirkung (Kategorien 1A, 1B oder 2) aufgelistet. Die Angaben entstammen der GESTIS-Stoffdatenbank des Instituts für Arbeitsschutz (IFA), (GESTIS-Stoffdatenbank 2022) sowie den Sicherheitsdatenblättern der Hersteller.

Tabelle 8-4: Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen der Kategorien 1A, 1B und 2 mit CAS-Nummer, Stoffnamen mit IUPAC Bezeichnung, Einsatz und Menge sowie Kategorie.

CAS-Nr.	Stoffname (IUPAC)	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
10043-35-3	Borsäure (Orthoborsäure)	Bestandteil TBE-Puffer, 2,7g oder 0,2-1 L einer 44,5mM Lösung	R1B
56-75-7	Chloramphenicol (R-(R*,R*))-2,2-Dichlor-N-(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl)acetamid	Antibiotikum zur Selektion, Einsatz von 5 mg-1 g als Feststoff oder in ethanolischer Lösung	K2 R2
67-66-3	Chloroform (Trichlormethan)	Phenol/Chloroform Extraktion von Proteinen, zur Gewinnung von DNA, 0,4-20 mL	K2 R2
1239-45-8	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenantridiniumbromid)	Reagenz zur Färbung von DNA in Gelsystemen, 0,5-15 µL einer 1%igen Lösung	M2
75-12-7	Formamid	Sequenzierung, 30µL- 60µL	K2 R1B
61177-44-4	Lithium-Clavulanat	Antibiotikum, Einsatz von 1-100 mg als Feststoff oder wässrige Lösung	R1B
25389-94-0	Kanamycinsulfat	Antibiotikum, Einsatz von 5 mg-1 g als Feststoff oder wässrige Lösung	R1B
548-62-9	Kristallviolett ((4-(4,4'-Bis(dimethylamino)benzhydryliden)cyclohexa-2,5-dien-1-yliden)dimethylammoniumchlorid)	Reagenz für Gram-Färbung, 50-100 mL einer 0,25%igen Lösung	K2

108-95-2	Phenol (Benzenol)	Phenol/Chloroform Extraktion von Proteinen, zur Gewinnung von DNA, 400 µL-1,2mL	M2
----------	--------------------------	---	-----------

















8.5.2 Gefahrstoffe








In Tabelle 8-5 sind die verwendeten Gefahrstoffe nach GHS mit ihren Gefahrenpiktogrammen sowie ihren H (*Hazard Statements*) und P (*Precautionary Statements*) -Sätzen aufgeführt. Die Daten entstammen den aktuellen Sicherheitsdatenblättern der aufgeführten Stoffe.

Tabelle 8-5: Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe mit Gefahrenpiktogramm sowie H- und P-Sätzen.

Substanz	GHS-Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Amoxicillin-Trihydrat		H334 H410	P304+P340 P342+P311 P391
Ampicillin-Natrium		H317 H334	P261 P280 P342+P311
Borsäure		H360FD	P201 P202 P280 P308+P313 P405 P501
Cefixim		H317 H334	P261 P280 P284 P304+P340 P342+P311
Cefotaxim-Natrium		H317 H334	P261 P280 P342+P311
Cefoxitin-Natrium		H317	-
Chloramphenicol		H318 H351 H361fd	P202 P280 P305+P351+P338 P308 + P313 P405 P501
Essigsäure (Eisessig)		H226 H314 H334 H317	P210 P280 P301+P330+P331 P303+P361+P353 P305+P351+P338

Anhang

Ethanol	 	H225 H319	P210 P243 P280 P305+P351+P338 P403+P235
Ethidiumbromidlösung 1%		H341	P201 P280 P308+P313
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	 	H332 H373	P260 P314
Formamid (CEQ® DTCS Kit)		H351 H360FD H373	P201 P280 P308+P313 P314
Gentamicinsulfat		H317 H334	P261 P272 P280 P284 P302+P352 P333+P313
Isopropanol	 	H225 H319 H336	P233 P240 P241 P242 P305+P351+P338
Kanamycinsulfat		H360D	P201 P308+P313
Kristallviolett	   	H302 H318 H351 H410	P202 P273 P280 P301+P312 P305+P351+P338 P308+P313
Lithium-Clavulanat		H360D	P201 P208 P308+P313
Meropenem-Trihydrat		H315 H335 H319	P280 P312 P302+P352 P305+P351+P338 P304+P340

Methanol		H225 H301+H311+H331 H370	P210 P233 P270 P280 P303+P361+P353 P304+P340 P308+P311
Natriumdodecylsulfat (SDS)		H228 H302+H332 H315 H318 H335 H412	P210 P273 P280 P301+P312 P302+P352 P304+P340 P305+P351+P338
Natriumhydroxid		H290 H314	P280 P233 P301+P330+P331 P303+P361+P353 P305+P351+P338 P308+P310
(ROTI®)-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v)		H301+H331 H312 H314 H341 H351 H361d H372 H411	P201 P270 P280 P304+P340 P305+P351+P338 P308+P313
Salzsäure konzentriert		H290 H314 H335	P234 P261 P271 P280 P303 + P361 + P353 P305 + P351 + P338
Tetracyclin-HCl		H315 H319 H335 H361fd H410	P202 P261 P273 P302+P352 P305 + P351 + P338 P308+P313
Xylencyanol		H319	P264 P280 P305+P351+P338 P337+P313

Die in der Tabelle verwendeten Gefahren-Piktogramme nach GHS entstammen www.unece.org, abgerufen am 19.7.2022 (GHS pictograms | UNECE 2023) und www.reach-compliance.ch, abgerufen am 19.7.2022 (Giacobbo 2022).

9 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Professor Dr. Peter Heisig für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Ich danke ihm für die Betreuung und wissenschaftliche Diskussion sowie für die Möglichkeit Forschungsdaten auf Tagungen und Kongressen zu präsentieren. Insbesondere danke ich ihm auch für die ausgezeichnete fachliche und persönliche Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Sebastian Wicha bedanke ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Anke Heisig danke ich für ihre wissenschaftliche Expertise, insbesondere auf dem Gebiet der Sequenzierung, die sie mir hat zukommen lassen. Außerdem bedanke ich mich für den konstruktiven fachlichen Diskurs und diverse Denkanstöße, die diese Arbeit positiv beeinflusst haben sowie auch für ihren steten Zuspruch.

Gudrun Melles, Antje Schnasse und Philipp Groth danke ich sehr für die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Labor sowie praktische Hilfe bei meinen Projekten und ganz besonders für das freundschaftliche und kollegiale Verhältnis, welches ich sehr schätze.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Heisig möchte ich ebenfalls für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit und für die gute Atmosphäre über die Grenzen des Labors hinaus danken. Dieser Dank gilt insbesondere Nadine Hilsberg-Emrich, Katja Carstens, Hans-Peter Sfeir, Greta Gulbins, Philipp Hebel, Deike Rönfeldt, Alina Schwarz, Anna Podolska und Marie Vogel-Heinze, die meinen Laboralltag außerordentlich bereichert haben und die ich in bester Erinnerung behalte. Im Weiteren danke ich all denjenigen, die im Rahmen von Wahlpflicht-Praktika oder als Teil der labortechnischen Ausbildung an meinen Projekten mitgearbeitet haben für ihr Interesse und ihren Einsatz. Bei Sabine Badziung bedanke ich mich für ihre kollegiale und freundliche Art.

Bei Prof. Dr. Elisabeth Stahl-Biskup bedanke ich mich für Ansporn und Inspiration.

Ich bedanke mich ebenso bei den Wissenschaftlern, die Bakterienstämme für diese Arbeit bereitgestellt haben, darunter sind insbesondere Joanne Mollinger (ehemals Platell) von der University of Queensland, Dr. Yvonne Pfeifer vom Robert-Koch-Institut aus Wernigerode, Dr. Michael Kresken von der Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie und Rosy Reynolds von der Universität Bristol sowie der British Society for Antimicrobial Chemotherapy.

Darüber hinaus möchte ich mich für spannende Kooperationen bei Mathias Schacht und Prof. Nina Schützenmeister, sowie auch bei Natalie Wagner, Franziska Klitsche, Prof. Patrick Théato und Prof. Wolfgang Maison bedanken.

Bei Dr. Alina Schwarz bedanke ich mich für die Übernahme des Lektorats.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie. Insbesondere danke ich meiner Mutter für ihre immerwährende Unterstützung und Motivation.

10 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 04.08.2024

Phyllis Zimmermann