

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,

Virologie und Hygiene

Direktor: Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher

**Molekulargenetische Mechanismen der Carbapenemresistenz bei  
klinischen Isolaten von *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertation zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin im  
Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Veronika Goritzka  
aus Itzehoe

Hamburg 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 28.04.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der Vorsitzender: Prof. Dr. H. Rohde

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. B. Fleischer

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	1
1.1 Biologie von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als Krankheitserreger.....	1
1.3 Antibiotikaresistenz bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	2
1.4 Molekulare Grundlagen zur erworbenen Antibiotikaresistenz bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
1.4.1 Efflux-Systeme.....	4
1.4.1.1 Das <i>mexR</i> -Gen.....	7
1.4.1.2 Das <i>nalC</i> -Gen .....	8
1.4.1.3 Das <i>nalD</i> -Gen.....	8
1.5 Membranporine.....	9
1.6 Die AmpC- $\beta$ -Laktamase .....	9
1.7 Erworbene Carbapenemasen .....	11
1.8 Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel.....	15
2.1.2 Laborgeräte.....	15
2.1.3 Medien.....	16
2.1.4 Lösungen.....	16
2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide.....	17
2.1.5.1 Klinische <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolate.....	17
2.1.5.2 Sonden und Primer.....	17
2.1.5.3 Primer zum Nachweis von Carbapenemasen.....	18
2.1.5.4 Datenbanken und Programme.....	19

2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	19
2.2.1.1 Konservierung und Kultivierung der Bakterien.....	19
2.2.1.2 Resistenzbestimmung mittels Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	20
2.2.1.3 EDTA-Test.....	21
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.2.2.1 Extraktion der <i>Pseudomonaden</i> -DNA.....	21
2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
2.2.2.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	23
2.2.2.4 Pulsfeldgelelektrophorese.....	23
2.2.2.5 DNA-Sequenzierung.....	25
2.2.2.6 Ethanol-fällung.....	26
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Probencharakteristika und MHK-Werte.....	27
3.2 Nachweis von Carbapenemasen.....	31
3.3 EDTA-Test.....	32
3.4 Pulsfeldgelelektrophorese.....	32
3.5 Sequenzauswertung.....	33
3.5.1 <i>mexR</i> -Sequenzen.....	33
3.5.2 <i>nalC</i> -Sequenzen.....	34
3.5.3 <i>nalD</i> -Sequenzen.....	36
3.5.4 <i>ampC</i> -Sequenzen .....	36
3.5.5 <i>oprD</i> -Sequenzen.....	41
3.5.6 Übersicht zur Sequenzauswertung.....	43
4 Diskussion.....	50
4.1 Auswertung und Beurteilung der Antibiogramme .....	50
4.2 Nachweis von Carbapenemasen .....	50
4.3 Imipenemresistenz.....	53
4.3.1 <i>oprD</i> -Mutationen .....	53
4.3.2 <i>ampC</i> -Mutationen.....	57

4.4 Meropenemresistenz.....	61
4.4.1 Auswirkungen der <i>mexR</i> -Mutationen.....	61
4.4.2 Auswirkungen der <i>nalC</i> -Mutationen.....	63
4.4.3 Auswirkungen der <i>nalD</i> -Mutationen.....	64
4.5 Meropenemsensibilität.....	66
5 Zusammenfassung.....	73
6 Literaturverzeichnis.....	75
7 Publikationsverzeichnis.....	88
8 Danksagung .....	88
9 Eidesstattliche Erklärung.....	89

**Abkürzungsverzeichnis**

1bp-Deletion	1 Basenpaar-Deletion (engl. 1 basepair deletion)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mg	Milligramm
ÜN	über Nacht
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase-chain-reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
ESAC	extended-spectrum AmpC-β-Laktamase
PBP4	Penicillin-bindendes Protein 4 (engl. Penicillin-binding protein 4)
ESBL	extended-spectrum-β-Laktamase
MHK	Minimale Hemmkonzentration (engl. MIC minimal inhibitor concentration)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
IS	Insertionssequenz
PAO1	Wildtyp <i>P. aeruginosa</i> (Accession number: NC_002516)
p.	Protein
n.	Nukleotid
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
MBL	Metallo-β-Laktamase
VIM	Verona Integron-codierte Metallo-β-Laktamase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
SME	<i>Serratia marcescens</i> Carbapenemase
IMI	Imipenem-hydrolysierende-β-Laktamase
NMC	Nicht- Metalloenzym-Carbapenemase
GES	Guiana-extended-spectrum-β-Laktamase
OXA	Oxacillin-hydrolysierende-β-Laktamase
IMP	Imipenemase
SPM	São-Paulo-Metallo-β-Laktamase
GIM	German-Imipenemase
PDC	<i>Pseudomonas</i> -derived-cephalosporinase -1

## Abkürzungsverzeichnis

EX	Multidrug Efflux
OMF	äußerer Membran Faktor (engl. outer membrane factor)
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (engl. chronic obstructive pulmonary disease)
CF	Cystische Fibrose
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	European Centre for Disease prevention and Control
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NIDEP	Nosokomiale Infektionen in Deutschland, Erfassung und Prävention
GENARS	German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
RND	Resistance Nodulation Division
A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
B	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
Z	Glutamin oder Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
J	Isoleucin oder Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin

## Abkürzungsverzeichnis

S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin
U	Selenocystein
O	Pyrrolysin



# 1 Einleitung

## 1.1 Biologie von *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ist ein gram-negatives Stäbchenbakterium aus der Gruppe der Proteobakterien (Vasil, 1986). Das Stäbchen ist beweglich und monotrich begeißelt. Auffällig sind die Pigmentbildung (Pyozyanin, Pyoverdin, Pyomelanin und Pyorubin), sowie die Anspruchslosigkeit und Anpassungsfähigkeit an seinen Lebensraum (Vasil, 1986).

Zwar ist *P. aeruginosa* ein ubiquitär verbreiteter Keim, er bevorzugt jedoch feuchte Lebensräume. Im klinischen Umfeld ist er u.a. oft in Duschen und Wasserhähnen (Bert *et al.*, 1998), Dialysegeräten (Lo *et al.*, 1998) und Schwimmbecken (Tate *et al.*, 2003) nachweisbar.

*P. aeruginosa* kann schnell zu einem bedeutenden Problem für die Krankenhaushygiene werden (Hancock und Brinkman, 2002). Resistenzen gegen Desinfektionsmittel erschweren die Bekämpfung des Bakteriums.

## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa* als Krankheitserreger

*P. aeruginosa* ist ein fakultativ pathogener Keim. Infektionen bilden sich insbesondere bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem aus. Häufig betroffen sind Patienten auf onkologischen Stationen oder Patienten mit Cystischer Fibrose (Gallant *et al.*, 2000). Als Krankheitsbilder treten beispielsweise Pneumonien, Sepsis, Weichteilinfektionen oder Endokarditiden auf. Besonders hohe Sterberaten sind bei Patienten mit einer von *Pseudomonaden* ausgelösten Sepsis zu beobachten. Auch der Befall von Verbrennungswunden birgt eine große Gefahr für die Patienten. Die meisten dieser Infektionen werden nosokomial, d.h. im Krankenhaus erworben (Garau und Gomez, 2003).

In etwa 10% der nosokomialen Infektionen ist *P. aeruginosa* als Erreger zu finden (Suárez *et al.*, 2009). In einer Studie wurde gezeigt, dass im Krankenhaus 18,1% der Pneumonien, 3,4% der Bakteriämien, 9,5% der allgemeinen postoperativen Infektionen und 16,3% der Harnwegsinfektionen im Jahr 2003 durch *P. aeruginosa* ausgelöst werden (Gaynes *et al.*, 2005). Wie gefährlich der Keim ist, verdeutlicht eine Mortalität von 36% bei einer Bakteriämie mit einem carbapenemsensiblen

Stamm bzw. 46% bei einer Infektion mit einem carbapenemresistenten Stamm (Suárez *et al.* 2010). Über eine steigende Mortalität im Rahmen einer Carbapenemresistenz berichten auch Liu *et al.* 2015.

Die Therapie dieser Krankheiten gestaltet sich unter Umständen sehr schwierig, da *P. aeruginosa* ein breites Spektrum an natürlichen Resistenzen gegen diverse Antibiotika in sich trägt (Hancock und Speert, 2000). Zudem ist der Keim sehr anpassungsfähig und kann unter Antibiotikatherapie weitere Resistenzen ausbilden (Hancock und Speert, 2000).

Eine transiente Besiedlung hingegen ist für den Menschen harmlos. Nur selten werden ambulant erworbene Infektionen durch *P. aeruginosa* ausgelöst; der Keim spielt beispielsweise bei ambulant erworbenen Pneumonien so gut wie keine Rolle (Höffken *et al.*, 2009).

### **1.3 Antibiotikaresistenz bei *Pseudomonas aeruginosa***

Natürlicherweise ist *P. aeruginosa* resistent gegen eine Reihe verschiedener Antibiotika, z.B. Aminopenicilline, Cephalosporine der Gruppen 1, 2 und 3a (Cefazolin, Cefuroxim, Cefotaxim) sowie Tetrazykline und Makrolide (Li *et al.*, 1995). So sind von den verfügbaren  $\beta$ -Laktam-Antibiotika nur die Acylureidopenicilline, sowie 3b-Cephalosporine (Ceftazidim), Cephalosporine der 4. Generation (Cefepim) und Carbapeneme der Gruppe 1 gegen *P. aeruginosa* wirksam. Zudem zeigen Aminoglykoside sowie die Chinolone Ciprofloxacin und Levofloxacin, eine gute Wirksamkeit bei Infektionen mit diesem Keim (Hancock und Speert, 2000).

Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika entstehen unter anderem durch das Zusammenwirken der folgenden Faktoren: De-Repression der AmpC- $\beta$ -Laktamase, niedrige Membranpermeabilität durch Verlust von Membranporen (Porine), hochregulierte Efflux-Systeme und den über Plasmide stattfindenden Erwerb von Enzymen zum Abbau von Antibiotika. Unter Antibiotikatherapie ist *P. aeruginosa* in der Lage, weitere Resistenzen auszubilden (Lynch *et al.*, 1987, Lister *et al.*, 2009).

Das GENARS (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance) und die EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) dokumentieren auf nationaler und europäischer Ebene die Entwicklung der Antibiotikaresistenz bei Bakterien. Die in Tabelle 1 angegebenen Zahlen beziehen sich auf die

durchschnittlichen Resistenzraten bei *P. aeruginosa* im Jahr 2012 in Deutschland und Europa (ECDC, 2013). Hier wird deutlich, dass die deutschen Resistenzraten bei *P. aeruginosa* im europäischen Vergleich noch deutlich niedriger sind. Abgesehen davon, sind die aufgeführten Zahlen im klinischen Alltag problematisch und verdeutlichen die Schwierigkeit einer adäquaten Antibiotikatherapie.

**Tabelle 1:** Durchschnittliche Antibiotikaresistenzraten bei *P. aeruginosa* im Vergleich Deutschland und Europa 2012. Quelle: ECDC, 2013.

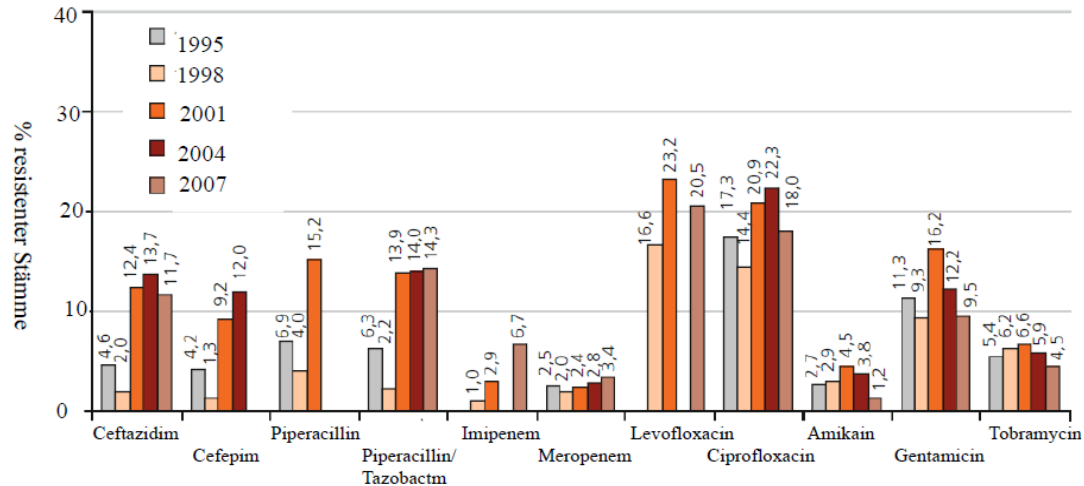
Antibiotikum	Europa	Deutschland
Piperacillin ±Tazobactam	19,8 %	15,5 %
Ceftazidim	13,5 %	9,6 %
Fluorchinolone	21,0 %	19,6 %
Aminoglykoside	18,4 %	10,6 %
Carbapeneme	17,1 %	10,7 %
Kombinierte Resistenz*	13,8 %	8,4 %

\*Kombinierte Resistenz bedeutet, resistent gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen.

Die Ergebnisse der PEG-Resistenzstudie 2010 (GENARS 2010) sind in Abbildung 1 dargestellt. Sie zeigt die Resistenzentwicklung von 1995 bis 2007. Entnommen ist die Abbildung einer Veröffentlichung (GERMAP 2010) vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und Infektiologie Freiburg in der über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland berichtet wird. Deutlich wird hier, dass häufig eingesetzte Antibiotika zur kalkulierten Therapie gegen Infektionen durch *P. aeruginosa* in den letzten Jahren immer häufiger unwirksam waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das immer häufigere Auftreten von Multiresistenzen die Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Antibiotika immer weiter einschränkt und es somit häufiger zu Therapieversagen kommt (Nikaido und Pagès 2011). Eine sogenannte Multiresistenz oder kombinierte Resistenz liegt dann vor, wenn ein Keim gegen mehr als 3 Antibiotikaklassen resistent ist. Zu diesen Klassen gehören Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Chinolone (KRINKO, Epidemiologisches Bulletin 09/2011). Für eine Studie von Tam *et al.*

wurden in Texas zwischen 2005 und 2007 *Pseudomonaden* aus Blutkulturen isoliert, von diesen Proben waren 14% multiresistent (Tam *et al.*, 2010).



**Abbildung 1:** Prozentuale Anteile resistenter Stämme von *P. aeruginosa*. Quelle: nach GENARS 2010.

## 1.4 Molekulare Grundlagen zur erworbenen Antibiotikaresistenz bei *Pseudomonas aeruginosa*

Zu den molekularen Mechanismen erworbener Resistenzen gehören hochregulierbare Efflux-Systeme, runterregulierbare und mutierte Membranporine, sowie de-reprimierte AmpC- $\beta$ -Laktamasen. Ausgelöst werden diese Veränderungen der Genexpressionen durch chromosomale Mutationen (Lister *et al.*, 2009).

Außerdem können mobile Genelemente, wie z.B. Plasmide und Transposons, Resistenzgene tragen. Diese können zwischen Bakterien ausgetauscht werden (Lister *et al.*, 2009). So sind beispielsweise die Metallo- $\beta$ -Laktamasen (MBL) plasmidcodiert. Im Folgenden werden lediglich die in dieser Arbeit untersuchten Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene erklärt. All diese Mechanismen sind für Carbapenemresistenz verantwortlich.

### 1.4.1 Efflux-Systeme

*P. aeruginosa* hat verschiedene Efflux-Systeme (Poole, 2004). Diese Pumpen befinden sich in der Zellmembran und schleusen nicht nur Antibiotika, sondern u.a.

auch Biozide, Farbstoffe und Lösungsmittel aus den Keimen (Sobel *et al.*, 2005b). Dieser Transport verhindert eine Akkumulation von Medikamenten und anderen Giftstoffen in der Zelle. Tabelle 2 verdeutlicht die Einteilung der Efflux-Systeme: Zunächst werden sie nach ihren Energiequellen und dem Transportmechanismus klassifiziert. Danach folgt die Einteilung in Superfamilien und Familien.

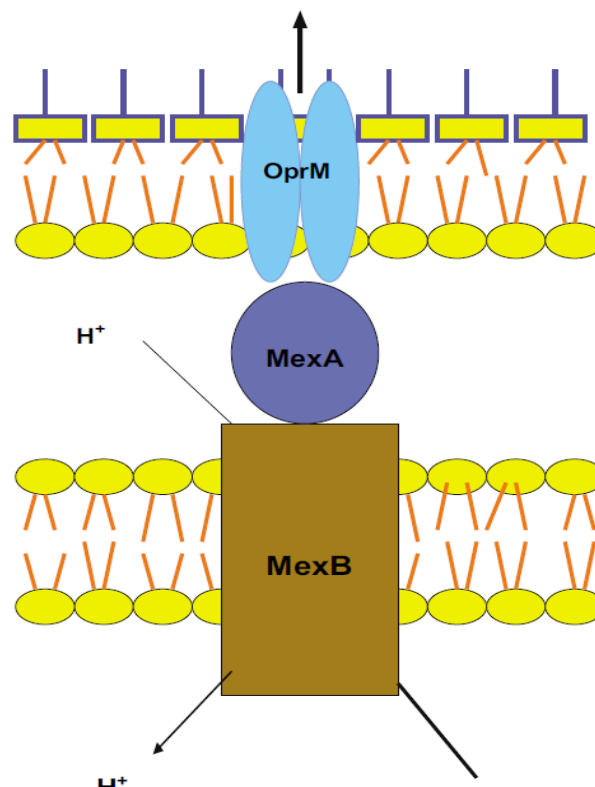
**Tabelle 2:** Einteilung der Efflux-Systeme Quelle: van Bambeke *et al.*, 2000; es sind nur die bei *P. aeruginosa* vorkommenden Familien der Efflux-Pumpen aufgeführt.

Superfamilie	Familie	Transportmechanismus
ABC (ATP-Bindekassette)		Primär aktive Transporter
Small Multidrug Resistance		Sekundär aktive Transporter
Multidrug Endosomal Transporter		Sekundär aktive Transporter
Resistance Nodulation Division (RND)	Mex bei <i>P. aeruginosa</i>	Sekundär aktive Transporter
Major Facilitator Superfamily	TetC bei <i>P. aeruginosa</i>	Sekundär aktive Transporter
Major Facilitator Superfamily	CmlA bei <i>P. aeruginosa</i>	Sekundär aktive Transporter
Multi-Antimicrobial-Resistance		Sekundär aktive Transporter

Jedes dieser Systeme verfügt über spezifische Regulatorgene (Nikaido, H., 1998). So wird MexAB-OprM (RND-Familie) beispielsweise durch *mexR* reguliert (Poole *et al.*, 1996). Eine Überexpression dieser Pumpen ist vermutlich nicht nur im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenz wichtig, sondern könnte auch physiologische Bedeutung haben. So gibt es Mutanten, die auch ohne Kontakt zu Antibiotika das Efflux-System hochregulieren (Join-Lambert *et al.*, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass diese hochregulierten Efflux-Systeme auch dem Schutz des Bakteriums vor schädlichen Umwelteinflüssen, z.B. dem Kontakt mit Chlorphenolen, dienen. Diese Desinfektionsmittel werden somit unwirksam (Ghosh *et al.*, 2011).

Als wichtigstes Efflux-System für die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen nutzt *P. aeruginosa* die MexAB-OprM-Pumpe (Li *et al.*, 1995). Diese ist in der Lage, u.a. Fluorchinolone, Tetracykline, Chloramphenicol,  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und  $\beta$ -Laktaminhibitoren, Makrolide, Novobiocin, Trimethoprim und Sulfonamide aus der

Zelle zu schleusen. Zu den ausschleusbaren  $\beta$ -Laktamen gehören Carboxypenicilline, extended-spectrum-Cephalosporine sowie die Carbapeneme Meropenem und Panipenem (Lister *et al.*, 2009, El Amin *et al.*, 2005). In einer Studie von Köhler *et al.* aus dem Jahre 1999 wurde gezeigt, dass bei Überexpression von MexAB-OprM der MHK-Wert für Meropenem von  $4\mu\text{g/ml}$  (Wildtyp) auf  $16\mu\text{g/ml}$  ansteigt. Der MHK-Wert für Imipenem bleibt bei einer Überexpression der MexAB-OprM-Pumpe unverändert (Köhler *et al.*, 1998, Livermore *et al.*, 2001).



**Abbildung 2:** Schematisches Modell der RND-Pumpe MexAB-OprM Quelle: Askoura *et al.*, 2011.

Der Aufbau dieser Efflux-Pumpe ist in Abbildung 2 dargestellt. MexB durchzieht die innere Membran und dient als eigentlicher Transporter. Im periplasmatischen Raum befindet sich als Verbindungsstück MexA. In der äußeren Membran schleust OprM die schädliche Substanz aus dem periplasmatischen Raum ins Cytosol und verhindert zudem die Wiederaufnahme des Stoffes in die Zelle (Askoura *et al.*, 2011).

Bisher sind die drei Gene *nalC*, *nalD* und *mexR* als Regulatoren für MexAB-OprM-

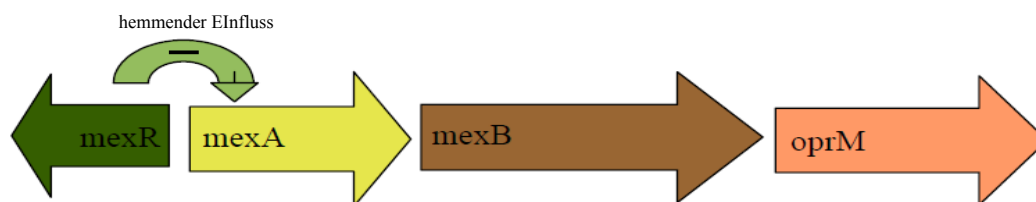
Effluxpumpe bekannt (Daigle *et al.*, 2007). Ihr jeweiliger Einfluss auf die Überproduktion der Efflux-Pumpe wird im Folgenden beschrieben.

#### 1.4.1.1 Das *mexR*-Gen

Das *mexR*-Gen befindet sich im bakteriellen Genom stromaufwärts von *mexAB-oprM*, wird aber unabhängig transkribiert. Als Repressor der MarR-Familie reguliert MexR die *mexAB-oprM*-Expression (Poole *et al.*, 1996).

Ist das *mexR*-Gen mutiert, verliert es seinen hemmenden Einfluss und es kommt zu einer circa zweifach erhöhten Expression von *mexAB-oprM* (Poole *et al.*, 1996). Diese Isolate werden als nalB-Mutanten bezeichnet. Solche Mutationen bewirken z.B. eine Verschiebung des Leserahmens oft mit vorzeitigem Stopcodon, die Produktion eines instabilen Proteins, oder sie behindern die Dimerisierung des Proteins (Adewoye *et al.*, 2002). Die MHK für Meropenem steigt im Vergleich zum Wildtyp bei nalB-Mutanten laut Riera *et al.* (2011) von 0,38mg/l auf 2mg/l.

MexR kann auch post-translational reguliert werden. Durch die Oxidation von zwei Cysteinresten ändert sich die Konformation des Regulators, eine Anlagerung an die DNA wird unmöglich. In der Folge wird MexR zu einem unfunktionellen Repressor und die Expression von *mexAB-oprM* steigt (Chen *et al.*, 2008). Die Abbildung 3 verdeutlicht die Lage von *mexR* stromaufwärts von *mexAB-oprM*. Dargestellt ist außerdem der Einfluss von *mexR* auf die Expression der Efflux-Pumpe.



Regulatorgen

Membranfusionsprotein-codierendes Gen

RND-Transporter-codierendes Gen

Äußeres Membranprotein-codierendes Gen

**Abbildung 3:** Schema zur Regulation von *mexAB-oprM* durch *mexR*, modifiziert nach Lister *et al.*, 2009

#### 1.4.1.2 Das *nalC*-Gen

Das *nalC*-Gen (PA3721) codiert für einen TetR/AcrR-family-Repressor. Dieser Repressor reguliert ein anliegendes Zwei-Gen-Operon (PA3720-PA3719). Beim Verlust von *nalC* oder einer Mutation, erhöht sich die Expression von PA3719 (ArmR) (Cao *et al.*, 2004). ArmR ist ein Anti-Repressor für *mexR* (Daigle *et al.*, 2007). Bildet MexR einen Komplex mit ArmR, ist es nicht mehr in der Lage, als Repressor auf das *mexAB-oprM*-Gen zu wirken (Wilke *et al.*, 2008). Dies setzt die oben beschriebene Signalkette in Gang: MexR verliert seinen hemmenden Einfluss und *mexAB-oprM* wird überexprimiert.

Diese De-Repression von ArmR (*mexR*-Anti-Repressor) wird z.B. durch Chlorphenole (Desinfektionsmittel) ausgelöst (Ghosh *et al.*, 2011). Trotz eines intakten *mexR*-Gens kommt es bei diesen so genannten *nalC*-Mutanten durch die De-Repression also zu einer Überproduktion von MexAB-OprM (Srikumar *et al.*, 2000, Cao *et al.*, 2004).

Interessanterweise wird in Stämmen, die eine Mutation im *nalC*-Gen aufweisen, MexR verstärkt exprimiert. Sobel vermutet, dass dies eine Antwort auf eine erhöhte PA3720-PA3719-Produktion ist (Sobel *et al.*, 2005b).

#### 1.4.1.3 Das *nalD*-Gen

Wie NalC ist auch NalD (PA3574) ein Repressor der TetR/AcrR-Familie. In einer Studie war kein Einfluss auf *mexR* feststellbar (Sobel *et al.*, 2005b). Das legt die Vermutung nahe, dass es neben dem oben beschriebenen PA3719-Pfad noch einen weiteren Weg zur Regulierung der *mexAB-oprM*-Expression gibt. Morita *et al.* (2006) konnten zeigen, dass NalD als Repressor an einen zweiten Promotor stromaufwärts von *mexAB-oprM* bindet und direkt die Expression der Effluxpumpe unterdrückt. Somit ist nach Mutationen im *nalD*-Gen eine gesteigerte Antibiotikaresistenz durch Derepression von *mexAB-oprM* erklärbar.

Stämme, die ausschließlich Mutationen in *nalD* trugen, zeigten bei Sobel *et al.* eine verstärkte Antibiotikaresistenz und im Vergleich zum Wildtyp eine um das 1,69-fache erhöhte Expression der Effluxpumpe MexAB-OprM. Bei einer Probe, bei der *nalD* gar nicht amplifiziert werden konnte, lag die Expression von MexAB-OprM sogar beim 2,41-fachen im Vergleich zum Wildtyp.



## 1.5 Membranporine

Die äußere Zellmembran bei gram-negativen Bakterien stellt eine semipermeable Barriere zur Umwelt dar (Lister *et al.*, 2009). Durchlässig wird die Membran für hydrophile Substanzen durch wassergefüllte Kanäle, so genannte Porine (Tamber *et al.*, 2005). So gelangen Nährstoffe wie Zucker, Aminosäuren, Phosphate, divalente Kationen und Siderophore (Hancock und Brinkman, 2002) in die Zellen. Diese Art der Nahrungsaufnahme ist wichtig für das Überleben der Zellen. Jedoch gelangen über denselben Weg auch Antibiotika wie  $\beta$ -Laktame, Aminoglykoside, Tetrazykline und einige Fluorchinolone (Nikaido, 1989) in die Zelle. Somit kann ein Verlust bzw. die verminderte Expression dieser Porine zu einer erhöhten Resistenz gegen Antibiotika führen (Köhler *et al.*, 1999).

Für die Carbapenemresistenz ist das Porin OprD von Bedeutung. OprD ist ein substratspezifisches Porin für basische Aminosäuren oder kleine Peptide, in denen diese Aminosäuren enthalten sind. Außerdem gelangt Imipenem durch diese Poren in die Zellen (Trias *et al.*, 1990). Eine fehlende OprD-Expression führt somit zu einer „High-level“ Imipenemresistenz mit MHK-Werten  $> 32\text{mg/l}$  (Riera *et al.*, 2011).

Andere Antibiotika sind von einem Verlust des Porins nicht oder nur eingeschränkt betroffen, da sie andere Wege nutzen, um in das Zellinnere zu gelangen. So können beispielsweise Meropenem und Aminoglykoside durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran diffundieren (Delcour 2010, Franceschini, 2002). Livermore und Yang berichteten 1989 jedoch im Zusammenhang mit einem bei OprD-Verlust ebenfalls über einen Anstieg der Meropenem-MHK von  $0.25\text{mg/l}$  auf  $1\text{-}2\text{mg/l}$ . Somit scheint auch Meropenem das Porin OprD wenigstens teilweise als Eintrittspforte in die Zelle zu nutzen.

## 1.6 Die AmpC- $\beta$ -Laktamase

Das Enzym AmpC ist eine chromosomal codierte Cephalosporinase, die in der Lage ist, verschiedene  $\beta$ -Laktam-Antibiotika abzubauen. Sie befindet sich im periplasmatischen Raum. Dort fängt das Enzym die eingetretenen Antibiotika ab und hydrolysiert sie. Zu den Substrat-Antibiotika gehören Amino- und Ureidopenicilline, Cephamecin, Oxyiminocephalosporine (Ceftazidim, Cefotaxim oder Ceftriaxon), sowie Monobactame (Bush *et al.*, 1995), ausgenommen sind Carbapeneme

(Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Das Besondere dieser  $\beta$ -Laktamase ist, dass sie nicht durch Clavulansäure gehemmt, sondern induziert wird (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Die AmpC-Cephalosporinase wurde nicht nur bei *P. aeruginosa*, sondern auch bei verschiedenen Enterobacteriaceae gefunden (Sanders *et al.*, 1988).

Der Resistenzphänotyp wird jedoch nur realisiert, wenn die Expression der AmpC induziert wird oder dereprimiert wurde. Sowohl durch Induktion nach der Gabe von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Lister *et al.*, 2009), als auch durch eine De-Repression wird eine Signalkette, die zur Überproduktion von AmpC führt, gestartet.

Bei der Induktion gelangt das verabreichte Antibiotikum in die Zelle und bindet an die Penicillinbindenden-Proteine (PBP), dadurch wird die Zellwandsynthese gestört und es kommt zu einem vermehrten Anfall von Zellwandbausteinen (1,6-Anhydromuropeptide). Diese Bausteine gelangen in das Zellinnere und werden von AmpD recycelt. Durch das  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum steigt die Substratmenge für AmpD. Die anfallende Substratmenge kann nicht schnell genug verarbeitet werden. Nun gelangen die Bausteine in Kontakt mit AmpR. Durch diesen Kontakt verändert AmpR seine Struktur und wird zum Aktivator für die *ampC*-Expression (Lister *et al.*, 2009). Die Induktion (Bagge *et al.*, 2002) ist nach Absetzen des Antibiotikums reversibel (Lindberg *et al.*, 1988). Unterschieden werden die Antibiotika in starke und schwache Induktoren mit Stabilität oder Labilität gegenüber der  $\beta$ -Laktamase (Livermore 1995). Zu den starken, labilen Induktoren gehören z.B. Amoxicillin und Ampicillin. Zu den schwachen und gleichzeitig labilen Induktoren gehören Piperacillin und die Cephalosporine der 3. Generation (Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon). Starke, stabile Induktoren der  $\beta$ -Laktamase sind die Carbapeneme.

Ein weiterer Mechanismus für eine gesteigerte AmpC-Expression ist die oben aufgeführte De-Repression. Hierbei kommt es durch Mutationen, zum Beispiel in Struktur- oder Regulatorgenen, zu einer fehlenden Funktionalität von AmpD (Juan *et al.*, 2005). Die anfallenden 1,6-Anhydromuropeptide werden nicht mehr recycelt und binden an AmpR. Dadurch kommt es zu einer konstitutiven Überexpression von AmpC (Lister *et al.*, 2009), dies wiederum führt zu einer Resistenz gegen labile Substrate wie Aminopenicilline; Ureidopenicilline und Cephalosporine (unabhängig von ihren Induktionseigenschaften). Der Vorgang der De-Repression ist Antibiotika-unabhängig (Bagge *et al.*, 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur Veränderung der AmpC-Expression erfolgt durch Mutationen im Penicillin-bindenden Protein 4 (PBP4). Hierdurch fallen ebenfalls vermehrt Zellwandbausteine an. Es kommt ebenfalls zu einer De-Repression von AmpC (Moya *et al.*, 2009).

In Zusammenhang mit einer gesteigerten Imipenemresistenz wird auch eine expanded-spectrum-AmpC- $\beta$ -Laktamase (ESAC) diskutiert, die durch einen Aminosäureaustausch an Position 105 von Threonin zu Alanin entsteht (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Diese soll den *Pseudomonaden* zusätzlich eine verminderte Carbapenemempfindlichkeit oder sogar Carbapenemresistenz verleihen - insbesondere gegen Imipenem mit einer Steigerung der MHK-Wert um das Vierfache (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Eine Besonderheit dieser ESAC ist neben der Wirksamkeit gegen Carbapeneme auch, dass sie durch Clavulansäure gehemmt werden kann.

## 1.7 Erworbene Carbapenemasen

Neben den oben beschriebenen intrinsischen Resistenzmechanismen, kann eine Resistenz gegen Carbapeneme auch durch erworbene  $\beta$ -Laktamasen, die sogenannten Carbapenemasen entstehen. Die Gene für diese Carbapenemasen sind meist auf Plasmiden lokalisiert. In der Klassifikation der  $\beta$ -Laktamasen nach Ambler (siehe Tabelle 3), finden sich Carbapenemasen in den Klassen A, B und D.

**Tabelle 3:** Einteilung der  $\beta$ -Laktamasen. Quelle: nach Nordmann und Poirel, 2002.

Klasse	Biochemie	Beispiel
A	Serin- $\beta$ -Laktamasen	KPC, GES, SME, IMI, Nmc-A, SFC, BIC
B	Metallo- $\beta$ -Laktamasen	Carbapenemasen (VIM, IMP, NDM, KHM, GIM)
C	Serin- $\beta$ -Laktamasen	Cephalosporinasen (AmpC)
D	Serin- $\beta$ -Laktamasen	Oxacillinasen (OXA-48)

Zu den Carbapenemasen der Klasse A gehören KPC, SME, IMI, NMC und GES. Diese Enzyme werden vor allem bei *Enterobacteriaceae* gefunden, selten bei *P. aeruginosa*. Klasse-A-Carbapenemasen verleihen diesen Keimen Resistenz gegen Penicilline, Aztreonam, Carbapeneme und Cephalosporine. Clavulansäure und Tazobactam können diese inhibieren (Patel und Bonomo, 2013).

Die Klasse B umfasst alle Metallo- $\beta$ -Laktamasen (MBL). Dazu gehören IMP, SPM, GIM, NDM und VIM. Diese spielen eine wichtige Rolle bei *P. aeruginosa*. Sie hydrolysieren Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme jedoch keine Monobactame (Livermore *et al.*, 2000). Klasse B-Carbapenemasen tragen im aktiven Zentrum ein Zinkion, welches für die Hydrolyse der Carbapeneme essentiell ist (Nordmann und Poirel, 2002). Die Aktivität des Enzyms kann mit dem Chelatbildner EDTA gehemmt werden.

Die IMP-Carbapenemase wurde erstmals 1991 in Japan beschrieben (Osano *et al.*, 1994). In den folgenden 20 Jahren wurden immer häufiger Funde aus aller Welt bekannt (Pagani *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2009, Gomes Franco *et al.*, 2010, Borgianni *et al.*, 2011). Trotz der hohen Aktivität gegen Carbapeneme gibt es auch IMP-positive Stämme, die noch für Carbapeneme empfindlich sind (Senda *et al.*, 1996). Aktuell wurden insgesamt 42 IMP-Varianten meist aus Asien bei *P. aeruginosa* beschrieben (Patel und Bonomo, 2013).

Eine weitere Enzymgruppe der Klasse B bilden die VIM (Verona Integron-codierte Metallo- $\beta$ -Laktamase). Das erste dieser Enzyme, VIM-1, beschrieb Lauretti 1999 in Verona (Lauretti *et al.*, 1999). VIM-Enzyme sind noch weiter verbreitet als IMP und es sind bereits 37-Subtypen bekannt (Patel und Bonomo, 2013). Kurz nach der Erstbeschreibung in Italien wurden weltweit Funde gemeldet, z.B. aus Griechenland (Tsakris *et al.*, 2000), aus Frankreich (Poirel *et al.*, 2000) aus Taiwan (Yan *et al.*, 2001) und aus den USA (Li *et al.*, 2008). Die VIM-2 hat eine stärkere Aktivität gegen Imipenem als gegen Meropenem (Poirel *et al.*, 2000).

Auch in Deutschland wiesen mehrere Forschergruppen in den vergangenen Jahren GIM- und VIM-Enzyme nach, darunter 2004 Castanheira *et al.*, ein Jahr später Henrichfreise *et al.*, sowie 2008 und 2010 Schneider *et al.* und Elias *et al.* In einer großangelegten Studie zu Metallo- $\beta$ -Laktamasen in Deutschland im Jahr 2010 entdeckten Valenza *et al.* VIM-2 bei *P. aeruginosa* in Würzburg (Valenza *et al.*, 2010). Erste Funde bei gram-negativen Bakterien in Hamburg beschrieben Hentschke *et al.* 2011.

Laut Valenza *et al.* sind alle VIM-positiven *Pseudomonas*-Stämme resistent gegen Ceftazidim, nicht unbedingt aber auch gegen Imipenem. Die Frage nach einer VIM sollte gestellt werden, sobald der MHK für Imipenem  $\geq 8\mu\text{g/ml}$  und für Ceftazidim

$\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  liegt. In Würzburg zeigten von 489 klinisch isolierten *Pseudomonaden* 15 Stämme diese MHK-Werte. Davon wurde bei sieben Stämmen eine VIM nachgewiesen - das sind 1,6% aller untersuchten Proben und 46,6% aller Stämme mit auffälligen MHK-Werten für Imipenem und Ceftazidim.

Die Verbreitung einiger Carbapenemasen ist regional begrenzt: so unter anderem in Deutschland die GIM-1, in Korea die SIM-1 (Seoul-Imipenemase) und in Australien die AIM-1 (Australian-Imipenemase) (Salabi *et al.*, 2010).

Die Carbapenemasen der Klasse D umfassen die Carbapenem-hydrolysierenden OXA-Enzyme. Weltweit sind über 250 Subtypen der OXA- $\beta$ -Laktamasen bekannt, von denen jedoch nur eine geringe Anzahl (OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-48, OXA-51 und andere, Poirel *et al.*, 2004) Carbapeneme hydrolysieren können (Patel und Bonomo, 2013). OXA- $\beta$ -Laktamasen hydrolysieren Oxacillin und Cloxacillin (Livermore und Woodford 2000). Die Inhibitoren Clavulansäure und EDTA wirken nicht hemmend, *in vitro* lässt sich eine Hemmung jedoch durch NaCl erreichen. OXA-Carbapenemasen gehören in Deutschland zu den am häufigsten gefundenen Carbapenemasen (Epidemiologisches Bulletin, 19/2013). OXA-Carbapenemasen finden sich kaum in *Pseudomonaden*, jedoch häufig in Enterobakterien und Acinetobacter.

## 1.8 Fragestellung

Nach wie vor sind Carbapeneme Reserveantibiotika für schwere Infektionen mit *P. aeruginosa* (El Amin *et al.*, 2005). Carbapeneme sind  $\beta$ -Laktam-Antibiotika mit einem breiten Wirkspektrum, besonders gegen nosokomiale Problemkeime wie *P. aeruginosa*. Sie sind wirksam gegen gram-negative Bakterien mit ESBL (extended-spectrum- $\beta$ -Laktamasen) und AmpC-Überproduktion (Livermore und Woodford, 2000).

In Europa lag die durchschnittliche Carbapenemresistenz von *P. aeruginosa* bei 17,1% mit deutlichem Nord-Ost/Süd-Gefälle (ECDC 2013). In Deutschland lag die Imipenemresistenz im Bereich der stationären Versorgung 2013 bei *P. aeruginosa* bei 15% (Vergleich 2008 8,9%). Die Meropenemresistenz lag im Bereich der stationären Versorgung im Jahr 2013 bei 6,7%, im Vergleich dazu lag die Resistenzrate im Jahr 2008 bei 6,5% (Robert-Koch-Institut, ARS 2014). Auch am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf treten immer häufiger Infektionen mit multiresistenten

*Pseudomonaden* auf. Dies birgt in der Folge viele Probleme in der adäquaten Antibiotikatherapie für Patienten mit schweren Krankheitsbildern.

Bei *P. aeruginosa* sind verschiedene molekulare Mechanismen zur Ausbildung einer Carbapenemresistenz bekannt. Dazu gehören einerseits die verminderte Expression von Membranporinen, die gesteigerte Expression von Effluxpumpen und  $\beta$ -Laktamasen als intrinsische Resistenzmechanismen und auf der anderen Seite die erworbenen Carbapenem-hydrolysierenden  $\beta$ -Laktamasen (Lister *et al.*, 2009).

Für diese Studie wurden zwischen dem 14.01.2008 und dem 19.07.2010 carbapenemresistente *Pseudomonas*-Stämme im Routinelabor des UKE gesammelt. Bei diesen Stämmen sollte untersucht werden, inwieweit durch bereits bekannte molekulare Mechanismen die Carbapenemresistenz erklärt werden kann. Hierfür wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- a) mittels PCR und Sequenzierung Suche nach Mutationen im *oprD*-Gen, die die Carbapenemaufnahme in die Zelle weiter reduzieren und damit die minimale Hemmkonzentration ansteigen lassen.
- b) mittels PCR und Sequenzierung sollte in den Regulatorgenen für die Effluxpumpe MexAB-OprM *mexR*, *nalD*, *nalC* nach inaktivierenden Mutationen gesucht werden, durch die es zu einer gesteigerten Expression der Effluxpumpe und damit Ausschleusung der Antibiotika aus der Zelle kommt.
- c) mittels PCR und Sequenzierung sollten Mutationen im *ampC*-Gen gefunden werden, die für eine Erweiterung des Hydrolysespektrums verantwortlich gemacht werden.
- d) weiter sollte versucht werden, mittels PCR Carbapenemasen nachzuweisen.
- e) Untersuchung der genetischen Verwandtschaft der Carbapenemase tragenden Stämme mittels Pulsfeldgelelektrophorese, um einen möglichen Ausbreitungsweg darstellen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland) und J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) in pro analysi-Qualität bezogen. Ausnahmen sind gesondert angegeben.

Plastikartikel und Einwegmaterial stammten von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Greiner (Kremsmünster, Österreich). Ausnahmen sind gesondert angegeben.

#### 2.1.2 Laborgeräte

Die verwendeten Geräte sind mit Namen und Herstellern in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 4:** Verwendete Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank		Heraeus
Geldokumentationssysteme	ChemiDoc™ XRS UV-Transilluminator	Bio-Rad Vilber Lourmat
PCR-Cycler	Mastercycler ep gradientS Mastercycler ep gradient vapo.protect	eppendorf eppendorf eppendorf
Power-Supply	Electrophoresis Power Supply EPS 600	PharmaciaBiotech
Waagen	KERN PCB PC440 Delta-Range	Kern Mettler-Toledo
Zentrifugen	Heraeus Fresco17 centrifuge 5410	Thermo Scientific eppendorf
pH-Meter	inolab	WTW
Wasserbad		GFL
PFGE-Geräte	CHEF-DR®III System Model 1000 Mini Chiller Variable Speed Pump Chef Electrophoresis Cell	Bio-Rad Bio-Rad Bio-Rad Bio-Rad

### 2.1.3 Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

In Tabelle 20 sind die verwendeten Medien aufgeführt.

**Tabelle 5:** Verwendete Medien

Medium	
Columbia-Blutagar	von OXOID bezogen, bei 4°C gelagert
Müller-Hinton-Agar	von OXOID bezogen, bei 4°C gelagert
Trypticase Soya Broth (TSB)	TSB-BBL pH 7,3 ± 0,5 (Becton Dickinson) 30 g/l

### 2.1.4 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt, und ohne vorheriges Autoklavieren verwendet.

Eine Übersicht der benutzten Lösungen zeigt Tabelle 6.

**Tabelle 6:** Verwendete Lösungen

Lösung	
SE-Puffer 1000ml (75mM NaCl, 25mM EDTA [pH 7,5])	15ml 5M NaCl 50ml 0,5M Na-EDTA [pH 7,5] A. bidest. ad 1000ml
ES-Lösung 1000ml [pH 9,0]	1000ml 0,5M EDTA 10g Laurylsarcosin ~ 50 NaOH-Plättchen zur pH-Wert-Einstellung
ESP-Lösung	1ml ES-Lösung 2µl Proteinase K
TE-Puffer 1000ml (10mM Tris-HCl [pH 7,5], 10mM Na-EDTA)	5ml 2M Tris-HCl [pH 7,5] 20ml 0,5M Na-EDTA [pH 7,5] A. bidest. ad 1000ml
10xTBE-Puffer (9,0M Tris, 0,9M Borsäure, 20mM EDTA [pH 8,0])	109g Tris 55,6g Borsäure 7,4g Na-EDTA [pH 8,5] A. bidest ad 1000ml



Lösung	
1,6%ige Low-melting-point-Agarose (LMP-Agarose)	128mg INCERT-Agarose (FMC BioProducts) 8ml SE-Puffer
50xTAE-Puffer	242g Tris 57,1ml Eisessig 100ml EDTA aus 0,5 M pH 8 A. bidest. ad 1000ml
DNA-Ladepuffer	240 mM Tris-Base 6 mM EDTA 0,12 % Bromphenolblau 40 % Saccharose

## 2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

### 2.1.5.1 Klinische *Pseudomonas aeruginosa* Isolate

Die in dieser Arbeit verwendeten *P. aeruginosa* Stämme wurden im Labor der mikrobiologischen Routinediagnostik am UKE durch Labormitarbeiter gesammelt. Ausgewählt wurden die Stämme, wenn sie gegen mindestens ein Carbapenem resistent waren. Die Proben wurden alle von Patienten im UKE, jedoch aus unterschiedlichem Material (Urin, Blut, usw.) gewonnen.

### 2.1.5.2 Sonden und Primer

Die Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der Resistenzgene sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7:** Verwendete Primer

Primernamen	Sequenz	Referenz
Pre- <i>ampC</i> -PA1	5'-ATGCAGCCAACGACAAAGG-3'	[Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2009]
Post- <i>ampC</i> -PA2	5'-CGCCCTCGCGAGCGCGCTTC-3'	[Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2009]
<i>nalC</i> -F2	5'-TGCCAGAGCCTCTATCG-3'	diese Arbeit
<i>nalC</i> -For	5'-TCAACCCTAACGAGAAACGCT-3'	[Tomás <i>et al.</i> , 2010]

Primernamen	Sequenz	Referenz
<i>nalC</i> -Rev	5'-TCCACCTCACCGAACTGC-3'	[Tomás <i>et al.</i> , 2010]
<i>nalD</i> -For	5'-GCGGCTAAAATCGGTACTACT-3'	[Tomás <i>et al.</i> , 2010]
<i>nalD</i> -Rev	5'-ACGTCCAGGTGGATCTTGG-3'	[Tomás <i>et al.</i> , 2010]
<i>mexR</i> -For	5'-TGTTCTTAAATATCCTCAAGCGG-3'	[Tomás <i>et al.</i> , 2010]
<i>mexR</i> -Rev	5'-GTTGCATAGCGTTGTCCTCA-3'	[Tomás <i>et al.</i> , 2010]
<i>mexR</i> -F neu	5'-TTTAGCTCGATGGCCGGTT-3'	diese Arbeit
<i>mexR</i> -R neu	5'-ATACCTGAAACGAAAACGC-3'	diese Arbeit
<i>oprD</i> -F	5'-CGCCGACAAGAAGAACTAGC-3'	[Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2009]
<i>oprD</i> -R	5'-GTCGATTACAGGATCGACAG-3'	[Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2009]
<i>oprD</i> -F2	5'-GCCGACCACCGTCAAATCG-3'	[Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2009]
<i>oprD</i> -F neu	5'-CAAGAAGAAGACTAGCCGTCCTACT-3'	diese Arbeit
<i>oprD</i> -R neu	5'-AGAGTAATGAGGAAGACCTGG-3'	diese Arbeit
<i>oprD</i> -Fa	5'-GTGGTGTGCTGATGTCGC-3'	diese Arbeit
<i>oprD</i> -Fb	5'-GAGTTGGCGAGGA-3'	diese Arbeit

### 2.1.5.3 Primer zum Nachweis von Carbapenemase

In Tabelle 8 sind die Primer zum Nachweis der Carbapenemase aufgelistet.

**Tabelle 8:** Verwendete Primer zum Nachweis von Carbapenemase

Primernamen	Sequenz	Referenz
KPC-for	5'-CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC-3'	[Dallenne <i>et al.</i> , 2010]
KPC-rev	5'-ACGACGGCATAGTCATTTGC-3'	[Dallenne <i>et al.</i> , 2010]
GES-for	5'-AGTCGGCTAGACCGGAAAG-3'	[Dallenne <i>et al.</i> , 2010]
GES-rev	5'-TTTGTCCGTGCTCAGGAT-3'	[Dallenne <i>et al.</i> , 2010]
OXA-48-for	5'-GCTTGATCGCCCTCGATT-3'	[Dallenne <i>et al.</i> , 2010]

Primernamen	Sequenz	Referenz
OXA-48-rev	5'-GATTTGCTCCGTGGCCGAAA-3'	[Dallenne <i>et al.</i> , 2010]
VIM-F	5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
VIM-R	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
GIM-F	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
GIM-R	5'-AACTTCCAACCTTGCCATGC-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
SIM-F	5'-TACAAGGGATTCGGCATCG-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
SIM-R	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
IMP-F	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
IMP-R	5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
SPM-F	5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
SPM-R	5'-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3'	[Ellington <i>et al.</i> , 2007]
VIM2- Volllänge-F	5'-AAAGTTATGCCGCACTCACC-3'	diese Arbeit
VIM2- Volllänge-R	5'-TGCAACTTCATGTTATGCCG-3'	diese Arbeit

#### 2.1.5.4 Datenbanken und Programme

Agarosegele und Pulsfeldgelelektrophorese-Gele wurden mit ChemiDoc™ XRS fotografiert und bearbeitet. Als wichtigste online-Datenbank für diese Arbeit ist „Pseudomonas genome database V<sub>2</sub>“ ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) verwendet worden. Eingesehen werden können dort alle erfassten Gensequenzen verschiedener *Pseudomonas*-Stämme. Die Bearbeitung und Analyse der durch PCR und Sequenzierreaktion gewonnen DNA-Sequenzen wurden mit CLC Main Workbench (CLC Bio, Aarhus, Dänemark) und nach dem BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) durchgeführt. Als Referenzstamm diente PAO1 NCBI (Accession number: NC\_002516).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Konservierung und Kultivierung der Bakterien

Zur Konservierung wurden einige wenige Kolonien der Bakterien mit einer

Ausstreichöse in CRYOBANK-Röhrchen (MAST DIAGNOSTICA, Reinfeld, Deutschland) gebracht und suspendiert. So konnten die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Zur Stammhaltung wurden die Bakterien zusätzlich in regelmäßigen Abständen bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf Columbia-Blutagar kultiviert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für jegliche Versuche wurden stets frische ÜN-Kulturen verwendet.

### **2.2.1.2 Resistenzbestimmung mittels Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

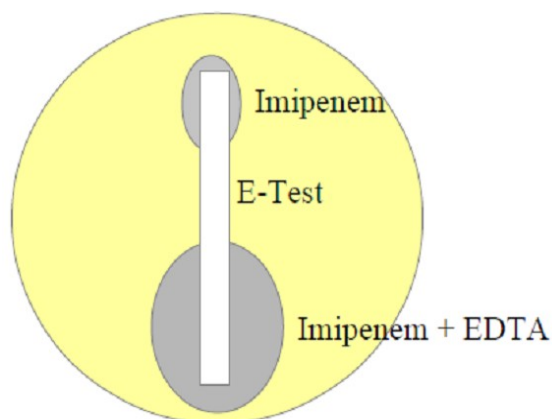
Die Resistenzmuster der verwendeten *Pseudomonas*-Stämme wurden mit der minimalen Hemmkonzentration (MHK) durch E-Tests (Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italien)) mit verschiedenen Antibiotika nach dem Standard der EUCAST zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung erfasst:

Zur Bestimmung der MHK wurden Bakterien in 2ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) suspendiert und ein McFarland-Wert von 0,45-0,55 als Trübungsstandard wurde eingestellt. Die Suspension wurde gleichmäßig dünn mit einem Wattestäbchen auf dem Müller-Hinton-Agar verstrichen. Danach wurde der mit Antibiotika bedeckte Teststreifen mit Hilfe einer Pinzette mittig auf die Agarplatte gelegt. Die Platten wurden anschließend ÜN bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Die ellipsenförmige Aussparung rund um den Teststreifen zeigt jenen Bereich an, in dem die Antibiotikakonzentration ausreicht, um das Wachstum der Bakterien zu hemmen. An der Stelle, an der gerade kein Wachstum mehr zu sehen ist, kann von dem Teststreifen die MHK in  $\mu\text{g/ml}$  abgelesen werden. Durchgeführt wurde dieser Test mit folgenden Antibiotika: Gentamicin, Imipenem, Meropenem, Ceftazidim, Ciprofloxacin. Die Teststreifen wurden von Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italien) bezogen.

### 2.2.1.3 EDTA-Test

Nach derselben Vorgehensweise wie der E-Test wurde der EDTA-Test durchgeführt. Dabei befand sich auf der einen Hälfte des Teststreifens nur das Antibiotikum Imipenem und auf der anderen Hälfte Imipenem + EDTA (siehe Abbildung 4). Mit diesem Test wurde bei einigen Stämme das Vorhandensein der Metallo- $\beta$ -Laktamase VIM bestätigt. Durchgeführt wurde der Test nur bei Proben, bei denen durch die PCR der Verdacht auf eine VIM entstanden war.

Metallo- $\beta$ -Laktamasen lassen sich durch Clavulansäure, Tazobactam oder Sulbactam nicht hemmen (Nordmann und Poirel, 2002). Im aktiven Zentrum der Metallo- $\beta$ -Laktamasen befindet sich ein Zink-Ion. Das Zink-Ion lässt sich durch den Chelatbildner EDTA binden (Patel und Bonomo, 2013). Der Test gilt als positiv für das Vorhandensein einer Metallo- $\beta$ -Laktamase, wenn nach Zugabe von EDTA die Imipenem-MHK um 3 Verdünnungsstufen oder mehr sinkt.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des E-Tests

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Extraktion der *Pseudomonaden*-DNA

Zur Vorbereitung wurden die *Pseudomonaden* am Vortag auf Blutagar ausgestrichen und als  $\ddot{U}$ N-Kultur bei 37°C inkubiert. Die DNA der Bakterien wurde nach folgendem Protokoll isoliert:

1. In die beschrifteten Eppendorf-Tubes wurden 200µl TE-Puffer vorgelegt und anschließend mit einer Ausstreichöse circa drei Bakterienkolonien suspendiert.
2. Die Suspension wurde anschließend für zehn Minuten bei 95°C inkubiert.
3. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz für fünf Minuten bei 13300rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt
4. Hinzu wurden danach 200µl Phenol pipettiert. Das Eppendorf-Tube wurde dann kräftig geschüttelt.
5. Nun wurde erneut für fünf Minuten, bei 13300rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.
6. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Tube überführt (circa 150µl). Der Rest des Reaktionsgemisches wurde entsorgt.
7. Hinzugegeben wurden dann 150µl Chloroform. Daraufhin wurde das Tube wieder kräftig geschüttelt.
8. Erneut folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 13300rpm und Raumtemperatur.
9. Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Die so extrahierte DNA konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

#### **2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR wurde zur Amplifikation der Gene, sowie zum Nachweis von Metallo-β-Laktamasen in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

- 39µl steriles Millipore H<sub>2</sub>O
- 5µl 10x PCR Rxn Buffer -MgCl<sub>2</sub> (invitrogen™)
- 1,5µl MgCl<sub>2</sub>
- 1µl dNTPs (100 mM dNTP Set, PCR Grade, 250µL enthalten 25µmol dNTPs in gereinigtem Wasser (pH 7.5), Catalog number: 10297-018, invitrogen™)
- 1µl DNA-Lösung
- 0,5µl Platinum®*Taq* DNA Polymerase (invitrogen™)

- 1µl For-Primer (10µM)
- 1µl Rev-Primer (10µM)

Zu Reaktionsbeginn wurde die DNA für 5min bei 95°C einmalig denaturiert. Die folgenden sich 30-38mal wiederholenden Zyklen liefen mit einer Denaturierungszeit (95°) von 30 Sekunden und einer Annealing-Dauer von 30 Sekunden bei einer Temperatur von 55-58°C an. Zur Synthese der DNA wurde die Temperatur für 2min auf 72°C eingestellt. Nach Ende dieser Zyklen schloss sich eine einmalige Synthesephase von zehn Minuten bei 72°C an. Anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Zur Kontrolle des PCR-Ergebnisses wurde eine horizontale (Agarose) Gelelektrophorese durchgeführt.

### **2.2.2.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA**

Die Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung eines DNA-Gemisches in seine verschieden großen Fragmente genutzt. Bei diesen DNA-Gemischen handelte es sich um PCR-Proben. Verwendet wurde ein 1%iges Agarosegel, welches aus 1g SeaKem®LE-Agarose (Lonza) und 100ml 1x TAE-Puffer sowie 5µl Ethidiumbromid hergestellt wurde. Das Agarosepulver sowie der Puffer wurden solange aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nach Abkühlung des Gels auf circa 60°C wurde das Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. 10µl der aufzutrennenden DNA wurden mit 2,5µl blauem 5XLadepuffer mit RNase versetzt und in die Geltaschen pipettiert. In der ersten Geltasche wurden 10µl einer 1kb Ladder (invitrogen™) als DNA-Standard eingesetzt. Dieser DNA-Standard enthielt 12 Fragmente von 500bp bis 12kb. Abhängig von der Gelgröße und erwarteter Größe der DNA-Banden lief das Gel zwischen 20 und 45 Minuten bei 80 bis 140V. Als Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer verwendet. Anschließend wurde das Gel zur Auswertung unter UV-Licht fotografiert.

### **2.2.2.4 Pulsfeldgelelektrophorese**

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde mit den VIM-positiven Bakterienstämmen durchgeführt. Der Versuch wurde anhand des folgenden Protokolls durchgeführt:

1. Anzucht der Kulturen: Frische Übernacht-Kulturen (ÜN) auf Blutagar wurden mit einer Ausstreichöse in 10ml TSB-Medium überimpft. Die Kulturen wurden ÜN bei 37°C bebrütet. Von dieser ÜN-Kultur wurden nach

- kurzem Vortexen 1ml in ein Eppendorf-Tube überführt, zwei Minuten bei 12000rpm zentrifugiert und zweimal mit 1ml SE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500µl SE-Puffer resuspendiert.
2. Herstellung der Agarose-Bakterien-Blöckchen: Die 1,6%ige Low-melting-point-Agarose wurde bei 50°C im Heizblock aufgewärmt. Dann wurden 120µl Bakteriensuspension mit 120µl LMP-Agarose vermischt, gevortext und in 2 Kammern des Gießblocks (Plug Mold, Bio-Rad) pipettiert. Die Blöckchen wurden dann 30 Minuten bei 4°C gekühlt.
  3. ÜN-Lyse mit Proteinase K (Sigma): Die erstarrten Blöckchen wurden dann vorsichtig aus der Gießkammer in Eppendorf-Tubes überführt. Danach wurde 1ml ESP-Lösung hinzugefügt. Die Tubes wurden dann ÜN bei 56°C inkubiert.
  4. Waschen der Gelblöckchen: Am Morgen nach der ÜN-Lyse wurden die Blöckchen viermal für jeweils eine Stunde in 10ml TE-Puffer gewaschen.
  5. Restriktion mit Dra I (Roche): Der Restriktionspuffer M (Roche) wurde 1:10 mit aqua dest. verdünnt. Der TE-Puffer wurde entfernt. Die Blöckchen mussten dann für eine Stunde in circa 800µl Restriktionspuffer M äquilibrieren. Der Puffer wurde anschließend entfernt und 100µl Restriktionspuffer M+4µl Dra I hinzugefügt. Der Ansatz wurde ÜN bei 37°C inkubiert.
  6. Herstellung und Vorbereitung des Gels: Zu Beginn wurden 2 l 0,5x TBE-Puffer hergestellt und bei 4°C aufbewahrt. Für das 1%ige Gel wurde der gewünschten Gelgröße entsprechend die Sigma-Agarose mit dem 0,5x TBE-Puffer vermischt, aufgeköcht und auf 60°C abgekühlt. Von diesem Agarose-Gel wurden 2-4ml abgenommen und bei 56°C aufbewahrt. Die abgekühlte Agarose wurde dann in die Gelkammer gegossen. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen bilden. Das Gel musste 30 Minuten bei 4°C aushärten. In das ausgehärtete Gel wurden dann die LMP-Gelblöckchen überführt. Die Gelblöckchen wurden mit einem Spatel vorsichtig in die Gelschlitze gesetzt. Für die erste Bahn wurde ein DNA-Standard verwendet, bei dem außerhalb dieser Studie eine VIM nachgewiesen wurde. Die Schlitze wurden dann mit der bei 56°C aufbewahrten Agarose



verschlossen. Das Gel wurde dann aus der Gießkammer in den Pulsfeldgelelektrophoresekammer gelegt und der kühle TBE-Puffer hinzugegeben. Der Pulsfeldgelelektrophoresekammer wurde wie folgt programmiert:

- Block 1: 20-20s für 12 Stunden
- Block2: 5-15s für 17 Stunden
- Spannung: 6,0V/cm
- Winkel: 120°
- Umwälzrate der Pumpe: 100%
- Kühltemperatur im Mini-Chiller:14°C

7. Färbung des Gels mit Ethidiumbromid und Fotodokumentation: Das Gel wurde nach dem 29 Stunden dauernden Lauf in 400ml Wasser und 20µl 1%igem Ethidiumbromid für 25min unter leichten Rotationsbewegungen gefärbt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert.

Die Interpretation der Banden erfolgte nach den Kriterien von Tenover *et al.* (1995): Dort werden Stämmen, die nicht unterscheidbar, nahe verwandt, wahrscheinlich verwandt oder nicht verwandt sind voneinander unterschieden. Diese Unterscheidung ist möglich, sobald zehn Banden deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Sind weniger Banden beurteilbar, ist das Ergebnis nicht sicher zu bewerten.

Nicht zu unterscheiden sind die Stämme voneinander, wenn die Anzahl und Größe aller Banden übereinstimmen.

Nahe verwandte Stämme unterscheiden sich lediglich durch eine genetische Veränderung wie z.B. einer Punktmutation, Insertion oder Deletion. Diese Veränderungen bewirken in der PFGE zwei bis drei Bandenunterschiede.

Wahrscheinlich verwandt sind Stämme, bei denen es zu zwei unabhängigen genetischen Veränderungen gekommen ist. Daraus resultieren vier bis sechs unterschiedliche Banden.

Nicht verwandt sind Stämme, bei denen es zu drei oder mehr genetischen Ereignissen gekommen ist und sich in sieben oder mehr Banden unterscheiden.

#### **2.2.2.5 DNA-Sequenzierung**

Nach der PCR wurde bei allen Proben der DNA-Gehalt gemessen und mit sterilem

Millipore H<sub>2</sub>O auf 100µg/ml verdünnt. Anschließend wurde mit folgendem Reaktionsansatz eine Sequenzier-PCR durchgeführt:

- 1µl verdünntes PCR-Produkt
- 1µl For- oder Rev-Primer (10µM)
- 6µl BigDye Puffer (AppliedBiosystems)
- 2µl BigDye Terminator Mix (AppliedBiosystems)
- 10µl steriles Millipore H<sub>2</sub>O

Der Cycler wurde auf ein Standardprogramm für alle Gene und Primer eingestellt. Bei diesem Programm gab es eine initiale Denaturierungsphase von einer Minute bei 96°C. Darauf folgten 25 Zyklen nach folgendem Schema: 96°C für 20 Sekunden zur Denaturierung, 50°C für 5 Sekunden zur Anlagerung der Primer an die DNA und 60°C für vier Minuten zur DNA-Synthese. Anschließend wurden die Proben auf 4°C herunter gekühlt.

#### **2.2.2.6 Ethanolfällung**

Nach der Sequenzier-PCR wurde mit allen Proben eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

- 72µl steriles Millipore H<sub>2</sub>O
- 8µl 3M NaAc (pH 5,2)
- 300µl 100%iges Ethanol
- komplettes Probevolumen aus der Sequenzier-PCR ( $\leq 20\mu\text{l}$ )

Alle Reagenzien wurden in ein Eppendorf-Tube pipettiert und manuell kräftig geschüttelt. Dann wurden die Proben 15min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden vorsichtig aus der Zentrifuge genommen und die komplette Flüssigkeit abpipettiert, ohne dabei das (nicht immer sichtbare) Pellet zu schädigen. Im Anschluss wurden zu den Proben erneut 400µl 70%iges Ethanol hinzugefügt und diese ohne erneutes Schütteln für eine Minute bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Erneut wurde die gesamte Flüssigkeit abgenommen und die Proben anschließend für 5min mit offenem Deckel bei 37°C zum Lufttrocknen stehen gelassen. Die so verarbeiteten Proben können dann bei -20°C aufbewahrt werden. Die gefällten Proben wurden für diese Arbeit stets vom UKE-internen Sequenzierservice sequenziert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Probencharakteristika und MHK-Werte

Im Rahmen dieser Studie wurden *Pseudomonas aeruginosa* Isolate untersucht, die zwischen dem 14.01.2008 und dem 19.07.2010 im Routinelabor des UKE gesammelt wurden. Als Auswahlkriterium dienten Resistenzen gegen Imipenem oder/und Meropenem. Nach den in Tabelle 9 dargestellten Grenzwerten wurden die E-Tests ausgewertet.

**Tabelle 9:** MHK-Grenzwerte nach EUCAST, 2011

Antibiotikum	(mg/L)	(mg/L)
Imipenem	$S \leq 4$	$R > 8$
Meropenem	$S \leq 2$	$R > 8$
Gentamicin	$S \leq 4$	$R > 4$
Ciprofloxacin	$S \leq 0,5$	$R > 1$
Ceftazidim	$S \leq 8$	$R > 8$

In Tabelle 10 sind die Charakteristika Alter und Geschlecht, sowie die Antibiogramme der Proben dargestellt.

**Tabelle 10:** Antibiogramme, Alter, Geschlecht und Material der Proben

Probennummer	Imipenem (mg/L)	Meropenem (mg/L)	Gentamicin (mg/L)	Ciprofloxacin (mg/L)	Ceftazidim (mg/L)	Alter (Geschlecht)	Material
VA 14867	> 32 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	1947 (M)	Bronchialsekret
VA 19060	> 32 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	> 32 (R)	16 (R)	1950 (W)	Gezielte Absaugung
VA 11995	> 32 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	> 32 (R)	12 (R)	1950 (M)	Gezielte Absaugung
UR 17208	> 32 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	> 32 (R)	1 (S)	1924 (M)	Urin
VA 17914	> 32 (R)	> 32 (R)	64 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	1947 (M)	Wundabstrich
VA 18698	> 32 (R)	> 32 (R)	48 (R)	> 32 (R)	3 (S)	1968 (M)	Tracheostomaabstrich
UR 442	> 32 (R)	> 32 (R)	48 (R)	> 32 (R)	3 (S)	1954 (M)	Katheterurin
UR 10225	> 32 (R)	> 32 (R)	12 (R)	> 32 (R)	2 (S)	1961 (M)	Katheterurin
VA 15480	> 32 (R)	> 32 (R)	3 (S)	> 32 (R)	12 (R)	1949 (M)	Penroseabstrich
VA 28868	> 32 (R)	> 32 (R)	2 (S)	> 32 (R)	6 (S)	1933 (M)	Leistenabstrich
UR 7100	> 32 (R)	> 32 (R)	1,5 (S)	> 32 (R)	3 (S)	1940 (M)	Katheterurin
VA 14381	> 32 (R)	> 32 (R)	2 (S)	1 (I)	> 256 (R)	1948 (M)	Ulcusabstrich
VA 29501	> 32 (R)	> 32 (R)	1,5 (S)	8 (R)	> 256 (R)	1943 (M)	unbekannt
VA 12732	> 32 (R)	> 32 (R)	1,5 (S)	4 (R)	> 256 (R)	1959 (W)	Wundabstrich
VA 18417	> 32 (R)	> 32 (R)	0,75 (S)	0,75 (I)	> 256 (R)	1928 (M)	Sputum
VA 16931	> 32 (R)	> 32 (R)	16 (R)	0,38 (S)	1,5 (S)	1938 (W)	Sputum
UR 11118	> 32 (R)	> 32 (R)	4 (S)	1 (I)	2 (S)	1985 (M)	Mittelstrahlurin
9610	> 32 (R)	> 32 (R)	4 (S)	0,19 (S)	3 (S)	1930 (M)	Nasenabstrich
UR 958	> 32 (R)	> 32 (R)	3 (S)	12 (R)	4 (S)	1919 (M)	Nierenfistel
VA 12593	> 32 (R)	> 32 (R)	2 (S)	3 (R)	32 (R)	1934 (M)	Wundabstrich

Probennummer	Imipenem (mg/L)	Meropenem (mg/L)	Gentamicin (mg/L)	Ciprofloxacin (mg/L)	Ceftazidim (mg/L)	Alter (Geschlecht)	Material
UR 9848	> 32 (R)	> 32 (R)	2 (S)	2 (R)	2 (S)	1960 (W)	Katheterurin
VA 18819	> 32 (R)	> 32 (R)	2 (S)	0,5 (S)	24 (R)	1937 (M)	Gezielte Absaugung
UR 903	> 32 (R)	> 32 (R)	2 (S)	0,064 (S)	8 (S)	2001 (W)	Urin
UR 9569	> 32 (R)	> 32 (R)	1,5 (S)	0,064 (S)	1 (S)	1942 (W)	Mittelstrahlurin
VA 14224	> 32 (R)	> 32 (R)	1,5 (S)	0,064 (S)	1 (S)	1953 (W)	Trachealsekret
VA 14876	> 32 (R)	> 32 (R)	1 (S)	0,19 (S)	4 (S)	1998 (M)	Rachenabstrich
UR 7838	> 32 (R)	> 32 (R)	1 (S)	0,064 (S)	0,5 (S)	1940 (W)	Mittelstrahlurin
UR 7089	> 32 (R)	12 (R)	3 (S)	4 (R)	3 (S)	1937 (M)	Mittelstrahlurin
VA 16566	> 32 (R)	12 (R)	1,5 (S)	0,38 (S)	1,5 (S)	1925 (M)	Bronchialsekret
BK 4460	> 32 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	8 (R)	16 (R)	1991 (M)	Blutkultur
BK 4743	> 32 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	8 (R)	16 (R)	1947 (M)	Blutkultur
VA 1027	> 32 (R)	> 32 (R)	> 256 (R)	> 32 (R)	16 (R)	unbekannt	Urethralabstrich
VA 12183	> 32 (R)	> 32 (R)	8 (R)	> 32 (R)	12 (R)	2006 (W)	Trachealsekret
VA 13664	> 32 (R)	> 32 (R)	3 (S)	> 32 (R)	12 (R)	1964 (M)	Analabstrich
VA 29439	> 32 (R)	> 32 (R)	3 (S)	> 32 (R)	16 (R)	1955 (M)	Sputum
UR 6985	> 32 (R)	> 32 (R)	4 (S)	> 32 (R)	8 (S)	1941 (W)	Beutelurin
UR 8919	> 32 (R)	8 (R)	3 (S)	4 (R)	1 (S)	1923 (M)	Mittelstrahlurin
UR 71	> 32 (R)	8 (R)	3 (S)	0,25 (S)	32 (R)	1939 (M)	Katheterurin
UR 9975	> 32 (R)	8 (R)	1,5 (S)	0,125 (S)	1,5 (S)	1951 (W)	Katheterurin
VA 16313	> 32 (R)	8 (R)	0,25 (S)	0,047 (S)	32 (R)	1920 (M)	Abdomenabstrich
VA 15165	> 32 (R)	6 (S)	2 (S)	0,064 (S)	256 (R)	1942 (M)	Ulcusabstrich

Probennummer	Imipenem (mg/L)	Meropenem (mg/L)	Gentamicin (mg/L)	Ciprofloxacin (mg/L)	Ceftazidim (mg/L)	Alter (Geschlecht)	Material
UR 16831	> 32 (R)	6 (S)	1,5 (S)	0,064 (S)	1 (S)	1929 (W)	Katheterurin
VA 18456	> 32 (R)	6 (S)	1 (S)	0,38 (S)	1 (S)	1937 (M)	Abstrich Oberbauch
VA 18463	> 32 (R)	4 (S)	0,75 (S)	0,25 (S)	1 (S)	1926 (W)	Abstrich retrosternal
UR 11489	> 32 (R)	3 (S)	1,5 (S)	32 (R)	0,75 (S)	1965 (W)	SPDK-Urin
BK 5602	> 32 (R)	3 (S)	1,5 (S)	0,064 (S)	0,75 (S)	1954 (M)	Blutkultur
VA 16959	> 32 (R)	4 (S)	1,5 (S)	0,047 (S)	8 (S)	1958 (W)	Rachenabstrich
VA 14816	> 32 (R)	2 (S)	2 (S)	1,5 (R)	16 (R)	1946 (W)	Bronchialsekret
VA 14184	> 32 (R)	2 (S)	2 (S)	1,5 (R)	1,5 (S)	1959 (W)	Nasensekret
VA 14379	> 32 (R)	2 (S)	0,75 (S)	1,5 (R)	0,75 (S)	1967 (M)	Pus-Abstrich
VA 12562	> 32 (R)	1,5 (S)	2 (S)	1 (S)	1,5 (S)	1967 (M)	Ohrabstrich
VA 13060	> 32 (R)	1,5 (S)	1,5 (S)	0,094 (S)	1 (S)	1971 (W)	Wundabstrich
VA 13215	> 32 (R)	1,5 (S)	1,5 (S)	0,064 (S)	0,75 (S)	1946 (M)	Bronchialsekret
VA 13745	> 32 (R)	1,5 (S)	1,5 (S)	0,064 (S)	1 (S)	1941 (W)	Aszites-Abstrich
VA 13791	> 32 (R)	1 (S)	1 (S)	0,032 (S)	0,75 (S)	1929 (W)	BAL
VA 19135	> 32 (R)	1 (S)	1 (S)	0,19 (S)	4 (S)	1942 (W)	Gezielte Absaugung
VA 16942	> 32 (R)	0,5 (S)	4 (S)	0,094 (S)	1,5 (S)	1952 (M)	Tubusabsaugung
VA 14618	> 32 (R)	0,38 (S)	1,5 (S)	0,064 (S)	0,75 (S)	1969 (W)	Sputum
UR 10195	> 32 (R)	0,5 (S)	12 (R)	> 32 (R)	0,5 (S)	1943 (M)	Katheterurin

Bei der Auswertung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) fiel auf, dass alle Proben eine Imipenemresistenz aufweisen. Lediglich acht (13,6%) der 59 untersuchten Stämme waren allein gegen Imipenem resistent, 40 Proben waren zusätzlich resistent gegen Meropenem. Alle anderen Stämme waren gegen mindestens ein weiteres Antibiotikum resistent: gegen Imipenem, Meropenem und Gentamicin ist ein Stamm resistent. Gegen Imipenem, Meropenem und Ciprofloxacin sind sechs Stämme als resistent und einer als intermediär getestet worden. 36 Stämme (61%) waren gegen mindestens drei verschiedene Antibiotika nicht sensibel. Acht Stämme sind sogar gegen alle fünf getesteten Antibiotika resistent.

### 3.2 Nachweis von Carbapenemasen

Carbapenemresistenz kann durch die Anwesenheit einer Carbapenemase bedingt sein. Untersucht wurden daher die carbapenemresistenten Isolate mittels PCR auf das Vorliegen der folgenden  $\beta$ -Laktamasen: VIM, KPC, GES, OXA-48, GIM, SIM, IMP, SPM. Die hierfür verwendeten Primer stammten von Dallenne *et al.*, 2010 und Ellington *et al.*, 2007. Außer der VIM konnte keine andere Carbapenemase nachgewiesen werden. Die Stämme, bei denen die VIM-PCR positiv waren, sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11:** VIM-positive Proben

VIM-positiv	Probe
	BK4460
	BK 4743
	UR 6985
	VA 1027
	VA 12183
	VA 13664
	VA 29439

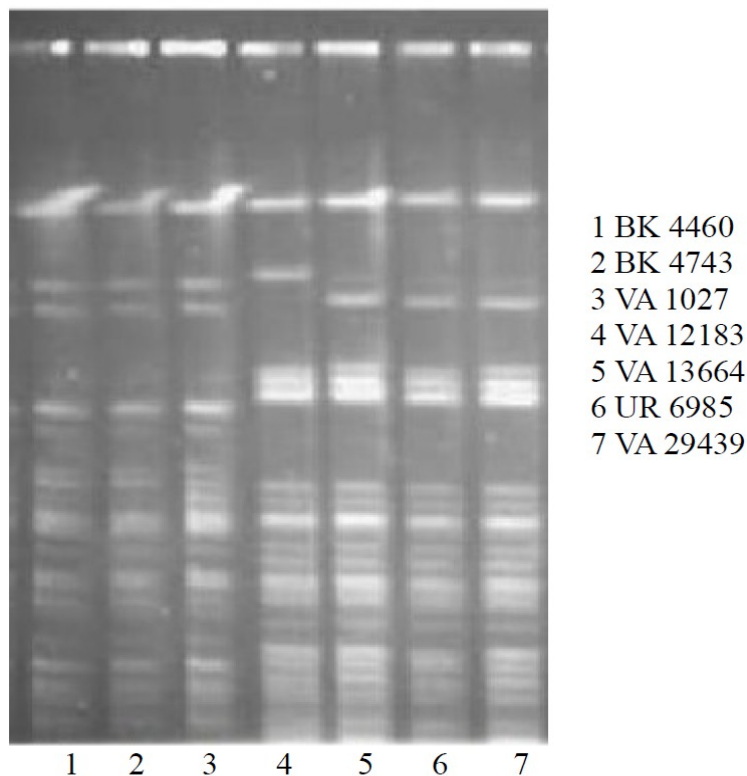
Anschließend erfolgte die Sequenzierung der PCR-Produkte. Hier konnte der Nachweis des VIM-Gens bestätigt werden. Die Amplifikation des Volllängen-Gens mit anschließender Sequenzierung ergab den Subtyp VIM-2.

### 3.3 EDTA-Test

Der EDTA-Test eignet sich, um das Vorliegen einer Metallo- $\beta$ -Laktamase zu überprüfen. Metallo- $\beta$ -Laktamasen lassen sich durch EDTA hemmen. Der einen Hälfte des Antibiotika-Teststreifens ist deswegen EDTA zugefügt worden. Im Falle des Vorliegens einer MBL (Metallo- $\beta$ -Laktamase) wird durch das EDTA auf der einen Hälfte des Teststreifens das Enzym gehemmt und die Imipenempfindlichkeit nimmt zu, d.h. die Hemmellipse wird um mindestens drei Verdünnungsstufen größer. Nachdem bei den obengenannten Proben die VIM-PCR positiv war, wurde bei diesen Stämmen (BK4460, BK 4743, UR 6985, VA 1027, VA 12183, VA 13664, VA 29439) der EDTA-Test durchgeführt. Bei allen sieben getesteten Stämmen fiel der Test positiv aus.

### 3.4 Pulsfeldgelelektrophorese

Um eine genetische Verwandtschaft der Isolate festzustellen, wurde für alle VIM-positiven Stämme eine Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) erstellt. Diese gilt als Grundlage zur Analyse des möglichen Ausbreitungsweges im Krankenhaus.



**Abbildung 5:** Pulsfeldgelelektrophorese der VIM-positiven Stämme



In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der PFGE der VIM-positiven Stämme dargestellt. Es wird deutlich, dass es sich lediglich um zwei verschiedene Pulsotypen handelt. In die erste Gruppe zählen die Stämme BK 4460, BK 4743 und VA 1027. Diese Proben wurden von der Knochenmarkstransplantationsstation isoliert. Die zweite Gruppe wird von VA 12183, VA 13664, UR 6985 und VA 29439 gebildet. Diese Stämme stammen von unterschiedlichen Stationen.

### 3.5 Sequenzauswertung

#### 3.5.1 *mexR*-Sequenzen

Als Regulator der MexAB-OprM-Effluxpumpe wurde *mexR* in dieser Studie auf Mutationen hin untersucht, die in der Folge eine erhöhte Antibiotikaresistenz bewirken. Im *mexR*-Gen wiesen 22 der 59 untersuchten Proben keine Mutationen auf. Sechs (VA 18698, VA 18417, VA 17914, VA 12732, UR 10225, VA 13060) Stämme zeigten zwar einen Basenaustausch, dieser blieb jedoch ohne Konsequenz: eine Aminosäure wurde nicht ausgetauscht (stumme Mutation).

Fünf (9610, UR 9848, VA 1027, VA 19060, VA 29501) der untersuchten Proben zeigten Mutationen, bei denen es entweder durch eine Insertion oder Deletion zu einer Verschiebung des Leserahmens kommt. Bei diesen Mutationen ist davon auszugehen, dass das MexR-Protein nicht funktionsfähig ist.

Die restlichen 26 Stämme wiesen Mutationen auf, welche zu Aminosäureaustauschen führen: Dabei wiesen 23 der untersuchten Proben die Mutation n.377 T→A, p.126 V→E auf. Zusätzlich dazu zeigten UR 7100 und UR 9975 n.395 T → C, p.132 V→A. UR 442 weist neben n.377 T→A, p.126 V→E die Mutation n.131 A→T, p.44 K→M auf. Zwei Bakterienstämme (VA 14867, VA 11995) zeigten eine Mutation an n.301G→A, p.101 G→R. Bei VA 15480 konnte die Mutation n.388 A→C, p.130 T→P nachgewiesen werden. Die Auswirkungen dieser Aminosäureaustausche für die Funktion von MexR sind unklar.

Bei VA 16959 lässt die große Anzahl (30 ausgetauschte Basenpaare) an Mutationen im Vergleich zu PAO1 vermuten, dass es sich bei diesem Stamm um einen anderen Wildtyp handelt. Wird die Sequenz bei ncbi BLASTn eingegeben erscheint als erstes Ergebnis *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (Genbank accession number CP000744.1). Hier gibt es die meisten Übereinstimmungen (442/451 (98%)). Somit entspricht

VA 16959 am ehesten dem Wildtyp PA7. An Position n.94 findet sich eine Insertion der Base Cytosin mit Leserahmenverschiebung. Einen Überblick über die Mutationen in *mexR* gibt Tabelle 12, stille Mutationen sind nicht aufgeführt.

**Tabelle 12:** *mexR*-Mutationen

Probe	<i>mexR</i> -Mutation
VA 16959 im Vergleich mit PA7	1bp-Insertion n.94 (C)
VA 19060	1bp Insertion n.81 (T)
9610	1bp Deletion n.315 (C)
UR 9848	11bp Deletion n.65-75 (GCGCATCCAGA)
VA 1027	13bp Deletion n.308-321(CATCCACCAGCAT)
VA 29501	13bp Deletion n.367-389 (CTCACCCCGGTGG)
VA 11995, VA 14867	n.301 G → A, p.101 G → R
VA 15480	n.388 A → C, p.130 T → P
UR 442	n.131 A → T, p.44 K → M n.377 T → A, p.126 V → E
BK 4460, BK 4743, UR 71, UR 903, UR 9569, UR 6985, UR 7838, UR 8919, UR 16831, VA 18819, VA 28868, VA 12593, VA 13664, VA 14184, VA 19135, VA 29439, VA 14618, VA 14876, VA 12183	n.377 T → A, p.126 V → E
UR 7100, UR 9975	n.377 (T → A), p.126 (V → E) n.395 (T → C), p.132 (V → A)

### 3.5.2 *nalC*-Sequenzen

Bei *nalC*-Mutanten kommt es durch die De-Repression mit folgender gesteigerter MexAB-OprM-Produktion, zu einer verminderten Meropenemempfindlichkeit. Deswegen wurde auch im *nalC*-Gen nach Mutationen gesucht.

Lediglich bei VA 13060 zeigte sich die Wildtyp-Sequenz. 55 Proben weisen n.212 G→A, p.71 G→E auf. Die Mutation n.625 A→C, p.209 S→R ließ sich 33 mal finden. Die Mutation n.434 C→T, p.145 A→V wurde bei sieben der 59 Stämme gefunden. Die Mutation n.457 G→C, p.153 E→Q gab es fünfmal. Fünf weitere Stämme zeigten die Mutation n.556 G→A, p.186 A→T. Bei zwei Proben (VA 14618,

VA 14876) konnte die Mutation n.237 T→A, p.79 D→E nachgewiesen werden. Allein UR 903 zeigte n.88 C→T, p.30 H→Y. Eine 1bp-Deletion zeigte sich bei zwei Stämmen (VA 18698, UR 10225) neben der oben erwähnten Mutation n.212 G→A, p.71 G→E. Hier ist von einem Funktionsverlust des Proteins auszugehen. Tabellarisch dargestellt sind die Mutationen in Tabelle 13.

**Tabelle 13:** *nalC*-Mutationen

Probe	<i>nalC</i> -Mutationen
9610, UR 7089, UR 7100, UR 9848, UR 9975, UR 10195, UR 11489, VA 16566, VA 16942, VA 15165, VA 14381, VA 14379, VA 14816, VA 16931, VA 18417, VA 13215, VA 12593, VA 14224	n.212 G→A, p.71 G→E n.625 A→C, p.209 S→R
BK 4460, BK 4743, UR 442, VA 1027, VA 12562	n.212 G→A, p.71 G→E n.457 G→C, p.153 E→Q n.625 A→C, p.209 S→R
BK 5602, UR 17208, VA 14184, VA 11995, VA 14867	n.212 G→A, p.71 G→E n.556 G→A, p.186 A→T
UR 71, UR 9569, UR 7838, UR 8919, UR 16831, VA 29501, VA 19135	n.212 G→A, p.71 G→E n.434 C→T, p.145 A→V n.625 A→C, p.209 S→R
UR 903	n.88 C→T, p.30 H→Y n.212 G→A, p.71 G→E n.625 A→C, p.209 S→R
VA 14618, VA 14876	n.212 G→A, p.71 G→E n.237 T→A, p.79 D→E n.625 A→C, p.209 S→R
UR 958, UR 6985, UR 11118, VA 18819, VA 28868, VA 12732, VA 17914, VA 18456, VA 18463, VA 12183, VA 13664, VA 13791, VA 13745, VA 29439, VA 15480	n.212 G→A, p.71 G→E
VA 18698, UR 10225	n.212 G→A, p.71 G→E 1bp-Deletion n.455 (A)
VA 16313, VA 16959	stumme Mutation
VA 19060	nicht auswertbar
VA 13060	Wildtyp

### 3.5.3 *nalD*-Sequenzen

21 der 59 untersuchten Stämme wiesen das Wildtyp-Gen für *nalD* auf. 33 Proben zeigten verschiedene Basenaustausche, die jedoch auf die Aminosäuresequenzen keinen Einfluss haben.

Bei zwei Proben (UR 7100, VA 12732) wurden Deletionen entdeckt. Bei der zuerst genannten kam es zu einer Verschiebung des Leserahmens. Bei der anderen fehlen 21 Nukleotide (CATCCGGGCATGACCCCGAGG), d.h. sieben Aminosäuren (HPGMTPR). Bei drei Stämmen (VA 14184, VA 16566, VA 18417) kam es zu Mutationen, die in der Folge einen Aminosäureaustausch bewirken. Eine Übersicht gibt Tabelle 14.

**Tabelle 14:** *nalD*-Mutationen

Probe	<i>nalD</i> -Mutationen
VA 16566	n.562 A→G, p.188 T→A
VA 14184	n.559 G→C, p.187 D→H
VA 18417	n.98 T→A, p.33 L→Q
UR 7100	1bp del n.294 (G)
VA 12732	21bp del n.460-480 (CATCCGGGCATGACCCCGAGG)

### 3.5.4 *ampC*-Sequenzen

Die Auswertung der *ampC*-Sequenzen orientiert sich an dem Schema von Rodríguez-Martínez *et al.* aus dem Jahre 2009 (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Alle untersuchten Stämme wurden entweder in die Gruppen PDC-1, -3, -5, -8 und -10 nach Rodríguez-Martínez *et al.* eingeteilt, oder einer der hier neu erstellten Gruppen PDC-11-32 zugeordnet.

Die Gruppe PDC-1 beinhaltet die Stämme des Wildtyps. Lediglich VA 13060 zeigte keine Mutation. Bei drei Proben (UR 17208, VA 12593, VA 16313) fanden sich ausschließlich Mutationen, die keinen Aminosäureaustausch bewirkten. Diese vier Stämme wurden ebenfalls PDC-1 zugeteilt.

In allen anderen Gruppen ist in jedem Fall die Mutation p.105 T→A enthalten. Diese Mutation ist laut Rodríguez-Martínez *et al.* für ein erweitertes Hydrolysespektrum der AmpC-β-Laktamase verantwortlich. In dieser Arbeit zeigte sich diese Mutation bei 54 der 59 untersuchten Stämme. In Tabelle 15 ist zu sehen, welche Mutationen

die einzelnen PDC-Gruppen aufweisen. Die mit \* gekennzeichneten Mutationen wurden ebenfalls von Rodríguez-Martínez *et al.* beschrieben. Tabelle 16 stellt dar, welche Stämme welcher PDC-Gruppe angehören.

Zwei Stämme (VA 13745, VA 16959) sind in ihrer DNA so verändert, dass es zu einem vorzeitigen Stopcodon kommt. Durch diese Mutationen wird kein funktionsfähiges Protein hergestellt, sodass AmpC ihre Funktion verliert. Sie entsprechen den Gruppen PDC-31 und PDC-32. Alle anderen Stämme konnten nach dem Schema von Rodríguez-Martínez *et al.* eingeteilt werden.

Tabelle 15: PDC-Gruppen

PDC-Gruppe	1	3	5	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
p.21*	T				A			A														A	A		A		
p.27*	G												D	D		D	D	D	D	D							D
p.55*	A																			T							
p.79*	R		Q						Q	Q	Q	Q			Q												
p.97*	A												V														V
p.105*	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
p.155*	Q																			R							
p.176*	L			R			R																				
p.205*	V											L	L	L	L	L	L	L	M	L	L	L	L	L	L	L	L
p.356*	V												I		I		I	I	I				I		I		
p.391	G					A		A					A	A	A	A	A		A	A		P	A		A		
p.5	R																									G	
p.7	P																S	S	S								
p.23	P										S															S	
p.31	A																							T			
p.36	A																									T	
p.117	Q																									L	
p.126	R						H																				
p.170	A																									T	
p.200	L																									I	
p.204	Q																			P							

PDC-Gruppe	1	3	5	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
p.225	Q																											Stop
p.273	R																									K		
p.274	P								L																			
p.277	Q																										Stop	
p.359	R																									S		
p.365	I								V																			

\* diese Mutationen wurden ebenfalls von Rodríguez-Martínez *et al.* beschrieben.

Die von Rodríguez-Martínez *et al.* beschriebene Veränderung an p.105 T→A wird mit einer erhöhten Imipenemresistenz in Verbindung gebracht. Scheinbar ist es so, dass die AmpC-β-Laktamase durch die Mutation an p.105 ihr Wirkspektrum erweitert und als ESAC auch Carbapeneme hydrolysieren kann.

**Tabelle 16:** Zuordnung der Proben in PDC-Gruppen

PDC-Gruppe	Zugeordnete Proben
PDC- 1	UR 17208, VA 12593, VA 13060, VA 16313
PDC- 3	9610, UR 11118, VA 12562, VA 18456, VA 18463, VA 12183, VA 13664, VA 13791, VA 14184, VA 28868, VA 29439
PDC- 5	UR 7100, UR 11489, VA 13215, VA 14379, VA 14816, VA 15165, VA 18417
PDC- 8	UR 903, UR 9848, UR 10225, VA 12732, VA 15480, VA 18698
PDC- 10	VA 16942
PDC- 11	UR 958, UR 7089
PDC- 12	VA 17914
PDC- 13	VA 16931
PDC- 14	BK 5602
PDC- 15	UR 9975
PDC- 16	UR 10195
PDC- 17	VA 16566
PDC- 18	VA 14618, VA 14876
PDC- 19	BK 4460, BK 4743, UR 442, VA 19060
PDC- 20	UR 7838
PDC- 21	UR 8919, VA 29501
PDC- 22	UR 71
PDC- 23	UR 9569
PDC- 24	UR 16831
PDC- 25	VA 19135
PDC- 26	UR 6985, VA 11995
PDC- 27	VA 14224
PDC- 28	VA 14381
PDC- 29	VA 14867
PDC- 30	VA 18819
PDC- 31	VA 13745
PDC- 32	VA 16959



### 3.5.5 *oprD*-Sequenzen

Das von *oprD* codierte Porin schleust unter normalen Bedingungen Imipenem in die Zelle. Folglich wurde in dieser Studie das *oprD*-Gen auf inaktivierende Mutationen untersucht, um möglicherweise die vorliegende Imipenemresistenz erklären zu können. Es ist bekannt, dass das *oprD*-Gen eine große genetische Variabilität aufweist (Pirnay *et al.*, 2002). Einige der Mutationen, die wir gefunden haben, wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen genauer untersucht und mit einer erhöhten Carbapenemresistenz assoziiert. In dieser Studie gab es drei Stämme (VA 13060, VA 12562, VA 16313) ohne Mutation im *oprD*-Gen. Bei den Proben VA 16959, VA 14381, VA 16566, VA 15480, VA 14224, VA 14184, VA 13791, UR 903, UR 7838 und UR 10225 war die Amplifikation des *oprD*-Gens nicht möglich.

In unserem Probenkollektiv zeigten sich in *oprD* diverse Mutationen, darunter zahlreiche stille Mutationen. Bei neun Proben fanden wir Mutationen, die einen Aminosäureaustausch bewirken. Bei acht dieser Proben wurde zusätzlich ein vorzeitiges Stopcodon gefunden. Zu Leserahmenverschiebungen kam es bei sieben Stämmen aufgrund einer 1bp-Insertion, bei 16 Proben wegen einer 1bp-Deletion sowie bei einem Stamm aufgrund einer 11bp-Deletion. Dieser Deletion folgt zudem ein vorzeitiges Stopcodon. UR 11118 zeigte eine 6bp-Insertion.

Bei 14 Proben wurde die von Epp *et al.* beschriebene Mutation gefunden, welche eine erhöhte Meropenemsuszeptibilität vermitteln soll. Eine Übersicht der *oprD*-Mutationen gibt Tabelle 17.

**Tabelle 17:** Mutationen im *oprD*-Gen

Probe	<i>oprD</i> -Mutation
VA 13060, VA 12562, VA 16313	Wildtyp
BK4460, BK4743, VA 1027, VA 19060	1bp-Insertion n.1206 (C)
UR 7100	1bp-Deletion n.59 (T)
UR 8919	1bp-Deletion n.481 (A)
UR 958	1bp-Deletion n.404 (T)
UR 16831	1bp-Deletion n.416 (G)
VA 16931	1bp-Deletion n.463 (C)
VA 13664, VA 12183, UR 6985, VA 28868, VA 29439	1bp-Deletion n.89 (A)
VA 18819	11bp-Deletion n.79-89 (GTCGACGATCA)

Probe	<i>oprD</i> -Mutation
BK 5602	n.1250 TGG → TAG (Vorzeitiges Stopcodon)
UR 442	n.1018 CAG → TAG (Vorzeitiges Stopcodon)
UR 9848	n.1009 AAA → TAA (Vorzeitiges Stopcodon)
UR 9975, VA 17914	n.413 TGG → TAG (Vorzeitiges Stopcodon)
VA 14876	n.1138 AAG → TAG (Vorzeitiges Stopcodon)
VA 18456, VA 18463	n.1017 TGG → TGA (Vorzeitiges Stopcodon)
UR 11489, VA 13215, VA 14816, VA 15165	n.308 C→G p.103 T→S n.344 A→C, p.115 K→T n.508 T→C p.170 F→L
VA 16942, VA 12593, VA 19135	n.308 C→G p.103 T→S n.344 A→C, p.115 K→T n.508 T→C p.170 F→L n.553 G→C, p.178 E→Q n.556 C→G, p.186 P→G n.558 G→C, p.186 P→G n.565 G→A, p.189 V→T n.566 T→C, p.189 V→T n.928 C→G, p.310 R→E n.929 G→A, p.310 R→E n.930 C→G, p.310 R→E n.944 C→G, p.315 A→G n.945 A→C, p.315 A→G n.1274 G→C, p.425 G→A
VA 14618	n.308 C→G p.103 T→S n.344 A→C, p.115 K→T n.508 T→C p.170 F→L n.553 G→C, p.178 E→Q n.556 C→G, p.186 P→G n.558 G→C, p.186 P→G n.565 G→A, p.189 V→T n.566 T→C, p.189 V→T n.928 C→G, p.310 R→E n.929 G→A, p.310 R→E n.930 C→G, p.310 R→E n.944 C→G, p.315 A→G n.945 A→C, p.315 A→G n.1274 G→C, p.425 G→A

Probe	<i>oprD</i> -Mutation
VA 29501	n.308 C→G p.103 T→S n.344 A→C, p.115 K→T n.508 T→C p.170 F→L n.553 G→C, p.178 E→Q n.556 C→G, p.186 P→G n.558 G→C, p.186 P→G n.565 G→A, p.189 V→T n.566 T→C, p.189 V→T n.928 C→G, p.310 R→E n.929 G→A, p.310 R→E n.930 C→G, p.310 R→E n.944 C→G, p.315 A→G n.945 A→C, p.315 A→G n.1274 G→C, p.425 G→A n.1301 T→C, p.434 L→P
9610, UR 71, UR 7089, UR 9569, UR 10195, VA 12732, VA 13745, VA 14379, VA 18417, VA 18698	n.1114-1149 (ATGTCTGACAACA ACGTCGGCTATAAGA ACTACGG C → GTCGACTCCAGTTCCTCC TACGCGGGCCTG-----) entspricht „Epp-Mutation“
UR 11118	„Epp-Mutation“ und 6bp-Insertion n.1173 (CGAAAC)
VA 11995, UR 17208, VA 14867	„Epp-Mutation“ und 1bp-Insertion n.1206 (C)
VA 16959, VA 14381, VA 15480, VA 14224, VA 14184, VA 13791, UR 903, UR 7838, UR 10225, VA 16566	Amplifikation nicht möglich

### 3.5.6 Übersicht zur Sequenzauswertung

Eine Zusammenstellung aller gefundenen Mutationen der jeweiligen Isolate und der Carbapenemase-Nachweis ist in Tabelle 18 zu finden. Angegeben sind zudem nur die MHK-Werte für Meropenem, da alle untersuchten Stämme gegen Imipenem resistent waren (siehe oben).

Bei Mutationen mit Leserahmenverschiebung kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das nachfolgend entstehende Protein funktionslos ist. Somit haben diese Mutationen wahrscheinlich Einfluss auf das Resistenzverhalten der Bakterien.

**Tabelle 18:** Zusammenstellung aller gefunden Mutationen, stille Mutationen sind nicht dargestellt

Probe	Meropenem-MHK in (mg/L)	<i>nalD</i>	<i>nalC</i>	<i>mexR</i>	<i>ampC</i>	<i>oprD</i>	VIM-positiv
9610	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E p.209 S → R	1bp-Deletion n.315 (C)	PDC-3	„Epp-Mutation“	nein
BK 4460	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.153 E → Q p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-19	1bp-Insertion n.1206 (C)	ja
BK 4743	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.153 E → Q p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-19	1bp-Insertion n.1206 (C)	ja
BK 5602	3 (S)	Wildtyp	p.71 G → E p.186 A → T	Wildtyp	PDC-14	n.1250 TGG → TAG (Stopcodon)	nein
UR 10195	0,5 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-16	„Epp-Mutation“	nein
UR 10225	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E 1bp-Deletion n.455 (A)	stumme Mutationen	PDC-8	Amplifikation nicht möglich	nein
UR 11118	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	Wildtyp	PDC-3	„Epp-Mutation“, 6bp-Insertion n.1173 (CGAAAC)	nein
UR 11489	3 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-5	p.103 T→S p.115 K→T p.170 F→L	nein
UR 16831	6 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.145 A → V p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-24	1bp-Deletion n.416 (G)	nein

Probe	Meropenem-MHK in (mg/L)	<i>nalD</i>	<i>nalC</i>	<i>mexR</i>	<i>ampC</i>	<i>oprD</i>	VIM-positiv
UR 17208	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E p.186 A → T	Wildtyp	PDC-1	„Epp-Mutation“, 1bp-Insertion n.1206 (C)	nein
UR 442	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.153 E → Q p.209 S → R	p.126 V → E, p.44 K→M	PDC-19	n.1018 CAG → TAG (Stopcodon)	nein
UR 6985	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	p.126 V → E	PDC-26	1bp-Deletion n.89 (A)	ja
UR 7089	12 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-11	„Epp-Mutation“	nein
UR 71	8 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.145 A → V p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-22	„Epp-Mutation“	nein
UR 7100	> 32 (R)	1bp-Deletion n.294 (G)	p.71 G → E p.209 S → R	p.126 V → E, p.132V → A	PDC-5	1bp-Deletion n.59 (T)	nein
UR 7838	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.145 A → V p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-20	Amplifikation nicht möglich	nein
UR 8919	8 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.145 A → V p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-21	1bp-Deletion n.481 (A)	nein
UR 903	> 32 (R)	Wildtyp	p.30 H → Y p.71 G → E p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-8	Amplifikation nicht möglich	nein
UR 9569	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.145 A → V p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-23	„Epp-Mutation“	nein

Probe	Meropenem-MHK in (mg/L)	<i>nalD</i>	<i>nalC</i>	<i>mexR</i>	<i>ampC</i>	<i>oprD</i>	VIM-positiv
UR 958	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	Wildtyp	PDC-11	1bp-Deletion n.404 (T)	nein
UR 9848	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E p.209 S → R	11bp-Deletion n.65-75 (GCGCATCCAGA)	PDC-8	n.1009 AAA → TAA (Stopcodon)	nein
UR 9975	8 (R)	Wildtyp	p.71 G → E p.209 S → R	p.126 V → E, p.132V → A	PDC-15	n.413 TGG → TAG (Stopcodon)	nein
VA 1027	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.153 E → Q p.209 S → R	13bp-Deletion n.308-321 (CATCCACCAGCAT)	Auswertung nicht möglich	1bp-Insertion n.1206 (C)	ja
VA 11995	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E p.186 A → T	p.101 G → R	PDC-26	„Epp-Mutation“, 1bp-Insertion n.1206 (C)	nein
VA 12183	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	p.126 V → E	PDC-3	1bp-Deletion n.89 (A)	ja
VA 12562	1,5 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.153 E → Q p.209 S → R	Wildtyp	PDC-3	Wildtyp	nein
VA 12593	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-1	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L, p.178 E→Q, p.186 P→G, p.189 V→T, p.310 R→E, p.315 A→G, p.425 G→A	nein
VA 12732	> 32 (R)	21bp-Deletion n.460-480 (CATC CGGGCATGACC CCGAGG)	p.71 G → E	stumme Mutationen	PDC-8	„Epp-Mutation“	nein
VA 13060	1,5 (S)	Wildtyp	Wildtyp	stumme Mutationen	PDC-1	Wildtyp	nein

Probe	Meropenem- MHK in (mg/L)	<i>nalD</i>	<i>nalC</i>	<i>mexR</i>	<i>ampC</i>	<i>oprD</i>	VIM- positiv
VA 13215	1,5 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-5	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L	nein
VA 13664	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	p.126 V → E	PDC-3	1bp-Deletion n.89 (A)	ja
VA 13745	1,5 (S)	Wildtyp	p.71 G → E	Wildtyp	PDC-31	„Epp-Mutation“	nein
VA 13791	1 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E	Wildtyp	PDC-3	Amplifikation nicht möglich	nein
VA 14184	2 (S)	p.187 D → H	p.71 G → E p.186 A → T	p.126 V → E	PDC-3	Amplifikation nicht möglich	nein
VA 14224	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-27	Amplifikation nicht möglich	nein
VA 14379	2 (S)	Wildtyp	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-5	„Epp-Mutation“	nein
VA 14381	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-28	Amplifikation nicht möglich	nein
VA 14618	0,38 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.79 D → E p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-18	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L, p.178 E→Q, p.186 P→G, p.189 V→T, p.310 R→E, p.315 A→G, p.425 G→A	nein
VA 14816	2 (S)	Wildtyp	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-5	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L	nein
VA 14867	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E p.186 A → T	p.101 G→R	PDC-29	„Epp-Mutation“, 1bp-Insertion n.1206 (C)	nein

Probe	Meropenem-MHK in (mg/L)	<i>nalD</i>	<i>nalC</i>	<i>mexR</i>	<i>ampC</i>	<i>oprD</i>	VIM-positiv
VA 14876	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.79 D → E p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-18	n.1138 AAG → TAG (Stopcodon)	nein
VA 15165	6 (S)	Wildtyp	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-5	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L	nein
VA 15480	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E	p.130 T → P	PDC-8	Amplifikation nicht möglich	nein
VA 16313	8 (R)	Wildtyp	stumme Mutationen	Wildtyp	PDC-1	Wildtyp	nein
VA 16566	12 (R)	p.188 T → A	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-17	Amplifikation nicht möglich	nein
VA 16931	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-13	1bp-Deletion n.463 (C)	nein
VA 16942	0,5 (S)	Wildtyp	p.71 G → E p.209 S → R	Wildtyp	PDC-10	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L, p.178 E→Q, p.186 P→G, p.189 V→T, p.310 R→E, p.315 A→G, p.425 G→A	nein
VA 16959	4 (S)	stumme Mutationen	stumme Mutationen	im Vergleich mit PA7: 1bp-Insertion n.94 (C)	PDC-32	Amplifikation nicht möglich	nein
VA 17914	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E	stumme Mutationen	PDC-12	n.413 TGG → TAG (Stopcodon)	nein
VA 18417	> 32 (R)	p.33 L → Q	p.71 G → E p.209 S → R	stumme Mutationen	PDC-5	„Epp-Mutation“	nein
VA 18456	6 (S)	Wildtyp	p.71 G → E	Wildtyp	PDC-3	n.1017 TGG → TGA (Stopcodon)	nein



							Ergebnisse
Probe	Meropenem- MHK in (mg/L)	<i>nalD</i>	<i>nalC</i>	<i>mexR</i>	<i>ampC</i>	<i>oprD</i>	VIM- positiv
VA 18463	4 (S)	Wildtyp	p.71 G → E	Wildtyp	PDC-3	n.1017 TGG → TGA (Stopcodon)	nein
VA 18698	> 32 (R)	Wildtyp	p.71 G → E 1bp-Deletion n.455 (A)	stumme Mutationen	PDC-8	„Epp-Mutation“	nein
VA 18819	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	p.126 V → E	PDC-30	11bp-Deletion n.79-89 (GTCGACGATCA)	nein
VA 19060	> 32 (R)	stumme Mutationen	nicht auswertbar	1bp-Insertion n.81 (T)	PDC-19	1bp-Insertion n.1206 (C)	nein
VA 19135	1 (S)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.145 A → V p.209 S → R	p.126 V → E	PDC-25	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L, p.178 E→Q, p.186 P→G, p.189 V→T, p.310 R→E, p.315 A→G, p.425 G→A	nein
VA 28868	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	p.126 V → E	PDC-3	1bp-Deletion n.89 (A)	nein
VA 29439	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E	p.126 V → E	PDC-3	1bp-Deletion n.89 (A)	ja
VA 29501	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.71 G → E p.145 A → V p.209 S → R	13bp-Deletion n.367-389 (CTCACCCCGGT GG)	PDC-21	p.103 T→S, p.115 K→T, p.170 F→L, p.178 E→Q, p.186 P→G, p.189 V→T, p.310 R→E, p.315 A→G, p.425 G→A, p.434 L→P	nein

## 4 Diskussion

*P. aeruginosa* spielt im Rahmen nosokomialer Infektionen eine besondere Rolle. Circa zehn Prozent der im Krankenhaus erworbenen Infektionen werden durch dieses Bakterium ausgelöst (Suárez *et al.*, 2009). Aufgrund seiner zahlreichen Antibiotikaresistenzen ist die Behandlung dieses Keimes besonders schwierig (Hancock und Speert, 2000). Immer häufiger lassen sich Berichte über steigende Raten multiresistenter *Pseudomonaden* finden (Tam *et al.*, 2010, Robert Koch-Institut: ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: 29.08.2014).

Die Gene zur Resistenzbildung sind entweder chromosomal codiert oder befinden sich auf Plasmiden (Lister *et al.*, 2009). Die vorliegende Studie soll aufzeigen, wie es bei *P. aeruginosa* zu einer vermehrten Antibiotikaresistenz kommt. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den molekularen Veränderungen, die zu einer gesteigerten Carbapenemresistenz führen. Das können unter anderem Mechanismen sein, die dazu führen, dass vermehrt Antibiotika abgebaut, oder aus der Zelle ausgeschleust werden oder, dass die verabreichten Medikamente nicht in die Zellen gelangen. Dafür wurden die Gene *nalC*, *nalD*, *mexR*, *ampC* und *oprD*, welche in engen Zusammenhang mit Carbapenemresistenz gebracht werden, analysiert. Zudem wurde versucht, Carbapenemasen in den erfassten *Pseudomonas*-Stämmen nachzuweisen. Die genetische Verwandtschaft wurde zur Analyse der Ausbreitungswege im Krankenhaus mittels Pulsfeldgelelektrophorese untersucht.

### 4.1 Auswertung und Beurteilung der Antibiogramme

Die Auswahl der Bakterienproben aus dem Routinelabor erfolgte aufgrund einer Resistenz gegen mindestens ein Carbapenem. Zu Beginn der Arbeit wurde für jede Probe ein Antibiogramm erstellt. Getestet wurden dabei die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Ceftazidim und Ciprofloxacin. Lediglich acht Stämme waren alleine gegen Imipenem resistent. 15 Stämme waren gegen zwei verschiedene Antibiotika resistent. Die anderen 41 Proben waren gegen mindestens drei der von uns getesteten Antibiotika resistent; das entspricht 80,4 % der getesteten Stämme.

### 4.2 Nachweis von Carbapenemasen

Carbapenemasen vermitteln eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegen Carbapeneme (Patel und Bonomo, 2013). Sie werden nach Ambler-Klassifikation in die Gruppen A, B

und D eingeteilt. Allen gemeinsam ist die Fähigkeit, mehr oder minder effektiv Aminopenicilline, Ureidopenicilline und Carbapeneme zu hydrolysieren. Einige Carbapenemasen der Gruppe A (NmcA, Sme-1 bis Sme-3, IMI-1) und die Klasse D Carbapenemase OXA-48 haben, im Gegensatz zu Enzymen der anderen Untergruppen, keine Wirksamkeit gegen extended-spectrum-Cephalosporine. Das Monobactam Aztreonam wird von den Carbapenemasen der Gruppe B (MBL) nicht abgebaut (Nordmann und Poirel, 2002). Zur Aufklärung der Carbapenemresistenz bei unserem Bakterien wurde das Kollektiv auf das Vorliegen dieser Enzyme untersucht. Außer der Metallo- $\beta$ -Laktamase VIM-2 konnte in dieser Studie keine andere Carbapenemase nachgewiesen werden.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Carbapenemasen in Deutschland nicht weit verbreitet sind. Daten aus dem „Epidemiologischen Bulletin“ 19/2013 zeigen jedoch, dass die Ausbreitung von Keimen mit Carbapenemasen zugenommen hat (Nationales Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger 2013). Der erste VIM-Nachweis in Deutschland gelang Henrichfreise *et al.* 2005. Die Forschungsgruppe wies VIM-2 in einem im Jahre 2003 isolierten *P. aeruginosa*-Stamm von einer Leukämie-Patientin aus Berlin nach. Außerdem wurde von Schneider *et al.* 2007 über einen Patienten aus München berichtet, der mit einem VIM-2-positiven *Pseudomonas*-Stamm besiedelt war. Weitere Meldungen bezüglich der Metallo- $\beta$ -Laktamase VIM-2 gab es unter anderem 2010 von einer urologischen Station in Würzburg (Elias *et al.*, 2010). In einer Studie von Valenza *et al.* 2010 aus Würzburg waren von 489 getesteten Bakterienproben sieben Stämme VIM-2-positiv (1,4%). In dieser Studie konnte bei sieben von 59 Stämmen (12%) mittels PCR, Sequenzierung und EDTA-Test die Metallo- $\beta$ -Laktamase (MBL) VIM-2 nachgewiesen werden. Seit dem ersten Fund 1996 in Frankreich, konnte die VIM-2 bei gram-negativen Bakterien weltweit in mehr als 50 Ländern nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2011).

Im Epidemiologischen Bulletin 19/2013 wird das Vorkommen von Carbapenemasen in Deutschland beschrieben. So ist nachzulesen, dass bei 786 getesteten *Pseudomonas*-Isolaten mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen der Anteil an Carbapenemase-produzierenden Isolaten 21,9% betrug. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die VIM-2 in sieben der 59 untersuchten Isolate nachgewiesen. Das entspricht etwa 12% der Proben. Metallo- $\beta$ -Laktamasen vom VIM-2- Typ sind mit 58,1% die häufigsten Carbapenemasen bei *P. aeruginosa* (Epidemiologisches Bulletin, 19/2013). Bei *Enterobacteriaceae* hingegen ist OXA-48 die am häufigsten gefundene Carbapenemase. Die VIM-1-Metallo- $\beta$ -Laktamase ließ sich am häufigsten in

*Enterobacteriaceae* nachweisen. Die Metallo- $\beta$ -Laktamasen GIM-1 und NDM-1 konnten ebenfalls in dem Probenkollektiv des NRZ bei *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Die GIM-1 wurde bisher - bis auf eine Ausnahme in Sachsen - nur in Nordrhein-Westfalen gefunden (Kaase *et al.* 2013). In Sachsen konnte gehäuft die KPC-2 bei *K. pneumoniae* nachgewiesen werden. Die KPC-3 war durch das NRZ vorwiegend bei eingesandten Isolaten aus Berlin nachweisbar. Die insgesamt am häufigsten gefundene Carbapenemase in Deutschland ist die OXA-48 (Epidemiologisches Bulletin 19/2013).

Laut einer im Februar 2013 veröffentlichten europäischen Studie des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (Glasner *et al.*, 2013) liegen die Prävalenzraten von Carbapenemasen in Deutschland mit nur sporadisch gemeldeten, Krankenhaus bezogenen Ausbrüchen im Vergleich mit 39 Ländern im Mittelfeld. In Europa zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle bezüglich der Carbapenemase-Vorkommen (Glasner *et al.*, 2013). In Griechenland wird deren Vorkommen bereits als endemisch beschrieben, während hingegen aus Nordeuropa/Skandinavien lediglich sporadische Vorkommen oder nur Fälle in einzelnen Krankenhäusern gemeldet werden (Canton *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Studie konnte mittels Pulsfeldgelelektrophorese gezeigt werden, dass es sich bei den VIM-2-positiven Stämmen um zwei unterschiedliche Pulsotypen handelte. Dabei wurde deutlich, dass die drei Stämme des Pulsotyps 1, die alle von derselben Station isoliert wurden, genetisch verwandt sind. Bei dieser Station handelt es sich um eine Knochenmarkstransplantationsstation. Patienten dort haben generell ein geschwächtes Immunsystem und sind anfällig für Infektionen mit fakultativ pathogenen Keimen wie *P. aeruginosa*. Es lässt sich also vermuten, dass es sich bei diesem Ausbruch um ein stationsinternes, krankenhaushygienisches Problem handelt. Stämme des Pulsotyps 2 wurden hingegen von verschiedenen Stationen des UKE isoliert.

Im Zuge des VIM-2-Nachweises wurde neben der Imipenemresistenz von Valenza *et al.* 2010 zusätzlich eine 100% Ceftazidimresistenz durch diese Metallo- $\beta$ -Laktamase beschrieben. In dieser Studie zeigen sechs der sieben VIM-2-positiven Stämme neben der Imipenemresistenz auch eine verminderte Sensibilität für Ceftazidim. Mit einer MHK von 8  $\mu$ g/ml ist der einzige sensible Stamm jedoch sehr nah am klinischen Breakpoint, d.h. es müssen hohe Dosen (3 x 2g) Ceftazidim verabreicht werden, um eine ausreichende Wirkung des Antibiotikums zu erzielen (EUCAST, 2014).

Gomes Franco *et al.* haben 2010 bei den von ihnen untersuchten VIM-2-positiven Stämmen eine 100%ige Co-Resistenzrate gegen Ceftazidim, Cefepim, Gentamicin,

Tobramycin, Ciprofloxacin und Meropenem feststellen können. Die in dieser Studie gefundenen VIM-2-Stämme waren zu 100% gegen Imipenem, Meropenem und Ciprofloxacin resistent. Vier der sieben Stämme sind zudem gegen Gentamicin resistent. Tobramycin und Cefepim wurden im Rahmen dieser Analyse nicht getestet.

### 4.3 Imipenemresistenz

Alle hier getesteten Stämme sind gegen das Carbapenem Imipenem resistent. Als Hauptursache für eine Imipenemresistenz wird eine verminderte Expressionsrate des Membranproteins OprD verantwortlich gemacht (Livermore *et al.*, 2001). Eine weitere Erklärung der Imipenemresistenz ist die Expression von sogenannten expanded-spectrum-AmpC- $\beta$ -Laktamasen (ESAC), welche eine erhöhte hydrolytische Aktivität gegen Imipenem aufweisen (Nordmann und Mammeri 2007).

#### 4.3.1 *oprD*-Mutationen

Die äußere Membran von *P. aeruginosa* ist für verschiedene Moleküle von Natur aus schlecht permeabel (Lister *et al.*, 2009). Daraus resultiert bereits eine natürliche Resistenz gegen viele Antibiotika (Li *et al.*, 1995).

Das Porin OprD ist im Zusammenhang mit Carbapenemresistenz von besonderer Bedeutung. Carbapeneme gehören in die Gruppe der hydrophilen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Ihr Wirkungsort liegt im Zellinneren. Da  $\beta$ -Laktame nicht einfach durch die Zellwand diffundieren können, benötigen sie zur Überwindung der Zellwand von gram-negativen Bakterien spezielle Poren, wie zum Beispiel die OprD-Porine (Nikaido, 1989). Wenn es aufgrund inaktivierender Mutationen zu einer Reduktion der Porinproduktion kommt, können diese Antibiotika nicht mehr in die Zelle gelangen und verlieren ihre Wirksamkeit (Köhler *et al.*, 1999). In früheren Studien fielen imipenemresistente Stämme durch das Fehlen des OprD-Porins auf (Yoneyama und Nakae, 1993, Pirnay *et al.* 2002, Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009).

Gutiérrez *et al.* beschrieben 2007 verschiedene Mutationen, die für eine Inaktivierung des *oprD*-Gens und somit folglich für eine erhöhte Imipenemresistenz verantwortlich sind. Dazu zählen Deletionen und Insertionen mit konsekutiver Verschiebung des Leserahmens, vorzeitige Stopcodons und Insertionssequenzen (IS). Durch solche inaktivierenden Mutationen wird die OprD-Produktion gestört, die Zellwand wird weniger durchlässig (Yoneyama und Nakae, 1993). Die in dieser Studie gefunden inaktivierenden Mutationen im *oprD*-Gen lassen somit alle vermuten, dass es bei diesen Stämmen zu keiner adäquaten OprD-Produktion kommt, der Einstrom für Imipenem gestört ist und die Bakterien auf diesem Wege imipenemresistent werden (Köhler *et al.*,

1999).

In dieser Arbeit fanden sich bei sieben Proben 1bp-Insertionen mit nachfolgenden Leserahmenverschiebungen. Außerdem wurde bei zehn Proben eine 1bp-Deletion mit konsekutiver Leserahmenverschiebung gefunden. Bei diesen Bakterienstämmen ist davon auszugehen, dass die Porinproduktion fehlerhaft verläuft, die Membranporen ihre Funktion nicht erfüllen und somit Imipenem nur noch vermindert in die Zelle gelangen kann.

Yoneyama und Nakae beschrieben bereits 1993 Mutationen im Protein D2 (heute OprD), die sie bei imipenemresistenten *Pseudomonaden* fanden. Eine der Mutationen war eine Deletion von elf Basenpaaren. In der Folge kam es zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stopcodon. Weitere Untersuchungen ergaben, dass zwar RNA produziert wurde, das Protein jedoch nicht in der Zellwand zu finden war. Eine ähnliche Mutation wurde auch in der hier vorliegenden Studie bei Probe VA 18819 gefunden: eine Deletion von elf Basenpaaren von n.79 bis n.89 und in der Folge ein Stopcodon an p.73, welches durch die resultierende Leserahmenverschiebung entsteht. Pirnay *et al.* untersuchten 2002 ebenfalls Mutationen im *oprD*-Gen. Durch die DNA-Veränderung n.32 T → C, p.11 L → Q kam zu Veränderungen im Signalpeptid für die *oprD*-Expression. Diese Mutation haben wir in VA 13745 gefunden. Durch die Mutationen n.1018 CAG → TAG und n.413 TGG → TAG kam zu einem vorzeitigen Stopcodon. Bei den imipenemresistenten Stämmen UR 442, UR 9975 und VA 17914 haben wir jeweils eine der Mutationen gefunden. Acht weitere unserer imipenemresistenten Stämme (MHK-Werte > 32mg/L) zeigten an anderen Positionen ebenfalls ein vorzeitiges Stopcodon. Auch hier ist davon auszugehen, dass kein funktionsfähiges OprD-Porin mehr synthetisiert wird. Durch die Entstehung von vorzeitigen Stopcodons in *oprD* kann somit bei elf Proben die Imipenemresistenz erklärt werden.

Bei weiteren neun Proben fanden sich zahlreiche unterschiedliche Mutationen mit Aminosäureaustausch. Diese Mutationen wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die Bedeutung dieser Veränderungen im Bezug auf die Funktionalität des Membranporins und auf die Imipenemresistenz dieser Stämme ist noch unklar. Hier ist zu diskutieren, ob es sich bei den Mutationen lediglich um Polymorphismen handelt oder tatsächlich funktionelle Mutationen vorliegen. Zur weiteren Abklärung sind Komplementierungsversuche mit dem Wildtyp-*oprD* und anschließende Resistenzbestimmungen notwendig.

Zur besseren Bewertung der *oprD*-Mutationen lassen sich besonders gut imipenemresistente Proben diskutieren, die weder in *ampC* Veränderungen aufweisen

oder eine VIM-2 tragen (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Proben mit Wildtyp AmpC und verändertem *oprD*

AmpC PDC-1	<i>oprD</i> -Mutation	MHK für Imipenem	MHK für Meropenem	VIM-2
UR 17208	„Epp-Mutation“, 1bp-Insertion n.1206 (C)	> 32mg/l (R)	> 32mg/l (R)	nein
VA 12593	p.103 T→S p.115 K→T p.170 F→L p.178 E→Q	> 32mg/l (R)	> 32mg/l (R)	nein
VA 13060	Wildtyp	> 32mg/l (R)	1,5mg/l (S)	nein
VA 16313	Wildtyp	> 32mg/l (R)	8mg/l (R)	nein

Bei Probe UR 17208 ist aufgrund der fehlenden *ampC*-Mutationen und nicht nachweisbarer VIM-2 die Imipenemresistenz mit der 1bp-Insertion an n.1206 erklärbar. Gutiérrez *et al.* beschrieben bereits, dass 1bp-Insertionen und -Deletionen in diesem Gen zu einem veränderten Resistenzverhalten führen können.

Bei Stamm VA 12593 ließen sich diverse Mutationen nachweisen, die zu einem Aminosäureaustausch geführt haben. Jedoch findet sich kein Stopcodon, keine Leserahmenverschiebung oder irgendeine andere Veränderung, die die Imipenemresistenz erklären könnte. In nachfolgenden Untersuchungen, wie beispielsweise Komplementierungsversuchen mit dem Wildtyp-Gen, ist es nun nötig, die Bedeutung der einzelnen Mutationen zu untersuchen.

Aus vorherigen Studien scheint klar zu sein, dass auch ein isolierter kompletter OprD-Verlust zu einer Imipenemresistenz führt (Aogáin *et al.*, 2012); die MHK-Werte für Imipenem steigen dadurch von 1-2mg/l auf 8–32mg/l (Livermore, 2001). Die Auswirkung auf die Imipenemresistenz von Mutationen im *oprD*-Gen, die zu einer reduzierten, aber nicht ganz aufgehobenen OprD-Produktion führen, sind hingegen nicht ganz eindeutig zu klären. So berichten El Amin *et al.* (2005) beispielsweise von einer Probe, bei der der MHK-Wert für Imipenem bei 8mg/l lag, die OprD-Expression jedoch überraschenderweise lediglich beim 0,004-fachen Wert im Vergleich zum Wildtyp lag. Aogáin *et al.* gehen davon aus, dass in solchen Fällen eine Kombination aus verminderter OprD-Expression und induzierter AmpC zu einer Imipenemresistenz führt.

Besonders interessant sind die Ergebnisse bei VA 13060 und VA 16313. Beide Stämme zeigen in *ampC* und *oprD* die Wildtypsequenz, auch eine Metallo-β-Laktamase war hier

nicht nachzuweisen und trotzdem sind beide Stämme gegen Imipenem resistent. Hier wird deutlich, dass es noch weitere Mechanismen geben muss, die zu dem veränderten Resistenzverhalten führen. Mechanismen zur negativen Regulierung der *oprD*-Expression beeinflussen entweder die Transkription oder die Translation, so Lister *et al.* (2009). Zur Beeinträchtigung der Transkription kann es unter anderem durch die oben genannten und von uns untersuchten Veränderungen im Strukturgen kommen. Weiterhin sind zum Beispiel Veränderungen der Promotorregion, die Anwesenheit von beispielsweise Zink, Kupfer oder Salicylsäure oder eine inverse Ko-Regulierung mit Effluxsystemen Möglichkeiten, die die Porin-Produktion negativ beeinflussen:

Bei Kontakt z.B. mit Zink oder Kupfer kommt es zu einer gesteigerten Expression des Efflux-Systems CzcCBA mit seinen Regulatorgenen *czcR* und *czcS*, gleichzeitig wird die Expressionsrate für *oprD* herunter gefahren. Verantwortlich hierfür ist CopR, ein negativer Regulator für die *oprD*-Expression (Caille *et al.*, 2007).

Laut Ochs *et al.* (1999) ist Salicylsäure in der Lage, durch eine Reduktion der *oprD*-Expression um das 3,3-fache eine 16-fach gesteigerte Imipenemresistenz zu verursachen. Für das Efflux-System MexEF-OprN ist eine inverse Ko-Regulierung mit der *oprD*-Expression beschrieben: MexT gilt als Repressor für *oprD*, bei dessen Überexpression es durch verminderte OprD-Produktion zu einem zwei- bis vierfachen Anstieg der Imipenemresistenz kommt (Ochs *et al.*, 1999). Zusätzlich aktiviert MexT die Expression der Effluxpumpe MexEF-OprN. In diesem Zusammenhang wird auch die Funktion von MexS diskutiert. MexS befindet sich stromaufwärts von *mexT* und codiert eine Oxidoreduktase/Dehydrogenase, durch dessen Inaktivierung bzw. Verlust kommt es zu einem vermehrten Anfall von Metaboliten, wodurch die Expression von *mexT* gesteigert wird. Somit wird konsekutiv auch die Expression von *oprD* negativ beeinflusst. Durch die gesteigerte Expression der Efflux-Pumpe MexEF-OprN und die verminderte OprD-Produktion kommt es zu einer gesteigerten Resistenz gegen Fluoroquinolone, Chloramphenicol, Trimethoprim und gegen das Carbapenem Imipenem. Bei diesen Stämmen handelt es sich um sogenannte *nfxC*-Mutanten (Sobel *et al.*, 2005a).

Eine weitere Ko-Regulierung ist für die Efflux-Pumpe MexXY mit verschiedenen Regulationsmechanismen bekannt, welche als Hauptursache für Resistenzen gegen Aminoglykoside, Fluorchinolone und einige Cephalosporine gilt (Guénard *et al.*, 2014). Hier beeinflusst das Regulatorsystem ParRS nach Mutationen nicht nur die Expression der Efflux-Pumpe positiv, sondern auch die Expression von *oprD* negativ (Muller *et al.*, 2011, Fournier *et al.*, 2013).

All diese genannten möglichen Veränderungen, die die Expression von *oprD* verringern



wurden bei unseren Proben bisher nicht untersucht. Hier sind also zur Klärung der Imipenemresistenz weitere Untersuchungen notwendig.

Für VA 16959, VA 14381, VA 16566, VA 15480, VA 14224, VA 14184, VA 13791, UR 903, UR 7838 und UR 10225 war es auch nach mehreren Versuchen nicht möglich, das *oprD*-Gen zu amplifizieren. Gründe hierfür könnten beispielsweise Insertionssequenzen (Diene *et al.*, 2013) oder auch große Deletionen, welche das ganze Gen oder größere Teile davon betreffen, sein. Auch ist es möglich, dass es zu Mutationen an den Bindungsstellen der Primer gekommen ist und so die Amplifikation nicht ablaufen konnte.

#### 4.3.2 *ampC*-Mutationen

AmpC hydrolysiert Amino- und Ureidopenicilline, Cephامycin, Oxyiminocephalosporine (Ceftazidim, Cefotaxim, Ceftriaxon) und Monobactame. Nicht abgebaut werden Carbapeneme (Hancock und Bellido, 1996).

Durch Veränderungen in der Aminosäuresequenz (Insertionen, Deletionen und Austausch von Aminosäuren) kommt es zur Bildung einer ESAC (extended-spectrum-AmpC-β-Laktamase), sodass sich die Substratspezifität der AmpC-β-Laktamase erweitert (Mammeri *et al.*, 2004). Zur Erweiterung des Hydrolysespektrums müssen die strukturellen Veränderungen in einer der vier folgenden Regionen liegen: H-2 Helix (Raimondi *et al.*, 2001), im V-Loop (Hidri *et al.*, 2005), in der Nähe der H-10 Helix (Vakulenko *et al.*, 2002) oder am terminalen C des Proteins (Mammeri *et al.*, 2004). Durch diese molekularen Veränderungen kommt es zu einer erhöhten katalytischen Aktivität gegen extended-spectrum-β-Laktame (Ceftazidim, Cefotaxim, Cefepim) und in einigen Fällen auch gegen Imipenem (Nordmann und Mammeri, 2007).

Im Hinblick auf die hier untersuchte Carbapenemresistenz spielt deshalb ein von Rodríguez-Martínez *et al.* 2009 beschriebener Aminosäureaustausch an p.105 eine Rolle, bei dem Threonin gegen Alanin ausgetauscht wird. Diese Mutation liegt in der H-2-Helix des Proteins. In der Folge können laut Rodríguez-Martínez *et al.* ebenfalls Carbapeneme hydrolysiert werden, der MHK-Wert für Imipenem steigt um das Vierfache an.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde das *ampC*-Gen imipenemresistenter Stämme mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen mit der des Wildtyps verglichen. Wie bei Rodríguez-Martínez *et al.* wurden die Bakterienstämme mit gleichen Mutationen in PDC (*Pseudomonas*-derived-cephalosporinase)-Subgruppen eingeteilt. Dabei wurde die Einteilung von Rodríguez-Martínez *et al.* um 22 Gruppen erweitert.

In allen PDC-Gruppen (im Vergleich zu PDC-1= Wildtyp) ist es zu einem Austausch von Threonin zu Alanin an Position 105 gekommen. Rodríguez-Martínez *et al.* haben bei allen Proben mit diesem Aminosäureaustausch eine verminderte Sensibilität bzw. erhöhte Resistenz gegen Imipenem und Oxyiminocephalosporine (Cephalosporine der 3. Generation) festgestellt. Erklärt wird das durch die Position der Mutation im H2-Motiv. Das Alanin an Position 97, das in PDC-19 zu einem Valin mutiert ist, ist ebenfalls in dieser Helix lokalisiert. Ausschlaggebend ist hier die Nähe zum aktiven Zentrum im Bereich Serin64. Diese Aminosäure ist an der Loopbildung beteiligt (Raimondi *et al.*, 2001), sodass durch eine Mutation die Struktur des Proteins verändert wird. Dieser Prozess wurde bereits in mehreren Arbeiten für eine Erweiterung des Hydrolyse-Spektrums der AmpC-Cephalosporinase verantwortlich gemacht (Mammeri *et al.*, 2004, Raimondi *et al.*, 2001).

In unserer Studie wurde bei 54 Stämmen der Aminosäureaustausch an p.105 gefunden, laut Rodríguez-Martínez *et al.* müsste hier also eine ESAC vorliegen. Die wirkliche Auswirkung auf die Carbapenemresistenz ist jedoch ohne weitere Untersuchungen schwierig zu beurteilen denn: in zehn Fällen konnte *oprD* nicht amplifiziert werden, in sechs Proben fanden sich Aminosäureaustausche in *oprD*, deren Bedeutung für die Carbapenemresistenz noch nicht klar sind, in zehn Fällen zeigte sich die von Epp *et al.* beschriebene Mutation im *oprD*-Gen und in 27 Proben fanden wir inaktivierende Mutationen, wie zum Beispiel 1-bp-Insertionen oder -Deletionen in *oprD*. Es liegt somit am ehesten eine additive Wirkung der verschiedenen Resistenzmechanismen vor, bei denen wohl aber die inaktivierenden Mutationen in *oprD* die größte Rolle spielen (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009, Aogáin *et al.*, 2012), da bei fehlendem OprD-Porin die Imipenem-MHK auf Werte > 32mg/l ansteigt (Nikaido 2003, Riera *et al.*, 2011). In nur einer Probe (VA 12562) konnte weder eine Mutation in *oprD* noch eine VIM nachgewiesen werden. Hier liegen entweder weitere, von uns nicht untersuchte Resistenzmechanismen wie zum Beispiel die oben genannten negativen Regulationsmechanismen für die Expression von *oprD* vor oder aber die ESAC führt hier zur Imipenemresistenz. Eine ähnliche Probe wurde von Rodríguez-Martínez *et al.* 2010 untersucht. Hier lag an p.105 der Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin vor, jedoch zeigte sich in *oprD* die Wildtypsequenz und AmpC wurde nicht überexprimiert. Der MHK-Wert für diese Probe lag im intermediären Bereich bei 4µg/ml.

Kritisch bewertet wurde die Auswirkung der Mutation an p.105 auf die Imipenemresistenz von Zamorano *et al.* (2010), da in der dortigen Studie Proben mit

dieser Mutation keine Veränderung der MHK für Imipenem zeigten.

Vier Stämme (UR 17208, VA 12593, VA 13060, VA 16313) weisen an p.105 keine Mutation auf und gehören somit in die Gruppe PDC-1. Hier muss die Ursache für die vorliegende Imipenemresistenz woanders liegen. Zu untersuchen sind beispielsweise Expressionslevel, Promotorregionen oder Transkriptionsfaktoren von *ampC* sowie *oprD*. Drei Proben zeigten sowohl in *oprD* als auch in *ampC* keine Veränderungen. Hier ist der Mechanismus der Imipenemresistenz also noch nicht aufgeklärt. Bei zwei Proben wurde in *ampC* die Wildtyp-Sequenz nachgewiesen. Die hier in *oprD* gefundenen Mutationen bzw. einmal auch das Vorliegen einer VIM-2 können hier die Imipenemresistenz erklären.

Tabelle 20 fasst zusammen, welche molekularen Veränderungen, die mit einer Imipenemresistenz in Verbindung gebracht wurden, in unserem Probenkollektiv gefunden wurden. Bei vielen von uns gefundenen *oprD*-Mutationen ist die funktionelle Relevanz noch nicht belegt und über die alleinige Auswirkung auf die Imipenemresistenz der *ampC*-Variante mit der Mutation an p.105 wird noch diskutiert.

**Tabelle 20:** Mutationen, die in Zusammenhang mit einer gesteigerten Imipenemresistenz stehen

Probennummer	<i>oprD</i> -Mutationen	ESAC	VIM-2	Erklärung für die Imipenemresistenz
9610	Epp-Mutation	+	-	teilweise
BK 4460	1bp-Insertion	+	+	ja
BK 4743	1bp-Insertion	+	+	ja
BK 5602	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
UR 10195	Epp-Mutation	PDC-1	-	nein
UR 10225	n.a.	+	-	teilweise
UR 11118	6bp-Insertion, Epp-Mutation	+	-	unklar
UR 11489	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise
UR 16831	1bp-Deletion	+	-	ja
UR 17208	1bp-Insertion, Epp-Mutation	PDC-1	-	ja
UR 442	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
UR 6985	1bp-Deletion	+	+	ja
UR 7089	Epp-Mutation	+	-	teilweise
UR 71	Epp-Mutation	+	-	teilweise
UR 7100	1bp-Deletion	+	-	ja
UR 7838	n.a.	+	-	teilweise
UR 8919	1bp-Deletion	+	-	ja

Probennummer	<i>oprD</i> -Mutationen	ESAC	VIM-2	Erklärung für die Imipenemresistenz
UR 903	n.a.	+	-	teilweise
UR 9569	Epp-Mutation	+	-	teilweise
UR 958	1bp-Deletion	+	-	ja
UR 9848	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
UR 9975	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
VA 1027	1bp-Insertion	PDC-1	+	ja
VA 11995	1bp-Insertion, Epp-Mutation	+	-	ja
VA 12183	1bp-Deletion	+	+	ja
VA 12562	Wildtyp	+	-	teilweise
VA 12593	Aminosäure-Austausch	PDC-1	-	unklar
VA 12732	Epp-Mutation	+	-	teilweise
VA 13060	Wildtyp	PDC-1	-	nein
VA 13215	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise
VA 13664	1bp-Deletion	+	+	ja
VA 13745	Epp-Mutation	+	-	teilweise
VA 13791	n.a.	+	-	teilweise
VA 14184	n.a.	+	-	teilweise
VA 14224	n.a.	+	-	teilweise
VA 14379	Epp-Mutation	+	-	ja
VA 14381	n.a.	+	-	teilweise
VA 14618	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise
VA 14816	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise
VA 14867	1bp-Insertion, Epp-Mutation	+	-	ja
VA 14876	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
VA 15165	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise
VA 15480	n.a.	+	-	teilweise
VA 16313	Wildtyp	PDC-1	-	nein
VA 16566	n.a.	+	-	ja
VA 16931	1bp-Deletion	+	-	ja
VA 16942	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise
VA 16959	n.a.	+	-	teilweise
VA 17914	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
VA 18417	Epp-Mutation	+	-	teilweise
VA 18456	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
VA 18463	Vorzeitiges Stopcodon	+	-	ja
VA 18698	Epp-Mutation	+	-	teilweise

Probennummer	<i>oprD</i> -Mutationen	ESAC	VIM-2	Erklärung für die Imipenemresistenz
VA 18819	11bp-Deletion	+	-	ja
VA 19060	1bp-Insertion	+	-	ja
VA 19135	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise
VA 28868	1bp-Deletion	+	-	ja
VA 29439	1bp-Deletion	+	+	ja
VA 29501	Aminosäure-Austausch	+	-	teilweise

+ : nachgewiesen, - : nicht nachgewiesen, n.a. : Sequenz nicht analysiert

Die Imipenemresistenz ist meist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt und ein Zusammenspiel unter anderem aus einer verminderten OprD-Produktion, einer gesteigerte AmpC-Aktivität bzw. ESAC und der Wirkung von Carbapenemasen (Quale *et al.*, 2006, Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Weitere Mechanismen, die zu einer Imipenemresistenz führen können, stehen zum Beispiel in Zusammenhang mit Mutationen in *mexT* und *mexS*, in *czcR* und *czcS* sowie in *parR* und *parS*, die in Verbindung mit einer verminderten OprD-Produktion gebracht werden.

## 4.4 Meropenemresistenz

Als Ursache für eine Meropenemresistenz steht eine Überexpression der MexAB-OprM-Effluxpumpe im Mittelpunkt (Li *et al.*, 1995, El Amin *et al.*, 2005). Zu solch einer Überexpression kann es in Folge von Mutationen in den Regulatorgenen *mexR*, *nalC* und *nalD* kommen (Poole *et al.*, 1996, Daigle *et al.*, 2007). Deswegen wurden im Zuge dieser Studie diese drei Regulatorgene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen mit den Wildtyp-Genen verglichen. Die gesteigerte Meropenemresistenz ist weiterhin für die sieben Stämme erklärbar, bei denen eine VIM-2-Carbapenemase gefunden wurde. Eine Meropenemresistenz besteht bei 40 der 59 getesteten Stämme.

### 4.4.1 Auswirkungen der *mexR*-Mutationen

Ein möglicher Mechanismus für eine Resistenz gegen Meropenem sind Mutationen im *mexR*-Gen. Diese sogenannten nalB-Mutanten wurden auch in dieser Studie gefunden. Wenn es durch Insertion, Deletion oder Punktmutationen zu einer *mexR*-Inaktivierung kommt, wird die Produktion von MexAB-OprM nicht mehr reprimiert, sie kann vermehrt produziert werden (Poole *et al.*, 1996). Die Bakterien sind dann in der Lage, Meropenem vermehrt auszuschleusen und somit die Wirkung abzuschwächen. Laut Riera *et al.* (2011) steigt die Meropenem-MHK durch einen MexR-Verlust von 0,38mg/l

auf 2mg/l.

Ziha-Zarifi *et al.* haben bereits 1999 die Mutation n.377 T→A, p.126 V→E beschrieben und mit Meropenemresistenz in Zusammenhang gebracht. Gefunden wurde diese Mutation damals bei fünf multiresistenten Stämmen (Ziha-Zarifi *et al.*, 1999). Die gleiche Mutation wurde auch von Srikumar *et al.* 2000 beschrieben. Allerdings haben Campo Esquisabel *et al.*, 2011 ebenfalls die Mutation n.377 T→A, p.126 V→E untersucht. Den damaligen Ergebnissen zufolge, scheint dieser Aminosäureaustausch für eine Veränderung der Meropenemresistenz nicht ausschlaggebend zu sein, da Campo Esquisabel *et al.* diese Mutation auch bei sensiblen Stämmen nachweisen konnten. In der vorliegenden Studie zeigen 23 Proben diese Mutation, diese Häufigkeit spricht am ehesten für einen Polymorphismus und stützt somit die Aussage von Campo Esquisabel *et al.*. 14 dieser Proben waren mit einem MHK-Wert > 32µg/ml resistent gegen Meropenem. Sechs Stämme wurden als intermediär resistent getestet, drei Proben waren trotz der Mutation n.377 T→A, p.126 V→E sensibel für Meropenem. Hier handelt es sich also um eine Mutation, die eventuell in Kombination mit anderen Mechanismen für eine Meropenemresistenz sorgt, jedoch nicht alleine dafür verantwortlich gemacht werden kann. Hier sind weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel Komplementierungsversuche notwendig, um die Mutation funktionell beschreiben zu können.

Srikumar *et al.* 2000 berichteten weiter von einer Insertion an n.81 (T), die eine Leserahmenverschiebung nach sich zieht. Hierdurch müsste es ebenfalls zu einem weniger funktionstüchtigen bzw. fehlenden Protein MexR kommen. Diese Mutation wurde bei einem Stamm dieser Studie nachgewiesen. Die MHK für Meropenem dieser Probe ist > 32µg/ml, d.h. sie ist resistent.

Außerdem wurden folgende Mutationen in *mexR*, die mit einer Meropenemresistenz einhergehen, in der Untersuchung gefunden: Bei VA 19060 kam es zu einer 1bp-Insertion. Diese Mutation verschiebt den Leserahmen und verhindert die Produktion des Proteins. Die MHK für Meropenem liegt hier bei > 32µg/ml. Vier weitere Proben (9610, UR 9848, VA 1027, VA 29501) zeigten verschieden große Deletionen. Hier kommt es zu einer Verkürzung des Proteins mit wahrscheinlich folgendem Funktionsverlust. Die Resistenztestung ergab für alle vier Proben eine MHK von > 32µg/ml. Anzumerken ist noch, dass VA 1027 zudem eine VIM-2 trägt, welche ebenfalls die Meropenemempfindlichkeit beeinflusst.

Der Effluxregulator MarR von *E. coli* (Alekhshun *et al.* 2001) und MexR stimmen in Aminosäureabfolge zu 31% überein. Diese Ähnlichkeit diskutierten Higgins *et al.*

bereits 2002. Die DNA-bindende Struktur befindet sich demnach zwischen Aminosäure 55 und 100. In dieser Region lassen sich auch die größten Übereinstimmungen zwischen *marR* und *mexR* feststellen. Mutationen in diesem Bereich haben somit laut Higgins *et al.* die potentiell größte Auswirkung auf die Regulatorfunktion von MexR und dadurch auf die Meropenemresistenz. In dieser Studie wurde ein Stamm mit einer Mutation in diesem Bereich gefunden: VA 16959 zeigte an Position n.236 A→G eine Mutation mit Aminosäureaustausch p.79 N→S. Allerdings wurde bei diesem Stamm lediglich eine intermediäre Resistenz gegen Meropenem gemessen, der MHK-Wert lag bei 4µg/ml.

Quale *et al.* beschrieben 2006 eine Mutation an p.132 V→A, die vermutlich zu Meropenemresistenz führt. Diese Veränderung in der DNA wurde in dieser Arbeit bei zwei Stämmen entdeckt: UR 7100 ist resistent gegen Meropenem, weist aber gleichzeitig eine inaktivierende Mutation im *nalD*-Gen auf. Die Auswirkung dieser Mutation kann hier somit nicht sicher belegt werden. UR 9975, resistent gegen Meropenem getestet, zeigt ebenfalls die von Quale *et al.* beschriebene Mutation auf. Das *nalD*-Gen weist den Wildtyp auf. Somit liegt die Erklärung für die Meropenemresistenz wahrscheinlich in dieser Mutation.

Aus dem Probenkollektiv sind 40 Proben meropenemresistent. In unseren Untersuchungen zeigten vier Proben eine Deletion und zwei Proben eine Insertion im *mexR*-Gen, bei ihnen ist nachfolgend keine Proteinexpression möglich und somit die Meropenemresistenz erklärbar.

Bei den Mutationen mit Aminosäureaustausch ist eine Auswirkung auf die Meropenem-MHK möglich. Allerdings sind alle Mutationen auch bei sensiblen Stämmen nachgewiesen worden. Bei sechs Stämmen zeigten sich Punktmutationen, sie sind eher eine unwahrscheinliche Ursache für die Meropenemresistenz. Zur weiteren Charakterisierung sind hier Komplementierungsversuche und Expressionsanalysen von MexAB-OprM notwendig. Bei acht Stämmen zeigte die Sequenzierung das Wildtyp-Gen.

#### **4.4.2 Auswirkungen der *nalC*-Mutationen**

NalC ist ein weiterer repressiver Regulator für die Effluxpumpe MexAB-OprM. Bei inaktivierenden Mutationen, wie zum Beispiel einer Leserahmenverschiebung, kann man davon ausgehen, dass die Funktion von NalC stark eingeschränkt, beziehungsweise aufgehoben ist. In der Folge würde indirekt die MexAB-OprM-Produktion und somit die Meropenemresistenz zunehmen (Cao *et al.*, 2004).

Bei zwei Stämmen (UR 10225 und VA 18698) wurde eine solche inaktivierende 1bp-Deletion an n.455 im *nalC*-Gen entdeckt. Diese Mutation könnte somit zu einer

Überexpression der MexAB-OprM-Effluxpumpe führen, wodurch Meropenem vermehrt ausgeschleust wird und in der Zelle nicht mehr wirken kann. Die MHK dieser beiden Stämme für Meropenem liegen bei  $> 32\mu\text{g/ml}$ .

Die in dieser Studie nachgewiesenen Mutationen p.145 A $\rightarrow$ V, p.186 A $\rightarrow$ T (Tomás *et al.*, 2010), p.71 G $\rightarrow$ E, p.153 E $\rightarrow$ Q und p.209 S $\rightarrow$ R (Llanes *et al.*, 2004), sind für das Resistenzverhalten nicht signifikant (Tomás *et al.*, 2010; Llanes *et al.*, 2004). Llanes *et al.*, 2004 beschreibt, dass die Mutationen auch bei nicht resistenten Wildtyp-Stämmen gefunden wurden. Bei Tomás *et al.* 2010 wurden Stämme mit erhöhter MexR-Produktion gefunden, jedoch konnte keine der erwähnten Mutationen mit der Meropenemresistenz korreliert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese vier Mutationen trotz eines Aminosäureaustauschs nicht für eine verminderte Antibiotikasensibilität verantwortlich gemacht werden können. Da sie sogar häufig bei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander aufgetaucht sind, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um wirkungslose bzw. wirkungsarme Polymorphismen handelt.

Diskutiert wird ebenfalls ein additiver Effekt von *nalC*- und *mexR*-Mutationen auf die MexA-Expression (Llanes *et al.*, 2004).

Um die Auswirkung bisher noch nicht beschriebener aber in dieser Studie entdeckter Mutationen (p.30 H $\rightarrow$ Y bei UR 903, p.79 D $\rightarrow$ E bei VA 14618 und VA 14876) auf die NalC-Produktion beurteilen zu können, bedarf es weiterer Studien der Proteinexpression, wie z.B. realtime-PCR, Western Blots und auch Komplementierungsversuche.

VA 14618, sensibel für Meropenem, und VA 14876, resistent gegen Meropenem, tragen beide die gleiche Mutation an p.79 D $\rightarrow$ E. Da die Stämme völlig unterschiedliche MHK-Werte haben, ist es wahrscheinlich, dass diese Mutation nicht ausschlaggebend für die Meropenemresistenz ist und es bei VA 14876 einen anderen Mechanismus gibt.

Eine sichere Erklärung für die Meropenemresistenz konnte in dieser Studie durch *nalC*-Mutationen bei zwei Proben gefunden werden, bei ihnen fanden wir jeweils eine 1bp-Deletion. In allen anderen Stämmen zeigten sich zwar viele Mutationen, die auch Aminosäureaustausche zur Folge hatten. Jedoch fanden sich die gleichen Mutationen auch bei sensiblen Stämmen. Somit scheint deren Auswirkung auf das Resistenzverhalten eher unwahrscheinlich. Bei einer Probe war keine Amplifikation des *nalC*-Gens möglich. Gründe hierfür können beispielsweise Mutationen im Bereich des Primeransatzpunktes sein, die das Annealing und in der Folge die Amplifikation unmöglich machen. Eine andere Erklärung könnte die Deletion des gesamten Gens sein.

#### 4.4.3 Auswirkungen der *nalD*-Mutationen

NalD ist ein weiterer Modulator für die Effluxpumpe MexAB-OprM. Auch dieses Gen



wurde bei sämtlichen untersuchten Stämmen amplifiziert und sequenziert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit der Wildtyp-Sequenz verglichen.

Sobel *et al.* haben 2005 bei Proben mit einer gesteigerten Meropenemresistenz Mutationen im *nalD*-Gen beschrieben. Bei diesen Proben war die Expression der Effluxpumpe MexAB-OprM im Vergleich mit dem Wildtyp um das 1,69-fache erhöht. Einige der von Sobel *et al.* beschriebenen Mutationen konnten auch in dieser Studie gefunden werden. Diese waren jedoch allesamt stille Mutationen bzw. Polymorphismen, die keinen Aminosäureaustausch bewirken. Sobel *et al.* gehen davon aus, dass diese Veränderungen in der DNA keine Auswirkungen auf das Resistenzverhalten von *P. aeruginosa* haben.

Weiterhin wurde in unserer Studie bei einem Stamm (UR 7100) eine 1bp-Deletion gefunden, die eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge hat. Hier ist davon auszugehen, dass *nalD* nicht mehr richtig exprimiert wird. Ähnlich wie bei der Inaktivierung von NalC kommt es in der Folge zu einer vermehrten MexAB-OprM-Produktion. Ob ein ähnlicher Effekt bei einer größeren Deletion von z.B. 21 Basenpaaren (VA 12732) entsteht, muss noch geklärt werden. Zwar ist der Leserahmen nicht verschoben, jedoch ist das Protein sieben Aminosäuren kleiner als beim Wildtyp. Hierdurch kann es eventuell zu einem gestörten DNA-Bindungsverhalten kommen und so die reprimierende Wirkung auf MexAB-OprM eingeschränkt werden.

Die hier gefundenen Aminosäureaustausche p.188 T>A und p.33 L>Q in *nalD* wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Deren Auswirkung auf das Resistenzverhalten muss in nachfolgenden Untersuchungen, beispielsweise durch Komplementierungsversuche mit dem Wildtyp-Gen, nachgeprüft werden. Die Mutation p.187 D>H wurde bei einer Probe gefunden, diese ist jedoch sensibel auf Meropenem getestet worden.

Bei zwei Proben sind die Auswirkungen der Mutation somit noch unklar, eine Erklärung für die Meropenemresistenz könnte hier gefunden werden. Bei den beiden Stämmen mit der Deletion ist dies wahrscheinlich die Erklärung für die erhöhte Meropenem-MHK.

In der Tabelle 21 ist ein Überblick zu den Mutationen in *mexR*, *nalD* und *nalC* bei den meropenemresistenten Stämmen. Mit „nein“ gekennzeichnete Stämme weisen einen funktionell irrelevanten Polymorphismus auf, der in der Literatur schon beschrieben wurde. Mit der Bezeichnung „möglich“ sind Stämme kenntlich gemacht, die bislang unbeschriebene Punktmutation unbekannter funktioneller Bedeutung tragen.

Uns war es möglich für 15 der 40 meropenemresistenten Stämme eine wahrscheinliche

Ursache für die MHK-Anstieg herauszufinden (siehe Tabelle 21). Bei sieben Stämmen muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden, welche Auswirkungen die gefundenen Mutationen auf das Resistenzverhalten haben. Diese Proben sind in Tabelle 21 mit „möglich“ gekennzeichnet. Für die restlichen 18 Proben könnte die Resistenz beispielsweise durch Mutationen in den hier nicht untersuchten Effluxpumpen erklärbar sein. Außerdem wird ein Anstieg der Meropenem-MHK durch einen Verlust von OprD diskutiert (Köhler *et al.*, 1999) bzw. für eine Kombination aus OprD-Verlust und MexAB-OprM-Überexpression beschrieben Riera *et al.* 2011 hohe Meropenem-MHK-Werte (> 32mg/L). Köhler *et al.* erwägen hier auch das Vorliegen von weiteren Eintrittspforten für Meropenem in die Zelle, welche von Mutationen betroffen sein könnten und somit für eine Meropenemresistenz verantwortlich sein könnten.

#### 4.5 Meropenemsensibilität

In Zusammenhang mit einer gesteigerten Meropenemsensibilität hingegen haben Epp *et al.* 2001 über einen Basenaustausch im *oprD*-Gen berichtet, der die Keime für Meropenem empfindlicher macht. Hier waren die MHK-Werte für Meropenem bis zu viermal niedriger als bei Stämmen mit Wildtyp-Sequenz. Wie in der Arbeit von Epp *et al.* (2001) wurde im Rahmen dieser Untersuchung im *oprD*-Gen der Polymorphismus n.1114-1149 (atgtctgacaacaacgtcggctataagaactacggc) zu (---gtcgactccagttcctctacgcgggcctg---) gefunden. Es wurde festgestellt, dass sich die oben beschriebene Mutation in Loop L7 befindet, das Protein verkürzt ist und diesem somit eine andere Struktur verleiht. Diese Strukturveränderung bewirkt eine weitere Öffnung des OprD-Porins und vereinfacht dem Meropenemmolekül den Eintritt in die Zelle. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Ocampo-Sosa *et al.* 2012. Hier waren die Proben mit dieser Mutation sogar sowohl für Meropenem als auch für Imipenem sensibel.

Vier Stämme (VA 14379, VA 13745, UR 10195, UR 71) mit der von Epp *et al.* beschriebenen Mutation sind sensibel für Meropenem. Hier fanden sich keine weiteren Mutationen in den Regulatorgenen für MexAB-OprM.

Lassen sich neben der von Epp *et al.* beschriebenen Mutation noch zusätzlich weitere inaktivierende Mutationen (z.B. 1bp-Deletionen) im *oprD*-Gen nachweisen, gehen Epp *et al.* davon aus, dass es zwar zu einer verminderten Imipenemresistenz, jedoch zu keiner gesteigerten Meropenemempfindlichkeit kommt. Im untersuchten Probenkollektiv wurden bei fünf Stämmen im Anschluss an die „Epp-Mutation“ solche inaktivierenden Mutationen gefunden (UR 958, UR 11118, UR 11995, UR 17208, VA 14867). Die MHK-Werte für Meropenem und Imipenem sind bei diesen Keimen alle

> 32µg/ml.

Bei drei weiteren Stämmen (9610, VA 12732, VA 18698) ist es nicht möglich, die Auswirkung der „Epp-Mutation“ zu beurteilen, da diese Proben zusätzlich Mutationen in den Regulatorgenen von MexAB-OprM (*mexR*, *nalC*, *nalD*) tragen, die für eine erhöhte Meropenemresistenz verantwortlich gemacht werden.

Bei UR 7089 und UR 9569 ist außer der „Epp-Mutation“ keine die Meropenemempfindlichkeit beeinflussende Mutation gefunden worden. Trotzdem sind beide Stämme mit einer MHK von > 32µg/ml resistent gegen Meropenem. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sollten Anlass sein, im nächsten Schritt weitere Tests durchzuführen, um den Mechanismen der Meropenemresistenz und -empfindlichkeit weiter auf den Grund zu gehen. Denkbar wären zum Beispiel Expressionsanalysen der Effluxpumpe oder die Untersuchung weiterer Efflux-Systeme und Porine.

**Tabelle 21:** Mutationen, die in Zusammenhang mit einer gesteigerten Meropenemresistenz stehen.

Probennummer	Meropenem-MHK in mg/L	<i>mexR</i> -Mutationen	<i>nalD</i> -Mutationen	<i>nalC</i> -Mutationen	VIM-2	Meropenemresistenz
9610	> 32 (R)	1bp-Deletion n.315 (C)^	Wildtyp	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	ja
BK 4460	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.153 E → Q* p.209 S → R*	+	ja
BK 4743	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.153 E → Q* p.209 S → R*	+	ja
UR 10225	> 32 (R)	stumme Mutationen	Wildtyp	p.71 G → E* 1bp-Deletion n.455 (A)^	-	ja
UR 11118	> 32 (R)	Wildtyp	stumme Mutationen	p.71 G → E*	-	nein
UR 17208	> 32 (R)	Wildtyp	Wildtyp	p.71 G → E* p.186 A → T*	-	nein
UR 442	> 32 (R)	p.126 V → E* p.44 K → M°	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.153 E → Q* p.209 S → R*	-	möglich
UR 6985	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E*	+	ja

Probennummer	Meropenem-MHK in mg/L	<i>mexR</i> -Mutationen	<i>nalD</i> -Mutationen	<i>nalC</i> -Mutationen	VIM-2	Erklärung für die Meropenemresistenz
UR 71	8 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.145 A → V* p.209 S → R*	-	nein
UR 7089	12 (R)	Wildtyp	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	nein
UR 7100	> 32 (R)	p.126 V → E* n.132V → A°	1bp-Deletion n.294 (G)^	p.71 G → E* n.209 S → R*	-	ja
UR 7838	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.145 A → V*	-	nein
UR 8919	8 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.145 A → V* p.209 S → R*	-	nein
UR 903	> 32 (R)	p.126 V → E*	Wildtyp	p.30 H → Y° p.71 G → E* p.209 S → R*	-	nein
UR 9569	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.145 A → V* p.209 S → R*	-	nein
UR 958	> 32 (R)	Wildtyp	stumme Mutationen	p.71 G → E*	-	nein

Probennummer	Meropenem-MHK in mg/L	<i>mexR</i> -Mutationen	<i>nalD</i> -Mutationen	<i>nalC</i> -Mutationen	VIM-2	Erklärung für die Meropenemresistenz
UR 9848	> 32 (R)	11bp-Deletion n.65-75 (GCGCATCCAGA) <sup>^</sup>	Wildtyp	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	ja
UR 9975	8 (R)	p.126 V → E* p.132 V → A <sup>^</sup>	Wildtyp	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	ja
VA 1027	> 32 (R)	13bp-Deletion n.308-321 (CATCCACCAGCAT) <sup>^</sup>	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.153 E → Q* p.209 S → R*	+	ja
VA 11995	> 32 (R)	p.101 G → R <sup>°</sup>	Wildtyp	p.71 G → E* p.186 A → T*	-	möglich
VA 12183	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E*	+	ja
VA 12593	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	nein
VA 12732	> 32 (R)	stumme Mutationen	21bp-Deletion n.460-480 (CATCCGGGCATGAC CCCGAGG ) <sup>°</sup>	p.71 G → E*	-	möglich
VA 13664	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E*	+	ja
VA 14224	> 32 (R)	Wildtyp	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	nein
VA 14381	> 32 (R)	Wildtyp	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	nein

Probennummer	Meropenem-MHK in mg/L	<i>mexR</i> -Mutationen	<i>nalD</i> -Mutationen	<i>nalC</i> -Mutationen	VIM-2	Erklärung für die Meropenemresistenz
VA 14867	> 32 (R)	p.101 G→R°	Wildtyp	p.71 G → E* p.186 A → T*	-	möglich
VA 14876	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.79 D → E* p.209 S → R*	-	nein
VA 15480	> 32 (R)	p.130 T → P°	Wildtyp	p.71 G → E*	-	möglich
VA 16313	8 (R)	Wildtyp	Wildtyp	stumme Mutation	-	nein
VA 16566	12 (R)	Wildtyp	p.188 T → A°	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	möglich
VA 16931	> 32 (R)	Wildtyp	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	nein
VA 17914	> 32 (R)	stumme Mutationen	Wildtyp	p.71 G → E*	-	nein
VA 18417	> 32 (R)	stumme Mutationen	p.33 L → Q°	p.71 G → E* p.209 S → R*	-	möglich
VA 18698	> 32 (R)	stumme Mutationen	Wildtyp	p.71 G → E* 1bp-Deletion n.455 (A)^	-	ja
VA 18819	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E*	-	nein
VA 19060	> 32 (R)	1bp-Insertion n.81 (T)^	stumme Mutationen	nicht auswertbar	-	ja

Probennummer	Meropenem-MHK in mg/L	<i>mexR</i> -Mutationen	<i>nalD</i> -Mutationen	<i>nalC</i> -Mutationen	VIM-2	Erklärung für die Meropenemresistenz
VA 28868	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E*	-	nein
VA 29439	> 32 (R)	p.126 V → E*	stumme Mutationen	p.71 G → E*	+	ja
VA 29501	> 32 (R)	13bp-Deletion n.367-389 (CTCACCCCGGT GG)^	stumme Mutationen	p.71 G → E* p.145 A → V* p.209 S → R*		ja

° Mutationen unbekannter funktioneller Bedeutung, \* Mutationen ohne Auswirkung auf die Meropenemresistenz, ^ Mutationen mit Auswirkung auf die Meropenemresistenz, + : nachgewiesen, - : nicht nachgewiesen



## 5 Zusammenfassung

In Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen spielt *P. aeruginosa* eine bedeutende Rolle. Etwa zehn Prozent der im Krankenhaus erworbenen Infektionen werden durch diesen Keim ausgelöst. Für die Behandlung gelten als sogenannte Reserveantibiotika die Carbapeneme. Jedoch wird die Behandlung dieser Infektionen aufgrund von immer weiter steigenden Resistenzraten gegen Carbapeneme immer schwieriger. Die Antibiotikaresistenz entsteht durch verschiedene Mechanismen mit jeweils komplexen Regulationsvorgängen. Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es herauszufinden, welche der bislang bekannten molekularen Mechanismen zur Entstehung einer Carbapenemresistenz bei *P. aeruginosa* bei Stämmen aus dem Routinelabor des UKE vorliegen.

Zu den untersuchten Mechanismen im Bezug auf die bei allen Proben vorliegende Imipenemresistenz (MHK > 32mg/l) gehörten die Carbapenemasen, Mutationen im Gen des Membranporins OprD und in der AmpC- $\beta$ -Laktamase bzw. extended-spectrum-AmpC- $\beta$ -Laktamase (ESAC). Es war möglich, für 28 der 59 untersuchten Stämme einen wahrscheinlichen Mechanismus für die vorliegende Imipenemresistenz zu finden. Bei 26 Proben fanden wir Veränderungen, die das Resistenzverhalten zumindest teilweise erklären können. Lediglich bei drei Proben fanden wir in den untersuchten Genen keine Erklärung für die gesteigerte Imipenemresistenz. Bei zwei Proben sind die Auswirkungen der Mutationen auf das Resistenzverhalten unklar.

Zur Untersuchung der bei 40 Proben vorliegenden Meropenemresistenz wurden die Regulatorgene der Effluxpumpe MexAB-OprM *mexR*, *nalC*, *nalD* sowie das Vorliegen einer Carbapenemase untersucht. Für Meropenem konnte bei 15 Proben der wahrscheinliche Resistenzmechanismus geklärt werden. Bei sieben Proben müssen weitere Untersuchungen folgen, um die Auswirkung der Mutationen auf die Meropenemresistenz zu klären. Bei 18 Proben fanden wir keine Erklärung für die gesteigerte Meropenemresistenz.

Aus den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit ergeben sich Anknüpfungspunkte für weitergehende Untersuchungen. Insbesondere bei den Proben, bei denen ein Aminosäureaustausch mit noch unbekannter Auswirkung nachgewiesen wurde, ist es wichtig, im nächsten Schritt beispielsweise Komplementierungsversuche mit dem Wildtyp-Gen vorzunehmen. So könnten die Auswirkungen der Mutationen auf das Resistenzverhalten geklärt werden. Weiterhin müssten Expressionsanalysen

vorgenommen werden, um zu untersuchen, wie sich die Proteinexpression durch die Mutationen verändert. Unsere Studie zeigt zudem, dass, neben den hier untersuchten Mechanismen Weitere für die Entstehung von Carbapenemresistenz relevant sind.

## Conclusions

*Pseudomonas aeruginosa* plays an important role in nosocomial infections. Approximately 10% of hospital-acquired infections are caused by this pathogen. Carbapenems are an important therapeutic option for the treatment of serious infections induced by *P. aeruginosa*. Because of an increasing prevalence of carbapenem resistance an appropriate treatment is becoming more complicated. Antimicrobial resistance is developed by *P. aeruginosa* by different mechanisms each with complex regulatory systems. The purpose of this work was to determine which of the already known mechanisms for carbapenem resistance are prevalent in samples of *P. aeruginosa* collected in the clinical microbiology laboratory of the UKE.

Showing a MIC > 32mg/l all samples were resistant to imipenem. For those strains we investigated the following resistance mechanisms: prevalence of Carbapenemases, mutations in *oprD* encoding for an outer membrane porin as well as mutations in the gene encoding the AmpC- $\beta$ -Lactamase, respectively extended-spectrum-AmpC- $\beta$ -Lactamase (ESAC). It was possible to determine the responsible mechanism for imipenem resistance for 28 out of 59 samples. In 26 cases we found genetic alterations which may explain imipenem resistance in parts. For three strains we were not able to find an explanation for the imipenem resistance. For two samples the impact of our findings on imipenem resistance remain unclear.

To investigate the mechanisms for meropenem resistance, seen in 40 cases, we analysed both the genes *mexR*, *nalC*, *nalD* which regulate the efflux pump MexAB-OprM, and the existence of carbapenemases. The probable resistance mechanism was found for 15 samples. For seven strains it is necessary to do further investigation to rule out the effect of the mutations we found. In 18 cases no explanation for the meropenem resistance was found.

To explain the antimicrobial resistance it is necessary to do further research. Especially for those cases where the effect of the found mutations remains unclear. For example complementation with the wildtype-genes or analyses of protein expression could be done. Additionally, this work reveals that there are relevant mechanisms for carbapenem resistance which were not discussed or analysed in our study.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R., Poole, K. (2002) The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of mutations compromising activity. *The Journal of Bacteriology* 184 (15): 4308-4312.
- Aogáin Mac, M., Kulah, C., Rijnsburger, M., Celebi, G., Savelkoul, P.H.M., O'Gara, F., Mooij, M.J. (2012) Characterization of imipenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (7): 718-719.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B., Mealy, T.R., Seaton, B.A., Head, J.F. (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 angstrom resolution. *Nat Struct Biol* 8 (8): 710-714.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3): 403–410.
- Askoura, M., Mottawea, W., Abujamel, T., Taher, I. (2011) Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med* 6: 5870-DOI: 10.3402/ljm.v6i0.5870.
- Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J.I.A., Givskov, M., Høiby, N. (2002) Constitutive high expression of chromosomal  $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11): 3406-3411.
- Bert, F., Maubect, E., Bruneau, B., Berry, F., Lambert-Zechovsky, N. (1998) Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *Journal of Hospital infection* 39 (1): 53-69.
- Borgianni, L., Prandi, S., Salden, L., Santella, G., Hanson, N.D., Rossolini, G.M., Docquier, J.-D. (2011) Genetic context and biochemical characterization of the IMP-18 metallo- $\beta$ -lactamase identified in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (1): 140-145.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. (1995) A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents* 39 (6): 1211–1233.
- Caille, O., Rossier, C., Perron, K. (2007) A copper-activated two-component system

- interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4561–4568.
- Campo Esquisabel, A.B., Rodríguez, M.C., Campo-Sosa, A.O., Rodríguez, C., Martínez-Martínez, L. (2011) Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime. *Clinical Microbiology and Infection Early* 17 (12): 1817-22.
- Canton, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G.M., Samuelsen, Seifert, H., Woodford, N., Nordmann, P. (2012) Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (5): 413–431.
- Cao, L., Srikumar, R., Poole, K. (2004) MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Molecular Microbiology* 53 (5): 1423-1436.
- Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J., Walsh, T.R. (2004) Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (12): 4654-4661.
- Chen, H., Hu, J., Chen P.R. Lan, L., Li, Z., Hicks, L.M., Dinner A.R., He, C. (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (36): 13586-13591.
- Daigle, D.M., Cao, L., Fraud, S., Wilke, M.S., Pacey, A., Klinoski, R., Strynadka, N.C., Dean, C.R., Poole, K. (2007) Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Bacteriology* 189 (15): 5441-5451.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C., and Arlet, G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (3): 490-495.
- Delcour, A.H. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1794 (5): 808–816.
- Diene, S.M., L'homme, T., Bellulo, S., Stremler, N., Dubus, J.-C., Mely, L., Leroy, S., Degand, N., Rolain, J.-M. (2013) ISPa46, a novel insertion sequence in

- the *oprD* porin gene of an imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42 (3): 268–271.
- El Amin, N., Giske, C.G., Jalal, S., Keijsers, B., Kronvall, G., Wretling, B. (2005) Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* 113 (3): 187-196.
- Elias, J., Schoen, C., Heinze, G., Valenza, G., Gerharz, E., Reidmiller, H., Vogel, U. (2010) Nosocomial outbreak of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with retrograde urography. *Clinical Microbiology and Infection* 16 (9): 1494-1500.
- Ellington, M.J., Kistler, J., Livermore, D.M., and Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (2): 321-322.
- Epp, S.F., Köhler, T., Plésiat, P., Michéa-Hamehpour, M., Frey, J., Pechère, J.-C. (2001) C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (6): 1780–1787.
- Franceschini, N., Segatore, B., Perilli, M., Vessillier, S., Franchino, L., Amicosante, G. (2002) Meropenem stability to  $\beta$ -lactamase hydrolysis and comparative in vitro activity against several  $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 49 (2): 395-398.
- Fournier, D., Richardot, C., Müller, E., Robert-Nicoud, M., Llanes, C., Plésiat, P., Jeannot, K. (2013) Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (8): 1772-80.
- Gallant, C.V., Raivio, T.L., Olson, J.C., Woods, D.E., Storey, D.G. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity. *Microbiology* 146 (Pt 8): 1891–1899.
- Garau, J., Gomez, L. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16 (2): 135–143.
- Gaynes, R., Edwards, J.R. and the National Nosocomial Infections Surveillance System (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 41 (6): 848–54.

- GERMAP 2010: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch: Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.
- Ghosh, S., Cremers, C.M., Jakob, U., Love, N.G. (2011) Chlorinated phenols control the expression of the multidrug resistance efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with NalC. *Molecular Microbiology* 79 (6): 1547-1556.
- Glasner, C., Albiger, B., Buist, G., Tambić Andrašević, A., Canton, R., Carmeli, Y., Friedrich, A.W., C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Nordmann, P., Poirel, L., Rossolini, G.M., Seifert, H., Vatopoulos, A., Walsh, T., Woodford, N., Donker, T., Monnet, D.L., Grundmann, H. (2013) Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *The European Survey on Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group*.
- Gomes Franco, M.R., Caiaffa-Filho, H.H., Nascimento Burattini, M., Rossi, F. (2010) Metallo- $\beta$ -lactamases among imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics* 65 (9): 825-829.
- Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., Plésiat, P. (2013) Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1): 221–228.
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenadeo, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, J.L., Oliver, A. (2007) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (12): 4329-4335.
- Hancock, R.E.W., Bellido, F. (1996) Antibacterial in vitro activity of fourth generation cephalosporins. *Journal of Chemotherapy* 8 (2): 31–36.
- Hancock, R.E.W., Speert, D.P. (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates* 3 (4): 247–255.
- Hancock, R.E.W., Brinkman, F.S. (2002) Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annual Review Microbiology* 56: 17-38.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Sherwood, K.J., Wiedemann, B. (2005) Detection of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (4): 1668-1669.

- Hentschke, M., Goritzka, V., Belmar Campos, C., Merkel, P., Ilchmann, C., Lellek, H., Scherpe, S., Aepfelbacher, M., Rohde, H. (2011) Emergence of carbapenemases in gram-negative bacteria in Hamburg, Germany. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71 (3): 312–315.
- Hidri, N., Barnaud, G., Decré, D. (2005) Resistance to ceftazidime is associated with a S220Y substitution in the omega loop in the AmpC- $\beta$ -lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 55 (4): 496–9.
- Higgins, P.G., Fluit, A.C., Milatovic, D., Verhoef, J., Schmitz, F.-J. (2003) Mutations in *gyrA*, *parC*, *mexR* and *nfxB* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21 (5): 409–413.
- Höffken, G., Lorenz, J., Kern, W., Welte, T., Bauer, T., Dalhoff, K., Dietrich, E., Ewig, S., Gastmeier, P., Grabein, B., Halle, E., Kolditz, M., Marre, R., Sitter, H. (2009) Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie. Update 2009. S3-Leitlinie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk CAPNETZ
- Join-Lambert, O.F., Michéa-Hamzehpour, M.T., Faurisson, F., Dautrey, S., Vissuzaine, C., Carbon, C., Pechère, J. (2001) Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (2): 571–576.
- Juan, C., Macia, M.D., Gutiérrez, O., Vaidal, C., Pérez, J.L., Oliver, A. (2005) Molecular mechanisms of  $\beta$ -Lactam-resistance mediated by AmpC-hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (11): 4733–4738.
- Kaase, M., Szabados, F., Pfennigwerth, N., Anders, A., Geis, G., Pranada, A., B., Roßler, S., Lang, U., Gatermann, S.G. (2013) Description of the metallo- $\beta$ -lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. *J Antimicrob Chemother* 69: 81–84.
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Epp, S.F., Pechere; J.-C. (1999) Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (2):



424-427.

- Laurettil, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G.M. (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (7): 1584-90.
- Lee, K., Park, A.J., Kim, M.Y., Lee, H.J., Cho, J.-H., Kang, J.O., Yong, D., Chong, Y., und KONSAR group (2009) Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas spp.* in Korea: High prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 Type. *Yonsei Med J* 50 (3): 335-339.
- Li, X.-Z., Nikaido, H., Poole, K. (1995) Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (9): 1948-1953.
- Li, H., Toleman, M.A., Bennett, P.M., Jones, R.N., Walsh, T.R. (2008) Complete sequence of p07-406, a 24,179-base-pair plasmid harboring the blaVIM-7 metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (9): 3099-3105.
- Lindberg, F., Lindquist, S., Normark, S. (1988) Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal class I  $\beta$ -lactamase in non-fastidious gram-negative bacilli. *Rev. Infect. Dis.* 10 (4): 782-785.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., Hanson, N.D. (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Review* 22 (4): 582-610.
- Liu, Q., Li, X., Li, W., Du, X., He, J.-Q., Tao, C., Feng, Y. (2015) Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: a meta-analysis. *Sci. Rep.* 5, 11715; doi: 10.1038/srep11715.
- Livermore, D.M. und Yang, Y.J. (1989) Comparative activity of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains with well-characterized resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (24): 149-59.
- Livermore, D.M. (1992) Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (9): 2046-2048.
- Livermore, D.M. (1995)  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 8 (4): 557.



- Livermore, D.M., Woodford N. (2000) Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology* 3 (5): 489–95.
- Livermore, D. (2001) Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47 (3): 247-250.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benai-Baitich, D., Neuwirth, C., Plésiat, P. (2004) Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (5): 1797-1802.
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., Delden, C. van, Plesiat, P. (2011) Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55(12): 5676.
- Lo, C.Y., Chu, W.L., Wan, K.M., Ng, S.Y., Lee, W.L., Chu, M.F., Cheng, S.W., Lo, W.K. (1998) *Pseudomonas* exit-site infections in CAPD patients: evolution and outcome of treatment. *Perit Dial Int.* 18 (6): 637-640.
- Lynch, M.J., Drusano, G.L., Mobley, H.L.T. (1987) Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31 (12): 1892-1896.
- Mammeri, H., Nazic, H., Naas, T. (2004) AmpC- $\beta$ -lactamase in an *Escherichia coli* clinical isolate confers resistance to expanded spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (10): 4050–3.
- Mammeri, H., Nordmann, P. (2007) Extended spectrum cephalosporinases in Enterobacteriaceae. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 6 (1): 71–82.
- Mammeri, H., Nordmann, P., Berkani, A., Eb, F. (2008) Contribution of extended spectrum AmpC (ESAC)  $\beta$ -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 282 (2008) 238–240.
- Morita, Y., Cao, L., Gould, V.C., Avison, M.B., Poole, K. (2006) *nalD* encodes a second repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* December 2006 vol. 188 no. 24 8649-8654.
- Moya, B., Dötsch, A., Jaun, C., Blázquez, J., Zamorano, L., Haussler, S., Oliver, A. (2009)  $\beta$ -lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathogens* 5 (3): e1000353.
- Muller, C., Plésiat, P., Jeannot, K. (2011) A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones,

- and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (3): 1211–1221.
- Nikaido, H. (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (11): 1831-1836.
- Nikaido, H. (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current opinion in Microbiology* 1 (5): 516-523.
- Nikaido, H., Pagès, J.-H. (2011) Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*: 1–24.
- Nordmann, P. und Poirel, L. (2002) Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321–331.
- Nordmann, P., Mammeri, H., (2007) Extended spectrum cephalosporinases: Structure, detection and epidemiology. *Future Microbiology* 2(3): 297-307.
- Ocampo-Sosa, A.A., Cabot, G., Rodriguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M.D., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Pena, C., Dominguez, M.A., Moncalián, G., Oliver, A., Martínez-Martínez, L. (2012) Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (4): 1703-1713.
- Ochs, M.M, McCusker, M.P., Bains, M., Hancock, R.E.W. (1999) Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (5): 1085–1090.
- Ochs, M.M., Bains, M., Hancock, R.E.W. (2000) Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (7): 1983-1985.
- Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Hori, T., Ito, H., Yoshimura, F., Kato, N. (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (1): 71-78.
- Pagani, L., Colinon, C., Migliavacca, R., Labonia, M., Docquier, J.-D., Nucleo, E., Spalla, M., Bergoli, M.L., Rossolini, G.M. (2005) Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8): 3824-3828.
- Patel, G. und Bonomo, R.A. (2013) “Stormy waters ahead”: global emergence of

- carbapenemases. *Frontiers in microbiology 4: Article 48*.
- Pirnay, J.P., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P., Zizi, M. (2002) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environmental Microbiology 4 (12): 872-882*.
- Pirnay, J.-P., Vos, D. de, Conchez C., Bilocq, F., Vanderkelen, A., Zizi, M., Ghysels, B., Cornelis, P. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environmental Microbiology 4 (12): 898-911*.
- Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J.-D., Nordmann, P. (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44 (4): 891-897*.
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann, P. (2004) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48: 15-22*.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., Bianco, N. (1996) Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40 (9): 2021-2028*.
- Poole, K. (2004) Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection 10 (1): 12-26*.
- Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., Landman, D. (2006) Interplay of efflux system, *ampC* and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50 (5): 1633-1641*.
- Raimondi, A., F. Sisto, F., Nikaido, H. (2001) Mutation in *Serratia marcescens* AmpC- $\beta$ -lactamase producing high-level resistance to ceftazidime and ceftiprome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45 (8): 2331-2339*.
- Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., García-Castillo, M., del Campo, R., Juan, C., Cantón, R., Oliver, A. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *Journal for Antimicrobial Chemotherapy 66: 2022-2027*.
- Rodríguez-Martínez, J.M., Poirel, L., Nordmann, P. (2009) Extended spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy 53 (11): 1766-1771*.

- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., Nordmann, P. (2009) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (11): 4783-4788.
- Salabi, A.el, Toleman, M.A., Weeks, J. (2010) First report of the metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (1): 582.
- Sanders, W.E., Sanders, C.C. (1988) Inducible  $\beta$ -lactamases: Clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins. *Rev. Infect. Dis.* 10 (4): 830-838.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-BarbancEon, V., Buchaklian, Lei, M., Long, R.M., Wiener-Kronish, J., Sawa, T. (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *The EMBO Journal* 22 (12): 2959-2969.
- Schneider, I., Keuleyan, E., Rasshofer, R., Markovska, R., Queenan A.M., Beuernfeind, A. (2008) VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (8): 2977-2979.
- Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M. (1996) Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (2): 349-353.
- Srikumar, R., Li, X.Z., Poole, K. (1997) Inner membrane efflux components are responsible for  $\beta$ -lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179 (24): 7875-7881.
- Srikumar, R., Paul, C.J., Poole, K. (2000) Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 182 (5): 1410-1414.
- Sobel, M.L., Neshat, S., Poole, K. (2005a) Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 187 (4): 1246-1253.
- Sobel, M.L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P., Poole, K. (2005b) Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (5): 1782-1786.
- Suárez, C., Pena, C., Tubau, F., Gavalda, Manzur, A., Angeles Dominguez, M., Pujol, M., Gudiol, F. Ariza, J. (2009) Clinical impact of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Journal of infection* 58 (4): 285-290.
- Suárez, C., Pena, C., Gavalda, L., Tubau, F., Manzur, A., Dominguez, M.A., Pujol, M., Gudiol, F., Ariza, J. (2010) Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *International Journal of Infectious Diseases* 14S (2010) e73–e78.
- Tam, V.H., Chang, K.-T., Abdelraouf, K., Brioso, C.G., Ameka, M., McCaskey, L.A., Weston, J.S., Caeiro, J.-P., Garey, K.W. (2010) Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 1160-1164.
- Tamber, S., Ochs, M.M., Hancock, R.E.W. (2006) Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 188 (1): 45-54.
- Tate, D. und Mawer, S. (2003) Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis associated with a swimming pool inflatable. *Epidemiol. Infect.* 130 (2): 187-192.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (9): 2233-2239.
- Tomás, M., Doumith, M., Warner, M., Turton, J.F., Beceiro, A., Bou, G., Livermore, D.M., Woodford, N. (2010) Efflux pumps, OprD porin, AmpC- $\beta$ -lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (5): 2219-2224.
- Trias, J., Nikaido, H. (1990) Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (26): 15680-15684.
- Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M.-F. I., Babini, G.S., Douboyas, J., Livermore D.M. (2000) Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Jouranl of Clinical*

- Mircobiology* 38 (3): 1290-1292.
- Valenza, G., Joseoh, B., Elias, J., Claus, H., Oesterlein, A., Engelhardt, K., Turnwald, D., Frosch, M., Abele-Horn, M., Schoen, C. (2010) First survey of metallo  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a German university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (8): 3493-3497.
- Vakulenko, S.B., Golemi, D., Geryk, B. (2002) Mutational replacement of Leu-293 in the class C *Enterobacter cloacae* P99  $\beta$ -lactamase confers increased MIC of cefepime. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (6): 1966–70.
- Van Bambeke, F., Balzic, E., Tulkens, P.M. (2000) Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* 60 (4): 457–470.
- Vasil, M.L. (1986) *Pseudomonas aeruginosa*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr*. 108 (5 Pt 2): 800-805.
- Wilke, M.S., Heller, M., Creagh, A.L., Haynes, C.A., McIntosh, L.P., Poole, K., Strynadka, N.C. (2008) The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (39): 14832-14837.
- Wolter, D.J., Hanson, N.D., Lister, P.D. (2004) Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiology Letters* 236 (2004) 137–143.
- Yan, J.-J., Hsueh, P.-R., Ko, W.-C., Luh, K.-T., Tsai, S.-H., Wu, H.-M., Wu, J.-J. (2001) Metallo- $\beta$ -Lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (8): 2224-2228.
- Yoneyama, H., Nakae, T. (1993) Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (11): 2385-2390.
- Zamorano, L. Moya, B., Juan, C., Oliver, A. (2010) Differential  $\beta$ -lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (7): 1540-1542.
- Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q. (2011) Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases in gram-negative bacilli. *Future Microbiology* 6 (3): 317-333.
- Ziha-Zarif, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J.-C., Plesiat, P. (1999) In vivo

emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (2): 287-291.

Internetquellen:

ECDC; 2013. zuletzt aufgerufen am 29.08.2014:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>

EUCAST 2014, zuletzt aufgerufen am 29.08.2014:

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_4.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf)

Robert Koch-Institut, ARS, zuletzt aufgerufen am 29.08.2014:

<https://ars.rki.de>, Datenstand: 29.08.2014

Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 12. September 2011/Nr. 36, zuletzt aufgerufen am 28.12.2014: [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/Ausgaben/36\\_11.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/Ausgaben/36_11.pdf?__blob=publicationFile)

## 7 Publikationsverzeichnis

Hentschke, M., Goritzka, V., Belmar Campos, C., Merkel, P., Ilchmann, C., Lellek, H., Scherpe, S., Aepfelbacher, M., Rohde, H. (2011) Emergence of carbapenemases in gram-negative bacteria in Hamburg, Germany. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71 (3): 312–315.

## 8 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte bedanken.

Herrn PD Dr. med. Moritz Hentschke, dem Leiter der Arbeitsgruppe, danke ich für die Überlassung des Themas. Hervorheben möchte ich seine stete Bereitschaft zum kritischen Gedankenaustausch, die mir immer wieder wertvolle Impulse beim Erstellen dieser Arbeit gegeben hat. Herrn Prof. Dr. med. Holger Rohde danke ich für die Übernahme der Aufgaben des Doktorvaters.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit bedanken.



## 9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....