

Epidemiologische und diagnostische Bedeutung  
der genetischen Plastizität und Variabilität der  $\beta$ -Lactamasen

vorgelegt am 13.07.2021

an der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dr. rer. nat. Oliwia Makarewicz  
geboren in Schwerin

Gutachter der Habilitationsschrift:

1: Prof.Dr. Mathias Pletz

2: Prof. Dr. Marie von Lilienfeld-Toal

3: .Prof. Dr. Simone Scheithauer

Erteilung der Lehrbefähigung am: 08.12.2022

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis .....	3
Tabellenverzeichnis .....	4
Abkürzungsverzeichnis .....	5
Verzeichnis eigener Publikationen, auf denen die vorliegende Arbeit beruht.....	7
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen.....	8
1.2 Historischer Rückblick und aktuelle Lage.....	8
1.3 Belastungen durch Resistenzen .....	11
1.4 $\beta$ -Lactamantibiotika und $\beta$ -Lactamasen .....	13
1.5 Diagnostik von Resistenzen.....	13
<b>2. Zielstellung.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und Einordnung in das wissenschaftliche Umfeld .....</b>	<b>17</b>
3.1 Lokale Epidemiologie und Risikofaktoren für Kolonisierung mit ESBL- und Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien.....	17
3.1.1 EPE-Kolonisierungsepidemiologie .....	18
3.1.2 EPE-Kolonisierungsrisiken.....	19
3.2 Phylogenetische <i>in-silico</i> -Analysen der bekannten $\beta$ -Lactamasen .....	20
3.2.1 Update der klassifizierten $\beta$ -Lactamasen .....	20
3.2.2 Das unbekannte $\beta$ -Lactamase-Resistom .....	22
3.2.3 Epidemiologische Schlussfolgerungen.....	24
3.3 Entwicklung von molekularen Methoden zur mRNA-basierten differenziellen Diagnostik von $\beta$ -Lactamasen.....	25
3.3.1 Nachweis der CTX-M Subgruppen mittels Pyrosequenzierung aus mRNA.....	26
3.3.2 Direkter, RNA-basierter Nachweis von CTX-M-BL in menschlichen Blutproben .....	28
3.3.3 Phylogenie-basierte magnetische Bead-Reinigung von OXA-mRNA .....	30
3.4 Phänotyp-Genotyp-Korrelation von $\beta$ -Lactamasen.....	33
3.4.1 Analyse der phänotypbestimmenden Mutationen in SHV- $\beta$ -Lactamasen.....	33
3.4.1.2 Mutanten-Bibliothek und Expressionsmodell.....	35
3.4.1.3 Substitutionen im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Cephalosporinen höherer Generation .....	37
3.4.1.4 Substitutionen im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber BLI .....	39
3.4.1.5 Einfluss der Expressionsstärke auf das Resistenzprofil .....	39
3.4.2 Veränderungen im Resistenzprofil bestimmter CTX-M-Varianten für Cephalosporine unter selektivem Druck.....	40
3.5 Mobile genetische Elemente und deren Bedeutung für die Verbreitung der $\beta$ -Lactamasen .....	42
3.5.1 Verbreitung der BL am Beispiel eines VIM-Integrans.....	42

3.5.2	Gentische Diversität der KPC-Plasmide.....	44
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>47</b>
4.1	Das One-Health-Konzept und die Rolle des horizontalen Gentransfers für die Verbreitung von $\beta$ -Lactamasen .....	47
4.2	Sekundäre Mechanismen der Resistenz und deren diagnostische und therapeutische Folgen .....	49
4.3	Molekulare Epidemiologie.....	50
4.4	mRNA-basierte holistische Diagnostikansätze.....	51
	Literaturverzeichnis .....	53
	Anhang .....	59
	Ehrenwörtliche Erklärung .....	61
	<i>Curriculum vitae</i> .....	63
	Originalarbeiten, auf denen die vorliegende Arbeit beruht.....	65

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Prozentualer Anteil der carbapenemresistenten invasiven Isolate für Infektionen mit den Spezies <i>K. pneumoniae</i> (A), <i>A. baumannii</i> (B) und <i>P. aeruginosa</i> (C) in Europa, 2018.....	11
Abbildung 2:	Darstellung der Verteilung der EPE-Befunde (A) und der identifizierten Spezies (B) über die verschiedenen Zeitpunkte der Probensammlung. ....	18
Abbildung 3:	A) SSN-Analyse und B) Clustal-Analyse basierend auf den klassifizierten 1 886 Aminosäuresequenzen. ....	21
Abbildung 4:	Alignment repräsentativer Allelvarianten für die fünf CTX-M-Gruppen. ....	27
Abbildung 5:	Sensitivitätsgrenzen des Ansatzes zum differenziellen Nachweis von CTX-M-Gruppen in der Amplifikation (A) und Pyrosequenzierung (B).....	29
Abbildung 6:	Darstellung der 21 OXA-Gruppen mit prozentualer Verteilung der Phänotypen der bekannten Allelvarianten .....	31
Abbildung 7:	Arbeitsablauf der OXA-Isolation mittels der Streptavidin-Dynabeads.....	32
Abbildung 8:	Mit OptiSLang ermittelte <i>CoP</i> -Werte für die PRAS-Positionen (Ambler-Nomenklatur) in SHV-Varianten für die spezifischen Phänotypen 2b, 2be und 2br. ....	35
Abbildung 9:	Veränderungen der MHK verschiedener $\beta$ -Lactamantibiotika und BLI der SHV-Substitutionsmutanten normiert auf die MHK-Werte der SHV-1 für Cephalosporine in Einzelmutanten (A) und Mehrfachmutanten (B) sowie für $\beta$ -Lactam/BLI-Kombinationen in Einzel- und Mehrfachmutanten mit A146V-Substitution (C) und weitere Mehrfachmutanten (D).....	37
Abbildung 10:	Prozentualer Anteil an resistenten Mutanten der Transkonjuganten-Kulturen mit CTX-M-1, die unter nichtselektiven (A) oder selektiven Bedingungen (B) $\frac{1}{2}$ MHK Ceftaxim und (C) $\frac{1}{2}$ MHK Ceftazidim kultiviert wurden. ....	41
Abbildung 11:	Schematische Genkarte des identifizierten Klasse-1-Integrans, bestehend aus den flankierenden iR-Sequenzen ( <i>inverted repeats</i> ), die als Erkennungsstellen für die transposase dienen, <i>intI1</i> (Integrase), der Metallo- $\beta$ -lactamase ( <i>bla<sub>VIM</sub></i> ), <i>aadA</i> (Aminoglycoside-Resistenz), <i>qacE<math>\Delta</math>sull</i> (Sulfonamid-Resistenz deletiert durch die Insertion des <i>qacE</i> Gens), <i>orf</i> (unbekanntes Leseraster) und vier Modulgene für die Transposition.....	43
Abbildung 12:	Heatmap-Diagramm der genetischen Distanzen zwischen den 153 Plasmidgruppen.....	46
Abbildung 13:	Rekonstruktion eines möglichen Szenarios für die am UKJ stattgefundenen Ausbrüche und Befunde von Enterobakterien mit einer VIM-MBL basierend auf Genomsequenzierungsdaten.....	51
Abbildung 14:	Kristallstruktur (dargestellt als <i>Wireframe</i> -Grundgerüst) der SHV-1-BL mit Avibactam ( <i>ball-stick</i> Darstellung) im aktiven Zentrum [74].....	59

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Definition der 3MRGN und 4MRGN gemäß der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention .....	10
Tabelle 2:	Statistische Daten zu den Infektionsfällen und Todesfällen mit resistenten Bakterien in Europa und Europäischem Wirtschaftsraum im Jahr 2015 (nach Cassini <i>et al.</i> , 2019 [11]) .....	12
Tabelle 3:	Einfluss von demographischen Faktoren und medizinischen Interventionen auf die <i>de novo</i> ESBL-Kolonisation während des Krankenhausaufenthaltes bei T1. ....	19
Tabelle 4:	Verwendete $\beta$ -Lactamantibiotika und deren Zuordnung zu den verschiedenen Substanzklassen .....	36
Tabelle 5:	Übersicht zu kommerziellen Produkten für die molekulare Erreger- Diagnostik aus Vollblut .....	60

## Abkürzungsverzeichnis

(ohne Eigen- und Genbezeichnungen, oder IUAPC Abkürzungen)

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständige Bezeichnung</b>
1G, 2G, 3G. etc.	Erst-, Zweit, Drittgeneration, etc.
BL	$\beta$ -Lactamase(n)
BLI	$\beta$ -Lactamase Inhibitor
BMBF	Bundesministerium für Forschung und Bildung
CFU	<i>Colony-forming units</i> (koloniebildende Einheiten)
CoP	<i>Coefficient of prognosis</i>
CPE	Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien
CRE	Carbapenemresistente Enterobakterien
CRNF	Carbapenemresistente <i>Non-Fermenter</i>
DMG	Drittmittelgeber
EARS-Net	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPE	ESBL-produzierenden Enterobakterien
ESBL	<i>Extendent spectrum <math>\beta</math>-lactamasen</i>
EWR	Europäischem Wirtschaftsraum
FAS	Fettsäure-Synthase
FB	Forschungsbereich
FDA	U. S. Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKZ	Förderkennzeichen
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
IIMK	Institut für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene
Inc	Inkompatibilitätsgruppen bei Plasmiden
IPHT	Leibniz-Institut für Photonische Technologien
iR	<i>Inverted repeat</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LfL	Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft
LSPR	<i>Localized surface plasmon resosnance</i>
MBL	Metallo- $\beta$ -Lactamase(n)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRB	Multiresistenten Bakterien
MRGN	Multiresistente Gram-negative Bakterien, wobei 3MRGN und 4MRGN auf die Resistenz gegenüber 3 bzw. 4 der leitenden Antibiotika für die empirische Therapie bei Gramnegativen-Infektionen hinweist
MRSA	Methicillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>

---

NRPS	Peptidsynthasen
orf	<i>Open reading frame</i>
PBPs	Penicillin-Bindeprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKS	Polyketidsythesen
POC	<i>Point-of-care</i>
Ppi	Pyrophosphat
PRAS	Phänotyprelevante Aminosäure-Substitutionen
qPCR	Quantitative PCR
RR	Relatives Risiko
RT	Reverse Transkription
SLU	Schwedische Landwirtschaftsuniversität
SP	Signalpeptid
SSN	<i>Sequence Similarity Network</i>
TTR	<i>Time to result</i>
UKJ	Universitätsklinikum Jena
VRE	Vancomycinresistente Enterokokken
WHO	<i>World Health Organization</i>

---

## Verzeichnis eigener Publikationen, auf denen die vorliegende Arbeit beruht

(sortiert nach Erscheinungsdatum)

1. A genotype-phenotype correlation study of SHV  $\beta$ -lactamases-new insight into SHV resistance profiles. S Neubauer, S Madzgalla, M Marquet, A Klabunde, B Büttner, A Göhring, C Brandt, K-H Feller, MW Pletz, **O Makarewicz**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, V 64 (7): e02293-19.
2. Assessing genetic diversity and similarity of 435 KPC-carrying plasmids. C Brandt, A Viehweger, A Singh, MW Pletz, D Wibberg, J Kalinowski, S Lerch, B Müller, **O Makarewicz**. *Scientific reports*, 2019, V9(1): 1-8
3. ESBL colonization and acquisition in a hospital population: the molecular epidemiology and transmission of resistance genes. S Hagel, **O Makarewicz**<sup>a</sup>, A Hartung, D Weiß, C Stein, C Brandt, U Schumacher, R Ehricht, V Patchev, MW Pletz. *Plos one*, 2019, V14(1): e020850 •
4. A Nosocomial Foodborne Outbreak of a VIM Carbapenemase-Expressing *Citrobacter freundii*. MW Pletz, A Wollny, UH Dobermann, J Rödel, S Neubauer, C Stein, C Brandt, A Hartung, A Mellmann, S Trommer, B Edel, V Patchev, **O Makarewicz**, J Maschmann. *Clinical Infectious Diseases*, 2018, V 67 (1): 58-645
5. In silico serine  $\beta$ -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. C Brandt, SD Braun, C Stein, P Slickers, R Ehricht, MW Pletz, **O Makarewicz**. *Scientific Reports*, 2017, V7: 43232
6. Mutagenesis of the CTX-M-type ESBL—is MIC-guided treatment according to the new EUCAST recommendations a safe approach? JM Costa Ramos, C Stein, Y Pfeifer, C Brandt, MW Pletz, **O Makarewicz**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, V70 (9): 2528-2535
7. Development of a rapid diagnostic assay based on magnetic bead purification of OXA- $\beta$ -lactamase mRNA. C Brandt, E Zander, Y Pfeifer, SD Braun, R Ehricht, **O Makarewicz**<sup>b</sup>, MW Pletz. *Future Microbiology*, 2016, V11 (5), 617-629
8. Direct RNA-based detection of CTX-M  $\beta$ -lactamases in human blood samples. C Stein, **O Makarewicz**<sup>a</sup>, Y Pfeifer, C Brandt, MW Pletz. *International Journal of Medical Microbiology*, 2015, V 305 (3): 370-377
9. Direct RNA-based detection and differentiation of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL). C Stein, **O Makarewicz**<sup>a</sup>, Y Pfeifer, C Brandt, JC Ramos, M Klinger, MW Pletz. *PloS one*, 2013, V 8 (11): e80079

<sup>a</sup> Geteilte Erstautorenschaft

<sup>b</sup> Geteilte Seniorautorenschaft

# 1. Einleitung

## 1.1 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen

Die Sekretion antibiotisch wirksamer Verbindungen ist ein natürlicher und ‚uralter‘ Mechanismus von Bakterien und anderen Mikroorganismen, der die Besiedlung von Nischen durch die Verdrängung nährstoffkonkurrierender Organismen sichert. Ebenso so alt wie Antibiotika sind die Mechanismen, die der Resistenz zugrunde liegen. Üblicherweise besitzen die ‚Produzenten‘ selbst eine Resistenz gegen die Komponenten, die sie ausscheiden. Andere Organismen können sich durch verschiedene Prozesse, wie Mutationen oder horizontalen Genaustausch, die durch selektiven Druck begünstigt werden, anpassen und Resistenzen entwickeln oder diese erwerben.

Die meisten Antibiotika werden als Sekundärmetabolite gebildet und gehören damit nicht zu den essenziellen Stoffwechselprodukten. Oft sind die Gene, welche Proteine zur Herstellung von Antibiotika kodieren, in großen Genclustern organisiert, deren Produkte nicht-ribosomale Peptidsynthasen (NRPS) oder Polyketidsynthasen (PKS) hervorbringen. NRPS nutzen Aminosäuren für die Synthese, die PKS hingegen Acyl-Co-Precursor (ähnlich der Fettsäure-Synthase (FAS)) [1]. Das Grundgerüst dieser Moleküle wird in der Regel weiter modifiziert, z.B. durch Methylierung, Reduktion oder Oxidation, Epimerisierung, Zyklisierung oder Kopplung von Fettsäureresten. Die Modifikationsmodule sind meist Bestandteil der Operons. Diese modular aufgebauten, hochkomplexen Enzyme sind für die Synthese zahlreicher, in der Medizin bekannter Antibiotikaklassen verantwortlich: Vancomycin, Daptomycin, Bleomycin, Polymyxine oder  $\beta$ -Lactam-Präkursor sind Produkte von NRPS; Makrolide, Rifamycine, oder Tetracycline sind Produkte der PKS. Diese werden von Umweltkeimen abgegeben und erzeugen einen selektiven Druck auf andere Mikroorganismen, die sich diesem durch Entstehung von Resistenzmechanismen entziehen können. Die hohe Vielfalt der Mikroorganismen, kombiniert mit kurzen Generationszeiten, hohen Zelldichten und horizontalem Gentransfer, ermöglicht eine rasche Akkumulation von Resistenzmechanismen in einem relativ hohen evolutionären Tempo. Dabei ist Fitnessverlust nicht immer die Folge von Resistenzerwerb [2, 3]. In Umweltbakterien bleiben die Resistenzen meist unbemerkt, bis diese oder die Resistenzen medizinisches Interesse erlangen.

## 1.2 Historischer Rückblick und aktuelle Lage

Kurz nach der Einführung des Penicillins zur Behandlung der Syphilis (verursacht durch *Treponema pallidum*) von Wehrpflichtigen in 1940 und noch vor dessen industrieller Produktion und Einsatz im zivilen Sektor (1944) wurde der erste Penicillin-abbauende *Escherichia coli* entdeckt [4]. Durch den breiten Einsatz von Penicillinen seit ca. 1944 verging bis in die 1960er Jahre nur wenig Zeit bis mehr als 80 % der ambulanten und nosokomialen

Infektionen durch Penicillin-resistente *Staphylococcus aureus* verursacht wurden [5]. Erste penicillinresistente Isolate von *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria gonorrhoeae* wurden 1967 [6] bzw. 1979 [7] berichtet. Ähnlich erging es allen anderen darauffolgend zugelassenen Antibiotika.

In den 1950er Jahren wurden zum ersten Mal multiresistente *Shigella dysenteriae* [8] (1955 in Japan) und *Salmonella thyphimurium* [9] (1959 in UK) Stämme identifiziert. Für diese wurde Anfang der 1960er Jahre gezeigt, dass Antibiotikaresistenzen über Zell-Zell-Kontakt (später als Konjugation bezeichnet) zwischen den Stämmen ausgetauscht werden können [10]. Hier wurde dann die Bezeichnung R-Faktor (R für Resistenz) geprägt, was heute als R-Plasmid bekannt ist.

Während der ‚goldenen Jahre‘ zwischen 1950 und 1972 wurden die meisten der heute bekannten Antibiotikaklassen entdeckt. Durch die schon damals steigenden Resistenzraten wurden bereits zahlreiche dieser Klassen, wie die Penicilline, chemisch/synthetisch modifiziert und derivatisiert (z.B. zu Cephalosporinen), um die Wirksamkeit wiederherzustellen. Die Möglichkeiten, neue, besser wirksame Antiinfektiva zu produzieren, stimmte euphorisch, gab es doch zu dem Zeitpunkt 23 unterschiedliche antimikrobielle Substanzklassen, deren zahlreiche Derivate als Präparate auf dem Markt bereits zugelassen waren oder deren Vermarktung zu erwarten war. Das hat 1972 den Sanitätsinspekteur der Vereinigten Staaten, Sir Jesse Leonard Steinfeld, dazu veranlasst, optimistisch zu behaupten, die Ära der Infektionskrankheiten sei endgültig beendet. Daraufhin hat sich die Pharmaindustrie langsam und im Verlauf nahezu vollständig aus der teuren und langwierigen Antibiotikaentwicklung zurückgezogen. Die Entdeckung der Lipopeptidantibiotika-Klasse im Jahr 1987 markiert den Beginn des sogenannten *discovery void* (auch bekannt als die *lean years*), ein Zeitraum von mehr als 20 Jahren, in denen kaum neue Substanzen entdeckt wurden. Während dieser Zeit wurden vor allem Derivate bereits zugelassener Cephalosporine und Fluorchinolone auf den Markt gebracht. Zur selben Zeit nahmen die nosokomialen Infektionen vor allem mit MRSA in vielen Industrieländern deutlich zu und wurden weltweit zum Problem.

Waren in den 1980-1990er Jahren die MRSA ein zentrales klinisches Problem, so hat sich die Lage in den letzten 20 Jahren in Richtung der gramnegativen Bakterien verschoben. Da der natürliche Lebensraum von Staphylokokken die Haut- und Schleimhautflora sind, konnte mit gezielten Patientenscreenings und strikten Hygienemaßnahmen die Zahl der Neuinfektionen mit MRSA im letzten Jahrzehnt stabilisiert werden; in Deutschland und anderen europäischen Ländern sind die Zahlen sogar rückläufig (laut dem *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Surveillance Atlas*<sup>°</sup>). Zeitgleich stieg die Anzahl der Infektionen mit gramnegativen Erregern, die gegen die empirisch empfohlenen  $\beta$ -

<sup>°</sup> <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>

Lactame mit erweitertem Wirkungsspektrum (Cephalosporine und  $\beta$ -Lactamaseinhibitoren (BLI)) Resistenzen entwickelten. Der Mechanismus hierbei geht auf die sogenannten  $\beta$ -Lactamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (*extended spectrum  $\beta$ -lactamasen* = ESBL) zurück (Details in Kapitel 1.4).

Die Zahl von nosokomialen Infektionen mit ESBL-produzierenden *E. coli* hat sich allein in Deutschland binnen 10 Jahren von 2001 (0,7 %) bis 2010 (8,4 %) und 2018 (12,5 %) deutlich erhöht. Seit ca. 2005 stellen jedoch Infektionen mit multiresistenten *K. pneumoniae* zunehmend ein Problem dar, da diese neben dem ESBL-Phänotyp häufig auch eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen tragen, was in Deutschland und Österreich als 3MRGN-Phänotyp bezeichnet wird (Tabelle 1). Vor allem in ost- und südeuropäischen Ländern liegen die Raten von nosokomialen Infektionen mit 3MRGN-*K. pneumoniae* häufig bei mehr als 30 %. Dies führte zu verstärktem Einsatz von Reserve- $\beta$ -Lactamen, den Carbapenemen, und damit zu steigenden Infektionsraten mit carbapenemresistenten, gramnegativen Bakterien.

Tabelle 1: Definition der 3MRGN und 4MRGN gemäß der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention

Antibiotikagruppe	Leitsubstanz	Enterobakterien		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>	
		3MRGN	4MRGN	3MRGN	4MRGN	3MRGN	4MRGN
Acylureidopenicilline	Piperacilin	R	R	Nur eine der 4 Antibiotikagruppen wirksam (S)	R	R	R
3./4.Generation Cephalosporine	Cefotaxim und/oder Ceftazidim	R	R		R	R	R
Carbapeneme	Imipenem und/oder Meropenem	S	R		R	R	R
Flurochinolone	Ciprofloxacin	R	R		R	R	R

R = resistent, S = sensibel entsprechend den aktuellen EUCAST<sup>d</sup> Breakpoints.

Derzeit liegen die nosokomialen Infektionsraten mit carbapenemresistenten *K. pneumoniae* in einigen südeuropäischen Ländern bereits über 25 %, mit Griechenland (63,9 % im Jahr 2018) an der Spitze (Abbildung 1). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat daher in ihrer letzten Prioritätsliste<sup>e</sup> (erscheinen im Jahr 2017) carbapenemresistente *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie Vertreter der Enterobakterien, die gegenüber Carbapenem und/oder Drittgeneration-Cephalosporinen (3G) resistent sind, in die ‚kritische‘ Kategorie eingestuft. Diese Liste sollte Regierungen dazu anhalten, über politische Maßnahmen Förderanreize für die Grundlagenforschung und Forschungs- und Entwicklungsprojekte (F&E) anzuregen, um nicht nur die Entwicklung neuer Antiinfektiva, sondern auch die Vorbeugung von Infektionen, z.B. durch rationalen Einsatz vorhandener Antibiotika bei Mensch und Tier und die Entwicklung besserer Diagnostika, voranzutreiben.

<sup>d</sup> [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)

<sup>e</sup> <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

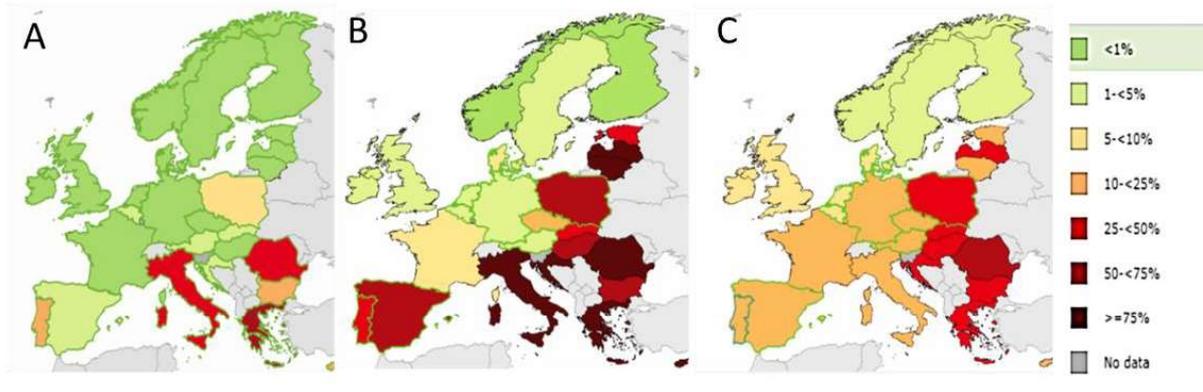


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der carbapenemresistenten invasiven Isolate für Infektionen mit den Spezies *K. pneumoniae* (A), *A. baumannii* (B) und *P. aeruginosa* (C) in Europa, 2018.

Quelle: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>

### 1.3 Belastungen durch Resistenzen

Infektionen mit multiresistenten Bakterien (MRB) sind ein generelles, globales und zunehmendes Problem. Zwischen 2007 und 2015 hat sich die Fallzahl von Infektionen mit MRB verdreifacht. Dabei ist die Zahl der Todesfälle verursacht durch Infektionen mit ESBL-Bildnern stark gestiegen: um die Faktoren 4,79 für *E. coli*, 6,16 für *K. pneumoniae* und 3,29 für *P. aeruginosa* (*Acinetobacter spp.* wurde 2007 nicht erfasst). Für die Jahre 2015 bis 2020 liegen noch keine so umfassenden Studien vor. Ausgehend von den epidemiologischen Daten der ECDC scheint sich der Trend jedoch fortzusetzen.

Einer 2019 veröffentlichten Studie zufolge, die Statistiken basierend auf den EARS-Net-Daten zu den Infektionsfällen für Europa und den Europäischen Wirtschaftsraum (EWR) erstellt hat (Tabelle 2), verursachten resistente Bakterien ca. 671 689 Infektionen mit ca. 33 110 Todesfällen im Jahr 2015 [11]. Das entspricht einer Sterblichkeitsrate von ca. 5 %. Insgesamt konnten 75 % aller Infektionen und 74 % aller infektionsbedingten Todesfälle auf multiresistente, gramnegative Bakterien (MRGN) zurückgeführt werden. Davon waren 63,5 % (ca. 426 277) der Infektionen auf einen nosokomialen Ursprung zurückzuführen. Allein die Enterobakterien (*E. coli* und *K. pneumoniae*) mit Resistenz gegenüber den 3G-Cephalosporinen, die zur empirischen Therapie empfohlen werden, waren für fast 54 % der Infektionen und 39 % der Todesfälle verantwortlich. Methicillinresistente *S. aureus* (MRSA) verursachten einen zwar noch immer großen, im Vergleich jedoch geringeren Schaden: 22 % der Infektionen und 21 % der Todesfälle.

Legt man die Daten der Studie von Cassini *et al.* [11] zugrunde und zieht basierend auf verschiedenen Studien einen durchschnittlichen Mehrkostenaufwand für Infektionen mit MRB hinzu [12], lässt sich abschätzen, dass jährlich Zusatzkosten von mind. 4 480 Milliarden € durch MRB für Europa und den EWR entstehen, wovon 63 % (2 833 Milliarden €) allein auf die MRGN zurückgehen.

Tabelle 2: Statistische Daten zu den Infektionsfällen und Todesfällen mit resistenten Bakterien in Europa und Europäischem Wirtschaftsraum im Jahr 2015 (nach Cassini *et al.*, 2019 [11])

Erreger	Median		Ø Mortalität <sup>2</sup>
	Infektionsfälle	Todesfälle	
3G-Cephalosporin-resistente <i>E. coli</i>	297 416 (44,3%)	9 066	3%
3G-Cephalosporin-resistente <i>K. pneumoniae</i>	68 588 (10,2%)	3 687	5%
Carbapenem-resistente <i>P. aeruginosa</i> <sup>1</sup>	61 892 (9,2%)	4 155	7%
Carbapenem-resistente <i>Acinetobacter spp</i> <sup>1</sup>	27 343 (4,1 %)	2 363	9%
Carbapenem-resistente <i>K. pneumoniae</i> <sup>2</sup>	15 947 (2,4 %)	2 118	13%
Carbapenem-resistente <i>E. coli</i> <sup>2</sup>	2 619 (0,4 %)	141	5%
Colistin-resistente <i>Acinetobacter spp</i>	1 084,7 (0,2 %)	95,5	9%
Colistin-resistente <i>P. aeruginosa</i>	1 261,9 (0,2 %)	85,5	7%
Colistin-resistente <i>K pneumoniae</i>	7 450 (1,1 %)	1 635	22%
Colistin-resistente <i>E. coli</i>	7 156 (1,1 %)	621	9%
Muliresistente <i>P. aeruginosa</i>	9 028 (1,3 %)	572	6%
Multiresistente <i>Acinetobacter spp</i>	2 181,5 (0,3 %)	100	5%
MRSA	148 727 (22,1 %)	7 049	5%
VRE	16 146 (2,4 %)	1 081	7%
Penicillin-resistente <i>S. pneumoniae</i>	2 836 (0,4 %)	172	6%
Pencillin- und Macrolid-resistente <i>S. pneumoniae</i>	2 013 (0,3 %)	172	9%
Gesamt	671 689 (100%)	33 110	5%

<sup>1</sup> Colistin-resistente Isolate nicht mitberücksichtigt, <sup>2</sup> Durchschnittliche Mortalität gibt die Todesrate innerhalb der spezifischen Infektion (z.B. 3G-Cephalosporin-resistente *E. coli*); MDR = Resistenz gegenüber Aminoglycosiden und Fluorchinolonen; 3G = Drittgeneration-Cephalosporine, MRSA = Methicillin-resistente *S. aureus*; VRE = Vancomycin-resistente *E. faecium* und *E. faecalis*. Enterobakterien sind weiß unterlegt, gramnegative Non-Fermenter sind grün unterlegt, grampositive sind blau unterlegt

Die Antibiotikaentwicklung ist ein langwieriger und kostenintensiver Prozess. Im Durchschnitt vergehen 15 Jahre von der Suche nach neuen Substanzen über erste vorklinische Studien, gefolgt von klinischen Studien bis zu deren Zulassung. Dabei sind laut dem *Tufts Center for the Study of Drug Development* die jährlichen Gesamtausgaben für die Antibiotikaentwicklung zwischen 1970 und 2010, nicht zuletzt wegen der erhöhten Zulassungshürden, von ca. <300 Millionen Dollar auf ca. >2,6 Milliarden Dollar und damit um fast das 10-fache gestiegen [13]. Pro Substanz muss mit Kosten von ca. 20 Millionen Dollar für die präklinische Phase sowie die klinische Phase 1 gerechnet werden. Für die klinische Phase 2 fallen durchschnittlich 26 Millionen Dollar und für weitere klinischen Studien zwischen 100-150 Millionen Dollar pro Substanz an. Die Kosten für die Zulassung werden mit ca. 3,7 Millionen Dollar und das anschließende Marketing mit 401 Millionen Dollar beziffert! <sup>f</sup>. Angesichts dieser Kosten verwundert es nicht, dass das erste Lipopeptidantibiotikum (Daptomycin) erst 16 Jahre nach der Entdeckung der Stoffklasse im Jahr 2003 in den USA und 2006 in Deutschland zugelassen wurde. Die Therapiekosten zur Behandlung von MRSA mit Dapomycin liegen entsprechend mit 186,33 €/Tag deutlich höher als vergleichsweise 6,88 €/Tag für Vancomycin (ca. 30fach!) [14]. Die Kosten für neuere

<sup>f</sup> <https://amr-review.org/sites/default/files/Modelling%20the%20antibiotic%20development%20process.pdf>

Antibiotika liegen oft sogar bei mehr als 1 000 €/Tag (z.B. Dalbavancin als Einmaldosis bis zu 2 713 €, Listenpreis des Herstellers).

Eine schnelle, gezielte und vor allem zuverlässige Diagnostik der Erreger und ihrer Resistenzprofile ist demnach sowohl im medizinischen als auch ökonomischen Sinne ein Stützpfiler der Patientenversorgung für die bestmögliche Antibiose.

## 1.4 $\beta$ -Lactamantibiotika und $\beta$ -Lactamasen

Die  $\beta$ -Lactamantibiotika ( $\beta$ -Lactame) gehören wegen ihrer guten Verträglichkeit und des breiten Wirkungsspektrums zu den am häufigsten verschriebenen und verabreichten Antibiotika weltweit, sowohl im ambulanten als auch stationären Sektor [15].  $\beta$ -Lactame zeichnen sich durch ihren typischen  $\beta$ -Lactamring aus. Ausgehend von der chemischen Struktur werden sie weiter in Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobaktame unterteilt [16]; auch einige der  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren (BLI) gehören zu den  $\beta$ -Lactamen (z.B. Tazobactam) [17], wobei sie selbst keine antibakterielle Wirkung entfalten, sondern  $\beta$ -Lactamasen durch Interaktion mit dem aktiven Zentrum hemmen (Erklärung unten). Der  $\beta$ -Lactamring hat eine sterisch analoge Struktur zu D-Alanin-D-Alanin (D-Ala-D-Ala), dem endständigen Rest der Peptidoglycan-Bausteine, aus dem die bakterielle Zellwand aufgebaut wird. Der D-Ala-D-Ala Rest dient den Transpeptidasen (auch bekannt als Penicillin-Bindeproteine = PBPs) als Substrat für die Quervernetzung der Peptidoglycan-Schichten, wobei ein D-Ala abgespalten wird. Der  $\beta$ -Lactamring wird irreversibel im aktiven Zentrum des PBPs gebunden und inhibiert damit die Zellwandsynthese [16].

Als  $\beta$ -Lactamasen (BL) werden Enzyme bezeichnet, die den  $\beta$ -Lactamring hydrolysieren und damit die  $\beta$ -Lactame unwirksam machen. Diese Enzyme können strukturell in zwei Typen unterteilt werden, die Serin-BL (SBL) und die Metallo- $\beta$ -Lactamasen (MBL). Die SBL haben sich homolog zu den PBPs entwickelt und haben damit einen gemeinsamen Ursprung [18]. Die Hydrolyse der  $\beta$ -Lactame erfolgt bei den SBL über einen katalytisch aktiven Ser-Rest. Die Ambler-Klassifizierung [19] differenziert die SBL in die Klassen A, C und D, die jedoch phylogenetisch weit voneinander entfernt sind. Die MBL werden in der Ambler-Klasse B zusammengefasst. MBL benötigen ein oder zwei Zinkionen [20], um die Hydrolyse zu katalysieren und haben sich analog zu den SBL entwickelt. MBL weisen eher strukturelle Ähnlichkeiten zu Thioesterasen [21] und Glyoxalase II [22] auf.

## 1.5 Diagnostik von Resistenzen

Der Goldstandard in der Resistenztestung sind bereits seit langem angewandte, kulturbasierte mikrobiologische Methoden, wie Mikroverdünnung, Plättchentest, E-Test, oder

automatisierte Verfahren, wie BP Phoenix™ von Becton, Dickinson and Company oder VITEK2® von BioMerieux, die auf dem Prinzip der Mikroverdünnung<sup>9</sup> basieren, jedoch vollautomatisch (photometrisch) das Wachstum verfolgen. Die kulturbasierte Routinediagnostik bei MRGN dauert in der Regel zwei Tage. Dieser Zeitspanne kann sich erhöhen (bis zu 9 Tage), wenn die Ergebnisse aus dem Resistogramm uneindeutig sind und weiter mikrobiologisch nachgeprüft werden müssen oder die Spezies schwer kultivierbar ist, wie z.B. bei bestimmten Pilzen oder Anaerobiern. Hier kann eine molekulare Diagnostik, die direkt aus dem Patientenmaterial (wie Blut, Urin, oder Rektalabstrich) erfolgt, einen entscheidenden Zeitvorteil bieten. Die Sensitivität solcher Verfahren ist jedoch meist nicht ausreichend, um die sehr geringen Erregerlasten in sterilen Körperflüssigkeiten (z.B. Blut mit 1-100 CFU/ml<sup>h</sup> im Infektionsfall) [23] nachzuweisen. Hier hat die blutkultur-basierte Diagnostik mit einer Sensitivität < 1 CFU/ml einen deutlichen Vorteil. Auf der anderen Seite ist die Sensitivität der blutkultur-basierten Diagnostik unter antibiotischer Therapie im Vergleich zu molekularen Methoden häufig geringer [24].

Die PCR (*polymerase chain reaction*) stellt bei den molekularen Assays stets den ersten Schritt dar. Sie erlaubt eine Vervielfältigung der Zielgene und erhöht damit die Sensitivität. Die Detektion selbst erfolgt über verschiedene Methoden. Meist wird eine quantitative PCR oder eine Hybridisierung an immobilisierte Sonden und eine antikörperbasierte Detektion über eine spezielle, in der PCR addierte Gruppe (z.B. Biotin) angewendet. Dabei sind in den kommerziell erhältlichen Tests (Tabelle 5, Anhang) häufig Primer für die Detektion der Genallele *mecA*, *vanA* oder *vanB*, die jeweils für die Methicillin-Resistenz in *S. aureus* oder Vancomycin-Resistenz in den Enterokokken kodieren, enthalten. Für die MRGNs werden, je nach Testpanel, die ESBL-Varianten CTX-M-1/15 und CTX-M-14 sowie die Carbapenemasen KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51, OXA-58 detektiert. Dabei umfassen die Panels selten alle klinisch relevanten Varianten in einem Test. Zunehmend wird auch das *mrc-1*-Allel für die Colistin-Resistenz abgedeckt. Andere Resistenzgene, die für Fluorchinolon-, Aminoglycosid-, Macrolid- und andere Resistenzen verantwortlich sind, werden mittels der PCR-basierten Tests in der Regel nicht erfasst, da sie häufig durch Punktmutationen entstehen, was die Möglichkeiten klassischer Hybridisierungsmethoden meist übersteigt (Tabelle 5, Anhang). Die derzeit verfügbaren molekularen PCR-basierten Tests weisen damit in der Regel die Spezies gut nach, aber die Detektion der zugrundeliegenden Resistenzgene bei MRGN ist deutlich limitiert. Das liegt vor allem an der Vielzahl möglicher Allele bei den BL.

---

<sup>9</sup> Bei der Mikroverdünnung wird das Antibiotikum seriell in einer log-2 Weise verdünnt. Die Inokulation erfolgt mit ca. 105 Bakterien/ml. Die Kulturen (in der Regel in Titerplatten) werden nach ca. 20 Stunden Inkubation rein optisch auf Wachstum (Trübung) hin untersucht.

<sup>h</sup> Die Einheit CFU (colony forming units) per ml gibt die Lebendzellzahl der Bakterien wieder.

## 2. Zielstellung

Um den steigenden Infektionsraten durch ESBL- und carbapenemaseproduzierende Bakterien entgegenzuwirken, wurden weltweit verschiedene Maßnahmen ergriffen. Unter anderem wurden in den letzten Jahren gezielt Förderprogramme und Initiativen zu Diagnostik, Therapeutika-Entwicklung, Epidemiologie sowie *Antibiotic Stewardship*<sup>i</sup> im humanen und landwirtschaftlichen Sektor auf nationaler und internationaler Ebene auf den Weg gebracht. Die vorliegende Arbeit widmet sich verschiedenen Aspekten im Kampf gegen die MRGN. Sie wurde im Rahmen verschiedener Förderprojekte durchgeführt: BMBF-Förderung der klinischen Arbeitsgruppe ‚Klinische Infektiologie‘ (Förderkennzeichen 01KI1204 und 01KI1501), Horizon2020 InfectControl (BMBF, FKZ 03ZZ0804C), Forschungscampus InfectoGnostics (BMB, FKZ13GW0096D).

Einen wesentlichen Beitrag im Kampf gegen die MRB leistet das *Antibiotic-Stewardship*-Konzept, das weltweit in Kliniken umgesetzt wird. Dadurch soll die Abgabe von Antibiotika kontrolliert und die antibiotische Therapie verantwortungsvoller und gezielter eingesetzt werden. Dank der Zusammenarbeit von Infektiologen, klinischen Mikrobiologen und Krankenhausapothekern wird die bestmögliche Therapie für den Patienten bei gleichzeitiger Reduktion von Selektionsprozessen, die zur Entstehung und Verbreitung von Resistenzen beitragen, sichergestellt. Wichtige Rollen bei den Entscheidungen spielen die lokale Epidemiologie und Risikofaktoren, Resistenzentwicklung unter Antibiose sowie eine schnelle und zuverlässige Diagnostik. Diese Aspekte wurden primär, aber nicht ausschließlich in der vorliegenden Arbeit adressiert:

Die lokale Epidemiologie und Risikofaktoren sollten in einer klinischen Beobachtungsstudie erfasst werden. (**Kapitel 3.1**)

Molekulare Diagnostik kann deutlich früher Auskunft über das Vorliegen von Resistenzen geben als die blutkulturbasierte mikrobiologische Routinetestung. Allerdings decken die kommerziell erhältlichen Tests die Vielzahl an möglichen Resistenzallelen bei MRGN nicht zufriedenstellend ab. Deshalb sollten zunächst phylogenetische Analysen der bekannten BL durchgeführt werden, um geeignete Genbereiche sowie Primer und Sonden für differenzielle molekulare Analysen zu definieren. (**Kapitel 3.2**)

Die DNA-basierte molekulare Diagnostik kann aktive nicht von inaktiven Genen unterscheiden. Das spielt bei induzierbaren Resistenzdeterminanten und vor allem bei differenziell exprimierten Genen eine zentrale Rolle und kann schnell zur Überinterpretation der Ergebnisse führen. Deshalb wurden Ansätze verfolgt, die bakterielle mRNA als molekulares Zielmaterial zu nutzen. (**Kapitel 3.3**)

---

<sup>i</sup> Konzept zum verantwortungsvollen und rationalen Einsatz von Antibiotika

Die Erweiterung des Resistenzspektrums kann sich in Bakterien aufgrund der kurzen Generationszeiten unter selektivem Druck schnell etablieren. Häufig reicht bereits der Austausch einer Base, um das Resistenzprofil der BL zu verändern, was experimentell anhand der CTX-M-Gruppe geprüft werden sollte. Einzelbasenaustausche stellen ein komplexes Problem für molekulare Assays dar. Hier haben vor allem die älteren BL der Gruppen SHV und TEM eine zentrale Rolle. Für diese sollten eindeutige Sequenzmotive gefunden werden, die zwischen den Subtypen nach Bush-Jacoby-Medeiros [25, 26], 2b (Schmalspektrum), 2be (Resistenz gegen 3G-Cephalosporine), 2br (Resistenz gegen BLI) und 2bre (Resistenz gegen 3G-Cephalosporine und BLI) differenzieren. **(Kapitel 3.4)**

Die meisten Resistenzgene bei gramnegativen Bakterien werden allerdings plasmidal übertragen, deshalb sollte die Rolle der Plasmide in der Diversifizierung der Carbapenemasen untersucht werden. **(Kapitel 3.5)**

### 3. Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und Einordnung in das wissenschaftliche Umfeld

#### 3.1 Lokale Epidemiologie und Risikofaktoren für Kolonisierung mit ESBL- und Carbapenemase-produzierenden Enterobakterien

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 3 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Im Gegensatz zum MRSA lassen sich die meisten ESBL- und carbapenemase-produzierenden Enterobakterien (EPE und CPE) nicht leicht dekolonisieren, da sie größtenteils zur natürlichen Darmflora von Säugetieren gehören. Die Aufnahme solcher EPE oder CPE erfolgt meist über die Nahrungskette. In Studien wurde beispielhaft gezeigt, dass rohes Fleisch [27] aber auch Gemüse, vor allem bodennahe Sorten, wie Salat oder Rüben, unabhängig von den Zuchtbedingungen mit EPEs besiedelt sein können [28]. Ursache sind vor allem Dünger, die aus fäkalen Abfällen der Tierhaltung stammen, da bis zu 100 % der Mastbestände gastrointestinal mit EPE besiedelt sein können [29, 30]. Entsprechend steigen auch die Kolonisierungsraten mit EPE bei Menschen. Derzeit wird geschätzt, dass über 5 % der gesunden Bevölkerung mit EPE kolonisiert sind, wobei die Zahlen je nach Kohorte stark variieren [31, 32]. In der hier vorgestellten eigenen Studie werden die Aspekte der lokalen Epidemiologie und der Übertragung von EPE und CPE näher untersucht.

In der prospektiven Kohortenstudie „ESBL-Alerts“ (DRKS00005273) <sup>j</sup> sollten die Kolonisierungsraten vor der Krankenhausaufnahme, Risikofaktoren, nosokomiale Infektions- und Kolonisierungsraten und Kolonisierungspersistenz ermittelt werden. Einschlusskriterien waren ein Alter der Patienten  $\geq 18$  Jahre, erwartete Aufenthaltsdauer  $> 48$  Stunden und eine externe Überweisung. Es konnten 1.334 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Diese wurden zwischen Januar 2013 und September 2015 auf die Stationen der Herz-Thoraxchirurgie, der Gastroenterologie-Hepatologie-Infektiologie und der Geriatrischen Medizin des Universitätsklinikums Jena (UKJ) aufgenommen. Die EPEs und CRE wurden durch Abstriche auf selektivem CHROMagar ESBL/KPC Agarplatten isoliert und mittels mikrobiologischer Routinemethoden (Speziesnachweis und Resistogramm mittels VITEK2<sup>®</sup> und Mikrodilutionsmethode) charakterisiert. Zusätzlich wurden CARB-Detect AS-2-DNA-Microarrays (Alere Technologies) und ERIC-PCR <sup>k</sup> durchgeführt, um die molekulare Epidemiologie und die Übertragungsraten der EPE zu bestimmen.

<sup>j</sup> Deutsches Register Klinischer Studien

<sup>k</sup> Eine spezielle PCR mit definierten Primersets zur Amplifikation von enterobakteriellen repetitiven intergenetischen Consensus Sequenzen

### 3.1.1 EPE-Kolonisierungsepidemiologie

Insgesamt wurden aus den Patientenabstrichen zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkte 342 EPE-Isolate gesammelt (Abbildung 2 A). CPE wurden zu keinem Zeitpunkt gefunden. Bei 13 Patienten wurde mehr als ein EPE-Isolat gleicher Spezies oder anderer Spezies zu einem der Zeitpunkte gesammelt. Davon handelte es sich bei 5 Abnahmen sehr wahrscheinlich um klonale Isolate, da die molekularen Muster identisch waren. *E. coli* war mit über 88,9 % der am häufigsten nachgewiesene EPE, gefolgt von *K. pneumoniae* (8,2 %); andere *Enterobacteriaceae* waren in Einzelfällen vorhanden (Abbildung 2 B). Es gab keine signifikanten Unterschiede ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) in der Verteilung der Arten zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Probenentnahme.

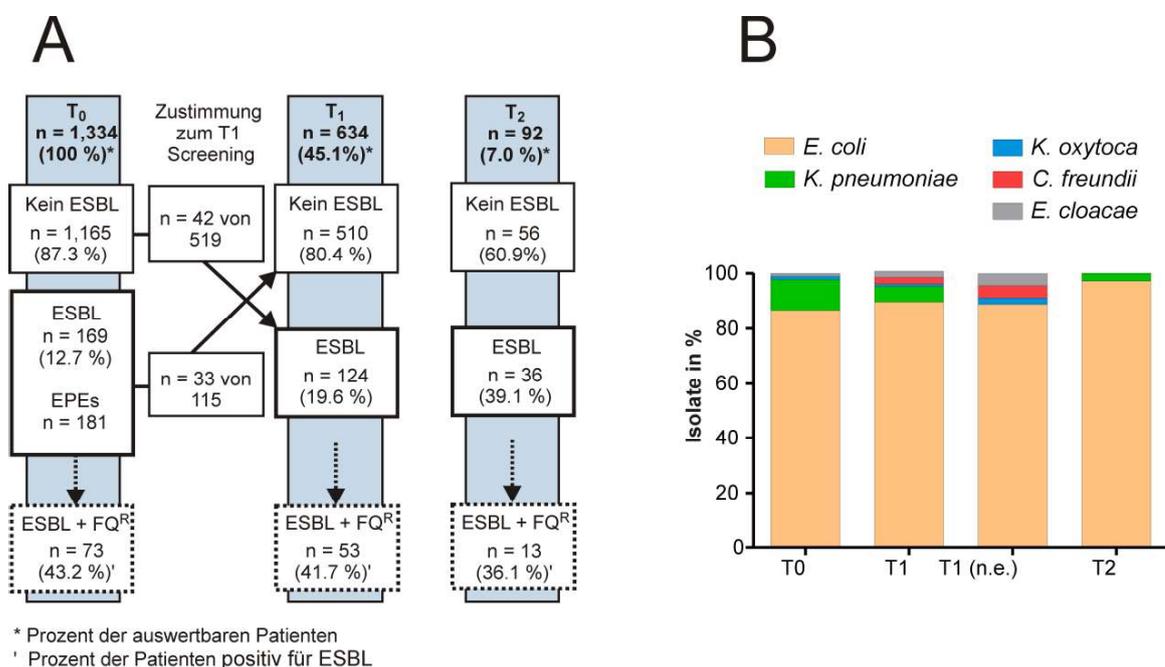


Abbildung 2: Darstellung der Verteilung der EPE-Befunde (A) und der identifizierten Spezies (B) über die verschiedenen Zeitpunkte der Probensammlung.

Bildquelle modifiziert nach den Daten von Hagel *et al.*, 2019 [33].

Die EPE-Kolonisierungsrate lag bei Aufnahme (T<sub>0</sub>) bei 12,7 % und war damit doppelt so hoch wie in anderen Studien für diese Zeitperiode berichtet wurde [34-37]. In Übereinstimmung mit anderen Berichten [38, 39] war die EPE-Kolonisierungsrate auffällig höher bei Patienten aus Pflegeheimen. Bei Entlassung waren insgesamt 19,6 % der Patienten mit einem EPE kolonisiert, von denen 8,1 % der Betroffenen ein EPE nosokomial erworben haben, was ebenfalls mit anderen Studien übereinstimmt [40]. Von den entlassenen Patienten mit einem EPE-positiven Befund waren nach durchschnittlich 6 Monaten immer noch 39,1 % mit einem EPE besiedelt. In der Studie von Birgand *et al.* wurde für die EPE-Besiedlung eine Halbwertszeit von ca. 6 Monaten bestimmt [41], womit es auch hier keine nennenswerte Abweichung gab.

In Übereinstimmung mit anderen Studien [42, 43] war die CTX-M-1/15-Gruppe mit insgesamt 81.2 % die häufigste nachgewiesene BL in der EPE-Kohorte. Die zweithäufigste BL-Gruppe war die TEM-Gruppe (49.7 %), wobei hier die molekularen Tests nicht zwischen ESBL und Non-ESBL unterscheiden können. Die Prävalenz anderer BL-Gruppen lag unter 10 %. Es konnte anhand typischer Signaturen von mobilen Elementen, welche man häufig auf Multiresistenz-Plasmiden vorfindet, beobachtet werden, dass eine Übertragung der Plasmide zwischen verschiedenen Enterobakterien-Spezies innerhalb der Patienten häufiger auftrat als zwischen den Patienten.

### 3.1.2 EPE-Kolonisierungsrisiken

Das relative Risiko<sup>1</sup> (RR) für eine EPE-Kolonisierung bei der Aufnahme war mit 0,644 (0,448 – 0,937) für Patienten niedriger, die wegen elektiver Eingriffe eingewiesen wurden, im Vergleich zu Patienten, die über die Notaufnahme eingeliefert wurden. Während des Krankenhausaufenthaltes erhöhten (RR >1 und Konfidenzintervalle (CI) > 1) chirurgische Indikation und invasive Eingriffe (abgesehen von Endoskopie), Antibiotika- und Antazida-Therapien das RR einer EPE-Kolonisierung (Tabelle 3). Andere Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf die EPE-Besiedlung bei T0, T1 oder T2.

Tabelle 3: Einfluss von demographischen Faktoren und medizinischen Interventionen auf die *de novo* ESBL-Kolonisation während des Krankenhausaufenthaltes bei T1.

<b>Faktor</b>	<b>RR</b>	<b>95 % CI</b>
Geschlecht männlich	0,779	0,428 – 1,417
Chirurgische Indikation bei Aufnahme	2,967	1,188 – 5,701
Antibiotika-Behandlung	2,231	1,247 – 3,991
Antazida-Behandlung	1,952	1,004 – 3,797
Andere invasive Eingriffe (Beatmung, Infusion, Katheter, parenterale Ernährung)	2,405	1,291 – 4,483
Chirurgische Eingriffe	1,532	0,859 – 2,732
Endoskopie	0,717	0,401 – 1,281

Es gab nur einen Fall (0,6 %) einer nosokomialen Infektion mit EPE, der bereits bei Aufnahme nachgewiesen wurde, womit das Risiko einer Infektion mit dem kolonisierenden EPE deutlich niedriger lag als in anderen Studien, bei denen jedoch hämato-onkologische Patienten, die aufgrund ihrer Grunderkrankung ein erhöhtes Infektionsrisiko haben, untersucht wurden [40, 44].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Studie im Vergleich zu anderen Studien eine sehr niedrige Rate an EPE-Blutkreislaufinfektionen ergab und einige bekannte Risikofaktoren im Zusammenhang mit der EPE-Kolonisierung bestätigte. Die CTX-M-BL

<sup>1</sup> Verhältnis des Risikos in zwei Gruppen, dargestellt als Quotient aus den kumulativen Inzidenzen, der mit dem Risikofaktor exponierten und der nicht exponierten Gruppen

waren mit 91,8 % die vorherrschenden ESBL-Varianten. Innerhalb dieser war CTX-M-1/15-ESBL (81,2 %) die häufigste Gruppe. Eine Assoziation der ESBL mit hochvariablen Multiresistenz-Plasmiden, die offensichtlich zwischen verschiedenen Spezies ausgetauscht wurden, verdeutlichte, dass das epidemiologische Problem mit den ESBL und Carbapenemasen unterschätzt wird. Damit erscheint eine sequenzbasierte Überwachung der EPE und CRE sinnvoll und ist der reinen Spezies-basierten *Surveillance*<sup>m</sup> überlegen.

### 3.2 Phylogenetische *in-silico*-Analysen der bekannten $\beta$ -Lactamasen

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 5 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Die klinisch verwendeten  $\beta$ -Lactame sind Derivate des natürlichen Penicillins, das durch die Pilzgattung *Penicillium* gebildet wird. Diese Entdeckung kann auf das Jahr 1874 durch Theodor Billroth datiert werden (also 54 Jahre vor Flemings ‚Neuentdeckung‘): Zitat "...*ich kann hinzufügen, dass in den sehr seltenen Fällen, in welchen eine üppige Penicillium-Entwicklung, z.B. auf Urin rasch auftritt, Coccobacteria septica später zu Entwicklung kommt, als wenn der Schimmel die Entwicklung von Bakterien stören kann...*" [45].

So wie die  $\beta$ -Lactame, sind auch die BL in der Natur weit verbreitet. In der hier vorgestellten Arbeit wurden deshalb umfassende Analysen der BL und ihren verwandten Proteinen/Enzymen durchgeführt, um die Dynamik der klinisch relevanten BL besser zu verstehen.

#### 3.2.1 Update der klassifizierten $\beta$ -Lactamasen

Die Analysen wurden, basierend auf den Einträgen in den Sequenz- und Proteindatenbanken<sup>n,p</sup>, *in silico* durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Analysen (2016) waren 1 886 BL-Varianten bereits klassifiziert. Diese wurden zunächst mittels des Aminosäuresequenz-*Similarity Networks* (SSN) und phylogenetisch mittels Clustal-Omega [46] analysiert (Abbildung 3). Auf der Grundlage der verfeinerten Kladen wurden die charakteristischen, konservierten Motive für alle 1 191 SBL-Sequenzen anhand von multiplen Sequenzalignements der verwandten Subgruppen neu ermittelt.

Die SSN-Analyse zeigte erwartungsgemäß eine gute Übereinstimmung mit der Ambler-Nomenklatur. Die Klasse-A-BL bildeten zwei phylogenetische Cluster, wobei sich die BL-Gruppen PER und VEB deutlich von den übrigen Klasse-A-BL differenzieren, was auf einen großen phylogenetischen Abstand hinweist. Die Klasse-B-BL bildeten drei Cluster, die mit den Ambler-Gruppen konsistent waren: B1, B2 und B3. Innerhalb der Gruppen B1 und B2

<sup>m</sup> Monitoring/Überwachung, hier der epidemiologischen Resistenzlage

<sup>n</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>

<sup>o</sup> <http://bigsdw.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>

<sup>p</sup> <http://www.laced.uni-stuttgart.de>

wurden jedoch größere Variationen beobachtet, was die hohe phylogenetische Heterogenität der MBL unterstreicht. Innerhalb des B1-Clusters lösten sich hauptsächlich IND-Varianten vom Cluster ab, was mit einer geringen Sequenzähnlichkeit zu den anderen Vertretern der B1-Gruppe einhergeht. Die äquidistante Netzwerkanordnung innerhalb der Klasse C verdeutlicht hingegen die enge Verwandtschaft dieser Klasse. Innerhalb der Klasse D trennte sich eine Gruppe von Varianten vom größeren Cluster ab, was auf deren geringere Ähnlichkeit und Verwandtschaft zu den übrigen BL diese Klasse hinweist. Obwohl noch mit dem großen OXA-Cluster verbunden, streuten ebenfalls einzelne andere OXA-Varianten. Obwohl die einzelnen Klasse-D-Untergruppen Sequenzübereinstimmungen von 84 % (OXA-134a und OXA-235 Gruppen) bis 87 % (OXA-40 und OXA-143 Gruppen) aufwiesen, lag die allgemeine Sequenzübereinstimmung über alle Untergruppen bei weniger als 40%, was die hohe Heterogenität dieser Klasse verdeutlicht.

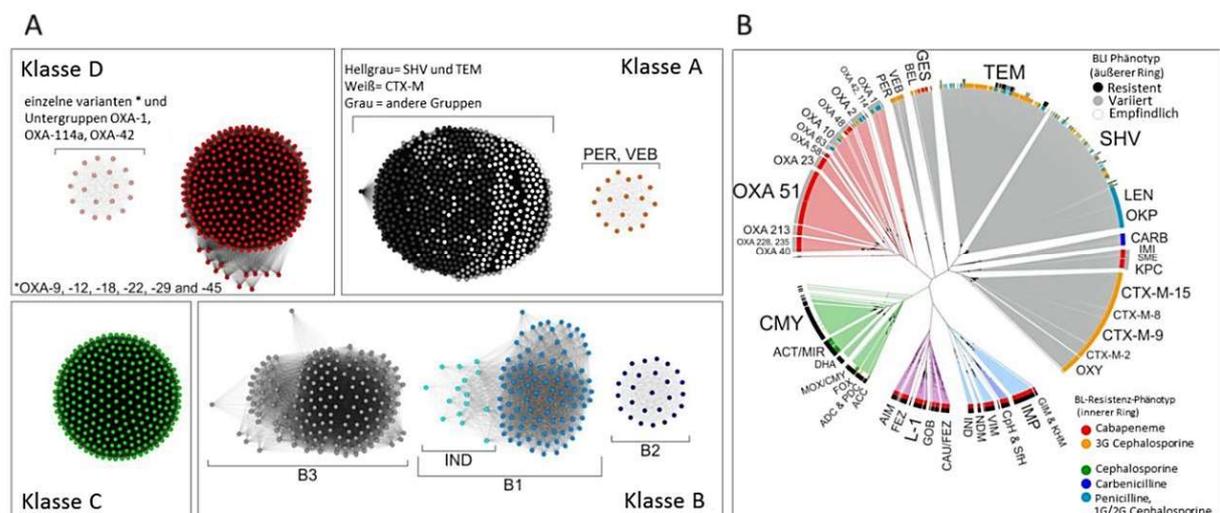


Abbildung 3: A) SSN-Analyse und B) Clustal-Analyse basierend auf den klassifizierten 1 886 Aminosäuresequenzen.

Die SSN wurde auf der Grundlage von BLAST<sup>q</sup> e-Werten<sup>r</sup> durchgeführt. Der Schwellenwert für den e-Wert wurde mit  $e^{-30}$  festgelegt. Das Netzwerk wurde mit dem 'BLAST2SimilarityGraph'-Plugin für Cytoscape 2.7 erstellt. Die Konstruktion des phylogenetischen Baums mit maximaler Wahrscheinlichkeit wurde mit 100 Bootstrap-Replikaten und unter Verwendung des WAG-Proteinsubstitutionsmodells [47] durchgeführt. Da die Ursprünge oder Verbindungen zwischen den verschiedenen phylogenetischen Kladen unbekannt sind, wurde ein unbewurzelter radialer phylogenetischer Baum erstellt. Die BL wurden gemäß der Ambler-Nomenklatur [19] in vier Klassen eingeteilt (A = in Graufarbskala, B = blau-violette Töne, C = grün, D = rot). Bildquelle Brandt *et al.*, [48].

Basierend auf dem Sequenzvergleich-Update konnten die drei spezifischen konservierten Aminosäuremotive [19], SxxK, [SYF]xN und [KR][TG]G der SBL weiter verfeinert werden (x deutet auf weniger konservierte Aminosäurereste an der jeweiligen Position).

Das Motiv SxxK mit dem katalytischen Serinrest (fett markiert) im aktiven Zentrum wies deutliche Sequenzpräferenzen für die verschiedenen Klassen und Kladen auf und konnte

<sup>q</sup> Basic Local Alignment Search Tool

<sup>r</sup> Erwartungswert, eine Metrik für die Signifikanz einer Homologie-Übereinstimmung in BLAST; je kleiner der e-Wert, desto höher die Übereinstimmung.

sogar um weitere Aminosäurereste in 5'- und 3'-Richtung erweitert werden. Damit kann dieses Motiv für die Klasse A als R<sup>65</sup>FxxxS<sup>70</sup>xxK<sup>s</sup> verallgemeinert werden. In der Klasse A2 wird Arginin an Position 65 durch Histidin oder Lysin ersetzt. Das konservierte aktive Zentrum mit dem Motiv P<sup>68</sup>xS<sup>70</sup>xxK ist bei Klasse D kürzer. Bei Klasse C unterscheidet sich dieses Motiv mit der Sequenz T<sup>59</sup>xFxcGS<sup>64</sup>xSK am stärksten. Das zweite Motiv, S<sup>130</sup>DN, ist in den BL der Klasse A und A2 stark konserviert, wobei es zu Variationen des Serins in bestimmten Varianten der Kladen GES/BEL, TEM/SHV/OKP/LEN und A2 kommt. Die Asparaginsäure wird hingegen bei einigen Varianten der CTX-M/OXY Kladen durch Histidin ersetzt. In der Klasse D ist dieses Motiv durch [YF]GN ersetzt. In Klasse C kann das zweite Motiv als RxY<sup>150</sup>xN verallgemeinert werden und zeigt damit größere Ähnlichkeit zum [YG]GN-Motiv der Klasse D. Das dritte Motiv K[TS]G ist für alle SBL mit Ausnahme der CARB-Klasse, in der es zu R[TS]G verändert wurde, erhalten geblieben.

### 3.2.2 Das unbekannte $\beta$ -Lactamase-Resistom<sup>t</sup>

Um die unbekannt BL und ihre nahen Verwandten zu identifizieren, wurden alle in den Datenbanken gespeicherten Sequenzen, die in den PFAM-Clan der 'Ser- $\beta$ -Lactamase-ähnlichen Superfamilie' (CL0013) kategorisiert wurden, analysiert. Die Datenbank PFAM<sup>u</sup> [49] (**Proteinfamilien**) identifiziert automatisch homologe Proteine über ein Hidden-Markov-Modell (HMM) anhand eines Vergleichs mit repräsentativen und bekannten Vertretern dieser Proteinfamilien. Auf diese Weise wurden 112 727 nicht-redundante Sequenzen der 'Ser- $\beta$ -Lactamase-ähnlichen Superfamilie' aus der NCBI-Datenbank abgerufen und mit Hilfe eines PERL-Skripts (Supplement in [48]) und BLAST weiter annotiert. Insgesamt wurden 9 681 Proteinsequenzen als stark verwandt mit den derzeit bekannten BL identifiziert.

Der **Ambler-Klasse A** konnten 4 917 Proteine zugeordnet werden, die in verschiedenen phylogenetischen Klassen der Phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* vorkommen. Basierend auf den Verwandtschaftsbeziehungen wurden in den Klasse-A-verwandten Gruppe sechs Hauptcluster definiert:

**TEM/SHV-Cluster** (n = 788 Varianten) beinhaltet relativ wenige konservierte Kladen (TEM, SHV/LEN/OKP, LAP, TER, ORN, PLA) mit Schmal-Spektrum-BL, ESBL und BLI-resistenten Varianten und ist stark mit *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* und *Pseudomonaceae* assoziiert. Aufgrund der hohen Konservierung der Kladen ist eine spontane Entstehung von Carbapenemasen hier höchst unwahrscheinlich.

**CARB-Cluster** (n = 201 Varianten) kommt in verschiedenen Familien der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien, inkl. menschlichen Pathogenen (z.B. *Enterobacteriaceae* und

<sup>s</sup> Die hochgestellte Zahl gibt die Position der Aminosäure an.

<sup>t</sup> Die Gesamtheit der Resistenzgene in einer ausgewählten Population

<sup>u</sup> <https://pfam.xfam.org/>

*Pseudomonadaceae*) und Umweltisolaten (z.B. *Rhodospirillaceae* und *Psychromonadaceae*), vor, was auf frühe evolutionäre Verzweigungen, Familienübertragungen und Diversifizierung hinweist. Da das CARB-Cluster hauptsächlich Schmalspektrum- und Carbenicillinase-Varianten (wie BRO, HER, AER) und nur wenige ESBL enthält, ist die Entstehung neuer Carbapenemasen innerhalb dieses Clusters höchst unwahrscheinlich.

**Carbapenemase/ESBL-Cluster** (n = 842 Varianten) beinhalten vor allem ESBL (CTX-M und die verwandten Kladen FONA und RAHN sowie einige andere ESBL-Kladen) und die einzigen Carbapenemasen (KPC/IMI/SME-Klade) innerhalb der Klasse A. Diese kommen verbreitet in  $\gamma$ -Proteobakterien, aber auch vereinzelt in  $\beta$ -Proteobakterien vor und deuten darauf, dass die Carbapenem-Resistenz weit vor dem klinischen Einsatz der Carbapeneme auf natürliche Weise entstand. Da die CTX-M bislang keine echten Carbapenemasen hervorgebracht haben, ist es unwahrscheinlich, wenn auch nicht unmöglich, dass dies in Zukunft passieren wird.

**A2-Cluster** (n = 414 Varianten) beinhaltet neben den bekannten PER- und VEP-ESBL viele uncharakterisierte Varianten und zeigt eine hohe Diversität. Das Cluster ist vor allem mit der Gattung *Bacteroides* assoziiert, wobei das Vorkommen einzelner Varianten in  $\gamma$ -Proteobakterien auf eine frühe Phylum-Übertragung hinweist, die wahrscheinlich durch die gemeinsame Nischenbesiedlung des Darms begünstigt wurde.

**Grampositive Cluster I** (n = 771 Varianten) **und II** (n = 246 Varianten) beinhalten zahlreiche Schmalspektrum-BL-Kladen, die vor allem in *Firmicutes* and *Actinobacteria* vorkommen. Das schließt auch pathogene Vertreter, wie Staphylokokken und Clostridien (bei *Firmicutes*) oder Mykobakterien und *Nocardiaceae* (bei Actinobakterien), ein. Das zeigt, dass neben den veränderten penicillinbindenden Proteinen (PBP, kodiert z.B. durch *mecA*, *mecC*) auch Penicillinasen in diesen Familien weit verbreitet sind und zu deren Gesamtresistenz gegenüber  $\beta$ -Lactamen beitragen können.

Der **Klasse C** wurden 2 383 Proteine zugeordnet. Viele der bekannten Varianten weisen einen ESBL- oder Schmalspektrum-Phänotyp auf, der hauptsächlich auf frühe Cephalosporine (Cephalosporinase) beschränkt ist. Für einige Varianten wurde allerdings eine schwache hydrolytische Aktivität für Carbapeneme beschrieben (CMY-2, CMY-10, ATC-1 und ADC-68) [50, 51]. Im Gegensatz zu dem SSN-Ergebnis für die klassifizierten Klasse-C-Varianten zeigt die gesamte verwandte Gruppe deutlich weniger Sequenzübereinstimmung, so dass sich einzelne Kladen schwierig definieren lassen. Die Klasse-C-Vertreter sind meist chromosomal kodiert und kommen genusspezifisch verbreitet vor. Entsprechend lassen sich übergeordnete Haupt-Cluster für *Pseudomonas* (n = 178 Varianten), *Acinetobacter* (n = 229 Varianten), *Aeromonas* (n = 68 Varianten) und *Enterobacteriaceae* (n = 672 Varianten) sowie vereinzelte kleinere Cluster, die sich unterschiedlichen Gattungen zuweisen lassen, differenzieren. Die Plasmid-lokalisierten Klasse-C-Kladen DHA, ACT/MIR and CMY

verbreiten sich nur in *Enterobacteriaceae*, wohingegen die plasmidalen FOX- und MOX-Allele, die vor allem aus Enterobakterien isoliert wurden, ihren Ursprung in *Aeromonas* haben und damit auf eine gattungsübergreifende Transmission hinweisen. Die plasmidübertragbaren Varianten neigen durch die kürzeren Generationszeiten der Plasmide zu einer schnellen Diversifizierung. So konnten sich auch die Carbapenemase-Aktivitäten durch Veränderung von zwei Loops im Enzym (R2- und C-Loop) [51] entwickeln, was man bei einigen DHA-, ACT- und CMY-Varianten beobachten kann. Das deutet darauf hin, dass viele Klasse-C-Gruppen eine potenzielle hydrolytische Aktivität gegenüber Carbapenemen aufweisen und dass ihre Diversifizierung zu Carbapenemasen durch erhöhten selektiven Druck (wie der Einsatz von Carbapenemen) beschleunigt werden könnte. Außerdem ist zu erwarten, dass weitere, bislang chromosomal-kodierte Varianten in Plasmiden integriert werden und so den Weg in Humanpathogene finden.

Der **Klasse D** konnten 2 381 Proteine zugeordnet werden. Diese kodieren für Carbapenemasen und ESBL. Klasse D zeigt eine hohe Diversität und bündelt eher wenig miteinander verwandte Kladen. Hier gibt es eine große Anzahl nicht charakterisierter Varianten und verwandter Proteine in verschiedenen Phyla, was auf einen unterschätzten Pool von Klasse-D-BL und möglicherweise Carbapenemasen hinweist. Ursprünglich als chromosomale Varianten eingestuft verbreiten sich vor allem die OXA-23-, -40-, -51- and -58-Carbapenemase und ESBL gattungsübergreifend auf Plasmiden in verschiedenen gramnegativen Pathogenen.

Darüber hinaus wurden 433 BlaR-Rezeptorproteine der Klasse D zugeordnet. Deren extrazelluläre Domäne weist strukturelle Ähnlichkeiten mit den OXA-BL auf, was auf einen gemeinsamen Vorfahren hindeutet.

### 3.2.3 Epidemiologische Schlussfolgerungen

BL stellen eine alte und wenig verwandte Gruppe von Enzymen dar, die sich unabhängig voneinander in verschiedenen Arten entwickelt haben. Innerhalb dieser natürlichen BL kommen auch ESBL und Carbapenemasen vor, deren Entstehung nicht auf den selektiven Druck durch die in der modernen Gesellschaft erst seit den 1960er Jahren verwendeten  $\beta$ -Lactame zurückgeht. Vielmehr sind sie wesentlich früher in der Evolution aufgrund von natürlichen, selektiven Prozessen entstanden und konnten sich auch ohne Fitness-Verlust in verschiedenen Nischen etablieren. Das Neuerscheinen von ESBL und später von Carbapenemasen im klinischen Setting kann auf zwei wesentliche Prozesse, die sich anhand der Klasse A gut nachvollziehen lassen, zurückgeführt werden: i) plasmidale Übertragung und ii) anschließende Diversifizierung.

Durch Transmissionsereignisse sind TEM und SHV ungefähr zeitgleich in den 1960er Jahren in pathogenen Gramnegativen aufgetaucht. Sie haben unter dem selektiven Druck durch

Punktmutationen schrittweise die Fähigkeit erworben, alle ab ca. den 1970er Jahren neu eingeführten Cephalosporine der späteren Generation zu hydrolysieren oder haben eine Resistenz gegenüber den BLI entwickelt. Sie konnten sich zudem erfolgreich im Großteil klinisch relevanter Gramnegativer durch horizontalen Gentransfer etablieren. Bis dann Ende der 1980er Jahre [52] gleich mehrmals verschiedene CTX-M-ESBL den Weg in die pathogenen Gramnegativen fanden und sich ebenfalls sehr effektiv hier etablieren konnten. Interessant bei dem CTX-M ist die Tatsache, dass bis vor kurzem keine BLI-Resistenz bei den natürlichen Varianten nachgewiesen wurde, obwohl die BL/BLI-Kombinationen, wie Piperazillin/ Tazobactam zur empirischen Therapie auch gegen schwere nosokomiale Infektionen durch gramnegative Bakterien zählt (S2-Leitlinie: Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2018)<sup>v</sup>. Grund hierfür könnte die Kopräsenz von den ‚klinisch älteren‘ BL der Gruppe TEM und SHV sein, die bei ca. 50 % der klinischen Isolate die CTX-M begleiten [33] und bekanntermaßen auch BLI-resistente Varianten aufweisen.

Die Veränderungen in den TEM, SHV und den CTX-M haben jedoch keine Carbapenemasen hervorgebracht, obwohl das erste Carbapenem, Imipenem (in Kombination mit Cilastatin, um den Abbau durch die renale Dihydropeptidase I zu hemmen), 1985 durch die FDA<sup>w</sup> zur Behandlung von komplizierten bakteriellen Infektionen zugelassen wurde. Im Jahr 1996 folgte die Zulassung für Meropenem. Ungefähr zeitgleich tauchte 1997 die erste KPC in einem klinischen *K.-pneumoniae*-Isolat in den USA auf [53]. Die KPC-Carbapenemasen gehören zu einer deutlich älteren Carbapenemase-Klade als der breite Einsatz von Carbapenemen datiert werden kann. Der selektive Druck hat hier die Transmission vermutlich aus einem Umweltkeim begünstigt [54], was gut demonstriert, dass solche Ereignisse deutlich wahrscheinlicher sind, als die mutationsbedingte Erhöhung des Resistenzspektrums.

### 3.3 Entwicklung von molekularen Methoden zur mRNA-basierten differenziellen Diagnostik von $\beta$ -Lactamasen

Die BL sind seit Anfang der 1990er Jahre zu einem der wesentlichen Probleme in der Krankenversorgung, sowohl in der Therapie als auch in der Diagnostik, geworden. Die unterschiedlichen Abstammungslinien daraus folgend die geringe Sequenzhomologie zwischen den Kladen sowie die schnelle Diversifizierung der BL-Varianten und Integration auf mobilen Elementen stellen vor allen in der molekularen Schnelldiagnostik die größte Herausforderung dar (siehe Kapitel 3.2). Bei bestimmten Gruppen (z.B. SHV und TEM) entscheiden Punktmutationen über den Phänotypwechsel von Schmalspektrum-BL zu ESBL,

<sup>v</sup> [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/082-006l\\_S2k\\_Parenterale\\_Antibiotika\\_2019-08.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-006l_S2k_Parenterale_Antibiotika_2019-08.pdf)

<sup>w</sup> U. S. Food and Drug Administration

bei anderen sind ganze Kladen (z.B. CTX-M oder KPC) oder nur vereinzelte Varianten (z.B. OXA) ESBL oder Carbapenemasen. Einige BL stehen unter der Kontrolle von induzierbaren Promotoren (z.B. einige Klasse C-Varianten), andere werden durch unterschiedlich starke Promotoren (z.B. OXA-58), je nachdem, ob sie im Chromosom vorliegen oder bereits in ein plasmidales Integron aufgenommen wurden, reguliert. Die veränderte Aminosäuresequenz und die differenzielle Expression resultieren in einer Veränderung der beobachteten Resistenzphänotypen, gemessen als minimale Hemmkonzentration (MHK).

Durch die hohe Sequenzdiversität lassen sich die klinisch relevanten BL nur schwer in einen molekularen *One-fits-all*-Assay integrieren. Ferner verringert die unterschiedliche Genaktivität die Aussagekraft von DNA-basierten Assays. Deshalb sollten verschiedene Methoden erprobt werden, um die Nutzung der bakteriellen mRNA als Zielmolekül für molekulare Assays zu eruieren. Obwohl mRNA für andere diagnostische Fragestellungen (z.B. Virusnachweis) bereits eingesetzt wird, existieren derzeit keine mRNA-basierten Tests für Resistenzen. Dabei bietet mRNA theoretisch viele Vorteile gegenüber der DNA, die in verschiedenen Ansätzen anhand der CTX-M und OXA BL überprüft werden sollten:

1. Die Spezifität sollte aufgrund der DNA-Abschrift dem DNA-Assays nicht unterlegen sein.
2. Da mRNA kontinuierlich transkribiert wird, liegen stets mehr Kopien der mRNA vor als die des entsprechenden Gens, so dass die Sensitivität höher sein müsste.

### 3.3.1 Nachweis der CTX-M Subgruppen mittels Pyrosequenzierung aus mRNA

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 9 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Die CTX-M-BL wurden nach dem bevorzugten Substrat, Cefotaxim (CTX), und deren Entdeckungsort München (M) bezeichnet und lassen sich aufgrund der Aminosäuresequenzhomologie in fünf Subgruppen (im weiteren Verlauf nur als „Gruppen“ bezeichnet) aufteilen, die nach der häufigsten Variante bezeichnet wurden: CTX-M-1, -2, -8, -9 und -25 (siehe Kapitel 3.2.1). Die Experimente wurden mit ausgesuchten, bereits charakterisierten Enterobakterien-Isolaten (N = 17) durchgeführt, die jeweils eine der verschiedenen CTX-M-Gruppen (N = 13) oder keine CTX-M (N = 4) und zusätzlich weitere BL-Gruppen (N = 10) enthielten [55]. Die Gesamt-RNA wurde aus angezüchteten Kulturen mittels des Tempus™ Blood RNA Tube und Tempus™ Spin RNA Isolationskits nach Herstellervorschrift (ThermoFischer) gewonnen. Das Kit ist für die Isolation von RNA aus Vollblutproben vorgesehen und nutzt die Guanidinthiocyanat-Fällungsmethode zu Stabilisierung und Reinigung von RNA [56]. Die RNA wurde nach der Aufreinigung durch DNase-Verdau von DNA-Resten befreit, was mittels PCR und konservierten 16S-Primerpaaren überprüft wurde. Die Quantität und Qualität der RNA (RIN > 7,5, wird auf Basis

von 16S- und 23S-rRNA bestimmt) wurden mittels Agilent Bioanalyzer 2100 und des Prokaryote-Total-RNA-Pico-Assays (beides Agilent Technologies) bestimmt.

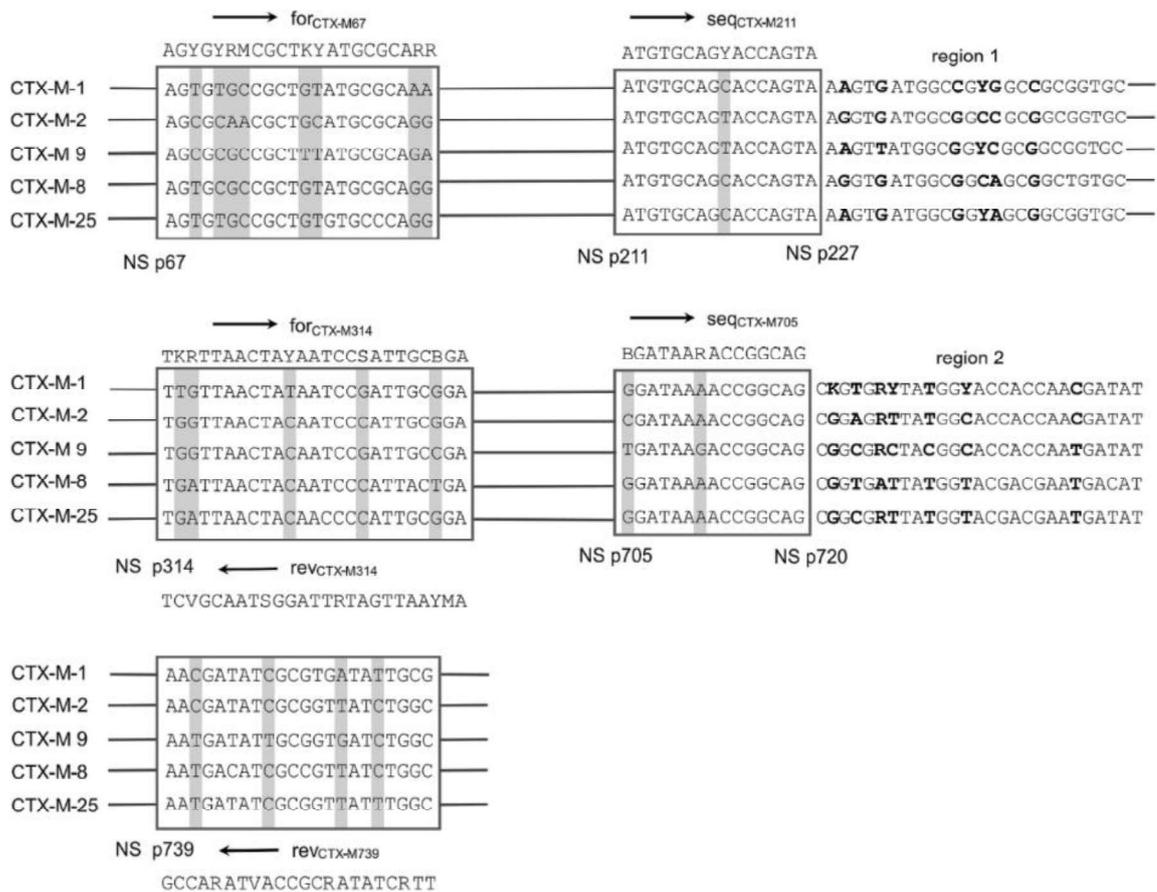


Abbildung 4: Alignment repräsentativer Allelvarianten für die fünf CTX-M-Gruppen.

Der IUPAC-Code wurde verwendet, um die variablen Nucleotide innerhalb der Primersequenzen (sind ober- und unterhalb des Alignments in 5'→3' Richtung angegeben) und die durch Pyrosequenzierung analysierten Regionen 1 und 2 hervorzuheben. Die Positionen der PCR- und Sequenzierungsprimer sind eingerahmt und die Position (z.B. p67) des ersten Nucleotides (NS) an dieser Stelle ist angegeben. Die Sense- und Antisense-Richtungen der Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die degenerierten Nucleotide innerhalb der Primeranealing-Positionen sind grau unterlegt. Die gruppenspezifischen Positionen innerhalb der Sequenzierungsregionen 1 und 2 sind fett gedruckt. Bildquelle Stein *et al.*, 2013 [55].

Basieren auf den Sequenzalignments wurden degenerierte Primer für die Reverse Transkription (RT), PCR und Pyrosequenzierung designt (Abbildung 4), so dass sie an den am höchsten konservierten Genstellen binden und die Pyrosequenzierung an den beiden gruppenspezifischen Positionen 1 und 2 erfolgte. Die RT wurde mit den Primersets  $rev_{CTX-M314}$  und  $rev_{CTX-M739}$ , und die anschließende PCR mit den Primersets  $for_{CTX-M67} / rev_{CTX-M314}$  und  $for_{CTX-M314} / rev_{CTX-M739}$  durchgeführt. Die Pyrosequenzierung erfolgte am PyroMark Q24 Sequenzer (Qiagen) jeweils mit den Primern  $seq_{CTX-M211}$  oder  $seq_{CTX-M705}$ . Die Pyrosequenzierung basiert auf der Detektion von freigesetzten Pyrophosphaten (PPi), die beim Einbau der Nucleotide während der DNA-Synthese freigesetzt werden. Aufgrund der Nachweisreaktion, bei der PPi zunächst durch die Aryl-Sulfurylase zu ATP umgewandelt, das dann durch die Luciferase zur Emission von Fluoreszenz verbraucht wird, kommt es mit zunehmender Synthesedauer zu Edukt-Erschöpfung. Damit eignet sich diese Methode nur

für die Analyse von kurzen Sequenzen und Einzelbasenmutationen (*single nucleotide polymorphism* - SNPs).

Mit dem angewandten Amplifikations-/Sequenzierungsansatz konnten alle fünf CTX-M-Gruppen eindeutig anhand der SNPs in den ausgewählten Regionen unterschieden werden. Unspezifische Störsignale durch die Anwesenheit anderer BL-Gruppen (hier TEM, SHV, OXA, NDN und CMY) wurden nicht beobachtet. Die Region 1 wies bereits allein eine 100%ige Spezifität für die bekannten Varianten innerhalb der Gruppen CTX-M-8 und -25 auf, durch die Region 2 wurde auch für die Gruppen CTX-M-1, -2 und -9 eine Spezifität von 100% erreicht. In diesen Versuchen wurden keine Isolate, die mehrere verschiedene CTX-M enthalten, getestet, um die Spezifität für solche Fälle zu bestimmen. Hier könnte die Implementierung einer weiteren Region, wie bereits durch Naas *et al.* [57] für die CTX-M-Charakterisierung mittels Pyrosequenzierung untersucht wurde, die phylogenetische Differenzierung erhöhen. Um den Kosten-Nutzen-Faktor einer Erweiterung zu prüfen, müsste die Prävalenz solcher Isolate erst untersucht werden, was aufgrund der lückenhaften Datenlage<sup>x</sup> jedoch nur eine geringe Aussagekraft hätte.

### 3.3.2 Direkter, RNA-basierter Nachweis von CTX-M-BL in menschlichen Blutproben

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 8 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Nachdem die Eignung der bakteriellen mRNA für die molekulare Diagnostik und spezifische Differenzierung der CTX-M bestätigt wurde, sollte die Sensitivität des Amplifikations-Sequenzierungsansatzes geprüft werden. Dazu wurde frisches humanes Vollblut (EDTA-Blutmonovette, Sarstedt) von freiwilligen Spendern (Ethikvotum 4016-02/14) verwendet, das mit definierten Bakterienlasten (in CFU/ml) angeimpft wurde. Die CFU/ml wurden für alle Ansätze mittels Verdünnungsreihen und Ausplattieren auf Agarplatten bestimmt. Das Protokoll der RNA-Isolation aus Vollblut wurde entsprechend den Vorarbeiten (Kapitel 3.3.1) durchgeführt. Es wurden bereits charakterisierte Enterobakterien-Isolate (N = 15), die CTX-M enthielten oder CTX-M- und BL-negativ waren, als Kontrollen verwendet. Die aus einer 3-ml-EDTA-Monovette gewonnene Gesamt-RNA-Menge unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Bakterienlasten und betrug 2,5 bis 7 µg, was vor allem auf die humane RNA aus Leukozyten zurückzuführen ist. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde die RNA nach der chromatographischen Tempus<sup>TM</sup>-Säulenreinigung durch eine Fällung aufkonzentriert und vollständig für die weitere Testung verwendet.

Zum Vergleich wurden aerobe und anaerobe Blutkulturen (BacT/Alert® SA und BacT/Alert® SN, bioMérieux) mit ca. 10 CFU derselben Isolate beimpft und standardmäßig bei 37°C bis

<sup>x</sup> Anmerkung: Sequenzierungen von klinischen Isolaten werden nicht flächendeckend durchgeführt.

zur Positivität inkubiert (in der Regel innerhalb von 24 h Inkubation). Die RNA wurde aus 0,5 ml Blutkultur gewonnen. Da sich die Tempus<sup>TM</sup>-Technologie auf Grund des hohen organischen Anteils in der Blutkultur hier nicht zur RNA-Isolation eignet, wurden erst die Erythrozyten mit 3 Volumen EP-Puffer (Qiagen) lysiert und die Bakterien mittels Zentrifugation pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in PBS (137 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) gewaschen, die Zellen anschließend mit 800 µl TRIzol (Life Technologies) und 160 µl Chloroform (Carl Roth) lysiert und die RNA stabilisiert. Zellbestandteile und Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt, die wässrige Phase mit 250 µl reinem Ethanol gefällt und mittels RNeasy Mini Kit Columns (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Qualitätskontrollen, RT, PCR und Pyrosequenzierung wurden entsprechend den Vorarbeiten (Kapitel 3.3.1) durchgeführt.

Die Amplifikations- und Sequenzierungsbedingungen wurden weiter optimiert. Dazu wurde ein linearisiertes, eigens hergestelltes Plasmid (pCTXM15) mit dem CTX-M-15-Gen verwendet. Um die unspezifischen Hintergrundsignale bei der RT zu eliminieren und die Signalstärke aufrecht zu erhalten, zeigte sich eine Primerkonzentration von 0,16 µM als günstig. Um die Sensitivität weiter zu erhöhen, wurde für die anschließende Amplifikation die Primerkonzentration auf 1,9 µM und die Zyklen auf 50 erhöht. Dabei wurde die Denaturierungstemperatur auf 93°C gesenkt, um die Prozessivität der DNA-Polymerase über die 50 Zyklen zu gewährleisten. Auf diese Weise konnte eine Sensitivität von 0,1 fg pCTXM15 erreicht werden, was ca. 23 Plasmid-Molekülen entspricht. Die PCR-Effizienz lag trotz der degenerierten Primer bei mind. 92 %. Die hohe Spezifität der degenerierten Primer wurde für die Vollblutproben und die Blutkulturen ebenfalls gezeigt, da keine PCR-Banden für die Kontroll-Stämme (keine CTX-M) nachweisbar waren.

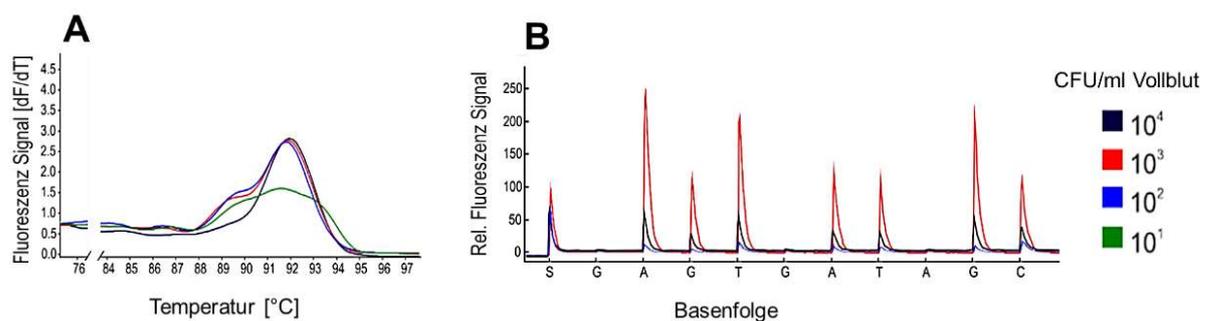


Abbildung 5: Sensitivitätsgrenzen des Ansatzes zum differentiellen Nachweis von CTX-M-Gruppen in der Amplifikation (A) und Pyrosequenzierung (B).

Die CFU/ml wurde für alle Ansätze durch Ausplattieren auf Agarplatten ermittelt, jedoch in der Abbildung vereinfacht als Log-Größen angegeben. Bild modifiziert nach Stein *et al.*, 2013 [55].

Die optimierte Methode erreichte für EDTA-Blut bei der PCR eine untere Nachweisgrenze (Sensitivität) von 10<sup>1</sup> CFU/ml und bei der anschließenden Pyrosequenzierung 10<sup>1</sup> – 10<sup>2</sup> CFU/m (Abbildung 5). Angesichts des höheren bakteriellen RNA-Gehaltes spielte die Nachweisgrenze bei den positiven Blutkulturproben keine Rolle. Deshalb wurde die

Sensitivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Blutkulturproben (0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h) analysiert. Spezifische PCR-Produkte waren nach 6 und 8 h Inkubation nachweisbar, was einem bakteriellen Konzentrationsbereich von  $10^5$  bis  $10^7$  CFU/ml entspricht (Bestimmung der Lebendzellzahl).

Trotz der optimierten Protokolle konnte eine Sensitivität  $<10$  CFU/ml nicht erreicht werden, was ein limitierender Faktor für den diagnostischen Einsatz sein könnte, da die Erregerlast bei Blutstrominfektionen bei Erwachsenen vor allem auf Intensivstationen oft sogar unter 1 CFU/ml Vollblut liegen kann [23, 58]. Andererseits lag die hierbei erreichte Sensitivität im Bereich molekularer Multiplex-Diagnostika für Vollblut-Proben aus kommerzieller Herstellung (Tabelle 5). Die Zeit von der Blutentnahme bis Ergebnis (TTR = *time to result*) betrug 8 Stunden. Eine Automatisierung, z.B. in einer Fluidik-Kartusche, würde hier eine deutliche Reduktion der TTR bringen, was den Einsatz als molekulare Schnell Diagnostik ermöglichen könnte. Damit stellt der Pyrosequenzierungsansatz eine interessante Alternative zu den derzeit verfügbaren Tests, die größtenteils auf der PCR- und ggf. nachgeschalteter Hybridisierung von DNA basieren, dar.

### 3.3.3 Phylogenie-basierte magnetische Bead-Reinigung von OXA-mRNA

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 7 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Die Bezeichnung „OXA-BL“ ist auf die Fähigkeit zur Hydrolyse von Cloxycillin (OXA) zurückzuführen. Da sich die OXA-Varianten deutlich voneinander unterscheiden, jedoch häufig verschiedene OXA-Gruppen in einem Isolat vorliegen können, sollte der Einsatz von subgruppen-spezifischen Immobilisierungssonden zur gezielten mRNA-Aufreinigung vor einer Detektion analysiert werden. Die Verwendung von sogenannten magnetischen *Beads* ermöglicht eine schnellere Implementierung in automatische Systeme und wurde daher bevorzugt. So wurden spezifische Fängersonden sowie Multiplexing-Primerpaare für neun OXA-Gruppen (in Abbildung 6 rot umrandet) entwickelt. Die OXA-Gruppen wurden anhand der Nukleinsäure-Identität ( $>80\%$ ) definiert, so dass insgesamt 21 Gruppen gebildet wurden. Von diesen wurden jedoch nur die neun prävalentesten Gruppen (hier mit der bekanntesten Variante bezeichnet) adressiert: OXA-1, OXA-2, OXA-10, OXA-40, OXA-23, OXA-48, OXA-51, OXA-58 und OXA-134a (Abbildung 6).

Nachdem die Fängersonden und Primer iterativ anhand von gereinigter DNA (aus ausgesuchten, charakterisierten, OXA-enthaltenden Isolaten und OXA-freien Kontroll-Isolaten) mittels PCR optimiert wurden, folgten Analysen zu Spezifität und Sensitivität der Fängersonden. Es wurde ebenfalls geprüft, ob die Spezifität und Sensitivität beeinträchtigt wird, wenn alle neun Fängersonden im Multiplex-Verfahren und ohne Ablösung der immobilisierten mRNA für die PCR-Detektion und Hybridisierung eingesetzt werden.

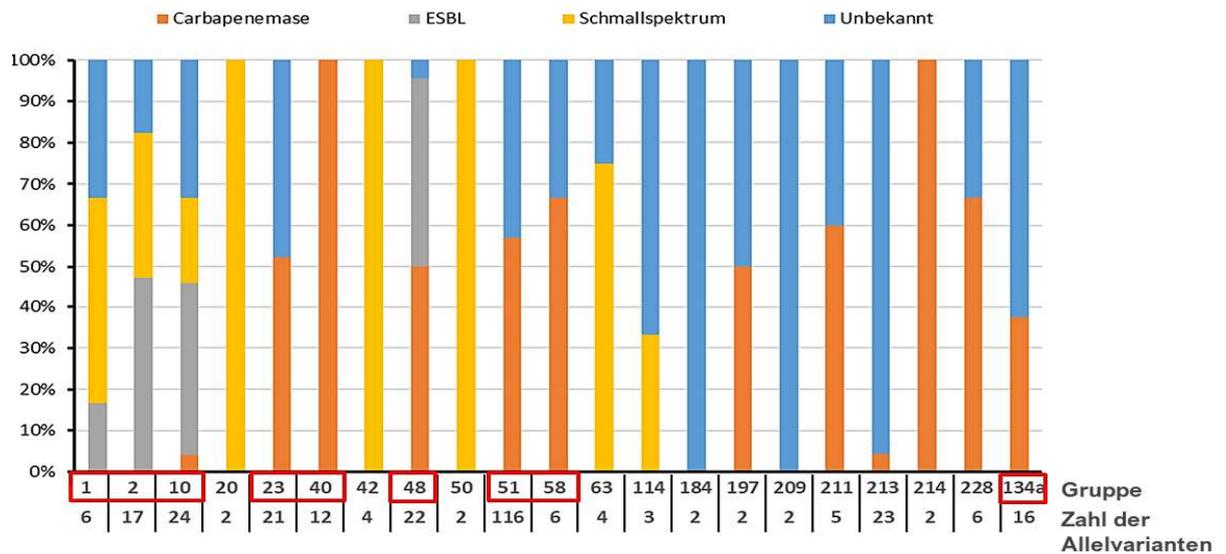


Abbildung 6: Darstellung der 21 OXA-Gruppen mit prozentualer Verteilung der Phänotypen der bekannten Allelvarianten

(Stand 22.01.2016, Manuskriptvorbereitung)

Die verwendeten magnetischen Streptavidin-Beads (Dynabeads M280 Streptavidine, Invitrogen) konnten bis zu 0,47 pmol/µg Bead mit den Fängersonden gesättigt werden, was ca. doppelt so hoch war, wie die Bindekapazität laut Herstellerangaben und höchstwahrscheinlich an der linearen Natur der Sonden lag, wodurch sterische Masseneffekte reduziert wurden. Die Sonden bestanden aus DNA-Sequenzen identisch mit den Revers-Primern. Sie enthielten am 5'-Ende jeweils einen 6 x Adenin-Linker und wurden endständig mit Biotin derivatisiert. Der Linker fungierte als Abstandshalter zwischen der zu hybridisierenden Sequenz und dem Bead. Der Biotinrest dient der Kopplung an die Streptavidinschicht des Bead.

Die höchste Spezifität der Fängersonden wurde mit relativ niedrigen Sonden-Konzentration von 5- 25 pmol pro Reaktion erreicht, wobei die unspezifischen PCR-Signale vorrangig für chromosomal kodierte OXA-51 zu beobachten waren. Diese unspezifischen Banden erwiesen sich nach Sequenzierung als ein rRNA-Transkript, was durch eine 8-Basenfolge in der OXA-51-Sonde anscheinend aus den Gesamt-RNA mit isoliert wurde. Das Multiplexing der Sonden wurde deshalb mit je 5 pmol je Sonde (insgesamt 9 Sonden) durchgeführt.

Die Sensitivität wurde an verschiedenen Isolaten untersucht, die jeweils eine OXA-51-ähnliche BL unter der Kontrolle verschiedener Promotoren aufwiesen: native Promotoren oder hochaktive ISAb1-Promotoren. PCR-Produkte wurden aus weniger als 10-25 ng Gesamt-RNA für nativ exprimierte OXA-51-Varianten nachgewiesen. Da sich die Bandenstärken Isolat-spezifisch unterschieden, deutete es auf unterschiedliche Transkriptionsniveaus von natürlichen Promotoren hin. Für ISAb1-kontrollierte OXA-Varianten wurden PCR-Produkte aus weniger als 1-5 ng bakterieller Gesamt-RNA

nachgewiesen, was auf die verbesserte Transkription und damit höhere Konzentration der mRNA durch das IS-Element zurückzuführen ist.

Ferner wurde gezeigt, dass eine Ablösung der an den Bead immobilisierten mRNA für die anschließende PCR sogar mit Sensitivitätsverlusten einherging. In ergänzenden Tests wurde weiterhin gezeigt, dass die Anwesenheit der Beads die nachgeschalteten Applikationen, wie die weitere Analyse mittels des CarbDetect AS-2 Arrays (Abbott), nicht stört. Dieses basiert auf einer Hybridisierung von PCR-Fragmenten, die während der PCR mit Biotin-Nukleotiden markiert werden und anschließend mittels Anti-Biotin-Antikörpern kolorimetrisch detektiert werden [59].

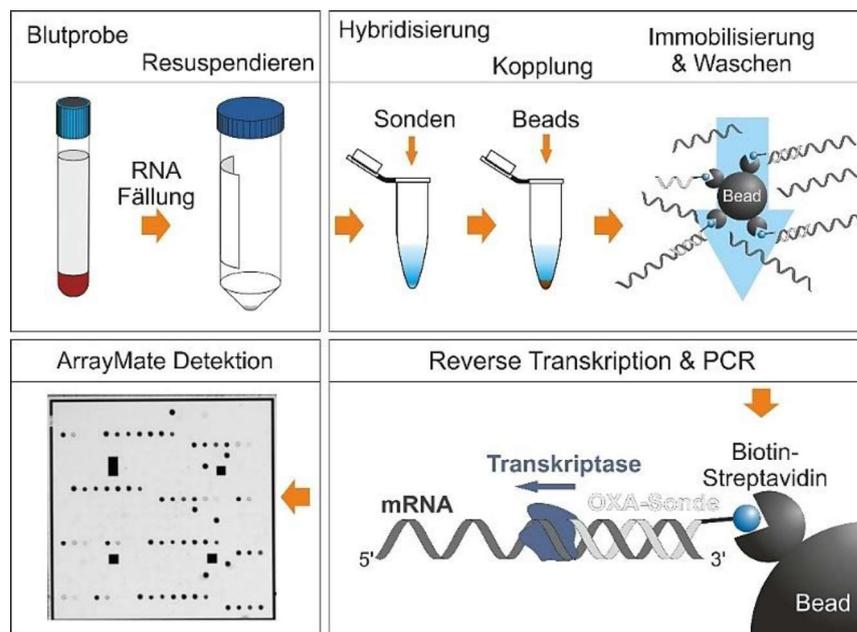


Abbildung 7: Arbeitsablauf der OXA-Isolation mittels der Streptavidin-Dynabeads.

Bildquelle *Brandt et al.*, [60].

Als effizienteste Reihenfolge (Abbildung 7) für die spezifische Bead-Anreicherung der mRNA erwies sich eine Multiplex-Hybridisierung der Sonden an die mRNA mit anschließender Immobilisierung der Biotin-Reste (Sonde) an die Streptavidin-Beads. Die Waschschrte, um unspezifische RNA zu entfernen, wurden durch die magnetischen Eigenschaften der Beads vereinfacht. Die RT und nachfolgende PCR wurde anschließend direkt am Bead durchgeführt (Sonde diente dabei zusätzlich als Revers-Primer).

Diese mRNA-basierte Methode verdeutlicht, dass eine quantitative sequenzspezifische Detektion der aktiven Resistenzgene im Rahmen der Resistenzdiagnostik möglich ist, obwohl bei dieser Studie nur eine semiquantitative Auswertung vorgenommen wurde. Um eine sichere Quantifizierung und damit Aussagen zu dem MHK vornehmen zu können, bedarf es weiterer Analysen, die den Einfluss zusätzlicher Faktoren, wie Wachstumsstärke, Wachstumsphase, Medienzusammensetzung oder selektiver Stress, auf die Expression zeigen können. Dies wird nötig sein, um solche Tests in Zukunft zu standardisieren und zu

kalibrieren. Dennoch zeigt diese Studie eindeutig das Potential von mRNA-basierter molekularer Diagnostik, den Phänotyp deutlich besser abzubilden als DNA. Vor allem bei den OXA-51 spielt das klinisch eine wichtige Rolle. Die natürlichen chromosomal kodierten OXA-51-Gene werden häufig nur sehr schwach exprimiert und die Ausprägung der Carbapenem-Aktivität liegt hier weit unterhalb des klinischen MHK-Grenzwertes [61]. Damit sind solche Isolate in einem Resistogramm als carbapenemsensibel eingestuft. Hier kann ein klassischer DNA-basierter molekularer Assay zur Überinterpretation führen und das Carbapenem als nicht mehr wirksam einstufen und damit die Therapieoptionen deutlich limitieren.

### 3.4 Phänotyp-Genotyp-Korrelation von $\beta$ -Lactamasen

#### 3.4.1 Analyse der phänotypbestimmenden Mutationen in SHV- $\beta$ -Lactamasen

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 1 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Die erste SHV-BL wurde 1972 (damals PIT-2) durch Pitton entdeckt [62] und das dazugehörige Plasmid 1988 sequenziert [63]. Die Abkürzung SHV steht für *Sulphydrylvariable* und geht auf die frühere Annahme zurück, dass die Hemmung des Enzyms durch Chlormercuribenzoatsäure (SH-Gruppen-reaktiver Proteinhemmer) in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat inkonstant ist. Die SHV-BL werden entsprechend ihres Substrat- und BLI-Spektrums (Bush-Jacoby-Medeiros (BJM)-Klassifikation) in die folgenden Subtypen unterteilt:

- **2b**-Varianten hydrolysieren Penicilline und Cephalosporine der 1. und 2. Generation (1G und 2G), z.B. Cefazolin oder Cefoxitin
- **2be**-Varianten sind ESBL und hydrolysieren 3G-Cephalosporine, z.B. Cefotaxim oder Ceftazidim
- **2br**-Varianten sind gegen BLI, z.B. Clavulansäure oder Tazobactam, resistent.

Seit der Entdeckung ist die Zahl neue Allelvarianten schnell gestiegen. Die SHV breiteten sich vor allem in klinischen *Enterobacteriaceae*-Isolaten, vor allem in *K. pneumoniae* und *E. coli*, aber auch in anderen Pathogenen, wie *P. aeruginosa* und *A. baumannii* [64, 65], aus. Die geschätzte Zahl der uncharakterisierten SHV-Allelvarianten mit neuen Aminosäuresubstitutionen, Deletionen oder Insertionen nimmt zu, wird jedoch selten erfasst, da die molekulare Diagnostik die SHV-Varianten nicht adressiert [66]. Das liegt daran, dass einzelne Aminosäuresubstitutionen den Phänotyp verändern können. Durch die Degeneration des genetischen Codes entsteht damit eine Vielzahl von möglichen DNA-Punktmutationen (SNP), was sich durch gängige, PCR-basierte molekulare Assays kaum zuverlässig nachweisen und noch schwieriger auflösen lässt. Da vor dem Hintergrund der hochprävalenten CTX-M das Vorhandensein von SHV-Allelen in den letzten Jahren nur eine geringe klinische Relevanz hatte, wurden nur wenige Versuche unternommen, dieses

technische Problem anzugehen. Allerdings nimmt die durch SHV vermittelte BLI-Resistenz aufgrund der zunehmend limitierenden Therapieoptionen an Relevanz zu.

Für die Entwicklung eines molekularen Differenzierungstests, welcher auf einzelnen Nukleotid-Tripletts basiert, ist es notwendig, die phänotyprelevanten Aminosäuresubstitutionen (PRAS) eindeutig einzugrenzen. Der Einfluss von einzelnen Aminosäuresubstitutionen auf das Substratspektrum der SHV wurde nur für bestimmte Substrate [67] oder für ausgewählte Varianten untersucht [68, 69]. Daher wurden in dieser Studie verschiedene mathematische Optimierungsalgorithmen angewandt und anhand von 146 bekannten SHV-Varianten trainiert, um Punktmutationen oder Mutationskombinationen innerhalb des SHV-Gens zu identifizieren, die eindeutig die Phänotypen 2b, 2be und 2br unterscheiden. Um die vorhergesagten PRAS zu validieren, wurden darauf basierend gerichtete Mutagenesen des SHV-1-Gens durchgeführt und die Resistenzprofile der mutierten SHV-Derivate in einem BL-freien *E. coli*-Modell analysiert. Ziel dieser Studie war es, potenzielle Positionen innerhalb des SHV-Gens zu identifizieren, die in molekulardiagnostischen Ansätzen zur eindeutigen Unterscheidung von 2be- und 2br-Phänotypen eingesetzt werden können.

#### 3.4.1.1 Mathematische Vorhersage der phänotyprelevanten Aminosäurepositionen (PRAP)

Innerhalb der 147 in dieser Studie analysierten Varianten wiesen 102 der 292 Aminosäure-Positionen innerhalb des reifen Proteins und 12 Positionen innerhalb des abspaltbaren Signalpeptids (SP) variable Aminosäurereste auf. Drei der Varianten besaßen Insertionen innerhalb der Sequenz, die nicht in den genannten variablen Positionen berücksichtigt wurden, und bei zwei Varianten war das SP N-terminal um zwei Aminosäurereste verlängert. Insgesamt wiesen diese Varianten 130 verschiedene Aminosäure-Substitutionen auf. Dabei entfielen 62 Substitutionen auf unbekannte Phänotypen. Innerhalb der bekannten Phänotypen kamen 32 Substitutionen in 2b-, 39 in 2be- and 7 in 2br-Varianten vor. Diese wurden genutzt, um mathematische Modellierungen mittels OptiSLang (Dynardo GmbH) vorzunehmen. OptiSLang ist eine Software für multidisziplinäre Aufgaben unter Anwendung stochastischer Analysen (Regressionen und Interpolationen), wie dem Metamodell der optimalen Prognose<sup>y</sup> (MOP) oder Kirging<sup>z</sup>. Dabei werden die Komplexität und die Variablen iterativ im Optimierungsschleifen reduzieren, um den optimalen Satz von Eingangsvariablen und das am besten geeignete Approximationsmodell zu extrahieren [70]. Es wurden insgesamt 11 Modellierungen mit unterschiedlichen Einstellungen durchgeführt und miteinander verglichen (Abbildung 8). Nach jeder Optimierungsrunde wurde ein

<sup>y</sup> Ein automatischer Ansatz zur Variablenreduzierung und optimalen Auswahl von Metamodellen.

<sup>z</sup> Ist eine räumliche Gaußprozess-Regression, mit der man unbekannte Werte durch umliegende Messwerte interpoliert.

Vorhersagekoeffizient (*coefficient of prognosis* = *CoP*) berechnet. Der *CoP* ist äquivalent zum Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ), gilt aber für Polynomregressionen und ist somit definiert als:

$$CoP = 1 - \frac{\sum[\text{Vorhersagefehler/Lauf}]^2}{\sum\text{Gesamtfehler}^2} \quad [70, 71].$$

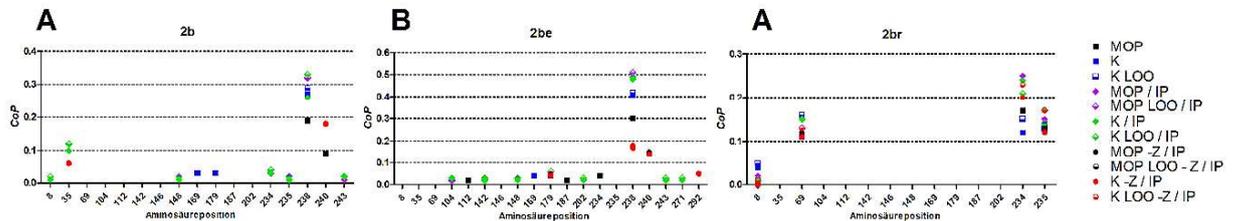


Abbildung 8: Mit OptiSLang ermittelte *CoP*-Werte für die PRAS-Positionen (Ambler-Nomenklatur) in SHV-Varianten für die spezifischen Phänotypen 2b, 2be und 2br.

MOP = Metamodell der optimalen Prognose; K = Kriging-Verfahren, LOO = leave-one-out Validierung, -Z = fehlende Aminosäurereste ausschließen (Null setzen), IP = isoelektrische Punkte der Aminosäurereste einschließen. Die Aminosäureposition sind entsprechend der Ambler-Festlegung angegeben. Bildquelle Neubauer *et al.*, [72].

Die iterative Optimierung wurde nach zehn Generationen ohne Änderungen des *CoP* oder spätestens nach 90 Generationen beendet.

Es wurden 18 PRAP identifiziert, wobei auch die passendsten Modelle (hoher *CoP*) nur 41,1 % der 2b-, 50,9 % der 2be- und 59,8 % der 2br-Varianten ausreichend beschrieben haben. Die Mehrzahl der Positionen wurde als relevant für den 2be- (N = 14) und 2b- (N = 10) Phänotyp eingestuft, während nur vier Positionen mit dem 2br-Phänotyp assoziiert waren. Nur fünf Positionen wiesen *CoP*-Werte >0,1 auf, was als >10 % Relevanz für den jeweiligen Phänotyp interpretiert werden kann: Die Positionen 35 (8,4 %) und 69 (13,5 %) wurden als ausschließlich relevant für den 2b- bzw. 2br-Phänotyp eingestuft. Weitere stark 2br-assozierte Positionen waren 234 (20 %) und 235 (14,8 %); während Position 8 (1,5%) nur wenig Signifikanz für den 2br-Phänotyp aufwies. Nur zwei Positionen, 238 (34,6 %) und 240 (14,4 %) wurden als stark relevant für den 2be-Phänotyp eingestuft, aber sie schienen auch essenziell für den 2b-Phänotyp zu sein (27,5 % bzw. 16,1 %).

#### 3.4.1.2 Mutanten-Bibliothek und Expressionsmodell

Basierend auf den Vorhersagen und den in natürlichen Varianten vorkommenden Kombinationen der Substitutionen wurde eine Mutanten-Bibliothek mittels Klonierung und Mutagenese erzeugt. Die SHV-1 diente als ursprünglichste Variante und wurde inklusive der nativen Promotorregion und mit dem eigenen Transkriptionsterminator in den pBT-Klonierungsvektor (Agilent Technologies) ligiert (finales Plasmid pMK3) und in *E. coli*-XL1-blue-Zellen propagiert (MK1 GVO). Das Plasmid wurde dann teilweise iterativ den

Mutagenesen unterzogen (QuikChange II Site Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies). Alle erzeugten SHV-Derivate wurden mittels Sequenzierung bestätigt.

Es wurden 23 Positionen im offenen Leseraster mutagenisiert, so dass 27 Einzel-, 8 Doppel- und 2 Dreifachmutationen sowie zusätzliche Promotormutanten erzeugt wurden. Für diese wurden die MHK für verschiedene  $\beta$ -Lactame (pur und in Kombination mit BLIs) ermittelt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete  $\beta$ -Lactamantibiotika und deren Zuordnung zu den verschiedenen Substanzklassen

Substanzklasse	Substanzen (Abkürzungen)
Penicilline	Amoxicillin (AMX), Ampicillin (AMP), Piperacillin (PIP)
BLI	Clavulansäure (CLA), Sulfbactam (SUL), Tazobactam (TAZ)
1G-Cephalosporin	Cefacolin (CFZ)
2G-Cephalosporin	Cefoxitin (FOX)
3G-Cephalosporine	Ceftazidim (CAZ), Cefotaxim (CTX), Ceftriaxon (CRO), Cefoperazon (CFP), Cefpodoxim (CPD)
4G-Cephalosporin	Cefepim (FEP)
5G-Cephalosporin	Ceftarolin (CPT)
Monobactam	Aztreonam (ATM)
Carbapeneme	Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Ertapenem (ETP)

Das ausgewählte Expressionsmodell, bestehend aus dem pMK3-Plasmid im *E. coli* XL1-blue (MK1), welches keine eigenen BL exprimiert, zeigte MHK-Werte für ausgesuchte Penicilline und Cephalosporine, die sich gut mit anderen Expressionssystemen aus der Literatur vergleichen ließen. Dabei lag die Expression des vorliegenden Modells zwischen den Werten beschrieben für ein *high-copy*-pTZ18R-Plasmid in der Arbeit von Nuesch-Inderbinen *et al.* [73] und dem *low-copy*-pCCR9-Plasmid in der Arbeit von Randegger *et al.* [68]. Da die Expression der SHV-1 dennoch im Vergleich zum klinischen Ausgangsisolat deutlich höher war, wurden die MHK-Werte für die verschiedenen Substrate auf die SHV-1 normiert. Auf Grund des Ein-Well-Fehlers in der klassischen  $\log_2$ -Mikrodilutionsmethode zur Resistenztestung (ISO 20776-1) wurden Unterschiede, die sich um mehr als das Doppelte erhöht haben oder abgefallen sind, als relevant erachtet (Abbildung 9; Werte außerhalb der gestrichelten Linie).



erhöhen. Damit sind diese Substitutionen diagnostisch für die Vorhersage des 2be-Phänotyps wertvoll.

Die Substitutionen an Position 238 gehen in 58,8 % der Fälle mit der Substitution E240K oder E240R einher. In unserer Studie erhöhten beide Substitutionen allein lediglich die MHK von Ceftarolin. Für die E240K-Substitution wurde gezeigt, dass sie die MHK von Cefotaxim [67] und CAZ in natürlichen G238S-Varianten synergistisch erhöht [68]. Damit sind diese Substitutionen ebenfalls diagnostisch interessant, da sie Substratspektrum und Resistenz gegenüber Cephalosporinen erweitern.

Position 179 konnte ebenfalls als relevant für den 2be-Phänotyp bestätigt werden. Der Asparaginsäurerest (D) an Position 179 interagiert mit dem Argininrest an Position 164 und stabilisiert so den sogenannten  $\Omega$ -Loop im SHV-Protein [76] (siehe auch Anhang Abbildung 14). Die Unterbrechung dieser Salzbrücke scheint die Flexibilität der  $\Omega$ -Schleife zu erhöhen, wodurch die sperrigen Cephalosporine in das aktive Zentrum gelangen können.

Die Substitutionen M129V, A243G, S270I und R292Q zeigten eine zweifach erhöhte Resistenz gegen Cefotaxim. Diese Substitutionen liegen unabhängig von anderen 2be-relevanten Substitutionen in mehreren 2be-Varianten vor, so dass davon auszugehen ist, dass sie sich in Kombination mit erhöhter Expression oder anderen Mechanismen (z.B. Porinverlust oder erhöhtem Efflux) als 2be-Phänotyp manifestieren könnten und damit ebenfalls diagnostisch erfasst werden sollten.

Interessanterweise erzeugten einzelne Mutationen an sonst nicht 2be-relevanten Positionen (wie A25S, L35Q oder A146V) eine Erhöhung der Ceftarolin-MHK, die jedoch durch Kombinationen mit anderen nicht 2be-relevanten Substitutionen die Empfindlichkeit für Ceftarolin wieder herstellen. Ferner wurde erhöhte Aktivität gegen Cefepim in der A146T-Mutante in Kombination mit einem starken Promotor beobachtet. In dieser Studie wurden diese Phänomene nicht weiter untersucht, aber der starke Anstieg der Aktivität gegenüber Ceftarolin und Cefepim deutet auf eine mögliche Kreuzresistenz von SHV-Varianten gegenüber Cephalosporinen der 4. und 5. Generation hin, die unabhängig vom ESBL-Phänotyp vorliegen könnte und somit diagnostische Relevanz hat. Um diese Resistenz besser zu verstehen, müssten natürliche Varianten genauer untersucht werden, da hier in der Regel andere Substitutionen enthalten sind, welche die MHK von Ceftarolin und Cefepim beeinflussen könnten. Vor allem im Hinblick auf das deutlich sperrigere Ceftarolin ist unklar, wie es hydrolysiert werden kann, wenn keine sonst typischen Substitutionen vorliegen, die den Zugang zum aktiven Zentrum vergrößern.

#### 3.4.1.4 *Substitutionen im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber BLI*

Die Positionen M69 und E240 waren stark mit dem BLI-resistenten (2br) Phänotyp assoziiert. Beide Substitutionen an Position 69 (M69I und M69L), die bereits in anderen Studien als verantwortlich für den 2br-Phänotyp identifiziert wurden [67, 77], führten auch hier zu einer Resistenz gegenüber Tazobactam und Sulfbactam. Beide Substitutionen an Position 240 (E240K und E240R), die als 2be-relevant vorhergesagt wurden, aber nur eine Erhöhung der Aktivität gegenüber Ceftarolin aufwiesen, vermitteln eine hohe MHK für Tazobactam. Diese Mutationen wurden in keiner der bekannten 2br-Varianten gefunden, daher wurde diese Position nie mit dem 2br-Phänotyp in Verbindung gebracht und es lässt sich nicht ausschließen, dass sie in den natürlichen Varianten eine untergeordnete Rolle bei der BLI-Resistenz spielt. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass diese Position in zukünftigen 2br-Varianten substituiert und der Phänotyp entsprechend verändert wird. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll beim Design neuer molekularer Diagnostika, diese Position zu berücksichtigen.

Die Substitution K234R scheint mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Avibactam verbunden zu sein, was bereits in anderen Studien berichtet wurde [77, 78]. Aufgrund der Nähe zum katalytischen Serin 130 verändert die Substitution K234R den Torsionswinkel von S130, was die Interaktion mit BLI (vor allem Avibactam und Clavulansäure) zu stören scheint [77]. Damit ist diese Position ebenfalls diagnostisch interessant.

#### 3.4.1.5 *Einfluss der Expressionsstärke auf das Resistenzprofil*

Die Substitutionen an der Position 146 (A146T und A146V) zeigten nur leicht erhöhte MHKs für Cefoperazon und Ceftarolin und keinen Effekt auf die BLIs. Im Gegensatz dazu zeigte die IS26-A146V-Mutante, die einen starken Promotor (IS26) besitzt, eine erhöhte Resistenz gegenüber diesem und weiteren Cephalosporinen (Ceftazidim und Cefepim) sowie gegen fast alle getesteten  $\beta$ -Lactam/BLI-Kombinationen, was darauf hindeutet, dass die Promotoraktivität nicht nur wesentlich für den ESBL-Phänotyp ist, sondern eine Schlüsselrolle für die BLI-Resistenz besitzt. Der Grund hierfür liegt an der Tatsache, dass sich bei höherer Konzentration der Enzyme, welche mit Ausnahme von Avibactam durch die BLI nahezu irreversibel inhibiert werden, das Gleichgewicht verschiebt und ausreichend Enzym vorhanden ist, um die  $\beta$ -Lactame effektiv zu hydrolysieren. Die Promotoraktivität lässt sich jedoch deutlich schwieriger durch PCR-basierte Verfahren erfassen, zumal die hier zugrunde liegenden Mutationen bei den BLI wenig erforscht sind und die Expression häufig durch mehrere Promotoren kontrolliert wird. Zusätzlich wird dies durch die Integration der Resistenzgene in mobilen genetischen Elementen (wie Integrons oder Transposons) erschwert, da sie weitere Promotoren mitbringen, welche die Expression der Resistenzgene und damit die MHK erhöhen können (siehe ISAb1 und OXA-51, Kapitel 3.3.3).

### 3.4.2 Veränderungen im Resistenzprofil bestimmter CTX-M-Varianten für Cephalosporine unter selektivem Druck

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 6 im Verzeichnis eigener Publikationen)

In der Regel wird bei der Interpretation eines Resistogrammes davon ausgegangen, dass beim Vorliegen einer Resistenz gegenüber einem Cephalosporin der höheren Generation (>3G) eine ESBL vorliegt, so dass im Resistogramm alle anderen Cephalosporine als ‚resistent‘ gesetzt werden, auch wenn deren MHK-Werte unterhalb der klinischen EUCAST-Breakpoints liegen. Dieses Phänomen kann man insbesondere bei einigen der hochprävalenten CTX-M-BL beobachten: So sind die Varianten CTX-M-1 and CTX-M-14 resistent gegenüber Cefotaxim, Ceftriaxon and Cefepim (MHKs 32-64 mg/l), jedoch sensibel gegenüber Ceftazidim (MHK 1-4 mg/l); wohingegen die CTX-M-15 eine hohe MHK für Ceftazidim (16-32 mg/l) aufweist [79-81]. Dabei unterscheidet sich die CTX-M-15 nur durch die Substitution D240G von CTX-M-1, welche (neben der Substitution P167S) für die Ceftazidim-Resistenz bei den CTX-M verantwortlich gemacht wird [82]. Die CTX-M-14 hat deutlich mehr Unterschiede in der Aminosäuresequenz, jedoch keine andere Substitution, die einen ceftazidimresistenten Phänotyp erzeugt.

Angeregt durch eine EUCAST-Experten-Empfehlung aus dem Jahr 2011 [83], in der darauf verwiesen wurde, dass die neuen EUCAST-Breakpoints eine MHK-basierte Interpretation für die Antibiose mit Cephalosporinen eröffnen, sollte die Zuverlässigkeit einer solchen Herangehensweise im Fall der häufigsten CTX-M-Varianten getestet werden. Dazu wurden diese *in vitro* einer Evolutionssimulation unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen unterzogen und die Veränderungen im Resistenzprofil sowie die dahinterstehenden Mechanismen untersucht. Die natürlichen Plasmide, welche die CTX-M-1, CTX-M-14 oder CTX-M-15 beinhalteten, wurden in den natriumazidresistenten *E. coli*-Stamm K12J53 konjugiert, so dass der genetische Hintergrund identisch war. Die Plasmide besaßen keine anderen BL-Gene, was mittels PCRs bestätigt wurde. Die MHK der Transkonjuganten wurden erfasst. Danach wurden sie verschiedenen selektiven Kulturbedingungen (1/2 x MHK für Cefotaxim oder Ceftazidim) ausgesetzt und sowohl das Wachstum/Fitness (Wachstumskurven) als auch die Veränderungen des Phänotyps (MHK-Bestimmung) für zufällig ausgewählte 100 Kolonien zu verschiedenen Zeitpunkten erfasst. Für ausgewählte, final resistent gewordene Mutanten und die Ausgangsstämme wurden die CTX-M-Gene sequenziert sowie die Efflux-Aktivität fluoreszenzphotometrisch und die Veränderungen der Transkriptionslevel durch *Real-time*-PCR der CTX-M-Gene bestimmt.

Das Wachstum aller Transkonjuganten wurde zwar durch die subletale Konzentration der Antibiotika verzögert, die Kulturen sind jedoch nicht abgestorben. Die CTX-M-1 und CTX-M-14 tragenden Transkonjuganten erlangten innerhalb von 24 Stunden unter selektiven Bedingungen eine Ceftazidim-Resistenz, die um das 32-fache (für die ursprüngliche CTX-M-

1) bzw. 8-fache (für die ursprüngliche CTX-M-14) lag. Unter nicht- und cefotaximselektiven Bedingungen wurden ebenfalls leicht erhöhte (2- bis 4-fach) Ceftazidim-MHK erreicht. Ceftazidimselektive Bedingungen erhöhten die Häufigkeit der resistenten Mutanten signifikant dreifach (CTX-M-1) und siebenfach (CTX-M-14) im Vergleich zu nichtselektiven Bedingungen.

Die resistent gewordenen Mutanten wiesen keine genetischen Veränderungen in den CTX-Genen auf. Die Efflux-Aktivität der Mutanten war nicht bei allen Mutanten erhöht, weshalb Efflux als primäre Ursache für die hohen MHK für Ceftazidim ausgeschlossen wurde. Der Verlust oder die Fehlfunktion von Porinen, die eine erleichterte Diffusion von Nährstoffen, aber auch  $\beta$ -Lactamen bewerkstelligen, wurde nicht untersucht. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies eine wesentliche Rolle bei der Ceftazidim-Resistenz gespielt hat. Da jedoch in den resistenten Mutanten die Expression des CTX-M-1-Gens eine deutlich höhere Aktivität aufwies, erscheint die plausibelste Erklärung in der sogenannten stochastischen Genexpression zu liegen. Diese geht davon aus, dass jede Population phänotypisch heterogen ist, so dass es immer Individuen mit niedrigeren und höheren Expressionsniveaus und damit MHK gibt, die im Mittel die jeweilige MHK einer Kultur ergeben [84].

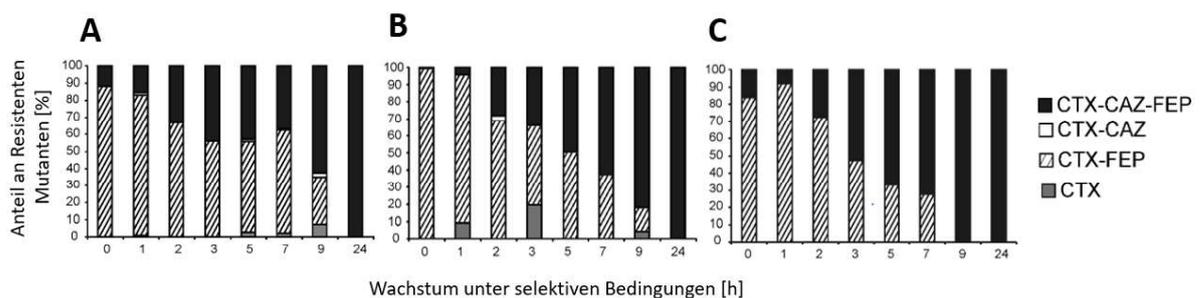


Abbildung 10: Prozentualer Anteil an resistenten Mutanten der Transkonjuganten-Kulturen mit CTX-M-1, die unter nichtselektiven (A) oder selektiven Bedingungen (B)  $\frac{1}{2}$  MHK Ceftaxim und (C)  $\frac{1}{2}$  MHK Ceftazidim kultiviert wurden.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde je ein Aliquot auf nichtselektives Medium ausplattiert und 100 Kolonien auf verschiedene selektive Medien (Konzentration entsprechend den EUCAST-Breakpoints für die Einstufung als „resistent“) übertragen (Legende). CTX = Cefotaxim. CAZ = Ceftazidim, FEP = Cefepim, Bildquelle nach Costa Ramos *et al.*, [85].

Eine phänotypische Heterogenität konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Die Ausgangskulturen wiesen bereits einzelne Kolonien mit höheren MHK für Ceftazidim ( $>2$  mg/l, z.B. 10 % der Klone mit CTX-M-1) auf (Abbildung 10). Die stochastische Genexpression ermöglicht eine wesentlich schnellere Anpassung einer Population an selektive Bedingungen als die Mutagenese und könnte damit erheblich zur beobachteten Entstehung von resistenten Isolaten unter Antibiose beitragen. Allerdings sind solche Resistenzen nicht besonders stabil, da unter fehlendem selektiven Druck die Expressionsstärke und damit der MHK in der Regel wieder sinken. Diese Art der Resistenz

wird molekular diagnostisch bislang nicht erfasst, da verfügbare Tests auf DNA-Basis durchgeführt werden und die Expressionsstärken damit nicht berücksichtigen. In der üblichen mikrobiologischen Resistenztestung ist es ebenso unklar, ob und wie schnell dieser Effekt durch die Vorkultivierung ohne Selektivität verloren geht.

Die Therapie mit Cephalosporinen wird bei kritisch kranken Patienten oft unterdosiert [86, 87], womit das Auftreten von Klonen mit stochastisch erhöhten MHK sehr wahrscheinlich erscheint, was durch Berichte zu Therapieversagen bei CTX-M-exprimierenden ceftazidimempfindlichen Bakterien unterstützt wird [88, 89].

In der vorliegenden Arbeit wurde damit gezeigt, dass ausschließlich MHK-basierte Therapieempfehlungen ein hohes Risiko für Therapieversagen bergen und die zugrundeliegenden Mechanismen der Resistenz stets berücksichtigt werden sollten, was derzeit unzureichend diagnostisch erfasst wird.

### 3.5 Mobile genetische Elemente und deren Bedeutung für die Verbreitung der $\beta$ -Lactamasen

#### 3.5.1 Verbreitung der BL am Beispiel eines VIM-Integrans

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 4 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Die VIM-Carbapenemasen gehören zu den sogenannten Metallo-BL (Klasse B) und kommen insbesondere assoziiert mit Klasse-1-Integrans vor. Die VIM-1 wurde in Verona (Italien) aus einem *P. aeruginosa* isoliert, daher deren Bezeichnung als *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamases* [90]. Zeitgleich und darauffolgend wurden zunehmend weitere VIM-Varianten in anderen Ländern und in anderen Spezies nachgewiesen, einige chromosomal kodiert [91]. Die Klasse-1-Integrans wurden bereits früher mit der nosokomialen Verbreitung von resistenten gramnegativen Bakterien in Verbindung gebracht [92]. Diese Integrans bauen dank einer Intergrase (*intI1*) Resistenzgenkassetten ein, die sowohl durch Transposition als auch Konjugation in selektiver Umgebung, wie Krankenhäusern, Antibiotikaresistenzgene effizient verbreiten.

Am 08.02.2016 wurde am UKJ ein fluorochinolonsensibler und carbapenemresistenter *Citrobacter freundii* bei zwei Patienten aus Rektalabstrichen während des Routinescreenings nachgewiesen. Die Carbapenemase wurde mittels molekularer Testung als VIM identifiziert. Aufgrund der lokalen und zeitlichen Übereinstimmung wurden Kontaktpatienten ebenfalls getestet und dabei in 12 von 14 Patienten *C. freundii* mit identischem Resistogramm identifiziert. Da bei Patienten auf weiter entfernten Stationen vergleichbare Befunde vermehrt auftraten, erfolgte ein Screening der Patienten auf allen Stationen sowie der Patientenzimmer, der Kantine, medizinischer Instrumente und Personal (nach Einwilligung),

um die Ursache und das Ausmaß des Kolonisierungsausbruchs festzustellen. Bis Juni 2016 wurden auf diese Weise 76 kolonisierte Patienten identifiziert.

Insgesamt wies der Erreger eine geringe Virulenz auf und war empfindlich gegenüber mehreren Klassen von Antibiotika. Es gab nur einen Fall einer klinischen Infektion, die mit Piperazillin/Tacobactam erfolgreich behandelt wurde. In den Nachuntersuchungen zeigten 74,3 % der Patienten eine spontane Eradikation innerhalb von 6 Monaten nach der Hospitalisierung.

Der VIM-produzierende *C. freundii* konnte nach Anreicherungskultur in Abstrichen aus der Kuchenmischmaschine, in der die Salate und Süßspeisen vorbereitet wurden, isoliert werden, was nahelegte, dass die Kontamination der Süßspeise die Ursache für die Kolonisierung der Patienten war. Nach Messung der Temperaturkurven der Mahlzeiten und der Süßspeise während der Essensvorbereitungsroutinen auf den Stationen wurde *in vitro* die Vermehrung des *C. freundii* unter diesen Bedingungen nachgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Mengen des Erregers in der Süßspeise nach wenigen Stunden bei Raumtemperaturen bis zu 34-fach höhere Zelldichten erreichen als bei 15 °C (Kühlkette), was für die Kolonisierung des Darms auszureichen schien.

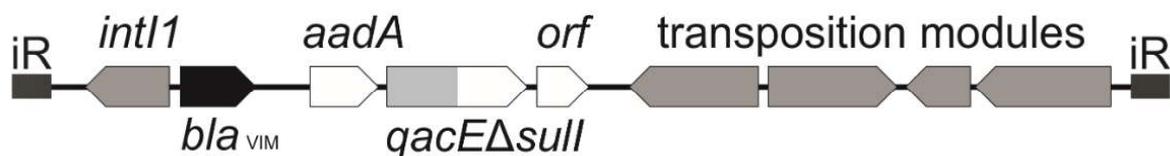


Abbildung 11: Schematische Genkarte des identifizierten Klasse-1-Integrans, bestehend aus den flankierenden iR-Sequenzen (*inverted repeats*), die als Erkennungsstellen für die transposase dienen, *int11* (Integrase), der Metallo- $\beta$ -lactamase (*bla<sub>VIM</sub>*), *aadA* (Aminoglycoside-Resistenz), *qacE $\Delta$ sull* (Sulfonamid-Resistenz deletiert durch die Insertion des *qacE* Gens), *orf* (unbekanntes Leseraster) und vier Modulgene für die Transposition.

Bildquelle nach Pletz *et al.*, [93].

Eine Sequenzierung des Ausbruchsstammes zeigt, dass die VIM auf einem Klasse-1-Integron (Abbildung 11) und plasmidal lokalisiert war. Da bereits vor dem Ausbruch (seit Mitte 2015) andere Enterobakterien mit einer VIM aufgefallen sind, wurden diese retrospektiv sequenziert. Interessanterweise wurde bei verschiedenen, nichtklonalen *Enterobacter cloacea*, *K. oxytoca* sowie *C. freundii* dieselbe VIM gefunden, allerdings assoziiert mit anderen Integrans oder Plasmiden, was darauf hindeutet, dass sich diese Carbapenemase sehr flexibel mittels verschiedener mobiler Elemente verbreitet. Durch Beprobung der Gemüselieferungen konnten VIM-freie *C. freundii* in vorgeschnittenen Karotten nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Quelle hinweist. Es ist bislang unklar, ob das VIM-Gen/-Plasmid im Krankenhaus (z.B. von den hier bereits verbreiteten VIM) oder beim

Hersteller in den Ausbruchsstamm gelangt ist. Da die VIM-freien *C. freundii*-Isolate leider nicht asserviert wurden, konnten keine weiterführenden genetischen Analysen folgen.

Zusammenfassend zeigt dieser Vorfall, wie schnell eine Kolonisierung durch eine lebensmittelbedingte Quelle verursacht wird und wie wichtig die Einhaltung der Kühlketten für die Kontrolle solche Fälle ist. Außerdem verdeutlicht es, dass insbesondere vor dem Hintergrund hochmobiler genetischer Elemente und deren speziesübergreifender Transmission vor allem in Enterobakterien die Vorschriften für die Lebensmittelsicherheit dringend revidiert werden sollten. Derzeit sind nur Screenings auf lebensmittelbedingte Krankheitserreger mit hoher Virulenz (z. B. *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*) vorgeschrieben. Eine Erweiterung auf andere Bakterienspezies, wie *C. freundii*, oder auf relevante Resistenzen (wie die ESBL und Carbapenemasen) würden helfen, solche Vorfälle und die Verbreitung durch Darmbesiedlung zu minimieren.

### 3.5.2 Genetische Diversität der KPC-Plasmide

(Die Ergebnisse beruhen auf der Publikation Nr. 2 im Verzeichnis eigener Publikationen)

Als derzeit einzige Klasse-A-Carbapenemasen breiten sich die KPC-Varianten erfolgreich aus. Deren Bezeichnung geht auf ihre anfänglich auf *K. pneumoniae* beschränkte Vorkommen zurück, doch inzwischen lassen sich KPC auch in anderen gramnegativen Spezies detektieren. Derzeit werden mehr als 32 Varianten unterschieden, die vermutlich alle auf ein Transmissionsereignis zurückgehen und Derivate der ersten in Humanpathogenen nachgewiesenen KPC darstellen. KPC-2 und KPC-3 sind weltweit die häufigsten Varianten [94].

Die KPC sind vor allem mit den pkpQIL-ähnlichen Plasmiden assoziiert [95], die weitere Resistenzgene und Virulenzfaktoren sowie Gene, die eine gute Übertragung und Plasmidstabilität vermitteln, tragen, so dass sie sich erfolgreich epidemiologisch durchsetzen können. Die KPC sind zusätzlich innerhalb von Transposons lokalisiert, hier insbesondere Tn4401, was eine hohe Mobilität auch innerhalb eines Bakteriums nach sich ziehen kann [96].

In der vorliegenden Studie wurde eine Analyse der bekannten KPC-Plasmide vorgenommen, um Fortschritt und Diversifizierung dieser besser zu verstehen, was für die Entwicklung neuer Diagnostika und therapeutische Entscheidungen wichtige Informationen liefern kann. Da ein Sequenzvergleich von Plasmiden aufgrund der hohen Plastizität nicht mit den herkömmlichen Analysetools, wie paarweiser oder multipler Sequenzvergleich, durchführbar ist, wurde ein eigener Algorithmus entwickelt.

Aus der NCBI-Datenbank wurden mittels der KPC-2-Sequenz (NC\_019161.1), die als die ursprüngliche definiert wurde, 681 Sequenzen extrahiert. Sequenzen, die kürzer als 5 kbp

waren, wurden verworfen, da sie weniger als die Hälfte der natürlichen Plasmiden darstellen und somit keine zuverlässigen Aussagen erlaubten. Die verbleibenden 442 Plasmidsequenzen wurden mittels des eigenen Binning-Tools in 153 Plasmidtyp-Gruppen (PG) eingeteilt. Nach einer weiteren Qualitätsprüfung (mind. 10 % Übereinstimmung mit KPC-2, e-Wert  $\leq 10^{-100}$ ) blieben 394 Plasmide als weiter auswertbar in der Untersuchung. Anschließend erfolgte die Annotation der Gene mittels diverser offener Tools und Datenbanken (wie *abricate* anhand der Datenbanken CARD [97], ARG-ANNOT [98], ResFinder [99] und Prokka [100]). Die Inc-Gruppen wurden nach Carattoli *et al.* [101] und die Transposons nach Pérez-Chaparro *et al.* [102] annotiert. Die genetische Distanz (Verwandtschaft) der PG wurde mittels des MinHash-Algorithmus berechnet [103].<sup>aa</sup>

Das KPC-2-Allel kam am häufigsten vor (75,38 %), gefolgt vom KPC-3-Allel (21,07 %). Weitere identifizierte KPC-Varianten waren KPC-4, -5, -6, -8, -21, -24 und -33. Elf Plasmide trugen mehr als eine Kopie des KPC-Gens. Andere BL waren in 62,09 % aller KPC-PG vorhanden, jedoch außerhalb des KPC-Transposons lokalisiert; in einigen Fällen waren sie auf Integron-Strukturen lokalisiert. Die TEM-BL begleiteten die KPC am häufigsten (53,05 %); als zweithäufigste kamen OXA-Varianten, die jedoch nicht zum carbapenemasereichen Clustern gehörten, vor (28,93 %). Etwas seltener befanden sich auch CTX-M- und SHV-Varianten und nur vereinzelt andere BL (wie VEB, CARB, LAP, CMY, DHA oder FOX) auf den Plasmiden.

In 51,63 % der PG wurden Gene für die stabile Verteilung auf die Tochtergenerationen (*stbAB* und *parAB*) und in 60,13 % Toxin/Antitoxin-Systeme gefunden. Außerdem waren in 41,17 % der Plasmide Inhibitoren der SOS-Antwort (*psiA* and *psiB*), die eine stabile Konjugation gewährleisten [104], vorhanden. Interessant war die Anwesenheit des *umuDC*-Operons in 68,62 % der PG, das für die fehleranfällige SOS-DNA-Polymerase V kodiert. Diese wird über die RecA-Kaskade induziert, wenn in der Zelle zu viele DNA-Schäden und Einzelstrang-DNA vorhanden ist, um im Schadensfall über die apurinieren Stellen zu synthetisieren, was mit einer hohen Mutationsrate einhergeht und die schnelle Diversifizierung der KPC binnen nur einer Dekade erklären könnte.

Fast die Hälfte der Plasmide konnte mindestens einer Inc-Gruppe zugeordnet werden, wobei insgesamt 13 Inc-Gruppen identifiziert wurden (FII, N, U, A/C, A/C2, Q1, Q2, FIB, FIA, L/M, I2, P, X3 (Abbildung 12)). Dabei lagen 48 der Plasmide als Fusionsplasmide vor, wovon 42 mindestens zwei Inc-Gruppen aufwiesen.

Der Vergleich der 394 KPC-Plasmide verdeutlicht, wie plastisch diese sind und wie schwierig es ist, hier eine phylogenetische Aussage über Verwandtschaften zu treffen. Eine Zeitlinie abzubilden oder bestimmte Ereignisse vorherzusagen ist hier nicht möglich, was vor allem an

<sup>aa</sup> Alle Sequenzen und die Berechnungen wurden unter [https://github.com/replikation/Rep3\\_KPC\\_plasmid\\_analysis](https://github.com/replikation/Rep3_KPC_plasmid_analysis) veröffentlicht.

den unzureichenden Sequenzeinträgen für Plasmide liegt. In den Datenbanken stammt der Großteil der Sequenzdaten aus Technologien, wie Illumina, die eher kurze Sequenzabschnitte generieren. Das erschwert deutlich ein zuverlässiges Assambling von hochrepetitiven Sequenzen, wie bei Plasmiden. Allerdings nimmt die Long-Read-Sequenzierung weltweit zu, so dass in nicht allzu ferner Zukunft die Datenbanken große Datenmengen zu Plasmiden aus den verschiedenen Umweltischen verfügbar haben werden, was neue Erkenntnisse zur Transmission von Resistenzgenen oder Mobilgenen aus Umweltkeimen in Humanpathogenen ermöglichen wird.

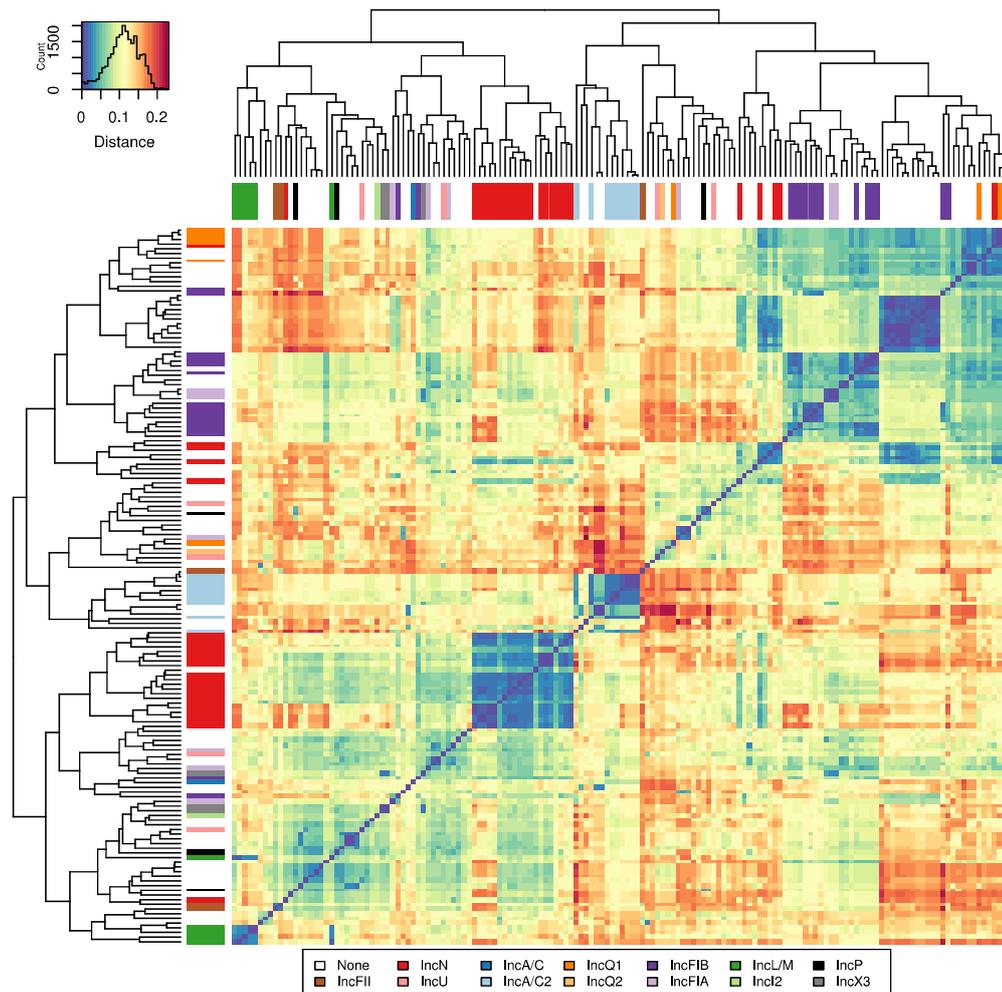


Abbildung 12: Heatmap-Diagramm der genetischen Distanzen zwischen den 153 Plasmidgruppen.

Der blau-rote-Gradient stellt den geschätzten Mash-Abstand dar (Legende oben links, spiegelt die Menge der Daten wider, die jeder Farbe/Distanz entspricht). Dunkelblau gekennzeichnet sind eng verwandte PG mit ähnlichem Gengehalt, aber unterschiedlichen Genanordnungen. Auf den X- und Y-Achsen wurden die 153 PG basierend auf ihrem Abstand zueinander angeordnet. Die Farben an den phylogenetischen Bäumen entsprechen den verschiedenen Plasmid-Inkompatibilitätsgruppen (Legende unten). Bildquelle nach Brand *et al.*, [105].

Bereits aus heutiger Sicht erweisen sich Inc-Gruppen-Gene als unzulänglich, um Plasmide sinnvoll zu klassifizieren. Der hier entwickelte Algorithmus ermöglicht eine deutlich sinnvollere Auflösung und Klassifizierung der Plasmide, was jedoch an anderen Plasmiden weiter optimiert werden muss.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Das One-Health-Konzept und die Rolle des horizontalen Gentransfers für die Verbreitung von $\beta$ -Lactamasen

Das plötzliche Aufkommen neuer BL-Gruppen im klinischen Alltag fiel zeitlich mit der Zunahme an anderen epizootischen, zoonotischen und humanen Infektionskrankheiten und Epidemien aber auch anderen Krankheiten, die vor allem auf externe Umweltfaktoren zurückgeführt werden (Allergien, Autoimmunerkrankungen, Tumore), ungefähr zusammen. Dieser Trend ist nicht zuletzt auf die zunehmende Globalisierung, wachsende Bevölkerungsdichte und Umweltbelastung zurückzuführen [106]. Dies löste eine Diskussion über die Transmissionsrouten sowie die Rolle von Umweltfaktoren (im allgemeinen Sinn) und die des horizontalen Genaustauschs zwischen Umwelt- und klinischen Erregern aus und führte schließlich zum *One-Health*-Konzept<sup>bb</sup>. Es umfasst die globale und sektorübergreifende Aufrechterhaltung der ‚Gesundheit‘ von Menschen, Tieren, Pflanzen und Ökosystemen [106]. Dabei ist es ausschlaggebend, den Zusammenhang Mensch – Tier – Ökosystem sowie die Folgen menschlicher Aktivitäten darauf und auf die Entstehung und Verbreitung von Krankheitserregern zu verstehen. Daraus sollen gezielte Maßnahmen abgeleitet werden, um Infektionsrisiken zu minimieren.

Verschiedene Arbeiten weisen darauf hin, dass der horizontale Gentransfer von Resistenzgenen und Virulenzfaktoren sowohl aus dem Bodenmikrobiom, einem der vielfältigsten Habitate, als auch in den Abwasserströmen, wie Kläranlagen, zur Verbreitung von Resistenzgenen in klinisch relevanten Spezies maßgeblich beiträgt [107-109]. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der hohe Antibiotikaverbrauch zu hohen Konzentrationen in den Abwasserströmen und damit in Oberflächengewässern und Boden führt [110, 111], so den Selektionsdruck erhöht und horizontalen Gentransfer von Multiresistenz-Plasmiden, die oft eine oder mehrere BL tragen, fördert.

In der Publikation Nr. 5 konnte demonstriert werden, dass das natürliche BL-Resistom eine Vielzahl von BL-Varianten und eng verwandten Enzymen birgt, dessen Substanzspektren größtenteils noch unbekannt sind, da die dazugehörigen Gene in der Regel durch Sequenzierung entdeckt und deren biochemische Eigenschaft noch nicht untersucht wurden. Der Blick auf die Entwicklung der BL-Resistenz im klinischen Sektor zeigt, dass bis dahin nicht bekannte ESBL sowie die Carbapenemasen zeitgleich mit den jeweiligen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auftauchen, und damit nicht unbedingt das Ergebnis vom Mutationsereignissen von sich bereits in klinischen Erregern ausbreitenden BL waren. Vielmehr wurden diese Varianten aus Umwelterregern über die Translokation von intrinsisch kodierten Genen auf

---

<sup>bb</sup> <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>

hochmobilen Elementen mobilisiert und gelangten über horizontalen Gentransfer in Humanpathogene. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass im natürlichen BL-Resistom bereits Varianten existieren, die neu eingeführte (z.B. Ceftarolin) und zukünftige  $\beta$ -Lactame bereits hydrolysieren könnten oder unempfindlich für neue Inhibitoren, wie z.B. Avibactam oder Relebactam, sind und es nur eine Frage der Zeit ist, bis sie das Repertoire der klinischen Isolate um diese Eigenschaften ergänzen. Das konnte in der Publikation Nr. 1 für Ceftarolin und Avibactam für die SHV-BL gezeigt werden. Bestimmte, in klinischen Varianten vorkommende Mutationen, die sonst nicht direkt mit einem ESBL- oder BLI-Phänotyp in Verbindung stehen, erhöhen die MHK für diese relativ neuen Wirkstoffe.

Zwar spielt die Diversifizierung der Varianten in einer hochselektiven Umgebung (z.B. dem Patienten unter Antibiose) auch eine Rolle und war vermutlich die treibende Kraft bei der zunehmenden Unempfindlichkeit der ersten BL, wie SHV, gegenüber erweiterten Penicillinen, Cephalosporinen und BLI, der Prozess der Adaptation mittels Mutagenese scheint jedoch deutlich länger zu benötigen, eine Mutante mit wesentlich verändertem Resistenzprofil hervorzubringen als der horizontale Gentransfer, weshalb die ESBL, wie OXA und CTX-M (bei diesen sogar zeitgleich verschiedene Gruppen), und nun auch die Carbapenemasen, wie KPC oder VIM, in Gramnegativen seit Mitte der 1980-er Jahre vor allem durch Transmissionen aus dem Umweltreservoir und nicht durch Mutagenese auftauchten. In der Publikation Nr. 6 konnte für die hochprävalenten CTX-M-Varianten gezeigt werden, dass neben Mutagenesen die stochastische Genexpression genügt, um dem selektiven Druck effektiv entgegenzuwirken. Dieses Prinzip erfordert allerdings eine gewisse Enzymaktivität gegenüber dem entsprechenden Substrat, damit das Massenwirkungsgesetz hier greifen kann. Für viele der ESBL ist bekannt, dass sie eine rudimentäre Aktivität für Carbapeneme ausweisen (wie CTX-M [112], SHV-38 [113]), die in Kombination mit anderen Mechanismen, wie erhöhter Expression der BL oder der Effluxpumpen und/oder Verlust der Porine, zu einem Carbapenemase-Phänotyp führen können [114, 115].

Eine weitere Ursache für die beobachtete schnelle Transmission von Resistenzgenen gegen neue Wirkstoffe könnte am steigenden selektiven Druck durch die Antibiotikaverunreinigung der Umwelt liegen. Diese erhöht in der Regel die Mutationsfrequenz [116] sowie den genetischen Austausch durch Konjugation, Transformation und Transduktion und könnte damit die Etablierung neuer Resistenzen in Umweltbakterien fördern, was *in vitro* bereits bewiesen wurde [117, 118]. In der Publikation Nr. 2 wurden zudem zahlreiche KPC-Fusionsplasmide identifiziert, was verdeutlicht, dass zusätzliche Rekombinationsprozesse neue mobile Elemente mit kombinierten Eigenschaften, wie Erweiterung der Resistenzen, Virulenzfaktoren sowie der Wirtsspektren, erzeugen, was gepaart mit hohen Bakteriendichten und Vermischung von Umweltbakterien und Humanpathogenen in Abwasserströmen einen sichtbaren Effekt hervorbringt.

Dieser Fragestellung widmen sich nun verschiedene Folgeprojekte des Forschungsbereiches (FB) ‚Laborforschung‘ des Instituts für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene am Universitätsklinikum Jena (IIMK). Beispielsweise werden in Kooperation mit der Schwedischen Landwirtschaftsuniversität (SLU, Uppsala) und der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL, Friesing) Mikrobiome und Resistenzgene entlang der Abwasser- und Abfallprozessierung in Biogasanlagen untersucht, um die Nachhaltigkeit der Recycling-Systeme für organischen Abfall zu eruieren. Ferner wird in einem Forschungs- und Entwicklungsprojekt mit dem Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT, Jena), Mildendo GmbH (Jena) und SIOS Meßtechnik GmbH (Ilmenau) an einem plasmidbasierten, markierungsfreien Nachweissystem, basierend auf der lokalen Oberflächenplasmonresonanz (LSPR) an Goldnanopartikeln, für Resistenzgene geforscht (Projekt PbR).

## 4.2 Sekundäre Mechanismen der Resistenz und deren diagnostische und therapeutische Folgen

Die Prävalenz für invasive carbapenemresistente Enterobakterien (CRE) in Deutschland liegt derzeit zwar nur bei ca. 1 %, die Tendenz ist jedoch steigend. In süd- und osteuropäischen Ländern liegen die Zahlen bereits deutlich höher, z.B. in Polen bei >5% und in Griechenland sogar bis zu 75% (<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>). Damit stellen die CRE zunehmend ein klinisches Problem für die Patientenversorgung, insbesondere für schwerkranke Patienten auf Intensivstationen, dar. Die Carbapenem-Resistenz wird allerdings zu einem nicht unerheblichen Teil (je nach Spezies bis zu >80 %) durch Sekundärmechanismen, wie Efflux und Porinverlust, gepaart mit einer ESBL (z.B. CTX-M) hervorgerufen [114, 115]. Zusätzlich können echte Carbapenemasen vorliegen, wodurch eine mikrobiologische, aber auch molekulare Differenzierung schwierig wird. Insbesondere bei Pseudomonaden liegen oft alle Mechanismen gleichzeitig vor [119, 120]. Dies Sekundärmechanismen resultieren zusätzlich in einer erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber weiteren, therapeutisch wichtigen Antibiotika, wie Fluorchinolonen, Aminoglycosiden und Tetracyclinen [121]. Das schränkt die Therapieoptionen stark ein. Studien zufolge kann ein carbapenemasenegativer CRE jedoch weiterhin gut mit Cephalosporin in Kombination mit einem BLI (Ceftazidim/Avibactam) behandelt werden [122], was die Nutzung der Carbapeneme einspart und so die vorzeitige Etablierung von echten Carbapenemasen hinauszögert.

Ein routinemäßiger phänotypischer Carbapenem-Resistenz-Befund hat zudem weitreichende hygienische Maßnahmen (Isolation, ggf. aggressive Antibiose) für den Patienten zur Folge und eine Deeskalation der Antibiose ist erst nach molekularer Bestätigung möglich. Das verdeutlicht, wie essenziell molekulare Diagnostik im Zusammenhang mit MRGN ist. Die kommerziell erhältlichen molekularen Tests adressieren jedoch nur wenige hochprävalente Zielgene. So werden neue oder weniger prävalente Varianten übersehen. Die Limitation in

der Breite der Zielgene liegt an den klassischen PCR-basierten Ansätzen, die beim Multiplexing mit zunehmender Anzahl der adressierten Gene an Sensitivität und Spezifität verliert [123]. Deshalb sind dringend neue Ansätze in der Diagnostik erforderlich.

Hier entwickelt der FB ‚Laborforschung‘ des IIMK in verschiedenen Projekten neue molekulare Methoden. Im Projekt DRESI (Partner IPHT und Bling AG (Jena)) wird an einer kartuschenintegrierten *point-of-care* (POC)-Lösung für die Probenaufbereitung (DNA-Isolation aus Vollblut, molekulare Voramplifikation) und hochauflösenden Einzelmolekül-Multiplex-Assay (PCR-basiert) in einem Nanoreaktor-Format geforscht. Diese soll eine Detektion von Resistenzen und Spezies unterhalb einer Stunde direkt auf der Intensivstation ermöglichen. In einem anderen Projekt wird in Kooperation mit der GenID GmbH an einem fluoreszenzbasierten Nachweis von Aminosäuresubstitutionen bei den ESBL- und BLI-resistenten Klasse A-BL, wie SHV oder TEM, geforscht. Dieser wird zusammen mit anderen BLI in einem Array zusammengefasst und soll eine preiswerte und zuverlässige Differenzierung von ESBL, BLI-Resistenz und Carbapenemasen erstmalig ermöglichen.

### 4.3 Molekulare Epidemiologie

Während initial eine speziestypische Expression bestimmter BL-Klassen erfolgte, zeigt sich in den letzten Dekaden eine speziesunabhängige Evolution. Wie bereits oben diskutiert (Kapitel 4.1) liegen die Ursachen im zunehmenden Selektionsdruck, der Integration der Gene auf mobilen Elementen und dem horizontalen Genaustausch, insbesondere der Konjugation von Plasmiden, auch zwischen nichtverwandten, gramnegativen Spezies. Dies konnte in den Publikationen Nr. 2 und 3 ebenfalls demonstriert werden. Damit sind PCR-basierte Nachweismethoden nur bedingt für eine vertrauenswürdige klinische Epidemiologie geeignet.

Nach dem Kolonisierungsausbruch im Frühjahr 2016 am UKJ (Publikation Nr. 4) wurden retrospektiv bis zum Juli 2015 verschiedene VIM-Isolate sequenziert. Dies offenbarte, dass das VIM-Integron, das im *C. freundii*-Ausbruchstamm identifiziert wurde (Abbildung 13, grün unterlegt), bereits in *K. oxytoca* auf einem anderen Plasmid vorlag, der in Herbst 2015 einen kleineren Ausbruch verursachte (Abbildung 13, gelb unterlegt). Dieses Plasmid wiederum breitete sich bereits seit mindestens Sommer 2015 in verschiedenen Enterobakterien am UKJ aus und könnte ein Produkt eines Transpositionereignisses in einem *E. cloacae*-Isolat gewesen sein, in dem das VIM-Gen in Kopie auch im Chromosom gefunden wurde (Abbildung 13, rot unterlegt). Seitdem wurde am UKJ durch das IIMK eine sequenzbasierte Überwachung der MRGN etabliert. Das VIM-Plasmid sowie das Integron werden seitdem immer wieder in verschiedenen Enterobakterien gefunden. Derzeit ist unklar, ob es sich um einen andauernden ‚Plasmid-Ausbruch‘ handelt oder dieses Plasmid generell besonders prävalent ist und immer wieder in das UKJ durch Patienten ‚eingeschleppt‘ wird. Um das beantworten zu können, fehlen Sequenzdaten von anderen lokalen Quellen.

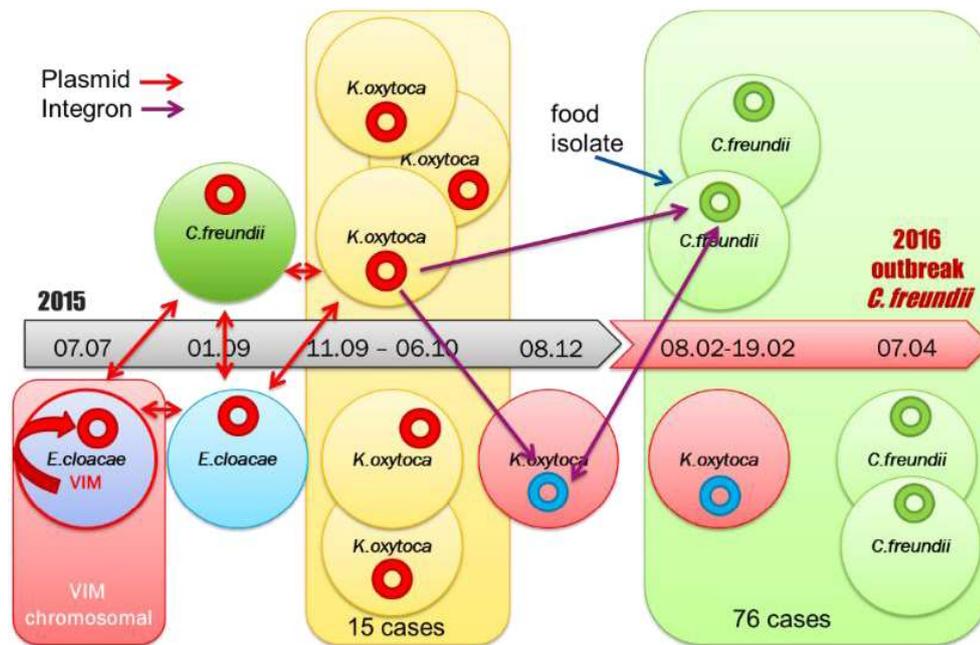


Abbildung 13: Rekonstruktion eines möglichen Szenarios für die am UKJ stattgefundenen Ausbrüche und Befunde von Enterobakterien mit einer VIM-MBL basierend auf Genomsequenzierungsdaten.

Die Pfeile zeigen mögliche Transmissionsrouten von Plasmiden (rot) oder dem Integron (lila). Bildquelle: Christian Brandt (unveröffentlicht).

Die Genomsequenzierung bietet für die Überwachung viele Vorteile; es existieren jedoch noch einige Einschränkungen, die einen breiten Einsatz in der klinischen Routine und der Überwachung erschweren. Die Kosten für die Genomsequenzierung sind in den letzten Jahren durch neue Technologien und verbesserte Performance erheblich gesunken, dennoch betragen sie je nach Technologie und Anzahl der Proben pro Lauf zwischen ca. 100-300 € (basierend auf kommerziellen Angeboten und eigenen Berechnungen). Das ist immer noch zu kostenintensiv für Routineuntersuchungen, so dass nur ausgewählte Isolate derzeit vollständig sequenziert werden können. Ein anderes Problem stellt die Datenaufbereitung und bioinformatische Analyse der Daten dar. Sie benötigt erfahrenes Personal und entsprechende IT-Infrastruktur, die es in den meisten Routinelaboren nicht gibt. Und nicht zuletzt eignen sich nicht alle Technologien gleichermaßen gut für die Erfassung von Plasmiden oder anderen hoch-repetitiven Sequenzen (wie Transposons oder Integrons). Hier öffnet die NanoPore-Technologie, die über tausende Basen sequenziert (s.g. *Long-Read*-Sequenzierung) und ohne teure Geräteinvestitionen auskommt, gekoppelt an Cloud-Computing-Dienste (für die Datenanalysen) neue Möglichkeiten für eine genombasierte Überwachung der Resistenzlage und der Transmissionen, z.B. im Ausbruchsfall, was in Zukunft mehr Erkenntnisse und ein besseres Verständnis der Plasmiddynamik liefern wird.

#### 4.4 mRNA-basierte holistische Diagnostikansätze

Molekulare Diagnostik, wie sie für die Resistenzanalysen in der mikrobiologischen Routine verwendet wird, weist nur bestimmte DNA-Bereiche (in der Regel zwischen 100 und 400 bp)

nach. Das tatsächliche Resistenzprofil ist daraus nicht ableitbar, da i) Gene defekt sein können (Non-Sense-Mutationen, Deletionen, Insertionen), was aufgrund der Primer in der Regel nicht erfasst wird, ii) Expressionsveränderungen aufgrund von Veränderungen der Promotoren oder sekundärer Regulatoren und iii) sekundäre Mechanismen überhaupt nicht erfasst werden. All diese Mechanismen sind jedoch ausschlaggebend für die Ausprägung einer Eigenschaft, in dem Fall Resistenzphänotyp.

RNA-basierte Ansätze können deutlich zuverlässiger die genetische Ausprägung abbilden und sind damit direkt proportional zur MHK der Antibiotika, was auch für die BL in der Publikation Nr.7 gezeigt werden konnte. RNA-basierte quantitative *In-Vitro*-Diagnostikverfahren werden bereits für diverse Erkrankungen, wie Karzinome oder virale Infektionen, eingesetzt. Allerdings haben sie bislang keinen Weg in die Resistenz-Diagnostik von Bakterien gefunden. Dabei bietet die mRNA den Vorteil, dass sie neben der Korrelation mit dem Phänotyp in deutlich mehr Kopien pro Zelle vorliegt als die des entsprechenden Gens, was die Sensitivität beim sachgemäßen Umgang mit der Probe sogar erhöhen könnte. In den Publikationen Nr. 8 und 9 konnte gezeigt werden, dass eine Detektion der mRNA von Resistenzgenen bis zu einer Erregerlast von 10 CFU/ml Vollblut möglich ist. Bei Kombination mit hochsensitiven Techniken, wie im DRESI-Projekt verfolgt wird, ist eine Erhöhung der Sensitivität bis  $< 1$  CFU/ml denkbar.

Die Sequenzierungstechnik bietet hier sogar noch mehr Möglichkeiten. Durch transkriptombasierte Ansätze werden neben der mRNA-Quantifizierung alle strukturellen Gene (die hochabundante rRNA wird in der Regel spezifisch entfernt, um die Sensitivität zu erhöhen) basengenau sequenziert. Je nach Protokoll ist eine Quantifizierung der regulatorischen RNA-Spezies damit ebenfalls möglich, was zusätzliche neue Erkenntnisse zu Regulation der Resistenzausprägung bringen wird. Durch *Deep-Learning*-Algorithmen wird es in Zukunft möglich sein, den Phänotyp MHK-genau vorherzusagen. Um dies zu bewerkstelligen, müssen entsprechend viele Genotyp-Phänotyp-korrelierte Datensätze generiert werden, die zum Trainieren der künstlichen Intelligenz (KI) notwendig sind. Diesem Ansatz widmen sich zwei Projekt des IIMK: Im Projekt PREPLEX wird in Zusammenarbeit mit Curetis GmbH (Holzlingen) und Ares Genetics GmbH (Wien) an KI-gestützten Vorhersagen des Phänotyps aus Genomdaten und der Ableitung von mRNA-Spezies für einen PCR-Assay, der sekundäre Mechanismen erfasst, gearbeitet. In einem anderen Forschungsprojekt (kein Akronym) sollen die Transkriptom-Analysen mit den Resistogrammen korreliert werden. Dies sind die ersten Schritte auf dem langen Weg zu einer kulturunabhängigen Resistenztestung, welche die Vorteile der molekularen (Schnelligkeit) und mikrobiologischen (MHK) Routinediagnostik verbinden könnte.

## Literaturverzeichnis

1. Schwarzer, D. and M.A. Marahiel, *Multimodular biocatalysts for natural product assembly*. Naturwissenschaften, 2001. **88**(3): p. 93-101.
2. Rudolf, D., et al., *International pneumococcal clones match or exceed the fitness of other strains despite the accumulation of antibiotic resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(10): p. 4915-7.
3. Durante-Mangoni, E., et al., *Emergence of colistin resistance without loss of fitness and virulence after prolonged colistin administration in a patient with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii**. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015. **82**(3): p. 222-6.
4. Rammelkamp, C. and T. Maxon, *Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1942. **51**(3): p. 386-389.
5. Lobanovska, M. and G. Pilla, *Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?* Yale J Biol Med, 2017. **90**(1): p. 135-145.
6. Hansman, D., et al., *Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea*. Med J Aust, 1974. **2**(10): p. 353-6.
7. Lind, I., *Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae**. Clin Infect Dis, 1997. **24 Suppl 1**: p. S93-7.
8. Kitamoto, O., et al., *Drug sensitivity of the *Shigella* strains isolated in 1955*. J Jpn Assoc. Infect. Dis, 1956. **30**: p. 403-404.
9. Datta, N., *Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium**. J Hyg (Lond), 1962. **60**: p. 301-10.
10. Davies, J., *Vicious circles: looking back on resistance plasmids*. Genetics, 1995. **139**(4): p. 1465-8.
11. Cassini, A., et al., *Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis*. Lancet Infect Dis, 2019. **19**(1): p. 56-66.
12. Naylor, N.R., et al., *Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review*. Antimicrob Resist Infect Control, 2018. **7**: p. 58.
13. Mullin, R. *Cost to Develop New Pharmaceutical Drug Now Exceeds \$2.5B*. Chemical & Engineering News, 2014.
14. Sakka, S. and J. Matten, *Antibiotikatherapie in der Intensivmedizin*. 2010, Kölln: Deutsches Ärzteblatt GmbH.
15. Control, E.C.f.D.P.a., *Antimicrobial consumption - Annual Epidemiological Report for 2017, in Annual epidemiological report for 2017*. 2018, ECDC: Stockholm, Sweden.
16. Fernandes, R., P. Amador, and C. Prudencio,  *$\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance*. Reviews in Medical Microbiology, 2013. **24**(1): p. 7-17.
17. Drawz, S. and R. Bonomo, *Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors*. Clinical Microbiology REviews, 2010. **23**(1): p. 160-201.
18. Ghusen, J., *Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins*. Annual review of microbiology, 1991. **45**: p. 37-67.
19. Ambler, R.P., et al., *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases*. Biochem J, 1991. **276** ( Pt 1): p. 269-70.
20. Fast, W. and L.D. Sutton, *Metallo-beta-lactamase: inhibitors and reporter substrates*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**(8): p. 1648-59.
21. Awakawa, T., et al., *Physically discrete beta-lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochryson synthesis by iterative type I polyketide synthase*. Chem Biol, 2009. **16**(6): p. 613-23.
22. Schilling, O., et al., *Flexible metal binding of the metallo-beta-lactamase domain: glyoxalase II incorporates iron, manganese, and zinc in vivo*. Biochemistry, 2003. **42**(40): p. 11777-86.

23. Lee, A., et al., *Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed?* J Clin Microbiol, 2007. **45**(11): p. 3546-8.
24. Harris, A.M., et al., *Influence of Antibiotics on the Detection of Bacteria by Culture-Based and Culture-Independent Diagnostic Tests in Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia.* Open Forum Infectious Diseases, 2017. **4**(1).
25. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.* Antimicrob. Agents Chemother., 1995. **39**(6): p. 1211-33.
26. Bush, K. and G.A. Jacoby, *Updated functional classification of beta-lactamases.* Antimicrob. Agents Chemother., 2010. **54**(3): p. 969-76.
27. Projahn, M., et al., *Contamination of chicken meat with extended-spectrum beta-lactamase producing- *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* during scalding and defeathering of broiler carcasses.* Food Microbiology, 2019. **77**: p. 185-191.
28. Reuland, E.A., et al., *Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables.* European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2014. **33**(10): p. 1843-1846.
29. Hering, J., *Resistenzsituation bei landwirtschaftlichen Nutztieren – Repräsentative epidemiologische Untersuchungen zu Beta-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (ESBL) produzierenden Enterobacteriaceae in Deutschland.* 2014, Tierärztliche Hochschule: Hannover.
30. Saliu, E.-M., W. Vahjen, and J. Zentek, *Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry.* Animal Health Research Reviews, 2017. **18**(1): p. 46-57.
31. Jalilian, N., et al., *Colonisation with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in pregnant/post-partum women: Systematic review and meta-analysis.* J Glob Antimicrob Resist, 2019. **19**: p. 338-347.
32. Lubbert, C., et al., *Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany.* Int J Med Microbiol, 2015. **305**(1): p. 148-56.
33. Hagel, S., et al., *ESBL colonization and acquisition in a hospital population: The molecular epidemiology and transmission of resistance genes.* PLoS One, 2019. **14**(1): p. e0208505.
34. Heudorf, U., et al., *[Multidrug-resistant organisms (MDRO) in rehabilitation clinics in the Rhine-Main-District, Germany, 2014: prevalence and risk factors].* Rehabilitation (Stuttg), 2015. **54**(5): p. 339-45.
35. Friedmann, R., et al., *Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. **30**(6): p. 534-42.
36. Adler, A., et al., *A multinational study of colonization with extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthcare personnel and family members of carrier patients hospitalized in rehabilitation centres.* Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(8): p. O516-23.
37. Titelman, E., et al., *Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae is common 12 months after infection and is related to strain factors.* Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(8): p. O508-15.
38. Ludden, C., et al., *Colonisation with ESBL-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant enterococci, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term care facility over one year.* BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 168.
39. Willemsen, I., et al., *Extensive dissemination of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a Dutch nursing home.* Infect Control Hosp Epidemiol, 2015. **36**(4): p. 394-400.
40. Biehl, L.M., et al., *Colonization and infection with extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in high-risk patients - Review of the literature from a clinical perspective.* Crit Rev Microbiol, 2016. **42**(1): p. 1-16.

41. Birgand, G., et al., *Duration of colonization by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae after hospital discharge*. Am J Infect Control, 2013. **41**(5): p. 443-7.
42. Hamprecht, A., et al., *Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(10): p. 2957-63.
43. Reuland, E.A., et al., *Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(4): p. 1076-82.
44. Vehreschild, M.J., et al., *A multicentre cohort study on colonization and infection with ESBL-producing Enterobacteriaceae in high-risk patients with haematological malignancies*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(12): p. 3387-92.
45. Billroth, T., *Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica und den Anteil, welche sie an der Entstehung und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten haben*. Reimer, Berlin 1874. 1 ed. 1874, Berlin: Georg Reimer.
46. Sievers, F., et al., *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 539.
47. Whelan, S. and N. Goldman, *A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach*. Mol Biol Evol, 2001. **18**(5): p. 691-9.
48. Brandt, C., et al., *In silico serine beta-lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43232.
49. Finn, R.D., et al., *Pfam: the protein families database*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D222-30.
50. Mammeri, H., et al., *Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(11): p. 4556-60.
51. Jeon, J.H., et al., *Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum beta-lactamase isolated from Acinetobacter baumannii*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014. **70**(Pt 11): p. 2924-36.
52. Canton, R. and T.M. Coque, *The CTX-M beta-lactamase pandemic*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(5): p. 466-75.
53. Yigit, H., et al., *Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4): p. 1151-61.
54. Forsberg, K.J., et al., *The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1107-11.
55. Stein, C., et al., *Direct RNA-based detection and differentiation of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80079.
56. Prezeau, N., et al., *Assessment of a new RNA stabilizing reagent (Tempus Blood RNA) for minimal residual disease in onco-hematology using the EAC protocol*. Leuk Res, 2006. **30**(5): p. 569-74.
57. Naas, T., C. Oxacelay, and P. Nordmann, *Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(1): p. 223-30.
58. Kellogg, J.A., J.P. Manzella, and J.H. McConville, *Clinical laboratory comparison of the 10-ml isolator blood culture system with BACTEC radiometric blood culture media*. J Clin Microbiol, 1984. **20**(4): p. 618-23.
59. Braun, S.D., et al., *Rapid identification of carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e102232.
60. Brandt, C., et al., *Development of a rapid diagnostic assay based on magnetic bead purification of OXA-beta-lactamase mRNA*. Future Microbiol, 2016. **11**: p. 617-29.
61. Evans, B.A. and S.G. Amyes, *OXA beta-lactamases*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(2): p. 241-63.

62. Pitton, J.S., *Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics*. Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie, 1972. **65**: p. 15-93.
63. Barthelemy, M., J. Peduzzi, and R. Labia, *Complete amino acid sequence of p453-plasmid-mediated PIT-2 beta-lactamase (SHV-1)*. Biochem J, 1988. **251**(1): p. 73-9.
64. Blackwell, G.A., M. Hamidian, and R.M. Hall, *IncM Plasmid R1215 Is the Source of Chromosomally Located Regions Containing Multiple Antibiotic Resistance Genes in the Globally Disseminated Acinetobacter baumannii GC1 and GC2 Clones*. mSphere, 2016. **1**(3).
65. Naas, T., et al., *An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1999. **43**(5): p. 1281-1284.
66. Liakopoulos, A., D. Mevius, and D. Ceccarelli, *A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**: p. 1374.
67. Hujer, A.M., K.M. Hujer, and R.A. Bonomo, *Mutagenesis of amino acid residues in the SHV-1 beta-lactamase: the premier role of Gly238Ser in penicillin and cephalosporin resistance*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1547**(1): p. 37-50.
68. Randegger, C.C., et al., *Contribution of natural amino acid substitutions in SHV extended-spectrum beta-lactamases to resistance against various beta-lactams*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2000. **44**(10): p. 2759-2763.
69. Gniadkowski, M., *Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms*. Clin Microbiol Infect, 2001. **7**(11): p. 597-608.
70. Most, T. and J. Will, *Metamodel of Optimal Prognosis - an automatic approach for variable reduction and optimal metamodel selection*, in *Weimar Optimization and Stochastic Days W*. Dynamic Software and Engineering GmbH, Germany & Research Training Group 1462, Bauhaus University Weimar, Germany, Editor. 2008, [www.dynardo.de/en/library](http://www.dynardo.de/en/library) Weimar, Germany.
71. Antony, J., *Design of Experiments for Engineers and Scientists* 2nd. ed. 2014: Elsevier.
72. Neubauer, S., et al., *A Genotype-Phenotype Correlation Study of SHV beta-Lactamases Offers New Insight into SHV Resistance Profiles*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(7).
73. Nuesch-Inderbilen, M.T., H. Hachler, and F.H. Kayser, *New system based on site-directed mutagenesis for highly accurate comparison of resistance levels conferred by SHV beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(8): p. 1726-30.
74. Krishnan, N.P., et al., *Inhibition of Klebsiella  $\beta$ -Lactamases (SHV-1 and KPC-2) by Avibactam: A Structural Study*. PloS one, 2015. **10**(9): p. e0136813-e0136813.
75. Matagne, A., J. Lamotte-Brasseur, and J.M. Frere, *Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity*. Biochem J, 1998. **330** ( Pt 2): p. 581-98.
76. Sampson, J.M., et al., *Ligand-dependent disorder of the Omega loop observed in extended-spectrum SHV-type beta-lactamase*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 2303-9.
77. Winkler, M.L., et al., *Avibactam and inhibitor-resistant SHV beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(7): p. 3700-9.
78. Winkler, M.L., et al., *Design and exploration of novel boronic acid inhibitors reveals important interactions with a clavulanic acid-resistant sulfhydryl-variable (SHV) beta-lactamase*. J Med Chem, 2013. **56**(3): p. 1084-97.
79. Poirel, L., M. Gniadkowski, and P. Nordmann, *Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2002. **50**(6): p. 1031-4.
80. Bonnet, R., *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2004. **48**(1): p. 1-14.
81. Livermore, D.M., et al., *Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?* The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2012. **67**(7): p. 1569-77.
82. Poirel, L., et al., *CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3355-61.

83. Leclercq, R., et al., *EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011.
84. Kaern, M., et al., *Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(6): p. 451-64.
85. Costa Ramos, J.M., et al., *Mutagenesis of the CTX-M-type ESBL-is MIC-guided treatment according to the new EUCAST recommendations a safe approach?* J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(9): p. 2528-35.
86. Taccone, F.S., et al., *Insufficient beta-lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock*. Crit Care, 2010. **14**(4): p. R126.
87. Perez-Trallero, E., et al., *In-vitro, in-vivo and ex-vivo studies with oral beta-lactams against Streptococcus pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998. **41**(6): p. 629-634.
88. Ho, P.L., et al., *Bacteremia caused by Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamase: a case-control study of risk factors and outcomes*. Scandinavian journal of infectious diseases, 2002. **34**(8): p. 567-73.
89. Paterson, D.L., et al., *Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory*. Journal of clinical microbiology, 2001. **39**(6): p. 2206-12.
90. Lauretti, L., et al., *Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(7): p. 1584-90.
91. Bedenić, B. and S. Sardelić, *Carbapenemases, Growing and Handling of Bacterial Cultures*, M. Mishra, Editor. 2018.
92. Martinez-Freijo, P., et al., *Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds*. J Antimicrob Chemother, 1998. **42**(6): p. 689-96.
93. Pletz, M.W., et al., *A Nosocomial Foodborne Outbreak of a VIM Carbapenemase-Expressing Citrobacter freundii*. Clin Infect Dis, 2018. **67**(1): p. 58-64.
94. Stoesser, N., et al., *Genomic epidemiology of global Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Escherichia coli*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 5917.
95. Leavitt, A., et al., *Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic Klebsiella pneumoniae sequence type 258*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(10): p. 4493-6.
96. Cheruvanky, A., et al., *Enhanced Klebsiella pneumoniae Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(6).
97. Jia, B., et al., *CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D566-D573.
98. Gupta, S.K., et al., *ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(1): p. 212-20.
99. Zankari, E., et al., *Identification of acquired antimicrobial resistance genes*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(11): p. 2640-4.
100. Seemann, T., *Prokka: rapid prokaryotic genome annotation*. Bioinformatics, 2014. **30**(14): p. 2068-9.
101. Carattoli, A., et al., *In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(7): p. 3895-903.
102. Perez-Chaparro, P.J., et al., *Complete nucleotide sequences of two blaKPC-2-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 Klebsiella pneumoniae clinical strains four years apart*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(5): p. 2958-60.
103. Ondov, B.D., et al., *Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 132.

104. Bagdasarian, M., et al., *PsiB, and anti-SOS protein, is transiently expressed by the F sex factor during its transmission to an Escherichia coli K-12 recipient*. Mol Microbiol, 1992. **6**(7): p. 885-93.
105. Brandt, C., et al., *Assessing genetic diversity and similarity of 435 KPC-carrying plasmids*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11223.
106. Destoumieux-Garzón, D., et al., *The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead*. Frontiers in veterinary science, 2018. **5**: p. 14-14.
107. Karkman, A., et al., *Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water*. Trends Microbiol, 2018. **26**(3): p. 220-228.
108. Cacace, D., et al., *Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings*. Water Research, 2019. **162**: p. 320-330.
109. Ju, F., et al., *Wastewater treatment plant resistomes are shaped by bacterial composition, genetic exchange, and upregulated expression in the effluent microbiomes*. The ISME journal, 2019. **13**(2): p. 346-360.
110. Ekwanzala, M.D., et al., *Environmental Dissemination of Selected Antibiotics from Hospital Wastewater to the Aquatic Environment*. 2020. **9**(7): p. 431.
111. Kraemer, S.A., A. Ramachandran, and G.G. Perron, *Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy*. Microorganisms, 2019. **7**(6): p. 180.
112. Stein, C., et al., *Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug-Resistant Clinical Klebsiella pneumonia Isolates*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0126479.
113. Poirel, L., et al., *Emergence in Klebsiella pneumoniae of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(2): p. 755-8.
114. Kandeel, A., *Epidemiology of carbapenemase producing Enterobacteriaceae in a general hospital*. Journal of Microbiology and Infectious Diseases, 2015. **5**(2): p. 57-62.
115. Lin, K.Y., et al., *Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections*. J Microbiol Immunol Infect, 2016. **49**(1): p. 52-9.
116. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics*. Nature Reviews Microbiology, 2014. **12**(7): p. 465-478.
117. Li, B., et al., *Dissecting horizontal and vertical gene transfer of antibiotic resistance plasmid in bacterial community using microfluidics*. Environment International, 2019. **131**: p. 105007.
118. Schuurmans, J.M., et al., *Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between E. coli strains*. Plasmid, 2014. **72**: p. 1-8.
119. Ayoub Moubareck, C., et al., *Role of outer membrane permeability, efflux mechanism, and carbapenemases in carbapenem-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa from Dubai hospitals: Results of the first cross-sectional survey*. International Journal of Infectious Diseases, 2019. **84**: p. 143-150.
120. Tuba, M., et al., *Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. The Journal of Infection in Developing Countries, 2018. **12**(01).
121. Fernández, L. and R.E.W. Hancock, *Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance*. Clinical microbiology reviews, 2012. **25**(4): p. 661-681.
122. Castanheira, M., et al., *Ceftazidime-avibactam activity against a challenge set of carbapenem-resistant Enterobacterales: Ompk36 L3 alterations and  $\beta$ -lactamases with ceftazidime hydrolytic activity lead to elevated MIC values*. Int J Antimicrob Agents, 2020. **56**(1): p. 106011.
123. Elnifro, E.M., et al., *Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology*. Clinical microbiology reviews, 2000. **13**(4): p. 559-570.

## Anhang

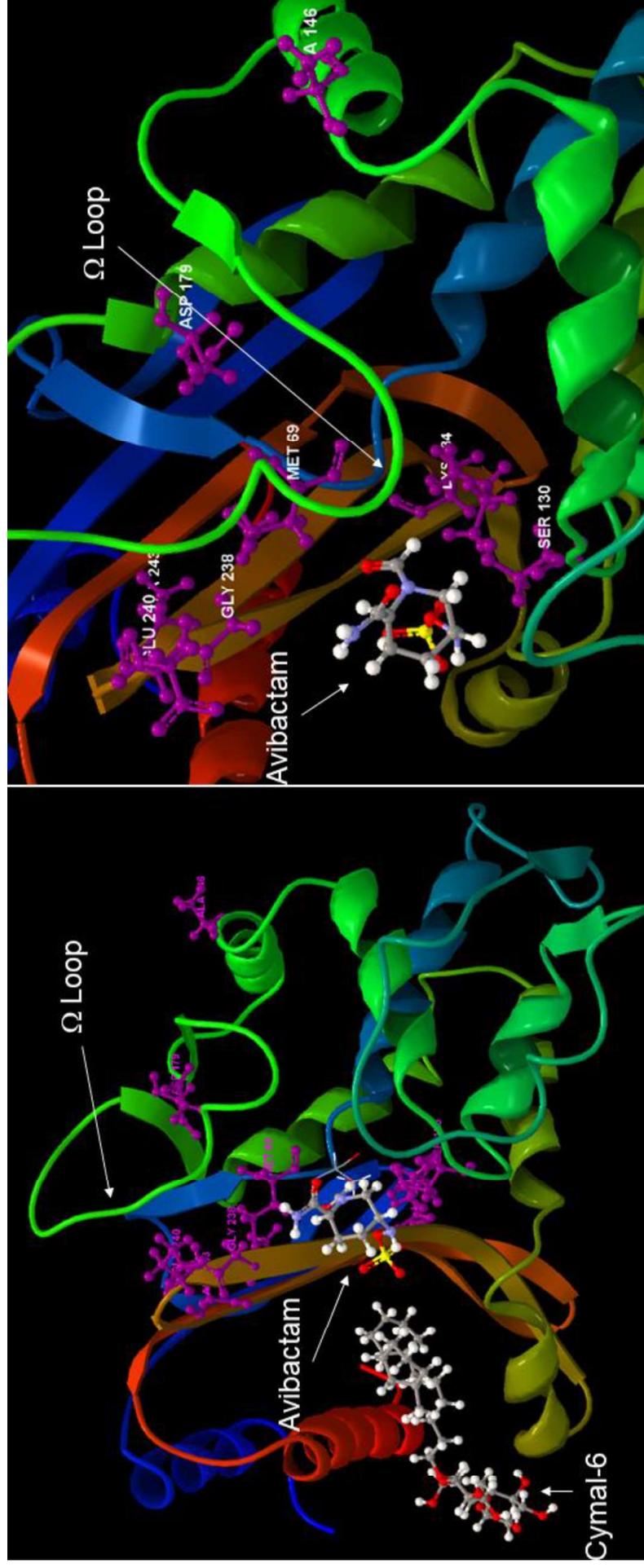


Abbildung 14: Kristallstruktur (dargestellt als Wireframe-Grundgerüst) der SHV-1-BL mit Avibactam (*ball-stick* Darstellung) im aktiven Zentrum [74].

Linkes Bild: Die Kristallisation erfolgte mit 0,56mM Cymal-6 (Cyclohexyl-Hexyl-β-D-Maltoside), das hier als langkettige *Ball-Stick*-Struktur (2 Moleküle) erkennbar ist. Dies diente der Stabilisierung der Kristalle und hat keinen Einfluss auf die molekularen Interaktionen zwischen BL und BLI. Rechtes Bild: Einblick in das aktive Zentrum aus einer anderen Perspektive. Aminosäure-Substitutionen mit Einfluss auf den Phänotyp sind lila als *ball-stick* dargestellt, um die sterische Anordnung der Atome besser abzubilden.

Tabelle 5: Übersicht zu kommerziellen Produkten für die molekulare Erreger-Diagnostik aus Vollblut

Hersteller	Assay	Technik/Methode	Probe	PV (ml)	Proben- vorbereitung	TTR (h)	LOD (CFU/ml)	Sensitivität / Spezifität (%)	Detektionsumfang	Resistenzmarker
Abbott Molecular	IRIDICA BAC BSI	PCR und ESI-MS	VB	5,0	extern (IRIDICA BB/SP)	6	0,25– 128	45–83/ 69–94	780 Bakterien und <i>Candida spp.</i>	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , und <i>blaKPC</i>
Roche Molecular Diagnostics	LightCycler® SeptiFast Test	Multiplex Real-Time PCR mit DNA-DNA Hybridisation und Schmelzkurvenanalyse	VB	1,5	extern (MAGNA Lyser)	4–6	3–100	63–83/ 83–95	16 Bakterien, <i>Candida</i> und <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	<i>mecA</i>
Molzym	SepsITest	Universal PCR und Sequenzierung	VB	1,0	extern	8–10	10–80	11–87 /83–96	345 Bakterien und 13 Pilze	Keine
Immunexpress	SeptiCyte	„host-response gene- expression assay“ - quantitative RT-qPCR von vier RNA Biomarkern	VB	2,5	extern (total RNA)	6	k.a.	k.a./ 95	kein direkter Nachweis von Pathogenen	Keine
SIRS-Lab	VYOO	Multiplex PCR + Gel- Elektrophorese	VB	5,0	extern	8	5-100	38-60/ 72-75	14 grampositive, 18 gramnegative, 7 Pilze	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> und <i>blaSHV</i>
Seegene	MagiCplex™ Sepsis Real- time Test	Multiplex Real-Time PCR	VB	1,0	extern (Standard- Kits)	3	k.a.	k.a.	21 Bakterienspezies, 90 Bakterien-gattungen, 6 Pilz-spezies	<i>mecA</i> , <i>vanA/B</i>
T2 Biosystems	T2Candida & T2Bacteria & T2Resistanc e	Miniaturisierte & Magnetresonanz Technologie	VB	n.a.	integriert	3-5	10	95/ 98	4 gramnegative, 2 grampositive Bakterien, <i>Candida spp.</i>	KPC, OXA-48, NDM, VIM, IMP, CTXM-14 und CTXM-15, <i>mecC</i> und <i>mecA</i> , CMY, DHA, <i>vanA/B</i>
DNae	LiDia BSI	Amplifikationsmessung über pH-Wert Veränderung an der Oberfläche eines Metalloxi- d Semikonduktor Arrays (CMOS Technologie)	VB	10,0	integriert	3	1-3	k.a.	4 gramnegative, 3 grampositive Bakterien, <i>Candida spp.</i>	Keine

PV = Probenvolumen, TTR = time-to-result (Dauer bis zum Ergebnis), VB = Vollblut, BK = Blutkultur, k.A. = keine Angaben, GP = grampositive, GN = gramnegative, RT-qPCR = reverse Transkription und quantitative PCR

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die Habilitationsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 07.01.1997 bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

An der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben die auf den Publikationen aufgeführten Koautoren unentgeltlich mitgewirkt:

### **Nr. 1. A genotype-phenotype correlation study of SHV $\beta$ -lactamases-new insight into SHV resistance profiles.**

Idee und Planung: O. Makarewicz

Laborexperimentellen Arbeiten: S. Neubauer, S Madzgalla, M Marquet, und A Klabunde

Mathematische Modellierung: B Büttner, A Göhring

Sequenzanalysen: S. Neubauer, S Madzgalla, C Brandt

Funding: K-H Feller, MW Pletz

Manuskriptvorbereitung und Abbildungen: O. Makarewicz

### **Nr. 2. Assessing genetic diversity and similarity of 435 KPC-carrying plasmids.**

Idee und Interpretation: O. Makarewicz

Planung und Sequenzanalysen: C Brandt, A Viehweger, A Singh, S Lerch

Kritische Prüfung der Daten: B Müller, D Wibberg, J Kalinowski

Auswertung und Abbildungen: C Brandt

Funding: B Müller, MW Pletz

Manuskriptvorbereitung: C Brandt, O. Makarewicz

### **Nr. 3. ESBL colonization and acquisition in a hospital population: the molecular epidemiology and transmission of resistance genes.**

Idee und Planung: S Hagel, MW Pletz

Praktische Umsetzung der Studie: S Hagel, A Hartung

Laborexperimente: D Weiß, C Stein, C Brandt, A Hartung

Statistik: U Schumacher

Auswertung und Abbildungen: O Makarewicz

Funding: R Ehricht, MW Pletz

Manuskriptvorbereitung: O Makarewicz, V Patchev

### **Nr. 4. A Nosocomial Foodborne Outbreak of a VIM Carbapenemase-Expressing *Citrobacter freundii*.**

Idee und Planung: MW Pletz, J Maschmann

Praktische Umsetzung: A Wollny, UH Dobermann, J Rödel, S Neubauer, C Stein, A Hartung, A Mellmann, S Trommer, B Edel

Auswertung und Abbildungen: O Makarewicz, A Wollny, S Neubauer

Funding: MW Pletz, J Maschmann

Manuskriptvorbereitung: V Patchev, M. Pletz, O Makarewicz

### **Nr. 5. In silico serine $\beta$ -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species.**

Idee und Planung: O Makarewicz, C Brandt

Sequenzanalysen: C Brandt, SD Braun, C Stein

Kritische Prüfung der Daten: P Slickers, R Ehricht

Abbildungen: C. Brandt

Funding: O Makarewicz, MW Pletz, R Ehricht

Manuskriptvorbereitung: C Brandt O Makarewicz

**Nr. 6. Mutagenesis of the CTX-M-type ESBL—is MIC-guided treatment according to the new EUCAST recommendations a safe approach?**

Idee und Planung: O Makarewicz, MW Pletz  
Sequenzanalysen: C Brandt, C. Stein  
Laborexperimente: JM Costa Ramos, Y Pfeifer  
Auswertung der Daten: JM Costa Ramos, O. Makarewicz  
Abbildungen: O. Makarewicz  
Funding: MW Pletz  
Manuskriptvorbereitung: O. Makarewicz, JM Costa Ramos

**Nr. 7. Development of a rapid diagnostic assay based on magnetic bead purification of OXA- $\beta$ -lactamase mRNA.**

Idee und Planung: O Makarewicz, MW Pletz  
Sequenzanalysen: C Brandt  
Laborexperimente: C Brandt, E Zander, Y Pfeifer, SD Braun  
Auswertung der daten: C Brandt, O Makarewicz,  
Funding: MW Pletz, R Ehrlich  
Manuskriptvorbereitung: O. Makarewicz, C Brandt

**Nr. 8. Direct RNA-based detection of CTX-M  $\beta$ -lactamases in human blood samples.**

Idee und Planung: O Makarewicz, MW Pletz  
Sequenzanalysen: C Stein, C Brandt  
Laborexperimente: C Stein, Y Pfeifer  
Auswertung der daten: C Stein, O Makarewicz,  
Funding: MW Pletz  
Manuskriptvorbereitung: C Stein, O Makarewicz

**Nr. 9. Direct RNA-based detection and differentiation of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL).**

Idee und Planung: O Makarewicz, MW Pletz  
Sequenzanalysen: C Stein, C Brandt  
Laborexperimente: C Stein, Y Pfeifer, JC Ramos, M Klinger  
Auswertung der daten: C Stein, O Makarewicz,  
Funding: MW Pletz  
Manuskriptvorbereitung: C Stein, O Makarewicz

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, 29.05.2021

## *Curriculum vitae*

In der elektronischen Version nicht verfügbar



## Originalarbeiten, auf denen die vorliegende Arbeit beruht

Der nachfolgende Anhang beinhaltet die Publikationen in gleicher Reihenfolge, wie im ‚Verzeichnis eigener Publikationen, auf denen die vorliegende Arbeit beruht‘ (Seite 7).

Supplements der Publikationen sind nicht enthalten, können aber unter folgenden Links eingesehen werden:

1. S Neubauer, *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2020, V 64 (7): e02293-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02293-1>

Supplemental Tables S1 to S5: <https://aac.asm.org/content/aac/suppl/2020/06/12/AAC.02293-19.DCSupplemental/AAC.02293-19-s0001.pdf>

Supplemental Data Set S1: [https://aac.asm.org/highwire/filestream/212514/field\\_highwire\\_adjunct\\_files/1/AAC.02293-19-sd002.xlsx](https://aac.asm.org/highwire/filestream/212514/field_highwire_adjunct_files/1/AAC.02293-19-sd002.xlsx)

2. C Brandt, *et al.*, *Scientific reports*, 2019, V9(1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47758-5>

Figure S1: [https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-019-47758-5/MediaObjects/41598\\_2019\\_47758\\_MOESM1\\_ESM.pdf](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-019-47758-5/MediaObjects/41598_2019_47758_MOESM1_ESM.pdf)

Supplementary Material Table S1: [https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-019-47758-5/MediaObjects/41598\\_2019\\_47758\\_MOESM2\\_ESM.xlsx](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-019-47758-5/MediaObjects/41598_2019_47758_MOESM2_ESM.xlsx)

3. S Hagel, *et al.*, *Plos one*, 2019, V14(1): e020850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208505>

S1 File. Supporting tables and figures to the manuscript: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208505.s001>

S1 Table. Details of the isolates: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208505.s002>

S1 Fig. Phylogeny of the E. coli isolates based on the ERIC-PCR band pattern: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208505.s003>

4. MW Pletz, *et al.*, *Clinical Infectious Diseases*, 2018, V 67 (1): 58-645. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy034>

Supplementary Table S1: [https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/cid/67/1/10.1093\\_cid\\_ciy034/1/ciy034\\_suppl\\_supplementary\\_tables1.xlsx?Expires=1624546621&Signature=3l6NCBhW7Qr~ovmijpT7HLfnf1KT2GmhIXZjNr5ukSIVOjpVNZZmVRAgzHtByd2cWqJOTUzQUJms9KMoGTnbYhC-9Fj8iHIX7kyz34RZIf5gLIAMKjL2Hulu1Kblhp5GB7hMOOIr9QweKFKHvamLISsOmji1duStEt~rv6lPAf30-5wg1o89Vi20iiKr0NFGg7ZQXmuAWRUrnVZ47tBeSNX0vhnWn-ZZbqC7QgOiSrgT4oOFjysbWpF8-Q58b6P7KbHb5q7~RX2Gy5fQQhGXrMzOOx4xvVkrJf47OqBBwyGTiJ0ffqJuk7ul-cj9Uc9gaVwMebyRcss2mb8gJn~NPg\\_&Key-Pair-Id=APKAIE5G5CRDK6RD3PGA](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/cid/67/1/10.1093_cid_ciy034/1/ciy034_suppl_supplementary_tables1.xlsx?Expires=1624546621&Signature=3l6NCBhW7Qr~ovmijpT7HLfnf1KT2GmhIXZjNr5ukSIVOjpVNZZmVRAgzHtByd2cWqJOTUzQUJms9KMoGTnbYhC-9Fj8iHIX7kyz34RZIf5gLIAMKjL2Hulu1Kblhp5GB7hMOOIr9QweKFKHvamLISsOmji1duStEt~rv6lPAf30-5wg1o89Vi20iiKr0NFGg7ZQXmuAWRUrnVZ47tBeSNX0vhnWn-ZZbqC7QgOiSrgT4oOFjysbWpF8-Q58b6P7KbHb5q7~RX2Gy5fQQhGXrMzOOx4xvVkrJf47OqBBwyGTiJ0ffqJuk7ul-cj9Uc9gaVwMebyRcss2mb8gJn~NPg_&Key-Pair-Id=APKAIE5G5CRDK6RD3PGA)

Supplementary Table S2: [https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/cid/67/1/10.1093\\_cid\\_ciy034/1/ciy034\\_suppl\\_supplementary\\_material.pdf?Expires=1624546621&Signature=RflqMtmoyoxlhPEMNug25YI2pU4yGWJ5A~pAZ4s9KFoNwLLEgwa7OSqBqq0eYqW0f7j851vXN7Lqx5tst3WuOS1zw2cwntLCyEnCD9ILnvH2vRYDe2SKOkmxYLOjMyPNof3J40YscuanpWzDNFiHskdtjfbBaF19DYrdgU2Gt8~r8po4oIxThEVTXwSENCEBtZPCtItp6QwVa5~yhi6gxWTKvVh~hHYrTN2e5C2OTzCQFbPy2EiyF5-EMXxs4i4mFRFeliLHfAWXUFPn8QfYGE8LEeKeN~RV8i9FreY9GOlkrMNexof364Bpt1ZeCyYAPTsuQSAKva4-4Xy24~-T8aI0A\\_&Key-Pair-Id=APKAIE5G5CRDK6RD3PGA](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/cid/67/1/10.1093_cid_ciy034/1/ciy034_suppl_supplementary_material.pdf?Expires=1624546621&Signature=RflqMtmoyoxlhPEMNug25YI2pU4yGWJ5A~pAZ4s9KFoNwLLEgwa7OSqBqq0eYqW0f7j851vXN7Lqx5tst3WuOS1zw2cwntLCyEnCD9ILnvH2vRYDe2SKOkmxYLOjMyPNof3J40YscuanpWzDNFiHskdtjfbBaF19DYrdgU2Gt8~r8po4oIxThEVTXwSENCEBtZPCtItp6QwVa5~yhi6gxWTKvVh~hHYrTN2e5C2OTzCQFbPy2EiyF5-EMXxs4i4mFRFeliLHfAWXUFPn8QfYGE8LEeKeN~RV8i9FreY9GOlkrMNexof364Bpt1ZeCyYAPTsuQSAKva4-4Xy24~-T8aI0A_&Key-Pair-Id=APKAIE5G5CRDK6RD3PGA)

5. C Brandt, *et al.*, *Scientific Reports*, 2017, V7: 43232. <https://doi.org/10.1038/srep43232>

Supplementary Material: [https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fsrep43232/MediaObjects/41598\\_2017\\_BFsrep43232\\_MOESM15\\_ESM.pdf](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fsrep43232/MediaObjects/41598_2017_BFsrep43232_MOESM15_ESM.pdf)

Supplementary Dataset: [https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fsrep43232/MediaObjects/41598\\_2017\\_BFsrep43232\\_MOESM16\\_ESM.xls](https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fsrep43232/MediaObjects/41598_2017_BFsrep43232_MOESM16_ESM.xls)

6. JM Costa Ramos, *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, V70 (9): 2528-2535. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv153>

Supplementary Data: [https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/jac/70/9/10.1093\\_jac\\_dkv153/1/dkv153\\_Supplementary\\_Data.zip?Expires=1624563050&Signature=nb6dHLY76kAYa61TO7fsbYYAIMyyS-ZJJXE4hO2TROTz-HFy7G2fjNfh4p-iOjDQczY8UDSYhfC61LHklizJeKKvBh7WsUPNsNJsPEpMZ-sewPJNqjzwp2POBDiu2owYgsjOmlKTJ-la0mktb0DUSsyxMvLI-3Xbc~wOwx-h-VD7XTZRpKo3PBEBQ8fNg7DccP9xvDL3e-3EA-WLwPMxrQkqd4hkomT6HFBK3DqbrQZr7Jgbc8yQ7kt8DTZsFa6ZzSMTS5rFYpo7cCol-A~Rr3Unr0h-zZw3IKBwMvUwbG~1KMorp56mMUVwsywGzVflsLh-56xxecz-krn~fpsBmw\\_&Key-Pair-Id=APKAIE5G5CRDK6RD3PGA](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/jac/70/9/10.1093_jac_dkv153/1/dkv153_Supplementary_Data.zip?Expires=1624563050&Signature=nb6dHLY76kAYa61TO7fsbYYAIMyyS-ZJJXE4hO2TROTz-HFy7G2fjNfh4p-iOjDQczY8UDSYhfC61LHklizJeKKvBh7WsUPNsNJsPEpMZ-sewPJNqjzwp2POBDiu2owYgsjOmlKTJ-la0mktb0DUSsyxMvLI-3Xbc~wOwx-h-VD7XTZRpKo3PBEBQ8fNg7DccP9xvDL3e-3EA-WLwPMxrQkqd4hkomT6HFBK3DqbrQZr7Jgbc8yQ7kt8DTZsFa6ZzSMTS5rFYpo7cCol-A~Rr3Unr0h-zZw3IKBwMvUwbG~1KMorp56mMUVwsywGzVflsLh-56xxecz-krn~fpsBmw_&Key-Pair-Id=APKAIE5G5CRDK6RD3PGA)

7. C Brandt, *et al.*, MW Pletz. *Future Microbiology*, 2016, V11 (5), 617-629. <https://doi.org/10.2217/fmb.16.13>

Artikel und Supplement sind nicht im ‚open access‘ veröffentlicht.

Zugang zum Supplement unter:

<https://www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/fmb.16.13>

8. O Makarewicz, *et al.*, *International Journal of Medical Microbiology*, 2015, V 305 (3): 370-377. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.02.005>

Artikel und Supplement sind nicht im ‚open access‘ veröffentlicht.

Zugang zum Supplement unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422115000168#sec0120>

9. C Stein, *et al.*, *PloS one*, 2013, V 8 (11): e80079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080079>

Supplementary Data:

Figure S1: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080079.s001>

Figure S2: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080079.s002>

Figure S3: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080079.s003>