

**INNOVATIVE DIAGNOSTIK BEI
BLUTSTROMINFEKTIONEN DURCH MULTI-
RESISTENTE GRAMNEGATIVE ERREGER**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Ingenieur, Claudia Stein
geboren am 14.10.1986 in Zwickau**

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Mathias W. Pletz (Friedrich-Schiller Universität Jena)**
- 2. Prof. Dr. rer. nat. Johannes Wöstemeyer (Friedrich-Schiller Universität Jena)**
- 3. Prof. Dr. Holger G. Rohde (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)**

Tag der Verteidigung: 05.01.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Zusammenfassung.....	3
3	Einleitung	5
3.1	β-Lactamresistenzen bei gramnegativen Bakterien.....	5
3.1.1	Mechanismen der β-Lactamresistenz.....	6
3.1.2	Einteilung der β-Lactamasen.....	7
3.1.3	Resistenzepidemiologie: aktuelle Statistik in Deutschland und weltweit.....	10
3.1.4	Mikrobiologische und gesellschaftliche Ursachen der Resistenzentwicklung	11
3.2	Bakterielle Diagnostik und Antibiotikatherapie.....	13
3.2.1	Diagnostische Verfahren bei Blutstrominfektionen.....	13
3.2.1.1	Kulturbasierter Nachweis in der Routinediagnostik	13
3.2.1.2	Molekularbiologische Verfahren in der Diagnostik.....	13
3.2.2	Kombinierter Einsatz von Wirkstoffen	15
3.3	Ziele der Arbeit	16
4	Materialien.....	18
4.1	Bakterienstämme und Plasmide	18
4.2	Nährmedien und Antibiotika.....	20
4.3	Eingesetzte Kits.....	21
4.4	Verwendete Oligonukleotide.....	21
4.5	Materialien für RT, PCR und Pyrosequenzierung	23
4.6	Puffer und Lösungen	24
4.7	Sonstige Materialien.....	25
4.8	Geräte	25
4.9	Computerprogramme	27
5	Methoden.....	27
5.1	Mikrobiologische Methoden	27
5.1.1	Bakterienanzucht und Stammhaltung	27
5.1.2	Keimzahlbestimmung	27
5.1.3	Herstellung kalziumkompetenter Zellen.....	28
5.1.4	Mikrodilutions-Methode zur Sensitivitätstestung.....	28
5.1.5	Checkerboard Design und Auswertung	29

5.1.6	Blättchendiffusionstest.....	30
5.1.7	Efflux-Messung.....	31
5.2	Molekularbiologische Methoden	32
5.2.1	Präparation von Plasmid-DNA	32
5.2.2	Herstellung des pCTX-M-15 Plasmides und Transformation in <i>E. coli</i> JM109 ...	32
5.2.3	Transformation von pET15 in <i>E. coli</i> JM109	33
5.2.4	RNA Isolation	33
5.2.4.1	Tempus RNA Isolation	33
5.2.4.2	Ammoniumacetat-Fällung	34
5.2.4.3	RNA Isolation aus Blutkulturen nach der Trizol-Chloroform-Säulen- Methode	35
5.2.5	Konzentrationsbestimmung.....	35
5.2.6	Integritätsprüfung der Gesamt-RNA.....	36
5.2.7	Reverse Transkription	37
5.2.8	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	38
5.2.9	Agarosegelelektrophorese.....	39
5.2.10	Amplifikation für die Sequenzierungen.....	39
5.2.11	Pyrosequenzierung	39
5.2.12	Sequenzextraktion, Erstellung von Sequenzvergleichen und phylogenetischen Stammbäumen.....	40
5.2.13	Auswertung der Sequenzierungsergebnisse.....	40
5.2.14	Statistische Auswertungen	41
6	Ergebnisse	42
6.1	Entwicklung eines differenziellen Nachweises für CTX-M β -Lactamasen.....	42
6.1.1	Design von Oligonukleotiden zur gezielten CTX-M-Amplifikation.....	42
6.1.2	Bestimmung der Stringenz der PCR	43
6.1.3	Bestimmung der Spezifität der Amplifikate	44
6.1.4	Bestimmung der Spezifität in der Pyrosequenzierung.....	46
6.1.4.1	Differenzierung der CTX-M Gruppen basierend auf der Region 1	46
6.1.4.2	Differenzierung der CTX-M Varianten basierend auf der Region 2	48
6.1.4.3	Nachweis der CTX-M Varianten unter Koexistenz diverser β -Lactamasen... 48	
6.1.5	Entwicklung eines Nachweissystems aus positiven Blutkulturen	49
6.1.5.1	Evaluierung der RNA Isolationsmethode	49
6.1.5.2	Nachweisgrenze und Spezifität der Detektion.....	50

6.1.6	Entwicklung eines direkten Nachweises aus EDTA-Blut.....	51
6.1.6.1	Optimierung der RNA Isolation / Reinigung.....	51
6.1.6.2	Optimierung der Reversen Transkription	52
6.1.6.3	Optimierung der PCR Bedingungen	54
6.1.6.4	Spezifität und Sensitivität der Echtzeit-PCR	54
6.1.6.5	Nachweisgrenze der direkten Nachweismethode	55
6.1.7	Messzeit beider Methoden	56
6.1.8	Validierung mit unbekanntem ESBL-Isolaten	56
6.2	Kombinationstherapie bei Carbapenem-resistenten <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolaten ..	57
6.2.1	Phänotypische und genotypische Charakterisierung der Stämme	57
6.2.1.1	Resistenzprofile.....	57
6.2.1.2	Mutationen in den <i>ompK35</i> und <i>ompK36</i> Genen.....	58
6.2.1.3	Veränderungen im Influx- und Efflux-Mechanismus.....	59
6.2.2	Effekte der 2- und 3-fach Antibiotikakombination.....	60
6.2.3	Synergieeffekte im Blättchendiffusionstest	63
7	Diskussion	65
7.1	Molekulare Diagnostik von β -Lactamasen	65
7.1.1	Welche Anforderungen sollten molekulare Nachweismethoden bei Blutstrominfektionen erfüllen?	65
7.1.2	Welche Herausforderungen stellen β -Lactamasen an das Nachweissystem?	66
7.1.3	Welche Vorteile hat das vorgestellte Nachweissystem?.....	67
7.1.4	Werden die Ansprüche an die Messzeit und Sensitivität erfüllt?	68
7.1.5	Welche klinische Relevanz hat der Schnellaufweis von Blutstrominfektionen?.....	69
7.2	Antibiotikatherapie bei multi-resistenten gramnegativen Bakterien.....	70
7.2.1	Wann sind Antibiotikakombinationen sinnvoll?.....	70
7.2.2	Welche Rolle spielen die β -Lactam-Resistenzmechanismen bei der Kombinationstherapie?	72
7.2.3	Welche Mechanismen stehen hinter der Synergie mit Colistin?	74
8	Schlussfolgerungen.....	75
9	Literatur- und Quellenverzeichnis	I
10	Anhang	77

10.1	Zusätzliche Daten	77
10.1.1	Sequenzanalysen	77
10.1.2	DNA Größenstandards	78
10.1.3	pCTX-M-15 Standard	78
10.1.4	Entwicklung des Schnellnachweises	79
10.1.5	Analysedaten der Sequenzierungsregionen 1 und 2	80
10.1.6	Analysedaten der Kombinationstherapie	84
10.2	Danksagung	91
10.3	Tabellenverzeichnis	92
10.4	Abbildungsverzeichnis	93
10.5	Lebenslauf	94
10.6	Ehrenwörtliche Erklärung	97

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AS	Aminosäure
Asp	Asparat
bla	β -Lactamasegen
ARS	Antibiotika Resistenz Surveillance
BLAST	Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten (Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	Rinderserumalbumin
Btn	Biotin
ca.	Zirka
CAZ	Ceftazidim (β -Lactamantibiotikum)
cDNA	komplementäre DNA
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CST	Colistin
C _T -Wert	Zyklenzahl beim Erreichen des Schwellenwertes (Echtzeit-PCR)
Del	Deletion
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat; umfasst dATP, dTTP, dGTP, dCTP
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	β -Lactamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (extended spectrum beta-lactamases)
et al.	und andere (et alii)
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EARS Net	Europäische Datenbank zur Resistenzentwicklung (Antimicrobialresistance interactive database)
ECCMID	European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FICI	Kennzahl zur Definition von Wirkstoffinteraktionen (fractional inhibitory concentration index)
for	vorwärts (forward)
G	Guanin
Gly	Glycin
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
Ins	Insertion
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
IR	Infrarot
IS-Element	Insertionselement
kb	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall, Statistische Analyse
LB	<i>Lysogeny Broth</i> , ein Nährmedium
MALDI-TOF MS	Massenspektrometer für große Moleküle (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer)
MH	Müller-Hinton (Nährmedium)

MEM	Meropenem
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MRGN	Multi-resistenten, gramnegativen Bakterien
4MRGN	Multi-resistenten, gramnegativen Bakterien; resistent gegen 4 definierte Antibiotikagruppen
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NCBI	Webseite für den Zugriff auf biomedizinische und genomische Daten (National Center for Biotechnology Information)
NDM	New Delhi Metallo- β -Lactamase
NP	Nukleotidposition
NRZ	Nationales Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger Bochum
NTC	Kontrolle ohne DNA-Matrize (No template control)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
σ	Standardabweichung (Statisches Auswertung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PBP	Penicillin-bindendes Protein (penicillin binding protein)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PPB	Kalium-Phosphat Puffer (potassium phosphate buffer)
ρ	Rangkorrelationskoeffizient (Statisches Auswertung)
rev	rückwärts (reverse)
RIN	Qualitätswert für RNA-Proben (RNA Integrity Number)
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RKI	Robert-Koch Institut Wernigerode
RPE	Puffer aus dem Rneasy Mini Kit (Qiagen)
RT-PCR	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)
RW1	Waschpuffer aus dem Rneasy Mini Kit (Qiagen)
seq	Sequenzierung
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphisms)
Std	Standard
Sub	Substitution
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TGC	Tigecyclin
TE	Tris-EDTA Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trizol	Reagenz zur RNA-Isolation (Phenol und Guanidiniumisothiocyanate)
VAAM	Vereinigung Allgemeiner und Angewandter Mikrobiologie
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-galactosid

2 Zusammenfassung

Weltweit wird eine Zunahme an Antibiotikaresistenzen gegenüber klinisch relevanter Wirkstoffklassen wie z.B. β -Lactamantibiotika verzeichnet. Vor allem die Ausbreitung und Variabilität der β -Lactam-spaltenden Enzyme (β -Lactamasen) bei multi-resistenten, gramnegativen Bakterien ist ein zunehmendes Problem bei der Behandlung von Infektionen. Die Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen wird vom zunehmenden Gebrauch der Wirkstoffe, der globalen Mobilität und der genetischen Variabilität der Pathogene gestützt. Aufgrund fehlender neuer Wirkstoffklassen bleiben therapeutisch nur wenige Alternativen.

Multi-resistente, gramnegative Erreger werden durch die in Leitlinien empfohlenen initialen empirischen Antibiotikatherapie meist nicht erfasst. Bei schweren Infektionen (Sepsis) steigt die Letalität mit jeder Stunde, in der eine adäquate Therapie verzögert wird. Die derzeitigen mikrobiologischen, Kultur-basierten Routinemethoden liefern definitive Ergebnisse jedoch erst am 3. - 4. Tag nach Probenahme. Ein umfassender molekulare Schnelldiagnostiktest für MRGN derzeit nicht verfügbar, da über 1200 verschiedene β -Lactamasen mit verschiedenen Substratspektra bekannt sind und kommerzielle Systeme hier keinen umfassenden Lösungsansatz bieten. In dieser Arbeit konnte ein Schnelldiagnostiksystem für β -Lactamresistenzgene aus humanen Blutproben erarbeitet werden. Der erarbeitete RNA-basierte Nachweis von β -Lactamasen der Gruppe CTX-M dient der zeitnahen und gezielten Behandlung von Blutstrominfektionen. Dabei wird die RNA aus den Blutproben isoliert, aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die phylogenetische Zuordnung der detektierten CTX-M Varianten sowie die Hydrolyseeigenschaften gegenüber den Leitsubstanzen Cefotaxim und Ceftazidim werden in der Pyrosequenzierung bestimmt. Mit dem erarbeiteten Verfahren kann innerhalb von 7 Stunden ein direkter Nachweis der CTX-M Resistenzgene aus EDTA-Blut erfolgen. Nach einer Bebrütungszeit von 6 – 8 Stunden kann ebenfalls ein Nachweis aus einer Blutkultur erfolgen, die Bearbeitungszeit beträgt hier 4 Stunden.

Infektionen durch MRGN bei denen aufgrund der Resistenz weder β -Lactame noch Fluorochinolone eingesetzt werden können (4MRGN), haben trotz gezielter Therapie eine besonders hohe Letalität, da die verbliebenen Optionen weniger wirksam und toxischer als die o.g. Standardtherapeutika sind. Nach klinischen Studien reduziert bei 4MRGN-Infektionen die gezielte Therapie mit Antibiotikakombinationen die Letalität. Bislang ist unklar, welche Kombinationspartner bei welchem Resistenzmechanismus den größten antibakteriellen Effekt

erreichen. Aufgrund der unzureichenden Daten auf dem Gebiet der Kombinationstherapie wurde *in vitro* die Wirkung der Colistin/Tigecyclin/Meropenem-Kombination gegen *K. pneumoniae* Stämme analysiert. Mittels einer Checkerboard-Analyse und des Blättchendiffusionstests konnten Synergien der Wirkstoffe hauptsächlich bei Stämmen mit hohen MHKs gegen die einzelnen Wirkstoffe der Kombination nachgewiesen werden. Die besten Ergebnisse zeigten Kombinationen mit Colistin, hier vor allem die Colistin-Tigecyclin-Kombination. Schon geringere Konzentrationen der Antibiotika führen durch den kombinierten Einsatz der Wirkstoffe zu einer antibakteriellen Wirkung. Der genaue Synergiemechanismus konnte durch die hier analysierten Resistenzmechanismen der Isolate (β -Lactamase-Profil, Porinmutationen, Efflux-Mechanismus) nicht vollends geklärt werden. Colistin scheint durch die Destabilisierung der äußeren und inneren Membran die Durchlässigkeit für die Kombinationspartner zu erhöhen. Die Kombinationstherapie zeigt zudem einen Mutationspräventionseffekt in den *in vitro* Testungen, der das Entstehen von neuen resistenten Klonen verhindert.

Sowohl das erarbeitete Nachweisverfahren als auch die Ergebnisse der Synergietestungen sind Strategien um die Letalität bei Infektionen durch MRGN zu reduzieren.

3 Einleitung

3.1 β -Lactamresistenzen bei gramnegativen Bakterien

Die erste Beobachtung antibakterieller Aktivität geht auf Alexander Fleming im Jahr 1928 zurück. Er beobachtete eine durch den Schimmelpilz *Aspergillus penicillium* entstandene Hemmzone auf einer Bakterien-Agarplatte. Die Veröffentlichung seiner Entdeckung im Jahr 1929 wurde durch die medizinische Fachwelt zunächst wenig beachtet. Erst die Entdeckung der Sulfonamide, die auf Gerhard Domagk zurückgeht (1932), führte zu einem raschen Fortschritt in der Erforschung von neuen Antibiotika und so wurden Flemings Arbeiten weiter entwickelt. Nach Einführung des Penicillins im militärischem (1941) und später im zivilem Sektor (1943) wurde ein deutlicher Rückgang der Sterblichkeit durch bakteriell-assoziierte Infektionskrankheiten verzeichnet (Abbildung 1). Kurz darauf wurden weitere Antibiotikaklassen, wie das Aminoglykosid Streptomycin (1944) entdeckt.

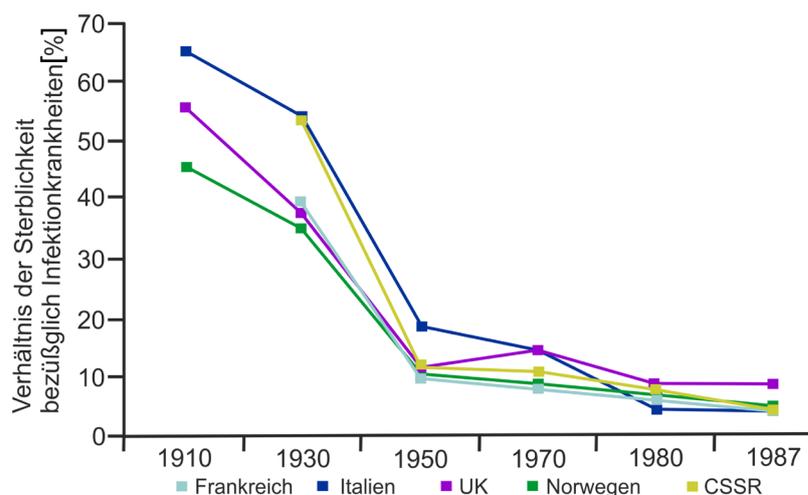


Abbildung 1: Verlauf der Sterblichkeitsrate assoziiert mit Infektionskrankheiten im Zeitraum von 1910-1987 (Grafik nach (Ball 2007)).

Der flächendeckende Einsatz der Antibiotika führte binnen weniger Jahre zur Selektion resistenter Bakterien. Das erste Penicillin-spaltende Enzym, eine plasmid-lokalisierte β -Lactamase (später als TEM-1 bezeichnet), wurde in den frühen 1960ern in gramnegativen Bakterien entdeckt (Datta und Kontomichalou 1965). Diese β -Lactamase verbreitete sich sehr schnell unter verschiedenen Bakterienarten und geographisch über den gesamten Erdball. Das gleiche Phänomen konnte bei der Einführung weiterer β -Lactamantibiotika beobachtet werden. Beispielsweise wurden nach der Markteinführung der Cephalosporine (z.B. Oxyimino-Cephalosporine, 3. Generation) β -Lactamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum

(ESBLs) detektiert (Bradford 2001). Die zunehmende Verbreitung der ESBLs führte zum steigenden Gebrauch von Reserveantibiotika. Das derzeit beobachtete Aufkommen von Carbapenem-spaltenden β -Lactamasevarianten, wie z.B. KPC, VIM, NDM und OXA, steht mit dem gesteigerten Einsatz der Carbapeneme in Verbindung (Canton et al. 2012). Das klinische Problem der Resistenzentwicklung gegenüber den β -Lactamen hat sich zwischen 1960 und 2014 von Penicillinasen, über ESBLs bis hin zu den Carbapenemasen erweitert. Durch die weltweite Resistenzverbreitung ist ein zunehmender Teil der Bevölkerung bereits mit resistenten Erregern kolonisiert (Overdevest et al. 2011, Schoevaerds et al. 2011). Die Kolonisierung mit einem ESBL-Bildner stellt ein erhöhtes Risiko einer Blutstrominfektion dar (Reddy et al. 2007). ESBL-assoziierte Blutstrominfektionen führen zu längeren Krankenhausaufenthalten und damit zu erhöhten Behandlungskosten (Leistner et al. 2014). Die Verbreitung der β -Lactam-Resistenzen trieb die Entwicklung neuer wirksamer β -Lactamderivate und β -Lactamase-Inhibitoren, welche in Kombination mit einem β -Lactam verabreicht werden, voran (Drawz und Bonomo 2010). Allerdings erreichten nur wenige Substanzen (z.B. Ceftarolin) in den letzten Jahren die Marktreife. Das abnehmende Interesse der Pharmakonzerne an der Entwicklung neuer Antibiotika forciert die derzeitige Situation. Neue Substanzklassen mit Wirksamkeit gegen multi-resistente gramnegative Erreger sind aus diesem Grund in näherer Zukunft nicht zu erwarten.

3.1.1 Mechanismen der β -Lactamresistenz

Bei *Enterobacteriaceae* ist die Produktion von β -Lactamasen, welche den β -Lactamring spalten, der wirkungsvollste Resistenzmechanismus. Die bakterizide Wirkung der β -Lactamantibiotika resultiert aus der Inhibierung der für die Quervernetzung der Peptidoglykanstränge verantwortlichen Enzyme, den Transpeptidasen (*penicillin-binding-protein* oder PBP). Der β -Lactamring ähnelt sterisch der Dipeptid-Gruppe des D-Ala-D-Ala Substrates, das zur Transpeptidierung benötigt wird. Folglich wird der β -Lactam-Wirkstoff (Substratanalogon) durch das PBP gebunden, was die Acylierung des PBPs und damit den Verlust der katalytischen Aktivität der Transpeptidase sowie den Abbruch der Quervernetzung zur Folge hat (Sauvage et al. 2008). Die ausbleibende Quervernetzung der Peptidoglykanschicht führt zur Instabilität der Zellwand. Die erhöhte Permeabilität und der durch den osmotischen Druck resultierende Verlust der Integrität der Bakterienzelle führen schließlich zur Zellyse. Bei grampositiven Bakterien sind Mutationen im aktiven Zentrum des PBPs mit einer verringerten Affinität des β -Lactams an das Target (MecA, MecC) und damit mit der Wirkstoffresistenz assoziiert (Laible et al. 1991).

Bei gramnegativen Bakterien werden Antibiotika-spaltende Enzyme in den periplasmatischen Raum sekretiert, wo sie die β -Lactamantibiotika hydrolysieren und damit die Inhibierung der PBPs verhindern. Auf dem Weg zur ihrem Wirkort müssen die β -Lactame die äußere Membran der gramnegativen Bakterien über Porine passieren. Sequenzveränderungen in der Region der Porin-codierenden Gene können zur verringerten Expression und verminderten Permeabilität bis hin zum Porinverlust führen. Der Verlust der OmpK Porine ist ein weitverbreiteter Resistenzmechanismus bei *K. pneumoniae* (Alberti et al. 1995).

Die Ausschleusung der Wirkstoffe aus dem periplasmatischen Raum in die Peripherie über Efflux-Pumpen (bei Enterobakterien meist über AcrAB/TolC) kann ebenfalls die Wirksamkeit des Antibiotikums herabsetzen (Poole 2004). Sowohl die Mutation der Porine, als auch der Efflux-Mechanismus kommen immer häufiger in Kombination mit β -Lactamasen vor, was die Resistenz gegenüber β -Lactamen verstärkt und das Resistenzprofil gegenüber anderen Antibiotikawirkstoffen ebenfalls beeinflusst.

3.1.2 Einteilung der β -Lactamasen

Die zunehmende Zahl an β -Lactamasevarianten erforderte eine Klassifizierung. Diese wurde nach zwei Systematiken vorgenommen: Die durch Ambler 1980 eingeführte molekulare Nomenklatur beruht auf der Aminosäuresequenzähnlichkeit und unterteilt die Enzyme in 2 Hauptgruppen. Die Klasse A wurde dabei durch ein Serin, die Klasse B (Metallo- β -Lactamasen) durch bivalente Kationen (meist Zink) im aktiven Zentrum definiert (Ambler 1980). Die Klasse der Serin- β -Lactamasen wurde durch die Abtrennung der Klasse C (Jaurin und Grundstrom 1981) und der Klasse D (Ouellette et al. 1987) erweitert. Bush, Jacoby und Medeiros gliederten die β -Lactamasen anhand ihrer Substrat – und Inhibitorprofile in die funktionellen Gruppen 1 bis 4 (Bush et al. 1995). Durch die rasch expandierende Anzahl an neu-identifizierten Varianten wurde die Einteilung und Nomenklatur der β -Lactamasen bzw. ESBLs stark diskutiert (Bush und Jacoby 2010, Lee et al. 2012, Livermore 2008) und resultierte in einer Erweiterung der Klassen. Eine eigen erstellte phylogenetische Übersicht der aktuell annotierten β -Lactamasen ist in Abbildung 2 dargestellt.

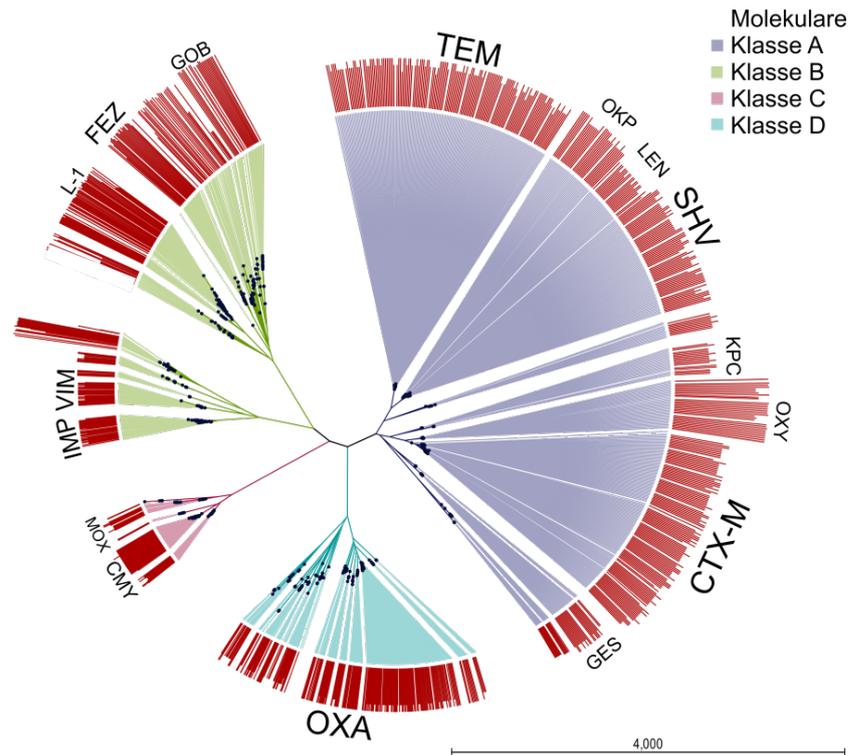


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der β -Lactamasen. Insgesamt wurden 1217 annotierte β -Lactamase Aminosäuresequenzen aus diversen Datenbanken (<http://www.mbled.uni-stuttgart.de>, <http://bigsdh.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>, <http://www.lahey.org/Studies>) verwendet. Die phylogenetische Sequenzanalyse wurde mittels CLC Mainworkbench 7.0.2 (Qiagen) unter Verwendung des Algorithmus ClustalW erstellt. Die Stammbaum-Rekonstruktion wurde mit der Neighbour Joining Methode (Bootstrap-Verfahren: 1000 Wiederholungen) erstellt. Die Scala zeigt den Aminosäureunterschied nach Jukes und Cantor.

Die Nomenklatur der β -Lactamasen wird über die Lahey-Datenbank (www.lahey.org/Studies) vorgenommen. Die Einteilung der β -Lactamasen ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Einteilung der β -Lactamasen.

Molekulare Einteilung (nach Ambler)	Aktives Zentrum	Funktionelle Einteilung (nach Bush-Jacoby-Medeiros)	Enzymvariante	Substrat
A	Serin	2b	TEM-1, SHV-1	Ampicillin, einzelne Cephalosporine
		2be, 2br, 2c	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER, VEB	Cephalosporine (3. Gen.)
		2e, 2f	KPC, GES, SME	alle β -Lactame
B1	Zinkbindende Thiolgruppe	3	VIM, IMP	alle β -Lactame
B2			GOB, FEZ	
B3			CphA	
C	Serin	1	AmpC, DHA, MOX	Cephamycine, Cephalosporine
		1e	CMY-37	Cephalosporine (3. Gen.)
D	Serin	2d, 2de, 2df	OXA-1, OXA-10 OXA-11, OXA-15 OXA-23, OXA-48	Oxacillin, Ampicillin Cephalosporine (3. Gen.) alle β -Lactame

Ein Großteil der ESBLs wird der von Ambler definierten Klasse A zugeordnet. Punktmutationen innerhalb der Varianten TEM-1 und SHV-1 führten zur Veränderung des aktiven Zentrums und zur Erweiterung des Substratspektrums von Penicillinen und Schmalspektrum Cephalosporinen bis hin zur Hydrolyseaktivität gegenüber Cephalosporinen der 3. und 4. Generation (Fechir et al. 2010). Ebenfalls der Klasse A angehörig und zu den ESBLs zählend ist die Gruppe der CTX-M Varianten (Cefotaximasen). Diese Gruppe hat ihren Ursprung in den chromosomal-codierten β -Lactamasen verschiedener *Kluyvera*-Species, was die relativ geringe Sequenzübereinstimmung innerhalb der CTX-M Gruppe widerspiegelt (Bonnet 2004). Die Mobilisierung der natürlichen *bla*_{CTX-M} Gene auf Plasmide (Humeniuk et al. 2002) ist die Ursache für die schnelle Verbreitung der Gene. Die Variante CTX-M-15 wird weltweit detektiert und ist auch in Deutschland prävalent (Zhao und Hu 2013). Aus den Daten vom RKI geht hervor, dass 97,5 % der ESBL-Isolate in Deutschland der CTX-M Gruppe zugeordnet werden (Pfeifer und Eller 2012). Anhand phylogenetischer Untersuchungen der Gruppe wurde eine Einteilung in 5 Hauptgruppen vorgenommen (Bonnet 2004).

CTX-M β -Lactamasen weisen eine hohe Aktivität gegenüber Aminopenicillinen, Carboxypenicillinen, Ureidopenicillinen und Schmalspektrum-Cephalosporinen auf.

Gegenüber Carbapenemen und Cefoxitin zeigt die Gruppe keine Hydrolyseaktivität (Bonnet 2004). Alle der CTX-M Gruppe angehörigen β -Lactamasen zeigen eine Hydrolyseaktivität gegenüber Cefotaxim, wohingegen die Aktivität gegen Ceftazidim, einem weiteren Vertreter der Cephalosporine der 3. Generation, nur bei einem Teil der Varianten vorliegt. Die Resistenz gegenüber Ceftazidim ist mit einer Sequenzveränderung an den Aminosäurepositionen 167 und 240 assoziiert (Poirel et al. 2002, Cartelle et al. 2004). Einige Varianten der CTX-M Gruppe zeigen eine Hydrolyseaktivität gegenüber Aztreonam und Cefepim.

Carbapenemasen sind in den molekularen Klassen A, B und D vertreten und hydrolysieren neben Penicillinen und Cephalosporinen höherer Generationen auch Carbapeneme (Nordmann und Poirel 2002).

3.1.3 Resistenzepidemiologie: aktuelle Statistik in Deutschland und weltweit

Die Zunahme an Antibiotikaresistenzen führte zur Gründung von Netzwerken zur Überwachung der Resistenzentwicklung auf regionaler, nationaler und internationaler Ebene. National werden die Daten zur Resistenzlage durch das Netzwerk Antibiotika Resistenz Surveillance (ARS) aufgearbeitet.

Das auf europäischer Ebene für die Datenanalyse verantwortliche Zentrum ECDC veröffentlichte 2013 einen aktuellen Bericht zur Resistenzlage (Fraser et al. 2013). Dabei wurde zwischen 2008 und 2011 ein signifikanter Anstieg an *E. coli* Stämmen mit einer Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in 18 der 28 erfassten europäischen Länder verzeichnet. Der Anteil an ESBL-positiven *E. coli* Isolaten schwankte dabei zwischen 71 % und 100 %. Weiterhin wurde ein Süd-Nord-Gefälle mit den höchsten ESBL-Resistenzanteilen, bezogen auf alle Isolate in Südeuropa, registriert (Schweden 3 %, Zypern 36 %). Ebenfalls konnte eine Zunahme an multi-resistenten *E. coli* und *K. pneumoniae* (Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation, Fluoroquinolone sowie Aminoglycoside) in 13 von 28 Ländern detektiert werden. Aufgrund dieser Entwicklung ist der Einsatz von Reserveantibiotika, wie z.B. Carbapenemen, immer häufiger notwendig, was wiederum die Resistenzentwicklung gegenüber dieser β -Lactam-Untergruppe forciert.

Auch in dem von der WHO 2014 veröffentlichten Bericht zur weltweiten mikrobiellen Resistenzentwicklung wurden die Resistenzen von *E. coli* und *K. pneumoniae* gegenüber den

β -Lactamen als wachsendes Problem erkannt (World 2014). Beleuchtet man die weltweite Entwicklung anhand des Forschungsinteresses in den Jahren von 1950 bis 2014 basierend auf der Anzahl von Publikationen (siehe Abbildung 3), wird das nachlassende Interesse an Penicillinasen und der starke Anstieg an Veröffentlichungen zu den Themen ESBLs und Carbapenemasen sowie *E. coli* und *K. pneumoniae* Infektionen im klinischen Sektor deutlich.

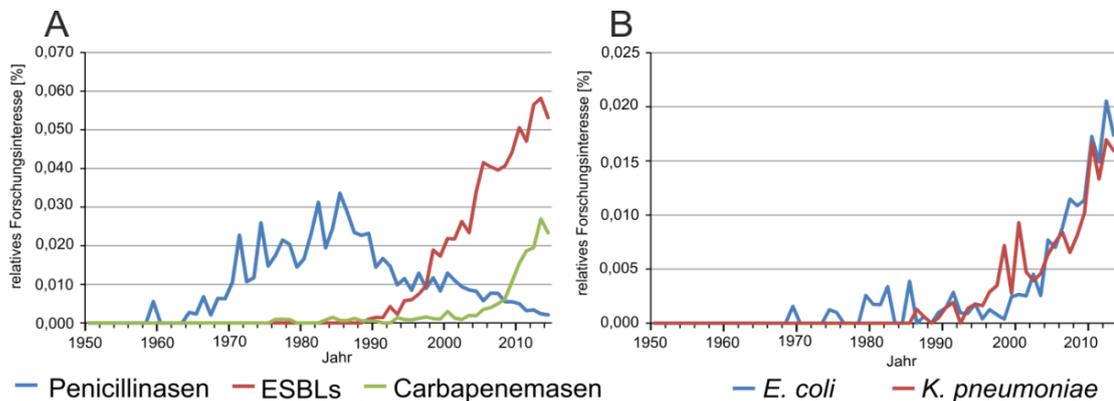


Abbildung 3: Entwicklung des Forschungsinteresses zwischen 1950 und 2014. Im Bild A ist das Forschungsinteresse der Themengebiete Penicillinasen, ESBLs und Carbapenemasen, im Bild B zu den Themengebieten *E. coli* und *K. pneumoniae* Infektionen dargestellt. Die Daten sind im Verhältnis zum Forschungsinteresse im Bereich 'medizinische Versorgung' aufgetragen (Daten aus GoPubMed.org extrahiert).

Im Anbetracht der rückläufigen Neuentwicklung von wirksamen antibakteriellen Präparaten und der dargestellten Resistenzlage stehen immer weniger Therapieoptionen zur Verfügung.

3.1.4 Mikrobiologische und gesellschaftliche Ursachen der Resistenzentwicklung

Zahlreiche Faktoren begünstigen und erklären die rasante Verbreitung der bakteriellen Resistenzen innerhalb der letzten Jahrzehnte. Resistente Bakterienstämme weisen gegenüber den sensiblen Vertretern milieuhabhängig häufig Fitnessnachteile auf (Levin et al. 1997), weil die betroffenen Zielstrukturen meist essentielle Funktionen in der Zelle erfüllen (Andersson 2003). Da die Umgebungsbedingungen das Ausmaß der Fitnesskosten definieren, können sich Wachstumsvorteile *in vivo* und *in vitro* unterscheiden (Andersson und Hughes 2010). Resistente Bakterienstämme haben in Anwesenheit von Antibiotika Wachstumsvorteile, in denen die Fitnesskosten eines sensiblen Stammes größer sind als die Kosten der Resistenz (Sandegren 2014).

Durch den erhöhten Einsatz von Antibiotika in der Veterinär –und Humanmedizin (Kluytmans et al. 2013), kommt es zum erheblichen Eintrag der Substanzen in die Umwelt. Daraus resultiert eine zunehmende Selektion resistenter Bakterien (Smith et al. 2002). Der schnelle speziesübergreifende Austausch genetischer Information mittels mobiler Elemente und die kurzen Generationszeiten der Mikroben beschleunigen die Ausbreitung der Resistenzgene in der Mikroflora. Die Verbreitung von bestimmten Plasmiden (Pfeifer et al. 2010), Insertionssequenzen, Integrons und/oder Transposons zwischen unterschiedlichen Stämme/Arten (horizontaler Gentransfer) (Chong et al. 2011) sowie die Verlagerung zwischen mobilen genetischen Elementen (Pfeifer et al. 2010), sind die häufigsten Mechanismen einer Mobilisierung von Resistenzgenen. Außerdem werden bestimmte resistente Klone (z.B. der CTX-M-15 tragende und weltweit verbreitete ST131 *E. coli* Klon) und bestimmte mobile Elemente besonders erfolgreich verbreitet (Woodford et al. 2011, Nicolas-Chanoine et al. 2014).

Durch eine unzureichende oder erfolglose Therapie, den zulassungsüberschreitenden Einsatz der Antibiotika und die steigende Reisetätigkeit wird die weltweite Verbreitung der resistenten Klone gefördert (Nobrega und Brocchi 2014, Hawkey und Jones 2009). Die Abbildung 4 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

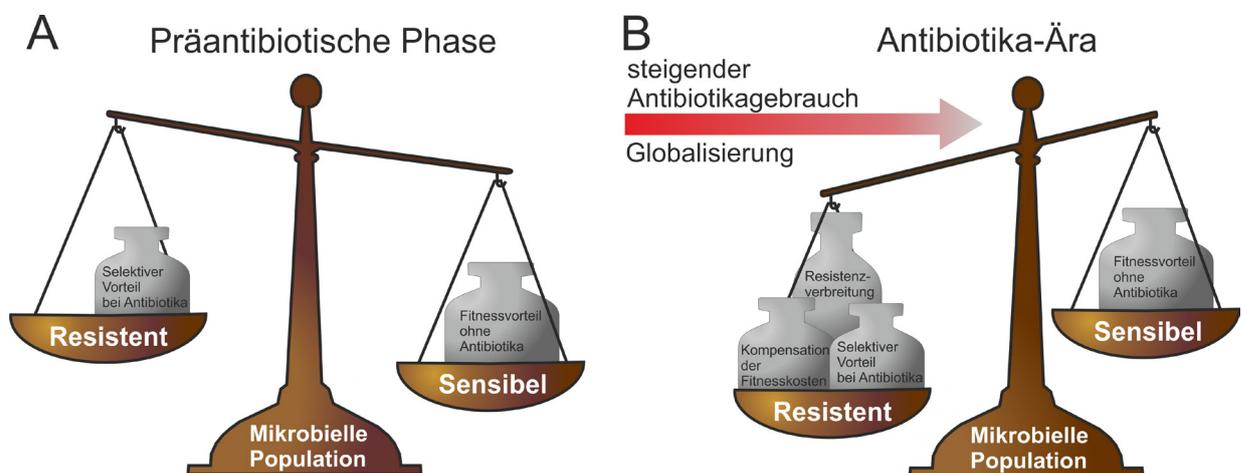


Abbildung 4: Darstellung der Resistenzentwicklung. Die in Bild A abgebildete Ausprägung einer natürlichen Population wird durch den steigenden Gebrauch von Antibiotika und die Globalisierung in Richtung einer spezialisierten Population beeinflusst (Bild B).

3.2 Bakterielle Diagnostik und Antibiotikatherapie

3.2.1 Diagnostische Verfahren bei Blutstrominfektionen

3.2.1.1 Kulturbasierter Nachweis in der Routinediagnostik

Um eine inadäquate, initiale Therapie zu vermeiden bzw. den Zeitraum bis zu einer resistenzgerechten Therapie zu minimieren, ist eine zeitnahe und gezielte Diagnostik unumgänglich. Die Zeitspanne bis zur spezifischen Therapie hat direkten Einfluss auf die Letalitätsrate der Patienten (Kumar et al. 2009). Eine effiziente und zeitnahe Diagnostik ist nicht nur für den aktuellen Behandlungsverlauf, sondern auch für nicht betroffene Patienten von Bedeutung. Eine schnelle und gezielte Therapie verringert die Gefahren der Verbreitung von Resistenzgenen.

Zur Analyse von Blutstrominfektionen stehen die Kultur-basierten und die molekularbiologischen Nachweismethoden zur Verfügung. In der Routinediagnostik erfolgt der kulturelle Nachweis durch die Anzucht der Erreger in Blutkulturflaschen, gefolgt von der Isolation (Vereinzelung der Kolonien) auf Agarplatten und der anschließenden Differenzierung und Resistenztestung. Beim Blutkultur-basierten Nachweis wird eine Detektionsgrenze von einem Keim pro 10 ml Blut (1 KBE/ml) erreicht, wobei hier nur kultivierbare Mikroorganismen eingeschlossen sind (Afshari et al. 2012). Aufgrund der hohen Probenzahl in der Routinediagnostik wird meist auf automatisierte Systeme wie z.B. Vitek® 2 (bioMérieux, Inc) oder Phoenix™ (Becton Dickinson and Company) zurückgegriffen (Drieux et al. 2008). Abhängig von der Dauer bis zur Positivdetektion der Blutkultur (durchschnittliche Inkubationszeit beträgt 10-15 Stunden) (Palmer et al. 2013, Marra et al. 2006, Peralta et al. 2006) wird eine Analysezeit von 63 bis mehr als 72 Stunden für Bakterien benötigt (Klouche und Schroder 2008). Der kulturelle Nachweis liefert recht zuverlässig die Speziesidentifikation und ein Resistogramm, gibt aber keine Auskunft über vorhandene Resistenzgene. Aufgrund des hohen Zeitaufwandes der klassischen, kulturellen Methode gewinnt der direkte, molekulare Nachweis in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung.

3.2.1.2 Molekularbiologische Verfahren in der Diagnostik

Vor allem bei älteren und immunsupprimierten Patienten können Bakterienkonzentrationen von 1-10 KBE/ml Blut bereits zu septischen Krankheitsverläufen führen (Weinstein 1996, Reimer et al. 1997). Molekularbiologische Verfahren sind bezüglich der Nachweisgrenze

gegenüber konventionellen, kulturellen Methoden weit unterlegen (Weinstein 1996). Aus diesem Grund wird üblicherweise eine Kultur-basierte Anzucht der Pathogene dem molekularen Nachweis vorgeschaltet. Folglich dient eine positive Blutkultur bzw. eine Reinkultur den meisten molekularen Methoden als Ausgangsmaterial. Bei Proben antibiotisch anbehandelter Patienten ist der Sachverhalt allerdings umgekehrt und die Kultur-basierte Diagnostik verliert an Sensitivität, so dass molekulare Methoden bessere Ergebnisse liefern (Peters et al. 2004).

Ein Großteil der molekularbiologischen Nachweisverfahren zur Detektion von Blutstrominfektionen basiert auf der Extraktion von Nukleinsäuren, der Amplifikation sowie der Identifikation bestimmter Genmarker mittels einfacher Gelelektrophorese, Hybridisierung (z.B. ELISA, Mikroarray) oder Sequenzierung (Afshari et al. 2012, Johansson et al. 2008). Diese Methoden bieten sowohl die Möglichkeit eines Speziesnachweises (über Gattungsbzw. Spezies-spezifischer Gene, wie Toxine oder Stoffwechselfgene), eines Breitbandnachweises von Bakterien oder Pilzen durch hochkonservierte Gene (z.B. panbakterielle 16S/23S RNA) mit anschließender Sequenzierung oder den Nachweis von einzelnen Resistenzgenen. Die parallele Detektion von unterschiedlichen Pathogenen oder Genen innerhalb eines pathogenen Erregers ist ebenfalls üblich (Multiplex PCR) (Klouche und Schroder 2008).

Im Vergleich zu den Kultur-basierten Methoden verkürzt der molekulare Nachweis des Erregers und der Resistenzdeterminanten direkt aus der Blutprobe die Detektionszeit wesentlich. Die kommerziell erhältlichen Systeme von Vyoo (SIRS-Lab, Deutschland), LightCycler SeptiFast (Roche, Deutschland), Plex-ID (Abbott, USA), VAPChip (Eppendorf Array Technologies, Belgien) und MagicPlex (SeeGene, Korea) beruhen auf einem multiplex PCR Ansatz und einer anschließenden Identifizierung. Diese Methoden sind allerdings mit recht hohen Kosten und technischem Aufwand verbunden und lassen ein umfangreiches Spektrum an antibiotischen Resistenzmarkern vermissen.

Daher sind die Anforderungen an ein adäquates molekulares Nachweissystem neben einer Nachweisgrenze, die der Bakterienkonzentration septischer Blutproben entspricht, ein hoher positiver sowie negativer prädiktiver Wert. Bedingt durch die starke Sequenzvariabilität der β -Lactamasegruppe muss die Methode eine breite Sequenzpalette als Target zulassen bzw. ausbaufähig sein.

3.2.2 Kombiniertes Einsatz von Wirkstoffen

Die zunehmenden Resistenzen der *Enterobacteriaceae* schränken die klinischen Therapiemöglichkeiten deutlich ein. Infektionen mit Enterobakterien, die Carbapenemasen wie z.B. KPC bilden, sind mit höheren Mortalitätsraten verbunden (Patel et al. 2008, Borer et al. 2009). Aufgrund dieser Entwicklung wird zunehmend auf Reserveantibiotika wie Colistin und Tigecyclin zurückgegriffen. Jedoch wurden bereits auch gegen diese Antibiotika gerichtete bakterielle Resistenzmechanismen nachgewiesen (Campos et al. 2004, Entenza und Moreillon 2009). In retrospektiven Studien konnte bei Patienten mit *K. pneumoniae* Bakteriämie unter einer Kombinationstherapie mit Colistin, Tigecyclin und Meropenem eine Verringerung der Mortalitätsrate gegenüber einer Monotherapie beobachtet werden (Qureshi et al. 2012, Tumbarello et al. 2012).

Colistin (Antibiotikaklasse: Zyklische Peptide) wirkt bakterizid durch die Störung der Membranintegrität. Das kationische Antibiotikum wechselwirkt mit den negativ geladenen Lipopolysacchariden der äußeren Membran (Schindler und Osborn 1979), was zur erhöhten Permeabilität der Zellhülle führt. Zusätzlich kann Colistin auch mit der Plasmamembran interagieren und die protonenmotorische Kraft entkoppeln, was folglich zum Zelltod führt. Resistenzen gegen das Antibiotikum entstehen hauptsächlich durch Veränderungen in der Zusammensetzung der Lipopolysaccharide, dem initialen Wirkungsort des Wirkstoffes (Biswas et al. 2012). Tigecyclin (Glycylcyclin), ein bakteriostatischer Wirkstoff, bindet an der Akzeptorstelle für die eintretende Aminoacyl-tRNA der 30S Untereinheit der Ribosomen. Damit verhindert Tigecyclin die Translation und inhibiert die Proteinbiosynthese (Entenza und Moreillon 2009). Durch eine Überexpression von Efflux-Systemen, wie AcrAB (in *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *K. pneumoniae*) und MexXY-OprM (in *P. aeruginosa*), können Resistenzen gegen das Antibiotikum entstehen (Entenza und Moreillon 2009).

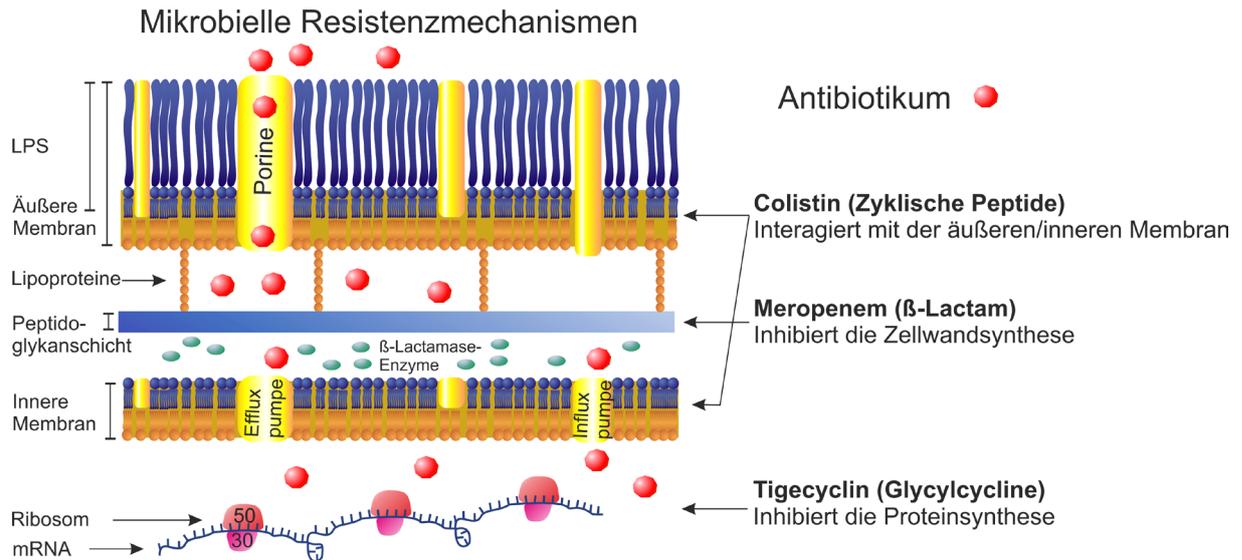


Abbildung 5: Bakterielle Angriffspunkte einer Kombinationstherapie mit Meropenem, Colistin und Tigecyclin. LPS = Lipopolysaccharide

Durch den kombinierten Einsatz von Colistin, Tigecyclin und Meropenem werden drei verschiedene, substantielle Zellprozesse (Integrität der Zellmembran, Translation und Zellwandsynthese) gestört. Diese sind in Abbildung 5 zusammengefasst. Synergien zwischen Colistin und Tigecyclin konnten bereits bei *in vitro* und *in vivo* Studien belegt werden (Betts et al. 2014). Der Wirkmechanismus der Kombinationstherapie ist allerdings noch ungeklärt.

3.3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, innovative diagnostische Strategien für den Nachweis von MRGN zu entwickeln. Die beiden erarbeiteten Strategien sollen die Nachteile der aktuellen Routinediagnostik überwinden und perspektivisch dazu beitragen, die erhöhte Letalität von MRGN-Infektionen durch eine optimierte Diagnostik zu reduzieren.

I) Den Hauptteil der vorliegenden Arbeit stellt die Entwicklung eines direkten Nachweisverfahrens zur Detektion von CTX-M β-Lactamasen aus humanen Blutproben dar. Diese molekularbasierte Methode sollte den Schnellaufweis von Resistenzen bei Blutstrominfektionen ermöglichen und eine möglichst kurze Detektionszeit aufweisen. Einige β-Lactamasen werden erst nach Induktion durch das Antibiotikum produziert (z.B. AmpC β-Lactamasen) (Zeng und Lin 2013). Andere liegen kryptisch im Genom und sind klinisch nicht relevant. Um ausschließlich transkribierte Resistenzgene nachzuweisen, wurde mRNA als Ausgangsmaterial für den Nachweis ausgewählt. Ferner sollte durch den Einsatz von mRNA, die üblicherweise in mehr Kopien als die entsprechenden Gene vorliegt, die Nachweisgrenze

soweit gesenkt werden, dass der direkte Nachweis aus Vollblut ohne vorherige Kultivierung gelingt.

II) Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Frage, wie effizient antibiotische Kombinationstherapien gegen ESBL und Carbapenem-resistente Enterobakterien sind und ob die wirksamste Kombination aufgrund des molekularen Resistenzmechanismus vorhergesagt werden kann? Retrospektive Studien beschreiben eine verringerte Mortalitätsrate der Antibiotikakombination Colistin, Tigecyclin und Meropenem gegenüber einer Monotherapie. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollten für Enterobakterien klinisch relevante Antibiotikakombinationen mit verschiedenen Nachweismethoden *in vitro* auf ihre synergistische Wirkungsweise untersucht werden, um die ineinandergreifenden Mechanismen besser zu verstehen.

4 Materialien

4.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden vom RKI Wernigerode sowie vom NRZ Bochum zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Identifizierung der β -Lactamasegene wurde durch das RKI bzw. NRZ vorgenommen.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.

	Spezies	Genotyp/Charakteristika	Referenz
Plasmide			
	pET15b	lacI, blaTEM-2(Ap r), T7	Novagen
	pGEMT	lacI, blaTEM-2(Ap r), T7, SP6	Novagen
Stämme			
RKI 26/08	<i>E. coli</i>	CTX-M-1	RKI
RKI 443/08	<i>E. coli</i>	CTX-M-14	RKI
RKI 25/08	<i>E. coli</i>	CTX-M-15	RKI
RKI 427/06	<i>E. coli</i>	CTX-M-27, TEM-1	RKI
RKI 29/04	<i>E. coli</i>	CTX-M-3	RKI
RKI 128/04	<i>E. coli</i>	CTX-M-2	RKI
CS01	<i>E. coli</i> (JM109)	TEM-2	Diese Arbeit
RKI 2/10*	<i>E. coli</i>	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1, OXA-2, NDM-1	RKI
RKI 209/10*	<i>S. enterica</i>	CTX-M-8	RKI
RKI 45/08	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-12	RKI
RKI 28/08	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, OXA-10, SHV-5	RKI
RKI 93/07	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, TEM-1, SHV-28, OXA-1, OXA-9, CMY-like, NDM-1	RKI
RKI 346/12	<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1, SHV-1, OXA-1, OXA-9, OXA-48	RKI
RKI VW823	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-25, SHV-11, TEM-1	RKI
RKI 428/08	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-9	RKI
RKI 1/10*	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1, OXA-48, AmpC	RKI
RKI 181/13	<i>K. oxytoca</i>	OXY	RKI
K12J53	<i>E. coli</i>	Natriumazid-resistent	RKI
RKI 536/13	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2, SHV-11, TEM-1, OXA-9**, VEB, OXA-10	RKI

NRZ 00246	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48, CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	NRZ
RKI 178/11	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, TEM-1, SHV-11	RKI
NRZ 04322	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3, OXA-9**, TEM-1, SHV-11	NRZ
RKI 84/14	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	RKI
RKI 551/13	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3, TEM-1, SHV-11, OXA-9**	RKI
RKI 85/14	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2, OXA-9**, TEM-1, SHV-12	RKI
NRZ 08996	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2, CTX-M-15, OXA-1, OXA-9**, TEM-1, SHV-1	NRZ
NRZ 01732a	<i>K. pneumoniae</i>	SHV-11, VIM-1	NRZ
NRZ 01839	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48, CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	NRZ
NRZ 02915	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48, CTX-M-15, OXA-9, OXA-1, TEM-1, SHV-1	NRZ
RKI 318/11	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2, TEM-1, SHV-11, OXA-9**	RKI
RKI 346/12	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48, CTX-M-15, OXA-9, OXA-1, TEM-1, SHV-1	RKI
RKI 83/14	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	RKI
RKI 105/10	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, TEM-1, SHV-11, OXA-1	RKI
NRZ 06142	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2, VIM-1, TEM-1, SHV-11, OXA-9**	NRZ
NRZ 03656	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48, CTX-M-15, OXA-9, OXA-1, SHV-1, TEM-1	NRZ
RKI 412/11	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-3, TEM-1, SHV-11, OXA-9**	RKI
RKI 60/11	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, TEM-1, SHV-11	RKI
NRZ 05989	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2, SHV-1, SHV-12	NRZ

* weitere Informationen zu den Isolaten sind in folgenden Studien beschrieben (Pfeifer et al. 2011, Pfeifer et al. 2012, Eller et al. 2013, Grobner et al. 2009)

** nicht funktionelles Gen

Für die Evaluierung des Nachweissystems wurden 98 weitere noch nicht genotypisierte phänotypisch ESBL-positive *Enterobacteriaceae* Stämme, die durch die Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Leipzig im Rahmen einer Studie zur rektalen Kolonisierung mit ESBL-Bildnern bei Reiserückkehrern gesammelt wurden, verwendet (Lubbert et al. 2015). Die Proben wurden vom Uniklinikum Leipzig mittels ESBL-selektiver Agarplatten gewonnen. Die Identifikation der CTX-M, TEM und SHV Varianten wurde mittels Sequenzierung durch die Firma SMB GmbH durchgeführt, um die Spezifität des erarbeiteten Nachweissystems zu überprüfen.

4.2 Nährmedien und Antibiotika

Alle Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Gegebenenfalls wurde dem abgekühlten Nährmedium Antibiotikum zugegeben. Die eingesetzten Nährmedien sind in

Tabelle 3 aufgelistet. Zur Herstellung von Nährmedienplatten wurden 10 g/l Agar-Agar (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Die eingesetzten Antibiotika wurden in Stammlösungen von 25 mg/ml bis 100 mg/ml bei -20 °C gelagert und sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 3: Eingesetzte Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
LB-Medium	10 g/l Casein (tryptisch verdaut), 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Müller-Hinton Medium (kationenadjustiert)	21 g Müller-Hinton Bouillon auf 1 l Medium, 20 mg/l CaCl ₂ , 10 mg/l MgCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 0,25 M KCl, 5 ml 2 M MgCl ₂ , 20 ml 1 M Glucose, mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, mit NaOH pH 7,0 eingestellt	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika.

Bezeichnung	Konzentration der Arbeitslösung	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cefotaxim	100 mg/ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Ceftazidim	100 mg/ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Meropenem	100 mg/ml	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
Tigecyclin	25 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Colistin	100 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

4.3 Eingesetzte Kits

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Eingesetzte Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Tempus™ Blood RNA Tube	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tempus™ Spin RNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
AbsoluteRNA Wash Solution	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Machery Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® PCR clean up	Machery Nagel, Düren, Deutschland
pGEM®-T Vector System	Promega, Mannheim, Deutschland
RNAasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

4.4 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet und wurden von der Firma Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, USA) bezogen. Das lyophilisierte Material wurde mit RNase freiem Wasser auf 100 µM eingestellt.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz
Oligonukleotide als Primer zur Reversen Transkription und Amplifikation	
for _{CTX-M67}	5'-AGYGYRMC GCTKYATGCGCARR-3'
rev _{CTX-M314}	5'-TCVGCAATSGGATTRTAGTTAAYMA-3'
for _{CTX-M314}	5'-TKRTTAACTAYAATCCSATTGCBGA-3'
rev _{CTX-M739}	5'-GCCARATVACCGCRATATCR TT-3'
for _{CTX-M-15}	5'- ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCA-3'
rev _{CTX-M-15}	5'- TTACAAACCGTCGGTGACGATTT-3'
Oligonukleotide als Primer zur Pyrosequenzierung	
seq _{CTX-M211}	5'-ATGTGCAGYACCAGTA-3'
seq _{CTX-M705}	5'-BGATAARACCGGCAG-3'
Oligonukleotide als Primer zur Sequenzierung	
TEM for	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'
TEM rev	5'-TTAATCAGTGAGGCACCTAT-3'
SHV for neu	5'-GCAAAACGCCGGGTTATTC-3'
SHV rev	5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3'

CTX-M-ges for	5'-TTCGTCTCTTCCAGAATAAGG-3'
CTX-M-ges rev	5'-CAGCACTTTTGCCGTCTAAG-3'
CTX-M-21 for	5'-ACACGGATTGACCGTATTGG-3'
CTX-M-21 rev	5'-TGCTTTATGCGCAGACGAGTG-3'
CTX-M-14-C for	5'-GCTTTCTCGCCGCTGAAG-3'
CTX-M-14-C rev	5'-ATGATTCTCGCCGCTGAAG-3'
OmpK-36-a for	5'-CTCCTGGTACCGGCTCTG-3'
OmpK-36-a rev	5'-GGACTGCAGGAAGTTGTCAG-3'
OmpK35/36 for	5'-GCAGCGTCAGCGGCGAAGG-3'
OmpK35/36 rev	5'-GGAGAAGCCAGCACGCGAC-3'

4.5 Materialien für RT, PCR und Pyrosequenzierung

Der Reaktionsansatz wurde mit gestopften, sterilen und RNA/DNA-freien Spitzen unter einer Laminarbank pipettiert und vom Post-PCR Bereich abgetrennt, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Alle verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Materialien für den Ansatz der RT, PCR und Pyrosequenzierung.

Bezeichnung	Konzentration der Arbeitslösung	Hersteller
Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion		
RNaseOUT™	40 U/μl	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
SuperScript III RT Kit	200 U/μl	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Sensiscript® RT Kit Puffer	10x	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTPs	Je 2,5 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green I	10 000x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
BSA	10 mg/ml	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Platinum® Taq DNA Polymerase MgCl ₂	5 U/μl 50 mM	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Reaktion Puffer	10x	
Primer Lösungen	100 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
5x Online-Puffer	250 mM Tris, 150 mM KCl, 40 mM MgCl ₂ , pH 8,5 mit 1 M HCL einstellen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1x Online-Puffer plus Carrier	1x Online Puffer, 1 ng/ml Carrier RNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pyrosequenzierung		
Denaturation solution		Qiagen, Hilden, Deutschland
Wash solution		Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Gold Q24 reagent		Qiagen, Hilden, Deutschland
Restriktionsenzyme		
SacI	10x	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

4.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt, für mikrobiologische Arbeiten autoklaviert bzw. sterilfiltriert und sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Spezielle Chemikalien/Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Konzentration	Hersteller
Spezielle Chemikalien/Lösungen		
TRIS	1 M	Roth, Karlsruhe, Deutschland
AbsoluteRNA Wash Solution		Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RNase freies Wasser		Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	20 mg/l	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	10 mg/l	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	10 mg/l	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Buffer EL (Erylyse-Puffer)		Qiagen, Hilden, Deutschland
Glucose	1,5 M	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	2 M	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol		Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	7,5 mM	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	100 mg/ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	>99,9 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CCCP	2 mM	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
BM-27	2 mM	Dr. Handzlik, Jagiellonian University Kraków, Polen
Puffer		
1x TE Puffer	10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 7,5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
5x Online Puffer	250 mM Tris, 40 mM MgCl ₂ , 150 mM KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS Puffer	137 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,6 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7	Roth, Karlsruhe, Deutschland

50x TAE	242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; mit H ₂ O auf 1000 ml aufgefüllt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PPB-Puffer	12,5 mM K ₂ HPO ₄ , 7,8 mM KH ₂ PO ₄ , 1 mM MgCl ₂ , pH 7	Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.7 Sonstige Materialien

Weitere Materialien sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Weitere Materialien.

Material	Hersteller
BacT/Alert® SA (aerobe Blutkulturflasche)	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland
BacT/Alert® SN (anaerobe Blutkulturflasche)	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland
EDTA Monovette	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Mikrotiterplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Rotilab-Testblättchen 6 mm Durchmesser	Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.8 Geräte

In Tabelle 10 sind alle eingesetzten Geräte aufgeführt.

Tabelle 10: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Inkubatoren	
Orbital inkubator SI500	Stuart, Staffordshire, United Kingdom
Kelvitron	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
BACTEXTM FX	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
RT/ PCR	
Rotor-Gene Q	Qiagen, Hilden, Deutschland
Veriti 96Well Thermo Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Mastercycler 5330	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pyrosequenzierung	
PyroMark Q24	Qiagen, Hilden, Deutschland
Techne Dri-Block DB 3	Thermo Dux, Wertheim, Deutschland
CM 9 Schüttler	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
PyroMark Workstation	Qiagen, Hilden, Deutschland
2511 Dry vakuum Pump/Compressor	Welch, Niles, USA

PCR Laminar Box	C.B.S. Scientific Co., San Diego, USA
Zentrifugen	
Microfuge R Centrifuge	Beckman, Krefeld, Deutschland
Centrifuge 5702 RH	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Centrifuge 5424 R	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Spektroskopie	
Multiskan GO	Thermo Scientific, USA
infinite M200Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Gelelektrophorese	
Elektrophorese Sytem BlueMarine 200	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Major Science Power Supply	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
sonstige Geräte	
Vortexer	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Mixing Block MB-102	Bioer
LaminarAir	Holten
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland
NanoDrop2000	PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland

4.9 Computerprogramme

Alle verwendeten Computerprogramme sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Verwendete Computerprogramme.

Programm	Hersteller
DS Gene 1.6	Accelrys Ltd.
CLC Main Workbench 7	CLC bio, A Qiagen Company
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research
i-control 1.10, Magellan 7.1 SP1	Tecan Tecan, Männedorf, Schweiz
PyroMark Assay Design, PyroMark Q24	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rotor-Gene Q Series Software	Qiagen, Hilden, Deutschland
CorelDraw X6	Corel Corporation
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., USA

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

5.1.1 Bakterienanzucht und Stammhaltung

Die bakteriellen Stämme wurden als Glycerinkonserven bei -80 °C gelagert. Dafür wurden logarithmisch wachsenden LB-Kulturen im Verhältnis 1:10 mit 100 %igem Glycerin versetzt und durch Einlegen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und danach eingelagert.

Die Stämme wurden durch einen Ausstrich aus den Glycerinkonserven auf (selektiven) Agarplatten angezogen. Ein bis drei Kolonien der bebrüteten Agarplatten wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen eingesetzt. Die Kulturen und Agarplatten wurden über Nacht bei $35 \pm 1\text{ °C}$ bebrütet.

5.1.2 Keimzahlbestimmung

Frische Bakterienkulturen wurden seriell mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt (Verdünnungsschritte 1:10). Jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ der Verdünnungen wurden auf MH-Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausplattiert und bebrütet. Von jeder der mindestens 3 untersuchten Verdünnungsstufen wurde eine Doppelbestimmung angesetzt. Bei der Auszählung der Keimzahlen wurden nur Agarplatten berücksichtigt, welche eine Keimzahl zwischen 20 und

300 Kolonien pro Platte aufwiesen. Die Berechnung der Keimzahl erfolgte nach der Farmiloe'schen Formel.

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d$$

Dabei stellt \bar{c} den gewogenen arithmetischen Mittelwert der Koloniezahlen, $\sum c$ die Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe) dar. n_1 repräsentiert die Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe, n_2 die Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe und d den Verdünnungsfaktor der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe.

5.1.3 Herstellung kalziumkompetenter Zellen

Die *E. coli* Bakterien wurden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bebrütet. Die Zellen wurden bei 4 °C und 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Ab hier wurden alle Schritte auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde in 30 ml MgCl₂ (0,1 M) gewaschen und zentrifugiert, danach in 5 ml CaCl₂ (0,1 M) resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4,3 ml kaltem CaCl₂ (0,1 M) resuspendiert und 0,7 ml Glycerinlösung (87 %) zugegeben. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlten Mikroreaktionsbehältern aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren.

5.1.4 Mikrodilutions-Methode zur Sensitivitätstestung

Die Empfindlichkeitsprüfung (MHK-Bestimmung) wurde nach den Vorgaben der EUCAST mittels Mikrodilutionsmethode durchgeführt. Das Inokulum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte am Spektralphotometer bei 600 nm auf eine Zelldichte von 5×10^5 KBE/ml eingestellt. Je 100 µl der Suspension wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten gegeben und mit dem gleichen Volumenanteil der vorverdünnten Antibiotikallösungen versetzt. Die Platten wurden 16-20 Stunden bei 35 ± 1 °C bebrütet.

Durch eine visuelle Beurteilung des Bakterienwachstums (ersichtlich durch die Trübung der Lösung) in den einzelnen Wells wurde die Checkerboard-Analyse ausgewertet. Die MHK ist

definiert als die niedrigste Konzentrationsstufe des Antibiotikums (mg/l), die das bakterielle Wachstum inhibiert.

5.1.5 Checkerboard-Analyse und Auswertung

Für die Analysen von antimikrobiellen Synergien zwischen 3 verschiedenen Antibiotika wurde ein dreidimensionaler Ansatz gewählt. Für diese Checkerboard-Analyse wurde die Mikrodilutionsmethode angepasst und weitere Antibiotikakonzentrationen eingeschlossen. Der Konzentrationsbereich der Antibiotika für die Checkerboard-Methode richtete sich nach den zuvor bestimmten MHKs der einzelnen Antibiotika. Für Meropenem wurden 11, für Tigecyclin 7 und für Colistin 6 Verdünnungsstufen getestet. Im 96-Well Format erhöhte sich die Konzentration von Meropenem von Reihe 2 bis Reihe 12, bei Tigecyclin von Reihe B bis Reihe H. Die Colistinlösung wurde in einer konstanten Konzentration über die gesamte Well-Platte gegeben und erhöhte sich von einer Well-Platte zur Nächsten. Eine Illustration des dreidimensionalen Ansatzes ist in Abbildung 6 dargestellt.

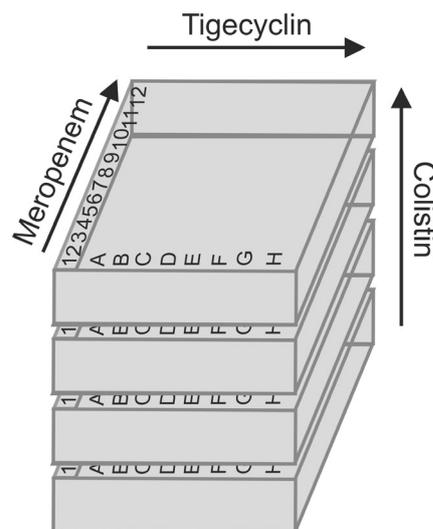


Abbildung 6: Dreidimensionaler Ansatz der Mikrodilutionsmethode zur Empfindlichkeitsprüfung. Die Pfeile geben den Konzentrationsanstieg der Antibiotika in die jeweilige Richtung an.

Jeder Ansatz wurde doppelt bestimmt und beinhaltete eine Wachstumskontrolle, ohne den Zusatz von Antibiotika. Das Design erlaubt neben der Synergieanalyse der 3-fach Kombination auch eine Analyse der Doppelkombinationen der Antibiotika. Folgende Kombinationen wurden insgesamt getestet:

2-fach Kombinationen:

Meropenem + Tigecyclin

Meropenem + Colistin

Colistin + Tigecyclin

3-fach Kombination:

Meropenem + Tigecyclin + Colistin

Die Platten wurden für 16-20 Stunden bei 35 ± 1 °C bebrütet und entsprechend der EUCAST Grenzwerte ausgewertet. Der FICI für die 2-fach und 3-fach Kombinationen wurde wie folgt berechnet:

$$FICI_{A/B} = \frac{MHK_{A(Kombination)}}{MHK_{A(Einzeln)}} + \frac{MHK_{B(Kombination)}}{MHK_{B(Einzeln)}}$$

$$FICI_{A/B/C} = \frac{MHK_{A(Kombination)}}{MHK_{A(Einzeln)}} + \frac{MHK_{B(Kombination)}}{MHK_{B(Einzeln)}} + \frac{MHK_{C(Kombination)}}{MHK_{C(Einzeln)}}$$

Um den Effekt der Kombination auszuwerten wurde jede FIC für jedes Antibiotikum in jeder Kombination bestimmt. Der FIC Index wurde als Summe jedes einzelnen FIC-Wertes berechnet und wie folgt ausgewertet (den Hollander et al. 1998):

FIC Index $\leq 0,8$

Synergistischer Effekt

FIC Index $> 0,8 - 4$

keine Interaktion, additive Effekte

FIC Index ≥ 4

Antagonistischer Effekt

5.1.6 Blättchendiffusionstest

Mit frisch gewachsenen Kolonien (MH-Agar) wurden 3 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung beimpft und die optische Dichte der Suspension auf McFarland 0,5 eingestellt. Das Inokulum wurde mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche einer MH-Agarplatte aufgebracht. Anschließend wurden die sterilen Testblättchen (Durchmesser 90 mm) auf dem Agar verteilt (EUCAST Blättchendiffusionstest zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung, Version 2.1 Februar 2012). Die Blättchen wurden in unterschiedlichen Abständen zueinander auf dem Agar platziert, um später das Ineinandergreifen der einzelnen Hemmhöfe und damit Einzel- sowie Synergieeffekte sichtbar zu machen. Die Blättchen wurden mit je 10 µl der entsprechenden Antibiotikallösungen beladen, so dass für Meropenem eine Blättchenbeladung von 40 µg, für Colistin von 20 µg und für Tigecyclin von 15 µg resultierte. Die Platten wurden für 16-20 Stunden aerob, bei 35 ± 1 °C, bebrütet.

Für die Auswertung wurden die Hemmhofdurchmesser vermessen sowie das Bakterienwachstum in den Diffusionsbereichen der Antibiotika visuell beurteilt.

5.1.7 Efflux-Messung

Die *K. pneumoniae* Stämme wurden für die Testungen über Nacht in 20 ml LB-Medium bebrütet, zentrifugiert und mit PPB-Puffer gewaschen. Die Bakterienpellets wurden in PPB-Puffer resuspendiert, auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt und bei Raumtemperatur bis zur Messung gelagert. Für den Vergleich der Efflux-Phänotypen wurden neben den 20 hauptsächlich Meropenem-resistenten *K. pneumoniae* Stämmen für die Synergietestungen weitere 20 Meropenem-sensible *K. pneumoniae* Stämme in die Messungen mit einbezogen.

Die Efflux-Messungen wurden in F-förmigen, transparenten 96-Well Platten am Infinite M200Pro Spektrometer durchgeführt. Um den Protonengradienten der Bakterienzelle zu entkoppeln wurden pro Well 200 µl der Bakteriensuspension mit 15 µM CCCP vermischt und für 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die deenergetisierten Zellen wurden mit 50 µM des Fluoreszenzfarbstoffes BM-27 (Arylidenehydantoin Piperazine) beladen. Der Farbstoff fluoresziert nicht im wässrigen Milieu, allerdings nach Bindung an plasmatische Lipide. Die Fluoreszenz wurde bei 400 nm angeregt (Extinktionsmaximum) und das Emissionslicht bei 457 nm gemessen. Die Inkubationszeit des Fluoreszenzfarbstoffes wurde in Abhängigkeit der Influxeigenschaften der Stämme gewählt und war beim Erreichen eines konstanten Messsignals abgeschlossen. Die Aktivierung des Efflux-Mechanismus wurde durch die Zugabe von 50 mM Glucose mittels eines automatischen Dispensers (Bestandteil des Spektrometers) initiiert und durch den Abfall des Fluoreszenzsignals in Echtzeit detektiert. Das gemessene Fluoreszenzsignal wurde auf der Ordinate, die Messzeit auf der Abszisse aufgetragen. Eine beispielhafte Messung ist in Abbildung 7 dargestellt.

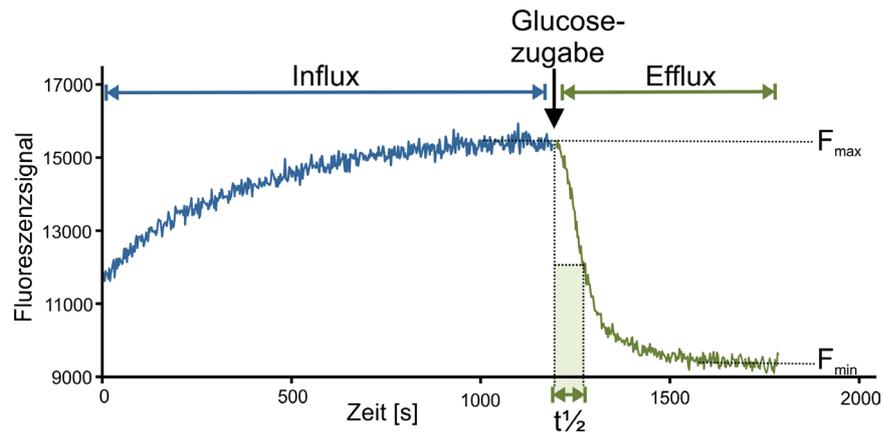


Abbildung 7: Beispielfläche Darstellung der Efflux-Messung.

Das Fluoreszenzsignal wurde unter Anwendung der folgenden einphasigen exponentiellen Zerfallsfunktion ausgewertet.

$$y = (F_{max} - F_{min}) \cdot e^{-Kx} + F_{min}$$

Dabei stellt y das gemessene Fluoreszenzsignal, x die gemessene Zeit dar. F_{max} repräsentiert das Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt $x = 0$. F_{min} repräsentiert das Fluoreszenzsignal nach Ablauf des Effluxes und K die Zerfallsrate. Die Efflux-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) entspricht dem Term $0,6932/K$ und wurde zur Einschätzung der Efflux-Eigenschaften eingesetzt. Als Indikator für die Influxeigenschaften der Bakterienzelle wurde die Farbstoffaufnahme (ΔF), resultierend aus der Differenz von F_{max} und F_{min} , eingesetzt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die plasmidale DNA wurde aus 5 ml Übernachtskultur unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentrationsbestimmung wurde am NanoDrop2000 durchgeführt.

5.2.2 Herstellung des pCTX-M-15 Plasmides und Transformation in *E. coli* JM109

Für den Einsatz als DNA-Standard innerhalb der quantitative PCR Analysen wurde das *bla*_{CTX-M-15} Gen in den pGEMT Vektor ligiert. Durch Koch-Lyse wurde die DNA aus dem Donatorstamm RKI 25/08 isoliert. Dafür wurden 1 bis 3 Kolonien in 100 μ l sterilem,

deionisierten Wasser eingerührt und für 12 Minuten bei 96 °C geschüttelt. Nach dem Abkühlen der Probe wurde die Suspension bei 15300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Lösung wurde für die Amplifikation mit dem Primerset for_{CTX-M-15}/rev_{CTX-M-15} verwendet. Das Amplifikat wurde mit dem NucleoSpin PCR clean up Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Ligation in den pGEMT-Vektor erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Transformation wurden 100 µl kalziumkompetenter *E. coli* JM 109 Zellen mit 10 µl des Ligationsansatzes in ein gekühltes Mikroreaktionsgefäß gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42 °C für 90 s wurde der Ansatz erneut 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und die Lösung bis zum Ausplattieren auf LB-Selektivplatten (versetzt mit 8 mg/l CTX) eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm bebrütet. Erfolgreich transformierte Zellen (Transformanten) wurden konserviert. Die korrekte Insertion der DNA wurde durch eine Plasmidpräparation unter Verwendung des NucleoSpin® Plasmid Kits und einer anschließenden PCR überprüft (siehe Anhang, Abbildung 27). Die isolierte zirkuläre Plasmid-DNA wurde außerdem mit dem Restriktionsenzym *SacI*, entsprechend der Herstellerangaben hydrolysiert. Die Konzentration des linearisierten Plasmids wurde am NanoDrop2000 bestimmt, mit 1x Online-Puffer plus Carrier auf eine Konzentration von 1 ng/µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

5.2.3 Transformation von pET15 in *E. coli* JM109

Für den Einsatz als CTX-M-Negativkontrolle wurde der pET15b-Vektor, der das β-Lactamasegen TEM-2 trägt, in *E. coli* JM109 Zellen transformiert und der GVO als CS01 benannt. Dafür wurden die CaCl₂-kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Zellen wurden steril 5-10 µl des Ligationsansatzes pipettiert. Die Ansätze wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Danach wurden die Zellen 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl LB wurde der Ansatz für 1 Stunde im Schüttler bei 37 °C inkubiert. 200 µl des Ansatzes wurden auf selektiven Platten ausplattiert und bei 37 °C bebrütet.

5.2.4 RNA Isolation

5.2.4.1 Tempus RNA Isolation

Während der Etablierungsphase des Nachweissystems wurden ausschließlich reine Bakterienkulturen zur Isolierung bakterieller RNA eingesetzt.

Zur Erarbeitung einer geeigneten Präparationsmethode für bakterielle RNA aus humanem Blut wurden EDTA-Blutproben von freiwilligen, gesunden Probanden (Ethikvotum des Universitätsklinikums Jena, Nummer 4016-02/14) verwendet. Die Blutproben der Probanden wurden mit Bakteriensuspensionen bekannter Keimkonzentration versetzt, um bakteriämische Blutproben zu simulieren. Dafür wurden Bakterienkulturen über Nacht unter Selektionsdruck (CTX-M Varianten mit 16 µg/ml Cefotaxim, Vertreter mit Ampicillinresistenz mit 100 µg/ml Ampicillin) bebrütet. Die Kultur wurde 1:20 mit Nährmedium verdünnt und für weitere 3 Stunden bebrütet. Die optische Dichte der Suspension wurde am Multiskan GO Spektralphotometer bei 600 nm bestimmt. Die Proben wurden mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. 3 ml EDTA-Blut wurden durch die Zugabe von 1 ml Keimsuspension beimpft. Die Gesamt-RNA wurde mittels TempusTM Blood RNA Tubes sowie dem TempusTM Spin RNA Isolationskit nach Herstellerangaben isoliert. Mittels der AbsoluteRNA Wash Solution wurde der DNase Verdau direkt auf der Säule durchgeführt. Die RNA wurde mit 100 µl Elution Solution eluiert die Konzentration am NanoDrop2000 bestimmt. Die RNA-Qualität wurde am Agilent Bioanalyzer unter Verwendung des Pico RNA Chips und des Prokaryote Total RNA Pico Assays bestimmt.

5.2.4.2 Ammoniumacetat-Fällung

Die gewonnenen RNA-Proben wurden mit Ethanol und Ammoniumacetat gefällt. Dazu wurden zu 100 µl RNA-Lösung 355 µl 99 %iges Ethanol sowie 47 µl 7,5 mM Ammoniumacetat zugegeben und 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung 15 Minuten bei 15300 rpm und 4 °C zentrifugiert. 450 µl vom Überstand wurden vorsichtig abgenommen. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt von 2 Minuten bei 15300 rpm wurde das durchsichtige RNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes verfestigt. Der verbleibende Flüssigkeitsüberstand wurde mit einer ausgezogenen 200 µl Spitze vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet aufzuwirbeln. Das Pellet wurde dann unter dem Abzug 10 Minuten (gegebenenfalls auch länger) getrocknet bis keine Feuchtigkeitsrückstände mehr sichtbar waren. Anschließend wurde das Pellet in 7,7 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und 1 µl der gefällten, aufkonzentrierten RNA zur Konzentrationsbestimmung am NanoDrop2000 und zur Qualitätsbestimmung am Agilent Bioanalyzer eingesetzt. Die restlichen 6,7 µl RNA-Lösung wurden für die Reverse Transkription verwendet.

5.2.4.3 RNA Isolation aus Blutkulturen nach der Trizol-Chloroform-Säulen-Methode

Aerobe und anaerobe Blutkulturflaschen wurden mit 1 ml Bakteriensuspension (10 KBE/ml) und 4 ml Blut (ohne Antikoagulans) beimpft. Die Flaschen wurden bei 37 °C bis zur Detektion des Bakterienwachstums im Inkubator (Bact/Alert™, bioMérieux) bebrütet.

Aus der Blutkulturflasche wurden 0,5 ml Suspension entnommen und zweimal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension je 5 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Nach der Zugabe von 800 µl saurem Trizol wurde die Lösung gemischt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert.

Für die Reinigung der RNA wurden 160 µl Chloroform zur Trizolsuspension gegeben und vermischt. Um eine Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben 20 Minuten bei 14 °C und 15300 rpm zentrifugiert. Trizol, eine Mischung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat sowie weiteren Komponenten, wird eingesetzt um Proteine und chromosomale DNA zu denaturieren und zu inaktivieren. Diese Bestandteile sammeln sich in der organischen Phase bzw. an der Grenzschicht zwischen beiden Phasen an (Chomczynski und Sacchi 1987).

Die obere wässrige Phase wurde ohne Verunreinigungen aus der Interphase mit einer Pipette abgenommen. Um optimale Bindungsbedingungen zu schaffen, wurde die wässrige Phase mit 250 µl reinem Ethanol vermischt und auf die Säule des RNeasy Mini Kits gegeben. Nach der Zentrifugation von 1 Minute bei 153000 rpm wurde der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde anschließend einmal mit 650 µl RW1 Puffer und zweimal mit jeweils 650 µl RPE Puffer aus dem RNeasy Mini Kit gewaschen. Um die Säule zu trocknen wurde 3 Minuten zentrifugiert und die Säule in ein neues, RNase-freies Mikroreaktionsgefäß eingesetzt. Die RNA wurde mit 25 µl RNase freiem Wasser von der Säule eluiert und bis zur Weiterverarbeitung bei – 20 °C gelagert.

5.2.5 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren wurde durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie einem spezifischen Multiplikationsfaktor (bei RNA Faktor 40) realisiert. Der Reinheitsgrad der Lösungen wurde durch das Verhältnis zwischen OD_{260nm} und OD_{280nm} bestimmt und zwischen einem Wert von

1,8 und 2,0 als proteinfrei ausgewertet. Alle Messungen wurden an einem NanoDrop Spektralphotometer durchgeführt. Zur Bestimmung des Leerwertes wurde die Flüssigkeit eingesetzt, welche auch zum Lösen bzw. Eluieren der Nukleinsäuren eingesetzt wurde.

5.2.6 Integritätsprüfung der Gesamt-RNA

Die isolierten RNA Proben wurden mit dem Agilent 2100 Bioanalyser kapillarelektrophoretisch getrennt und auf ihre Reinheit sowie Integrität geprüft. Die Proben wurden für 3 Minuten bei 72 °C inkubiert, um Disulfid- sowie Wasserstoffbrückenbindungen aufzulösen und so die Sekundärstrukturen zu linearisieren. Das Mikrogel wurde nach den Angaben des Herstellers präpariert und anschließend mit den Proben und einem RNA Standard beladen. Für die beschriebene Analyse wurde der Prokaryote Total RNA Pico Assay und der Pico RNA Chip eingesetzt. Die Proben bzw. Standards wurden im homogenen elektrischen Feld entsprechend ihres molekularen Gewichtes aufgetrennt und am Detektor mittels laserinduzierter Fluoreszenz erfasst. In einem Elektropherogramm wurde die gemessene Fluoreszenzintensität der ribosomalen RNA-Spezies korreliert und der RIN-Wert errechnet (Skala von eins bis zehn). Je geringer der RIN-Wert desto degradiierter (hervorgerufen durch RNase Aktivität) und damit minderwertiger ist die RNA. Für die weiteren Untersuchungen eigneten sich nur Proben, die einen RIN-Wert von mindestens 7 besaßen.

5.2.7 Reverse Transkription

Für die Erprobung des Nachweissystems wurde für die Reverse Transkription ein Reaktionsvolumen von 20 µl und eine Gesamt-RNA-Menge von 10 ng eingesetzt. Die Transkription der CTX-M Varianten wurde unter Verwendung von 20 µM der degenerierten, 5'-biotinylierten Rückwärts-Primer rev_{CTX-M314} und rev_{CTX-M739} (welche an die Positionen +314 bis +339 und +739 bis +761 der CTX-M Gene binden) durchgeführt. Die Reverse Transkription wurde im Mastercycler 5330 durchgeführt. Eine Anlagerung der Primer- und RNA-Komponenten wurde bei 72 °C für 6 Minuten erreicht. Danach wurde der Ansatz schrittweise auf die Synthesetemperatur von 37 °C abgekühlt.

Reaktionsansatz:

0,6 U/µl	RNase Inhibitor
0,167 mM	je dNTP
1x	Reaktionspuffer
0,33 U/µl	Sensiscrypt
0,1 mg/ml	BSA

Nach der Zugabe des Reaktionsansatzes wurden die Proben 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, woraufhin 10 Minuten bei 94 °C inaktiviert wurde.

Während der Optimierungsphase und Anpassung der Methode an den direkten Nachweis bakterieller RNA aus Blutproben wurde das Reaktionsvolumen auf 10 µl gesenkt, wobei 6,7 µl RNA sowie eine Primerkonzentration von 0,16 µM eingesetzt wurden.

5.2.8 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

(optimiert für den direkten Nachweis aus EDTA-Blut)

Die cDNA Transkripte wurden mit einer Echtzeit-PCR unter Verwendung der degenerierten Primer Paare for_{CTX-M67}/rev_{CTX-M314} und for_{CTX314}/rev_{CTX-M739} spezifisch amplifiziert. Bedingt durch die auf die Amplifikation folgende Streptavidin-Sepharose-Bead basierende Pyrosequenzierung, wurden PCR-Fragmente mit 5'-biotinylierten Rückwärts-Primern erzeugt.

Die Echtzeit-PCR wurde am Rotor-GeneQ Cycler durchgeführt. Der for_{CTX-M67} Primer korrespondierte dabei zu Position +67 bis +89, der for_{CTX314} Primer zu Position +314 bis +339.

Reaktionsansatz:

1,5 mM	MgCl ₂
1x	PCR Puffer
0,2 mM	dNTPs
1,9 mM	je Primer
0,08x	SybrGreen
0,1 mg/ml	BSA
0,08 U/μl	Platinum Taq DNA Polymerase
2 μl	cDNA

Der Ansatz wurde mit Wasser auf einem Volumen von 25 μl aufgefüllt. Nach folgendem Protokoll wurde der PCR-Lauf durchgeführt:

10 s bei 99 °C	
50 s bei 93 °C	
20 s bei 93 °C	Denaturierungsschritt
20 s bei 55 °C	Annealingschritt
14 s bei 72 °C	Elongationsschritt
	Schritte 3-5: 45 Zyklen

Die Schmelztemperatur der Amplifikate wurde über einen, sich der Amplifikation direkt anschließenden, schrittweisen Anstieg (0,5 °C/ 4 s) der Temperatur von 75 °C auf 99 °C bestimmt.

Zur Überprüfung der Amplifikation wurde der linearisierte CTX-M-15 Standard in seriellen Verdünnungsstufen eingesetzt (Positivkontrolle). Kontaminationen wurden durch das Mitführen einer Probe ohne spezifische Ausgangs-DNA (Negativkontrolle) nachgewiesen.

5.2.9 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. In Abhängigkeit der DNA-Größen wurden Agarosekonzentrationen zwischen 1,5 % und 2 % eingesetzt und 1 µg/ml Ethidiumbromid zugeben. Für die Präparation und die elektrophoretische Auftrennung der Gele wurde 1x TAE-Puffer verwendet.

Die Geltaschen wurden mit 5-10 µl DNA-Proben, vermischt mit 2 µl 6x DNA Loading Dye (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), beladen. Die eingesetzten Größenstandards sind in Abbildung 26 (siehe Anhang) dargestellt. Bei 80-120 V über einen Zeitraum von 30-70 Minuten wurden die Proben aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden unter Verwendung eines UV-Transilluminators dargestellt.

5.2.10 Amplifikation für die Sequenzierungen

Die DNA der zu testenden Stämme wurde mittels Koch-Lyse isoliert. Für die Sequenzierung der CTX-M Varianten wurden die Oligonukleotidprimer CTX-M-ges for/CTX-M-ges rev, CTX-M-21 for/CTX-M-21 rev sowie CTX-M-14-C for/CTX-M-14-C rev eingesetzt. Die SHV bzw. TEM Varianten wurden mit den SHV for neu/SHV rev und TEM for/ TEM rev Primern amplifiziert.

Die *ompK35* und *ompK36* Gene wurden mit den Primerpaaren OmpK-36-a for/OmpK-36-a rev, OmpK 36 for/OmpK36 rev und OmpK 35 for/OmpK35 rev amplifiziert (Lee et al. 2007).

Die Amplifikation wurden im Veriti 96Well Thermo Cycler durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Proben mit einer spezifischen und ausreichend starken Bande wurden direkt zur Sequenzierung eingeschickt. Die Amplifikate wurden im Auftrag durch die Firma SMB GmbH (Humboldt Universität zu Berlin, Deutschland) mittels Sanger-Sequenzierung strangauf- und abwärts sequenziert.

5.2.11 Pyrosequenzierung

Unter Verwendung der PyroMark Assay Design Software wurden die eingesetzten Sequenzierungsprimer dem Analyseassay angepasst und 2 Bereiche innerhalb der CTX-M Sequenzen analysiert.

Region 1 wurde mit den Oligonukleotidprimern for_{CTX-M67}/rev_{CTX-M314} amplifiziert und mit dem seq_{CTX-M211} Primer, welcher an Position +211 bis +226 bindet, pyrosequenziert. Durch die Amplifikation mit dem Primerpaar for_{CTX314}/rev_{CTX-M739} wurde Region 2 vervielfältigt und mit dem Primer seq_{CTX-M705}, welcher im Bereich +705 bis +720 bindet, die Sequenz analysiert. Die Testungen wurden am PyroMark Q 24 unter Verwendung der PyroMark Gold 24 Reagenzmischungen durchgeführt. Außer der eingesetzten Primerkonzentration (4-fach) sowie der Konzentration der Streptavidin-Sepharose-Suspension (3-fach) wurden alle Analysenschritte anhand der Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 20 µl des spezifischen PCR-Produktes, welches zu Beginn der Analyse denaturiert wurde, eingesetzt. Nach der Hybridisierung des Sequenzierungsprimers an den biotinylierten Einzelstrang wurden die einzelnen Nukleotide durch die DNA-Polymerase in 3'-Richtung eingebaut. Das durch den Einbau abgespaltene Pyrophosphat wurde in einer ATP-abhängigen Enzymkaskade durch die Enzyme Sulfurylase und Luziferase zu einem Lichtsignal, proportional der Anzahl der eingebauten Nukleotide, umgesetzt und detektiert. Nicht integrierte dNTPs sowie ATP wurde durch das Enzym APYrase abgebaut. Die resultierende Sequenz wurde in einem Pyrogramm dargestellt.

5.2.12 Sequenzextraktion, Erstellung von Sequenzvergleichen und phylogenetischen Stammbäumen

Insgesamt 135 *bla*_{CTX-M} DNA-Gensequenzen, extrahiert aus der Datenbank des NCBI, wurden für die Erstellung der Amplifikationsprimer unter Verwendung der DS Gene 1.5 sowie der CLC Sequence Viewer Software analysiert. Als Programm für den multiplen Sequenzvergleich wurde CLUSTALW verwendet (Fehlerwert für das Einfügen einer Lücke im Sequenzvergleich 10, Erweiterung der entstehenden Lücke 5). Für die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume wurde die TreeDyn Methode eingesetzt.

5.2.13 Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Die Amplifikate wurden strangauf- und abwärts analysiert. Die sich ergebenden Sequenzdaten wurden mit der CLC Software zusammengeführt, über den BLAST-Algorithmus (Altschul et al. 1990) mit der NCBI Datenbank verglichen und entsprechend den besten *score*- und *expectation*-Werten mikrobiellen Genen zugeordnet.

5.2.14 Statistische Auswertungen

Die Ergebnisse bei der Analyse der Kombinationstherapie (z.B. OmpK Mutationen, FICI) wurden durch den parameterfreien Wilcoxon-Mann-Whitney Test ausgewertet und durch die Angabe des Medians und eines Konfidenzintervalls von 95 % quantifiziert. Für semiquantitative Variablen (MHK, Efflux mit FICI) wurde der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient ρ (Konfidenzintervalls von 95 %) berechnet. Der Wilcoxon-Mann-Whitney Test wurde mit dem Statistikprogramm R Version 3.0.3 und die Spearman-Korrelation mit der SAS Version 9.3 angefertigt.

6 Ergebnisse

6.1 Entwicklung eines differenziellen Nachweises für CTX-M β -Lactamasen

6.1.1 Design von Oligonukleotiden zur gezielten CTX-M-Amplifikation

Die Nukleinsäuresequenzen der zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit 135 annotierten und katalogisierten CTX-M Varianten wurden aus der NCBI Datenbank extrahiert und einem multiplen Sequenzvergleich (CLUSTALW) unterzogen. Es ist zu vermerken, dass die Varianten CTX-M-18, CTX-M-57, CTX-M-97 und CTX-M-133 den Varianten CTX-M-14, CTX-M-55, CTX-M-2 sowie CTX-M-3 entsprachen und nicht mit in die Analyse einbezogen wurden. Somit wurden 131 *bla*_{CTX-M} Gene analysiert. Die phylogenetische Verwandtschaft wurde unter Berücksichtigung der Literaturangaben ermittelt und ist in Abbildung 24 (siehe Anhang) dargestellt. Insgesamt wurden die meisten CTX-M Varianten in die bekannten Gruppen 1, 2, 9, 8 und 25 eingeteilt (Bonnet 2004). Die Varianten CTX-M-74, -75, -137 und -143 konnten aufgrund der Sequenzunterschiede keiner der 5 Gruppen zugeordnet werden.

Um möglichst alle CTX-M Varianten in einem Nachweis zu erfassen, wurden konservierte Abschnitte mit einer Größe von rund 25 bp, die sich als universelle Primer eigneten, gesucht. Da jedoch die Sequenzen zu viele Abweichungen aufwiesen, kamen nur degenerierte Primer in Frage (*for*_{CTX-M67}, *for*_{CTX-M314}, *rev*_{CTX-M314}, *rev*_{CTX-M739}), welche an drei 3 hochkonservierte Bereiche homolog paaren und zur Amplifikation von zwei überlappenden DNA-Fragmenten führen (in Abbildung 8 dargestellt).

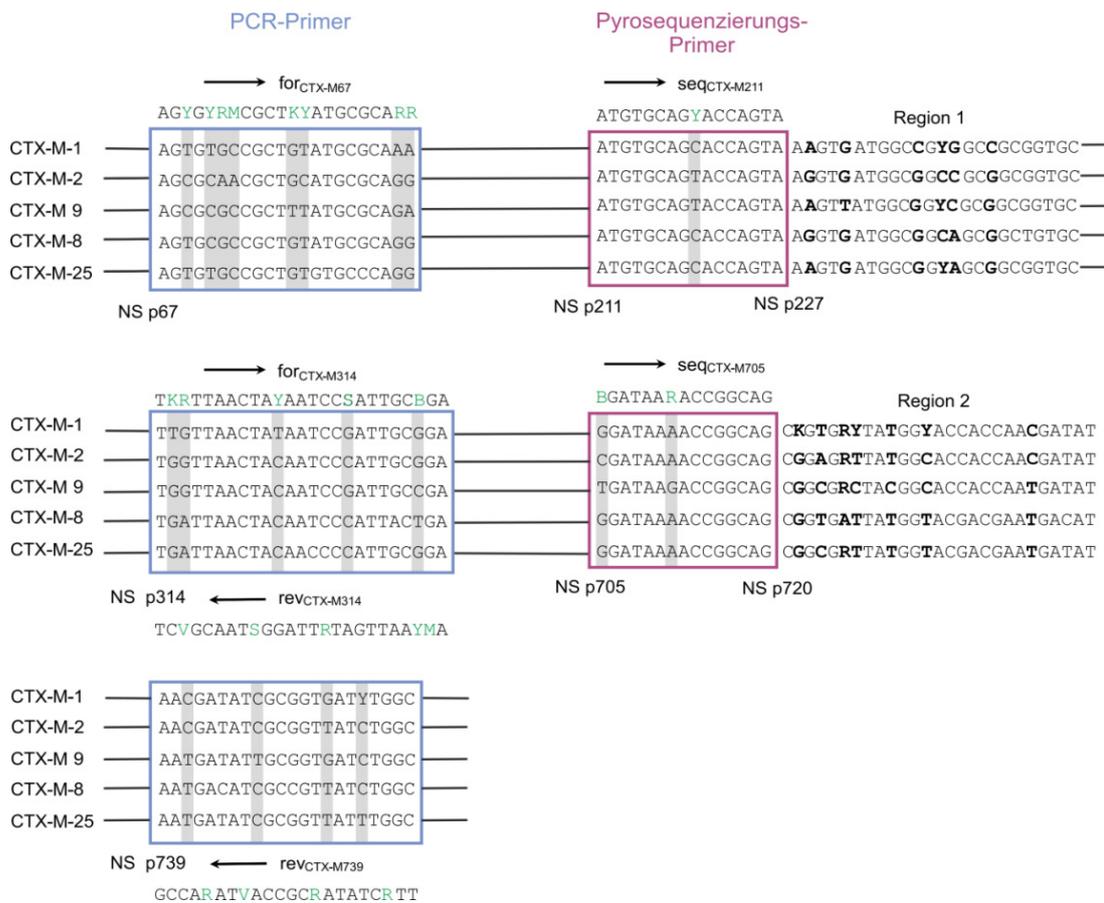


Abbildung 8: Alignment einzelner Vertreter der CTX-M Hauptgruppen (nach IUPAC Kode). Die variablen Nukleotidpositionen der CTX-M Varianten sind grau unterlegt bzw. fett-markiert, die degenerierten Primerbasen sind grün dargestellt. Die Sequenzabschnitte, die zur Amplifikation bzw. Reversen Transkription verwendet wurden, sind in blauen Boxen, die für die Pyrosequenzierung in violetten Boxen, eingerahmt. Nukleotidpositionen (NS) sind relativ zum Translationsstartpunkt angegeben.

Der Bereich um +314 wurde sowohl als Target für den Vorwärts- ($\text{for}_{\text{CTX-M314}}$) als auch für den Rückwärtsprimer ($\text{rev}_{\text{CTX-M314}}$) verwendet. Zusätzlich wurden zwei degenerierte Sequenzierungsprimer ($\text{seq}_{\text{CTX-M211}}$, $\text{seq}_{\text{CTX-M705}}$) für die Pyrosequenzierung designt. Alle Oligonukleotide wurden so konzipiert, dass möglichst viele Abweichungen in den Sequenzen durch die degenerierten Primermischungen abgedeckt wurden.

6.1.2 Bestimmung der Stringenz der PCR

Die Überprüfung der Stringenz der PCR wurde zunächst durch die Amplifikation einer seriellen Verdünnungsreihe des CTX-M-15 Standards realisiert. Die Spezifität der PCR konnte unter Verwendung der quantitativen Echtzeit-PCR, sowie der Gelelektrophorese (siehe Anhang, Abbildung 28) belegt werden. Dabei wurde eine PCR-Effizienz von 0,87 bestimmt. Schlussfolgernd wurden in jedem PCR-Zyklus 1,87 Amplifikate erzeugt. Der etwas niedrige

Wert (optimal sind >98 %) ist durch den Einsatz der degenerierten Oligonukleotide zu begründen. Durch die degenerierte Primermischung wird zwar das Spektrum an möglichen Amplifikaten erhöht, die einkalkulierte Unspezifität geht aber mit einem Verlust der Effizienz einher. Die ermittelte Standardkurve zur Quantifizierung zeigte immer hohe Korrelationskoeffizienten >0,99. Die Negativkontrollen, ohne DNA-Matrize, zeigten keine PCR-Produkte.

6.1.3 Bestimmung der Spezifität der Amplifikate

Da das zu erarbeitende Nachweissystem auf der Detektion exprimierter Resistenzgene beruht, wurde die Spezifität der Primer auf RNA-Basis untersucht. Die Reverse Transkription der isolierten bakteriellen Gesamt-RNA (aus Reinkulturen) wurde mit den degenerierten Rückwärts-Primern realisiert. Die Stringenz der Transkription und Amplifikation wurde in der Echtzeit-PCR mittels Schmelzkurvenanalyse sowie der Gelelektrophorese kontrolliert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurden Vertreter der CTX-M Gruppe sowie weitere ESBL Varianten aus den molekularen Klassen A und D (letztere als unspezifische ESBL-Kontrollen) getestet.

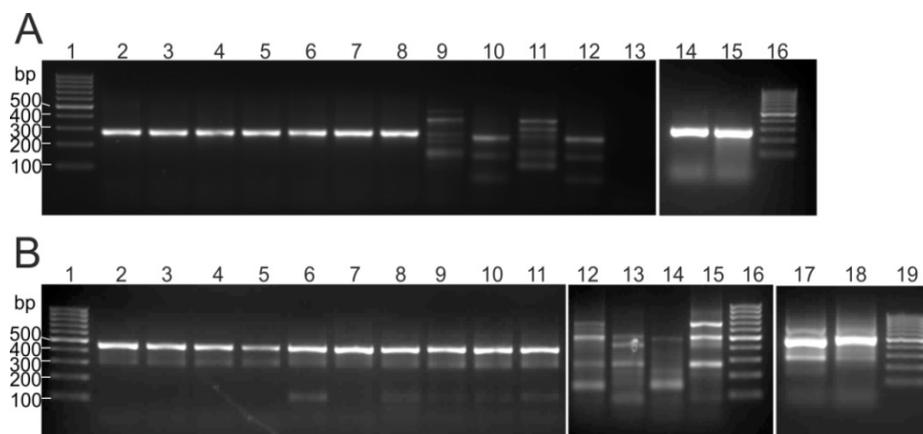


Abbildung 9: PCR Produkte verschiedener β -Lactamasen. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel nach 45 Zyklen aufgetragen. Bild A: PCR-Produkte der Region 1; Linie: 1 und 16 = Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, 2 = CTX-M-15, 3 = CTX-M-1, 4 = CTX-M-2, 5 = CTX-M-3, 6 = CTX-M-9, 7 = CTX-M-14, 8 = CTX-M-27, 9 = SHV-4, 10 = TEM-1, 11 = OXA-10, 12 = TEM-1, 13 = NTC, 14 = CTX-M-8, 15 = CTX-M-25. Bild B: PCR-Produkte der Region 2; Linie 1, 16 und 19 = Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, 2 = CTX-M-15 Std 1 pg, 3 = CTX-M-15 Std 0,1 pg, 4 = CTX-M-15 Std 0,01 pg, 5 = CTX-M-15 Std 1 fg, 6 = CTX-M-1, 7 = CTX-M-2, 8 = CTX-M-3, 9 = CTX-M-9, 10 = CTX-M-14, 11 = CTX-M-27, 12 = OXA-1, 13 = OXA-10, 14 = TEM-2, 15 = SHV-4, 17 = CTX-M-8, 18 = CTX-M-25.

Beide DNA-Regionen der getesteten CTX-M Varianten konnten mit den degenerierten Primersets mittels Reverser Transkription sowie PCR spezifisch amplifiziert werden. Die PCR-Produkte der Region 1 zeigten die erwartete Größe von 268 bp, die der Region 2 von 447 bp. Innerhalb der 5 phylogenetischen Gruppen wurden vergleichbare Schmelztemperaturen der PCR-Produkte bestimmt. Die Daten der Analysen sind aus Tabelle 16 und Tabelle 17 (siehe Anhang) zu entnehmen.

Im Vergleich zu den CTX-M Varianten wurden für die unspezifischen ESBL-Kontrollen erst bei einer höheren Zyklenzahl quantifizierbare PCR-Produkte detektiert. Aufgrund der ähnlichen Schmelztemperatur der Amplifikate konnte in der Schmelzkurvenanalyse nicht eindeutig zwischen CTX-M und nicht-CTX-M Varianten unterschieden werden. Allerdings zeigten sich in der Gelelektrophorese bei den nicht-CTX-M Varianten unspezifische Produkte mit unterschiedlicher Größe. Durch den Einsatz von Primermischungen kam es zur unspezifischen Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA der ESBL-Kontrollen. Die nicht-CTX-M Varianten konnten allerdings durch die Gelelektrophorese eindeutig abgegrenzt werden (siehe Abbildung 9).

Um den Einfluss der unterschiedlichen Matrizen auf die Produktspezifität und Ausbeute zu prüfen, wurde RNA aus Stämmen isoliert, die verschiedene β -Lactamase-Typen gleichzeitig exprimieren. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, zeigten die PCR-Produkte nur die CTX-M-spezifischen Banden.

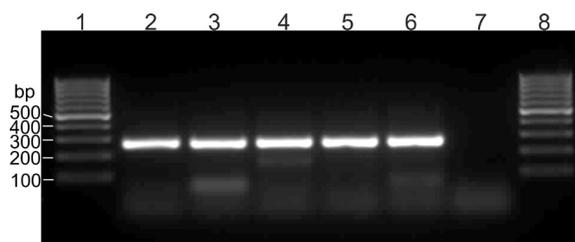


Abbildung 10: PCR-Produkte gemischter β -Lactamaseproben. PCR-Produkte der Region 1. Linie: 1, 8 = Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, 2 = CTX-M-15, 3 = RKI 01/10, 4 = RKI 02/10, 5 = RKI 93/07, 6 = RKI 364/12, 7 = NTC.

Zusammenfassend konnte eine spezifische Reverse Transkription und Amplifikation der CTX-M Sequenzen durch die degenerierten Oligonukleotide unabhängig vom genetischen Hintergrund nachgewiesen werden. Die klinische sowie phylogenetische Aussagekraft des Nachweissystems wurde durch die anschließende Pyrosequenzierung generiert.

6.1.4 Bestimmung der Spezifität in der Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung beider Regionen wurde mittels der Sequenzierungsprimer durchgeführt und die Spezifität anhand der Qualität und Signalstärke der Pyrogramme ermittelt. Für die Spezifizierung wurde die Region 1 (DNA-Bereich 228 bis 251) ausgewählt, welche eine Einteilung in die 5 Hauptdomänen der CTX-M Gruppe ermöglicht. Durch die Analyse der Region 2 (DNA-Bereich 721 und 747) wurde ein wichtiger Hotspot für die Hydrolyseeigenschaften gegenüber Ceftazidim analysiert.

Die Auswertung der Nukleotid-spezifischen Peaks der Pyrogramme wurde signifikant durch das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflusst. Aus diesem Grund konnte nur eine Auswertung der Signale erfolgen, wenn der Signalpeak mindestens 20-fach höher war als das Hintergrundsignal. Grundsätzlich war das Signal-Rausch-Verhältnis der Sequenzierung der Region 1 von besserer Qualität als das der Region 2, was durch die höhere Anzahl an variablen Basen in der Region 2 am Anfang der zu analysierenden Sequenzabfolge bedingt war.

6.1.4.1 Differenzierung der CTX-M Gruppen basierend auf der Region 1

Durch die Sequenzvarianz der CTX-M Gruppe musste eine für die Pyrosequenzierung vergleichsweise große Anzahl an Nukleotidpositionen (6) analysiert werden. Zusätzlich wurde in der Nukleotidabfolge der Sequenzierungsreaktion ein unspezifisches Nukleotid (Adenin) an Position 4 eingefügt, um die Analyse des GC-reichen Sequenzabschnittes zu ermöglichen. Die Treffsicherheit der eingebauten Nukleotide wurde prozentual für die einzelnen Positionen angegeben und mit weiteren Analyseparametern detailliert in Tabelle 16 (siehe Anhang) zusammengefasst. Repräsentative Pyrogramme der einzelnen CTX-M Gruppen wurden in Abbildung 11 dargestellt.

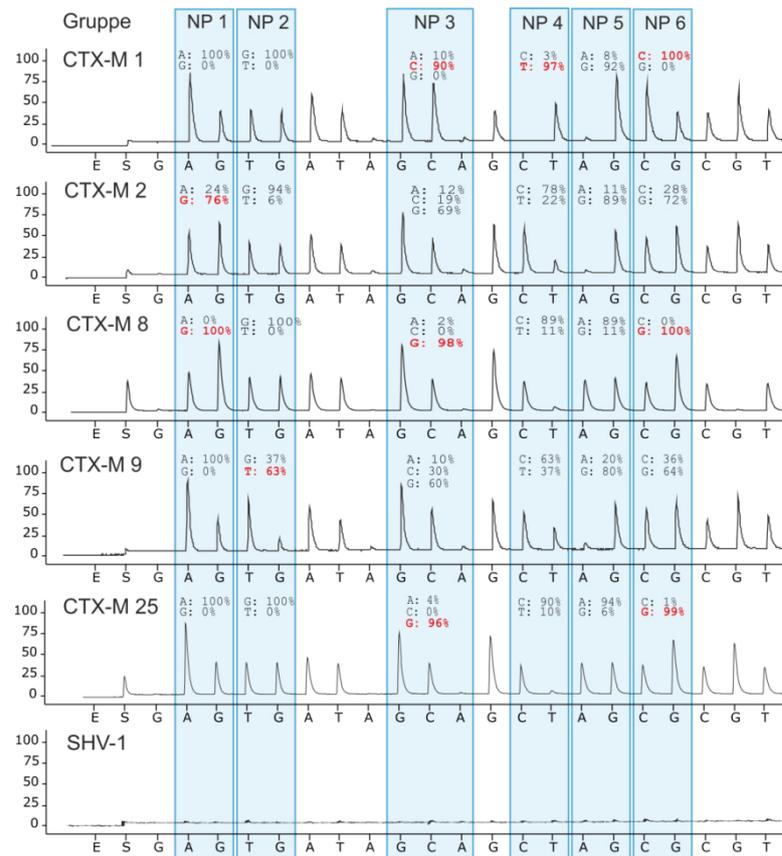


Abbildung 11: Auswertung der Pyrosequenzierung der Region 1. Die sequenzielle Nukleotidabfolge wurde auf der X-Achse, die relative Signalintensität auf der Y-Achse aufgetragen. Die variablen Nukleotidpositionen (NP) wurden eingrahmt und die prozentuale Wahrscheinlichkeit angegeben.

Die analysierten Proben wurden anhand des Sequenzmusters den Gruppen zugeordnet (siehe Abbildung 8). Der Nachweis von Cytosin an NP 3 und NP 6 war charakterisierend für die CTX-M Gruppe 1. Durch die Detektion von Thymin an NP 4 konnte eine Unterscheidung zwischen den klinisch relevanten CTX-M-1, -32 sowie weiteren Varianten (23, 52, 53, 55, 57, 58, 60, 61, 69, 79, 114, 116, 136, 144) von anderen Vertretern der Gruppe 1 getroffen werden (siehe Anhang, Abbildung 25). Gruppe 9 konnte von den Gruppen 1, 2, 8 und 25 (Guanin) durch Thymin an NP 2 abgegrenzt werden. Durch Guanin an NP 1 und NP 5 konnten Vertreter der Gruppe 2 identifiziert werden. Die Abgrenzung der Gruppe 2 (Guanin) zur Gruppe 8 (Adenin) erfolgte über NP 5. Zwischen den Gruppen 8 und 25, welche die gleiche Base bei NP 3 und NP 6 zeigten (Guanin), wurde durch das Guanin bzw. Adenin an NP 1 unterschieden.

6.1.4.2 Differenzierung der CTX-M Varianten basierend auf der Region 2

Guanin an NP 3 determiniert die Substitution Asp240Gly, welche mit einer erhöhten Ceftazidimhydrolyseaktivität in Verbindung steht. Die Vertreter der CTX-M Gruppe 1 zeigten die größte Sequenzvariabilität innerhalb der Region 2. An NP 3 findet man Guanin bei 27 Varianten der Gruppe 1 und bei der Variante CTX-M-137 (diese Variante wurde nicht eingruppiert), einige davon weisen eine hohe klinische Relevanz auf. Auch in Gruppe 2 (2 Varianten), 9 (9 Varianten) und 25 (4 Varianten) zeigten einige Vertreter diese Mutation. Dieser SNP wurde für die Abgrenzung der Ceftazidim-resistenten CTX-M Phänotypen eingesetzt. Abbildung 12 stellt einen Vergleich der Pyrogramme einer Ceftazidim-sensiblen (CTX-M-1) und einer Ceftazidim-resistenten (CTX-M-15) Variante dar.

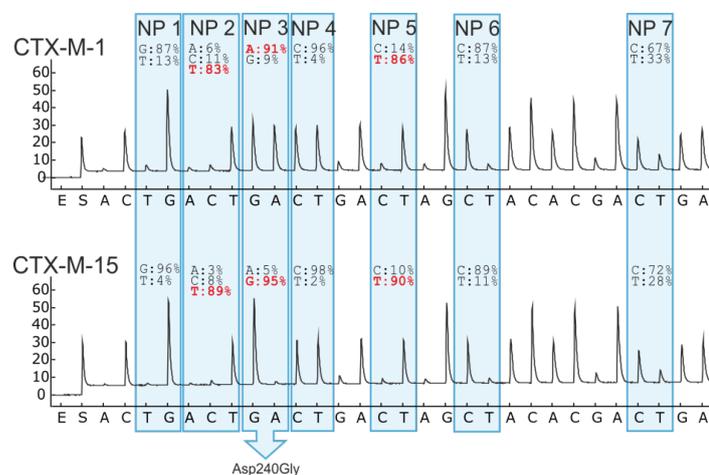


Abbildung 12: Vergleich der Pyrogramme von CTX-M-1 und CTX-M-15. Die sequenzielle Nucleotidabfolge wurde auf der X-Achse, die relative Signalintensität auf der Y-Achse aufgetragen.

Die weiteren Nucleotidpositionen der Region 2 konnten für die phylogenetische Zuordnung der Proben zu den CTX-M Gruppen eingesetzt werden. Varianten mit Adenin an NP 2 und Thymin an NP 4 konnten der Gruppe 2 zugeordnet werden. Weiterhin konnte NP 2 für die Unterscheidung von Varianten der Gruppe 1, 9 und 25 eingesetzt werden. Eine Übersicht der Analyseparameter zu Region 2 ist in Tabelle 17 (siehe Anhang) dargestellt.

6.1.4.3 Nachweis der CTX-M Varianten unter Koexistenz diverser β -Lactamasen

Vor allem die Variante CTX-M-15 wird im klinischen Sektor häufig in Koexistenz mit anderen β -Lactamasevarianten detektiert. Deshalb wurde die Spezifität der

Pyrosequenzierung auch mit Stämmen, die bis zu 6 verschiedene *bla*-Gene beinhalteten getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass das Vorhandensein weiterer β -Lactamasen die Spezifität der Reaktion während der Pyrosequenzierung nicht einschränkt. Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 18 (siehe Anhang) zusammengefasst.

6.1.5 Entwicklung eines Nachweissystems aus positiven Blutkulturen

6.1.5.1 Evaluierung der RNA Isolationsmethode

Für die Erarbeitung einer geeigneten Isolationsmethode von RNA aus positiven Blutkulturen wurde die Tempus Technologie (Life Technologies) mit einer Trizol-Chloroform-Säulen-Methode verglichen. Weiterhin wurden unterschiedliche Volumina der Blutkultursuspension (0,5 ml, 1 ml, 2 ml) für die Testungen eingesetzt. Unter Verwendung der Tempus Technologie, bestehend aus der Lyse der Blutkulturproben und einer Säulenreinigung, konnte keine RNA mit ausreichender Qualität isoliert werden. Die Verunreinigung der RNA-Proben wurde aus dem niedrigen Verhältnis von 260 nm/280 nm während der spektroskopischen Quantifizierung abgeleitet. Somit konnten mit diesen Proben auch keine PCR-Produkte erzeugt werden (siehe Tabelle 12). RNA guter Qualität und Quantität konnte mit der Trizol-Chloroform-Säulen-Methode aufgereinigt werden, was unter anderem durch die Generierung spezifischer PCR-Produkte gezeigt wurde.

RNA Proben, welche aus einem geringeren Blutkulturvolumen (0,5 ml und 1 ml) isoliert wurden, zeigten eine bessere RNA-Qualität (Verhältnis von 260 nm/280 nm) und damit auch geringere C_T -Werte während der Echtzeit-PCR.

Tabelle 12: Vergleich der Tempus RNA Isolation und der Trizol-Chloroform-Säulen-Methode für positive Blutkulturen. n.d. = nicht detektierbar

Probenvolumen der Blutkultur in ml	Tempus RNA Tubes			Trizol-Chloroform-Säulen-Methode		
	c in ng/ μ l	260 nm/280 nm	C_T	c in ng/ μ l	260 nm/280 nm	C_T
0,5	40,5	1,16	n.d.	158,3	1,97	16,7
1	135,9	1,40	n.d.	280,9	2,01	16,68
2	267,0	0,99	n.d.	449,3	2,11	17,57

6.1.5.2 Nachweisgrenze und Spezifität der Detektion

Nach Beimpfen von Blutkulturen mit 10 KBE/ml *E. coli* Flüssigkultur (RKI 26/08, RKI 443/08, RKI 25/08, RKI 128/04) wurde durchschnittlich eine Zeitspanne von 11-12 Stunden bis zur Positiv-Detektion durch den Inkubationsautomaten gemessen. Der Nachweis der CTX-M Resistenzgene aus positiven Blutkulturproben hatte bezüglich der Nachweisgrenze keine sichtbare Limitation, da die positiven Blutkulturen eine ausreichend hohe bakterielle Zelldichte erreichten. Als Vergleichskontrolle wurde das Experiment mit *E. coli* K12J53 Kulturen, die keine CTX-M Variante enthielten, wiederholt. Hier zeigte die Amplifikation ausschließlich unspezifische Produkte, welche keine ausreichende Signalstärke während der Pyrosequenzierung aufwiesen.

Weiterhin wurde überprüft, ob ein Nachweis der CTX-M Varianten aus Probenflaschen möglich ist, bei denen noch kein Bakterienwachstum durch den Inkubationsautomaten gemessen wurde. Folglich wurden Proben analysiert, die nur 0, 2, 4, 6 und 8 Stunden in der Blutkulturflasche bebrütet wurden und deren Keimzahl zum Entnahmzeitpunkt bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Ab einer Keimzahl von 10^5 KBE/ml Blut und einer Bebrütungszeit von 6 Stunden konnten aus den isolierten RNA-Proben die spezifischen CTX-M Varianten in ausreichender Signalstärke nachgewiesen werden. Bei Proben mit geringerer Keimzahl und Bebrütungszeit konnte nach PCR und Pyrosequenzierung kein ausreichendes Messsignal erzielt werden (siehe Anhang, Abbildung 30).

Tabelle 13: Bestimmung der Nachweisgrenze bei der Isolation der RNA aus der Blutkultur.

Zeit	Blutkultur	Probenisolation	Echtzeit-PCR		Pyrosequenzierung
	Keimzahl in KBE/ml Blut	RNA Konzentration in ng/ μ l	Mittelwert C_T $\pm \sigma$	T_m in $^{\circ}$ C	Ergebnis
0 h	$2,3 \cdot 10^1$	24,1	$34,93 \pm 0,33$	85,79	Nicht auswertbar
2 h	$4,5 \cdot 10^1$	16,1	$34,80 \pm 0,92$	89,28	Nicht auswertbar
4 h	$5,2 \cdot 10^3$	20,7	$34,73 \pm 2,77$	88,48	Nicht auswertbar
6 h	$2,3 \cdot 10^5$	18,9	$33,83 \pm 1,54$	90,76	Auswertbar
8 h	$1,0 \cdot 10^7$	16,1	$27,77 \pm 1,06$	92,29	Auswertbar

Schlussfolgernd wurden für die Aufarbeitung der Blutkulturproben die Trizol-Chloroform-Säulen-Methode und ein Volumen von 0,5 ml als Standardprotokoll festgelegt. Die einzelnen Arbeitsschritte, von der Isolation der RNA aus der positiven Blutkultur bis hin zum Nachweis der Resistenzgene, sind schematisch in Abbildung 13 dargestellt.

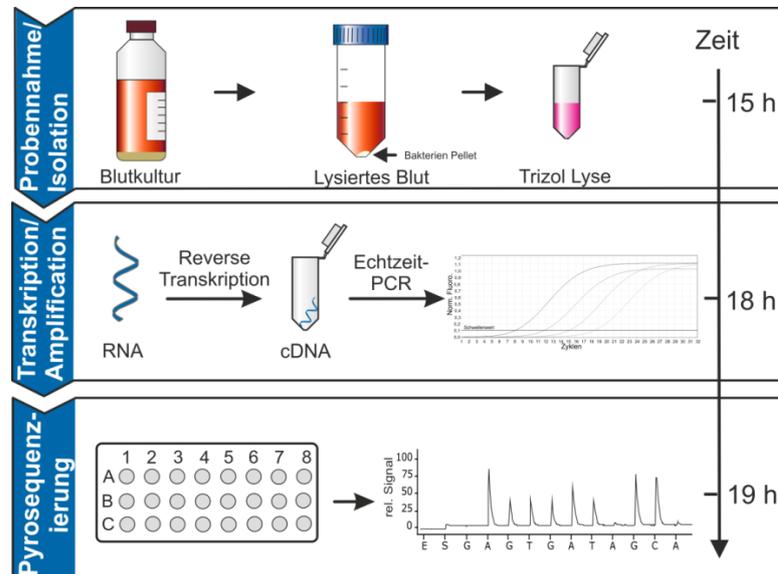


Abbildung 13: Arbeitsablauf basierend auf der Isolation von RNA aus einer positiven Blutkultur. Das benötigte Zeitintervall bis zur Positiv-Detektion der Blutkultur durch den Automaten wurde mit 15 Stunden (Marra et al. 2006; Palmer et al. 2013; Peralta et al. 2006) in der Zeitskala berücksichtigt.

6.1.6 Entwicklung eines direkten Nachweises aus EDTA-Blut

Für die Anpassung der Methodik an die geringe Keimzahl nicht bebrüteter Blutproben wurde das Nachweissystem schrittweise optimiert. Für die Testungen wurde der CTX-M-15 Standard, Blutproben ohne Keimzahl (Blutleerwert) sowie Blutproben infiziert mit unterschiedlichen Konzentrationen an ESBL-tragenden Stämmen eingesetzt.

6.1.6.1 Optimierung der RNA Isolation / Reinigung

Zur Reinigung der RNA aus Blutproben wurde die Tempus Technologie (Life Technologies) verwendet. Nach Herstellerangaben wurde die RNA mit einem Volumen von 100 µl aus der Silicamembran eluiert. Das große Elutionsvolumen und folglich die Verdünnung der Probe führten zu einem starken Verlust der Sensitivität. Zunächst wurde das Elutionsvolumen auf 20 µl verringert und damit die Konzentration erhöht. Bedingt durch das geringe Elutionsvolumen wurde die Säulen nicht ausreichend benetzt, was zu einem deutlichen

Verlust der RNA-Gesamtausbeute führte. Um möglichst viel RNA für die folgende Nachweismethode zu verwenden, wurde eine zusätzliche Fällung der RNA nach der Elution getestet (siehe Abbildung 14).

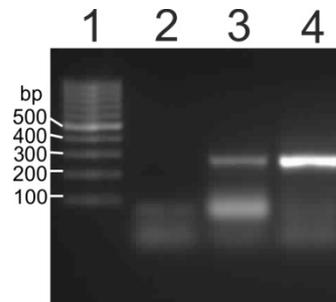


Abbildung 14: Vergleich der unterschiedlichen Elutionsvolumina im Bereich der Nachweisgrenze (10^3 KBE/ml). Linie 1 = Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, 2 = NTC; 3 = RNA Elution mit 20 μ l RNase-freiem Wasser, 4 = RNA Elution mit 100 μ l RNase-freiem Wasser.

Durch die Ammoniumacetat-Fällung konnte mit einem Elutionsvolumen von 100 μ l gearbeitet und das RNA-Pellet in einem für die Reverse Transkription optimalen Volumen resuspendiert werden. Die RNA-Konzentration wurde auch nach der Fällung bestimmt und eine Wiederfindung von durchschnittlich 83 % erreicht.

6.1.6.2 Optimierung der Reversen Transkription

Die anfänglichen Versuchsreihen für den direkten Nachweis der CTX-M mRNA zeigten auch bei höheren Keimzahlen der Blutproben, aufgrund des hohen Anteils an eukaryotischer RNA in der isolierten Gesamt-RNA sowie der Verwendung von degenerierten Primern, starke Unspezifitäten. Deshalb wurde zunächst der Einfluss diverser Transkriptasen (verschiedener Hersteller) auf die Spezifität und Sensitivität der Nachweismethode getestet. Hierbei erzielte das Enzym Sensiscript von Qiagen die besten Ergebnisse (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Vergleich der Enzyme Sensiscript und SuperScript. Die Enzyme wurden mit Blutproben unterschiedlicher Keimkonzentration (Stamm RKI 443/08) anhand der PCR Parameter verglichen.

	C_T	T_m in °C
Sensiscript		
10^5 KBE/ml Blut	23,35	89,4
10^4 KBE/ml Blut	27,62	89,35
10^3 KBE/ml Blut	29,59	89,35
SuperScript III		
10^5 KBE/ml Blut	29,57	89,50
10^4 KBE/ml Blut	35,85	89,50
10^3 KBE/ml Blut	37,12	80,65

Eine Verbesserung der Spezifität konnte durch die Reduktion der Primerkonzentration auf $0,16 \mu\text{M}$ erreicht werden (siehe Abbildung 15). Weiterhin wurde die Denaturierungstemperatur ($94 \text{ }^\circ\text{C}$) schrittweise der Synthesetemperatur ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) angeglichen ($3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$). Durch die stufenweise Anpassung der Temperatur hatten die Primer mehr Zeit, spezifisch an die Matrize zu hybridisieren. Unspezifische Anlagerungen wurden dadurch vermindert.

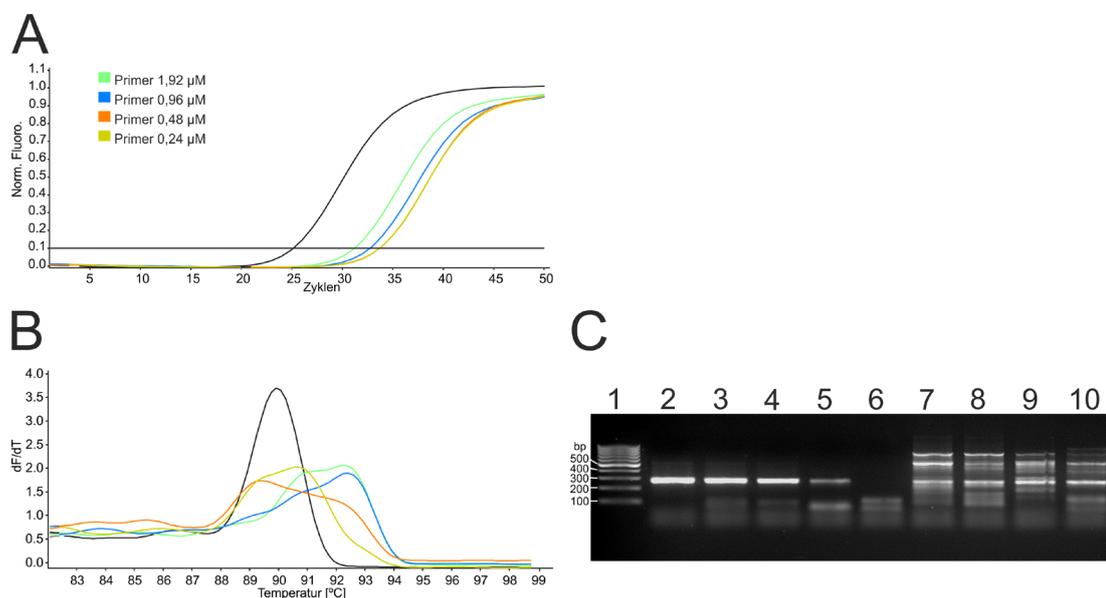


Abbildung 15: Optimierung der Reversen Transkription. Bild A: Amplifikation der cDNA mit unterschiedlichen Primerkonzentrationen während der Reversen Transkription. Bild B: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte (spezifische Produkte des CTX-M-15 Standards lagen bei T_m $91 \text{ }^\circ\text{C}$). Die schwarze Kurve in Bild A und B entspricht dem CTX-M-15 Standard in einer Konzentration von 1 pg. Bild C: Gelelektrophorese der PCR zeigte die zunehmende Spezifität bei abnehmender Primerkonzentration. Linie 1: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, 2 bis 6: CTX-M-15 Standard DNA (1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg, 1 fg, and 0,1 fg), 7 bis 10: CTX-M-1 (RKI 26/08) transkribiert mit unterschiedlichen Primerkonzentrationen (1,92 μM , 0,96 μM , 0,48 μM , 0,24 μM).

6.1.6.3 Optimierung der PCR Bedingungen

Die PCR-Reaktion sollte vor allem hinsichtlich der Sensitivität verbessert werden. Dafür wurde die Konzentration der Oligonukleotide auf 1,9 μM , die MgCl_2 -Konzentration auf 1,5 μM und die Zyklenzahl auf 50 angehoben, ohne die Spezifität der Amplifikation einzuschränken. Um die Aktivität der DNA-Polymerase über den gesamte Synthesezeitraum zu garantieren, wurde die Denaturierungstemperatur auf 93 °C gesenkt und die Zyklendauer verkürzt. Mit diesem optimierten PCR-Protokoll konnten 0,1 fg des CTX-M-15 Standards (23 Moleküle) spezifisch amplifiziert werden.

6.1.6.4 Spezifität und Sensitivität der Echtzeit-PCR

Die isolierte Gesamt-RNA aus der Blutkultur sowie aus dem EDTA-Blut wurde für die Reverse Transkription bzw. die Echtzeit-PCR eingesetzt. Spezifische PCR-Produkte zeigten eine Schmelztemperatur zwischen 89 °C und 92 °C. Eine DNA-Kontamination während der RNA-Isolation konnte mittels Negativkontrollen (RT-Ansatz ohne Zugabe der Reversen Transkriptase) ausgeschlossen werden (siehe Anhang, Abbildung 29). Die Spezifität und Sensitivität der Amplifikation ist in Abbildung 16 dargestellt.

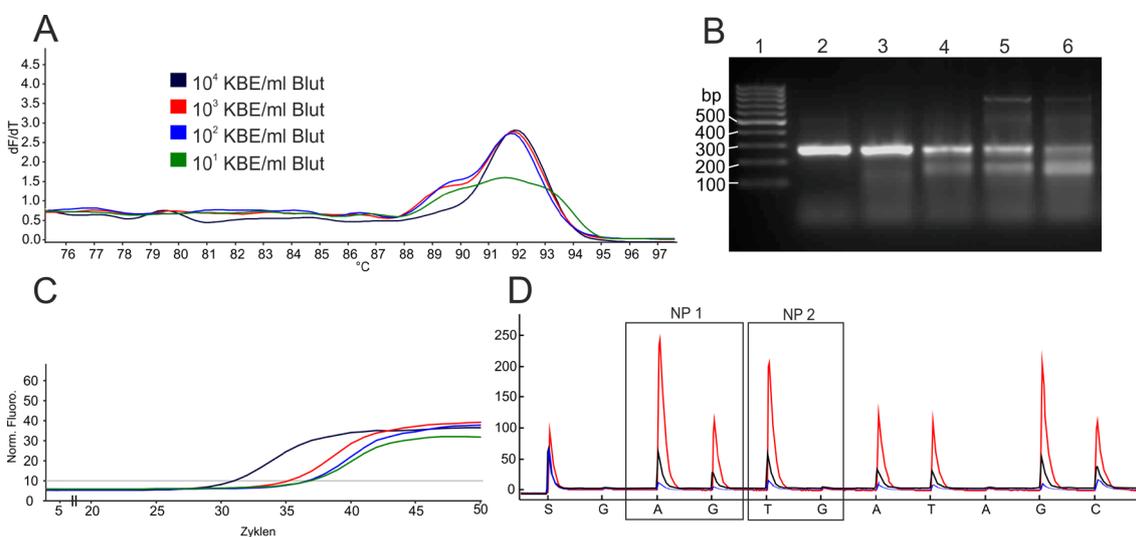


Abbildung 16: Nachweisgrenze der RNA-basierten RT-PCR-Pyrosequenzierungsmethode. Bild A zeigt die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Proben in Abhängigkeit der Keimzahl der EDTA-Blutproben. Das spezifische Produkt von 268 bp schmilzt bei 92 °C. Bild B: 2%iges Agarosegel der PCR-Produkte. Linie 1 = Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Linie 2 = CTX-M-15 Standard 1 pg, Linie 3-6 = CTX-M-9 (RKI 428/08) 10^4 KBE/ml, 10^3 KBE/ml, 10^2 KBE/ml, 10^1 KBE/ml. Bild C: Echtzeit-Amplifikationskurven der Proben. Bild D: Pyrogramm der Proben. Die sequenzielle Nukleotidabfolge wurde auf der X-Achse, die relative Signalintensität auf der Y-Achse aufgetragen.

6.1.6.5 Nachweisgrenze der direkten Nachweismethode

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden Blutproben mit unterschiedlicher Keimzahl beimpft (10^0 - 10^4 KBE/ml). In einem Konzentrationsbereich von 10^1 - 10^4 KBE/ml zeigten Proben mit Pathogenen ohne CTX-M Variante (SHV, OXA, TEM) ausschließlich unspezifische PCR-Produkte geringer Intensität und keine auswertbaren Signale im Pyrogramm. Vergleichbar waren die Ergebnisse bei der Auswertung des Blutleerwertes sowie der Proben von *E. coli* K12J53, ohne ESBL Varianten. Mit CTX-M tragenden Bakterienstämmen infizierte EDTA-Blutproben zeigten mit einer verringerten Bakterienzahl (10^3 - 10 KBE/ml Blut) zunehmende Unspezifitäten in der PCR. Mit dem optimierten Protokoll für die RNA Isolation, der Reversen Transkription und der Echtzeit-PCR konnten jedoch EDTA-Proben mit einer Keimzahl von 20 bis 10^2 KBE/ml Blut basierend auf dem mRNA Material in cDNA umgeschrieben und amplifiziert werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Bestimmung der Nachweisgrenze des Detektionssystems direkt aus EDTA-Blut. Die Ergebnisse wurden in einer 3-fach Messung bestimmt. Die fett gedruckten Isolate sind *K. pneumoniae* Stämme. n.d. = nicht detektierbar, unspez. = unspezifisches Produkt

Stamm	CTX-M Variante	RNA			PCR		Nachweisgrenze KBE/ml $\pm \sigma$
		c in ng/ μ l $\pm \sigma$	260 nm/ 280 nm	RIN	C _T	T _m in °C	
RKI 26/08	CTX-M-1	46 \pm 23	2,05	8	30	91	20 \pm 12
RKI 25/08	CTX-M-15	45,7 \pm 10,3	2,09	7	33	89	351 \pm 331
RKI 427/08	CTX-M-27	55,7 \pm 4,3	2,13	8,5	32	92	90 \pm 34
RKI 443/08	CTX-M-14	60,7 \pm 36,7	2,04	8,2	27	92	23 \pm 12
RKI 128/08	CTX-M-2	48,6 \pm 12,3	2,06	8	31	90	447 \pm 351
RKI 2/10	CTX-M-15	43,1 \pm 29,3	2,11	n.d.	30	89	212 \pm 275
K12J53	/	58,1 \pm 9,8	2,07	7,6	/	/	/
RKI 209/10	CTX-M-8	57,1 \pm 6,6	2,06	8,7	24	92	114 \pm 109
RKI 45/08	/	33,9 \pm 23,8	1,81	7,3	38	unspez.	/
RKI 93/07	CTX-M-15	50,4 \pm 7,1	2,05	n.d.	33	89	1065 \pm 92
RKI 346/12	CTX-M-15	57,8 \pm 13,6	1,99	n.d.	36	89	5500 \pm 2970
RKI VW823	CTX-M-25	48,6 \pm 6,4	2,12	n.d.	33	91	333 \pm 247
RKI 428/08	CTX-M-9	38,7 \pm 16,7	1,96	8,5	32	92	573 \pm 634
RKI 1/10	CTX-M-15	55 \pm 12,4	2,07	n.d.	33	89	630 \pm 468

Eine Übersicht der optimierten RNA-Aufarbeitung aus EDTA-Blutproben sowie dem Nachweissystem ist in Abbildung 17 dargestellt.

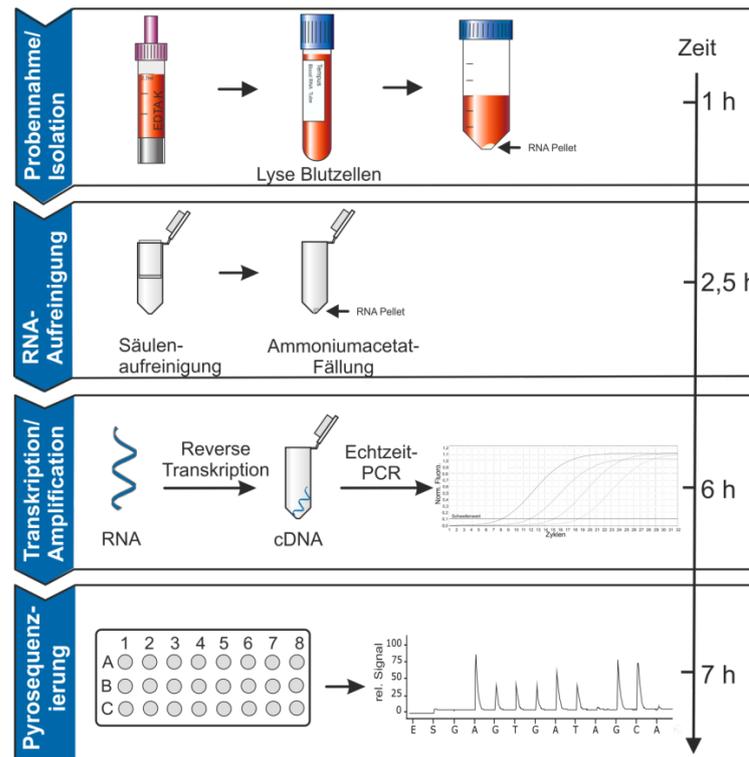


Abbildung 17: Übersicht zur Nachweismethode der CTX-M Gene direkt aus Vollblutproben.

6.1.7 Messzeit beider Methoden

Für die direkte Analyse der EDTA-Blutproben wurden zwischen 6 und 7 Stunden benötigt (siehe Abbildung 17). Bei der Bestimmung der Proben aus bebrüteten Blutkulturflaschen wurde eine Analysezeit von 4 Stunden benötigt. Abhängig von der Bebrütungsdauer der Blutkultur (10-15 Stunden für Bakterien) ergab sich ein Bearbeitungszeitraum von weniger als 19 Stunden, wobei die Bebrütung der Blutkultur den größten Zeitraum in Anspruch nahm (siehe Abbildung 13).

6.1.8 Validierung mit unbekanntem ESBL-Isolaten

98 phänotypisch ESBL-positive jedoch nicht genotypisierte *Enterobacteriaceae* Stämme wurden durch die Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Leipzig im Rahmen einer Studie zur rektalen Kolonisierung mit ESBL-Bildnern bei Reiserückkehrern gesammelt. Diese Isolate wurden für die Evaluierung des Nachweissystems eingesetzt. Die aus den Reinkulturen isolierte RNA wurde mit dem Rückwärtsprimer der Region 1 mittels RT in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Nach Analyse der ESBL

Varianten mit der RT-PCR-Pyrosequenzierungsmethode wurden die Proben mit der Sanger-Methode durch die Firma SMB GmbH sequenziert.

Der Vergleich der Ergebnisse der Pyrosequenzierung mit den Resultaten der Sanger-Sequenzierung zeigte, dass alle nicht-CTX-M Varianten (3,06 %) eindeutig von den CTX-M Varianten abgegrenzt werden konnten. Bei diesen nicht-CTX-M exprimierenden Isolaten wurden die β -Lactamasen TEM-1 sowie SHV-12 mittels Sanger-Sequenzierung identifiziert.

Die Analyse der CTX-M Varianten (96,94 %) zeigte bei 65 Stämmen vorrangig Vertreter der Gruppe 1 (66,3 %), hierbei besonders prävalent CTX-M-15 (46,94 %). Bei 30 Stämmen wurde ein Vertreter der Gruppe 9 (30,6 %) detektiert. Alle CTX-M tragenden Proben konnten anhand der erstellten Pyrogramme gruppenspezifisch richtig eingeteilt werden.

Aus der phylogenetischen Gruppe 1 wurden mittels Sanger-Sequenzierung die Varianten CTX-M-55 (13,27 %), CTX-M-1 (5,1 %) und CTX-M-65 (1,02 %); aus der Gruppe 9 die Vertreter CTX-M-27 (15,31 %), CTX-M-14 (11,22 %) und CTX-M-9 (1,02 %) nachgewiesen. Durch die Analyse der NP 4 der Region 1 ist eine Abgrenzung zwischen verschiedenen Varianten der Gruppe 1 möglich. Bei 62 der 65 Vertreter der Gruppe 1 (95,38 %) konnte eine korrekte Zuordnung erfolgen. Insgesamt wurde eine Spezifität des Detektionssystems bei einem Nachweis aus bakteriellen Reinkulturen von 99,49 % erzielt werden.

6.2 Kombinationstherapie bei Carbapenem-resistenten

***Klebsiella pneumoniae* Isolaten**

6.2.1 Phänotypische und genotypische Charakterisierung der Stämme

6.2.1.1 Resistenzprofile

Die Synergietestungen wurden mit 20 nicht klonalen, klinischen *K. pneumoniae* Isolaten durchgeführt. Die Stämme zeigten unterschiedliche Resistenzprofile sowie mindestens 2 verschiedene β -Lactamasen. Inbegriffen waren β -Lactamasen mit (CTX-M-15, OXA-1 und/oder VEB-1) und ohne erweitertem Wirkungsspektrum (TEM-1, SHV-1, SHV-11 und/oder OXA-11) sowie Carbapenemasen (OXA-48, VIM-1 und/oder KPC). In acht Stämmen wurde zusätzlich ein nicht-funktionelles OXA-9 Gene detektiert. 16 der Stämme (80 %) waren gegenüber Meropenem resistent (MHK >8 mg/l) und 4 intermediär (MHK >2 -

untersucht, jedoch scheint ein Verlust der Porinfunktion auf Grund der Aminosäuresubstitutionen und deren Position hier für unwahrscheinlich (Alberti et al. 1995).

Isolate mit Porindefekten, die nur β -Lactamasen mit einem erweitertem Hydrolysespektrum (z.B. CTX-M-15) beinhalten, zeigten stark erhöhte MHK-Werte (zwischen 4 und 32 mg/l) gegenüber Meropenem.

6.2.1.3 Veränderungen im Influx- und Efflux-Mechanismus

Die Efflux-Eigenschaften der Isolate wurden mit dem neuen Fluoreszenzfarbstoff BM-27 bestimmt. Im Vergleich zu *E. coli* zeigten *K. pneumoniae* Stämme ein verringertes Aufnahmevermögen gegenüber dem Farbstoff. Dennoch konnten mit Ausnahme eines Isolates (RKI 412/11) die untersuchten Stämme mit ausreichend Fluoreszenzfarbstoff beladen werden. Zwischen den Influx- und Efflux-Eigenschaften der Meropenem-resistenten und der Meropenem-sensiblen Stämme wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen (p Wert 0,247 und 0,879). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 abgebildet.

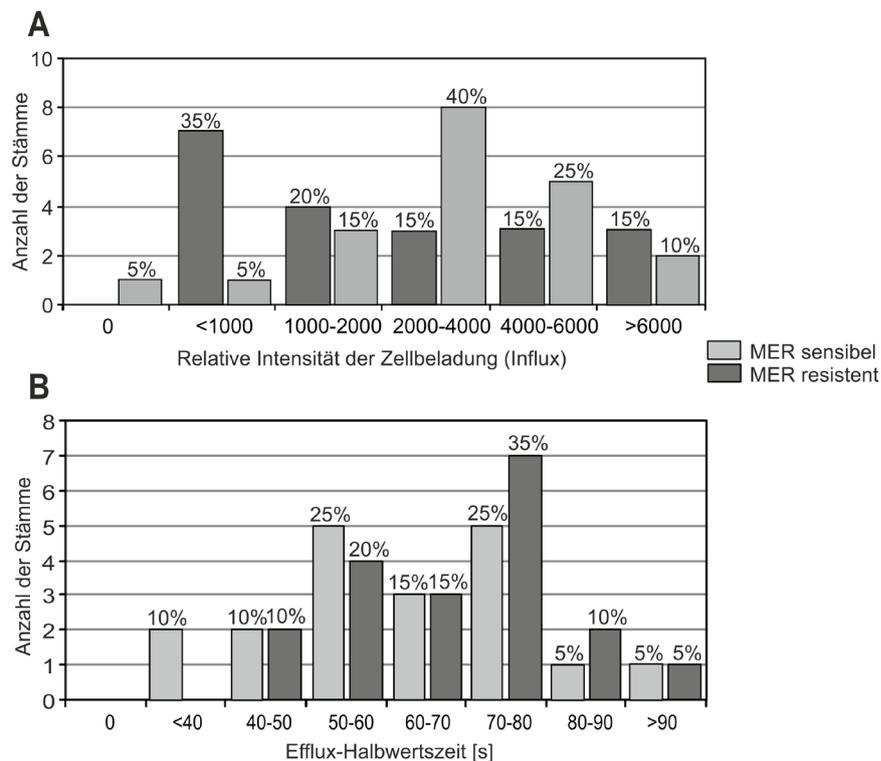


Abbildung 19: Darstellung der Influx- und Efflux-Eigenschaften der Meropenem-sensiblen und Meropenem-resistenten *K. pneumoniae* Stämme. MER = Meropenem

Die meisten Efflux-Kurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf, was darauf hindeutet, dass der Fluoreszenzfarbstoff durch mehrstufige Prozesse, oder mehrere Efflux-Systeme ausgeschleust

wurde. Aus diesem Grund wurden ausschließlich die Efflux-Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) für die Auswertung des Efflux-Mechanismus verwendet. Die Ergebnisse der Messung wurden in Tabelle 19 (siehe Anhang) aufgelistet. Die Efflux-Halbwertszeiten der Meropenem-resistenten *K. pneumoniae* Stämme schwankten zwischen 49 und 106 Sekunden. Ein Großteil der Stämme (70 %) zeigte eine Halbwertszeit von 50-80 Sekunden.

6.2.2 Effekte der 2- und 3-fach Antibiotikakombination

Mittels der 3-dimensionalen Checkerboard-Methode wurden die Synergieeffekte jeweils für alle 2-fach und 3-fach Antibiotikakombinationen bestimmt. Bei keiner Antibiotikakombination konnte ein Antagonismus nachgewiesen werden.

Mit Ausnahme von 2 Isolaten (RKI 536/13 und NRZ 00246) konnten für die Kombination von Meropenem und Tigecyclin nur additive Effekte nachgewiesen ($FICI > 0,8$) werden. Eine exemplarische Gegenüberstellung von synergistischen (A-C) und additiven Effekten (D-F) für die 2-fach Kombinationen ist in Abbildung 20 dargestellt. Die ausführliche Dokumentation ist der Tabelle 19 (siehe Anhang) zu entnehmen. Zusammenfassend konnten bei 7 von 20 Stämmen durch die Kombination der Wirkstoffe mit Colistin synergistische Effekte ($FICI \leq 0,8$) nachgewiesen werden. Davon zeigten bei 5 Isolaten (RKI 536/13, NRZ 00246, RKI 178/11, NRZ 04322, RKI 84/14) alle Kombination mit Colistin (MEM/CST, TGC/CST, MEM/TGC/CST) Synergien, bei einem Stamm (RKI 85/14) nur die Kombination MEM/CST und bei einem weiteren Stamm (RKI 551/13) die Kombinationen TGC/CST und MEM/TGC/CST Synergien. Eine signifikante Reduktion der FICI-Werte beim Vergleich der 2-fach Kombination TGC/CST und der 3-fach Kombination mit MEM konnte nicht festgestellt werden.

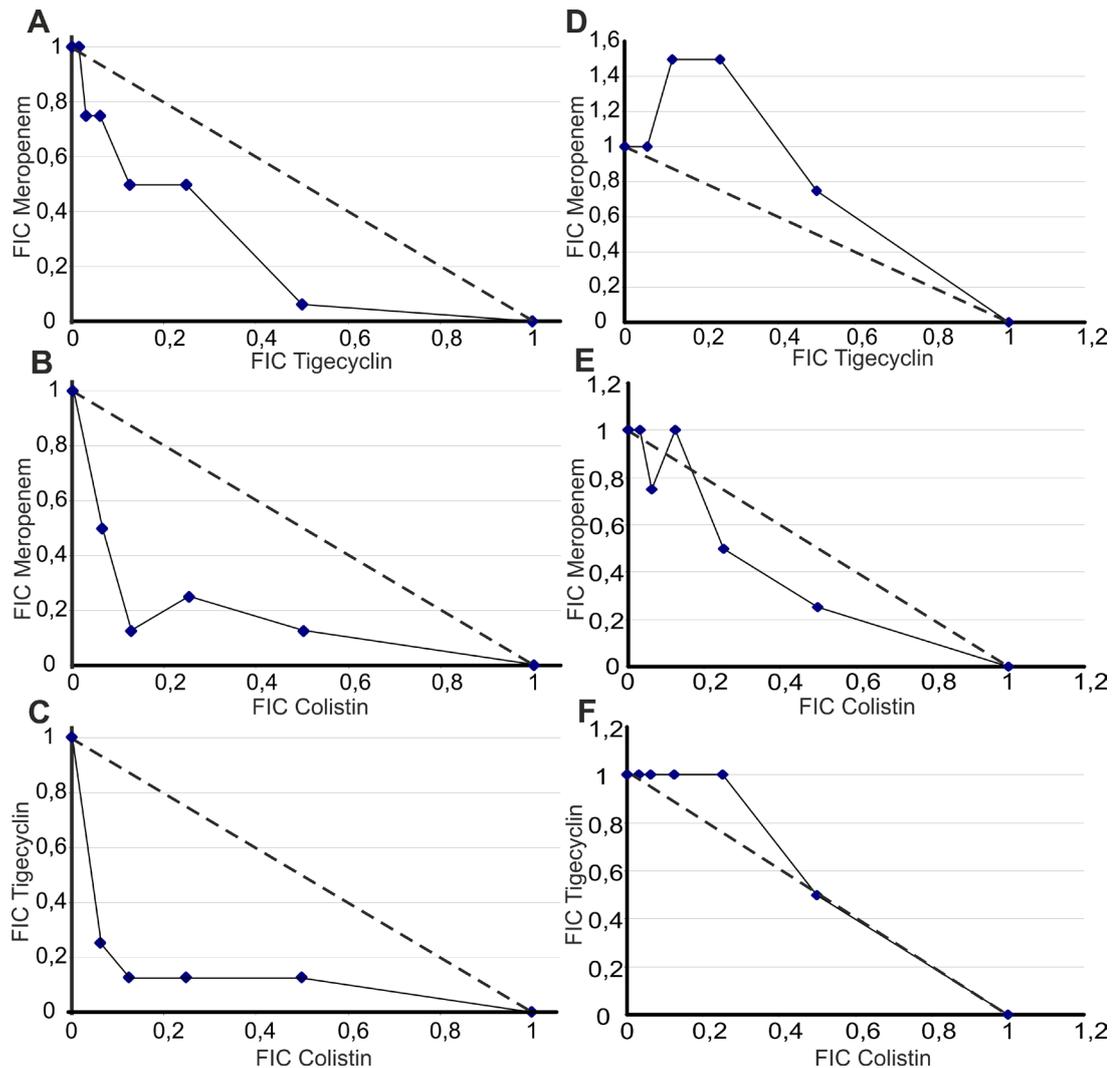


Abbildung 20: Isobolen für die 2-fach Kombinationen. Die Isobolen bilden alle FIC-Werte entlang der wachstumshemmenden Kombinationen ab, aus denen die FICIs als Median berechnet wurden. Bild A-C: FIC-Werte für den Stamm NRZ 00246 (OXA-48 Produzent); Bild D-F: FIC-Werte für den Stamm RKI 318/11 (KPC Produzent).

Auffällig war, dass Synergien nur bei Stämmen nachgewiesen wurden, die nach den EUCAST Grenzwerten als resistent gegenüber Colistin und gegenüber mindestens einem der beiden anderen Wirkstoffe eingestuft wurden. Dabei konnten leichte Korrelationen sowohl zwischen den MHK_{CST} und den $FICI_{TGC/CST}$ ($\rho = -0,52$, $p = 0,017$) und $FICI_{MEM/TGC/CST}$ ($\rho = -0,61$, $p = 0,003$) als auch zwischen MHK_{TGC} und den $FICI_{MEM/TGC}$ ($\rho = -0,70$, $p < 0,001$), $FICI_{TGC/CST}$ ($\rho = -0,70$, $p < 0,001$) und $FICI_{MEM/TGC/CST}$ ($\rho = -0,73$, $p < 0,001$) ermittelt werden. Alle Isolate bei denen Synergien auftraten waren Meropenem-resistent ($MHK_{MEM} > 8$ mg/l) und beinhalteten verschiedene β -Lactamasen (KPC, OXA-48 oder CTX-M-15). Eine Korrelation zwischen den MHK_{MEM} und den FICIs konnte jedoch nicht ermittelt werden (siehe Anhang, Tabelle 21).

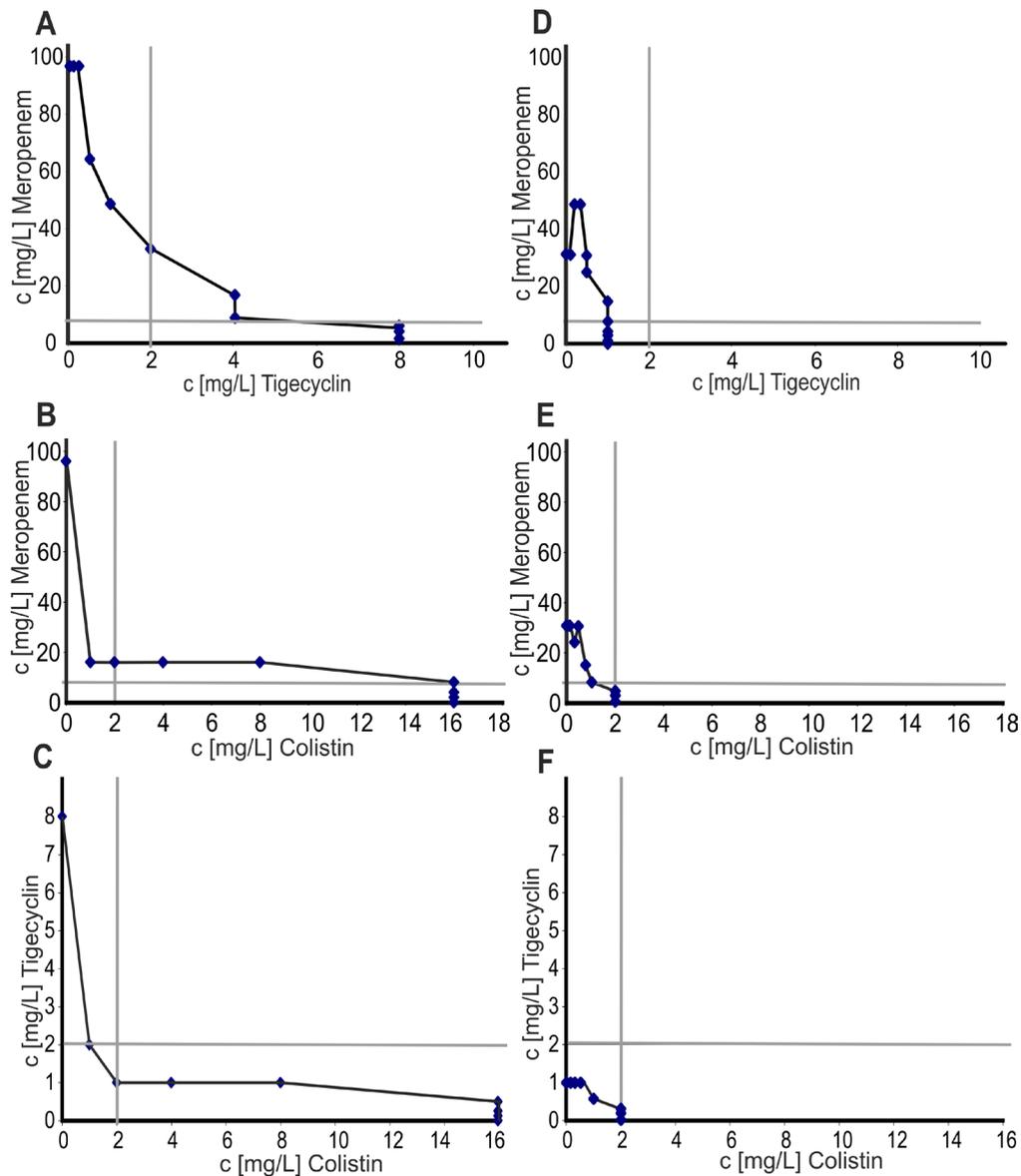


Abbildung 21: Auswertung der 2-fach Kombinationen innerhalb der gemessenen Konzentrationsbereiche. Die Antibiotikakonzentrationen entlang der Wachstumsgrenze in der Checkerboard-Analyse wurden für den Stamm NRZ 00246 (OXA-48 Produzent) im Bild A-C und für den Stamm RKI 318/11 (KPC Produzent) im Bild D-F abgebildet. Die aktuellen Grenzwerte der EUCAST sind mit grauen Linien gekennzeichnet.

Beim Einsatz der Wirkstoffkombinationen bei hochresistenten Isolaten wurde deutlich, dass die MHK für mindestens einen Wirkstoff der Kombination deutlich abgesenkt wurde (siehe Abbildung 21). Bei der Kombination Colistin/Tigecyclin konnten die MHKs beider Antibiotika unter die Grenzwerte der EUCAST abgesenkt werden.

Bei 5 der 7 Isolate, welche synergistische Effekte im Checkerboard zeigten, wurde ein Verlust des *ompK35* Gens und bei 4 Isolaten ein Verlust des *ompK36* Gens ermittelt. Die restlichen Isolate zeigten mehrere Veränderungen in der *ompK36* Gensequenz (siehe Anhang, Tabelle 20). Eine Korrelation zwischen den verschiedenen Mutationen der Poringene *ompK35* sowie

ompK36 und der synergistischen Wirkung der Antibiotikakombination wurde nicht gefunden. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen den gemessenen ΔF -Werten für die Beladung der Bakterienzelle (Influx) sowie den Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) für den Efflux des Farbstoffes aus der Bakterienzelle und den FICI-Werten nachgewiesen werden.

6.2.3 Synergieeffekte im Blättchendiffusionstest

Um die synergistischen Effekte mit einer weiteren Methode zu prüfen, wurde die Wirkung der 3-fach Kombination anhand des Blättchendiffusionstests bestimmt. Dabei wurden die Testblättchen so auf dem Nährboden platziert, dass die einzelnen Diffusionsbereiche ineinander griffen. 7 Stämme mit synergistischen Effekten und 2 Stämme mit additivem Effekt in der Checkerboard-Analyse wurden untersucht. Ein synergistischer Effekt wurde bei diesem Test durch die Verbreiterung der Hemmhöfe zwischen den Wirkstoffen nachgewiesen. Die Ergebnisse der Testungen wurden in Abbildung 22 zusammengestellt.

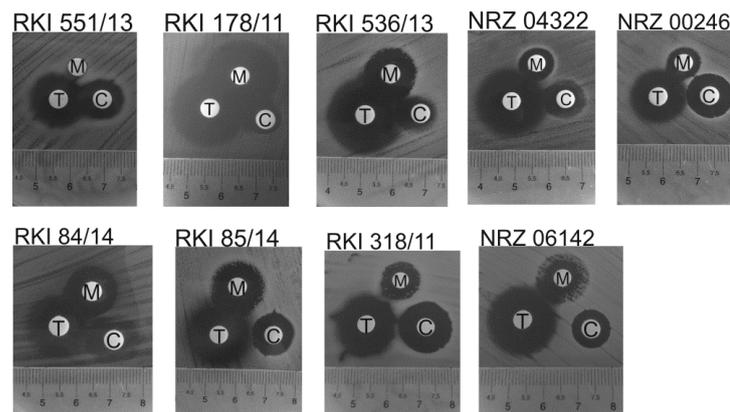


Abbildung 22: Blättchendiffusionstest einzelner *K. pneumoniae* Stämme. M = Meropenem, T = Tigecyclin, C = Colistin

Für 5 Stämme (RKI 551/13, RKI 178/11, RKI 563/13, NRZ 04322 und RKI 84/14) konnte eine Verbreiterung des Hemmhofes im Diffusionsbereich von Colistin beobachtet und damit vergleichbare Ergebnisse wie in der Checkerboard-Analyse erzielt werden. Im Blättchendiffusionstest konnte für 6 der getesteten Isolate und damit auch für die Stämme, welche in der Checkerboard-Analyse keine Effekte zeigten (NRZ 06142 und RKI 318/11), eine Verbreiterung des Meropenem-Hemmhofes im Diffusionsbereich zu Tigecyclin beobachtet werden.

Innerhalb des Hemmhofes von Meropenem konnte ein Wachstum von resistenten Mutanten beobachtet werden. Im Diffusionsbereich zu einem synergistischen Agonisten (meist

Tigecyclin) wurde das Wachstum der Mutanten unterdrückt (RKI 536/13, RKI 85/14, NRZ 06142).

7 Diskussion

7.1 Molekulare Diagnostik von β -Lactamasen

7.1.1 Welche Anforderungen sollten molekulare Nachweismethoden bei Blutstrominfektionen erfüllen?

Die meisten der heute im Routineeinsatz befindlichen und zugelassenen molekularen Nachweisverfahren wurden in den 1990er Jahren entwickelt. Damals bestand die Zielsetzung vor allem darin möglichst viele unterschiedliche Erregerspezies nachweisen zu können, da aus der Spezieszuordnung auch die Antibiotika-Empfindlichkeit des zugrundeliegenden Erregers weitgehend abgeleitet werden konnte. Dieser Zusammenhang besteht im Zeitalter der dynamischen Ausbreitung multi-resistenter Erreger nicht mehr. Beispielsweise ist der molekulare Nachweis eines *E. coli* aus der Blutkultur für die Entscheidung, welches Antibiotikum gegeben werden kann, heute kaum noch hilfreich, wenn nicht gleichzeitig bekannt ist, ob eine ESBL- oder Carbapenemase-Expression vorliegt. Es muss beachtet werden, dass der Nachweis eines Resistenzmechanismus nicht einer Sensibilitätstestung gleichzusetzen ist. Herausforderungen für molekulare Nachweisverfahren, die Erreger direkt aus nicht bebrüteten Blutproben nachweisen sollen, sind vor allem die niedrige Keimzahl (Yagupsky und Nolte 1990) und störende Blutkomponenten bzw. Bestandteile der Monovettenlösungen (wie EDTA oder Heparin), welche spätere Analysen, insbesondere die PCR, beeinträchtigen können.

Derzeit sind nur wenige molekulare Nachweissysteme für den direkten Erregernachweis aus Blutproben auf dem Markt erhältlich. Die meisten Nachweissysteme fokussieren auf kulturell angezüchtete und gereinigte Isolate und sind deshalb auf eine bebrütete, positive Blutkultur angewiesen. Die Detektionszeiten schwanken für die verschiedenen Systeme zwischen 1 bis 5 Stunden (Afshari et al. 2012). Hinzu kommt die Bebrütung der Blutkultur (ca. 10-12 Stunden), die Vereinzelnung der Pathogene auf Agarplatten (12-16 Stunden) und eine eventuelle Kultivierung zur DNA-Gewinnung (8-12 Stunden). Damit liegt die Zeitspanne von der Probenahme bis zum Ergebnis zwischen 1,5 bis 2 Tagen, bei schwer kultivierbaren Keimen sogar noch länger. Damit sind diese Testzeiten vergleichbar mit den Blutkultur-basierten Verfahren. Aus diesen Gründen war eine wesentliche Zielstellung dieser Arbeit die Sensitivität des Nachweises so weit zu verbessern, damit ein direkter Nachweis von β -

Lactamasen aus Patientenblut gelingt. Da die transkribierte mRNA im Vergleich zur DNA in höherer Anzahl vorliegt, wurde die hier beschriebene Nachweismethode auf Basis isolierter Gesamt-RNA erarbeitet und optimiert. Die Verwendung von mRNA als Zielmolekül hat einen weiteren Vorteil gegenüber DNA-basierten Methoden: es werden nur aktive Gene abgebildet. Dieser Sachverhalt spielt vor allem beim Nachweis Antibiotika-induzierbarer Resistenzgene eine wichtige Rolle. Ein Nachteil molekularer gegenüber kultureller Methoden stellt die Kontaminationsgefahr mit Nukleinsäuren dar.

7.1.2 Welche Herausforderungen stellen β -Lactamasen an das Nachweissystem?

Als Reaktion auf die dynamische Ausbreitung multi-resistenter Erreger haben einige Testhersteller die häufigsten Resistenzgene in ihr Portfolio inkludiert. Kommerziell erhältliche, PCR-basierte Methoden wie die DNA-Mikroarray Plattform von Check-Point (Naas et al. 2010, Lascols et al. 2012) oder das Verigene System (Nanosphere, USA) nutzen DNA als Ausgangsmaterial und liefern neben dem Speziesnachweis vereinzelte Informationen über spezifische mikrobielle Resistenzen. So liefert der Nachweis von Staphylokokken z.B. Informationen über die Methicillinresistenz durch den Nachweis des *mecA*-Genes (bei einigen Systemen auch *mecC*). Bei Enterokokken wird die Vancomycinresistenz über *vanA* und *vanB* detektiert (Paolucci et al. 2010, Afshari et al. 2012).

Die molekulare Differenzierung der β -Lactamasen in *Enterobacteriaceae* ist deutlich schwieriger, da die Sequenzen eine enorme Diversifizierung erreicht haben. Systeme wie Vyoo® (SIRS-Lab, Deutschland) oder Plex-ID™ (Abbott, USA) können nur einzelne β -Lactamasen (SHV, CTX-M) bzw. Carbapenemasen (KPC) detektieren. Ein breiteres Spektrum an β -Lactamasen wird durch das VAPChip System (Eppendorf Array Technologies, Belgien) abgebildet: 4 SHV- und 8 TEM-Varianten, neben der nicht-diskriminativen Detektion von 3 CTX-M Gruppen (1, 2 und 9) sowie einzelner klinisch wichtiger Carbapenemasen (OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-58, OXA-72, KPC-2, VIM-1, VIM-2, VIM-like, IMP-4 und IMP-13).

Ein weiteres Problem für die Diagnostik stellt die starke Verschiebung in der regionalen und temporalen Verbreitung einzelner β -Lactamasevarianten dar (Canton et al. 2012). Die

kontinuierliche Entstehung neuer Varianten, die oft schnell klinische Relevanz erreichen, wird durch die erhältlichen Nachweissysteme nicht abgedeckt.

7.1.3 Welche Vorteile hat das vorgestellte Nachweissystem?

Um auf die Problemstellung der Sequenzvielfalt der β -Lactamasen einzugehen, wurde in dieser Arbeit die Gruppe der CTX-M β -Lactamasen als Target ausgewählt, welche sich durch die Sequenzvariabilität und eine hohe Prävalenz in Deutschland auszeichnet. Mittels der hier vorgestellten mRNA-basierten Nachweismethode lassen sich alle CTX-M Varianten in cDNA umschreiben und in einer PCR amplifizieren. Die anschließende Pyrosequenzierung ermöglicht die Zuordnung zur jeweiligen phylogenetischen Gruppe sowie die Differenzierung der phänotypischen Resistenz gegenüber Cefotaxim, welche durch die Substitution Asp240Gly charakterisiert wird (Poirel et al. 2002, Cartelle et al. 2004). Aufgrund der Relevanz der Region für den Resistenzphänotyp, wurde die Stelle um den Aminosäurebereich Asp240Gly ebenfalls bei der Methodik von Naas et al. analysiert (Naas et al. 2007).

Die im Rahmen der Dissertation entwickelte Methode basiert auf degenerierten, gruppenspezifischen Primern, die innerhalb der CTX-Ms sehr konservierte Regionen erkennen. Damit ermöglicht diese Methode den Nachweis einer großen Anzahl an Varianten, einschließlich neuer Varianten, die durch Veränderungen in den variablen Regionen z.B. durch Punktmutationen entstehen könnten. Um ein möglichst breites Spektrum an Genen zu erfassen wird bei kommerziell erhältlichen Tests oft ein Multiplexansatz gewählt (Nanosphere Verigene BC-GP, Plex-ID, Hyplex Bloodscreen, Prove-it Sepsis, StaphPlex system, StaphSR und Gene Xpert MRSA/MSSA, Vyo, LightCycler SeptiFast, VapChip, MagicPlex) (Afshari et al. 2012). Die Verwendung degenerierter Primer (diese Arbeit) sowie die multiplex PCR (kommerzielle Tests) sind kompatibel, da sie jeweils mit Primermischungen arbeiten. Somit könnten erhältliche Systeme um die degenerierten CTX-M-Primer und damit das Spektrum an erfassten β -Lactamasen leicht erweitert werden.

Die Kombination aus RT, PCR und Pyrosequenzierung verbindet drei Reaktionen, die sich einzeln leicht auf verschiedene Plattformen implementieren lassen und so den Ausbau und die Kommerzialisierung dieser Methodik ermöglichen. Die Auswertung und/oder Identifizierung der Amplifikate erfolgt bei den kommerziellen Systemen über verschiedene Methoden: Mikroarray, Massenspektroskopie, Gelelektrophorese und/oder Sequenzierung. Die Sequenzierung bietet den Vorteil, dass zusätzliche Informationen generiert werden, die eine weitere Differenzierung ermöglichen. Dabei ist die Pyrosequenzierung den konventionellen

Methoden durch die sehr kurze Analysedauer (ca. 20 Minuten) und die Einfachheit der Datensätze überlegen.

7.1.4 Werden die Ansprüche an die Messzeit und Sensitivität erfüllt?

Für einzelne CTX-M Varianten wurde bereits ein PCR-basierter Nachweis mit anschließender Mikrogelelektrophorese innerhalb von 1,5 Stunden aus einer positiven Blutkultur (zuzüglich der 11-12 Stunden Bebrütung der Blutkultur) beschrieben (Fujita et al. 2011). In der hier vorliegenden Arbeit konnte aus positiven Blutkulturen mittels der RT-PCR-Pyrosequenzierungsmethode innerhalb von 4 Stunden eine Zuordnung der CTX-M Varianten zur entsprechenden phylogenetischen Gruppe erfolgen. Die längere Detektionszeit ist vor allem dadurch zu begründen, dass die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden muss. Da diese Methode sensitiv genug ist, um bereits nach 6-8 Stunden Bebrütung der Blutkultur einen sicheren Nachweis zu liefern, relativiert sich die Detektionszeit.

Bei dem direkten Nachweis aus Patientenmaterial ohne eine Anreicherung der Bakterien, spielt die Nachweisgrenze eine entscheidende Rolle. Für die getesteten *E. coli* Stämme konnte eine Nachweisgrenze von 20-500 KBE/ml Blut erreicht werden, was im Bereich der kommerziell erhältlichen Testsysteme liegt (3 bis >10 KBE/ml), die allerdings nur Spezies oder ein sehr limitiertes Spektrum an Resistenzgenen detektieren können (Afshari et al. 2012). Trotz der Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte konnte die Keimzahl von <10 KBE/ml Blut, die für Bakteriämien beschrieben wird (Reimer et al. 1997), nicht erreicht werden. Die Detektionsgrenze variierte zwischen den verschiedenen Bakterienspezies. Bei *K. pneumoniae* Stämmen lag die Nachweisgrenze mit 10^2 KBE/ml Blut deutlich höher, was durch eine weniger effiziente Lyse der Stämme, resultierend aus dem Aufbau der Zellwand, begründet werden kann (Gerasimenko et al. 2004). Eine Verbesserung der Nachweisgrenze, vor allem bei Isolaten der Spezies *K. pneumoniae* (10^2 KBE/ml Blut) ist erstrebenswert, da diese Stämme bei nosokomialen Infektionen und Ausbruchsgeschehen eine wichtige Rolle spielen (Muro et al. 2012, Rettedal et al. 2012, Filippa et al. 2013).

Die Bearbeitungszeit der RT-PCR-Pyrosequenzierungsmethode bis zur Bestimmung der Resistenzgene direkt aus EDTA-Blutproben liegt bei 7 Stunden und ist damit mit automatisierten Multiplex-PCR Systemen (3-12 Stunden) vergleichbar. Hier muss erwähnt werden, dass die hier beschriebene Detektionszeit für die manuelle Verarbeitung berechnet wurde. Eine Implementierung an automatische Systeme könnte die Detektionszeit wesentlich beschleunigen, so dass ein Testergebnis unter 5 Stunden erreichbar erscheint.

7.1.5 Welche klinische Relevanz hat der Schnelldiagnostik von Blutstrominfektionen?

Aus klinischer Sicht ist die Identifizierung der Pathogene für die Therapiemaßnahmen zunehmend von geringerem Stellenwert. Dies gilt besonders für Enterobakterien, die mit vielen verschiedenen Resistenzen ausgestattet sind, welche sich oft speziesübergreifend ausbreiten. Durch die direkte Bestimmung exprimierter Resistenzgene kann die Antibiotikatherapie bestmöglich angepasst werden. Im Fokus stehen dabei schwere akute Infektionen (Sepsis), bei denen die Verzögerung einer adäquaten Therapie um wenige Stunden bereits in einer höheren Letalität resultiert. In aktuellen Studien wurde *E. coli*, gefolgt von *K. pneumoniae*, als häufigster gramnegativer Erreger bei Blutstrominfektionen nachgewiesen (Fennell et al. 2012, Gastmeier et al. 2012, Harris et al. 2015). Hinzu kommt die steigende Rate an ESBL-produzierenden *E. coli* Stämmen (zwischen 5–20 %). Die kulturbasierte Routinediagnostik liefert ein umfangreiches Resistogramm, differenziert jedoch nicht die einzelnen β -Lactamasen. Die Klassifizierung 'ESBL' ist bei der Therapieentscheidung zwischen dem Einsatz eines β -Lactamase-Inhibitors oder einem Carbapenem unzureichend, da es sowohl Inhibitor-sensible als auch β -resistente ESBL-Varianten gibt (z.B. TEM-50). Aus diesem Grund wird das Resistenzprofil gegenüber β -Lactamase-Inhibitoren zusätzlich auf Selektivplatten überprüft, um eine Abgrenzung zwischen dem ESBL-Phänotyp und Penicillinasen bzw. Cephalosporinasen mit eingeschränktem Spektrum zu schaffen.

Einige Studien zeigen, dass bei der Behandlung von ESBL-Infektionen kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate zwischen einer Carbapenem-Therapie und einer β -Lactam-Inhibitor-Kombination besteht (Rodriguez-Bano et al. 2012, Shiber et al. 2015). Zur Deeskalation des Carbapenem-Einsatzes kann eine CTX-M-assoziierte Infektion erfolgreich mit einer β -Lactam-Inhibitor-Kombination (Piperacillin/Tazobactam) behandelt werden (Leclercq et al. 2013, Rodriguez-Bano et al. 2012), wenn bestimmte TEM- und/oder SHV-Varianten oder Klasse C β -Lactamasen (AmpC, häufig bei *Enterobacter* spp.) nicht gleichzeitig vorhanden sind. Anhand dieser Daten wurde eine Modifikation der EUCAST Empfehlungen vorgenommen, da die bisherige Empfehlung, bei ESBL aus Sicherheitsgründen immer ein Carbapenem einzusetzen, zu einer deutlichen Zunahme des Carbapenemverbrauches und der damit einhergehenden Selektion von Carbapenemasen geführt hat (Leclercq et al. 2013). Ferner kann durch den spezifischen Nachweis der CTX-M

Gruppe die Behandlung mit Cephalosporinen (mit erweitertem Wirkungsspektrum) sowie mit Aztreonam ausgeschlossen (Bonnet 2004) werden.

Der molekulare Schnellnachweis von Resistenzgenen ermöglicht eine Korrektur der empirisch begonnenen Antibiotikatherapie und hat dadurch das Potential, sowohl Letalität durch Fehltherapie, als auch Selektion multi-resistenter Erreger durch Übertherapie zu reduzieren. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht in Klonalitätsanalysen bei Ausbrüchen multi-resistenter Erreger. Da die entsprechenden β -Lactamasen durch Plasmide auch über die Speziesgrenze hinweg ausgetauscht werden können, kann hier im Vergleich zu klassischen Klonalitätsanalysen (z.B. PFGE) ein komplementärer Nutzen bestehen. Auch aus den genannten Gründen hat die EUCAST die unterstützende Diagnose von molekularen Resistenzmechanismen in ihre Richtlinie integriert. Die Behandlungs- und Entwicklungsmöglichkeiten, welche sich durch den Einsatz effektiver und schneller Nachweismethoden ergeben, sind in Abbildung 23 dargestellt.

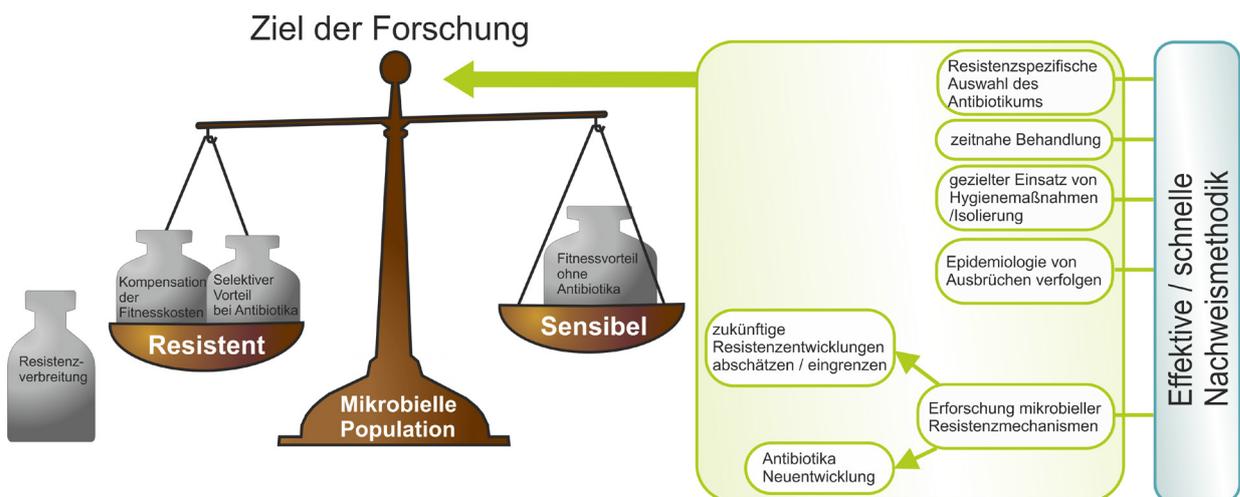


Abbildung 23: Stellenwert diagnostischer Nachweismethoden bei der Eindämmung und Kontrolle der zunehmenden Resistenzentwicklung.

7.2 Antibiotikatherapie bei multi-resistenten gramnegativen Bakterien

7.2.1 Wann sind Antibiotikakombinationen sinnvoll?

Neben der steigenden Zahl an Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in Deutschland und weltweit, werden auch zunehmend Stämme isoliert, die gegen die klinisch wichtigen Reserveantibiotika resistent sind (Carbapeneme, Polymyxine, Glycylcycline). Die effektive, kombinierte Behandlung solcher bakterieller Infektionen mit multi-resistenten,

gramnegativen Erregern wird zunehmend wichtiger, denn Monotherapien (z.B. mit Colistin) führen häufig zur Entstehung weitere Resistenzen und waren in klinischen Studien mit einer Übersterblichkeit assoziiert (Bogdanovich et al. 2011, Zarkotou et al. 2010, Daikos et al. 2014, Tzouvelekis et al. 2014).

Da neue gegen multi-resistente gramnegative Erreger gut und umfassend wirksame Antibiotika nicht verfügbar sind, fokussiert man aktuell bei hochresistenten Erregern wie z.B. *Acinetobacter baumannii* oder *Klebsiella pneumoniae*, auf Kombinationen der verbliebenen suboptimalen Therapieoptionen. In retrospektiven Studien konnten Tumbarello et al. sowie Qureshi et al. durch den Einsatz einer 3-fach Kombinationstherapie mit Colistin, Tigecyclin plus Meropenem eine verringerte Mortalitätsrate (12,5 %) für Patienten mit Blutstrominfektionen, im Vergleich zur Monotherapie mit Colistin oder Tigecyclin (30,4 %), belegen (Qureshi et al. 2012, Tumbarello et al. 2012). Da bisher nur wenige *in vitro* Daten zu dieser klinisch erfolgreichen 3-fach Kombination veröffentlicht wurden, wurde diese untersucht.

In der Checkerboard-Analyse konnte bei 40 % der getesteten *K. pneumoniae* Stämme ein synergistischer Effekt bei der 2-fach und 3-fach Kombination nachgewiesen werden, wobei der Effekt vor allem auf Colistin zurückzuführen ist. Beim Vergleich der FICI-Werte konnte keine Verbesserung des Effektes durch die Hinzunahme eines dritten Antibiotikums (Meropenem) gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte die synergistische Wirkungsweise von Meropenem und Tigecyclin nur im Blättchendiffusionstest nachgewiesen werden. Die Antibiotikakombination Meropenem/Tigecyclin konnte bereits erfolgreich bei der Behandlung von Blutstrominfektionen im klinischen Sektor eingesetzt werden (Daikos et al. 2014). Im Blättchendiffusionstest waren dagegen die Synergien mit Colistin kaum sichtbar, was durch das eingeschränkte Diffusionsverhalten des Polymyxins in der Agarmatrix erklärt werden könnte (Humphries 2015).

Durch die Analyse der Isolate mit dem Blättchendiffusionstest konnte ein Mutations-Präventionseffekt schon bei Stämmen mit nur additiver Wirkung der Antibiotika nachgewiesen werden. Die beobachtete Hemmung resistenter Meropenem-Mutanten im Diffusionsbereich zu Tigecyclin lässt vermuten, dass durch die Kombination verschiedener Antibiotikaklassen (unterschiedliche Angriffspunkte und Wirkmechanismen) die Ausbildung von Resistenzen gegenüber der Monotherapie deutlich erschwert wird, weil beispielsweise durch den Proteinsynthesehemmer Tigecyclin die Expression der β -Lactamasen beeinträchtigt wird. Hinzu kommt, dass Resistenzmechanismen in Abhängigkeit der vorherrschenden

Milieubedingungen in der Regel einen Fitnessverlust gegenüber sensiblen Vertretern zur Folge haben (Levin et al. 1997). Die Fitnesskosten beim Erwerb mehrerer Resistenzeigenschaften gegenüber grundlegend verschiedenen Wirkmechanismen unterliegen vermutlich dem hohen Selektionsdruck.

Die divergierenden Ergebnisse der *in vitro* Testung dieser Arbeit und den Ergebnissen der klinischen Studien von Tumbarello et al. sowie Qureshi et al. lassen sich durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen begründen. *In vitro* Modelle lassen sich nur bedingt auf *in vivo* Modelle übertragen (Andersson und Hughes 2010) und sind deswegen nur bedingt vergleichbar. Dennoch erscheint in Anbetracht der *in vitro* Daten eine Kombinationstherapie mit Antibiotika verschiedener Wirkungsweisen gegen ESBL-Bildner als vielversprechend.

7.2.2 Welche Rolle spielen die β -Lactam-Resistenzmechanismen bei der Kombinationstherapie?

Die β -Lactam-Resistenzmechanismen (β -Lactamase Variante, Art des Porinverlustes, funktionelle Leistungsfähigkeit der Efflux-Pumpen) der Isolate wurden bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Enzymvarianten und der Wirkung der Kombination aufzuzeigen. In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen den nachgewiesenen β -Lactamasetypen oder den MHK_{MEM} und dem Synergismus mit Colistin aufgezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch die Forschergruppe um David Wareham 2014 in einem Larven-Modell gezeigt (Betts et al. 2014). Auffällig war, dass alle Meropenem-resistenten Stämme mehrere Varianten der β -Lactamresistenz (mehrere β -Lactamasen) aufwiesen. Hier scheinen sich multi-resistente gramnegative Erreger deutlich von den grampositiven (MRSA, VRE) Erregern zu unterscheiden, bei denen 1 Gen (*mecA* bzw. *vanA*, *vanB*) für die Methicillin- bzw. Vancomycin-Resistenz verantwortlich ist.

Neben den Antibiotika-spaltenden Enzymen sind auch Resistenzmechanismen der Zellwand für die Antibiotikatherapie von Bedeutung. Die äußere Membran dient als Barriere und sichert die Zellintegrität. Die Porine der Membran sind als Transportweg für die Wirkstoffe in das Zellinnere und damit für die Wirkung bzw. der Resistenz gegenüber dem Antibiotikum wichtig. Bei *K. pneumoniae* Spezies gelangt der β -Lactamwirkstoff hauptsächlich über die Porine OmpK35 und OmpK36 von der Peripherie in den periplasmatischen Raum (Nikaido 1994). Resultierend aus dem funktionellen Verlust der Porine OmpK35 und OmpK36 variierten die MHKs der ESBL-Bildner (CTX-M-15) gegenüber Meropenem (Carbapenem)

zwischen 4 und 32 mg/l. Die erhöhte Resistenz gegenüber Carbapenemen aufgrund von Porinverlusten wurde bereits belegt (Garcia-Fernandez et al. 2010, Wang et al. 2009). Der genaue Anteil der Porine OmpK35 oder OmpK36 zur Erhöhung der MHK_{MEM} ist unklar, da kein spezifisches Muster zwischen den Mutationen der Poringene und den MHKs bestimmt werden konnte. Beide Porine sind bei ESBL-exprimierenden *K. pneumoniae* mit einer Carbapenemresistenz assoziiert (Martinez-Martinez 2008), wobei das OmpK36 eine stärkere Rolle zu spielen scheint (Wang et al. 2009). Vergleicht man die Stämme RKI 84/14 und RKI 83/14 unterschieden sich die Isolate weder bezüglich der Porinmutationen noch hinsichtlich dem β -Lactamaseprofil. Allerdings zeigt der Stamm RKI 83/14 eine wesentlich höhere MHK_{MEM} (32 mg/l). Die Ergebnisse belegen, dass weitere unbekannte Faktoren in den Resistenzmechanismus einwirken. *Klebsiella pneumoniae* verfügt über weitere Porine, wie PhoE oder LamB (Garcia-Sureda et al. 2011, Kaczmarek et al. 2006), die ebenfalls einen Anteil an der Carbapenemresistenz haben können, aber in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Zwischen den Mutationen bzw. dem Verlust der Funktionalität der Porine und der nachgewiesenen synergistischen Wirkungsweise der Antibiotika konnte kein Zusammenhang hergestellt werden. Auch in vorangegangenen Studien konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Synergieeffekt von Colistin und Meropenem und dem Verlust bzw. der Modifikation des OmpK36 Porins nachgewiesen werden (Hong et al. 2013).

Effluxmechnismen stellen ebenfalls einen Resistenzfaktor für verschiedene Antibiotika dar. Da der Wirkstoff Tigecyclin an den Ribosomen im cytoplasmatischen Raum angreift, wurde neben den Porineigenschaften der äußeren Membran auch Veränderungen der inneren Membran durch die Analyse des Efflux-Mechanismus mit in die Betrachtungen einbezogen. Für die Bestimmung wurde der neue Fluoreszenzfarbstoff BM-27 eingesetzt. Im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen, wie Nilrot (Bohnert et al. 2010) oder 1,2-Dinaphthylamin (Bohnert et al. 2011), ist BM-27 wasserlöslich. Der Farbstoff ist ein Substrat und Inhibitor für die Efflux-Pumpe AcrAB-TolC (Handzlik et al. 2012). Die Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff war bei *K. pneumoniae* aufgrund der stärkeren Ladung der äußeren Membran im Vergleich zu *E. coli* erschwert (Gerasimenko et al. 2004). Da zwischen den Influx-Messwerten und den Mutationen der OmpK Porine kein Zusammenhang hergestellt werden konnte, ist zu vermuten, dass der Fluoreszenzfarbstoff BM-27 über andere Kanäle oder Mechanismen durch die Zellwand penetriert. Da für *K. pneumoniae* noch keine vergleichbaren Daten für die Efflux-Testung existieren, wurden die Ergebnisse mit Studien zu *E. coli* verglichen. Eine Halbwertszeit von 50-70 Sekunden wird dabei einem mittelgradigen Efflux-System zugeordnet (Bohnert et al. 2010). Allerdings konnten weder die

Influxeigenschaften noch die Efflux-Eigenschaften mit den gemessenen MHK-Werten für Meropenem, Tigecyclin beziehungsweise Colistin, oder der Synergie zwischen diesen, korreliert werden.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die optimale Antibiotika-Kombination für Meropenem-resistente gramnegative Bakterien nur durch phänotypische Testung bestimmt werden kann und eine zuverlässige Vorhersage auf Basis molekularer Nachweisverfahren nicht sicher möglich ist.

7.2.3 Welche Mechanismen stehen hinter der Synergie mit Colistin?

Auffällig war, dass nur bei Isolaten mit hohen MHK_{MEM} (>8 mg/l), MHK_{CST} (>8 mg/l) und MHK_{TGC} (>2 mg/l) eine Synergie zwischen den Wirkstoffen nachgewiesen werden konnte. Der ausbleibende Nachweis synergistischer Wirkungen unter Stämmen, die für einen der Kombinationspartner sensibel getestet wurden, ist durch die Wirksamkeit des entsprechenden Antibiotikums zu erklären. Da bei diesen Isolaten nur eine geringe Menge des Wirkstoffes notwendig ist, um das Wachstum zu unterdrücken, wurde der Synergieeffekt durch die Verdünnungsmethode (serielle Verdünnung der Wirkstoffe 1:2) nicht erfasst. Bei den Stämmen mit hohen MHKs gegen alle drei Kombinationspartner konnten synergistische Effekte und eine Absenkung der MHKs unter die EUCAST Grenzwerte beobachtet werden. Folglich können bei der Kombinationstherapie geringere Antibiotikakonzentrationen der einzelnen Wirkstoffe verwendet werden.

Colistin verstärkt bei diesen Stämmen sowohl die Wirkung von Meropenem als auch Tigecyclin. Der Wirkungsort der β -Lactamantibiotika ist die Zellwand bzw. deren Synthese. Die Wirkstoffe gelangen über Porine (OmpK35 und OmpK36) der äußeren Membran ins Periplasma (Nikaido 1994). Tigecyclin agiert im Zytoplasma und muss somit die äußere und innere Membran passieren. Colistin interagiert mit den lipoiden Komponenten der bakteriellen Membran, bildet Poren und führt zur Instabilität beider Membranen (Chen und Feingold 1972). Die durch Colistin vermittelte Permeabilisierung der Membranen erleichtert die Aufnahme von Meropenem und Tigecyclin (Betts et al. 2014). Auf diese Weise können höhere Konzentrationen beider Wirkstoffe in der Zelle erreicht werden.

8 Schlussfolgerungen

Die zunehmende Resistenzentwicklung ist nach Einschätzung der WHO eine der wesentlichen Gefahren für die öffentliche Gesundheit. Wie das niederländische Vorbild zeigt, ist ein geringerer Verbrauch antimikrobieller Wirkstoffe in Bereichen wie der Veterinärmedizin und in der Lebensmittelindustrie durch gezielte Maßnahmen möglich. Ein verminderter Gebrauch im klinischen Sektor ist schwerer zu erreichen, allerdings gibt es auch hier ein Einsparpotential wie z.B. die unnötige Verlängerung einer perioperativen Antibiotikaprophylaxe über die Operation hinaus.

Dennoch ist nicht damit zu rechnen, dass die Resistenzentwicklung rückgängig gemacht werden kann. Dies bedeutet, dass Ärzte bei nosokomial erworbenen und zunehmend auch bei ambulant erworbenen Infektionen multi-resistente Erreger in der empirischen Therapie berücksichtigen müssen, wenn sie den Patienten nicht gefährden wollen. Da es unsinnig und gefährlich wäre alle Patienten mit einer maximalen Breitspektrum-Therapie zu behandeln, fordern Leitlinien, eine nach Risikofaktoren stratifizierte Therapie (American Thoracic and Infectious Diseases Society of 2005, Shorr et al. 2008, Hoffken et al. 2009). Allerdings ist die Identifikation von Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine Infektion durch multi-resistente Erreger aufgrund dieser Risikofaktoren (z.B. Antibiotikavorthherapie, Krankenhausaufenthalt über 5 Tage, chronische Dialyse *etc.*) mit Unsicherheiten behaftet und führt zu einer Über- oder Untertherapie. Eine schnelle molekulare Diagnostik, die eine Vorhersage zur Wirksamkeit der begonnenen Antibiotikatherapie liefern kann und damit eine frühzeitige Korrektur (Eskalation oder De-Eskalation) ermöglicht, wäre eine bedeutende klinische Verbesserung. Eine solche Diagnostik gesteuerte Therapie würde sowohl die Patientensicherheit erhöhen als auch der Selektion von Resistenzen durch Verhinderung des unnötigen Einsatzes von Breitspektrum-Antibiotika reduzieren. Für die derzeit im klinischen Fokus stehenden multi-resistenten gramnegativen Erreger ist dies aufgrund der multiplen und sich rasch weiterentwickelnden Resistenzmechanismen, insbesondere der β -Lactamasen, eine Herausforderung, die bislang keiner der entwickelten und sich in Entwicklung befindlichen Systeme gelöst hat. Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz ermöglicht zumindest für den wichtigsten Resistenzmechanismus, die β -Lactamasen, eine wahrscheinlich allumfängliche Detektion und soll klinisch mit Hilfe der Industrie (Alere Technologies) weiter entwickelt werden.

Der Goldstandard Blutkultur wird durch die molekulare Diagnostik von Resistenzgenen nicht abgelöst, kann aber ergänzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein direkter Nachweis von Resistenzgenen direkt aus Blutproben innerhalb von 7 Stunden möglich ist.

Auch Wirkstoffkombinationen für die Therapie von Meropenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Kombinationstherapie zeigt sich bei Stämmen mit erhöhten MHKs für alle 3 getesteten möglichen Kombinationspartner als synergistisch wirksam. Neben der synergistischen Wirkungsweise der Antibiotika konnte auch das Wachstum von Mutanten im Vergleich zu Monotherapien und damit die Selektion weiterer Resistenzen unterdrückt werden. Die synergistische Wirkungsweise der Antibiotikastoffe konnte mit den untersuchten Resistenzmechanismen nicht erklärt werden, allerdings bieten die Ergebnisse Grundlage für weitere Forschungen.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Afshari A, Schrenzel J, Ieven M, Harbarth S. 2012. Bench-to-bedside review: Rapid molecular diagnostics for bloodstream infection--a new frontier? *Crit Care*, 16 (3):222.
- Alberti S, Rodriguez-Quinones F, Schirmer T, Rummel G, Tomas JM, Rosenbusch JP, Benedi VJ. 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect Immun*, 63 (3):903-910.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215 (3):403-410.
- Ambler RP. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289 (1036):321-331.
- American Thoracic S, Infectious Diseases Society of A. 2005. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 171 (4):388-416.
- Andersson DI. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology*, 6 (5):452-456.
- Andersson DI, Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature reviews Microbiology*, 8 (4):260-271.
- Ball P. 2007. The clinical development and launch of amoxicillin/clavulanate for the treatment of a range of community-acquired infections. *International journal of antimicrobial agents*, 30 (2):113-117.
- Betts JW, Phee LM, Hornsey M, Woodford N, Wareham DW. 2014. In vitro and in vivo activities of tigecycline-colistin combination therapies against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58 (6):3541-3546.
- Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. 2012. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10 (8):917-934.
- Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian GB, Nguyen MH, Kwak EJ, Muto CA, Doi Y. 2011. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clin Infect Dis*, 53 (4):373-376.
- Bohnert JA, Karamian B, Nikaido H. 2010. Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (9):3770-3775.
- Bohnert JA, Schuster S, Szymaniak-Vits M, Kern WV. 2011. Determination of real-time efflux phenotypes in *Escherichia coli* AcrB binding pocket phenylalanine mutants using a 1,2'-dinaphthylamine efflux assay. *PLoS One*, 6 (6):e21196.
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (1):1-14.
- Borer A, Saidel-Odes L, Riesenber K, Eskira S, Peled N, Nativ R, Schlaeffer F, Sherf M. 2009. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30 (10):972-976.
- Bradford PA. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 14 (4):933-951.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (3):969-976.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (6):1211-1233.

- Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Alberti S, Bengoechea JA. 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 72 (12):7107-7114.
- Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen O, Seifert H, Woodford N, Nordmann P, European Network on C. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 18 (5):413-431.
- Cartelle M, del Mar Tomas M, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. 2004. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (6):2308-2313.
- Chen CC, Feingold DS. 1972. Locus of divalent cation inhibition of the bactericidal action of polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 2 (5):331-335.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1):156-159.
- Chong Y, Ito Y, Kamimura T. 2011. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11 (7):1499-1504.
- Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, Stefanou I, Sypsa V, Miriagou V, Nepka M, Georgiadou S, Markogiannakis A, Goukos D, Skoutelis A. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*, 58 (4):2322-2328.
- Datta N, Kontomichalou P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208 (5007):239-241.
- den Hollander JG, Mouton JW, Verbrugh HA. 1998. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. *Antimicrob Agents Chemother*, 42 (4):744-748.
- Drawz SM, Bonomo RA. 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23 (1):160-201.
- Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 (1):90-103.
- Eller C, Simon S, Miller T, Frick JS, Prager R, Rabsch W, Guerra B, Werner G, Pfeifer Y. 2013. Presence of beta-lactamases in extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* of 30 different serovars in Germany 2005-11. *J Antimicrob Chemother*, 68 (9):1978-1981.
- Entenza JM, Moreillon P. 2009. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies. *Int J Antimicrob Agents*, 34 (1):8 e1-9.
- Fechir M, Klega A, Buchholz HG, Pfeifer N, Balon S, Schlereth T, Geber C, Breimhorst M, Maihofner C, Birklein F, Schreckenberger M. 2010. Cortical control of thermoregulatory sympathetic activation. *The European journal of neuroscience*, 31 (11):2101-2111.
- Fennell J, Vellinga A, Hanahoe B, Morris D, Boyle F, Higgins F, Lyons M, O'Connell K, Keady D, Cormican M. 2012. Increasing prevalence of ESBL production among Irish clinical Enterobacteriaceae from 2004 to 2008: an observational study. *BMC Infect Dis*, 12:116.
- Filippa N, Carricajo A, Grattard F, Fascia P, El Sayed F, Defilippis JP, Berthelot P, Aubert G. 2013. Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying qnrB1 and blaCTX-M15 in a French intensive care unit. *Ann Intensive Care*, 3 (1):18.

- Fraser G, Dias G, Hrubá F, Albu C. 2013. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. [Annual Epidemiological Report].
- Fujita S, Yosizaki K, Ogushi T, Uechi K, Takemori Y, Senda Y. 2011. Rapid identification of gram-negative bacteria with and without CTX-M extended-spectrum beta-lactamase from positive blood culture bottles by PCR followed by microchip gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 49 (4):1483-1488.
- García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. 2010. An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (10):4178-4184.
- García-Sureda L, Juan C, Domenech-Sánchez A, Alberti S. 2011. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (4):1803-1805.
- Gastmeier P, Schwab F, Meyer E, Geffers C. 2012. Excess mortality and prolongation of stay due to bloodstream infections caused by multiresistant pathogens in Germany. *Dtsch Med Wochenschr*, 137 (34-35):1689-1692.
- Gerasimenko DV, Avdienko ID, Bannikova GE, Zueva O, Varlamov VP. 2004. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 40 (3):301-306.
- Grobner S, Linke D, Schutz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, Witte W, Pfeifer Y. 2009. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of medical microbiology*, 58 (7):912-922.
- Handzlik J, Szymanska E, Wojcik R, Dela A, Jastrzebska-Wiesek M, Karolak-Wojciechowska J, Fruzinski A, Siwek A, Filipek B, Kiec-Kononowicz K. 2012. Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with alpha(1)-adrenoceptor antagonistic properties. *Bioorg Med Chem*, 20 (14):4245-4257.
- Harris P, Peleg AY, Iredell J, Ingram PR, Miyakis S, Stewardson AJ, Rogers BA, McBryde ES, Roberts JA, Lipman J, Athan E, Paul SK, Baker P, Harris-Brown T, Paterson DL. 2015. Meropenem versus piperacillin-tazobactam for definitive treatment of bloodstream infections due to ceftriaxone non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp (the MERINO trial): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, 16 (1):24.
- Hawkey PM, Jones AM. 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*, 64 (1):i3-i10.
- Hoffken 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, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für C, Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und B, Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk C. 2009. Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany. *Pneumologie*, 63 (10):e1-68.
- Hong JH, Clancy CJ, Cheng S, Shields RK, Chen L, Doi Y, Zhao Y, Perlin DS, Kreiswirth BN, Nguyen MH. 2013. Characterization of porin expression in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* identifies isolates most susceptible to the combination of colistin and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*, 57 (5):2147-2153.
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*, 46 (9):3045-3049.
- Humphries RM. 2015. Susceptibility Testing of the Polymyxins: Where Are We Now? *Pharmacotherapy*, 35 (1):22-27.

- Jaurin B, Grundstrom T. 1981. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (8):4897-4901.
- Johansson N, Kalin M, Giske CG, Hedlund J. 2008. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples with real-time quantitative polymerase chain reaction for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 60 (3):255-261.
- Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. 2006. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (10):3396-3406.
- Klouche M, Schroder U. 2008. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med*, 46 (7):888-908.
- Kluytmans JA, Overdeest IT, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh MF, van der Zwaluw K, Heck M, Rijnsburger M, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH, Johnston BD, Gordon D, Johnson JR. 2013. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56 (4):478-487.
- Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, Peters C, Ahsan M, Chateau D. 2009. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 136 (5):1237-1248.
- Laible G, Spratt BG, Hakenbeck R. 1991. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 5 (8):1993-2002.
- Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hawser SP, Badal RE, Bonomo RA. 2012. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel beta-lactamases: a snapshot of extended-spectrum beta-lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol*, 50 (5):1632-1639.
- Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*, 19 (2):141-160.
- Lee CH, Chu C, Liu JW, Chen YS, Chiu CJ, Su LH. 2007. Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 60 (2):410-413.
- Lee JH, Bae IK, Lee SH. 2012. New definitions of extended-spectrum beta-lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Med Res Rev*, 32 (1):216-232.
- Leistner R, Gurntke S, Sakellariou C, Denkel LA, Bloch A, Gastmeier P, Schwab F. 2014. Bloodstream infection due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: an analysis of the disease burden in a large cohort. *Infection*, 42 (6):991-997.
- Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S, Antia R, Simonsen L, Walker NM, Stewart FM. 1997. The population genetics of antibiotic resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24 (1):9-16.
- Livermore DM. 2008. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*, 14 (1):3-10.
- Lubbert C, Straube L, Stein C, Makarewicz O, Schubert S, Mossner J, Pletz MW, Rodloff AC. 2015. Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany. *Int J Med Microbiol*, 305 (1):148-156.

- Marra AR, Edmond MB, Forbes BA, Wenzel RP, Bearman GM. 2006. Time to blood culture positivity as a predictor of clinical outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *J Clin Microbiol*, 44 (4):1342-1346.
- Martinez-Martinez L. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 (1):82-89.
- Muro S, Garza-Gonzalez E, Camacho-Ortiz A, Gonzalez GM, Llaca-Diaz JM, Bosques F, Rositas F. 2012. Risk factors associated with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae nosocomial bloodstream infections in a tertiary care hospital: a clinical and molecular analysis. *Chemotherapy*, 58 (3):217-224.
- Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. 2007. Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51 (1):223-230.
- Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. 2010. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (8):3086-3092.
- Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews*, 27 (3):543-574.
- Nikaido H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem*, 269 (6):3905-3908.
- Nobrega DB, Brocchi M. 2014. An overview of extended-spectrum beta-lactamases in veterinary medicine and their public health consequences. *J Infect Dev Ctries*, 8 (8):954-960.
- Nordmann P, Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*, 8 (6):321-331.
- Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (21):7378-7382.
- Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerging infectious diseases*, 17 (7):1216-1222.
- Palmer HR, Palavecino EL, Johnson JW, Ohl CA, Williamson JC. 2013. Clinical and microbiological implications of time-to-positivity of blood cultures in patients with Gram-negative bacilli bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32 (7):955-959.
- Paolucci M, Landini MP, Sambri V. 2010. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*, 36 (2):6-16.
- Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. 2008. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29 (12):1099-1106.
- Peralta G, Rodriguez-Lera MJ, Garrido JC, Ansorena L, Roiz MP. 2006. Time to positivity in blood cultures of adults with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *BMC Infect Dis*, 6:79.
- Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. 2004. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis*, 4 (12):751-760.
- Pfeifer Y, Eller C. 2012. Current data and trends about the resistance of Gram-negative pathogens to beta-lactams. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 55 (11-12):1405-1409.

- Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 300 (6):371-379.
- Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Gottig S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG. 2011. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother*, 66 (9):1998-2001.
- Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, Holfelder M, Witte W, Nordmann P, Poirel L. 2012. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (4):2125-2128.
- Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother*, 50 (6):1031-1034.
- Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10 (1):12-26.
- Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. 2012. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (4):2108-2113.
- Reddy P, Maleczynski M, Obias A, Reiner S, Jin N, Huang J, Noskin GA, Zembower T. 2007. Screening for extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae among high-risk patients and rates of subsequent bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45 (7):846-852.
- Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. 1997. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev*, 10 (3):444-465.
- Rettedal S, Lohr IH, Natas O, Giske CG, Sundsfjord A, Oymar K. 2012. First outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Norwegian neonatal intensive care unit; associated with contaminated breast milk and resolved by strict cohorting. *APMIS*, 120 (8):612-621.
- Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Retamar P, Picon E, Pascual A, Grp EIH. 2012. beta-Lactam/beta-Lactam Inhibitor Combinations for the Treatment of Bacteremia Due to Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*: A Post Hoc Analysis of Prospective Cohorts. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (2):167-174.
- Sandegren L. 2014. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups J Med Sci*, 119 (2):103-107.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, 32 (2):234-258.
- Schindler M, Osborn MJ. 1979. Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry*, 18 (20):4425-4430.
- Schoevaerdt D, Bogaerts P, Grimmelprez A, de Saint-Hubert M, Delaere B, Jamart J, Swine C, Glupczynski Y. 2011. Clinical profiles of patients colonized or infected with extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae isolates: a 20 month retrospective study at a Belgian University Hospital. *BMC infectious diseases*, 11:12.
- Shiber S, Yahav D, Avni T, Leibovici L, Paul M. 2015. beta-Lactam/beta-lactamase inhibitors versus carbapenems for the treatment of sepsis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70 (1):41-47.
- Shorr AF, Zilberberg MD, Micek ST, Kollef MH. 2008. Prediction of infection due to antibiotic-resistant bacteria by select risk factors for health care-associated pneumonia. *Arch Intern Med*, 168 (20):2205-2210.

- Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silbergeld EK, Morris JG, Jr. 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (9):6434-6439.
- Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. 2012. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*, 55 (7):943-950.
- Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. 2014. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*, 20 (9):862-872.
- Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. 2009. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol*, 58 (9):1196-1202.
- Weinstein MP. 1996. Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 23 (1):40-46.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35 (5):736-755.
- World HO. 2014. Antimicrobial resistance [Global report on surveillance].
- Yagupsky P, Nolte FS. 1990. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol Rev*, 3 (3):269-279.
- Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, Chrysos G, Prekates A, Voutsinas D, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. 2010. Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study. *J Clin Microbiol*, 48 (6):2271-2274.
- Zeng X, Lin J. 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4:128.
- Zhao WH, Hu ZQ. 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39 (1):79-101.

10 Anhang

10.1 Zusätzliche Daten

10.1.1 Sequenzanalysen

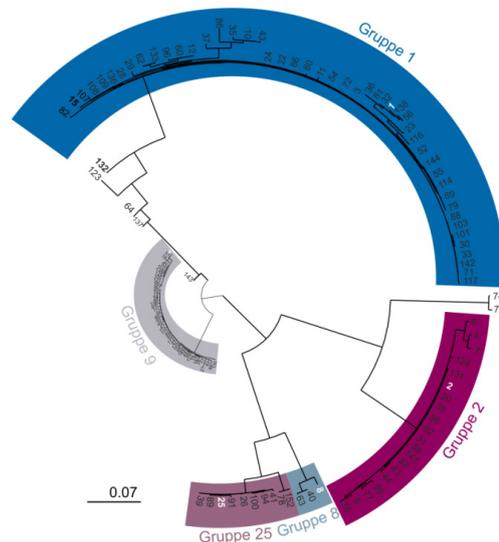


Abbildung 24: Phylogenetischer Stammbaum der β -Lactamase-Gruppe CTX-M. Die Scala zeigt einen Nukleinsäureunterschied von 7 %.

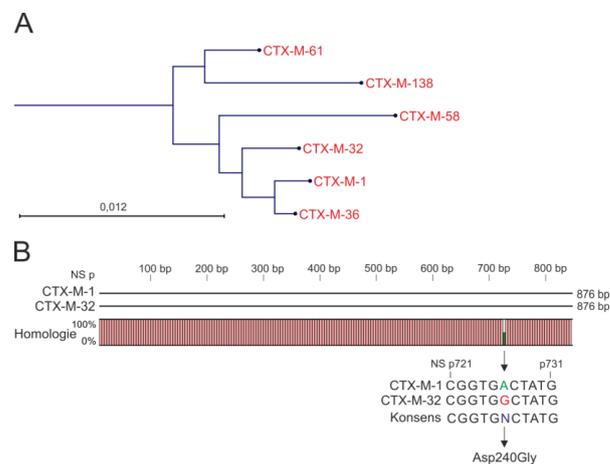


Abbildung 25: Sequenzvergleich und die phylogenetische Divergenz der CTX-M β -Lactamasen an Position 240. Der Sequenzvergleich wurde unter Berücksichtigung der phänotypischen Veränderungen der Resistenzgene erstellt. Bild A: Ausschnitt vom phylogenetischen Stammbaum der CTX-M Gruppe. B: Sequenzalignment der CTX-M Varianten 1 und 32, hervorgehoben wurde die Mutation an Position 240 (Aminosäuresequenz). Die Scala gibt eine Nukleinsäuredivergenz von 12 % an.

10.1.2 DNA Größenstandards

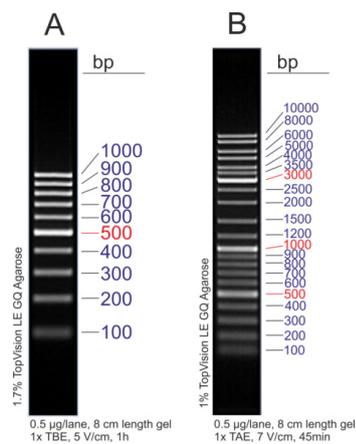


Abbildung 26: DNA-Größenstandards. (A) Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St-Leon-Rot) und (B) Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St-Leon-Rot).

10.1.3 pCTX-M-15 Standard

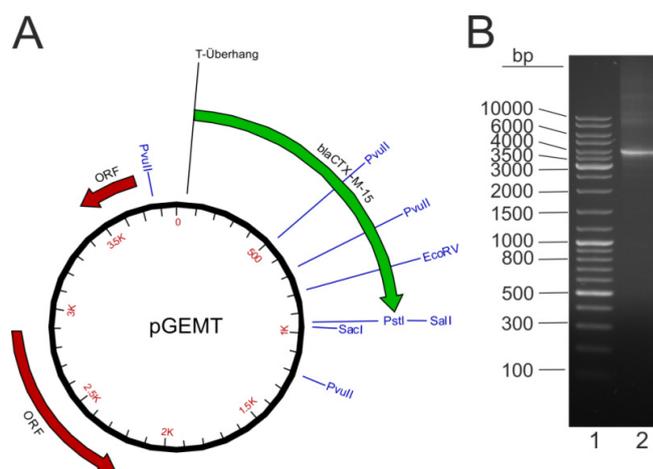


Abbildung 27: pCTX-M-15. Das *bla*_{CTX-M-15} Gen wurde in die 'multi cloning site' des pGEMT-Plasmides ligiert und das neue Plasmid in *E. coli* JM109 transformiert. Bild A: Plasmidkarte des pCTX-M-15. Bild B: Gelelektrophoretische Überprüfung des pCTX-M-15 Plasmids, 1 = Gene Ruler DNA Ladder Mix, 2 = linearisiertes pCTX-M-15 Plasmid. ORF = open reading frame

10.1.4 Entwicklung des Schnelldiagnosesystems

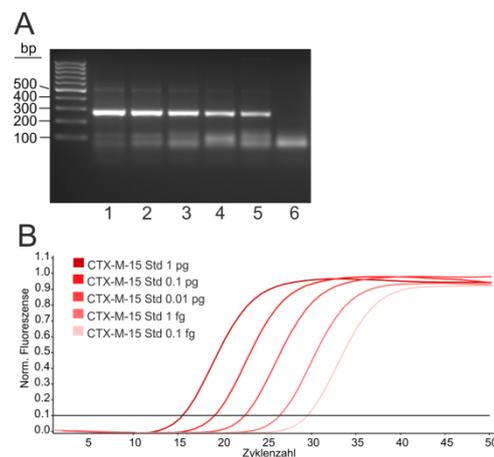


Abbildung 28: Nachweis der Spezifität der Reaktion unter Verwendung des CTX-M-15 Standards. A: 2 %iges Agarosegel zeigt die spezifischen PCR-Produkte der CTX-M-15 Amplifikation, Linie 1 = CTX-M-15 Std 1 pg, 2 = CTX-M-15 Std 0,1 pg, 3 = CTX-M-15 Std 0,01 pg, 4 = CTX-M-15 Std 1 fg, 5 = CTX-M-15 Std 0,1 fg, 6 = NTC; B: Ergebnis der Echtzeit-PCR (der Schwellenwert wurde auf 0,1 gesetzt).

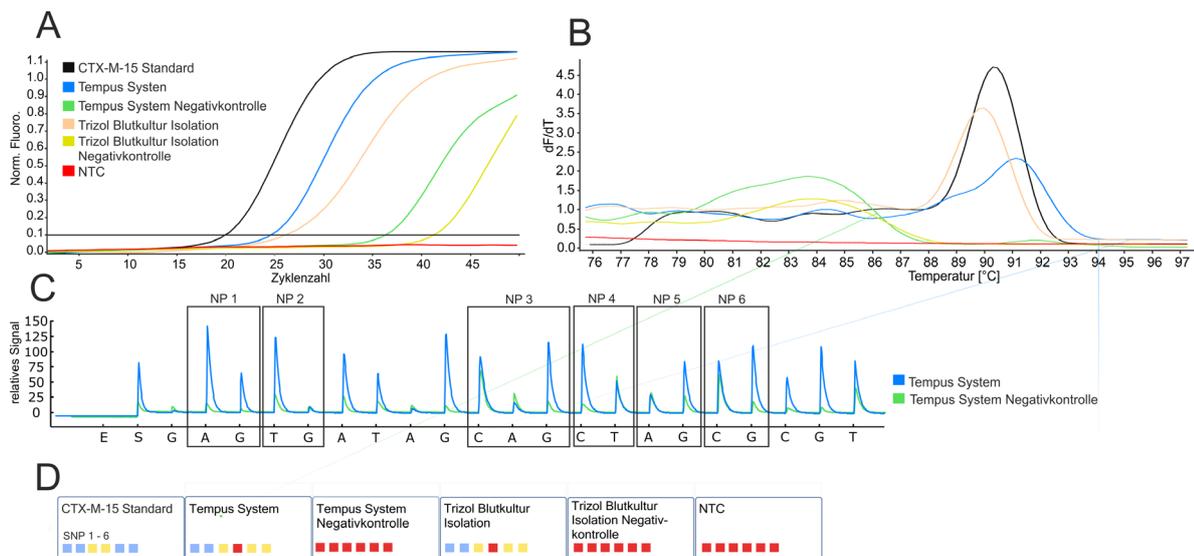


Abbildung 29: Überprüfung von DNA-Kontaminationen der RNA-Proben. Im Bild A sind die PCR-Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen beider Isolationssysteme und im Bild B die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte abgebildet. Dabei zeigten die Negativkontrollen im Gegensatz zum CTX-M-15 Standard und den Positivkontrollen keine spezifischen Produkte. Das Pyrogramm im Bild C belegt das Signal-Rausch-Verhältnis der positiven zu den negativen Kontrollen. Die sequenzielle Nukleotidabfolge wurde auf der X-Achse aufgetragen. Im Bild D sind die Ergebnisse der Pyrosequenzierung für die Nukleotidpositionen 1 bis 6 (Region 1) dargestellt. Blaue und gelbe Boxen signalisieren auswertbare und die rote Boxen nicht auswertbare Nukleotidpositionen.

10.1.5 Analysedaten der Sequenzierungsregionen 1 und 2

Tabelle 16: Analyse der Sequenzregion 1. Die RNA-Isolation wurde durch die Konzentration in ng/μl und den RIN-Wert, die Echtzeit-PCR durch den C_T-Wert und die Schmelztemperatur ausgewertet. Die analysierten NP 1 bis 6 wurden in Prozentsätzen angegeben. n.d. = nicht detektierbar; *Nukleotidnachweis ist signifikant für die entsprechende NP

Enzyme	RNA Isolation		Echtzeit-PCR Parameter		NP 1		NP 2		NP 3		NP 4		NP 5		NP 6		
	C _{RNA}	RIN	C _T	T _m	A	G	G	T	(A)	C	G	C	T	A	G	C	G
CTX-M-1	23,7	8,9	19,57	89,25	100	0	100	0	10	90*	0	3	97*	8	92	100*	0
CTX-M-3	20,1	8	20,93	89,75	100	0	99	1	11	89*	0	68	32	9	91	96*	4
CTX-M-15	230	n.d.	17,4	89,9	100	0	99	1	13	97*	0	73	27	13	87	96*	4
CTX-M-2	61,2	8,1	22,44	91,00	24	76*	94	6	12	19	69	78	22	11	89	28	72
CTX-M-9	34,8	8,3	25,7	91,6	100	0	37	63*	10	30	60	63	37	20	80	36	64
CTX-M-14	48,4	9,3	22,54	91,5	100	0	59	41*	4	58	38	57	43	4	96	56	44
CTX-M-27	49,3	9	21,87	91,4	100	0	60	40*	3	60	36	52	48	4	96	63	37
CTX-M-8	26,0	8	25,83	91,6	0	100*	100	0	2	0	98*	89	11	89	11	0	100*
CTX-M-25	43,9	8	29,02	90,25	100	0	100	0	4	0	96*	90	10	94	6	1	99*
SHV-4	80	n.d.	35,41	92,85	n.d.												
TEM-2	45,1	n.d.	31,35	89,15	n.d.												
OXA-10	44,1	n.d.	32,01	92,6	n.d.												

Tabelle 17: Analyse der Sequenzregion 2. Die Echtzeit-PCR wurde durch den C_T -Wert und die Schmelztemperatur ausgewertet. Die analysierten NP 1 bis 7 wurden in Prozentsätzen angegeben. * Nukleotidnachweis ist signifikant für die entsprechende NP; # Schmelzpunkte des zweiten PCR-Produktes; n.d. = nicht detektierbar

Enzyme	Echtzeit-PCR Parameter		NP 1		NP 2		NP 3		NP 4		NP 5		NP 6		NP 7		
	C_T	T_m	G	T	A	C	T	A	G	C	T	C	T	C	T	C	T
CTX-M-1	16,82	94,0	87	13	6	11	83*	91*	9	96	4	14	86*	87	13	67	33
CTX-M-3	18,12	94,3	86	14	7	13	80*	92*	8	94	6	17	83*	85	15	65	35
CTX-M-15	17,14	94,5	96	4	3	8	89*	5	95*	98	2	10	90*	89	11	72	28
CTX-M-2	14,16	94,0	88	12	73*	14	13	94	6	16	84	10	90	83	17	64	36
CTX-M-9	22,71	95,8	90	10	6	59	35	95*	5	100*	0	62	38	90	10	68	32
CTX-M-14	19,69	96,0	89	11	5	46	49	94*	6	99*	1	49	51	91	3	68	32
CTX-M-27	19,12	96,0	93	7	4	45	51	55	45*	100*	0	46	54	90	10	72	28
CTX-M-8	30,14	92,5	53	47	18	36	46	91	9	60	40	45	55	39	61	47	53
CTX-M-25	22,44	93,5	96	4	0	86*	14	0	100	100	0	92	8	86	14	80	20
SHV-4	21,44	91,5	n.d.														
TEM-2	30,78	87,60 (84,90) [#]	n.d.														
OXA-10	25,89	92,75 (89,75) [#]	n.d.														

Tabelle 18: Analyse der Region 1 in Anwesenheit von nicht CTX-M β -Lactamasen. Die Echtzeit-PCR wurde durch den C_T -Wert und die Schmelztemperatur ausgewertet. Die analysierten NP 1 bis 6 wurden in Prozentsätzen angegeben. * Nukleotidnachweis ist signifikant für die entsprechende NP

Enzyme	Echtzeit-PCR Parameter		NP 1		NP 2		NP 3			NP 4		NP 5		NP 6	
	C_T	T_m	A	G	G	T	A	C	G	C	T	A	G	C	G
CTX-M-15	24,63	89,75	98	2	100	0	3	97	0	89	11	4	96	88	12
RKI 01/10	18,90	89,65	98	2	100	0	3	97	0	89	11	4	96	91	9
RKI 02/10	17,82	89,65	99	1	100	0	2	98	0	90	10	4	96	95	5
RKI 93/07	20,50	89,65	99	1	100	0	2	98	0	90	10	3	97	89	11
RKI 364/12	17,74	89,65	97	3	100	0	5	95	0	85	15	4	96	78	22

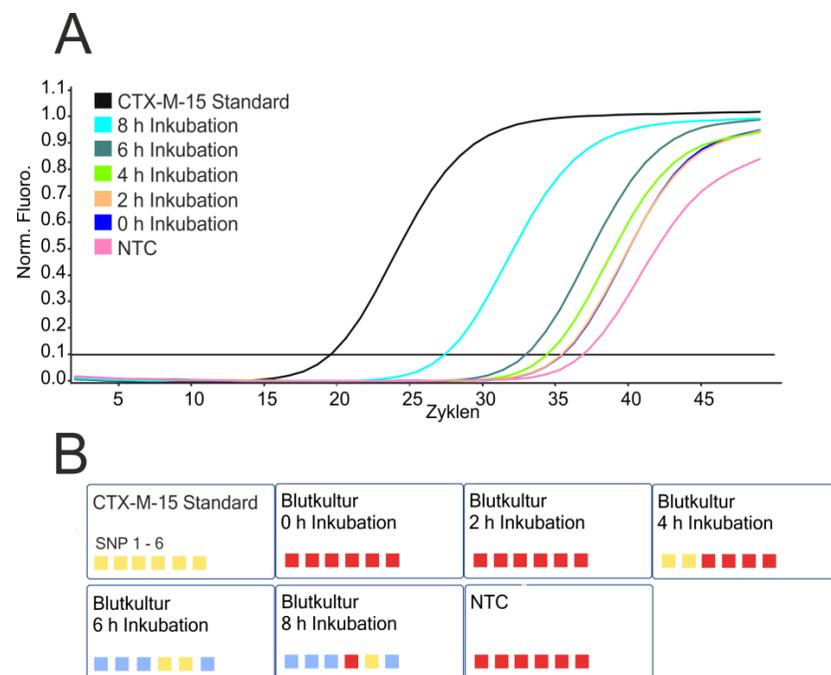


Abbildung 30: Bebrütung der Blutkultur. Im Bild A sind die Signale der Echtzeit-PCR in Abhängigkeit der Bebrütungszeit der Proben dargestellt. Im Bild B sind die Ergebnisse der Pyrosequenzierung (SNP 1-6 der Region 1) zu sehen.

10.1.6 Analysedaten der Kombinationstherapie

Tabelle 19: Analysenergebnisse der Synergietestungen. Die fettgedruckten FICI-Werte zeigen synergistische Wirkung der Antibiotika an. nm = nicht messbar; :: = Sequenzzerstörung durch Insertion eines IS-Elementes; Del = Deletion; Ins= Insertion; Sub = Substitution; *=nicht funktionales Gen

Stamm	MHK _{MEM} in mg/l	MHK _{TG} c in mg/l	MHK _{CST} in mg/l	β-Lactamasen	Porin- eigenschaften	Influx ΔF _{max}	Efflux t _½ in s±σ	FICI MEM/TGC±σ	FICI MEM/CST±σ	FICI TCG/CST±σ	FICI MEM/TGC/CST±σ
RKI 536/13	48	4	16	KPC-2, SHV-11, TEM-1, VEB, OXA-10, OXA- 9*	OmpK35 (Stop), OmpK36 (Leseraterschi- ebung)	2150	70,4±4,0	0,74±0,25	0,56±0,19	0,56±0,28	0,4±0,12
NRZ 00246	64	8	16	OXA-48, CTX- M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	OmpK36 (Stop)	8380	49,5±2,0	0,75±0,18	0,59±0,33	0,63±0,35	0,4±0,15
RKI 178 /11	8	4	16	CTX-M-15, TEM-1, SHV-11	OmpK36 (Stop)	3200	86,0±1,1	1,03±0,13	0,64±0,25	0,55±0,28	0,61±0,2
NRZ 04322	64	4	64	KPC-3, OXA-9*, TEM-1, SHV-11	OmpK35 (Stop), OmpK36 (2 AS Ins)	2420	59,0±7,9	1,02±0,29	0,79±0,25	0,56±0,35	0,69±0,33
RKI 84/14	32	4	32	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	OmpK35 (Stop), OmpK36:: <i>IS5</i> - ähnliche	5650	71,3±8,2	1,03±0,21	0,66±0,43	0,53±0,29	0,66±0,37
RKI 551/13	96	2	8	KPC-3, TEM-1, SHV-11, OXA-9*	OmpK35 (Stop), OmpK36 (2 AS Ins)	2015	62,6±3,6	1,13±0,15	1,33±0,3	0,53±0,23	0,81±0,36
RKI 85/14	16	1	2	KPC-2, OXA-9*, TEM-1, SHV-12	OmpK35 (Stop)	2830	68,3±9,6	1,13±0,28	0,65±0,3	1,02±0,32	1,04±0,32
NRZ 08996	16	1	16	KPC-2, CTX-M- 15, OXA-1, OXA-9*, TEM-1, SHV-1	OmpK36 (1 AS Ins, 3 AS Del, verschiede AS Sub)	2390	73,3±16, 3	1,06 ±0,5	1,13±0,72	1,0±0,23	0,88±0,68

NRZ 01732a	256	1	16	SHV-11, VIM-1	OmpK35 (Stop), OmpK36 (1 AS Sub)	4015	101,6±4, 9	1,01±0,27	1,0±0,19	1,03±0,22	0,94±0,25
NRZ 01839	16	1	8	OXA-48, CTX- M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	OmpK35 (Stop), OmpK36 (3 AS Ins, 3 AS Del, verschiedene AS Sub)	2875	66,3±6,3	1,13±0,22	1,03±0,46	0,88±0,26	1,0±0,39
NRZ 02915	32	1	16	OXA-48, CTX- M-15, OXA-9, OXA-1, TEM-1, SHV-1	OmpK35 (Stop), OmpK36 (3 AS Ins, 3 AS Del, verschiedene AS Sub)	4885	48,6±1,3	1,13±0,2	1,1±0,43	1,06±0,25	1,13±0,37
RKI 318 /11	32	1	2	KPC-2, TEM-1, SHV-11, OXA-9*	OmpK35 (Stop)	1185	78,6±3.1	1.1±0.21	1.01±0.18	1.09±0.09	1.13±0.21
RKI 346/12	32	2	2	OXA-48, CTX- M-15, OXA-9, OXA-1, TEM-1, SHV-1	OmpK35 (Stop), OmpK36 (3 AS Ins, 3 AS Del, verschiedene AS Sub)	1980	106,0±1, 4	1,12±0,21	0,92±0,21	0,88±0,25	1,13±0,4
RKI 83/14	4	1	1	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1, SHV-1	OmpK35 (Stop), OmpK36::IS5- ähnliche	2500	88,5±15, 0	1,1±0,18	1,06±0,17	1,06±0,18	1,14±0,26
RKI 105 /10	4	4	1	CTX-M-15, TEM-1, SHV-11	OmpK35 (Stop), OmpK36 (Stop)	4220	71,0±1,3	1,04±0,1	1,04±0,15	1,13±0,15	1,14±0,19
NRZ 06142	64	1	16	KPC-2, VIM-1, TEM-1, SHV-11, OXA-9*	OmpK35 (Stop), OmpK36 (Leserasterverschi ebung)	5170	57,6±10, 1	1,04±0,15	1,0±0,31	1,09±0,27	1,16±0,31
NRZ 03656	32	0,5	16	OXA-48, CTX- M-15, OXA-9, OXA-1, SHV-1, TEM-1	OmpK35 (Stop), OmpK36 (3 AS Ins, Del, verschiedene AS	9665	53,9±3,0	1,13±0,21	1,02±0,41	1,13±0,19	1,19±0,28

Sub)												
RKI 412 /11	256	1	1	KPC-3, TEM-1, SHV-11, OXA-9*	OmpK35 (Stop), OmpK36 (2 AS Ins, 1 AS Sub)	nm	nm	1,11±0,2	1,02±0,26	1,13±0,31	1,2±0,29	
RKI 60/11	4	1	0.5	CTX-M-15, TEM-1, SHV-11	OmpK35:: <i>IS3-IS911</i> -ähnliche	1565	72,9±12,3	1,12±0,16	1,03 ±0,15	1,25±0,28	1,29±0,17	
NRZ 05989	48	0,5	1	KPC-2, SHV-1, SHV-12	OmpK35 (Stop)	935	59,7±4,9	1,14±0,23	1,15±0,16	1,25±0,18	1,3±0,26	

Tabelle 20: Weitere AS Substitutionen in den ompK36 Genvarianten. Als Referenzgen wurde *ompK36* von *K. pneumoniae* Stamm JM45 (Zugangsnummer CP006656) verwendet.

Stamm	Val180 Pro	Asn191 Arg	Tyr203 Phe	Tyr212 Trp	Asn223 His	Leu227 Thr	Gly228 Asp	Asp229 Glu	Asp230 Glu	Lys233 Val	Leu234 Pro	Thr260 Ser
Chemische Eigenschaften	unpolar > unpolar	polar > basisch	polar > unpolar	polar > unpolar	polar > basisch	unpolar > > polar	polar > sauer	sauer > sauer	sauer > sauer	basic > nonpolar	nonpolar > nonpolar	polar > polar
RKI 318/11												
RKI 412/11		+										
RKI 178/11	+											
RKI 60/11												
RKI 105/10			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RKI 83/14												
RKI 84/14												
RKI 85/14												
RKI 346/12			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RKI 536/13	+											
RKI 551/13												
NRZ 00246			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NRZ 01732a	+											
NRZ 01839			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NRZ 03656			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NRZ 04322												
NRZ 06142	+											

NRZ 08996	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NRZ 02915	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NRZ 05989											

Tabelle 21: Statistische Analyse der Ergebnisse der Kombinationstherapie. Die statistische Analyse wurde für den Median der bestimmten FICIs und für den niedrigsten FICI der jeweiligen Testung angefertigt. KI = Konfidenzintervall

	FICI _{MEM/TGC}		FICI _{MEM/CST}		FICI _{TGC/CST}		FICI _{MEM/TGC/CST}	
	Median	Niedrigster Wert	Median	Niedrigster Wert	Median	Niedrigster Wert	Median	Niedrigster Wert
MHK _{MEM} [p (95% KI; p Wert)]	-0,17 (-0,57 bis 0,30; 0,473)	-0,39 (-0,71 bis 0,07; 0,086)	-0,13 (-0,54 bis 0,33; 0,580)	0,06 (-0,39 bis 0,49; 0,804)	-0,20 (-0,59 bis 0,27; 0,393)	-0,20 (-0,59 bis 0,27; 0,395)	-0,22 (-0,60 bis 0,25; 0,350)	-0,34 (-0,67 bis 0,13; 0,149)
MHK _{TGC} [p (95% KI; p Wert)]	-0,70 (-0,87 bis -0,36; <0,001)	-0,56 (-0,80 bis -0,15; 0,008)	-0,54 (-0,79 bis -0,12; 0,012)	-0,44 (-0,73 bis 0,01; 0,051)	-0,70 (-0,87 bis -0,36; <0,001)	-0,63 (-0,83 bis -0,25; 0,002)	-0,73 (-0,88 bis -0,41; <0,001)	-0,69 (-0,86 bis -0,34; 0,001)
MHK _{CST} [p (95% KI; p Wert)]	-0,45 (-0,74 bis 0,00; 0,045)	-0,69 (-0,86 bis -0,34; 0,001)	-0,42 (-0,72 bis 0,04; 0,067)	-0,40 (-0,71 bis 0,06; 0,083)	-0,52 (-0,78 bis -0,09; 0,017)	-0,48 (-0,75 bis -0,03; 0,032)	-0,61 (-0,82 bis -0,22; 0,003)	-0,61 (-0,82 bis -0,21; 0,004)
Influx [p (95% KI; p Wert)]	-0,27 (-0,64 bis 0,22; 0,267)	-0,37 (-0,70 bis 0,12; 0,124)	-0,36 (-0,69 bis 0,13; 0,137)	-0,49 (-0,76 bis -0,03; 0,034)	-0,11 (-0,53 bis 0,37; 0,661)	-0,19 (-0,59 bis 0,29; 0,435)	-0,17 (-0,58 bis 0,31; 0,494)	-0,15 (-0,56 bis 0,33; 0,548)
Efflux [p (95% KI; p Wert)]	-0,19 (-0,59 bis 0,29; 0,436)	0,02 (-0,44 bis 0,47; 0,952)	0,08 (-0,39 bis 0,51; 0,757)	0,19 (-0,29 bis 0,59; 0,442)	-0,08 (-0,51 bis 0,39; 0,754)	0,06 (-0,41 bis 0,50; 0,808)	-0,01 (-0,46 bis 0,45; 0,972)	0,04 (-0,43 bis 0,48; 0,886)
KPC [Medianabweichung (95% KI; p Wert)]	0,00 (-0,06 bis 0,09; 0,512)	-0,01 (-0,25 bis 0,22; 0,694)	0,02 (-0,08 bis 0,32; 0,724)	0,04 (-0,12 bis 0,30; 0,403)	0,01 (-0,19 bis 0,25; 0,866)	0,04 (-0,25 bis 0,31; 0,539)	0,00 (-0,26 bis 0,22; 1,00)	-0,03 (-0,27 bis 0,22; 0,896)
OXA-48 [Medianabweichung (95% KI; p Wert)]	0,02 (-0,02 bis 0,09; 0,237)	0,06 (-0,01 bis 0,44; 0,156)	-0,03 (-0,23 bis 0,27; 0,454)	-0,14 (-0,40 bis 0,03; 0,123)	-0,03 (-0,38 bis 0,33; 0,884)	-0,01 (-0,38 bis 0,25; 0,884)	0,00 (-0,22 bis 0,39; 0,986)	-0,01 (-0,26 bis 0,29; 0,946)

VIM-1 [Medianabweichung (95% KI; p Wert)]	-0,08 (-0,14 bis 0,27; 0,300)	-0,34 (-0,70 bis 0,14; 0,095)	-0,01 (-0,15 bis 0,38; 0,763)	-0,02 (-0,49 bis 0,28; 0,868)	0,06 (-0,22 bis 0,55; 0,605)	0,16 (-0,50 bis 0,50; 0,700)	0,02 (-0,27 bis 0,54; 0,747)	0,00 (-0,29 bis 0,34; 0,937)
CTX-M-15 [Medianabweichung (95% KI; p Wert)]	0,01 (-0,07 bis 0,12; 0,864)	0,01 (-0,14 bis 0,34; 0,315)	0,00 (-0,29 bis 0,17; 0,956)	-0,04 (-0,28 bis 0,16; 0,502)	-0,02 (-0,25 bis 0,31; 0,854)	-0,02 (-0,38 bis 0,25; 0,852)	-0,01 (-0,26 bis 0,25; 0,97)	0,06 (-0,19 bis 0,30; 0,539)
<i>ompK35</i> Stop [Medianabweichung (95% KI; p Wert)]	0,08 (-0,03 bis 0,38; 0,118)	0,23 (-0,22 bis 0,44; 0,192)	0,24 (-0,12 bis 0,42; 0,406)	0,16 (-0,22 bis 0,44; 0,296)	0,25 (-0,09 bis 0,55; 0,167)	0,19 (-0,12 bis 0,69; 0,347)	0,40 (0,01 bis 0,73; 0,039)	0,19 (-0,10 bis 0,46; 0,365)
<i>ompK36</i> Stop [Medianabweichung (95% KI; p Wert)]	-0,09 (-0,32 bis -0,02; 0,004)	-0,22 (-0,44 bis 0,00; 0,045)	-0,27 (-0,41 bis 0,03; 0,100)	-0,15 (-0,33 bis 0,08; 0,101)	-0,19 (-0,50 bis 0,06; 0,266)	-0,11 (-0,34 bis 0,22; 0,547)	-0,24 (-0,60 bis 0,02; 0,176)	-0,2 (-0,37 bis 0,06; 0,341)

10.2 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Pletz und Frau Dr. Makarewicz für das Vertrauen und Überlassen des hochinteressanten Themas herzlich bedanken. Während meiner gesamten Promotionszeit haben sie mir kompetent zur Seite gestanden und mir stets die Freiheit gewährt eigene Ideen umzusetzen. Die unkomplizierte Zusammenarbeit hat wesentlich zum Gelingen des Forschungsprojektes beigetragen. Die professionelle Betreuung und Hilfe hat mich in vielen Angelegenheiten vorangebracht.

Herrn Prof. Wöstemeyer möchte ich für die hilfreichen Ratschläge bei der Erstellung der Arbeit und die ermutigende Unterstützung danken.

Für die unermüdliche und professionelle Einführung in die molekularbiologischen Arbeiten danke ich Markus Hildner. Mit sehr großem Engagement hat er geholfen anfängliche molekularbiologische Probleme zu meistern.

Großer Dank gebührt meinen Mitdoktoranden sowie den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen meiner Arbeitsgruppe für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit. Jederzeit wurden wissenschaftliche Problemstellungen diskutiert und Hilfestellungen angeboten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie insbesondere meinen Eltern, die mir meine Ausbildung und das Studium ermöglichten und mich auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der β -Lactamasen.....	9
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	18
Tabelle 3: Eingesetzte Nährmedien.....	20
Tabelle 4: Verwendete Antibiotika.....	20
Tabelle 5: Eingesetzte Kits.....	21
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide.....	21
Tabelle 7: Materialien für den Ansatz der RT, PCR und Pyrosequenzierung.....	23
Tabelle 8: Spezielle Chemikalien/Lösungen und Puffer.....	24
Tabelle 9: Weitere Materialien.....	25
Tabelle 10: Verwendete Geräte.....	25
Tabelle 11: Verwendete Computerprogramme.....	27
Tabelle 12: Vergleich der Tempus RNA Isolation und der Trizol-Chloroform-Säulen- Methode für positive Blutkulturen. n.d. = nicht detektierbar.....	49
Tabelle 13: Bestimmung der Nachweisgrenze bei der Isolation der RNA aus der Blutkultur.	50
Tabelle 14: Vergleich der Enzyme Sensiscript und SuperScript.....	53
Tabelle 15: Bestimmung der Nachweisgrenze des Detektionssystems direkt aus EDTA-Blut.	55
Tabelle 16: Analyse der Sequenzregion 1.....	80
Tabelle 17: Analyse der Sequenzregion 2.....	81
Tabelle 18: Analyse der Region 1 in Anwesenheit von nicht CTX-M β -Lactamasen.....	82
Tabelle 19: Analysenergebnisse der Synergietestungen.....	84
Tabelle 20: Weitere AS Substitutionen in den ompK36 Genvarianten.....	87
Tabelle 21: Statistische Analyse der Ergebnisse der Kombinationstherapie.....	89

10.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf der Sterblichkeitsrate assoziiert mit Infektionskrankheiten im Zeitraum von 1910-1987 (Grafik nach (Ball 2007)).	5
Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der β -Lactamasen.	8
Abbildung 3: Entwicklung des Forschungsinteresses zwischen 1950 und 2014.	11
Abbildung 4: Darstellung der Resistenzentwicklung.	12
Abbildung 5: Bakterielle Angriffspunkte einer Kombinationstherapie mit Meropenem, Colistin und Tigecyclin.	16
Abbildung 6: Dreidimensionaler Ansatz der Mikrodilutionsmethode zur Empfindlichkeitsprüfung.	29
Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Efflux-Messung.	32
Abbildung 8: Alignment einzelner Vertreter der CTX-M Hauptgruppen (nach IUPAC Kode).	43
Abbildung 9: PCR Produkte verschiedener β -Lactamasen.	44
Abbildung 10: PCR-Produkte gemischter β -Lactamaseproben.	45
Abbildung 11: Auswertung der Pyrosequenzierung der Region 1.	47
Abbildung 12: Vergleich der Pyrogramme von CTX-M-1 und CTX-M-15.	48
Abbildung 13: Arbeitsablauf basierend auf der Isolation von RNA aus einer positiven Blutkultur.	51
Abbildung 14: Vergleich der unterschiedlichen Elutionsvolumina im Bereich der Nachweisgrenze (10^3 KBE/ml).	52
Abbildung 15: Optimierung der Reversen Transkription.	53
Abbildung 16: Nachweisgrenze der RNA-basierten RT-PCR-Pyrosequenzierungsmethode.	54
Abbildung 17: Übersicht zur Nachweismethode der CTX-M Gene direkt aus Vollblutproben.	56
Abbildung 18: Alignment der OmpK36 Sequenzen.	58
Abbildung 19: Darstellung der Influx- und Efflux-Eigenschaften der Meropenem-sensiblen und Meropenem-resistenten <i>K. pneumoniae</i> Stämme.	59
Abbildung 20: Isobolen für die 2-fach Kombinationen.	61
Abbildung 21: Auswertung der 2-fach Kombinationen innerhalb der gemessenen Konzentrationsbereiche.	62
Abbildung 22: Blättchendiffusionstest einzelner <i>K. pneumoniae</i> Stämme.	63
Abbildung 23: Stellenwert diagnostischer Nachweismethoden bei der Eindämmung und Kontrolle der zunehmenden Resistenzentwicklung.	70
Abbildung 24: Phylogenetischer Stammbaum der β -Lactamase-Gruppe CTX-M.	77
Abbildung 25: Sequenzvergleich und die phylogenetische Divergenz der CTX-M β -Lactamasen an Position 240.	77
Abbildung 26: DNA-Größenstandards.	78
Abbildung 27: pCTX-M-15.	78
Abbildung 28: Nachweis der Spezifität der Reaktion unter Verwendung des CTX-M-15 Standards.	79
Abbildung 29: Überprüfung von DNA-Kontaminationen der RNA-Proben.	79
Abbildung 30: Bebrütung der Blutkultur.	83

10.5 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Claudia Stein

Geburtsdatum: 14.10.1986
 Geburtsort: Zwickau
 Adresse: Forstweg 22
 07745 Jena, Deutschland
 Telefon: Tel.: +49 176 80518422
 E-mail: claudia.stein@med.uni-jena.de

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Juni 2013 9th Postgraduate Workshop ESCMID: Mechanism of Antimicrobial Resistance: A practical Approach
 23. - 28. Juni 2013, Palma de Mallorca, Spanien

Seit 2011 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Zentrum für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Jena

August 2008 Fresenius Hochschule, Zwickau, Deutschland
 bis April 2011 Studiengang: Chemie Ingenieurwesen
 Abschluss: Diplom Chemie Ingenieur, Abschlussnote: 1,7

September 2005 IFBE Bildungszentrum Zwickau, Deutschland
 bis Juli 2008 Abschluss: Veterinärmedizinisch-technische Assistentin,
 Abschlussnote: 2

September 1997 Gymnasium „Am Sandberg“, Wilkau-Haßlau, Deutschland
 bis Juli 2005 Anschluss: Allgemeine Hochschulreife, Abschlussnote: 2,3

FÖRDERUNGEN

Stipendium 2011 Stipendium der Argus Stiftung in einer Höhe von 5000 Euro

ProChance 2013 Programm zur Förderung der Chancengleichheit von Frau und Mann in der Wissenschaft (Friedrich-Schiller-Universität Jena) in einer Höhe von 1000 Euro

ECCMID 2013 Reiseunterstützung im Wert von 500 Euro von der ESCMID

POSTER-PRÄSENTATIONEN

Stein C, Makarewicz O, Pletz M W. 2012. Phylogenetic analysis of β -Lactamases [Poster]. Tübingen (Deutschland): Jahrestagung der VAAM

Stein C, Brandt C, Klinger M, Makarewicz O, Pletz M W. 2013. m-RNA basierte Differenzierung von β -Lactamasen aus Patientenmaterial [Poster]. Bad Honnef Symposium (Deutschland): Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft.

Stein C, Brandt C, Makarewicz O, Pletz M W. 2013. A fast and highly discriminative method to identify individual CTX-M groups in whole blood samples [Poster]. Berlin (Deutschland): Jahrestagung der ESCMID

Stein C, Brandt C, Makarewicz O, Pletz M W. 2013. A fast and highly discriminative method to identify individual CTX-M groups in whole blood samples [Poster]. Rostock (Deutschland): Jahrestagung der DGHM

Stein C, Makarewicz O, Pletz M W. 2014. *In vitro* testing for synergism of antibiotic triple combination against multi-resistant Gram-negative pathogens [Poster]. Barcelona (Spanien): Jahrestagung der ESCMID.

Stein C, Makarewicz O, Pletz M W. 2014. *In vitro* testing for synergism of antibiotic triple combination against multi-resistant Gram-negative pathogens [Poster]. Dresden (Deutschland): Jahrestagung der DGHM/VAAM

Stein C, Makarewicz O, Pletz M W. 2015. Synergy analysis of triple antibiotic combination (MEM, TGC and CST) against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates [ePoster]. Kopenhagen (Dänemark): Jahrestagung der ESCMID

VERÖFFENTLICHUNGEN

Stein C, Makarewicz O, Pfeifer Y, Brandt C, Ramos JC, Klinger M, Pletz MW. 2013. Direct RNA-based detection and differentiation of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). PLoS One, 8 (11):e80079.

Lubbert C, Straube L, **Stein C**, Makarewicz O, Schubert S, Mossner J, Pletz MW, Rodloff AC. 2015. Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany. Int J Med Microbiol, 305 (1):148-156.

Brandt C, Makarewicz O, Fischer T, **Stein C**, Pfeifer Y, Werner G, Pletz MW. 2014. The bigger picture: the history of antibiotics and antimicrobial resistance displayed by scientometric data. Int J Antimicrob Agents, 44 (5):424-430.

Stein C, Makarewicz O, Pfeifer Y, Brandt C, Pletz MW. 2015. Direct RNA-based detection of CTX-M beta-lactamases in human blood samples. Int J Med Microbiol, 305 (3):370-377.

Ramos C J, **Stein C**, Pfeifer Y, Brandt C, Pletz MW, Makarewicz O. 2015. Mutagenesis of the CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- Is MIC guided treatment according to the novel EUCAST recommendations a safe approach? Journal of Antimicrobial Chemotherapy (Akzeptiert). Geteilte Erstautorenschaft

Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, Pfeifer Y, Kesselmeier M, Hagel S, Pletz MW. 2015. Three dimensional checkerboard synergy analysis of colistin, meropenem, tigecycline against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. PLoS One, (Akzeptiert).

Makarewicz O, **Stein C**, Pfister W, Löffler B, Pletz MW. 2015. Identification Methods – An Overview. In: Modern Techniques for Pathogen Detection. Hrsg. Popp J, Bauer M. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 19-50.

Stein C, Makarewicz O, Forstner C, Weis S, Hagel S, Löffler B, Pletz MW. 2015. Daptomycin/rifampin combination against MRSA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (im Gutachterprozess).

10.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskript unterstützt haben: Dr. rer. nat. Oliwia Makarewicz (Jena), Prof. Dr. med. Mathias W. Pletz (Jena) und Prof. Dr. rer. nat. Johannes Wöstemeyer (Jena),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers