

**Phylogenomische Analyse von
Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL)-
kodierenden Isolaten aus Mensch und Tier**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Waezsada, Said-Elias

aus Lübbecke

Gießen 2020

Aus dem Institut für Mikrobiologie
des Fachbereichs Medizin Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachterin: Prof. Dr. Ursel Heudorf

Tag der Disputation: 1. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. <i>ESCHERICHIA COLI</i> - EIN KEIM MIT VIELEN EIGENSCHAFTEN	4
2.1.DIE FAMILIE DER ENTEROBACTERIACEAE	4
2.1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	4
2.1.1.1. PATHOVARE VON <i>E. COLI</i>	5
2.1.1.2. VERWANDTSCHAFTSANALYSE VON <i>E. COLI</i>	6
2.2.ANTIBIOTIKA	7
2.2.1. BETA-LAKTAM-ANTIBIOTIKA	8
2.2.1.1. PENICILLINE	8
2.3 PLASMIDE	12
2.4 MECHANISMEN DES HORIZONTALEN GENTRANSFERS	13
2.5 BETA-LAKTAMASEN	14
2.5.1. WICHTIGE VERTRETER DER EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASEN (ESBL)	15
2.5.2. TEM-ESBLs	15
2.5.3. SHV-ESBLs	15
2.5.4. CTX-M-ESBLs	16
2.6 <i>GALLERIA MELLONELLA</i> -MODELL	17
3. PROBLEMDARSTELLUNG	19
4. ZIEL DER ARBEIT	21
5. MATERIAL UND METHODEN	22
5.1 CHEMIKALIEN, NÄHRMEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	22
5.2 DNA-MARKER	24
5.3 ENZYME	24
5.4 KITS 24	
5.5. GERÄTE	24
5.6. SOFTWARE	26
5.7 BAKTERIENSTÄMME	27
5.7.1. <i>MCR-I</i> -KODIERENDE ENTEROBACTERIACEAE	28
5.7.2. BAKTERIENANZUCHT	28
5.7.3. HERSTELLUNG VON GLYCERINKULTUREN	28
5.8. RESISTENZTESTUNG	29
5.8.1. VITEK2-SYSTEM	29
5.8.2. E-TESTSTREIFEN	29
5.8.3. MAKRODILUTION	30
5.9 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	30
5.10 DNA-AUFREINIGUNG	31
5.11 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	32
5.12 PULSFELDGELELEKTROPHORESE (PFGE)	32
5.12.1 HERSTELLUNG VON AGAROSEBLÖCKCHEN	32
5.12.2 RESTRIKTIONSVERDAU MIT S1-NUKLEASE	33
5.13 DNA-SEQUENZIERUNG	34
5.14 INFESTIONSVERSUCH MIT <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	35
5.14.1 ANZUCHT DER LARVEN	35
5.14.2 INKUBATION DER BAKTERIENISOLATE	35
5.14.3 INFESTION DER LARVEN	35
5.15 KONJUGATION	36
5.16 BIOINFORMATISCHE ANALYSEN	38
5.16.1. INTERNETDATENBANKEN ZUR ANALYSE VON VIRULENZ- UND PLASMID-KODIERTEN RESISTENZGENEN	38
5.16.2. MAPPING DER CONTIGS MIT DEM PROGRAMM MAUVE	38
5.16.3. EDGAR	38
5.16.4. ERSTELLEN VON STAMMBÄUMEN	39

6. ERGEBNISSE	40
6.1 MULTILOCUS-SEQUENZTYPEN	40
6.2 ANALYSE DER ANTIBIOTIKA-RESISTENZGENE DER ISOLATE	41
6.2.2. <i>E. COLI</i> -ISOLATE VON TIEREN	42
6.2.3. VERGLEICH VON TIER- UND HUMANISOLATEN	42
6.3 VIRULENZGENE	44
6.3.1. <i>E. COLI</i> -ISOLATE VON MENSCHEN	44
6.3.2. <i>E. COLI</i> -ISOLATE VON TIEREN	44
6.3.3. VERGLEICH VON BAKTERIENISOLATEN VON MENSCHEN UND TIEREN	45
6.4 PLASMIDPROFIL	46
6.5 KONJUGATION	48
6.6 VIRULENZ IM <i>GALLERIA MELLONELLA</i> MODELL	49
6.6.1. <i>E. COLI</i> ISOLATE VON MENSCHEN	50
6.6.2. <i>E. COLI</i> ISOLATE VON TIEREN	50
6.7 RISIKOFAKTOREN FÜR EINEN HOHEN LARVIZIDEN EFFEKT	52
6.8 STAMMBAUM	53
6.9 MCR-1-PRODUZIERENDE ISOLATE	56
6.9.1. PLASMIDPROFIL UND MHK	56
6.9.2. KONJUGATION (MCR-1)	58
7. DISKUSSION	60
7.1. GENOMBASIERTE ANALYSEN	60
7.2 <i>GALLERIA MELLONELLA</i> -VERSUCHE	60
7.3. CHARAKTERISIERUNG <i>MCR-1</i> -KODIERENDER ISOLATE	62
8. ZUSAMMENFASSUNG	65
8. SUMMARY	66
9. LITERATURVERZEICHNIS	67
10. VERÖFFENTLICHUNGEN	72
11. ANHANG	73
11.1 ROHDATEN KONJUGATIONSVERSUCHE	73
11.2 ABBILDUNGEN PFGE ESBL-ISOLATE	75
11.3 <i>GALLERIA MELLONELLA</i> -EXPERIMENTE	79
11.4 ABBILDUNGEN PFGE <i>MCR-1</i> -ISOLATE	83
12. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	86
13 TABELLENVERZEICHNIS	88
14 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	89
15 DANKSAGUNG	90
16 TABELLARISCHER LEBENS LAUF	91

Verwendete Abkürzungen

A. dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CC	Clonal Complex
CFU	Colony forming units
CTX-M	Cefotaximase
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	Extended-Spectrum β -Lactamase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
HCl	Salzsäure
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
bp	Basenpaare
Kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
M	molar
MH	Müller-Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	Multilocus sequence typing (Multilocus-Sequenztypisierung)
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Next Generation Sequencing
Nr.	Nummer
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFGE	Pulsfeld Gel Elektrophorese
Ref.	Referenz
RESET	ESBL and fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)

SNP	Short Nucleotide Polymorphism
ST	Sequenztyp
STC	Sequenztypcluster
T	Transkonjugant
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
usw.	und so weiter
V	Volt
WHO	World Health Organization

Einleitung

Antibiotika sind Medikamente, die für die Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt werden. Ihre Wirkmechanismen sind vielfältig. Manche greifen die Zellwand an, andere hingegen greifen bei der DNA-Replikation/-Synthese bzw. beim Folsäuremetabolismus an.

Im Jahre 1928 wurde das erste Antibiotikum von dem englischen Bakteriologen Alexander Fleming entdeckt, nämlich das Penicillin (O'Neill, 2014). Durch diese Entdeckung wurde das Zeitalter der Antibiotika eingeläutet. Man glaubte durch diese Substanzen bakterielle Infektionen endgültig eindämmen zu können. Allerdings wurden die Antibiotika mit der Zeit immer unwirksamer, da Bakterien anfangen, Resistenzen gegen diese Antibiotika zu entwickeln. Die Erreger besaßen zudem das Potenzial, diese Resistenzen über mobile genetische Elemente, den Plasmiden, auf andere Arten zu übertragen. Dies bezeichnet man als horizontalen Gentransfer. Dieser Mechanismus wurde erstmals in der Arbeit von Watanabe in Japan bei Shigellen und *Escherichia coli* in den 1960er Jahren beschrieben (Hawkey & Jones, 2009). In den letzten Jahren haben sich die Antibiotikaresistenzen rasant weiterentwickelt, während die Entwicklung neuer Antibiotika langsam voranschreitet. Zudem steigt auch der Verbrauch der zur Verfügung stehenden Antibiotika, was zusätzlich die Entstehung neuer Antibiotikaresistenzen fördert. Momentan fordern Antibiotikaresistenzen in Europa und in den USA allein jährlich 50.000 Tote. Auch wenn Unterschiede zwischen der regionalen Verteilung der Antibiotikaresistenzen existieren, sind Antibiotikaresistenzen als ein globales Problem anzusehen, welches jede Nation ernst nehmen muss (O'Neill, 2014).

Diese Arbeit beschäftigt sich speziell mit multiresistenten Keimen, die Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL)-Enzyme enthalten. ESBLs kommt bei Gram-negativen Bakterien vor. Diese Enzyme hemmen die Wirkung von Beta-Laktam-Antibiotika, indem sie deren Beta-Laktam-Ring durch Hydrolyse spalten. Dadurch werden Infektionen mit ESBL-Produzenten schwer behandelbar. Als Reserveantibiotikum können Carbapeneme eingesetzt werden.

Die Übertragungswege von ESBL-kodierenden Enterobakterien sind ein intensiv erforschtes Thema. Anhand von Ganzgenomanalysen versucht man den Ursprung einzelner Bakterienstämme zu ermitteln. Circa 5 % der humanen ESBL-*E. coli* stammen vom Tier (Niedrig, M, Eckmanns, T, Wieler, LH. (2017) Durch den Transfer von ESBL-Resistenzgenen über Plasmide bzw. über andere mobile genetische Elemente ist es schwierig, Übertragungswege und Ursprünge der Bakterienklone zu detektieren (Valentin et al., 2014a).

Die ESBL-codierenden Enterobacteriaceae werden in verschiedene Subtypen unterteilt. Am meisten bekannt sind ESBLs vom Typ CTX-M. Als Gegenmittel helfen bei diesen Keimen nur noch Carbapeneme (Reserveantibiotika) und Beta-Laktamase-Inhibitoren wie z.B. Clavulansäure. 1989 wurde diese ESBL-Enzymklasse erstmals in *E. coli* entdeckt. Inzwischen sind etwa 251 CTX-M-Typen bekannt (<http://bldb.eu/>, Stand 03.01.2022). Das Gefährliche an diesen multiresistenten

Keimen ist ihr enormes Ausbreitungspotenzial. Weltweit am meisten verbreitet sind die Genotypen CTX-M-15 und CTX-M-14 (Bevan et al., 2017). Als wesentliche Ursache ist die erfolgreiche Verbreitung von CTX-M-15 bildenden ESBL-Isolaten der klonalen Linie ST131 O25b:H4 [9-11] anzuführen, wie es in Deutschland z.B. der Fall ist (Pfeiffer et al., 2013).

Warum diese Entwicklung ernstzunehmen ist, zeigt auch eine Statistik aus den USA. Jährlich sind 140.000 Patienten mit Enterobacteriaceae infiziert. Bei 26.000 Patienten ist ein ESBL-Enzym vorhanden. Von diesen 26.000 Patienten versterben jährlich 1.700 Patienten. Pro Infektion mit Enterobacteriaceae entstehen medizinische Mehrkosten in Höhe von 40.000 \$ (CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta). Das bedeutet, dass jährlich insgesamt 104 Millionen \$ Mehrkosten für die Behandlung dieser Patienten investiert werden müssen. An diesen Zahlen merkt man, dass die ESBL-kodierenden Bakterien nicht nur ein Gesundheitsproblem, sondern auch ein Kostenproblem darstellen.

Das Auftreten von ESBL-produzierenden Erregern nicht nur auf nosokomiale Infektionen und Krankenhäuser limitiert, man findet auch in Lebensmitteln, Tierproben und auch in der gesunden Allgemeinbevölkerung (RESET: Pfeiffer et al, 2012).

Während man anfangs der Auffassung war, dass Enterobacteriaceae mit ESBLs hauptsächlich gegen Beta-Laktam-Antibiotika resistent sind, vermeldete der Eurosurveillance-Report im Jahre 2008 einen Ausbruch von neuen ESBL-kodierenden Enterobacteriaceae mit Resistenz gegen Carbapeneme (Wilson, H., Török, M.E., 2018). Gründe hierfür sind ein übermäßiger Antibiotikagebrauch bei Menschen und Tieren, mangelnde Hygienemaßnahmen in Krankenhäusern, Ausbreitung der Bakterien über die Nahrungskette und Menschen- und Warenströme zwischen verschiedenen Ländern. Gewisse Enterobacteriaceae-Klone sind in der Lage, mehrere ESBL-kodierende Plasmide aufzunehmen und auf andere Bakterienstämme zu übertragen.

Die WHO hat aufgrund der globalen Zunahme von Antibiotikaresistenzen eine Kategorisierung von Antibiotika ins Leben gerufen, die dieses Problem aufgreifen soll. Diese Kategorisierung trägt das Akronym AWaRe (<https://aware.essentialmeds.org/groups>). Es werden drei Kategorien zusammengefasst, nämlich *Access*, *Watch* und *Reserve*. In der *Access*-Gruppe werden Antibiotika erfasst, die entweder Erst- bzw. Zweitwahl sind und aufgrund eines gezielten Erregerspektrums das Risiko für Antibiotikaresistenzen minimieren.

In der *Watch*-Gruppe kommen Antibiotika zum Einsatz, wenn bestimmte Infektsituationen auftreten. Dies erfordert jedoch ein intensives Monitoring und ein *Antibiotic Stewardship*. Antibiotika der *Reserve*-Gruppe werden nur bei Patienten mit multiresistenten Keimen verwendet. Dieses Patientenkollektiv erfordert eine noch engmaschigere Überwachung und die Kontrolle durch ein *Antibiotic Stewardship*, um eine effektive Antibiotikatherapie zu gewährleisten.

Es gibt sechs pathogene Bakterienarten, die aufgrund ihrer Multiresistenzen gegenüber Antibiotika

von besonderer Bedeutung sind. Diese werden mit dem Akronym „ESKAPE“ zusammengefasst. Hierunter zählen folgende Keime: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* Diese Bakterien stellen aufgrund ihrer Resistenzen gegen gewöhnliche Antibiotika, wie z.B. Penicillin, und Reserveantibiotika, wie Vancomycin und Carbapeneme, eine Gefahr dar. Wichtige Resistenzmechanismen sind zum einen die Synthese von Enzymen, die die Struktur von Antibiotika zerstören, eine Modifikation der Bindestellen der Antibiotika, die Bildung von Effluxpumpen sowie Biofilmproduktion.

Angesichts der rasanten und unkontrollierten Zunahme dieser resistenten Bakterienisolate ist es enorm wichtig, deren Übertragungswege zu verstehen und auch zu überwachen. Aufgrund der Mehrfachresistenzen sind ein gut überlegter Einsatz von Antibiotika und eine sorgfältige Überwachung von klonalen Ausbrüchen erforderlich. Nach dem Ansatz des „One Health - Konzepts“ muss man Menschen, Tiere, Lebensmittel und die Umwelt als ein ganzes System betrachten. Das bedeutet, wenn man Maßnahmen zur Kontrolle der Antibiotika-Resistenz einleiten will, muss man alle eben genannte Bestandteile des Systems berücksichtigen. Der Antibiotikaverbrauch muss sowohl bei Menschen und Tieren reguliert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, ist eine enge Zusammenarbeit zwischen Human- und Veterinärmedizin zwingend notwendig.

Jedes Jahr sterben in Ländern der Europäischen Union nach Schätzungen der WHO 25.000 Menschen durch Infektionen mit multiresistenten Erregern, die in Gesundheitseinrichtungen aufgetreten sind (<http://www.euro.who.int/de/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/antibiotic-resistance>).

In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise in Deutschland vom Bundesgesundheitsministerium in Zusammenarbeit mit den Bundesministerien für Ernährung und Landwirtschaft sowie Bildung und Forschung die Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie „DART 2020“ erstellt. Die „DART 2020“ beinhaltet Maßnahmen, die die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen eindämmen soll. Hierbei werden entsprechend dem „One Health-Ansatz“ Human- und Veterinärmedizin gleichermaßen in das Konzept einbezogen. Die Ziele der „DART 2020“ sind folgende: *One Health*-Konzept fördern, Resistenzentwicklungen frühzeitig detektieren, Therapieoptionen mit Antibiotika verbessern, Entstehung von Infektionen verhindern, Bewusstsein für einen sachgerechten Umgang mit Antibiotika stärken sowie Forschung unterstützen

(<https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/antibiotika-resistenzstrategie.html>).

Wenn der Ausbruch von multiresistenten Bakterien außer Kontrolle gerät, droht der gesamten Menschheit eine postantibiotische Ära, in der leichte Verletzungen für die Betroffenen tödlich enden

können (WHO, 2014).

2. *Escherichia coli*- ein Keim mit vielen Eigenschaften

2.1. Die Familie der Enterobacteriaceae

Enterobakterien stellen eine Familie dar, die aus mehreren Gattungen Gram-negativer Stäbchen besteht. Enterobakterien bevorzugen als Lebensraum den Magen-Darm-Trakt von Mensch und Tier (Kayser et al, 2013). Gemeinsames Merkmal dieser Bakterien ist die Fähigkeit, sich sowohl aerob als auch anaerob vermehren zu können. Ein wichtiges Charakteristikum von Enterobakterien ist die Fähigkeit, Laktose abzubauen. Laktose-positive Enterobakterien werden der Gruppe der koliformen Enterobakterien zugeordnet. Laktose-negative Enterobakterien sind z.B. Salmonellen und Shigellen. Morphologisch sind Enterobakterien durch ihre plumpe Form mit abgerundeten Enden gekennzeichnet. Vielen Arten tragen eine peritriche Begeißelung. Enterobakterien sind auf einfachen Nährmedien wie z.B. Luria Bertani (LB)-Agar anzüchtbar. In vitro beträgt ihre mittlere Generationszeit 20-30 min. Als Selektivmedium eignet sich MacConkey-Agar, weil er nur das Wachstum von Gram-negativen, Laktose-abbauenden Stäbchenbakterien zulässt.

Aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Arten innerhalb der Enterobakterien ist ein Mittel zur feineren Differenzierung hilfreich. Zur Klassifizierung innerhalb einer gleichen Art hat sich die Methode der Serotypisierung bewährt. Anhand von Antigenen kann man verschiedene Serovare unterscheiden. Als wichtigste Antigene gelten O-, K-, H- und F-Antigene. O-Antigene sind in der Zellwand befindliche spezifische Polysaccharidketten des Lipopolysaccharidkomplexes der äußeren Membran. Während H-Antigene aus Proteinen zusammengesetzte Geißelantigene sind, stellen K-Antigene in der Außenschicht der äußeren Membran existierende lineare Polymere aus Polysacchariden, die Kapsel, dar. Insgesamt bilden die Polysaccharide eine Schicht mit unterschiedlicher Dicke und können dafür sorgen, dass Antikörper nicht an das O-Antigen binden können (Kayser et al, 2012). F-Antigene sind Bestandteil der Haftfimbrien, die aus Proteinen gebildet werden.

2.1.1. *Escherichia coli*

Bei *E. coli* handelt es sich um Gram-negative, peritrich begeißelte Stäbchen, die über K-, O- und H- und F-Antigene verfügen. Unter Gasbildung ist *E. coli* in der Lage, Glukose, Laktose und Mannitol zu vergären und als Endprodukt Indol zu bilden (Kayser et al., 2013).

E. coli stellt innerhalb der Enterobakterien eine Spezies dar, die aus apathogenen, obligat pathogenen und fakultativ pathogenen Stämmen zusammengesetzt ist. Die beiden letzteren tragen spezifische Virulenzfaktoren, die auf mobilen genetischen Elementen wie z.B. Plasmiden, Phagen und Pathogenitätsinseln kodiert sind (Suerbaum et al, 2012). Die fakultativ pathogenen und apathogenen

E. coli besiedeln den Magen- und Darmtrakt von Mensch und Tier. Deshalb gilt dieser Keim als klassischer Fäkalindikator. Das bedeutet, dass der Nachweis von *E. coli* im Trinkwasser oder auf Gegenständen im Umfeld von Menschen ein Zeichen einer Kontamination durch menschliche bzw. tierische Ausscheidungsprodukte ist (Hof et al, 2009).

2.1.1.1. Pathovare von *E. coli*

Bei einer Kolonisierung des Wirtes mit *E. coli* unterscheidet man extraintestinale (ExPEC) und intestinale Pathogene.

Bei den intestinalen Pathogenen sind 5 Pathovare von großer Bedeutung. Zu diesen gehören EPEC, ETEC, EHEC, EAEC und EIEC.

EPEC gilt als Auslöser der Säuglingsdiarrhoe (Kayser et al, 2013). Durch einen „EPEC Adhesion Factor“ können diese Spezies an den Darmzellen anlagern und mittels eines Typ-III-Sekretionssystem toxische Proteine abgeben (Kayser et al, 2013). Hierdurch werden die für EPEC typischen *Attaching and Effacing*-(AE)-Läsionen an den Darmepithelzellen verursacht. Alle Proteine, die für diesen Vorgang erforderlich sind, sind in der chromosomalen Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) kodiert (Jean Celli et al, 2000).

ETEC (Enterotoxische *E. coli*) ruft eine wässrige Diarrhöe in allen möglichen Altersgruppen hervor. Dieser Keim ist besonders in tropischen Ländern präsent und löst das Krankheitsbild einer „Reisediarrhö“, welches der Cholera sehr stark ähnelt. Das hitzelabile Enterotoxin LT sowie das hitzestabile Toxin ST zählen zu den wichtigsten Effektorproteinen (Kayser et al, 2013). Mittels Fimbrien können sich ETECs fest an Darmepithelzellen binden und ihre Proteine in die Enterozyten sezernieren (Hof et al, 2009). Bei Schweinen beispielsweise treten spezifische ETEC-Stämme vor, die bei Saug- und Absatzferkeln das klinische Bild der wässrigen „Colidiarrhö“ hervorrufen (Mayr et al, 8. Auflage).

EHEC stehen in Verbindung mit den Erkrankungen hämorrhagische Kolitis und hämolytisch urämisches Syndrom (HUS). HUS ist durch drei Symptome gekennzeichnet: hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und Nierenversagen. Intimin und *Shiga-like*-Toxin zählen zu den entscheidenden Proteinen von EHECs. Intimin ist ein Adhärenzprotein und das *Shiga-like*-Toxin entspricht in seiner Wirkung dem Shigatoxin von *Shigella dysenteriae*. Shigatoxin zerstört Darmepithelzellen, indem es die Proteinsynthese hemmt.

EIEC (Enteroinvasive *E. coli*) gelten als Auslöser einer Erkrankung, die der bakteriellen Ruhr ähnlich ist. Über ein im Plasmid enthaltenes Invasin können EIECs in die Enterozyten eindringen und diese anschließend zerstören.

EAEC (Enteroaggregative *E. coli*) sind in der Lage, sich mithilfe von besonderen Fimbrien an die Darmmukosa festzusetzen. Bei einer Infektion durch diesen Erreger kommt es zu einer sekretorischen Diarrhö (Kaper, 2004).

Wenn außerhalb des Darms Bedingungen herrschen, in denen sich *E. coli* vermehren können, dann können sie extraintestinale Infektionen auslösen und werden als sogenannte ExPECs bezeichnet. Klassische Erkrankungen sind untere Harnwegsinfektionen, Nierenbeckenentzündungen und Meningitiden (Kayser et al, 2013). Infektionen der Harnwege sind auf uropathogene *E. coli* (UPEC) zurückzuführen. Mittels P-Fimbrien binden sie an Uroepithelzellen und gelangen in die Mukosa (Kayser et al, 2013). Meningitiden bei Neugeborenen werden häufig durch neonatale Meningits *E. coli* (NMEC) verursacht.

2.1.1.2. Verwandtschaftsanalyse von *E. coli*

E. coli kann 4 sogenannten phylogenetischen Gruppen (A, B1, B2 und D) zugeordnet werden (Carlos et al., 2010). Diese Einteilung basiert auf der Anwesenheit bzw. dem Fehlen von bestimmten Stoffwechsellenzymen. A und B1 sind Schwestergruppen, die als gemeinsamen Vorfahren Stämme von der Gruppe B2 besitzen (Carlos et al., 2010). Wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen spiegeln sich in den Nischen, in der Metabolisierung verschiedener Zucker, ihrer Antibiotikaresistenzen und den Virulenzfaktoren wider. Die Genomgrößen zwischen den Gruppen variieren. So besitzen die Gruppen A und B1 kleinere Genome als B2 und D (Carlos et al., 2010). Kommensale *E. coli*-Stämme werden der phylogenetischen Gruppen A und B1 zugeordnet, wohingegen extraintestinal pathogene Stämme der Gruppe B2 angehören (Derakhshandeh et al., 2013). Stämme der Gruppe D sind häufig enteropathogen (Derakhshandeh et al., 2013). In den Stämmen der Gruppen B2 und D sind mehr Virulenzfaktoren als in den Gruppen B1 und A vorzufinden (Clermont et al. , 2012).

Noch präziser ist die Klassifizierung nach sogenannten *housekeeping* Genen. Dieses Verfahren bezeichnet man als *Multilocus Sequence Typing* (MLST), nach welchem *E. coli* Bakterien phylogenetisch gruppieren werden können (Wirth et al., 2006). Bei dieser Methode werden *E. coli* anhand von 7 Genen, die essentiell für den Bakterienstoffwechsel sind, sogenannten *Housekeeping*-Genen, klassifiziert. Hierbei wird nach Austausch von einzelnen Nukleotiden in den DNA-Sequenzen, den sogenannten Polymorphismen, geschaut. Als *Housekeeping*-Gene wurden die Gene *adh* (Adenylat-Kinase), *fumC* (Fumarat-Hydratase), *gyrB* (DNA-Gyrase), *icd* (Isocitrat/Isopropylmalat-Dehydrogenase), *mdh* (Malat-Dehydrogenase), *purA* (Adenylosuccinat-Dehydrogenase) und *recA* (DNA-Reparatur-Enzym, ATP/GTP Binding Motif) ausgewählt. Aus der Gesamtsumme der

Polymorphismen in den 7 einzelnen Genloci werden einzelne Sequenztypen abgeleitet. STs, die sich in der Sequenz eines Allels unterscheiden, werden einem sogenannten Sequenztypcluster (STC) zugeordnet. Aus den STCs kann Informationen darüber gewonnen werden, aus welchem gemeinsamen Vorfahren die einzelnen zugehörigen Isolate entstanden sein könnten. Für epidemiologische Analysen von *E. coli*-Stämmen ist das MLST ein sehr hilfreiches Mittel.

2.2. Antibiotika

Antibiotika sind entweder aus Mikroorganismen gewonnene oder künstlich hergestellte Wirkstoffe, die das Wachstum von prokaryontischen Mikroorganismen stoppen bzw. diese abtöten können. Aufgrund dieser Wirkung sind sie ein häufig eingesetztes Mittel in der Human- und Tiermedizin zur Therapie bakterieller Infektionen. Es gibt zwei verschiedene Gruppen von Antibiotika hinsichtlich ihres Wirkmechanismus. Zum einen gibt es Antibiotika, die bakteriostatisch wirken. Das bedeutet, sie können das Wachstum von Bakterien hemmen, aber diese nicht abtöten. Zum anderen existieren bakterizide Antibiotika, die Bakterien abtöten durch beispielsweise Lyse der Zellwand. An beiden Wirkprinzipien wird deutlich, dass Antibiotika beim Stoffwechsel oder an zellulären Strukturen der Bakterien ansetzen.

Je nach Wirkmechanismus oder Angriffsort werden verschiedene Gruppen von Antibiotika unterschieden (siehe Abbildung 1). In dieser Dissertation wird der Fokus auf die Beta-Laktam-Antibiotika gelegt. Diese hemmen die Zellwandsynthese der Bakterien. Sie binden im aktiven Zentrum der Transpeptidase kovalent an das Serin. Dadurch wird das Enzym irreversibel blockiert und die Zellwandsynthese verhindert. Aufgrund ihres Wirkmechanismus haben Beta-Laktam-Antibiotika nur auf vermehrende Bakterienpopulationen Einfluss. Bei ruhenden Bakterien können diese ihre Wirkung nicht entfalten. Die Beta-Laktam-Antibiotika werden in verschiedene Klassen unterteilt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird (siehe auch Abbildung 2).

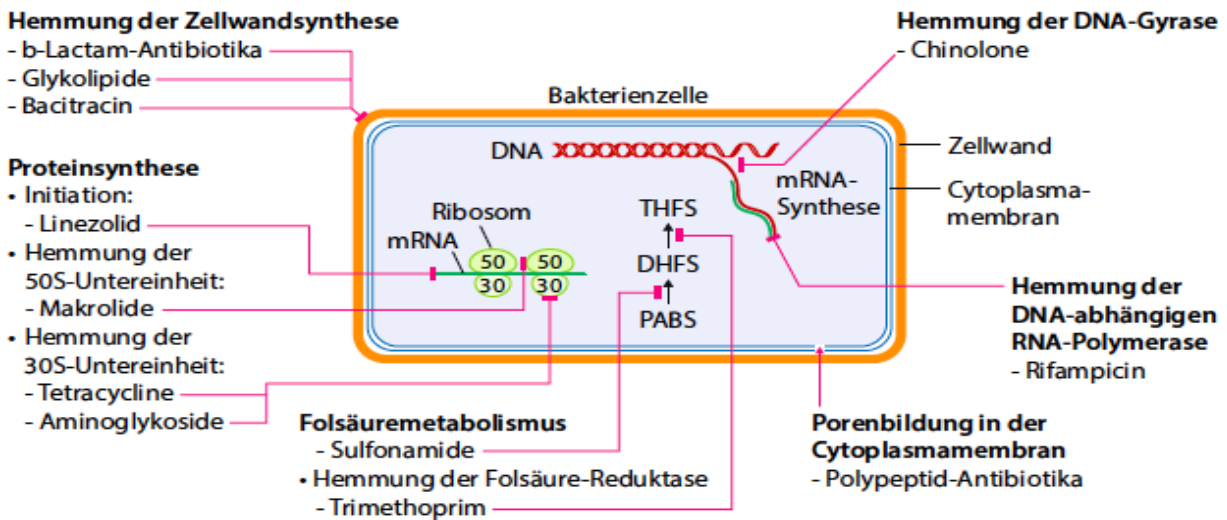


Abbildung 1 Wirkmechanismen der jeweiligen Antibiotikaklassen (Fritsche, 2016)

2.2.1. Beta-Laktam-Antibiotika

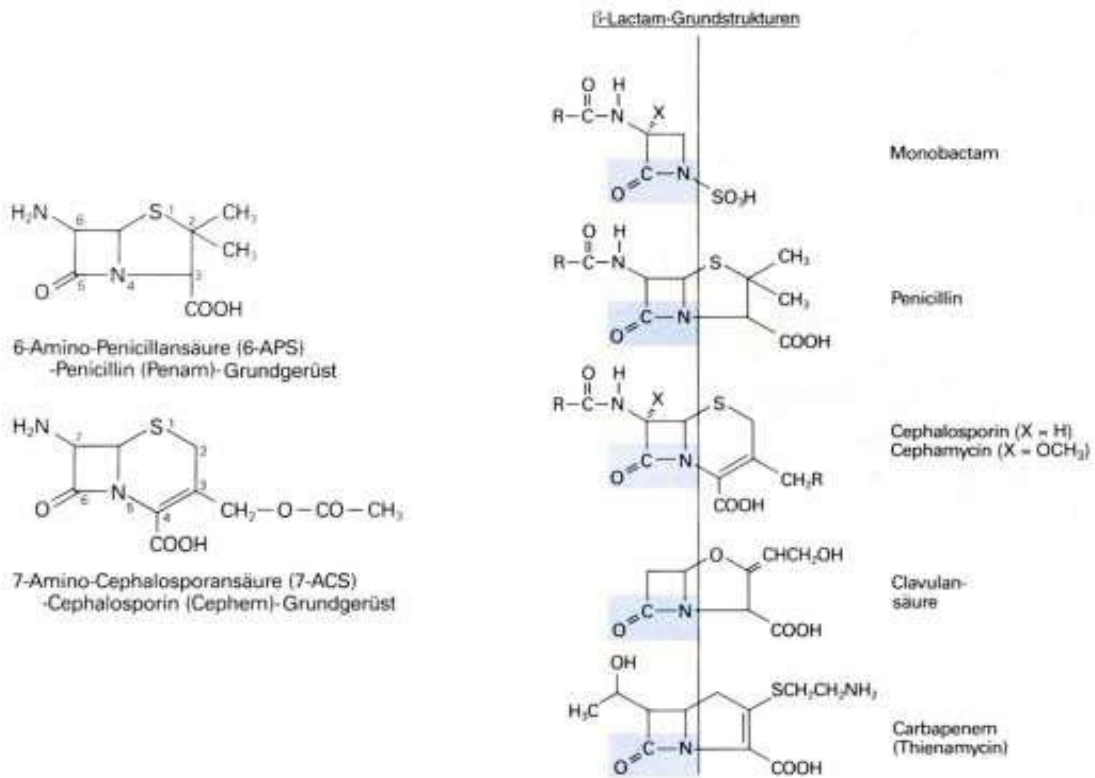


Abbildung 2 Aufbau therapeutisch eingesetzter β-Laktam-Verbindungen (Forth und Aktories, 2005)

2.2.1.1. Penicilline

Die Penicilline lassen sich in vier Gruppen unterteilen, nämlich dem Penicillin G, den Isoxazolylpenicillinen, Aminopenicillinen und Acylaminopenicillinen. Das Penicillin G kommt häufig als Natriumsalz-Depotform nach Infektion mit Gram-positiven Erregern (Streptokokken, Pneumokokken) zum Einsatz (Aktories et al, 2005).

Durch den Einbau von Aminoresten in der Benzylseitenkette von Penicillinen konnten auch die

Wirksamkeit auf Gram-negative Keime erweitert werden. Aminopenicilline sind sehr gut wirksam gegen *Haemophilus influenzae*, Listerien, Enterokokken, ca. 60% der *E. coli*-Stämme und über 90% der *Proteus mirabilis*-Stämme. Das in den 1960er Jahren entwickelte Ampicillin wird heutzutage durch Amoxicillin und Ampicillin-Ester bei der Therapie verdrängt (Aktories et al, 2005). Dies liegt an der deutlich besseren Resorption nach oraler Gabe.

Zu den bekanntesten Acylaminopenicillinen zählen Mezlocillin und Piperacillin. Diese Antibiotika sind gegen Gram-positive Kokken ähnlich wirksam wie Ampicillin, haben gegen Gram-negative Stäbchenbakterien einen größeren Effekt (Aktories et al, 2005).

Isoxazolylpenicilline sind unter allen Penicillinen die einzigen Vertreter, die gegen Penicillinasen von *Staphylococcus aureus* resistent sind. Ein Angriff der Penicillinasen auf den β -Laktamring wird durch längere, polare Seitenketten schwergemacht. Ein Nachteil dieser Gruppe ist jedoch die schwächere Wirkung gegen penicillinempfindliche Staphylokokken-Stämme im Vergleich zu Penicillin G und dessen verwandte Substanzen (Aktories et al, 2005). Bei Infektionen mit *Staphylococcus aureus* gilt Flucloxacillin als Standardantibiotikum, weil es sowohl oral als auch parenteral verabreicht werden kann.

2.2.1.2. Cephalosporine

Cephalosporine repräsentieren eine Gruppe von Beta-Laktam-Antibiotika, die halbsynthetisch produziert werden. Die chemische Grundstruktur wurde ursprünglich aus dem Pilz *Cephalosporium acremonium* gewonnen. Modifikationen am molekularen Grundgerüst der Cephalosporine finden an Substituenten an den Stellen 3 und 7 statt. Klinisch können Cephalosporine zur parenteralen Gabe und in solche, die oral gegeben werden, gegliedert werden. Pharmakologisch existiert eine Einteilung in 5 Generationen hinsichtlich ihres Wirkungsspektrums (Aktories et al., 2005).

Zu den Cephalosporinen der 1. Generation gehören Cefazolin, Cefadroxil und Cefalexin. Sie wirken gegen *S. aureus* einschließlich der Penicillinase-produzierenden Stämme. Gegen Gram-negative Erreger besitzen diese Wirkstoffe dagegen eine schwache Aktivität. Gegen Gram-negative Erreger besitzen dagegen Cephalosporine der 2. Generation eine bessere Wirksamkeit. Vertreter dieser Gruppe sind Cefuroxim, Cefalozin und Cefoxitin. Cephalosporine der 3. Generation fungieren als Breitspektrumantibiotika gegen Gram-negative und Gram-positive Keime. Typische Substanzen dieser Gruppe sind Ceftriaxon, Cefoperazon und Ceftiofur. Cephalosporine der 4. Generation, zu denen beispielsweise das Cefepim gehört, sind gegenüber β -Laktamasen von Gram-negativen Bakterien stabil, jedoch sind sie gegen einige Gram-positive wie Staphylokokken schwächer wirksam (Aktories et al, 2005). Zu den Cephalosporinen der 5. Generation gehört das Ceftobiprol. Von der Wirkung ist es vergleichbar mit den Cephalosporinen der 3. Generation. Zusätzlich ist es gegen MRSA einsetzbar (<https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=+Ceftobiprol.>).

2.2.1.3. Carbapeneme

Carbapeneme sind im Gegensatz zu allen anderen Beta-Laktam-Antibiotika sehr stabil gegenüber fast allen β -Laktamasen und sind gegen ein großes Spektrum an bakteriellen Erregern wirksam. Im 5-Ring der Carbapeneme ist statt dem Schwefelatom ein Kohlenstoffatom gebunden, was auch in Abbildung 2 zu sehen ist (Aktories et al, 2005). Darüber hinaus liegt eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 vor. Am C6-Atom ist eine Hydroxyethylseitenkette angelagert. Diese funktionelle Gruppe unterscheidet das erste Carbapenem Thienamycin von Cephalosporinen und Penicillinen, die an dieser Position eine Acylaminogruppe tragen. Die Hydroxyethylseitenkette hat Einfluss auf die Wirksamkeit von den Carbapenemen. Thienamycin hat sich nach seiner Entdeckung in den 1960er Jahren nicht lange bewährt, weil es in wässriger Lösung instabil ist. Dadurch entstanden neue Wirkstoffe wie Imipenem, Meropenem und Panipenem. 1985 wurde Imipenem als erstes Carbapenem gegen komplexe mikrobielle Infektionen eingeführt. Mittlerweile sind Abkömmlinge wie Doripenem, Ertapenem und Meropenem verfügbar. Insgesamt sind diese Antibiotika gegen Gram-negative Bakterien besonders wirkungsvoll (El Gamal et al., 2017).

2.2.2. Chinolon-Antibiotika

Chinolone sind Antibiotika mit bakterizider Wirkung. Als Ausgangssubstanz für die Synthese dieser Antibiotika gilt die Nalidixinsäure. Chinolone weisen Unterschiede im Hinblick auf ihr chemisches Grundgerüst und auf die Substituenten auf. Bei den Fluorchinolonen wie Norfloxacin wird durch das Fluoratom eine weitere Aktivitätssteigerung erzielt. Angriffspunkt der Chinolone sind die bakteriellen Topoisomerasen. Von denen sind entweder Topoisomerase II (Gyrase) oder Topoisomerase IV betroffen. Beide Enzyme sind für die Spiralisierung der DNA zuständig, damit die Replikation stattfinden kann. Durch die Chinolone wird dieser Prozess verhindert, sodass die DNA nicht abgelesen werden kann. Es kommt folglich zum Absterben der Bakterienzelle. Die Chinolone lassen sich in 4 Gruppen mit unterschiedlichem Angriffspunkt gliedern. Klassische Substanzen sind Ciprofloxacin, Enoxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin (Aktories et al, 2005).

2.2.3. Aminoglykoside

Aminoglykoside besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal ein zentrales 2-Desoxystreptamin, welches glykosidisch mit zwei Aminosuktern verknüpft ist. Die OH-Gruppen verleihen den Aminoglykosiden hydrophile Eigenschaften. Durch die Aminogruppen werden sie im neutralen und alkalischen Milieu basisch und nucleophil. Sobald sich die Aminoglykoside im Cytoplasma der Bakterienzelle befinden, binden sie an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und verursachen Fehlablesungen bei der mRNA. Dadurch kommt es zur Entstehung fehlerhafter Proteine, was letztlich

zum Absterben der Bakterien führt. Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums können Aminoglykoside bei vielen bakteriellen Infektionen verwendet werden. Wichtigste Vertreter dieser Antibiotikaklasse sind Streptomycin, Tobramycin und Amikacin (Aktories et al, 2005).

2.2.4. Tetrazykline

Diese Antibiotika wurden erstmals in *Streptomyces*-Arten entdeckt. Tetracycline sind durch vier Sechseringstrukturen gekennzeichnet. Die in der Therapie gebräuchlichen Derivate sind durch verschiedene Substituenten an den Ringpositionen 5,6 und 7 modifiziert. Tetracycline besitzen eine bakteriostatische Wirkung, indem sie sich zwischen der großen und kleinen Untereinheit der 70S-Ribosomen von Bakterien binden. Dadurch wird eine Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die kleine Untereinheit verhindert. Dies hat einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese zur Folge, was letztlich zum Untergang der Bakterienzelle führt. Tetracycline sind gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien gleichermaßen wirksam. Darüber hinaus kann man sie auch gegen obligat zellwandlose Bakterien wie Mykoplasmen einsetzen. Häufig verwendete Tetracycline sind Minocyclin und Doxycyclin (Aktories et al, 2005).

2.2.5. Colistin

Colistin ist ein als Antibiotikum wirkendes Polypeptid, welches 1947 in dem Bakterium *Paenibacillus polymyxa* erstmals entdeckt wurde. Colistin ist in zwei Formen erhältlich, nämlich Colistinsulfat und Colistinmethansulfonat. Seit 1959 wird Colistin bei der Behandlung von Infektionen durch multiresistente Gram-negative Erreger eingesetzt. Aufgrund seiner neurotoxischen und nephrotoxischen Nebenwirkungen wurde dieses Antibiotikum vor 50 Jahren durch Aminoglykoside ersetzt. Aufgrund einiger Patientenberichte über schwere Nierenschäden wurde die Anwendung von Colistin ab den frühen 1970-er Jahren komplett eingestellt. Heutzutage greift man auf Colistin als Reserveantibiotikum bei Patienten, die mit hochresistenten Gram-negativen Bakterien infiziert sind zurück, wenn alle anderen Antibiotika unwirksam sind (Andrade et al., 2020).

Die chemische Strukturformel ist in Abbildung 3 dargestellt. Das Grundgerüst besteht aus einem Heptapeptid und einer Tripeptidkette, welches am N-terminalen Ende mit einem Fettsäurerest verbunden ist.

Das Ziel von Colistin ist die bakterielle Zellmembran. Es bindet spezifisch an das Lipid A des Lipopolysaccharids (LPS) in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Durch die Bindung werden zweiwertige Kationen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} verdrängt. Durch das Fehlen dieser Ionen verliert die äußere Membran ihre Stabilität, wodurch sich Poren bilden. Im zweiten Schritt wird Colistin in die innere Membran eingebaut und die innere Membran wird dadurch aufgelöst. Dadurch gelangen Partikel aus dem Cytoplasma in die Peripherie. Es kommt letztlich zum Tod der Bakterien (Andrade

et al., 2020).

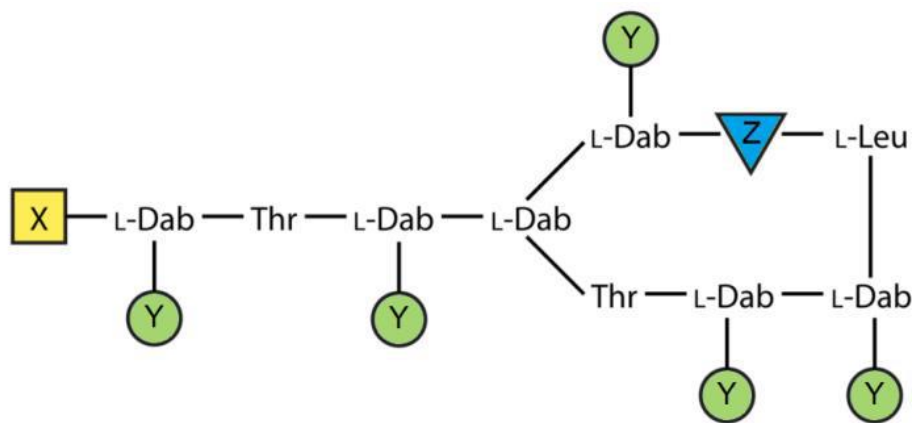


Abbildung 3 Chemische Strukturformel von Colistin:

Colistin ist ein Polypeptid, bestehend aus einer Heptapeptid und einer Tripeptidkette, welches am N-terminalen Ende mit einem Fettsäurereste verbunden ist. X: Fettsäurereste; Y: Aminogruppe (-NH₂); Z: D-Leucin (Poirel et al., 2017)

2.3 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, zirkuläre und doppelsträngige DNA-Moleküle, die im Zytoplasma von Bakterien vorkommen. Plasmide sind im Vergleich zum Chromosom relativ klein und sind selbst in der Lage, sich unabhängig zu replizieren. Dies wird durch einen Replikationsursprung (*origin of replication*, ori) ermöglicht. Bei Bakterien gibt es eine Unterteilung der Plasmide in drei Subtypen:

1. F-Faktoren (Fertilitätsfaktoren) unterscheiden Bakterien in Donor- bzw. Rezeptorzelle bei der Übertragung von Genen.
2. Colicinogene Faktoren besitzen Gene für die Synthese von Proteinen, mit denen andere *E. coli*-Bakterien abtöten können. Zudem können auch F-Pili gebildet werden.
3. Resistenzfaktoren sind im Besitz von Resistenzgenen gegen Antibiotika oder Umweltchemikalien. Gleichzeitig sind auch Gene gespeichert, die für den Transfer dieser Resistenzfaktoren in andere Zellen codieren.

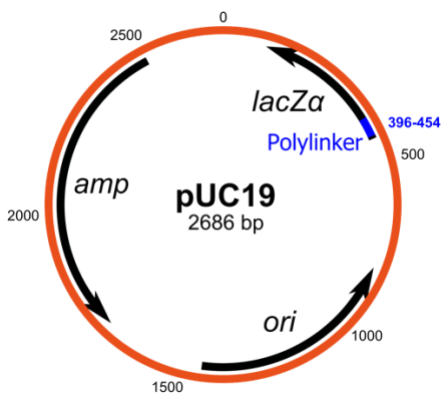


Abbildung 4 Beispiel eines Plasmids (pUC19): ori (Replikationsursprung), amp (Ampicillinresistenz), lacZα (Betagalaktosidasegen) (<https://de.wikipedia.org/wiki/PUC19>)

2.4 Mechanismen des horizontalen Gentransfers

Die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen geschieht durch verschiedene Mechanismen des Gentransfers und der DNA-Rekombination. Durch übermäßigen Verbrauch von Antibiotika wird ein Selektionsdruck auf die Bakterien ausgeübt, der diese zur Entwicklung von resistenten und multiresistenten Formen veranlasst. Antibiotikaresistenz-Gene können über Plasmide (Mechanismus Konjugation), Bakteriophagen (Mechanismus Transduktion), Transposons und Genkassetten (Mechanismus Transformation).

Aufgrund dieser Vielzahl an Mechanismen breiten sich die multiresistenten Bakterien rasch aus. All diese Komponenten des DNA-Transfers werden als mobile genetische Elemente zusammengefasst (Partridge et al. , 2018).

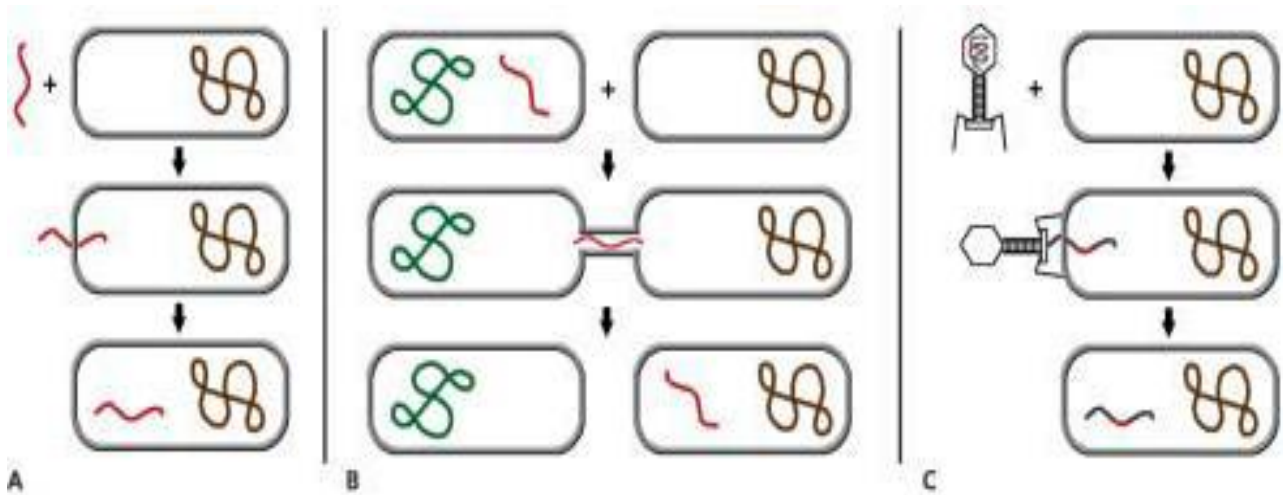


Abbildung 5 Mechanismen für horizontalen Gentransfer: A) Transformation B) Konjugation C) Transduktion

(https://www.helmholtzmuenchen.de/fileadmin/HZM/pdf/publikationen/mensch_und_umwelt_spezial/Heft17/59_64_Hartmann.pdf)

Anhand der Abbildung 5 sollen die verschiedenen 3 Mechanismen für horizontalen Gentransfer

veranschaulicht werden. In Abbildung 5A ist die Transformation abgebildet. Die freie DNA ist in dieser Abbildung rot dargestellt. Diese wird von den Bakterien über die Zellmembran aufgenommen. Hierfür ist eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von fremder DNA des Bakteriums erforderlich. Sollte das Bakterium nicht dazu in der Lage sein, muss man chemisch kompetente Zellen herstellen. Dies kann durch eine Vorbehandlung der Bakterienzellen mit Calciumchloridlösung und anschließender Hitzeschockreaktion herbeigeführt. Ein anderes Verfahren ist die Elektroporation. Der genaue Mechanismus, wie durch diese Verfahren die Zellmembran durchlässig für die freie DNA wird, ist momentan immer noch unklar. Die Konjugation ist in Abbildung 5B zu sehen. Diese ist ein Verfahren, bei dem zwischen zwei verwandten Bakterien der Genaustausch über sogenannte Pili erfolgt. Die Fremd-DNA kann in Form von Plasmiden oder Transposons übertragen werden. Bei einer Transduktion (Abbildung C) handelt sich um einen Gentransfer von einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle mittels Bakteriophagen.

2.5 Beta-Laktamasen

Beta-Laktamasen sind Enzyme, die den Beta-Laktamring hydrolysieren. Diese Enzyme werden nach ihrem aktiven Zentrum in zwei Gruppen unterteilt, nämlich die Serin-Beta-Laktamasen und die Metallo-Beta-Laktamasen (Di Guilmi, Dessen, Dideberg, & Vernet, 2003; Kohlrausch & Holtje, 1991). Serin-Beta-Laktamasen hydrolysieren Beta-Laktame unter Ausbildung eines Acyl-Enzym-Komplexes. Hierdurch wird der Beta-Laktamring aufgelöst. Anschließend wird Wasser durch Deacetylierung abgespalten und die Wirksamkeit des Antibiotikums aufgehoben (Di Guilmi et al., 2003). Die Gene für diese Beta-Laktamasen waren ursprünglich im Chromosom lokalisiert, inzwischen befinden sie sich auch auf Plasmiden. Das Gen für eine Beta-Laktamase wird als *bla*-(*beta-lactamase*)-Gen bezeichnet. Der spezifische Beta-Laktamase-Typ/-Subtyp ist tiefergestellt in der Beschreibung aufgeführt. So bedeutet z. B. *bla*_{CTX-M} das es sich um ein Beta-Laktamase-Gen des CTX-M-Typs handelt. Neue Allele können sich durch Punktmutationen ausbilden. Letztere werden dann mit Zahlen benannt d. h. *bla*_{CTX-M-15} steht für das Gen des Subtyps 15 der CTX-M-Beta-Laktamase.

Durch den Einbau in Plasmide hat eine schnelle Ausbreitung der Beta-Laktamase-Gene innerhalb der Enterobakterien stattgefunden. Inzwischen sind mehr als 7000 Beta-Laktamasen definiert worden (<http://bldb.eu/>, 2022). Die große Zahl an Beta-Laktamasen mit gleichem Angriffspunkt, aber unterschiedlichen Substratspektren, weist verschiedene Sensibilitäten gegen Beta-Laktamase-Inhibitoren und unterschiedliche Primärstrukturen auf. Dies führte zur Einführung von verschiedenen Klassifizierungsschemata. Am häufigsten verwendet wird das System von Bush (Bush & Jacoby, 2010), welches auf der Enzymaktivität gegen verschiedene Beta-Laktame basiert, und das System

von Ambler (Ambler, 1980), welches die Beta-Laktamasen basierend auf ihrer Aminosäuresequenz in 4 Substanzklassen (A, B, C und D) einteilt (Tabelle 1). Das System nach Bush teilt die Beta-Laktamasen ebenfalls in 4 Gruppen ein. Die Gruppe 1 beinhaltet Cephalosporinasen der Molekülklasse C, die nicht durch Clavulansäure gehemmt werden. In Gruppe 2 sind Penicillinasen und Cephalosporinasen der Molekülklassen A und D, die durch Clavulansäure in ihrer Wirkung aufgehoben werden, zu finden. Metalloenzyme, die der Molekülklasse B angehören und nicht durch Clavulansäure inhibierbar sind, sind in der Gruppe 3 zugeordnet. In Gruppe 4 sind Penicillinasen eingeordnet, die keiner Ambler-Molekülklasse zugeordnet sind und die nicht durch Clavulansäure inhibiert werden (Bush & Jacoby, 2010). Die Einteilung nach Ambler ist äquivalent zu der Klassifizierung in Serin- (Gruppe A, C, D) und Metalloproteinasen (Gruppe B) (Ambler 1980).

2.5.1. Wichtige Vertreter der Extended-Spectrum Beta-Lactamasen (ESBL)

Extended-Spectrum Beta-Lactamasen (ESBLs) sind bakterielle Enzyme, die Penicillinabkömmlinge und Aminopenicilline sowie Beta-Laktame mit einer Oxyimino-Gruppe (z. B. Ceftazidim, Cefotaxim) und Monobaktame (Aztreonam) abbauen können. Allerdings sind sie gegen Cephamycine und Carbapeneme wirksam und werden gewöhnlich von Beta-Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure gehemmt (Bush & Jacoby, 2010). Die meisten ESBLs gehören der Ambler-Klasse A und der Bush-Gruppe 2be an (Tabelle 1). Kennzeichnend für ESBLs ist deren Fähigkeit, eine größere Anzahl an Beta-Laktam-Antibiotika hydrolysieren zu können als die Enzyme (z. B. TEM-1, TEM-2 oder SHV-1), von denen sie abstammen.

2.5.2. TEM-ESBLs

Die TEM-Typ-Beta-Laktamasen stammen von den Subtypen TEM-1 und TEM-2 ab. 1965 wurde zum ersten Mal TEM-1 von einem Patienten namens Temoneira in Athen, Griechenland, isoliert. Nur wenige Vertreter der TEM-Typ-Beta-Laktamasen gehören den ESBLs an. Die meisten Subtypen, wie z.B. TEM-1 und TEM-2, hydrolysieren nur Penicillinderivate wie Ampicillin oder Piperacillin (Bush et al., 2020). Ein Beispiel einer ESBL TEM ist *bla*_{TEM-52}.

2.5.3. SHV-ESBLs

Die Bezeichnung SHV bedeutet *sulphydryl variable*. Aus *Klebsiella* spp. stammen alle SHV-Enzyme und der Subtyp SHV-1 gilt gemeinhin als Ursprung aller heute bekannten Plasmid-kodierten SHV-Abkömmlinge (Bush et al., 2020). Genauso wie bei den TEM-Typ-Beta-Laktamasen gehört nur ein sehr kleiner Teil der SHV-Subtypen ebenfalls den ESBLs an. Ein Beispiel einer ESBL-SHV ist *bla*_{SHV-12}.

2.5.4. CTX-M-ESBLs

Zunächst waren TEM und SHV bei klinischen Enterobacteriaceae-Isolaten die am häufigsten vorkommenden ESBLs. Inzwischen sind allerdings ESBLs vom CTX-M-Typ zahlenmäßig am wichtigsten. Im Gegensatz zu TEM und SHV-Enzymen sind alle CTX-M-Typ Beta-Laktamasen EBSLs. CTX-M-Typ-Beta-Laktamasen sind in der Lage, Cefotaxim (CTX) äußerst effektiv zu hydrolysieren. An diese Fähigkeit ist auch der Begriff Cefotaximase angelehnt. Der Buchstabe M in „CTX-M“ ist an die Stadt München angelehnt. Dort erfolgte der erste Nachweis einer Cefotaximase (Bauernfeind et al., 1990). Aufgrund von phylogenetische Analysen wird die Herkunft dieser Enzyme im Chromosom von *Kluyvera* spp. vermutet, von wo aus sie möglicherweise mittels mobiler genetischer Elemente auf Plasmide übertragen wurden (Canton et al. , 2012). Momentan existieren etwa 251 verschiedene CTX-M-Beta-Laktamasen (<http://bldb.eu/>, 2022). Bedingt durch ihre Aminosäuresequenz kann man die verschiedenen Subtypen in 5 Gruppen einteilen (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 und CTX-M-25) (Pitout, 2010). Gruppe 1 und 2 entstammen aller Wahrscheinlichkeit nach chromosomalen Genen von *Kluyvera ascorbata*, während die Herkunft der Gruppen 8, 9 und 25 in Genen von *Kluyvera georgiana* möglicherweise sein könnte. Verschiedene mobile genetischen Elemente sind im Besitz des Resistenzgen *bla_{CTX-M}*. Jedoch befindet es sich häufig auf großen Multiresistenzplasmiden. Die Insertionssequenz *ISEcp1* ist oft für die initiale Mobilisation verantwortlich, was jedoch nicht immer der Fall sein muss (Bush et al. , 2020).

Tabelle 1 Klassifikation der bakteriellen Beta-Laktamasen nach Bush und Ambler (*Bush & Jacoby, 2010*)

Bush- Jacoby- Medeiros Gruppe	Molekulare Klasse (Subklasse)	Bevorzugtes Substrat	Hemmbar durch:		Repräsentative Enzyme
			CA ¹	EDTA	
1	C	Cephalosporine	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cephalosporine	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilline	+	-	PC1
2b	A	Penicilline, Cephalosporine	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilline, Schmal- und Breitspektrumcephalosporine, Monobaktame	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Penicilline	+/-	-	TEM-30, TEM-36
2ber	A	Breitspektrumcephalosporine, Monobaktame	+	-	TEM-50

2c	A	Carbencillin	+	-	PSE-1, PSE-3
2ce	A	Carbencillin, Cefepim	+	-	RTG-4
2d	D	Penicilline, Oxacillin	+/-	-	OXA-1 bis OXA-10
2de	D	Breitspektrumcephalosporine	+/-	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapeneme	+/-	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Breitspektrumcephalosporine	+	-	CepA
2f	A	Carbapeneme	+/-	-	
3a	B (B1)	Die meisten β -Laktame, Carbapeneme	-	+	IMP-1, VIM-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1
3b	B (B2)		-	+	CphA, Sfh-1
(4)	Unbekannt				

1: Clavulansäure

2.6 *Galleria mellonella*-Modell

Mechanismen der angeborenen Immunantwort nach einer bakteriellen Infektion sind bei Menschen und Insekten vergleichbar. Daher werden Insekten sehr gerne als Tiermodell für Infektionsversuche verwendet, um die Virulenz von bestimmten Erregern zu untersuchen. Am Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen wurde die Larve der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* erfolgreich als Modellorganismus etabliert. Beispielsweise konnten Frick et al (2018) in einer Arbeit darlegen, dass die angeborene Immunantwort von Säugetieren und Insekten auf pathogene Darmbakterien vergleichbar mit der Immunantwort von *Galleria mellonella* ist. Hierzu wurden vergleichende Analysen hinsichtlich der Bildung von Rezeptoren zur Bindung der Bakterien sowie der Expression von reaktiver Sauerstoff- und Stickoxidspezies und antimikrobieller Peptide durchgeführt. Es wurden Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Erkennung von pathogenen Bakterien im Gastrointestinaltrakt und der Bildung von Effektormolekülen zur Induktion einer oxidativen Stressreaktion sowie Produktion antimikrobieller Peptide.

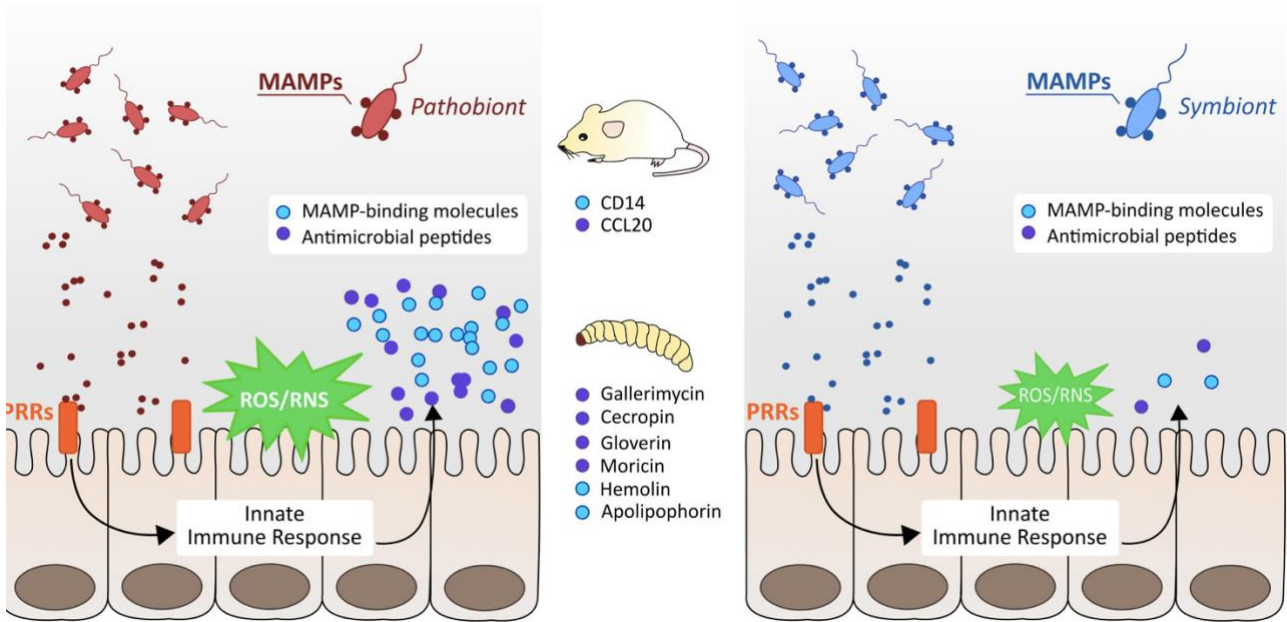


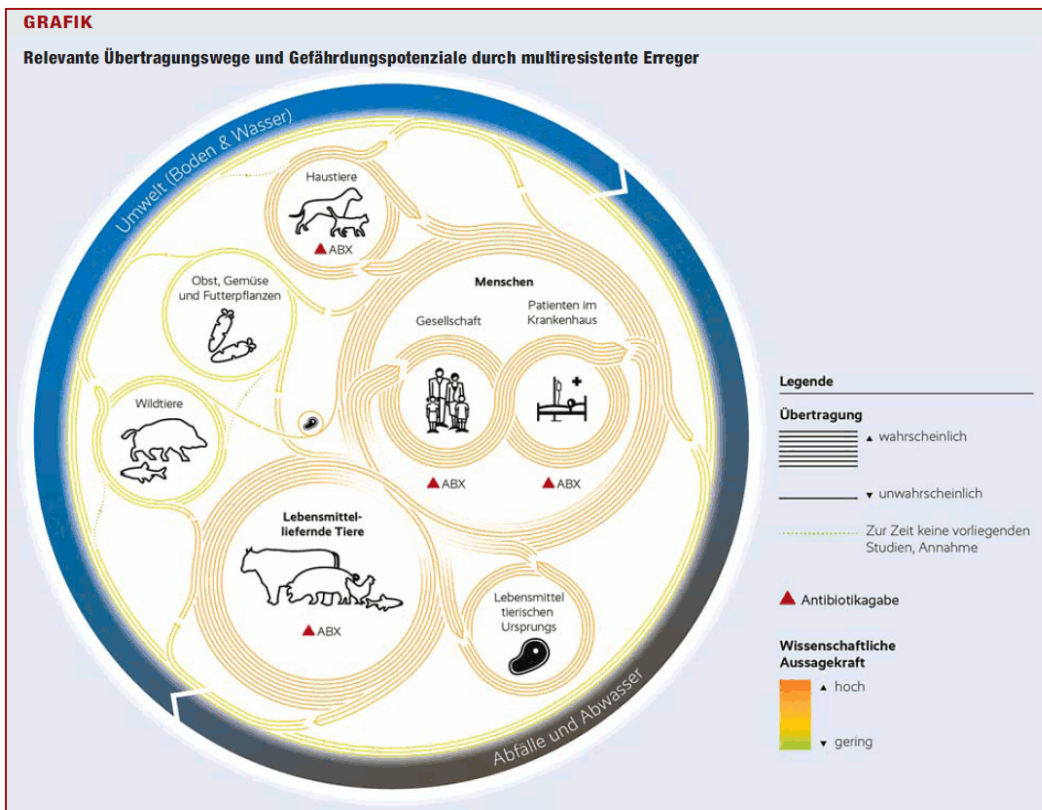
Abbildung 6 Übersicht über die angeborene Immunantwort von Säugetieren und Insekten auf pathogene und symbiotische Bakterien (Frick et al., 2018)

Es wurden bereits verschiedene *Listeria monocytogenes*-Stämme hinsichtlich ihrer Virulenz untersucht (Mukherjee et al., 2009). In der Doktorarbeit von Frau Dr. Judith Schmiedel (2015) wurde dieses Modell erfolgreich zur Analyse von *E. coli*-Isolaten verwendet. Man kann Unterschiede in der Virulenz zwischen den verschiedenen Stämmen feststellen. Dies zeigt, dass *Galleria mellonella* ein praktisches Modell für Infektionsstudien ist. In dieser Doktorarbeit wurde das Modell angewandt, um die Virulenz von verschiedenen ESBL-kodierenden Bakterienstämmen zu testen.

3. Problemdarstellung

Wie eingangs erwähnt, gewinnen multiresistente Gram-negative Bakterien weltweit als Auslöser von nosokomial und ambulant erworbenen Infektionen eine dramatisch zunehmende Bedeutung. In diesem Kontext spielt die Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika eine tragende Rolle, die vor allem durch den Erwerb von Beta-Laktamase-Gen-tragenden Plasmiden hervorgerufen wird (Peirano et al. , 2019). Beta-Laktamase-produzierende Erreger, insbesondere ESBL-kodierende Isolate, vermindern die Möglichkeiten der Antibiotikatherapie vor allem auf Intensivstationen und bei immunsupprimierten Patienten. International am häufigsten vorzufinden sind die Beta-Laktamase-Typen TEM, SHV und CTX-M (Bush et al, 2020). Weil ESBLs meist in Plasmiden befindlich sind, kann eine Übertragung zwischen den Vertretern verschiedener Spezies stattfinden. Die Situation wird dadurch erschwert, dass ESBL-kodierende Plasmide neben dem ESBL-Gen meistens auch noch andere Resistenzgene sowie Faktoren enthalten, welche die Mobilität der Resistenzgene fördern (Partridge et al. , 2018). Diese werden als Insertionselemente bezeichnet. Durch diese wird die Übertragbarkeit der ESBL-Gene von Plasmid zu Plasmid, aber auch von einem Plasmid in das bakterielle Chromosom und umgekehrt, in Gang gesetzt. Sobald das ESBL-Gen tragende mobile genetische Element in ein konjugatives Plasmid inseriert ist, kann sich das Gen über Konjugation schnell horizontal ausbreiten. Bakterielle Speziesgrenzen können problemlos überwunden werden. Identische Plasmide lassen sich dann in verschiedenen Bakterienspezies nachweisen, welche alle ein ähnliches in vitro-Resistenzmuster zeigen (Yao et al. , 2014). Im Vergleich zu z.B. MRSA, der sich bei Ausbrüchen ausschließlich klonal ausbreitet, zeigt sich hierdurch ein anderes Verteilungsmuster. Die Resistenz wird in diesem Fall nicht nur von der Donor- auf die Spenderzellen, sondern kann auch auf Bakterien der gleichen oder verwandten Spezies transferiert werden.

In einigen Studien wurde auch der Frage nachgegangen, ob eine Übertragung von ESBL-kodierenden Bakterien zwischen Menschen und Tieren stattgefunden haben könnte (Meyer et al. , 2012; Schmiedel et al. , 2014; Valentin et al. , 2014b). Schmiedel et al. und Valentin et al. waren in der Lage, die gleichen ESBL-Gene in Human- und Tierisolaten zu detektieren.



Schema der Übertragung antibiotikaresistenter Bakterien zwischen Tier und Mensch. Der tatsächliche Anteil der zwischen den einzelnen Habitaten übertragenen Infektionserreger lässt sich mittels NGS-basierter molekularer Surveillance ermitteln.

Abbildung 7 Hypothese zu den Hauptübertragungswegen von Antibiotikaresistenzgenen zwischen Menschen, Tieren, Lebensmitteln und der Umwelt nach dem One Health-Konzept (<http://www.bukopharma-online-lernbox.de/Antibiotika-Resistenzen/a2-one-world-one-health-csc-17.html>)

In **Abbildung 7** ist eine Hypothese zu den Hauptübertragungswegen von Antibiotikaresistenzen basierend auf dem sogenannten *One Health*-Konzept dargestellt. Durch die Verwendung von Antibiotika bei Menschen und Tieren wird ein Selektionsdruck auf die dort existierende Bakterienpopulation ausgeübt. Es kommt zur Vermehrung von resistenten Bakterien und einem Verbleiben der resistenzgen-tragenden Elemente (Plasmide, Transposons). Über Abwasser, Mist und Gülle gelangen diese wiederum in die Umwelt, wo diese Resistenzgen-tragenden Elemente erneut auf andere Bakterienspezies horizontal übertragen werden können. Über Lebensmittel können diese Erreger von den Menschen und Tieren aufgenommen und infolgedessen erneut in den Erregerkreislauf gelangen. Darüber hinaus kann auch eine Verbreitung über den Kontakt zwischen Menschen und Tieren stattfinden. Diese verschiedenen Übertragungswege erschweren eine Aufdeckung, Überwachung und Unterbrechung Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen.

Einen wichtigen Baustein zur Kontrolle der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen stellen sogenannte Surveillance-Systeme von Resistenz- und Verbrauchsdaten in der Human- und Veterinärmedizin dar. Auf der Grundlage dieser erhobenen Daten sollen Antibiotika rationaler verordnet werden. Dieser Aufgabe widmet sich das sogenannte Antibiotic Stewardship. Das One-

Health-Konzept ermöglicht eine interdisziplinäre Analyse des Gebrauchs von Antibiotika und des Auftretens von Antibiotikaresistenzen innerhalb der Human- und Veterinärmedizin.

4. Ziel der Arbeit

In dieser Doktorarbeit wurde der Frage nachgegangen, ob es eine Verwandtschaft zwischen 21 ausgewählten CTX-M-produzierenden Enterobacteriaceae Bakterienisolate aus Menschen und Tieren in Mittelhessen gibt. Zur Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Da ESBL-Gene in der Regel in Plasmiden enthalten sind, wurde ein Plasmidprofil der Bakterienisolate erstellt. Hierzu wurde mittels S1-PFGE ermittelt, ob die verschiedenen Isolate ähnliche Plasmide tragen. Über Ganzgenomsequenzierung wurde das komplette Genom der Bakterien entschlüsselt. Bioinformatische Analysen wurden angewandt, um zu bestimmen, wie verwandt die Isolate von Menschen und Tieren sind. Das bedeutet, dass die Anzahl, Größe und Inkompatibilitäts-Gruppen der Plasmide bestimmt wurden. Darüber hinaus werden die Isolate auf das Vorhandensein von Virulenz- und Resistenzgenen mittels Gendatenbanken überprüft. Mit Hilfe des Tiermodells der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* wurde die phänotypische Virulenz ermittelt. Hierzu wird der larvizide Effekt bestimmt. Über statistische Methoden wurden diejenigen Virulenzgene bestimmt, die eine hohe Larvizidität hervorrufen.

Im Laufe der Arbeit wurde in den oben genannten CTX-M-produzierenden Isolaten das sogenannte *mcr-1*-Gen gefunden. Das *mcr-1*-Gen ist ein Resistenzgen gegen das Polypeptidantibiotikum Colistin, welches über Plasmide übertragen wird. Bisherige Resistenzmechanismen waren bislang nur auf Chromosomen kodiert gewesen. Das *mcr-1*-Resistenzgen wurde erstmals 2015 in China im Rahmen einer Untersuchung von Antibiotikaresistenzen in *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolaten von Zuchttieren, die mit dem Reserveantibiotikum Colistin behandelt wurden, entdeckt. MCR-1 ist ein Protein, welches zur Enzymgruppe der Phosphoethanolamintransferasen gehört. Durch dieses Enzym wird ein Phosphoethanolamin auf das Lipid A der Bakterienzellmembran angelagert. Hierdurch wird die Bindung von Colistin auf die Bakterienzellmembran verhindert. Die Übertragung des *mcr-1*-Gens via Plasmid-vermitteltem Transfer konnte in einem Mausmodell nachgewiesen werden.

Aufgrund des Nachweises des *mcr-1*-Resistenzgens bei Enterobacteriaceae aus dieser Arbeit wurden neun *mcr-1*-kodierende ESBL-produzierende Isolate aus der Datenbank des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, die Ganzgenom-sequenziert wurden, in dieser Dissertation genau charakterisiert. Mittels S1-PFGE wurden diese Isolate auf das Plasmidprofil und mittels Konjugationsversuchen auf die Übertragbarkeit der *mcr-1*-Gene untersucht.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Nährmedien, Puffer und Lösungen

Die jeweiligen Nährmedien, Chemikalien, Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2-5 zusammengefasst.

Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose NEO Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH + Co. KG
Isopropanol	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Sigma Aldrich
Pulsed Field Certified Agarose	Bio-Rad, München, Deutschland
Sodium N-Lauroylsarcosin (Sarcosyl) 10 %	Sigma Aldrich
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Methanol	Sigma Aldrich
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH+ Co. KG
Mangan(II)chlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
100 % Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten VITEK 2[®] Antibiotikakarten und –teststreifen

Antibiotika	Hersteller
Antimicrobial Susceptibility Testing Cards: NST-214	BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Antimicrobial Susceptibility Testing Cards: NST-248	BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
MIC test strip Colistin	Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italien

Tabelle 4 Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Wachstumsmedien	Hersteller
-----------------	------------

Luria-Bertani-(LB)-Medium	NaCl 10,00 g/L(Sigma Aldrich), Trypton 10,00 g/L(Sigma Aldrich) Hefeextrakt 5,00 g/L (Becton Dickinson) Auffüllen auf 1L mit VE Wasser autoklaviert bei 121 °C, 2h
LB-Agar	LB-Medium (1L) Agar 15,00 g/L (Oxoid GmbH) autoklaviert bei 121 °C, 2h
Müller-Hinton-Agar	Oxoid GmbH
Minimalmedium (M9) für <i>E. coli</i>	150 mL Milli Q Wasser + 3 g Agar, autoklavieren dazu 40 mL M9 Salzlösung, 400µl 1M MgSO ₄ x 7H ₂ O, 4 mL 20 %-Glukose (steril filtriert mit 0,22 µm Filter), 20µL 1M Calciumchlorid bei 60 °C hinzugeben

Tabelle 5 Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Hersteller/Zusammensetzung
TBE-Puffer-Stammlösung (10x)	108 g TRIS (Sigma Aldrich), 55 g Borsäure (Sigma Aldrich), 20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) (Sigma Aldrich), ad 1L mit A. dest auffüllen
0,5 M EDTA pH 8.0	18,615 g EDTA (Sigma Aldrich), pH 8.0 mit NaOH (Carl Roth GmbH + Co. KG) eingestellt, ad 1L mit A. dest auffüllen
1 M TRIS-HCl pH 8.0	121,14 g TRIS (Sigma Aldrich), mit HCl auf pH 8.0 einstellen, ad 1L mit A. dest auffüllen
Enzypuffer S1-Nuclease	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Hampshire, U.K.
BSA 10 mg/mL	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aqua dest (10ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PCR-Laufpuffer	2,5 g Ficoll (Typ 400) (Carl Roth GmbH + Co. KG), 0,03 g Bromphenolblau (Sigma Aldrich), ad 10 ml mit A. dest
PCR-Puffer (10 x)	200 µL TRIS-HCl (pH 8,3) 200 mM, 20 µL KCl 250 mM (Carl Roth GmbH + Co. KG), 250 µL MgCl ₂ 20 mM (Carl Roth GmbH + Co. KG), 50 µL Tween 20 0,5 % (Sigma Aldrich), 100 µL Gelatine 1 mg/mL (Carl Roth GmbH + Co. KG)
TE-Puffer (10x)	12,1 g TRIS (Sigma Aldrich), 37,2 g EDTA (Sigma Aldrich) pH 8 mit NaOH (Carl Roth GmbH + Co. KG) eingestellt, ad 1L ml mit A. dest auffüllen
Zellysepuffer für PFGE	25 mL 1 M Tris-HCl, 50 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) (Sigma Aldrich), 50 mL 10 % Sarcosyl (Sigma Aldrich), ad 0,5 L mit A. dest auffüllen
M9-Salzlösung	In 200mL: 8,54 g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, 3,0 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g NaCl, 1,0 g NH ₄ Cl, pH auf 7,2 einstellen und bei 121 °C autoklavieren für 1h
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich

5.2 DNA-Marker

In der Gelelektrophorese wurden die in Tabelle 6 erwähnten DNA-Marker verwendet.

Tabelle 6 Herkunft der verwendeten DNA-Marker

Marker	Hersteller
1 kb plus DNA Ladder	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Lambda Ladder PFGE Marker	New England Biolabs GmbH
Salmonellenmarker	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Rockford, IL 61105 USA

5.3 Enzyme

Tabelle 7 stellt die Übersicht über den Ursprung und den Zweck der verwendeten Enzyme dar.

Tabelle 7 Herkunft und Verwendungszweck der verwendeten Enzyme

Enzyme	Hersteller	Verwendungszweck
Lysozym	Sigma Aldrich	Zelllyse vor der PFGE
Proteinase K	Carl Roth GmbH + Co KG	Proteinverdau vor der PFGE
S ₁ -Nuklease	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH	Restriktionsverdau
Taq-Polymerase	Life Technologies	PCR

5.4 Kits

Die Tabelle 8 fasst alle verwendeten Kits zusammen:

Tabelle 8 Kits

Kits	Hersteller
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Nextera XT Sample prep Kit	Illumina Netherlands, Eindhoven, Niederlande
PureLink® Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen, 92008 Kalifornien, USA

5.5. Geräte

- Brutschrank: Heraeus
- Elektrophoresekammer: eine von der Institutswerkstatt hergestellte Kammer
- Geldokumentationsgerät: Biorad Universal Hood II
- Kameras: Iphone 6S, Samsung Galaxy S5

- Nanodrop: Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific
- Pipetten: Biohit, Eppendorf Research
- Pulsfeld-Gelelektrophorese: CHEF-DR II, Bio-Rad
- Thermo Cycler (PCR-Maschine): Applied Biosystems
- Zentrifugen: Eppendorf, Heraeus
- Schüttelinkubatoren: Infors HT Ecotron, IKA KS 4000i control
- Automatische, gekühlte Zentrifuge: Sorvall Superspeed RC2-B, Du Pont de Nemours
- Tischzentrifuge: Megafuge 1.0 R, Heraeus
- Vortexer: Vortex Genie 2, Scientific Industries
 - VWR Mini Star, Silverline
 - Polylabo (für PCR-Tubes)
- Inkubation von Eppendorfgefäßen: Thermomixer comfort (Eppendorf)

5.6. Software

Lokal ausführbare Software:

- Contig-Assemblierung: Spades Version 3.0 (Bankevich *et al.*, 2012)
- MAUVE (Darling *et al.* 2004)
- MEGA5 (Tamura *et al.* 2011)
- Mendelej Desktop
- Microsoft Office 2013
- CLC Sequence Viewer 7 (CLC bio, Aarhus, Dänemark, 2015)
- Harvest Suite Version 1.1.2
- MEGA5
- Inkscape 0.91 (2015)

Web-basierte Software und Ressourcen:

- Multi Locus Sequence Typing 1.8 (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>)
- NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- EDGAR (Goesmann *et al.*, 2009)
- ResFinder 2.1 (2016) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)
- PlasmidFinder 1.3 (2015) (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)
- VirulenceFinder 1.5 (2015) (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)
- Restriction-Modification-Finder 1.1 (2015) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/Restriction-ModificationFinder/history.php>)
- SerotypeFinder 1.1 (2015) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>)
- CRISPRFinder (2014) (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>)

5.7 Bakterienstämme

Bakterienisolate von Menschen

Die untersuchten Bakterienisolate aus Menschen (n=6) stammen aus Köln. Diese wurden im Rahmen der ANGEL-Studie isoliert. Diese wurden auf das Vorhandensein von ESBL gescreent.

Tabelle 9 Übersicht über die Humanisolate

Bakterienisolat	Ursprung	Bakterienspezies
TO116	Mensch	<i>E. coli</i>
TO119	Mensch	<i>E. coli</i>
TO132	Mensch	<i>E. coli</i>
TO152	Mensch	<i>E. coli</i>
TO180	Mensch	<i>E. coli</i>
TO184	Mensch	<i>E. coli</i>

Tierische Bakterienisolate

Die Isolate aus Tierproben (n=21) wurden aus der Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen entnommen. Zwischen 2009 bis 2011 waren alle Gram-negativen Bakterienisolate gesammelt worden, die sich auf MacConkey-Agar mit Cefotaxim als Antibiotikum (1 µg/mL) anzüchten ließen. Alle Isolate wurden aus klinisch kranken Tieren in den Tierkliniken der JLU gewonnen und wurden als ESBL-Isolate klassifiziert. Die Isolate wurden im Kontext der Dissertation von Dr. Judith Schmiedel vorcharakterisiert (siehe Schmiedel et al., 2015, Überprüfen auf ESBL-Status und ESBL-Gen).

Tabelle 10 Übersicht über die Tierisolate

Bakterienisolat	Ursprung	Bakterienspezies
V40	Kalb	<i>E. coli</i>
V111	Pferd	<i>E. coli</i>
V130	Hund	<i>E. coli</i>
V131	Huhn	<i>E. coli</i>
V134	Hund	<i>E. coli</i>
V163	Ferkel	<i>E. coli</i>
V168	Kalb	<i>E. coli</i>
V228	Pferd	<i>E. coli</i>
V229	Pferd	<i>E. coli</i>
V238	Pferd	<i>E. coli</i>

V268	Pferd	<i>E. coli</i>
V271	Pferd	<i>E. coli</i>
V273	Pferd	<i>E. coli</i>
V283	Hund	<i>E. coli</i>

5.7.1. *mcr-1*-kodierende Enterobacteriaceae

Eine Datenbank von 577 Ganzgenom-sequenzierten Gram-negativen Bakterienisolaten des Institutes für Mikrobiologie der JLU Gießen aus verschiedenen Quellen (Mensch, Tier, Lebensmittel) wurde auf die Präsenz des *mcr-1*-Gens untersucht. Es konnten 9 Bakterienisolate mit dem *mcr-1*-Gen detektiert werden. Die Isolate sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 11 Übersicht über *mcr-1*-positive Bakterienisolate

Isolat	Quelle	Bakterienspezies
RL145	Rindfleisch	<i>E. coli</i>
RL158	Hähnchenfleisch	<i>E. coli</i>
RL465	Hähnchenfleisch	<i>E. coli</i>
RL138	Hähnchenfleisch	<i>E. coli</i>
142669	Kalbfleisch	<i>E. coli</i>
NRZ14408	Mensch	<i>E. coli</i>
V163	Schwein	<i>E. coli</i>
R253	Schwein	<i>E. coli</i>
112065	Schwein	<i>E. coli</i>

Die *mcr-1*-kodierenden Enterobacteriaceae wurden im Rahmen dieser Dissertation eingehender hinsichtlich ihrer Konjugationseffizienz und ihrer Plasmide analysiert

5.7.2. Bakterienanzucht

Die Bakterienstämme wurden unter einer Sterilwerkbank (Mikrobiologische Sicherheitskabine, Karl Bleyemehl Reinraumtechnik GmbH, Deutschland) mit einer sterilen Impföse von der Glycerinkultur auf LB-Platten mit 2 µg/ml Cefotaxim bzw. 2 µg/ml Colistin als Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank (B6060 Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) inkubiert.

5.7.3. Herstellung von Glycerinkulturen

Von jeder Reinkultur des jeweiligen Bakterienstammes wurde eine Glycerinkultur erstellt. Hierzu wird in einem sterilen 100 mL-Erlenmeyerkolben 10 mL LB-Medium mit Zusatz von 2 µg/mL Cefotaxim oder Colistin mit 2-3 Kolonien des Bakterienstammes angeimpft. Die Kultur wird über Nacht in einem Schüttler (BBI – 8865027, Sartorius, Göttingen, Deutschland) bei 37°C bebrütet.

Nach der Inkubation wird 700 µl Übernachtskultur mit 700 µl BHI mit 60 % Glycerin in einer 2ml Micro-Schraubröhre (Sarstedt Ag & Co., Deutschland) vermischt. Die Glycerinkultur wird bei -80 °C eingefroren.

5.8. Resistenztestung

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Bakterien mit Verdacht auf Colistinresistenz wurde mittels dreier unterschiedlicher Methoden bestimmt. Hierbei wurden Kolonien der von den zu untersuchenden Bakterienisolaten in 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und auf eine Dichte von McFarland 0,5 eingestellt. Danach wurde das VITEK2-System von Biomerieux und der E-Test angewandt, um die MHK zu ermitteln. Mit den festgelegten Grenzwerten der European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) wurden die Bakterienstämme in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) eingeteilt (EUCAST, 2012). Darüber hinaus wurde die MHK mittels eines Makrodilutionsverfahrens bestimmt.

5.8.1. VITEK2-System

Das VITEK ® 2 XL (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) ist ein automatisiertes System, das auf die Bestimmung der MHK von Bakterienisolaten gegenüber Antibiotika ausgerichtet ist. Hierbei werden sogenannte AST-Karten eingesetzt, die eine verkleinerte Version der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der MHK nach der Mikrodilutionsmethode darstellen. Jede AST-Karte besitzt 64 Felder, in denen bestimmte Mengen ausgewählter Antibiotika und Kulturmedien enthalten sind. Von einem fraglichen Bakterienisolat wird eine Testsuspension in Natriumchloridlösung hergestellt. Hierzu wird von einer über Nacht inkubierten Platte so viel Zellmaterial in 0,9%iger Natriumchloridlösung resuspendiert, bis man 0,5 McFarland erhielt. Diese Suspension wird im VITEK2-System automatisch in die Karten eingesogen und anschließend inkubiert. Das Gerät misst über 24h das Wachstum in den einzelnen Feldern. Wenn die Inkubationszeit zu Ende ist, werden aus den Wachstumsraten die MHK-Werte der Antibiotika von einem EDV-Expertensystem (Advanced Expert System) bestimmt. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das VITEK2-System hauptsächlich zur MHK-Bestimmung von Colistin bei bestimmten Bakterienisolaten verwendet. Eine Limitation dieses Verfahrens ist, dass die Ergebnisse bei Colistin nicht zuverlässig genug sind. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass das Colistin an den sich an den Plastikbereich der VITEK2-Karten bindet und somit die MHK-Werte falsch ausgegeben werden.

5.8.2. E-Teststreifen

Der E-Test kam bei der MHK-Bestimmung des Antibiotikums Colistin zum Einsatz (MIC Test Strip,

Liofilchem). Hierbei wurde eine Verdünnung von dem zu untersuchenden Bakterienisolat mit einem sterilen Wattetupfer auf einer Müller-Hinton-(MH)-Platte ausgestrichen. Dabei wurde die Platte dreimal im 90 °-Winkel gedreht, um eine gleichmäßige Verteilung des Bakterienisolates zu erreichen. Mit Hilfe einer Pinzette wurde der E-Teststreifen mittig auf die beimpfte MH-Platte gelegt. Die Platte wird für 16 h bei 37°C inkubiert. Die MHK wird eine Position höher gemessen, als der untere Rand des elliptischen Hemmhofs den Teststreifen schneidet.

5.8.3. Makrodilution

Die Makrodilution ist ein Verdünnungsverfahren, bei der eine definierte Konzentration eines Bakteriums mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Colistin in einer Kultur (10 ml LB-Medium + Bakteriensuspension) über Nacht bei 37°C bebrütet wird. Am nächsten Tag wird kontrolliert, bis zu welcher Antibiotikakonzentration noch ein Bakterienwachstum stattgefunden hat. Diese Konzentration stellt die MHK dar. In dieser Verdünnungsreihe betragen die Konzentrationen von Colistin jeweils 2, 4, 8, und 16 µg/mL.

5.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren, die einen festgelegten Abschnitt (Template) einer DNA vervielfältigt. Hierzu werden zum Start der PCR-Reaktion zwei Primer benötigt, die an den Einzelsträngen der DNA komplementär binden. Zur Synthese der komplementären Stränge ist eine DNA-Polymerase erforderlich, die bei hohen Temperaturen nicht denaturiert. Diese Bedingung erfüllt die sogenannte Taq-Polymerase. Als Bausteine für die synthetisierten Stränge werden Desoxyribonukleosidtriphosphate verwendet. Um für die DNA-Polymerase ein geeignetes Medium zu gewährleisten, wird eine Pufferlösung hinzugegeben.

Eine PCR besteht aus 20-50 Zyklen. Pro Zyklus werden drei Reaktionsschritte durchlaufen. Zu Beginn findet eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C statt. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgelöst. Anschließend erfolgt ein Annealing, bei dem die Primer sich an spezifische Sequenzen der Einzelstränge binden. Die Annealingtemperatur ist von der Länge und der Sequenz der Primer abhängig. Die Annealingtemperatur wird zwischen 30 - 60 s konstant gehalten, damit sich die Primer anlagern können. Während der Elongation knüpft die DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72 °C zunächst an die Primer am 3'-Ende ein freies Nukleotid und folgt dann dem DNA-Strang.

Für die PCR wurden die Ansätze nach dem in Tabelle 12 aufgeführten Rezept pipettiert und auf Eis inkubiert. Als Template wurde entweder mit einem sterilen Zahnstocher ein wenig aus einer Bakterienkolonie (Kolonie-PCR) entnommen oder 1-2 Kolonien mit einer sterilen Impfföse in 150µl

destilliertem Wasser resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend für 5 min bei 95°C inkubiert, und dann anschließend bei 11.000 g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand enthält freie genomische DNA.

Ein Reaktionsansatz setzt sich aus den folgenden Reagenzien zusammen:

Tabelle 12 Reaktionsansatz für die PCR

Volumen	Reagenz
5µL	DNA-Lösung
5µL	PCR-Puffer (10x)
2µL	dNTP Mix (0,2 mM)
1µL	Forward Primer (10 µmol/µL)
1µL	Reverse Primer (10 µmol/µL)
0,2µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)
35,8µL	ddH ₂ O
Gesamtvolumen= 50µl	

Falls in einen Reaktionsansatz statt 5µL DNA-Lösung eine Kolonie hinzugefügt wird, wird mit 40,8µL ddH₂O auf ein Volumen von 50µL aufgefüllt.

Für alle PCRs wird das folgende Programm durchlaufen:

Tabelle 13 Ablauf der PCR

Schritt Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	Initialisierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	95 °C	1 min
3	Annealing	variabel	0:30-1:00 min
4	Elongation	72 °C	1 min
5	Finale Elongation	72 °C	7 min
6	Ende	4 °C	∞

Die Schritte 2-5 werden jeweils 30x wiederholt.

5.10 DNA-Aufreinigung

Um nach einer PCR die amplifizierte DNA aufzureinigen, macht man sich das MSB® Spin PCRapace (500) von „strateg molecular“ zunutze. Je nach Volumen des PCR-Ansatzes wird ein bestimmtes

Volumen an Bindepuffer zugesetzt und über Vortexen gemischt. Bei Volumina bis zu 50 µl, fügt man 250 µl Bindepuffer hinzu. Bei Volumina zwischen 50 bis 100 µL gibt man 500 µL Bindepuffer hinzu. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf eine Spin Filter Column übertragen, und für 3 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Erneut wird bei 11.000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Danach wird der Spin Filter in ein neues 1,5-mL-Sammelgefäß überführt und 20 µL ddH₂O zum Eluieren in die Mitte des Spin Filters aufgetragen. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute. Danach wird bei 11.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Im Eluat liegt nun die aufbereitete DNA.

5.11 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient dazu, DNA-Fragmente zwischen 100 – 10.000 bp Länge darzustellen, insbesondere zum Nachweis von PCR-Produkten. Die Gelelektrophorese sorgt für eine Trennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund der Phosphatgruppen, die negativ geladen sind, in Richtung Anode. Das Gel fungiert als ein Filter, welcher kleinere Moleküle schneller wandern lässt. Dadurch wird die Darstellung unterschiedlich großer DNA-Moleküle möglich. Für das Auftrennen von PCR-Fragmenten wird ein 1%iges Agarosegel verwendet. Hierzu werden 4 g Agarose in 400 ml 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Aufkochen und Abkühlen auf ca. 50 °C wird 25 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) hinzugegeben und die Lösung vermischt. Das noch flüssige Gel wird in einen Gelschlitten gegossen. Nachdem das Gel fest geworden ist, wird es in eine Elektrophoresekammer, die mit 1 x TBE-Puffer befüllt ist, gelegt. Von den PCR-Produkten werden jeweils 10 µl mit 6 µl Laufpuffer in eine Geltasche pipettiert. Als Marker wird eine 1 kb plus DNA Ladder verwendet. Das Gel läuft für 1 Stunde bei 150 V. Anschließend wird das Gel mittels eines Transilluminators (Bio-Rad Universal Hood II Gel Imager, Bio-Rad, Hercules, USA) abfotografiert und das Bild gespeichert.

5.12 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese dient zur Bestimmung der Anzahl und Größe der Plasmide in einem Isolat. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wird zunächst ein Restriktionsverdau mit dem Enzym S1-Nuklease vorgenommen und anschließend eine PFGE durchgeführt.

5.12.1 Herstellung von Agaroseblöckchen

Von einer LB-Platte werden 2-3 Bakterienkolonien mit einer sterilen Impföse abgenommen und in 10mL LB-Flüssigmedium in einem 100mL-Erlenmeyerkolben angeimpft. Diese Flüssigkultur wird über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wird die optische Dichte photometrisch bei 600nm bestimmt. Die

Bakteriensuspension wird an eine optische Dichte von 1 (ca. 1×10^9 cfu/mL) angepasst. Das errechnete Volumen wird in einem 1,5mL-Eppendorfgefäß bei Raumtemperatur für 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge 5418, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wird abpipettiert und anschließend wird das Bakterienpellet 3x mit 400µL 1xPBS-Puffer gewaschen. Dabei wird für jeweils 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet in 384µL 1x TE-Puffer resuspendiert und dann mit 16µL frisch angesetzter Lysozymlösung (50mg/mL) versetzt. Die Lösung wird nun für 30 min bei 37°C auf dem Thermoblock (Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland) inkubiert. Nach diesem Schritt wird mit dem Reaktionsgemisch 20µL Proteinase K (20mg/mL) und 400µL 50°C warme 5 % ige Agarose (16mg/mL) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Nun wird dieses Gemisch in vorgefertigte Gelblöckchenformen (Disposable Plug Mold, Bio-Rad, Hercules, USA) pipettiert. Die Blöckchen werden für 5-10min im Kühlschrank gelagert. Nach Erstarren der Agarose werden die Blöckchen mittels eines kleinen Spatels herausgelöst und in 15mL Polypropylen-Röhrchen (Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich), die 5 mL Zelllysepuffer und 25µL Proteinase K (20mg/mL) enthalten, gegeben. Die Blöckchen werden über Nacht bei 54°C in einem Wärmebad über Nacht inkubiert. Zusätzlich werden Flaschen mit Milli Q Wasser und 1x TE-Puffer auf 54°C vorgewärmt. Nach der Inkubation werden die Blöckchen 4 x mit 5mL Milli Q Wasser gewaschen, anschließend 3 Mal mit 5mL 1x TE-Puffer. Nach den Waschschriften werden die Blöckchen in 5mL 1x TE-Puffer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

5.12.2 Restriktionsverdau mit S1-Nuklease

Die S1-Nuklease ist ein Enzym, welches Einzelstrangregionen in doppelsträngiger DNA hydrolysiert. Es werden nur Plasmide linearisiert. Zwar können auch chromosomale Regionen geschnitten werden, allerdings wandern Plasmide aufgrund ihrer geringeren Größe weiter unten im Gel. Durch diese Methode und die anschließende PFGE kann die Anzahl und Größe der vorhandenen Plasmide bestimmt werden.

Jeweils ein Blöckchen wird in einem 1,5 mL-Eppendorfgefäß für 20 min bei Raumtemperatur mit 300µL 1x S1-Nuklease-Puffer versetzt. Anschließend wird der Puffer abgenommen und durch 300µL 1x S1-Nuklease-Puffer mit 20 Units S1-Nuklease ersetzt. Dieser Reaktionsansatz wird auf dem Thermoblock für 2h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktion mit 50µL 0,5 M EDTA-Lösung für 30min bei Raumtemperatur beendet. Anschließend werden die Proben 3-mal mit 300µL 0,5x TBE-Puffer gewaschen und in die Probenvertiefungen eines 1%igen Agarosegels in einem speziellen PFGE-Schlitten gegeben. Die Blöckchen werden mit flüssiger 1%iger Agarose fixiert. Als Laufpuffer wird 3 L 0,5x TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese findet bei 6V, mit einem Switch von 1 bis 25 s über 18 h statt.

Nach dem Lauf wird das Gel für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (1 Tropfen Ethidiumbromid

auf 400ml 0,5 x TBE-Puffer) gefärbt und anschließend für 20min in 0,5x TBE-Puffer entfärbt.

5.13 DNA-Sequenzierung

Das Genom der Bakterienstämme, sprich das Chromosom und die vorliegenden Plasmide, wurde mithilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) sequenziert. Als Sequenziergerät kam der MiSeq (Illumina, San Diego, USA) zum Einsatz.

Für die Sequenzierung muss zunächst die DNA isoliert werden. Dazu wurden die Isolate in flüssigem LB-Medium über 5 h bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der DNA wurde mit dem PureLink® Genomic DNA-Kit durchgeführt.

Es wurden 1 mL der Übernachtskultur in einem Eppendorfgefäß für 30 Minuten abzentrifugiert. Das dabei entstehende Zellpellet wird anschließend in 180 µL Verdauungspuffer resuspendiert. Zusätzlich wird 20 µl Proteinase K hinzugefügt, um die Zellen zu lysieren. Das Reaktionsgemisch wird durch einen Vortexer gemischt. Um die Lyse zu vervollständigen, wird das Reaktionsgemisch für 30 Minuten bei 55 °C in einem Wärmeblock erwärmt. Nach diesem Schritt werden 20 µL RNase A zum Lysat gegeben, kurz gemischt und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Nun fügt man 200 µL Lysepuffer hinzu und mischt sorgfältig. Zum Schluss gibt man noch 200 µL 96-100 % Ethanol hinzu. Damit ist die Lyse abgeschlossen.

Das Lysat wird in ein spezielles Gefäß, der sogenannten Spin Column, übertragen. Die Spin Column befindet sich zusätzlich einem Sammelgefäß. Die Spin Column wird für eine 1 Minute bei 10.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sammelgefäß wird entfernt und durch eine neues ersetzt. In die Spin Column werden nun 500 µL Waschpuffer 1 pipettiert. Die Spin Column wird für eine 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Man ersetzt das Sammelgefäß durch ein neues. Nun gibt man 500 µL Waschpuffer 2 hinzu. Die Spin Column wird für drei Minuten in Maximalgeschwindigkeit bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Spin Column wird in ein steriles 1.5-mL Microcentrifugegefäß platziert. Man gibt man nun 100 µL Elutionspuffer. Es folgt eine anschließende Inkubation für eine Minute bei Raumtemperatur. Die Spin Column wird danach für eine Minute bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Das Sammelgefäß enthält nun aufgereinigte DNA.

Als nächster Schritt folgte die Erstellung einer sogenannten Library. Eine Library ist ein Pool von DNA-Bruchstücken, die nach einem bestimmten Protokoll hergestellt werden. In diesem Fall wurde der Nextera XT Sample prep Kit benutzt. Die DNA-Probe (Template-DNA) wurde in kleine Bruchstücke zerlegt und an den Enden mit unspezifischen Adapter-Oligonukleotiden verbunden. Nach einer Validierung wurde die Library auf eine Flowcell (Flusszelle) übertragen. Über spezifische Adaptermoleküle wird die Template-DNA an die Flowcell gebunden. An der Flowcell erfolgt die Sequenzierreaktion. Durch eine sogenannte Bridge-Amplifikation, die in ihrem Ablauf einer PCR

ähnelt, werden Anhäufungen aus identischen Molekülen produziert.

Anschließend findet die Sequenzierung in gleichen Zyklen statt. Es wird pro Zyklus ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid komplementär zur Template-DNA eingebaut.

Die Fluoreszenzgruppen der Nukleotide geben durch zwei Laser, die auf sie gerichtet sind, ein basenspezifisches Fluoreszenzsignal ab. Dieses wird von der Maschine erfasst. Danach werden die Fluoreszenzgruppe und der mit ihr verknüpfte reversible Terminator, der eine Bindung weiterer Nukleotide verhindert, entfernt. Im nächsten Zyklus wird dann das nächste Nukleotid angelagert. Aus der Abfolge von Farbsignalen wird letztlich die DNA-Sequenz rekonstruiert.

5.14 Infektionsversuch mit *Galleria mellonella*

5.14.1 Anzucht der Larven

Die Larven wurden von der Firma Fauna Topics (Marbach, Deutschland) bestellt und in großen Petrischalen (145/20 mm, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) mit Futter, (= zusammengesetzt aus Maismehl (22 %), Weizenkeimen (22 %), Trockenhefe (11 %), Bienenwachs (17,5 %), Honig (11 %) und Glycerin (11 %)) bei 30°C lichtgeschützt gelagert.

5.14.2 Inkubation der Bakterienisolate

Die jeweiligen Bakterienisolate wurden über Nacht in 10 mL LB-Medium mit 2µg/mL Cefotaxim bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Von diesen Übernachtskulturen wurde am nächsten Tag eine 1:200 Verdünnung in neuem LB-Medium ohne Antibiotikazusatz gemacht. Man ließ die Kultur bei 37°C solange inkubieren, bis eine $OD_{600} = 1$ ($\cong 10^9$ cfu/mL) erreicht wurde. Anschließend wurden von der 1000µL Bakteriensuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 6.000 rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit 1000µL 1x PBS-Puffer gewaschen und erneut bei 6.000 rpm für 5min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Nach dem Waschen wurde das Bakterienpellet in 1000µL LB-Medium resuspendiert. Durch eine \log_{10} -Verdünnungsreihe in PBS-Puffer wurde die CFU der verwendeten Bakteriensuspension ermittelt. Die Verdünnungsreihen wurden auf LB-Platten ohne Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Für die Injektion der Gallerienlarven wurde die Bakteriensuspension mit der Konzentration von 10^8 cfu/mL verwendet.

5.14.3 Infektion der Larven

Aus dem Eppendorfgefäß mit der Bakteriensuspension der Konzentration 10^8 cfu/mL wurden 10µL ventral in die Leibeshöhle gespritzt. Die Injektion erfolgte mit einer Feindosierungsspritze (Omnican®F, B. Braun Melsungen AG, Kronberg im Taunus, Deutschland). Die Spritze wurde an

einer Manual Microsyringe Pump (World Precision Instruments, Sarasota, USA) befestigt, um eine präzise Injektion zu ermöglichen. Die Larve wurde mit einer Pinzette festgehalten und zwischen dem letzten und vorletzten Ring mit 10µL der Bakteriensuspension infiziert. Anschließend wurden die Larven in kleinen Petrischalen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für jedes Bakterienisolat wurde der Infektionsversuch dreimal mit jeweils 10 mittelgroßen Larven durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Larven, die mit 1x PBS-Puffer injiziert wurden, und der avirulente *E. coli*-Stamm K12 MG1655. Die Larven wurden im Zeitraum von 6 Tagen täglich gezählt. Das bedeutet, es wurden tote und lebende Larven ausgezählt. Als tot gilt eine Larve, die bei Berührung mit der Pinzette keine Reaktion zeigt. Darüber hinaus macht sich eine Schwarzfärbung der Cuticula bemerkbar.

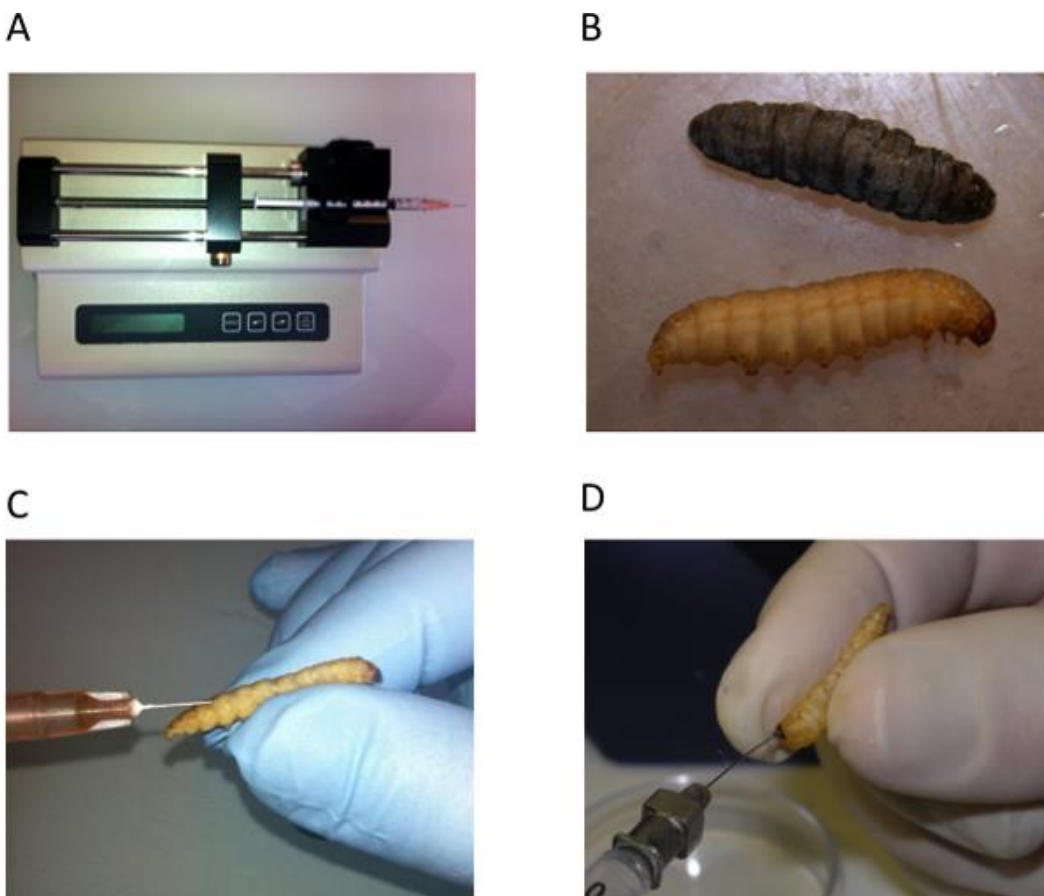


Abbildung 8 Infektionsversuch mit *Galleria mellonella*. A) Injektionsapparat, B) Vergleich zwischen toter (schwarz) und lebender Larve (hell), C) und D) Injektion am letzten bzw. vorletzten Ring (Ramarao et al., 2012).

5.15 Konjugation

Um die Übertragbarkeit von den Plasmiden zu überprüfen, wurde eine Konjugation unter Laborbedingungen durchgeführt. Die jeweiligen Bakterienstämme wurden als Donorstämme behandelt, die mit dem Laborstamm *E. coli* J53 als Rezipient zusammengebracht wurden. *E. coli* J53 eignet sich für diesen Versuch, weil er selbst kein Plasmid besitzt und eine Natriumazid-Resistenz

aufweist. Das heißt, wenn *E. coli* J53 ein Plasmid aufnimmt, welches ein Resistenzgen gegen Cefotaxim besitzt, dann wächst er in LB-Medium mit Cefotaximzusatz und Natriumazidzusatz. Man kann durch diesen Versuch zeigen, welche Bakterienstämme über Konjugation die Cefotaximresistenz weitergeben können.

In 10mL flüssigem LB-Medium mit 2µg/mL Cefotaxim wurden eine Übernachtskultur der jeweiligen Bakterienstämme angesetzt. Diese Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Von dieser Übernachtskultur wird 1 mL entnommen und in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt. Diese Bakteriensuspension wird bei 6000 rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, ohne dabei das Pellet zu beschädigen. Das Pellet wird 3x mit LB gewaschen (6000rpm, 5min) und anschließend in 1 mL LB-Medium resuspendiert. Um die CFU der jeweiligen Bakterien zu bestimmen, mit denen die Konjugation durchgeführt wird, wird eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu werden von jedem Stamm 100µL aus der Bakteriensuspension entnommen und in 900µL PBS-Puffer pipettiert. Um die Bakterien in der Lösung gleichmäßig zu verteilen, wird kurz gevortext. Aus dieser Lösung werden im nächsten Schritt wieder 100µL in ein neues Eppendorfgefäß mit 900µL PBS-Puffer gegeben. So hat man letztlich eine 1:100-Verdünnung. Dieser Vorgang wird so lange durchgeführt, bis man acht Verdünnungsstufen erhält. Von der siebten und achten Verdünnungsstufe werden jeweils zweimal 100µL auf zwei LB-Platten (1,5% Agar) ausplattiert und bei 37°C mit dem Deckel nach unten im Brutschrank inkubiert.

Für die Konjugation werden 100µL vom jeweiligen Donorstamm mit 200µL von *E. coli* J53 als Rezipienten in einem Eppendorfgefäß gemischt. Von dieser Mischung werden 150µL mittig auf eine LB-Platte (1,5% Agar) getropft und mit dem Deckel nach oben bei 37°C oder bei Raumtemperatur über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wird der Bakterientropfen, in dem Donor und Rezipient gemischt waren, mit einer sterilen Impföse komplett abgenommen und in ein Eppendorfgefäß mit 1000 µL PBS-Puffer überführt. Es wird für 1 Minute gevortext, um den Bakterientropfen vollständig im Puffer zu lösen. Danach wird von dieser Lösung eine Verdünnungsreihe erstellt. Von den beiden höchsten Verdünnungsstufen werden jeweils zweimal 100 µL auf LB-Platten (1,5% Agar) mit den jeweiligen Antibiotika ausplattiert. Als Antibiotika in dieser Arbeit werden jeweils Cefotaxim (Endkonzentration: 2 µg/mL) und Colistin (Endkonzentration: 2 µg/mL) verwendet. Natriumazid (Endkonzentration: 200 µg/mL) wird zusätzlich dazugegeben, weil der Rezipient *E. coli* J53 gegen diese Substanz resistent ist. Das heißt, mit Natriumazid und dem jeweiligen Antibiotikum, wovon die Übertragbarkeit nachgewiesen werden soll, werden auf den LB-Platten nur diejenigen *E. coli* J53-Bakterien wachsen, die die jeweilige Antibiotikaresistenz vom Donor aufgenommen haben.

Die LB-Platten werden nach dem Ausplattieren der Bakterienstämme für 2 Tage bei 37°C inkubiert

und nach dieser Inkubation die Kolonien gezählt.

5.16 Bioinformatische Analysen

5.16.1. Internetdatenbanken zur Analyse von Virulenz- und Plasmid-kodierten Resistenzgenen

Mit dem Programm Spades 3.0 (Bankevich et al. , 2012) wurden die Rohdaten aus der Sequenzierung assembliert. Assemblierung beschreibt die Zusammenfügung einzelner sich überlappender Basenabfolgen, den sogenannten Reads, zu größeren Genombruchstücken. Diese Bruchstücke bezeichnet man als Contigs. Da die hierbei erzeugten Datenmengen sehr groß sind, werden dafür spezielle Computerprogramme, die Assembler, herangezogen. Meistens liegt das Problem vor, dass die erhaltenen Contigs nicht zu einer zusammenhängenden Basensequenz zusammengefügt werden können. Es entstehen sogenannte Gaps. Trotzdem kann man mit den Contigs die auf ihnen existierenden Gene lokalisieren.

Die durch NGS erzeugten Contigs wurden im Hinblick auf Virulenz- und Plasmid-kodierten Resistenzgenen untersucht. Hierzu wurden verschiedene Internetdatenbanken benutzt. Mittels des Suchprogramms ResFinder wurden in allen Bakterienstämmen nach Plasmid-kodierten Resistenzgenen gesucht. Zur Detektion von Virulenzgenen wurden die Contigs der Bakterienstämme in der Datenbank VirulenceFinder hochgeladen und dort kontrolliert.

5.16.2. Mapping der Contigs mit dem Programm MAUVE

Durch das NGS werden sich Bruchstücke des Genoms, sogenannte Contigs, erzeugt. Diese müssen nun geordnet werden, um nähere Informationen über das Genom der zu analysierenden Bakterienstämme zu erhalten. Hierzu werden die Contigs mit dem bereits bekannten Genom eines Referenzstamms mittels des Programms Mauve an eine Referenz geordnet. In dieser Arbeit wurde als Referenzstamm *E. coli* K12 MG1655 verwendet. Nicht zu dem Referenzgenom passende contigs (d.h. mögliche Plasmid-Contigs) werden mittels CLC Sequence Viewer in eine neue Datei überführt.

5.16.3. EDGAR

EDGAR („Efficient Database framework for comparative Genome Analyses using BLAST score Ratios“) ist ein Programm zum schnellen Vergleich der Pangenome mehrerer Bakterien-Isolate. Das Pangenom beinhaltet alle Gene der untersuchten Isolate. Das Core-Genom bezeichnet alle Gene, die in einem bestimmten Bereich (Cut-Off) identisch sind. Um eine komparative Analyse des Bakterienisolates durchführen zu können, muss vorher das Genom annotiert werden. Das heißt, man leitet aus den Contigs die zugehörigen Gene ab. Diese Aufgabe wird mit dem Programm GenDB bewerkstelligt (Goesmann et al. , 2003).

Das Core-Genom wird durch den Vergleich des Bakterienisolates mit einem Referenzisolat kalkuliert.

Um eine Schwelle für zueinander homologe Gene zweier Bakterienspezies festzulegen, werden bei EDGAR sogenannte BLAST Score Ratio Values (SRVs) ermittelt. Hierbei werden die Bitscores aus dem BLAST mit dem Maximalscore ins Verhältnis gesetzt. Der Maximalscore ist als ein Wert definiert, der durch den Vergleich eines Gens mit sich selbst resultiert. Beim BLAST erhält man 100% Identität bei 100% Sequenzlänge. Dieser Wert gilt für den Referenzstamm. Beim Vergleich der jeweiligen Bakterienstämme mit dem Referenzstamm, werden bei unterschiedlichen Scores demzufolge verschiedene SRVs angezeigt. Diese SRVs werden in einem Histogramm abgebildet. Dieses weist meist eine bimodale Verteilung auf. Aus den Peaks der einzelnen Genkombination wird anschließend die Schwelle für homologe Gene festgelegt. Alle SRVs, die unterhalb dieser Schwelle sind, werden herausgefiltert.

5.16.4. Erstellen von Stammbäumen

Die Stammbäume von den Bakterienisolaten wurden mittels des Programms „Harvest Suite“ angefertigt. Dieses Programm vergleicht Bakterien auf der Grundlage ihrer Core-Genome, die über einen Vergleich mit der Referenz bestimmt werden. Hierbei wird gezielt nach SNPs gesucht. Als Input benötigt das Programm die Pseudogenome der Bakterienisolate. Das Programm basiert auf der Bestimmung der sogenannten „maximal unique matches“ (MUMs). MUMs sind Sequenzen, die in verwandten Bakterienspezies genau einmal vorkommen. Wenn Genome eine Grenze an erwünschten MUMs überschritten haben, werden sie beim Genomvergleich berücksichtigt. Sobald das Programm den Vergleich der Genome abgeschlossen hat, werden die Bakterienisolate basierend der Anzahl der Core-SNPs sortiert und Stammbäume erstellt. Zur Visualisierung dieser Stammbäume wird das Programm „MEGA5“ benutzt. Die Bakterienstämme sind nach ihren Sequenztypen sortiert. Mit dem Programm „Inkscape 0.91“ werden die Bakterienstämme mit ihrem Ursprung und ihren Cefotaximresistenzgenen beschriftet, sodass man einen besseren Überblick über ihre Verteilung hat.

6. Ergebnisse

6.1 Multilocus-Sequenztypen

Die *E. coli*-Isolate wurden mittels Multi-Locus Sequence Typing (MLST) einzelnen Sequenztypen (ST) zugeordnet. Die Isolate sind umso näher miteinander verwandt, je mehr der 7 untersuchten Housekeeping-Gene dasselbe Allel besitzen. Wenn jeweils alle Gene dasselbe Allel trugen, dann gehörten sie zu dem gleichen Sequenztyp.

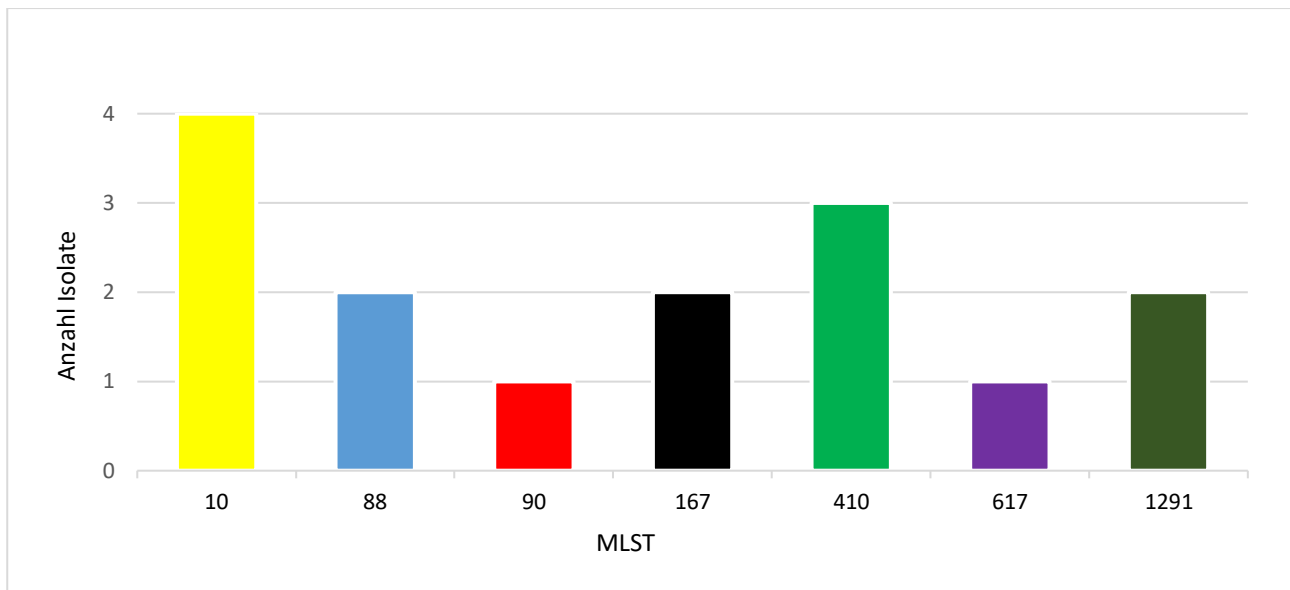


Abbildung 9 Absolute Häufigkeit der STs von Bakterienisolaten von Tieren

6.1.1. *E. coli*-Isolate von Tieren

Die Tierisolate lassen sich in Abbildung 9 7 verschiedenen Sequenztypen zuordnen: ST10, ST88, ST90, ST167, ST410, ST617 und ST1291. Den höchsten Anteil machen die Sequenztypen ST10 und ST410 (47%) aus. Die Isolate mit dem ST88, 167 und 1291 machen jeweils 13 % der Isolate aus. Anschließend kommen die Isolate mit dem ST90 und 671 mit jeweils 7 %.

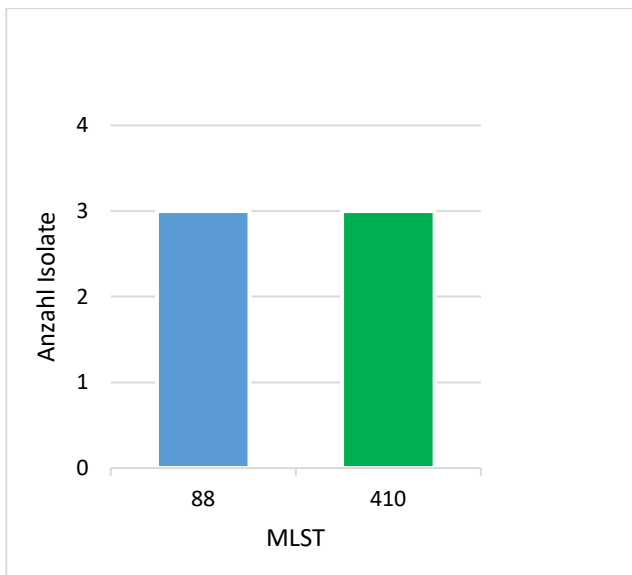


Abbildung 10 Absolute Häufigkeit der STs von Bakterienisolate von Menschen

6.1.2. *E. coli*-Isolate von Menschen

Unter den 6 humanen Isolaten wurden 2 verschiedenen STs gefunden, nämlich ST410 und ST88. Die Isolate TO116, TO119 und TO132 gehören dem ST88 an. Zum ST410 wurden die Isolate TO152, TO180 und TO184 zugeordnet (siehe Abbildung 10).

6.1.3. Vergleich von Human- und Tierisolaten

Beim Vergleich von Isolaten aus Menschen und Tieren fällt auf, dass bei den Tierisolaten mehr Sequenztypen ($n=7$) als bei den Humanisolaten ($n=2$) vorkommen. Eine Gemeinsamkeit für beide Gruppen ist die Tatsache, dass die Sequenztypen ST88 und ST410 häufig vorkommen. Bei den Tierisolaten machen die Sequenztypen zusammen einen Anteil von 33% an der Gesamtpopulation aus. Bei den Humanisolaten sind es 100%.

6.2 Analyse der Antibiotika-Resistenzgene der Isolate

Die Analyse der Antibiotika-Resistenzgene ist in Abbildung 11 dargestellt. Es wurden Antibiotika-Resistenzgene gegen acht unterschiedliche Antibiotika-Klassen (Aminoglykoside, Beta-Laktame, Phenicol, Trimethoprim, Sulfonamide, Tetrazykline, Lincosamide, Makrolide) detektiert.

6.2.1. *E. coli*-Isolate von Menschen

Bei den Isolaten von Menschen wurden Resistenzgene gegen 7 verschiedene Antibiotikaklassen entdeckt. Die höchste Anzahl an Resistenzgenen wurde bei dem Isolat TO180 (15) und die geringste Anzahl beim Isolat TO119 (7) nachgewiesen. Die durchschnittliche Anzahl an Resistenzgenen betrug 11. Alle Isolate trugen mindestens 2 Gene für β -Laktamasen wiederfinden. Von 6 Humanisolaten kodierten 5 Isolate auch für TEM-1. Zudem wiesen fast alle Isolate bis auf TO119 und TO152 die Resistenzgene *strA*, *strB*, *sul1* und *sul2* auf. Jedoch besitzen alle Isolate insgesamt verschiedene

Resistenzgenmuster.

6.2.2. *E. coli*-Isolate von Tieren

In dieser Gruppe wurde wie bei den Humanisolaten 7 verschiedene Klassen von Antibiotika identifiziert. Bei dem Isolat V168 wurden die meisten Resistenzgene (17) und bei Isolat V111 (1) die geringste Anzahl an Resistenzgenen gefunden. Im Durchschnitt kodierte ein Tierisolat ungefähr für 10 Resistenzgene. Bei den β -Laktamasen ist die Kombination aus *bla*_{CTX-M-15} und einem *bla*_{TEM-1} dominierend. Darüber hinaus treten bei sehr vielen Isolaten Resistenzgene gegen Streptomycin, Sulphonamide und Tetrazyklin auf.

6.2.3. Vergleich von Tier- und Humanisolaten

Beim Vergleich beider Populationen fällt auf, dass 71 % der Isolate eine *CTX-M-15*-Resistenz aufweisen. Wenn man sich das Resistenzgenverteilungsmuster genauer anschaut, fällt ein annähernd homogenes Muster bei allen Bakterienisolaten mit dem ST410 hinsichtlich der Aminoglykosid-, Betalaktam-, Phenicol- und Sulphonamidresistenzgene auf.

Alle Isolate von Menschen tragen ein *bla*_{CTX-M-ESBL}-Gen. Es wurden 5 verschiedene *ESBL*-Gene bei diesen nachgewiesen: *Bla*_{CTX-M-15} (n=2), *bla*_{CTX-M-1} (n=1), *bla*_{CTX-M-2} (n=1), *bla*_{CTX-M-3} (n=1) und *bla*_{CTX-M-14b} (n=1). *Bla*_{CTX-M-15} und *bla*_{CTX-M-14b} wurden nur in ST410-Isolaten gefunden, wohingegen bei den ST88-Isolaten jeweils *bla*_{CTX-M-1, -2} und *-3* vorkamen.

Bei den Isolaten von Tieren kamen im Gegensatz zu den humanen Isolaten 2 verschiedene *bla*_{CTX-M}-Resistenzgene vor. *Bla*_{CTX-M-14b}, *CTX-M-2* oder *CTX-M-3* waren bei keinem einzigen Tierisolat nachweisbar. *Bla*_{CTX-M-1} wurde zweimal nachgewiesen, *bla*_{CTX-M-15} 13-mal. Auffällig ist bei den ST40-Tierisolaten, dass sie noch ein weiteres (Nicht-ESBL)-Beta-Laktam-Resistenzgen besitzen. 8 Isolate besitzen zusätzlich das Resistenzgen *bla*_{OXA-1}. *Bla*_{TEM-1B} kommt ebenfalls bei 8 Isolaten von Tieren und das Gen *bla*_{TEM-1C} bei einem tierischen Bakterienisolat vor. Die Isolate V228 und V229, die den Sequenztyp 1291 besitzen, weisen exakt das gleiche Resistenzgenmuster auf. Das kann als Beleg dafür gewertet werden, dass diese beiden Isolate einen gemeinsamen Ursprung haben.

6.3 Virulenzgene

Zusätzlich zu den Antibiotika-Resistenzgenen wurden die Virulenzgene und phylogenetischen Gruppen der Isolate ermittelt (Abbildung 12).

Name	V111	V163	V238	V273	V279	V283	TO116	TO119	TO132	V131	V40	V134	V130	V268	V271	TO152	TO180	TO184	V168	V228	V229
Sequenztyp(ST)	10	10	10	10	88	88	88	88	88	90	167	167	410	410	410	410	410	410	617	1291	1291
Ursprung	V	V	V	V	V	V	H	H	H	V	V	V	V	V	V	H	H	H	V	V	V
Phylogenetische Gruppe	A	A	A	A	C	C	C	C	C	C	A	A	C	C	C	C	C	C	A	A	A
Adhäsine	f17A																				
	lpfA																				
	iha																				
	tsh																				
Toxine	mcmA																				
	mchF																				
	senB																				
Protektine	iss																				
Eisenaufnahmesysteme	ireA																				
	iroN																				
Stoffwechsel	ceb																				
	cma																				
	gad																				
	astA																				

Abbildung 12 Virulenzgene der Human- und Tierisolate

Legende: weiß: Gen nicht vorhanden, schwarz: Gen vorhanden, H: Humanisolat, V: Veterinärisolat

6.3.1. *E. coli*-Isolate von Menschen

Es wurden Virulenzgene der Kategorien „Adhäsine“, „Toxine“ und „Stoffwechsel“ mit ungefähr der gleichen Anzahl gefunden. Lediglich bei den „Protektinen“ und den „Eisenaufnahmesystemen“ wurden weniger Treffer identifiziert. Alle untersuchten Isolate weisen das *gad*-Gen auf. Das *lpfA*-Gen ist als einziges Adhäsins bei allen Humanisolaten vorhanden. Bei den „Toxinen“ wurde bei den ST88-Isolaten das *mchF*-Gen identifiziert. Ebenfalls konnte bei diesen Isolaten das *iss* detektiert werden, welches als Protektin eine erhöhte Serumresistenz ermöglicht. Darüber hinaus verfügten zwei Drittel der ST88-Isolate über die Eisenaufnahmegene *ireA* und *iroN*. Die ST410-Isolate besitzen keine Eisenaufnahmesysteme.

6.3.2. *E. coli*-Isolate von Tieren

Bei den Isolaten von Tieren sind, ähnlich wie bei den Isolaten von Menschen die meisten Treffer auf die Kategorien „Adhäsine“, „Toxine“ und „Protektine“ zurückzuführen. Bei den ST88-Isolaten und bei V130 (ST410) konnte das *lpfA*-Gen detektiert werden. Darüber hinaus wurden bei den Isolaten V228 und V229 (beide ST1291) das Adhäsins *iha* nachgewiesen. Unter den Toxingenen waren das Gen *mcmA* bei den Isolaten V228 und V229, bei V238, V273 und V279 das Gen *mchF* und des

Weiteren bei den ST88-Isolaten das Gen *senB* vorzufinden. Einige Isolate mit dem ST 10, alle Isolate mit den ST88 und ST167 tragen zusätzlich als Protektin das *iss*-Gen. Bei allen Isolaten kommt *gad* als Stoffwechselgen vor.

6.3.3. Vergleich von Bakterienisolaten von Menschen und Tieren

Beim Vergleich beider Populationen fällt auf, dass bis auf die Isolate V268 und V271 das *lpfA*-Gen bei allen Isolaten mit dem ST410 vor. Dagegen besitzen alle ST88-Isolate das *lpfA*-Gen. Zudem ist auch das *iss*-Gen bei allen Isolaten mit dem ST88 enthalten. Das Gen *gad* kommt sowohl bei allen Isolaten von Menschen als auch allen Isolaten von Tieren vor.

Beim Vergleich zwischen Human- und Tierisolaten ist ein wesentlicher Unterschied, dass das *lpfA*-Gen bei allen Humanisolaten vorkommt, jedoch bei den Tierisolaten nur das Isolat V130 dieses Virulenzgen besitzt.

6.4 Plasmidprofil

Von den 21 *E. coli*-Isolaten wurden die Anzahl und Größe ihrer Plasmide durch PFGE-Analyse ermittelt, nachdem die Plasmid-DNA mittels S1-Nuklease linearisiert wurde. Durch den Vergleich mit einem DNA-Marker, bei dem die Größe der Banden bekannt ist, kann aus der elektrophoretischen Beweglichkeit der jeweiligen Plasmide ihre Größe bestimmt werden. Als Größeneinheit verwendet man Kilobasenpaaren (Kbp). In Abbildung 13 ist beispielhaft veranschaulicht, wie für bestimmte Isolate das entsprechende Bandenmuster aussieht. Alle anderen Originalabbildungen sind im Anhang dargestellt.

Salmonellen Lambda V40 V131 V268 V271 V273 Lambda

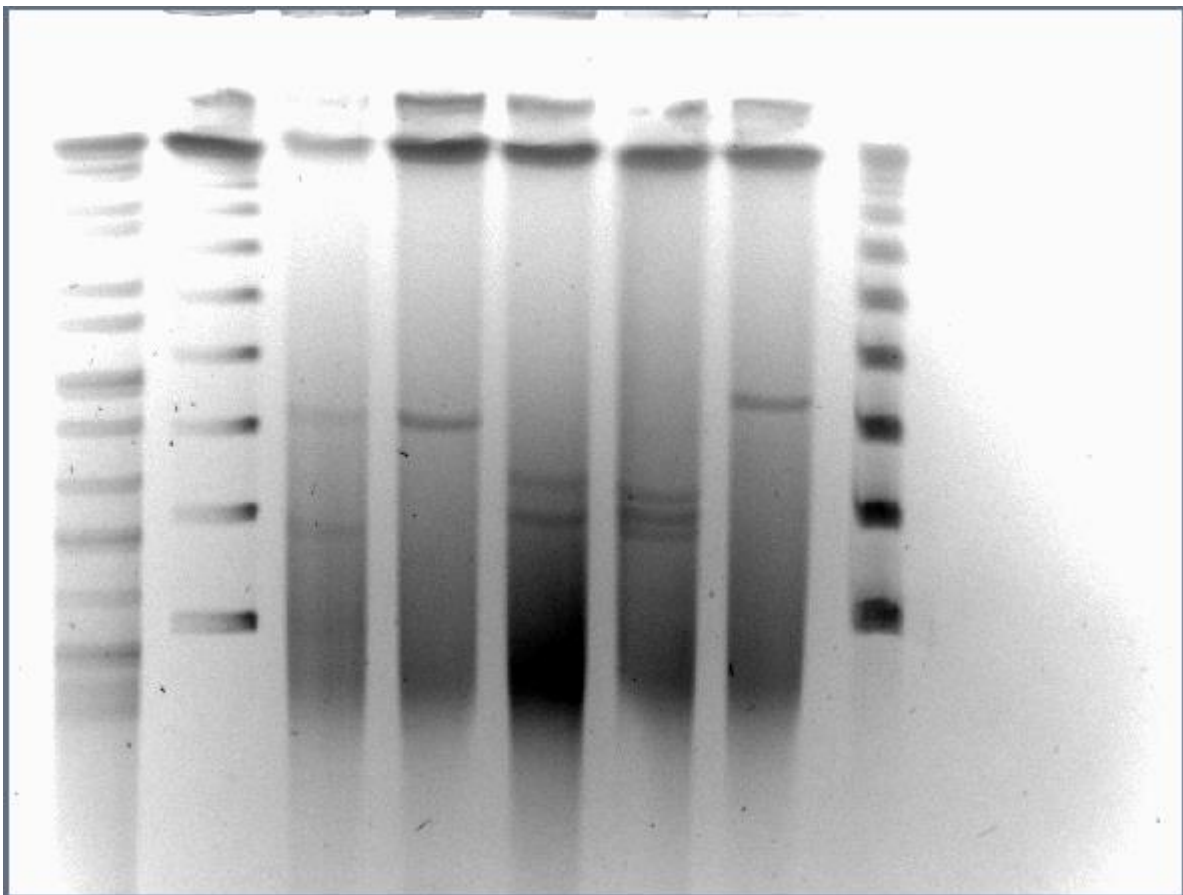


Abbildung 13 Pulsfeldgelelektrophorese mit Salmonellen- und Lambdamarker (Isolate: V40, V131, V268, V271 und V273)

Über den CGE-Server wurden die Plasmid-Inkompatibilitätsgruppen der Isolate bioinformatisch bestimmt.

Tabelle 14 Plasmidprofil der Human- und Tierisolate (V: Veterinärisolat, H: Humanisolat)

Isolat	CTX-M-Subtyp	ST	Ursprung	FIA	FIB	FIC	FII	I1	N	Y	Q1	X4	Plasmide (Anzahl; Größe in kbp)
V111	1	10	V		+								120, 100, 62, 39
V163	1	10	V									+	85, 40
V238	15	10	V		+			+					150, 95, 61
V273	15	10	V		+			+					153, 126, 94
V279	15	88	V	+	+	+	+						169
V283	15	88	V	+	+	+	+						165
TO116	2	88	H		+						+		205, 163, 39, 18
TO119	1	88	H		+								141, 112
TO132	3	88	H		+						+		129, 112, 82
V131	15	90	V	+	+						+		152
V40	15	167	V	+	+	+	+						152, 96, 45, 17
V134	15	167	V	+	+		+	+					125
V130	15	410	V	+			+	+					111, 93
V268	15	410	V	+	+	+	+			+	+		124, 104
V271	15	410	V	+	+	+	+		+				116, 106
TO152	15	410	H	+	+					+			124, 90
TO180	15	410	H	+	+						+		112, 95
TO184	14b	410	H		+								122, 109
V168	15	617	V	+	+	+	+						160, 145, 80
V228	15	1291	V	+	+			+			+		160, 91
V229	15	1291	V	+	+			+			+		160, 91

Alle Isolate wiesen *IncF*-Plasmide auf. Hierbei ist bei sechs Isolaten (V279, V283, V268, V271 und V168) die Plasmidkombination *IncFIA/FIB/FIC/FII* zu beobachten. Diese Kombination kommt nur bei den Tierisolaten vor, jedoch in unterschiedlichen Sequenztypen. All diese Isolate haben auch eine CTX-M-15-Resistenz. Bakterienisolate mit gleichen Plasmidkombination wurden in unterschiedlichen Farben hervorgehoben (siehe Tabelle 12).

Wenn man die Inc-Gruppen und die Plasmidprofile betrachtet, fällt auf, dass die Isolate V228 mit V229 und V279 mit V283 ein ähnliches Muster aufweisen. Das Isolat V163 besitzt als einziges ein

IncX4-Plasmid.

6.5 Konjugation

Die Tabelle 13 zeigt das Ergebnis der Konjugation der ausgewählten Bakterienisolate mit dem Stamm *E. coli* J53 als Rezipient. Als Positivkontrolle dient der Stamm *E. coli* H16. Dieser Stamm trägt *bla*_{CTX-M-1}-kodierendes Plasmid und wurde von Frau Dr. Judith Schmiedel bearbeitet und charakterisiert. Als Negativkontrolle wurde *E. coli* J53 ohne Zugabe eines Donors verwendet. Die Konjugationseffizienz der einzelnen Bakterienisolate wurde berechnet, um das Ausmaß der Übertragbarkeit der CTX-Resistenz quantifizieren zu können. Hierbei wird folgende Formel

herangezogen: Konjugationseffizienz = $\frac{\text{Anzahl an Transkonjuganten}}{\text{Anzahl an Bakterien vom Stamm J53}}$

Tabelle 15: Konjugationseffizienz der verwendeten Isolate bei 37°C

Stamm	Ursprung	CTX-M-Subtyp	ST	Konjugationseffizienz
V40	V	15	167	4,84x 10 ⁻⁶
V111	V	1	10	2,44x10 ⁻¹
V130	V	15	410	0
V131	V	15	90	0
V134	V	15	167	2,03x10 ⁻⁵
V163	V	1	10	1,87x10 ⁻²
V168	V	15	617	1,30x10 ⁻⁵
V228	V	15	1291	3,98x10 ⁻²
V229	V	15	1291	7,76x10 ⁻³
V238	V	15	10	0
V268	V	15	410	0
V271	V	15	410	0
V273	V	15	10	5,14x10 ⁻⁷
V279	V	15	88	2,28x10 ⁻²
V283	V	15	88	8,37x10 ⁻⁶
TO116	H	2	88	0
TO119	H	1	88	2,16x10 ⁻⁶
TO132	H	3	88	0
TO152	H	15	410	0
TO180	H	15	410	5,18x 10 ⁻⁵
TO184	H	14b	410	5,06 x 10 ⁻⁷

Wie in Tabelle 13 dargestellt, ist zu erkennen, dass die Bakterienisolate V228, V229 (beides Isolate mit dem ST1291), V111 und das Isolat V163 die höchsten Konjugationseffizienzen bei 37 °C aufweisen. Bei den Humanisolaten sind die Konjugationseffizienzen vergleichsweise gering bzw. haben den Wert 0, was bei TO152, TO116 und TO132 der Fall ist. Das bedeutet, dass keine Konjugation unter den verwendeten Bedingungen stattgefunden hat.

6.6 Virulenz im *Galleria mellonella* Modell

Die Larven von *Galleria mellonella* wurden einer mittleren Infektionsdosis von 10^6 Kolonie bildenden Einheiten (KbE) der 21 ESBL-kodierenden Bakterienisolate ausgesetzt. Hierbei hat man jeweils mit einem Isolat 10 Larven in je 3 Versuchen infiziert. Die Überlebensrate der Larven wurde über 6 Tage nach der Infektion beobachtet und dokumentiert. Die Testergebnisse sind in den Diagrammen (siehe Anhang) und in Tabelle 14 zusammengefasst. Anhand der Abbildung 14 mit den Isolaten des ST10 soll demonstriert werden, wie die Überlebensrate dargestellt wurde. Auf der x-Achse sind die Tage post infectionem aufgetragen, auf der y-Achse ist die Überlebensrate in % abgebildet. Als Kontrollstamm dient *E. coli* MG1655. Zusätzlich gibt es eine weitere Kontrolle mit Larven, denen nur PBS-Puffer injiziert wurde. Bei den Isolaten des ST10 fällt auf, dass Isolat V163 avirulent ist, bei V111 30 % der Isolate versterben und nach einem Tag bei Isolat V238 alle Isolate verstorben sind.

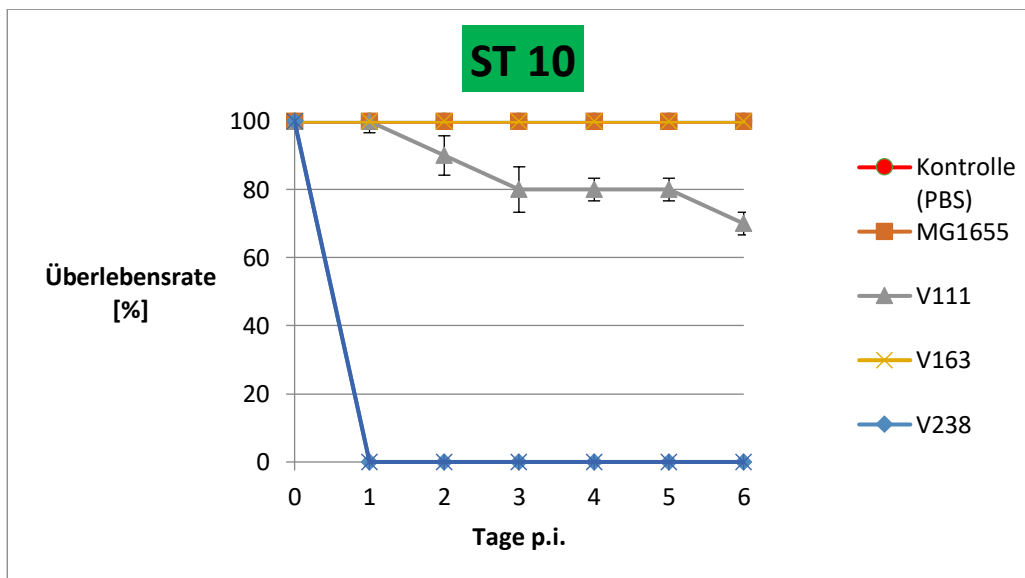


Abbildung 14 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V111, V163, V238, V273. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.

6.6.1. *E. coli* Isolate von Menschen

Von den 6 Humanisolaten zeigen die Isolate TO116, TO132, TO180 und TO184 einen larviziden Effekt von 100%. Dabei verstarben die Larven durch Infektion mit TO116 und TO132 nach 1,3 Tagen, wohingegen die Larven durch TO180 und TO184 nach einem Tag nicht mehr überlebten. Einen vergleichsweise leicht reduzierteren larviziden Effekt weisen die Bakterienisolate TO119 und TO152 mit 96,7% bei einer Überlebensdauer der Larven von 2 Tagen auf.

6.6.2. *E. coli* Isolate von Tieren

Bei den 15 untersuchten Tierisolaten ergab sich bei 8 Bakterienstämmen (V40, V131, V134, V228, V229, V268, V273 und V279) ein larvizider Effekt von 100%. Die Bakterienisolate V40, V134, V228, V268 und V273 töteten nach einem Tag alle Larven. Nach einer Infektion mit den Stämmen V131, V229 und V279 betrug die Überlebensdauer der Larven jeweils 1, 0,7 und 1,6 Tage.

Einen ähnlich hohen larviziden Effekt weisen die Bakterienisolate V130 mit 93 % und V283 mit 83,3 %. Die Überlebensdauer bei V130 betrug 93 %, bei V283 liegt sie bei 6 Tagen. Weitaus geringer sind die larviziden Effekte der Bakterienisolate V111, V168, mit 33 % und 40 %. Bei einer Infektion mit den Bakterienisolaten V238 und V271 überlebten die Larven 2 Tage. Bei V168 überlebten die Larven mit 5 Tagen und V111 mit 6 Tagen wesentlich länger. Als einziges apathogenes Bakterienisolat hat sich V163 erwiesen, wo keine Larve verstarb.

Tabelle 16 Herkunft, kodierter ESBL-Subtyp, eingesetzte Infektionsdosis im *Galleria mellonella*-Modell und der daraus resultierende larvizide Effekt der Human- und Tierisolat

Isolat	Material	CTX-M	Phylo-Gruppe	Sequenz-typ	Anzahl der Virulenz- und virulenzassoziierten Gene	Infektionsdosis (KBE/Larve)	Mittlere Überlebenszeit der Larven (Tage)	Larvizider Effekt (%)
V40	Kalb (Kot)	15	A	167	3	7×10^5	0	100
V111	Pferd (Kot)	1	A	10	1	$5,8 \times 10^5$	6	33
V130	Hund (Fistel)	15	C	410	2	$9,9 \times 10^5$	5,7	93
V131	Huhn (unbekannt)	15	C	90	2	$1,1 \times 10^6$	1	100
V134	Hund (Nase)	15	A	167	2	1×10^6	0	100
V163	Ferkel (Kot)	1	A	10	1	$8,6 \times 10^5$	6	0
V168	Kalb (Kot)	15	A	617	4	$7,8 \times 10^5$	5	40
V228	Pferd (Kot)	15	A	1291	4	$8,8 \times 10^5$	0	100
V229	Pferd (Kot)	15	A	1291	4	$8,5 \times 10^5$	2,3	100
V238	Pferd (Kot)	15	A	10	6	$9,1 \times 10^5$	2	100
V268	Pferd (Kot)	15	C	410	1	$1,1 \times 10^6$	0	100
V271	Pferd (Kot)	15	C	410	1	$9,9 \times 10^5$	2	100
V273	Pferd (Kot)	15	A	10	6	$8,4 \times 10^5$	0	100
V279	Hund (Urin)	15	C	88	5	10^6	0,7	100
V283	Hund (Urin)	15	C	88	4	$9,1 \times 10^5$	6	83,3
TO116	Mensch (Blutkultur)	2	C	88	7	$7,3 \times 10^5$	1,3	100
TO119	Mensch (Blutkultur)	1	C	88	4	$3,3 \times 10^5$	2	96,7
TO132	Mensch (Blutkultur)	3	C	88	7	$4,5 \times 10^5$	1,3	100
TO152	Mensch (Blutkultur)	15	C	410	2	$6,4 \times 10^5$	2	96,7
TO180	Mensch (Blutkultur)	15	C	410	2	$7,6 \times 10^5$	0	100
TO184	Mensch (Blutkultur)	14b	C	410	2	$8,4 \times 10^5$	0	100

6.7 Risikofaktoren für einen hohen larviziden Effekt

Gewisse Faktoren, die für einen hohen larviziden Effekt verantwortlich waren, wurden mittels einer Cox-Regressionsanalyse hinsichtlich ihres Zusammenhangs mit einer erhöhten Virulenz analysiert. Dazu zählten Vorhandensein der Virulenzgene, die Sequenztypen, der jeweilige CC und das Gen *lpfA* als positive Variablen. Die mittlere Überlebenszeit der Larven wurde für die Berechnung des larviziden Effekts der *E. coli*-Isolate benutzt. Die statistische Auswertung wurde von Frau Dr. Anita Windhorst aus dem Institut für medizinische Informatik der JLU Gießen durchgeführt. Als Programm für die Cox-Regressionsanalyse wurde das Programm Survival analysis verwendet. Dieses Programm basiert auf dem Statistikprogramm R (Version 3.3.2). Mittels einer multinomialen logistischen Regression wurde ermittelt, ob bestimmte Variablen, wenn sie in einer gewissen Kombination vorkamen, einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Larvizidität haben. Als Maß für die Virulenz zählen die sogenannte Hazard Rate und die Hazard Ratio.

Die Hazard Rate gibt das Risiko zu versterben, innerhalb einer bestimmten Zeit, was in diesem Versuch innerhalb von Tagen berechnet wurde. Bei einer Hazard Ratio (HR) werden verschiedene Hazard Raten miteinander verglichen. Hierbei gilt folgendes:

HR = 1 → kein Unterschied zwischen zwei Gruppen

HR > 1 → das Risiko für eine beobachtete Gruppe ist höher, innerhalb einer bestimmten Zeit zu versterben, als in der Vergleichsgruppe

HR < 1 → Risiko ist für die beobachtete Gruppe geringer als in der Vergleichsgruppe

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst:

Tabelle 17 Einfluss bestimmter Variablen auf die Larvizidität (Hazard-Ratio)

Geprüfte Variable	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall für das Hazard Ratio	p-Wert (p < 0,001)
CC23	3,91	3,18-4,81	0
Phylogruppe C	2,8	2,36-3,33	0
<i>lpfA</i>	39,92	20,31-78,47	0
<i>iss</i>	28,64	14,55-56,35	0

Diese Tabelle zeigt, dass die Virulenzgene *lpfA* und *iss* mit Hazard-Ratios von 39,92 und 28,64 einen großen Einfluss auf die Larvizidität haben. Auch die Zugehörigkeit zu dem CC23 führt zu einem

erhöhten larviziden Effekt. Allerdings ist dort die Hazard-Ratios 3,91 im Vergleich zu den Virulenzgenen deutlich geringer. Damit ist der Einfluss der Virulenzgene auf die Larvizidität größer als die Zugehörigkeit zum CC23.

6.8 Stammbaum

Der Stammbaum (Abbildung 13) stellt die Verwandtschaftsverhältnisse unter den Bakterienisolaten aus 4 verschiedenen Ursprüngen dar, nämlich aus Nutztieren, Haustieren und menschlichen Blutkulturen. Wenn man einen Blick auf die Sequenztypen wirft, fällt eine sehr nahe Verwandtschaft zwischen einigen Human- und Tierisolaten mit dem ST410 auf. Darüber hinaus sieht man bei den Isolaten mit dem ST10, dass einige Isolate vereinzelt sehr nah miteinander verwandt sind. Als Beispiele sind die Isolate V273 und V238 bzw. H122 und H92 anzuführen. Jedoch stellt man beim ST10 fest, dass die Isolate eine heterogene Gruppe bilden. Das heißt, dass die Isolate einen gemeinsamen Ursprung haben, sich jedoch voneinander unterscheiden im Gegensatz zu den Isolaten mit dem ST 410. Im Gegensatz zu ST410 sind ST10-Isolate aus Tier und Mensch nicht so nah verwandt. Das kann aus dem größeren Abstand im Stammbaum geschlossen werden.

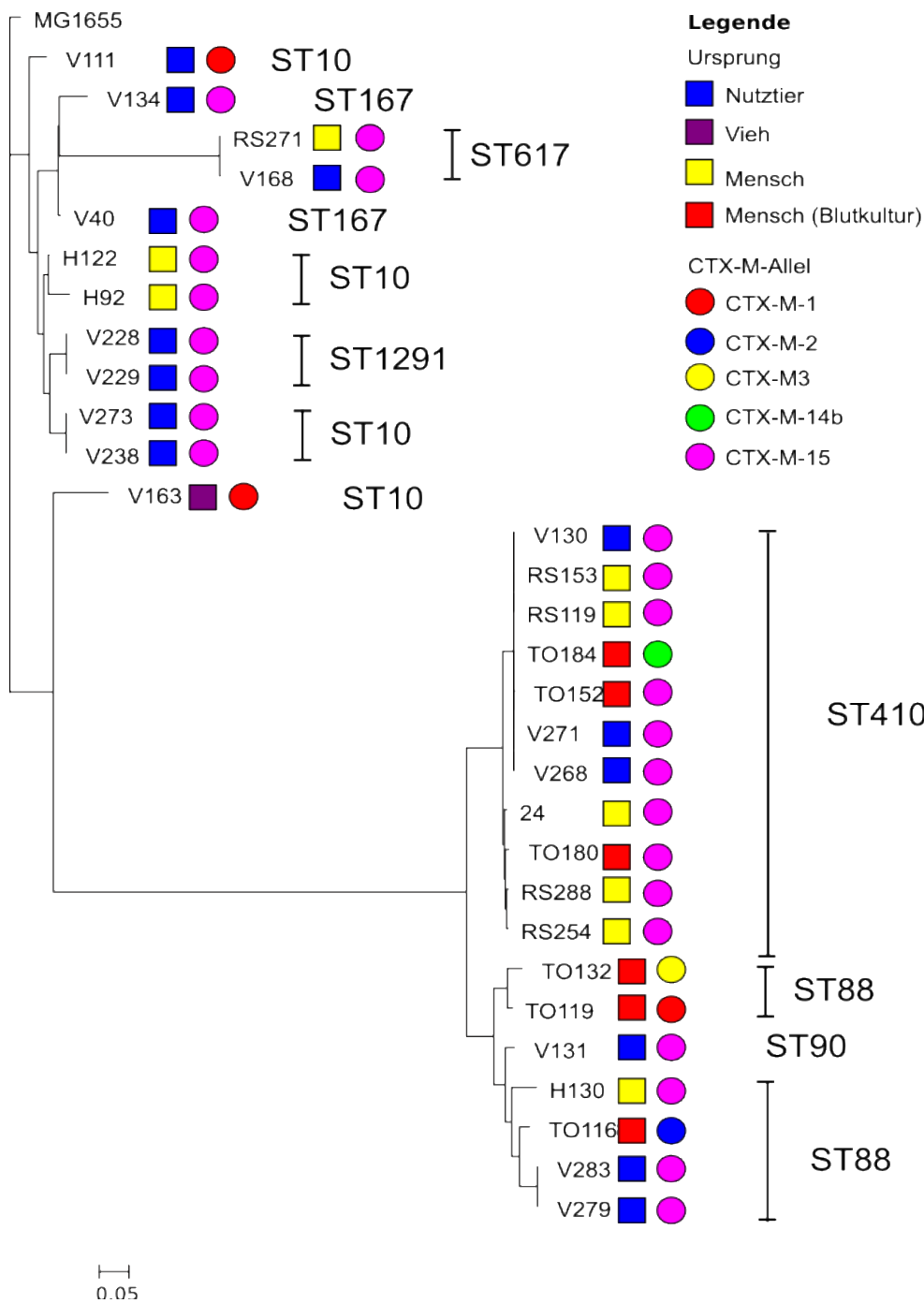


Abbildung 15 Stammbaum der in dieser Arbeit untersuchten Isolate mit Referenzisolaten.

Bei der phylogenetischen Analyse wurden auch die SNPs analysiert. Diese sind tabellarisch nach Sequenztypen (siehe Abbildung 15) geordnet zusammengefasst. Bei den SNPs ist zunächst zu erkennen, dass bei jedem einzelnen Sequenztyp die Isolate eine ähnliche Anzahl an SNPs aufweisen. Zudem fällt auf, dass die Sequenztypen ST88 und ST410 über ähnlich viele SNPs verfügen. Dies könnte auf einen möglichen gemeinsamen Ursprung hindeuten.

Tabelle 18 Darstellung der SNP-Zahlen im Vergleich zu *E. coli* MG1655

Isolat	ST	CTX-M-Subtyp	Ursprung	SNPs zu <i>E. coli</i> MG1655
MG1655	10	1	V	0
V111	10	1	V	6465
V273	10	15	V	8503
H92	10	15	H	8696
H122	10	15	H	6489
V238	10	15	V	8511
V163	10	1	V	14019
V283	88	15	V	44191
TO116	88	2	H	44205
TO132	88	3	H	44525
TO119	88	1	H	44203
V279	88	15	V	44188
V131	90	15	V	43929
H130	90	15	H	44707
V134	167	15	V	11032
V40	167	15	V	7561
TO180	410	15	H	43977
RS153	410	15	H	44228
RS119	410	15	H	44230
RS288	410	15	H	44037
V271	410	15	V	44228
TO152	410	15	H	44321
RS254	410	15	H	43886
V268	410	15	V	44237
TO184	410	14b	H	44251
V130	410	15	V	44225
24	410	15	H	43832
RS271	617	15	H	24931
V168	617	15	V	24945
V228	1291	15	V	7708
V229	1291	15	V	7710

6.9 Mcr-1-produzierende Isolate

Colistin ist ein Polypeptid und gilt als ein Reserveantibiotikum, welches bei Infektionen mit multiresistenten Gram-negativen Stäbchenbakterien, bei multiresistenten *Acinetobacter baumannii* und bei Atemwegsinfektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* zum Einsatz kommt.

Durch eine chinesische Arbeitsgruppe wurde im Jahre 2015 ein neuartiges, Plasmid-lokalisiertes Colistin-Resistenzgen publiziert, welches *mcr-1* benannt worden ist, aus einem Escherichia coli-Isolat vom Schwein nachgewiesen (Liu et al., 2016). Diese Entdeckung galt als bahnbrechend, da zuvor nur Resistenzen gegen Colistin durch chromosomale Mutationen entstanden sind. Aufgrund der Arbeit von Liu et al., 2016 begaben sich weitere mikrobiologische Institute weltweit auf die Suche nach der Plasmid-vermittelten Resistenz gegen Colistin. In dieser Dissertation wurden alle 21 Isolate und auch weitere Isolate der Ganzgenom-sequenzierten Bakterienstammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie auf das *mcr-1*-Gen gescreent. Aus den 21 zu analysierenden Bakterienisolaten kam das Resistenzgen im Tierisolat V163 vor. Insgesamt konnten im Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen in weiteren acht Isolaten aus Tier, Mensch und Nahrungsmitteln das *mcr-1*-Gen als erstes Institut in Deutschland nachgewiesen werden (Falgenhauer et al., 2016).

6.9.1. Plasmidprofil und MHK

Zur Charakterisierung der *mcr-1*-kodierenden Isolate wurde zum einen die minimale Hemmkonzentration gegenüber Colistin mit drei unterschiedlichen Methoden (Makrodilution, E-Test, VITEK) bestimmt, zum anderen die Anzahl und Größe der Plasmide in diesen Isolaten bestimmt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 19 Plasmidprofil, MHK und Interpretation der MHK der mcr-1-kodierenden Isolate

Isolat	Ursprung	Makrodilution	E-Test	VITEK	Inc-Gruppe	Plasmide (Anzahl; Größe in kbp)
V163	V	4 mg/L (R)	2 mg/L (S)	2mg/L (S)	X4	85, 40
R253	V	8 mg/L (R)	4 mg/L (R)	8mg/L	HI2	210, 111, 66, 35
NRZ14408	H	4 mg/L (R)	2 mg/L (S)	2mg/L (S)	HI2	210, 26
112065	V	>16 mg/L (R)	6 mg/L (R)	≥16mg/L (R)	HI2	225, 195, 135, 105, 50, 30
RL145	V	8 mg/L (R)	3 mg/L (R)	2mg/L (S)	X4	156, 120, 102, 75, 62, 35
RL158	V	8 mg/L (R)	3 mg/L (R)	2mg/L (S)	X4	196, 125, 35
RL465	V	4 mg/L (R)	3 mg/L (R)	2mg/L (S)	Chromosomal	158, 95, 44
RL138	V	>16 mg/L (R)	3 mg/L (R)	2mg/L (S)	HI2	221, 196, 98
142669	V	>16 mg/L (R)	6 mg/L (R)	≥16mg/L (R)	HI2	240, 196, 152, 99, 65

Hierbei zeigt es sich, dass sich unter Verwendung unterschiedlicher Methoden die MHK sehr stark unterscheidet. Nach EUCAST werden alle Isolate, die eine MHK von >2mg/L gegenüber Colistin zeigen, als resistent bezeichnet. Bei Verwendung der Makrodilution würden alle getesteten Isolate als resistent klassifiziert werden, wohingegen im E-Test nur 7/9 Isolaten als resistent bezeichnet würden. Dies stellt sich in der Untersuchung der MHK mittels VITEK sogar noch extremer dar, hier wären nur 3/9 Isolaten als resistent klassifiziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass nur die Makrodilution alle *mcr-1*-kodierenden Isolate als Colistin-resistent klassifiziert und somit keine falsch-negativen Aussagen ergibt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Empfehlungen des EUCAST/CLSI, welches besagt, dass Colistin-Resistenz nur in Mikro- oder Makrodilution ermittelt werden kann

(www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf).

Die Anzahl der Plasmide in den *mcr-1*-kodierenden Isolaten ist sehr stark unterschiedlich, sie liegt zwischen zwei und sechs Plasmiden. Auch die Größen der Plasmide sind stark unterschiedlich, sie liegen zwischen 26 und 240 kbp.

6.9.2. Konjugation (Mcr-1)

Die vorliegenden Daten zeigen die Konjugation der ausgewählten *mcr-1*-kodierenden Bakterienisolate mit dem Stamm *E. coli* J53 als Rezipient. Als Positivkontrolle dienten die Stämme *E. coli* V163 und R253 und als Negativkontrolle J53. Die Konjugationseffizienz der einzelnen Bakterienisolate wurde berechnet, um das Ausmaß der Übertragbarkeit der Colistinresistenz quantifizieren zu können. Die Konjugationseffizienz wurde nach obiger Formel berechnet (siehe Kap. 5.5).

Tabelle 20 Konjugationseffizienz der *mcr-1*-kodierenden Isolate

Stamm	Inc-Typ	Konjugationseffizienz (37°C)	Konjugationseffizienz (RT)
112065	HI2	$3,11 \times 10^{-8}$	$3,36 \times 10^{-2}$
NRZ14408	HI2	$2,33 \times 10^{-7}$	0
RL465	Chromosomal	0	0
142669	HI2	$9,58 \times 10^{-7}$	$1,98 \times 10^{-8}$
R253	HI2	Nicht durchgeführt	$4,84 \times 10^{-2}$
V163	X4	$5,53 \times 10^{-3}$	$3,60 \times 10^{-4}$
RL138	HI2	$5,92 \times 10^{-7}$	$2,85 \times 10^{-3}$
RL145	X4	$1,20 \times 10^{-3}$	Nicht durchgeführt
RL158	X4	$6,02 \times 10^{-4}$	Nicht durchgeführt

Die Konjugation wurde, wie der Tabelle 20 zu entnehmen ist, bei den meisten Isolaten sowohl in Raumtemperatur als auch bei 37 °C durchgeführt. Ausgenommen sind die Isolate R253, RL145 und RL158. In Tabelle 19 sind die Konjugationseffizienzen bei 37 °C und in Raumtemperatur zusammengefasst. Unter den *mcr-1* positiven Bakterienisolaten weisen die Isolate 112065 und R253 die höchste Konjugationseffizienz auf. Das Isolat NRZ14408 hat eine sehr niedrige Konjugationseffizienz. Beim Isolat RL465 hat keine Konjugation der Colistinresistenz auf *E. coli* J53 stattgefunden. Von den Transkonjuganten wurde ebenfalls die MHK mittels der oben genannten Methoden und die Plasmid-Anzahl und -Größe bestimmt.

Tabelle 21 Colistin-MHK-Bestimmung mittels Makrodilution, E-Test und VITEK und Plasmidprofil der Transkonjuganten.

Transkonjugant von	Inc-Typ	Makrodilution	E-Test	VITEK	Plasmide [Größe in kbp]
V163	X4	4 mg/L	2 mg/L	2mg/L	35 (RT + 37 °C)
R253	HI2	8 mg/L	4 mg/L	2mg/L	35 (RT + 37 °C)
NRZ14408	HI2	4 mg/L	2 mg/L	2mg/L	210 (RT)
112065	HI2	>16 mg/L	2 mg/L	2mg/L	225 (RT + 37 °C)
RL145	X4	8 mg/L	3 mg/L	2mg/L	35 (RT + 37 °C)
RL158	X4	8 mg/L	3 mg/L	2mg/L	35 (RT + 37 °C)
RL138	HI2	>16 mg/L	3 mg/L	2mg/L	221 (RT)
142669	HI2	>16 mg/L	2 mg/L	2mg/L	240, 196, 152, 99 (bei RT) 240 (37 °C)

Alle Isolate bis auf RL465 sind in der Lage, ihre Plasmide mittels Konjugation auf den Laborstamm *E. coli* J53 zu übertragen. Allerdings ist eine Konjugation des *mcr-1*-Gens (der Colistin-Resistenz) bei den Isolaten NRZ14408 und RL138 nur bei Raumtemperatur möglich. Bei 142669 sieht es bei dem Transkonjuganten bei RT so aus, als ob ein Wildtyp-Isolat gepickt worden wäre (enthält die identische Anzahl an Plasmiden).

Bei der Bestimmung der MHK zeigen sich bei den drei verwendeten Methoden wie auch bereits in Abschnitt 0 gezeigt, deutliche Unterschiede. Mittels VITEK-Bestimmung wäre nicht einer der Transkonjuganten als Colistin-resistent eingestuft, wohingegen bei der Makrodilution alle Transkonjuganten als Colistin-resistent eingestuft wären.

Bei RL465 befindet sich das *mcr-1*-Gen im Chromosom. Daher wurde kein Konjugationsversuch durchgeführt.

7. Diskussion

Während der letzten Jahre ist eine schnelle Ausbreitung multiresistenter ESBL-produzierender Enterobacteriaceae zu beobachten. Dies ist nicht ausschließlich ein Problem der Humanmedizin. Auch in der Tiermedizin werden sie häufig in Isolaten nachgewiesen, die von Tieren stammen. Eine Erklärung für die Ausbreitung von Multiresistenzen durch die Übertragung mobiler genetischer Elemente wie z. B. Plasmide. Sie können Antibiotikaresistenzen innerhalb von Bakterienspezies durch horizontalen Gentransfer rasant verteilen. ESBLs sind üblicherweise im Plasmid lokalisiert.

7.1. Genombasierte Analysen

21 ausgewählte CTX-M-1-, CTX-M-2-, CTX-M-3-, CTX-M-14b und CTX-M-15-produzierende *E. coli*-Isolate von Heimtieren (Hunden, Katzen) und von Patienten wurden eingehender hinsichtlich Verwandtschaft (MLST), Plasmiden und deren Eigenschaften sowie Virulenzeigenschaften untersucht. Darüber hinaus wurde ihre Virulenz in Infektionsversuchen mit der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* getestet.

Wenn man die MLSTs der Isolate betrachtet, fällt eine heterogene Gruppe auf. Es wurde eine Vielzahl an STs beobachtet. Es fallen sogar zwischen Human- und Tierisolaten hinsichtlich ihrer STs Überschneidungen auf. Zwei STs konnten sowohl bei Human- und Tierisolaten nachgewiesen werden (ST88 und ST410). Das könnte bedeuten, dass ein Austausch dieser Isolate zwischen den Habitaten stattgefunden haben könnte. Wenn man den Stammbaum genauer betrachtet, fällt eine nahe Verwandtschaft zwischen ST88 und ST410 auf.

Die Untersuchung der Human- und Tierisolate hinsichtlich Plasmidanzahl und -größe sowie Inc-Gruppen führte zu folgenden Resultaten: Beim Isolat V163 konnte als einziges das Plasmid IncX4 nachgewiesen werden. Alle Tierisolate mit der Plasmidkombination IncFIA/FIB/FIC/FII hatten auch eine CTX-M-15-Resistenz. Diese Beobachtung konnte auch in einer Analyse bei Falgenhauer et al. gemacht werden (Falgenhauer et al., 2014).

7.2 *Galleria mellonella*-Versuche

Bei der Analyse von Verteilung und Anzahl identifizierter Virulenzfaktoren und virulenzassoziierten Faktoren macht sich eine deutlich höhere Anzahl dieser in Isolaten der phylogenetischen Gruppe C mit dem CC88 bemerkbar. Dort kommen im Schnitt 6 Virulenzfaktoren im Vergleich zu Isolaten der phylogenetischen Gruppe A mit lediglich 3 Virulenzfaktoren vor. Bei Isolaten der Phylogruppe C konnte zu 75% das *lpfA*-Gen (long polar fimbriae A) nachgewiesen werden. Über das plfA-Protein wird eine Adhäsion der Bakterien an die Zellwand der Enterozyten vermittelt. Darüber hinaus fällt bei allen Isolaten mit dem ST88 eine Präsenz des Virulenzgens *iss* auf, welches eine Serumresistenz vermittelt.

In einem Tiermodellversuch mit *G. mellonella* wurde die phänotypische Virulenz der Isolate getestet. Zwischen dem Immunsystem von *G. mellonella* und dem angeborenen Immunsystem von Säugetieren gibt es viele Ähnlichkeiten. Es bestehen homologe Eigenschaften wie humorale und zelluläre Abwehrmechanismen. Zur Aufnahme von Krankheitserregern verfügt *G. mellonella* über Hämocyten. Diese Zellen töten Bakterien durch die Produktion von Sauerstoffradikalen genauso wie neutrophile Granulozyten von Säugetieren (Hoffmann, 1995). Aufgrund dieser Eigenschaft eignet sich dieses Modell besonders zur Beurteilung von bakteriellen Infektionen bei Neugeborenen, Frühgeborenen und Patienten, die immunsupprimiert sind. Gerade bei immunsupprimierten Patienten besteht ein hohes Risiko für nosokomiale Infektionen mit multiresistenten Erregern, insbesondere ESBL-Produzenten (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2002). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Virulenz ESBL-produzierender *E. coli*-Isolate analysiert. Letztlich sollten Faktoren nachgewiesen werden, die eine höhere Virulenz hervorrufen.

Zunächst wurde versucht, eine Korrelation zwischen der Zahl der Virulenzfaktoren mit dem beobachteten larviziden Effekt in *G. mellonella* herzustellen. Die Hypothese war, dass Isolate mit mehr Virulenzfaktoren auch einen ausgeprägteren larviziden Effekt haben. Isolate mit einer großen Anzahl an Virulenzfaktoren sind laut Williamson et al. in der Lage, *G. mellonella*-Larven schneller und in größerer Zahl zu töten. Dies konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Es konnten zwar einige Isolate mit vielen Virulenzfaktoren die infizierten Larven innerhalb der ersten 24 h töten. Ein Teil der Isolate, die weniger Virulenzfaktoren tragen, zeigten auch einen geringeren larviziden Effekt. Allerdings traten in beiden genannten Gruppen auch Ausnahmen auf. Bakterienisolate mit wenigen Virulenzfaktoren waren auch fähig, viele Bakterien innerhalb eines Tages zu töten, wohingegen bei einigen Isolaten mit vielen Virulenzfaktoren der larvizide Effekt vergleichsweise geringer ausgeprägt war.

In einem anschließenden Schritt wurde mit Hilfe der Cox-Regression versucht, Faktoren zu finden, die zu einem höheren larviziden Effekt beitragen. Hierbei erwiesen sich Parameter wie Zugehörigkeit zum CC23 sowie das Vorhandensein vom Adhäsionsgen *lpfA* als entscheidend. Gallerien, die von Bakterien mit dem Virulenzgen *lpfA* infiziert wurden, verstarben mit einem 39,9-fach erhöhten Risiko als ohne dieses Gen. Wenn die Isolate dem CC 23 angehörten, erhöhte sich das Risiko um 3,91 für die Larven, zu versterben. Bei Isolaten mit der Phylogruppe C betrug die Hazard Ratio 2,8.

Bei den Isolaten V111, V163 und V168 wurde der geringste larvizide Effekt beobachtet. Das kann auf der Tatsache beruhen, dass alle drei Isolate nicht der phylogenetischen Gruppe C angehören und nicht das Adhäsionsgen *lpfA* besitzen.

Insgesamt ermöglicht das *G. mellonella*-Modell eine gute Beurteilbarkeit der Virulenz von ESBL-*E. coli*. Möglicherweise konnten Risikofaktoren (Präsenz der Virulenzgene *lpfA*, *iss*, Zugehörigkeit zum CC23) entdeckt werden, die eine Prognose über die phänotypische Relevanz erlauben. Zur

Bestätigung dieser Theorie sind jedoch weiterführende Experimente zwingend erforderlich. Zunächst muss eine größere Anzahl von Isolaten auf das Vorhandensein der entsprechenden Risikofaktoren gescreent und anschließend im *G. mellonella*-Modell getestet werden. Allerdings resultiert der larvizide Effekt eventuell nicht immer nur durch die identifizierten Risikofaktoren. Es müssen auch Faktoren berücksichtigt werden, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden bzw. unbekannt sind. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die direkte Testung der Isolate in einem *in einem lebenden Modell*. Diese Bedingungen können *in vitro* nicht ausreichend nachgestellt werden. Durch das beobachtete Verhalten des Isolates in der Larve kann eine mögliche Infektion in Mensch oder Säugetier besser eingeschätzt werden. Durch ein Abfragen potenzieller Virulenzfaktoren mittels PCR oder Ganzgenomsequenzierung kann solch eine Erkenntnis nicht gewonnen werden.

Mit Hilfe dieser Studie konnte bewiesen werden, dass durch eine simultane Durchführung beider Methoden Risikofaktoren identifiziert werden können, die einen stärkeren larviziden Effekt bei *G. mellonella* auslösen können. Künftig können diese Ergebnisse dann für die Anwendbarkeit in einem Vertebraten-Tiermodell nützlich sein. Hierdurch können ESBL-*E. coli*-Infektionen beim Menschen besser beurteilt werden.

7.3. Charakterisierung *mcr-1*-kodierender Isolate

Colistin ist ein kationisches, basisches Polypeptidantibiotikum, welches bereits seit den späten 1940er- Jahren bekannt ist. Aufgrund einer stetigen Zunahme multiresistenter Gram-negativer Bakterien wie z.B. Enterobacteriaceae, kam Colistin als Reserveantibiotikum immer mehr zum Einsatz (Andrade et al. , 2020). Durch Wechselwirkung mit negativ geladenen Lipopolysaccharidmolekülen der Außenmembran entfaltet dieses Antibiotikum seine Wirkung. Es werden zweifach positive geladene Kationen, wie z.B. Mg^{2+} und Ca^{2+} von den Phosphatgruppen der Membranlipide verdrängt und somit die Durchlässigkeit der Bakterienzellmembran gefördert. Dies führt letztlich zum Austritt intrazellulärer Substanzen und infolgedessen zum Tod der Bakterien (Hancock et al. , 1997).

Gram-negative Bakterien haben über die Zeit Resistenzmechanismen gegen Colistin entwickelt. Diese beinhalten intrinsische, adaptive und übertragbare Mechanismen (Munita et al., 2016).

Intrinsische Resistenzmechanismen beziehen sich auf eine Veränderung der Lipopolysaccharide durch Bindung von Aminozuckern oder einer übermäßigen Synthese von Außenmembranproteinen. Adaptive Resistenzmechanismen betreffen eine Aktivierung von LPS-verändernden Operons durch Mutation von Zweikomponentensystem wie beispielsweise dem PmrA/PmrB- und dem Pho/phoQ-System oder der Expression von Effluxpumpen (Olaitan et al., 2014). Die Regulationsmechanismen sind in der Abbildung 16 dargestellt.

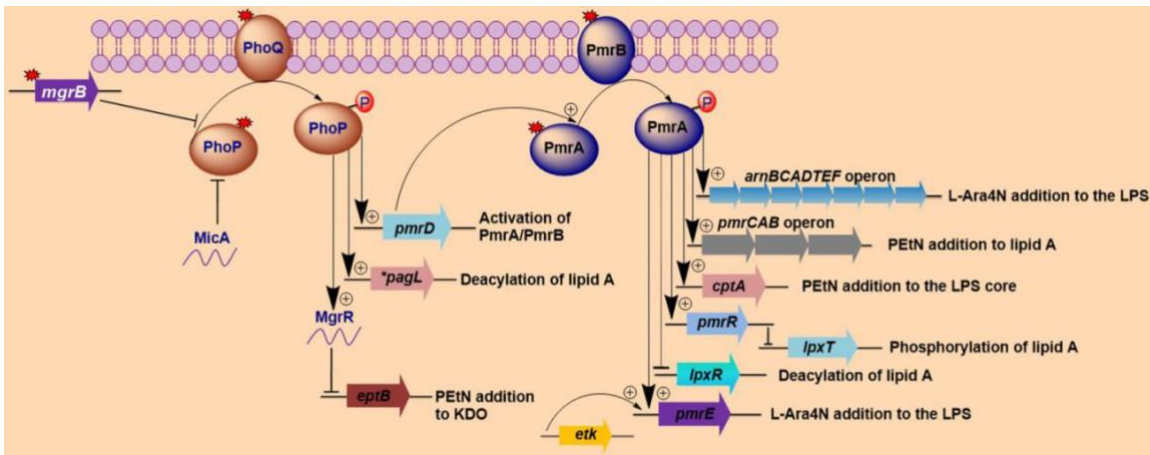


Abbildung 16 Regulationswege in Gram-negativen Bakterien zur Modifikation von Lipopolysacchariden

Seit der Entdeckung des *mcr-1* Gens in China im Jahre 2015 (Zhi et al. , 2016), welches eine Plasmid-vermittelte und somit übertragbare Resistenz gegen das Reserveantibiotikum Colistin darstellt, hat sich die Problematik mit multiresistenten Erregern verschärft. Bislang waren lediglich chromosomale Mutationen, die für eine Resistenz gegen Colistin verantwortlich sind, bekannt. Da die meisten dieser multiresistenten *E. coli* in China bei Schweinen entdeckt wurden, ist dies einer unangemessene Anwendung von Colistin in der Veterinärmedizin zuzuschreiben. Dass in der Arbeit von Liu et al. auch *mcr-1*-positive Isolate aus Menschen gefunden wurden, beweist eine mögliche stattgefunden Übertragung von dem Resistenzgen auf humane Bakterienisolate. Zudem konnten Wang et al. zeigen, dass dieses Resistenzgen möglicherweise durch ein gemeinsames Transposon, nämlich dem IS*Apl1*, mobilisiert werden konnte (Wang et al. , 2018).

Wie in den meisten Arbeiten veröffentlicht, zeigten sich auch in unseren Isolaten die IncHI2 und IncX4 Plasmide als Träger des *mcr-1*-Gens (Falgenhauer et al. , 2016). IncX4-Plasmide sind die am häufigsten vorkommende Plasmid-Gruppe in *mcr-1*-kodierenden Bakterienpopulationen. Die Konjugationseffizienz *mcr-1*-kodierender IncX4-Plasmide liegt zwischen 10^{-1} bis 10^{-4} , wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Das MCR-1-Protein ruft durch Modifikation des Lipid A der bakteriellen Zellmembran mittels Addition einer Phosphoethanolamingruppe eine Resistenz gegen Colistin hervor. Im Rahmen der PhD-Thesis von Dr. Gwozdziński wurde interessanterweise nachgewiesen werden, dass in Anwesenheit von Kalziumionen, welche in einer speziellen Lösung vorlagen, die Wirkung des *mcr-1*-Gens verstärkt wird. Dies wurde durch Bestimmung der MHK von Colistin in den entsprechenden Bakterienisolaten bestätigt (Gwozdziński et al. 2018).

Mit dem Nachweis des *mcr-1*-Resistenzgens am Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen im Jahre 2016 weiß man, dass die plasmidkodierte Colistinresistenz auch ein Problem in

Deutschland respektive Europa ist. Das Bakterienisolat RL465 hat hierbei eine besondere Bedeutung, weil es als einziges das *mcr-1*-Gen im Chromosom trägt (Falgenhauer et al., 2017). Das bedeutet, dass es das Gen stabil an seine Nachkommen vererben kann. Dadurch wird die Verbreitung der Resistenz rasanter und schwieriger zu kontrollieren sein. Deshalb muss man diese Entwicklung sehr ernstnehmen, da möglicherweise weitere Kontinente von diesem Problem betroffen sein können. Wenn sowohl von Veterinärmedizin als auch von Humanmedizin gemeinsam keine Anstrengungen unternommen werden, strengere Indikationen für die Gabe von Antibiotika zu stellen und die Ausbrüche von multiresistenten Darmkeimen genauer zu überwachen, droht uns eine sogenannte „postantibiotische Ära“ (WHO, 2014). Das wäre dann ein Zeitalter, in dem Antibiotika bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen nicht mehr helfen können.

8. Zusammenfassung

Aus den Ergebnissen dieser Doktorarbeit wird ersichtlich, dass das Vorkommen von ESBL-produzierenden Enterobacteriaceae aus Menschen und Tieren ein ernstzunehmendes Problem ist. Dies macht sich durch die Verteilung der Resistenzgene innerhalb der Human- und Tierisolate bemerkbar. Die Isolate weisen hinsichtlich der phylogenetischen Gruppen A und C eine leichte Überrepräsentation der Gruppe C auf. Die beiden ESBL-Subtypen, die am meisten vorlagen, waren CTX-M-15 (n=15) und CTX-M-1 (n=3). Das am häufigsten identifizierte PMQR-Gen war *aac(6')-Ib-cr* mit einem Anteil von 50 % bei den Humanisolaten und 50 % bei den Tierisolaten.

Insgesamt konnten bei allen 21 untersuchten Bakterienisolaten Plasmide nachgewiesen werden. Am häufigsten kamen die Plasmid-Inc-Gruppen FIA, FIB, FIC, FII, I1, N, Y, Q1 und X4 vor.

Der Nachweis des *mcr1*-Gens in Deutschland zeigt eine plasmidvermittelte Resistenz gegen das Reserveantibiotikum Colistin auf, welche zuvor chromosomal bekannt war. Fast alle Isolate stammen aus Zuchttieren und Lebensmittel. Lediglich ein Bakterienisolat stammt aus dem Menschen. Das Bakterienisolat RL465 enthält das Resistenzgen in seinem Chromosom. Das ist ein Beleg dafür, dass dieses Resistenzgen in der Lage ist, sich in das Chromosom zu integrieren.

Aus den Ergebnissen des Infektionsmodells *Galleria mellonella* konnten einige Risikofaktoren für einen erhöhten larviziden Effekt ermittelt werden (Präsenz der Virulenzgene *lpfA*, *iss*, Zugehörigkeit zur Phylogruppe C und CC23).

8. Summary

From the results of this thesis it is evident that the occurrence of ESBL-producing Enterobacteriaceae from humans and animals is a serious problem. This becomes noticeable through the distribution of the resistance genes within the human and animal isolates. With regard to phylogenetic groups A and C, the isolates show a slight overrepresentation of group C. The two most prevalent ESBL subtypes were CTX-M-15 (n=15) and CTX-M-1 (n=3). The most commonly identified PMQR gene was *aac(6')-Ib-cr*, accounting for 50% in human isolates and 50% in animal isolates.

In total, plasmids could be detected in all 21 bacterial isolates examined. The plasmid *inc* groups FIA, FIB, FIC, FII, II, N, Y, Q1 and X4 were the most common.

The detection of the *mcr1* gene in Germany shows a plasmid-mediated resistance to the reserve antibiotic colistin, which was previously known chromosomally. Almost all isolates come from breeding animals and food. Only one bacterial isolate comes from humans. The bacterial isolate RL465 contains the resistance gene in its chromosome. This is evidence that this resistance gene is capable of integrating into the chromosome.

From the results of the *Galleria mellonella* infection model, some risk factors for an increased larvicidal effect could be determined (presence of the virulence genes *lpfA*, *iss*, belonging to the phylogroup C and CC23).

9. Literaturverzeichnis

- Ambler, RP (1980): **The Structure of β -Lactamases**. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289 (1036), S. 321–331.
- Andrade, F.F., Silva, D., Rodrigues, A., Pina-Vaz, C., 2020. ***Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges***. *Microorganisms* 8, 1–12. doi:10.3390/microorganisms8111716
- Bankevich, A, Nur, S, Antipov, D, Gurevich, A, Dvorkin, M, Kulikov, A, Lesin, Valery, Nikolenko, S, Pham, S, Prjibelski, A, Pyshkin, A, Sirotkin, A, Vyahhi, N, Tesler, G, Alkseyev, M, Pevzner, P (2012): **Spades: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing**. *Journal of Computational Biology*. Volume 19, Number 5, S. 455-477.
- Bauernfeind, A, Grimm, H, Schweighart, S (1990): **A new plasmidic *cefotaximase* in a clinical isolate of *Escherichia coli***. *Infection*. 18(5), S. 294–298.
- Bevan, E.R., Jones, A.M., Hawkey, P.M., 2017. ***Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype***. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2145–2155. doi:10.1093/jac/dkx146
- Biswas, S, Brunel, J, Dubus, J, Reynaud-Gaubert, M, Rolain, J (2012): **Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century**. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Volume 8, S. 917-934
<http://bldb.eu/> Stand 03.01.2022
- Bush, K, Jacoby, GA, 2009. ***Updated Functional Classification of β -Lactamases***. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3):969-76. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- Bush, K., Bradford, P.A., 2020. ***Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens***. *Clin. Microbiol. Rev.* 33. doi:10.1128/CMR.00047-19
- Carlos, C, Pires, M, Stoppe, N, Hachich, E, Sato, M, Gomes, T, Amaral, L, Ottoboni, L (2010): ***Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination**. *BMC Microbiology* 2010, 10:161
- CDC. ***Antibiotic Resistance Threats in the United States***, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- Celli, J, Deng, W, Finlay, BB (2000): ***Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside***. *Cellular Microbiology* (2000) 2(1), S. 1-9
- Clermont, O, Christenson, JK, Denamur, E, Gordon, DM (2012): ***The Clermont Escherichia coli***

phylo-typing method revisited improvement of specificity and detection of new phylo-groups:

Environmental Microbiology Reports. Volume 5, Issue 1

Derakhshandeh, A, Firouzi, R, Moatamedifar, M, Motamedi, A, Bahadori, M, Naziri, Z (2013): **Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples.** Molecular Biology Research Communications 2013;2(4):143-149

Di Guilmi, AM, Dessen, A, Dideberg, O, Vernet, T (2003): **The Glycosyltransferase Domain of Penicillin-Binding Protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* Catalyzes the Polymerization of Murein Glycan Chains.** J Bacteriol 185(15), S. 4418–4423.

Dolejska, M; Villa, L; Hasman, H; Hansen, L; Carattoli, A (2013): **Characterization of *IncN* plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans.** J Antimicrob Chemother. 68(2), S. 333–339.

El-Gamal, M.I., Brahim, I., Hisham, N., Aladdin, R., Mohammed, H., Bahaeldin, A., (2017). **Recent updates of carbapenem antibiotics.** Eur. J. Med. Chem. 131, 185–195. doi:10.1016/j.ejmech.2017.03.022

EUCAST, 2012: www.eucast.org

Falgenhauer, L, Schmiedel, J, Ghosh, Hiren, Fritzenwanker, M, Yao, Y, Bauerfeind, R, Imirzalioglu, C, Chakraborty, T (2014): **Resistance plasmids in *ESBL*-encoding *Escherichia coli* isolates from humans, dogs and cats.** Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 127, Heft 11/12 (2014), S. 458-463.

Falgenhauer, L, Waezsada, SE, Gwozdziński, K, Ghosh, H, Doijad, S, Bunk, B, Spröer, C, Imirzalioglu, C, Seifert, H, Irrgang, A, Fischer, J, Guerra, B, Käsbohrer, A, Overmann, J, Goesmann, A, Chakraborty, T (2016): **Chromosomal locations of *mcr-1* and *bla*_{CTX-M-15} in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* ST410.** Emerging Infectious Diseases. 22(9), S. 1689–1691.

Falgenhauer, L, Waezsada, SE, Yao, Y, Imirzalioglu, C, Käsbohrer, A, Roesler, U, Brenner Michael, G, Schwarz, S, Werner, G, Kreienbrock, L, Chakraborty, T (2016): **Colistin resistance gene *mcr-1* in extended- spectrum β -lactamase- producing and carbapenemase- producing Gram-negative bacteria in Germany.** The Lancet Infectious Diseases. 16 (3), S. 282-3.

Forth, W, Aktories, K (2005): **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.** (9. Aufl.)

Frick, JS, Lange, A, Schäfer, A, Bender, A, Steimle, A, Beier, S, Parusel, R (2018): ***Galleria mellonella*: A Novel Invertebrate Model to Distinguish Intestinal Symbionts from Pathobionts.** Frontiers Immunology. 9, S. 2114.

Fritsche, O (2016). Kompaktwissen Mikrobiologie.

Goesmann, A, Meyer, F, McHardy, AC, Bartels, D, Bekel, T, Clausen, J, Kalinowski, J, Linke, B, Rupp O, Giegerich, R, Pühler, A (2003): **GenDB - an open source genome annotation system for prokaryote genomes**. Nucleid Acids Research. Band 31, Ausgabe 8. S. 2187-2195.

Gwozdziński, K (2018): **Macromolecular modification of the cell wall of *Gram-negative* bacteria leading to antibiotic resistance and formation of outer membrane vesicles**. Inaugural Dissertation

Gwozdziński, K, Azarderakhsh, S, Imirzalioglu, C, Falgenhauer, L, Chakraborty, T (2018): An improved medium for colistin susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 56, e01950-17. doi:10.1128/JCM.01950-17.

Hawkey, PM, Jones, AM. *The changing epidemiology of resistance*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 64, Issue suppl_1, September 2009, Pages i3–i10,

Hof, H, Dörries, R (2009): **Medizinische Mikrobiologie**. (4. Auflage). Thieme Verlag

Hoffmann, JA (1995): **Innate immunity of insects**. Curr Opin Immunol. 7 (1), S. 4–10.

<https://aware.essentialmeds.org/groups>

<https://de.wikipedia.org/wiki/PUC19>

https://www.helmholtzmuenchen.de/fileadmin/HZM/pdf/publikationen/mensch_und_umwelt_spezial/Heft17/59_64_Hartmann.pdf

<https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=+Ceftobiprol>.

Imirzalioglu, C, Falgenhauer, L, Schmiedel, J, Waezsada, SE, Gwozdziński, K, Roschanski, N, Roesler, U, Kreienbrock, L, Schiffmann, AP, Irrgang, A, Käsbohrer, A, Bauerfeind, R, Domann, E, Chakraborty, T (2017): **Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Assay for the Rapid Detection of Plasmid-Encoded Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* Isolates**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 61 (4), S. 16.

Kaper, JB, Nataro, JP, Mobley, HLT (2004): **Pathogenic *Escherichia coli***. Nat Rev Microbiol 2,2(2), S. 123-140

Kayser, FH, Böttger, EC, Haller, O, Deplazes, P, Roers, A (2013): **Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie**. Thieme Verlag

Kohlrausch, U, Holtje, JV (1991): **Analysis of murein and murein precursors during antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli***. J Bacteriol. 173(11), S. 3425–3431.

Liu, Y, Wang, Y, Walsh, T, Yi, LX, Zhang, R, Spencer, J, Doi, Y, Tian, G, Dong, B, Huang, X, Yu, LF, Gu, D, Ren, H, Chen, X, Lv, L, He, D, Zhou, Hongwei, Liang, Z, Liu, JH, Shen J (2015): **Emergence**

of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infectious Diseases. Volume 16, Issue 2, S. 161-168.

Mayr, A, Rolle, M (2006): **Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.** (8. Auflage). MVS Medizinverlage

Meyer, E, Gastmeier, P, Kola, A, Schwab, F (2012): **Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*.** Infection 40(6), S. 685–687.

Mukherjee, K, Altincicek, B, Hain, T, Domann, E, Vilcinskas, A, Chakraborty, T (2009): ***Galleria mellonella* as a Model System for Studying Listeria Pathogenesis.** Appl Environ Microbiol. 76(1), S. 310–317.

Munita, JM, Arias, CR (2016): **Mechanisms of Antibiotic Resistance.** *Microbiol Spectr.*, 4(2), S.1–37.

Niedrig, M, Eckmanns, T, Wieler, LH. (2017). ***One-Health-Konzept: Eine Antwort auf resistente Bakterien?*** Dtsch Arztebl 2017; 114(17): [8]; DOI: 10.3238/PersInfek.2017.04.28.02

O’Neill, J (2014): **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.** Review on Antimicrobial Resistance

Olaitan, AO, Morand, S. & Rolain, J.-M. (2014): **Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria.** *Frontiers in Microbiology*, 5(November), p.643.

Partridge, SR, Kwong, SM, Firth, N, Jensen, SO (2018): **Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance.** Clinical Microbiology Reviews. 31 (4). S. 17.

Pfeifer Y (2018). ESBL, Carbapenemase und Co.: ***Transferwege multiresistenter Gram-negativer Bakterien.*** Netzwerktreffen Multiresistente Erreger des Landkreises Stendal.

Poirel, L (2017): **Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes.** Clinical microbiology reviews. 30(2), S.557–596.

Ramarao, N, Nielsen-Leroux, C, Lereclus, D (2012): **The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis.** J. Vis. Exp. (70)

Schmiedel, J (2015): **Vergleichende molekulare Charakterisierung *ESBL*-produzierender *Enterobacteriaceae*-Isolate von Menschen und Tieren.** (VVB Lauferweiler Verlag)

Schmiedel, J, Falgenhauer, L, Domann, E, Bauerfeind, R, Prenger-Berninghoff, E, Imirzalioglu, C,

- Chakraborty, T. (2014): **Multiresistant extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hessen, Germany.** BMC Microbiol. 14:187.
- Suerbaum, S, Hahn, H, Burchard, GD, Kaufmann, S, Schulz, ThF (2012): **Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.** (7. Auflage). Springer Verlag
- Sun, J, Liang-Xing Fang, Zuwei Wu, Hui Deng, Run-Shi Yang, Xing-Ping Li, Shu-Min Li, Xiao-Ping Liao, Youjun Feng & Ya-Hong Liu (2017): **Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-I* Acquisition.** Scientific Reports. 7(424)
- Valentin, L, Sharp, H, Hille, K, Seibt, U, Fischer, J, Pfeifer, Y, Brenner Michael, G, Nickel, S, Schmiedel, J, Falgenhauer, L, Friese, A, Bauerfeind, R, Rösler, U, Imirzalioglu, C, Chakraborty, T, Helmuth, R, Valenza, G, Werner, G, Schwarz, S, Guerra, B, Appel, B, Kreienbrock, L, Käsbohrer, A (2014): **Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs.** Int J Med Microbiol. 304(7), S. 805-816
- Wang, R, van Dorp, L, Shaw, LP, Bradley, P, Wang, Q, Wang, X, Jin, L, Zhang, Q, Liu, Y, Rieux, A, Dorai-Schneiders, T, Weinert, LA, Iqbal, Z, Didelot, X, Wang, H, Balloux, F (2018): **The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-I*.** Nature communications. Volume 9, Issue 1. S. 1179.
- Wilson, H., Török, M.E., (2018). **Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.** Microb. Genomics 4. doi:10.1099/mgen.0.000
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. **Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective.** Mol. Microbiol. 60, 1136–51. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- World health organization (WHO) (2014): **Antimicrobial resistance - Global Report on surveillance 2014.** <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- Yao, Y; Imirzalioglu, C; Hain, T; Kaase, M; Gatermann, S; Exner, M; Mielke, M; Hauri, A; Dragneva, Y; Bill, R; Wendt, C; Wirtz, A; Domann, E; Chakraborty, T (2014): **Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment.** Genome Announc. 2(6) e01157-14.
- Zhi, C., Lv, L., Yu, L. F., Doi, Y., & Liu, J. H. (2016). **Dissemination of the *mcr-I* colistin resistance gene.** *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00063-](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00063-)

10. Veröffentlichungen

Linda Falgenhauer, **Said-Elias Waezsada**, Yancheng Yao, Can Imirzalioglu, Annemarie Käsbohrer, Uwe Rösler, Geovana Brenner Michael, Stefan Schwarz, Guido Werner, Lothar Kreienbrock, Trinad Chakraborty (2016) **Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany.** The Lancet Infectious Diseases

Linda Falgenhauer, **Said-Elias Waezsada**, Konrad Gwozdzinski, Hiren Ghosh, Swapnil Prakash Doijad, Boyke Bunk, Cathrin Spröer, Can Imirzalioglu, Harald Seifert, Alexandra Irrgang, Jennie Fischer, Beatriz Guerra, Annemarie Käsbohrer, Jörg Overmann, Alexander Goesmann, Trinad Chakraborty (2016) **Chromosomal Locations of *mcr-1* and blaCTX-M-15 in Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* ST410.** Emerging Infectious Diseases

Can Imirzalioglu, Linda Falgenhauer, Judith Schmiedel, **Elias Waezsada**, Konrad Gwozdzinski, Nicole Roschanski, Uwe Rösler, Lothar Kreienbrock, Arthur P. Schiffmann, Alexandra Irrgang, Annemarie Käsbohrer, Rolf Bauerfeind, Eugen Domann, Trinad Chakraborty (2017) **Evaluation of a LAMP-based assay for the rapid detection of plasmid-encoded colistin resistance gene *mcr-1* in Enterobacteriaceae isolates.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy

11. Anhang

11.1 Rohdaten Konjugationsversuche

Tabelle 22 Ergebnisse der Konjugation der ESBL-Isolate bei 37°C

Stamm	Versuch	CFU (colony forming units)	Anzahl Transkonjuganten (37 °C)	Konjugationseffizienz
V40	1	1,21x10 ¹⁰	2,95x 10 ⁴	4,84x 10 ⁻⁶
V111	1	2,69x10 ¹⁰	0	0
V130	1	1,69x10 ¹⁰	0	0
V131	1	3,55x10 ¹⁰	0	0
H16	1	1,50x10 ¹⁰	1,45x10 ⁵	2,38x10 ⁻⁵
J53	1	6,10x10 ⁹	0	0
V134	2	9,28x10 ⁹	1,64x10 ⁵	2,03x10 ⁻⁵
V168	2	1,97x10 ¹⁰	1,05x10 ⁵	1,30x10 ⁻⁵
V228	2	7,00x10 ⁹	0	0
H16	2	1,19 x10 ¹⁰	2,66x10 ⁵	3,29x10 ⁻⁵
J53	2	8,08x10 ⁹	0	0
V111	3	2,21x10 ¹⁰	1,95 x10 ⁹	2,44x10 ⁻¹
V163	3	1,60x10 ¹⁰	1,50 x10 ⁸	1,87x10 ⁻²
H16	3	1,75x10 ¹⁰	6,07 x10 ⁵	7,59x10 ⁻⁵
J53	3	8,00x10 ⁹	0	0
V273	4	3,85x10 ⁹	2,68x10 ³	5,14x10 ⁻⁷
V279	4	1,72x10 ¹⁰	1,19x10 ⁸	2,28x10 ⁻²
V283	4	1,62x10 ¹⁰	4,35x10 ⁴	8,37x10 ⁻⁶
H16	4	1,52x10 ¹⁰	1,04x10 ⁵	2,00x10 ⁻⁵
J53	4	5,20x10 ⁹	0	0
TO116	5	1,21x10 ¹⁰	0	0
TO119	5	1,47x10 ¹⁰	2,77x10 ⁴	2,16 x10 ⁻⁶
TO132	5	1,64x10 ¹⁰	0	0
H16	5	1,37x10 ¹⁰	1,45x10 ⁵	3,22 x10 ⁻⁶
J53	5	4,63x10 ⁹	0	0
TO152	6	1,38 x10 ¹⁰	0	0
TO180	6	1,43 x10 ¹⁰	3,60 x10 ⁶	5,18 x 10 ⁻⁵
TO184	6	1,57 x10 ¹⁰	3,52 x10 ⁴	5,06 x 10 ⁻⁷
H16	6	1,39 x10 ¹⁰	1,93 x10 ⁵	2,78 x 10 ⁻⁶
J53	6	6,95 x10 ¹⁰	0	0

Tabelle 23 Ergebnisse der Konjugation der ESBL-Isolate bei RT

Stamm	Versuch	CFU (colony forming units)	Anzahl Transkonjuganten RT	Konjugationseffizienz
V130	1	1,37 x10 ¹⁰	0	0
V131	1	1,26 x10 ¹⁰	0	0
V238	1	4,38 x10 ⁹	0	0
H16	1	1,55 x10 ¹⁰	2,70 x10 ⁵	3,53 x10 ⁻⁵
J53	1	7,65 x10 ¹⁰	0	0
V268	2	1,51x10 ¹⁰	0	0
V271	2	1,67x10 ¹⁰	0	0
TO116	2	1,21x10 ¹⁰	1,75x10 ⁴	1,76x10 ⁻⁶
V163	2	1,21x10 ¹⁰	5,40x10 ⁷	5,43x10 ⁻³
J53	2	9,95x10 ⁹	0	0
TO132	3	2,05x10 ¹⁰	2,17x10 ⁷	1,35 x10 ⁻³
TO152	3	2,17x10 ¹⁰	0	0
V163	3	2,17x10 ¹⁰	1,11x10 ⁸	6,94 x10 ⁻³
J53	3	1,60x10 ¹⁰	0	0

Tabelle 24 Ergebnisse der Konjugation der *mcr-1*-Isolate bei 37°C

Stamm	Versuch	CFU (colony forming units)	Anzahl Transkonjuganten (37 °C)	Konjugationseffizienz
112065	1	1,03x10 ¹⁰	2,00x10 ²	3,11x10 ⁻⁸
NRZ14408	1	7,90x10 ⁹	0	0
R253	1	1,44x10 ¹⁰	2,00x10 ³	3,11x10 ⁻⁷
J53	1	6,43x10 ⁹	0	0
112065	2	1,03x10 ¹⁰	2,00x10 ²	3,11x10 ⁻⁸
NRZ14408	2	7,90x10 ⁹	0	0
R253	2	1,44x10 ¹⁰	2,00x10 ³	3,11x10 ⁻⁷
J53	2	6,43x10 ⁹	0	0
RL465	3	9,90x10 ⁹	0	0
V163	3	1,33x10 ¹⁰	1,20x10 ⁸	1,25x10 ⁻²
J53	3	9,58x10 ⁹	0	0
142669	4	1,37x10 ¹⁰	1,21x10 ⁴	9,58 x10 ⁻⁷
V163	4	1,41x10 ¹⁰	6,05 x10 ⁷	4,78 x10 ⁻³
J53	4	1,27x10 ¹⁰	0	0
RL145	5	1,42x10 ¹⁰	5x10 ⁶	1,20x10 ⁻³
RL158	5	1,43x10 ¹⁰	2,5x10 ⁶	6,02x10 ⁻⁴
V163	5	1,71x10 ¹⁰	5,4x10 ⁷	1,30x10 ⁻²
J53	5	4,15x10 ⁹	0	0

Tabelle 25 Ergebnisse der Konjugation der *mcr-1*-Isolate bei RT

Stamm	Versuch	CFU (colony forming units)	Anzahl Transkonjuganten RT	Konjugationseffizienz
112065	1	1,03x10 ¹⁰	2,16x10 ⁸	3,36 x10 ⁻²
NRZ14408	1	7,90x10 ⁹	1,50 x10 ³	2,33 x10 ⁻⁷
R253	1	1,44x10 ¹⁰	3,11 x10 ⁸	4,84 x10 ⁻²
J53	1	6,43x10 ⁹	0	0
RL465	2	9,90x10 ⁹	0	0
V163	2	1,33x10 ¹⁰	9,50x10 ⁶	9,92x10 ⁻⁴
J53	2	9,58 x10 ⁹	0	0
142669	3	1,37x10 ¹⁰	2,50x10 ²	1,98x10 ⁻⁸
V163	3	1,41x10 ¹⁰	1,88x10 ⁷	1,48x10 ⁻³
J53	3	1,27x10 ¹⁰	0	0

11.2 Abbildungen PFGE ESBL-Isolate

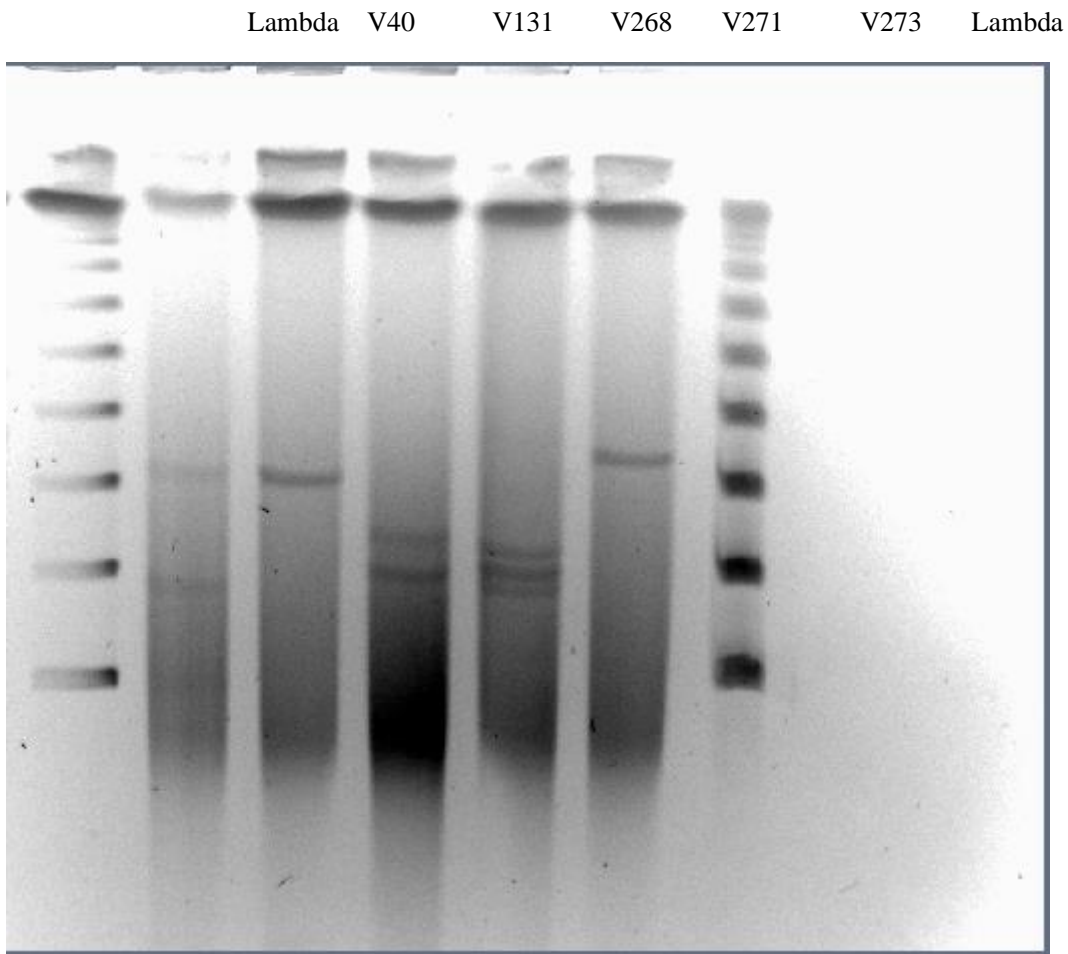


Abbildung 17 Pulsfeldgelelektrophorese mit Salmonellen- und Lambdamarker (Isolate: V40, V131, V268, V271 und V273)

Lambda V168 V228 V229 V238

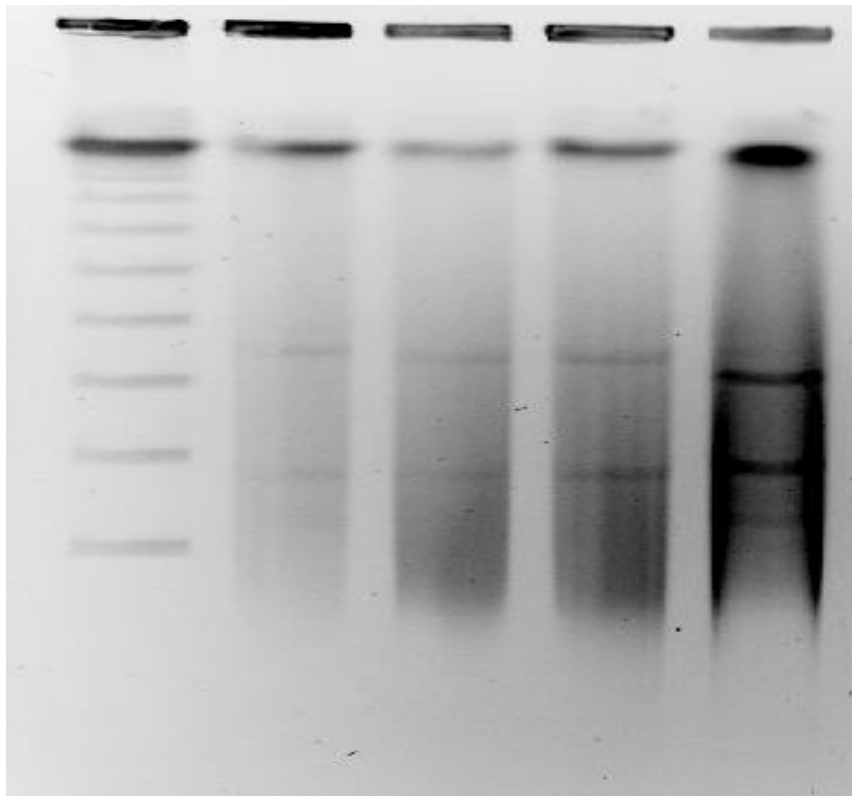


Abbildung 18 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolate: V168, V228, V229 und V238)

Marker H191 V111 V131 V268 V271 V279 Marker

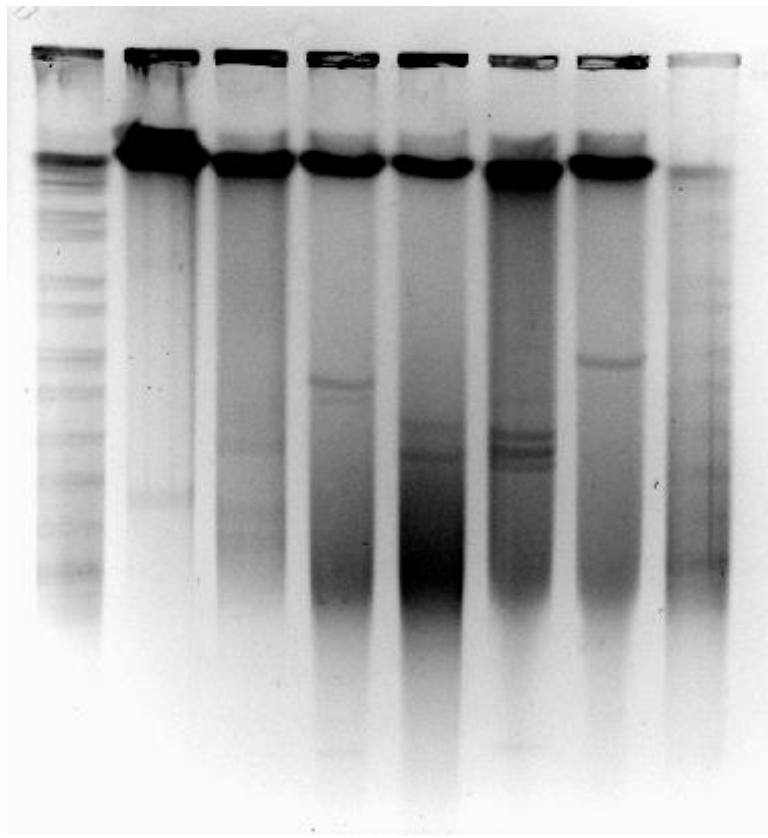


Abbildung 19 Pulsfeldgelelektrophorese mit Salmonellenmarker (Isolate: H191, V111, V131, V268, V271 und V279)

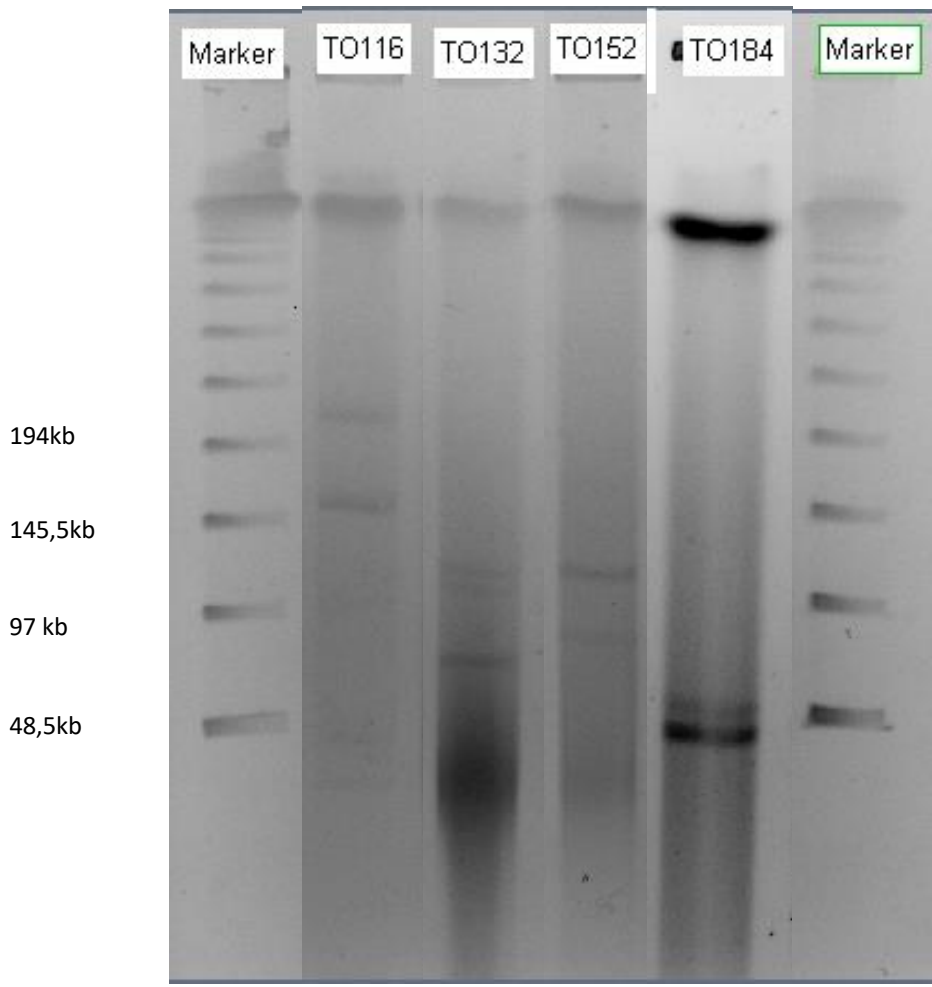


Abbildung 20 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolat: TO116, TO132, TO152, TO184)

11.3 *Galleria mellonella*-Experimente

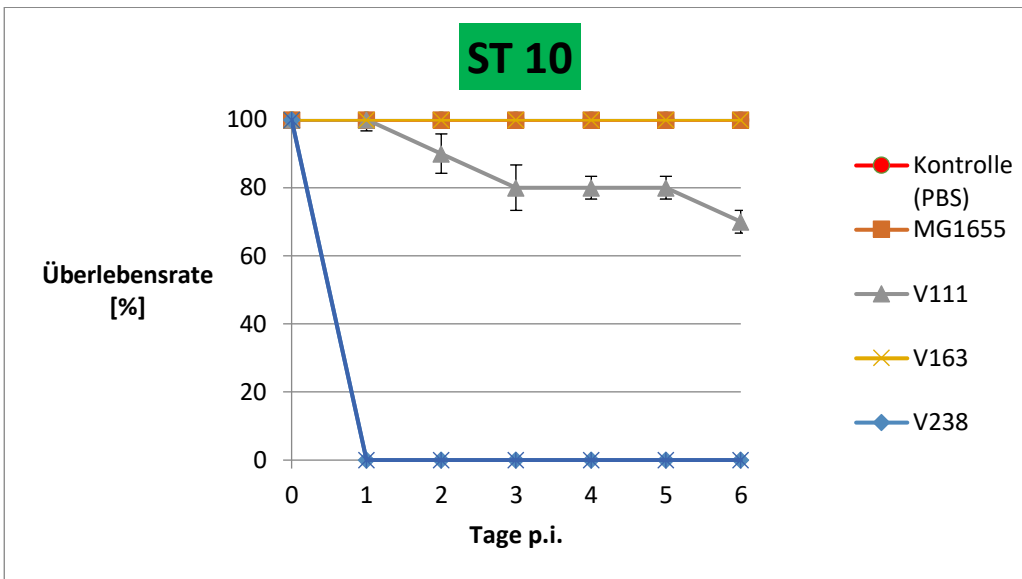


Abbildung 21 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten des MLST-Typs ST10. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V111, V163, V238, V273. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle. Für jedes Isolat wurden 30 Larven mit einer mittleren Infektionsdosis von 7×10^6 KbE infiziert und die Zahl der lebenden Larven nach jeweils 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen dokumentiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert +/- SEM. p.i.: post injectionem

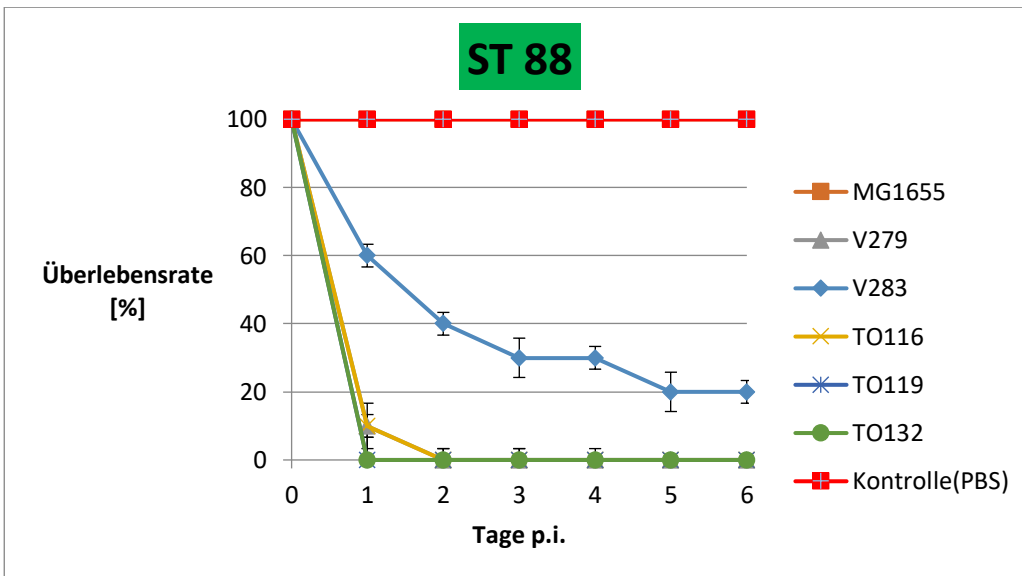


Abbildung 22 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten des MLST-Typs ST88. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V279, V283 und Human-Isolate TO116, TO119, TO132. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.

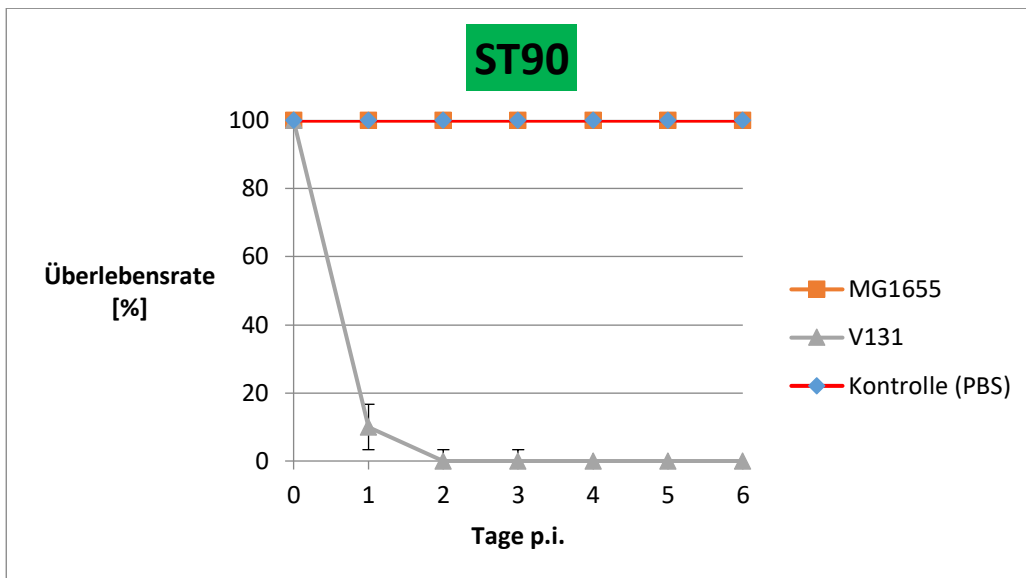


Abbildung 23 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten des MLST-Typs ST90. Dargestellt sind die Ergebnisse des Tierisolates V131. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.

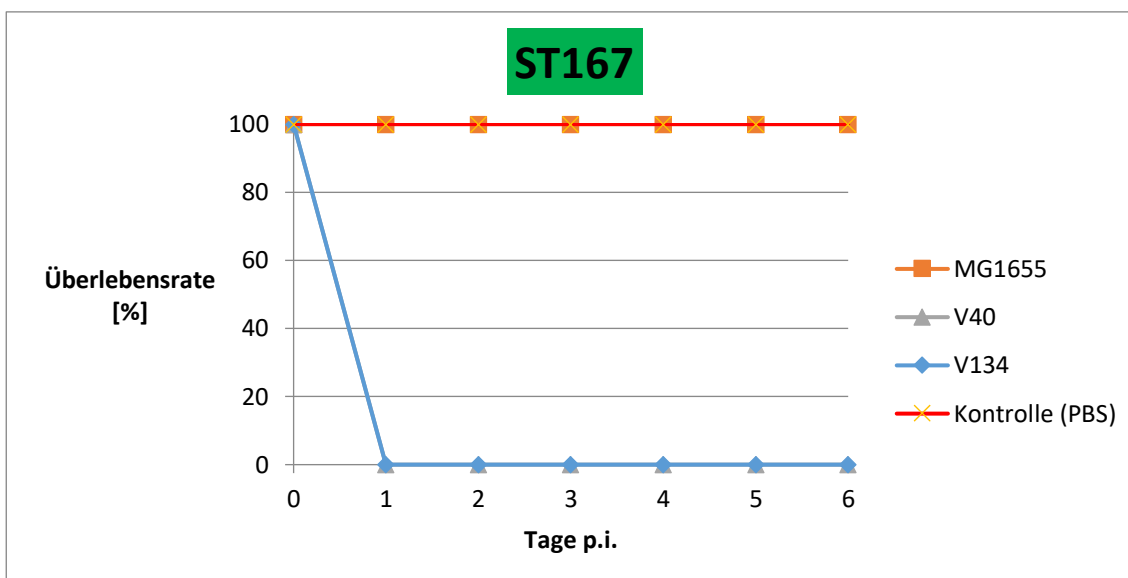


Abbildung 24 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten des MLST-Typs ST167. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V40, V134. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm

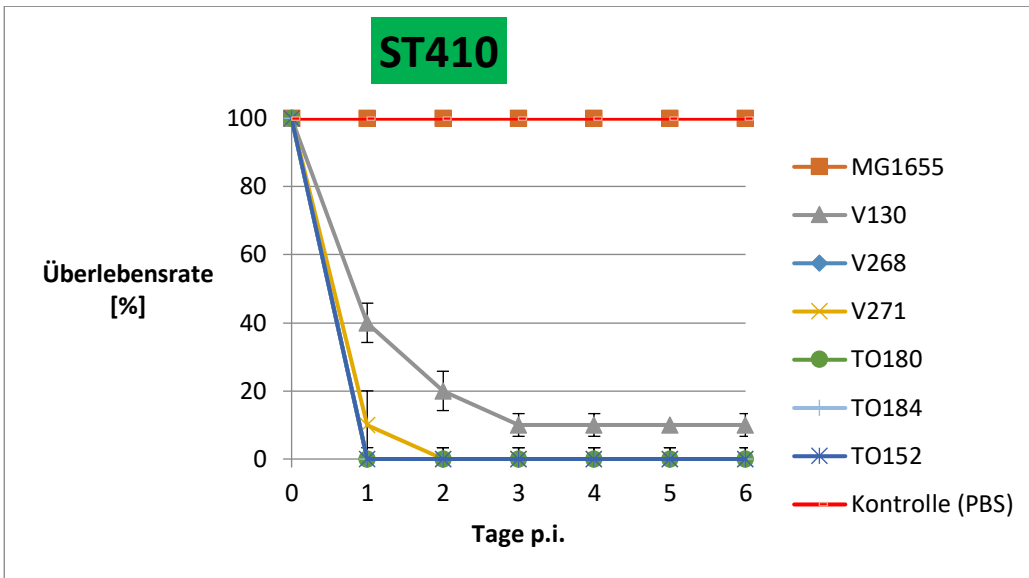


Abbildung 25 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten des MLST-Typs ST410. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V130, V268, V271 und der Humanisolate TO152, TO180, TO184. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.

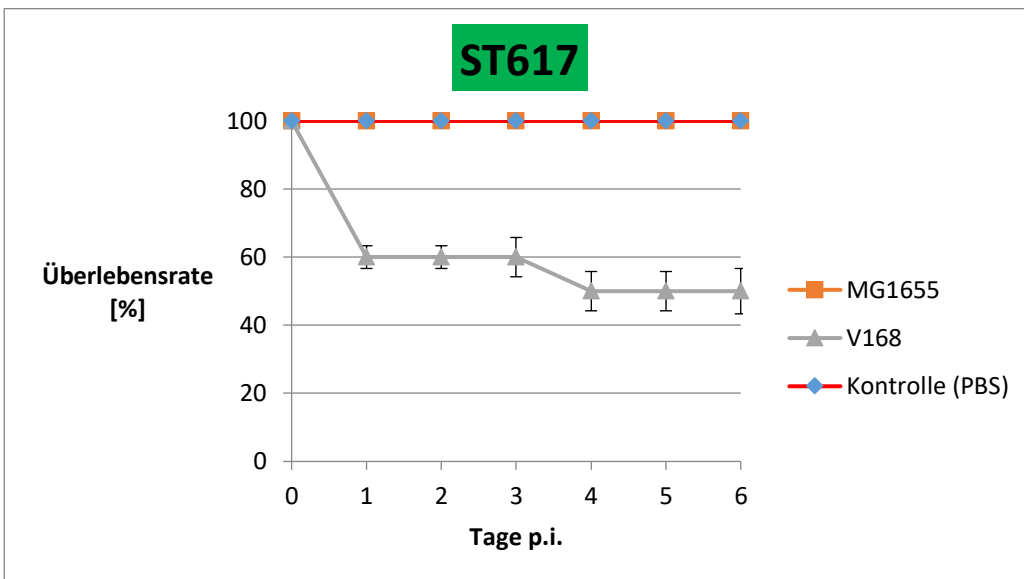


Abbildung 26 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten des MLST-Typs ST617. Dargestellt sind die Ergebnisse des Tierisolates V168. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.

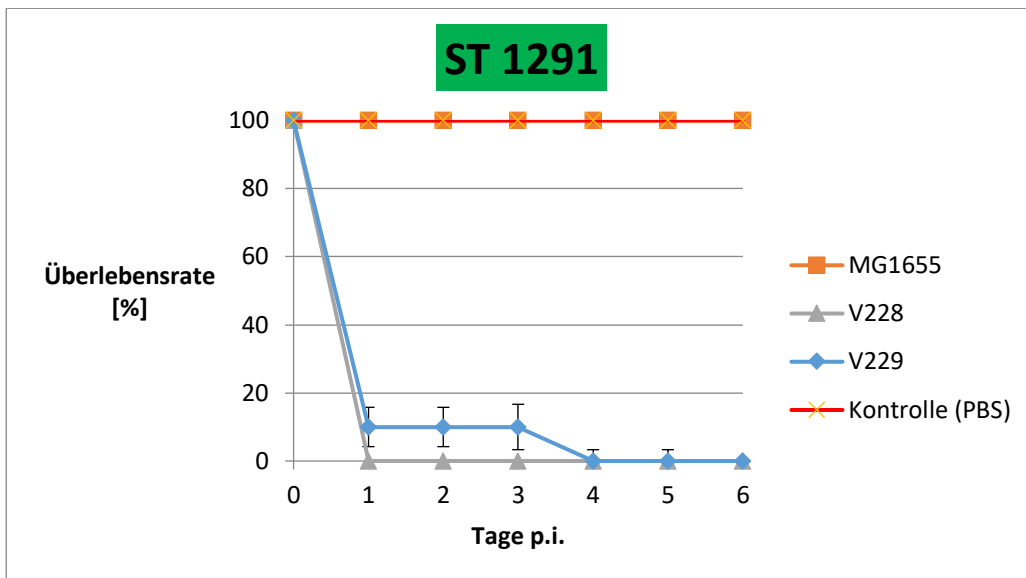


Abbildung 27 Überlebensrate von *Galleria mellonella*-Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden *E. coli*-Isolaten des MLST-Typs ST1291. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V228 und V229. *E. coli* MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.

11.4 Abbildungen PFGE *mcr-I*-Isolate

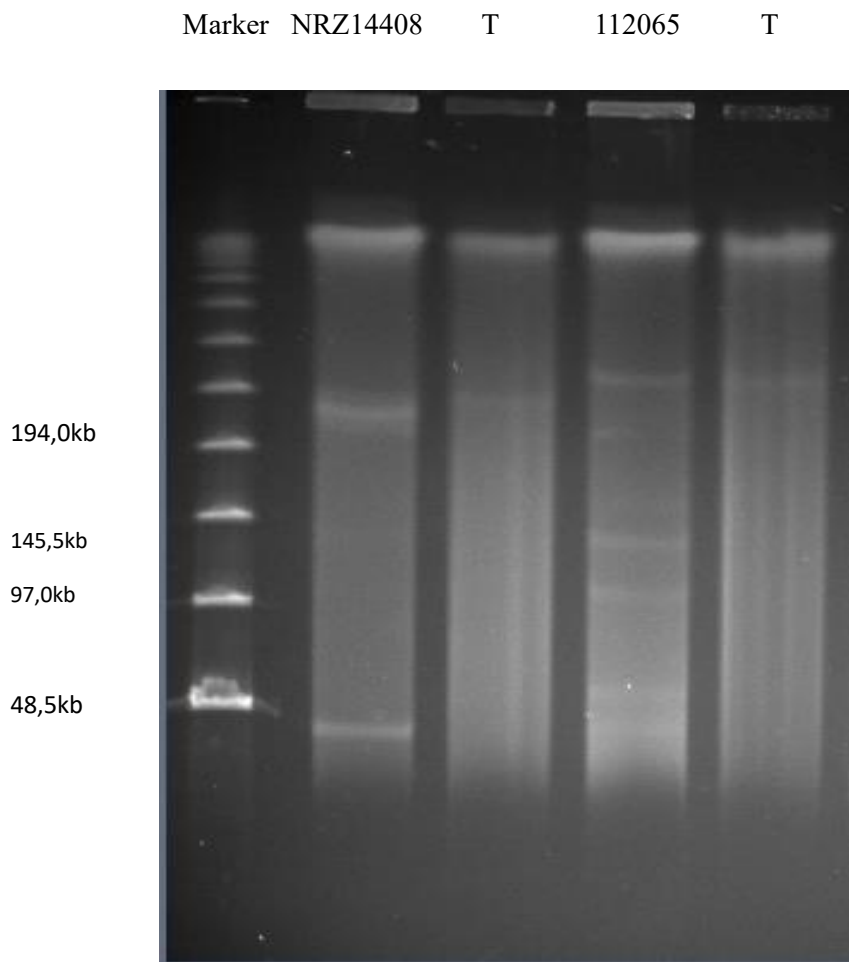


Abbildung 28 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolate: NRZ14408, Transkonjugant, 112065, Transkonjugant)

Marker V163 T R253 T RL145 T RL158 T Marker

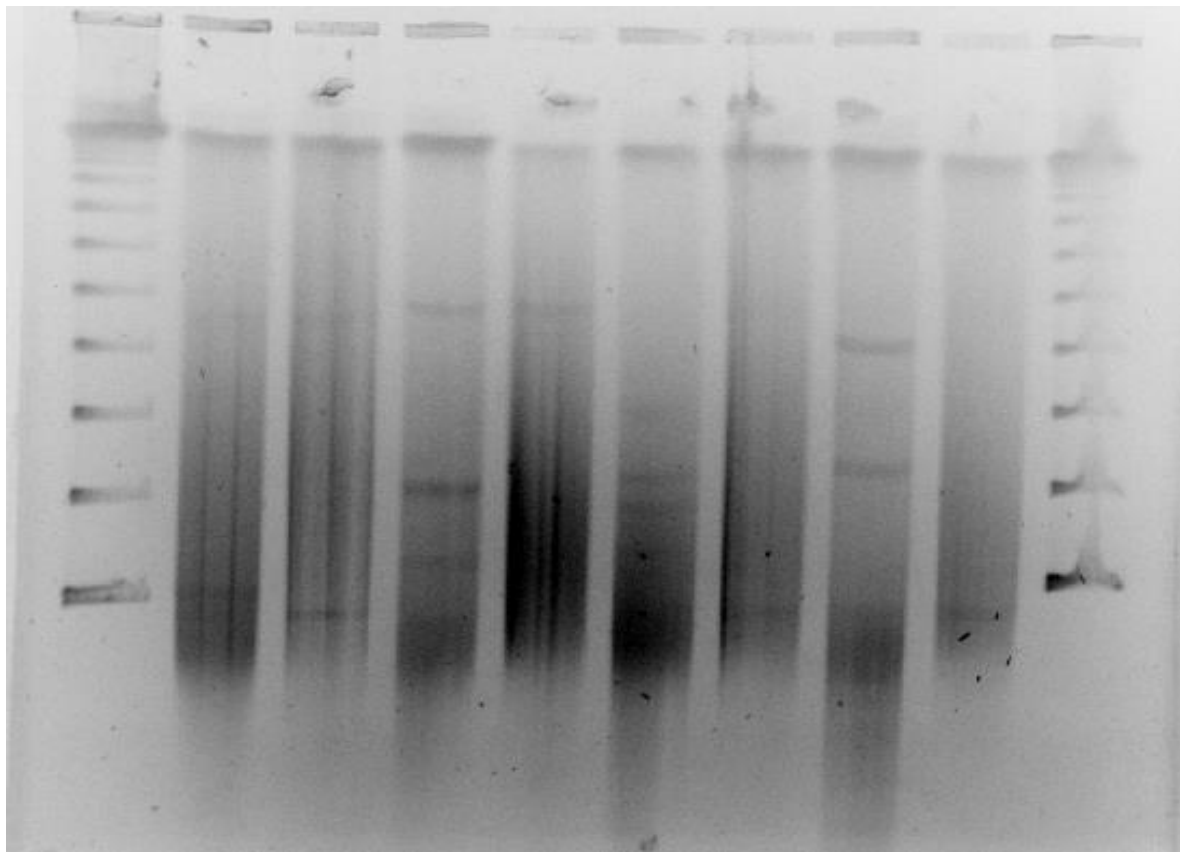


Abbildung 29 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker(Isolate: V163, Transkonjugant, R253, Transkonjugant, RL145, Transkonjugant, RL158 und Transkonjugant)

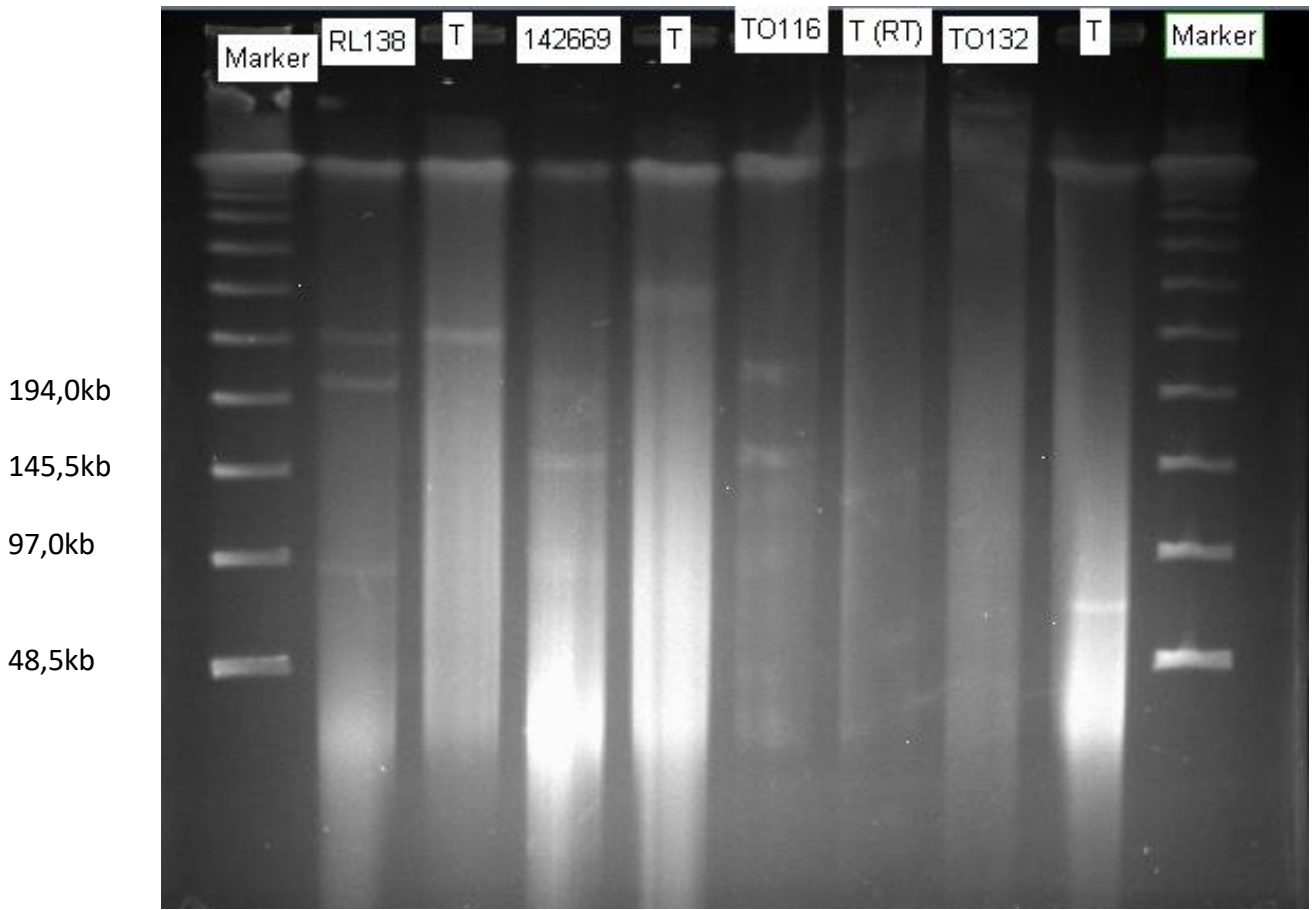


Abbildung 30 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolate: RL138, Transkonjugant, 142669, Transkonjugant, TO116, Transkonjugant, TO132, Transkonjugant)

12. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Wirkmechanismen der jeweiligen Antibiotikaklassen (Fritsche, 2016)	8
Abbildung 2 Aufbau therapeutisch eingesetzter β -Laktam-Verbindungen (Forth und Aktories, 2005)	8
Abbildung 3 Beispiel eines Plasmids (<i>pUC19</i>): ori (Replikationsursprung), <i>amp</i> (Ampicillinresistenz), <i>lacZα</i> (Betagalaktosidasegen) (Wikipedia <i>pUC19</i> -Plasmid)	13
Abbildung 4 Mechanismen für horizontalen Gentransfer: A) Transformation B) Konjugation C) Transduktion (https://www.helmholtzmuenchen.de/fileadmin/HZM/pdf/publikationen/mensch_und_umwelt_spezi_al/Heft17/59_64_Hartmann.pdf)	13
Abbildung 5 Übersicht über die angeborene Immunantwort von Säugetieren und Insekten auf pathogene und symbiotische Bakterien (Frick et al., 2018)	18
Abbildung 6 Hypothese zu den Hauptübertragungswegen von Antibiotikaresistenzgenen zwischen Menschen, Tieren, Lebensmitteln und der Umwelt nach dem One-Health-Konzept (http://www.bukopharma-online-lernbox.de/Antibiotika-Resistenzen/a2-one-world-one-health-csc-17.html)	20
Abbildung 7 Infektionsversuch mit <i>Galleria mellonella</i> . A) Injektionsapparat, B) Vergleich zwischen toter (schwarz) und lebender Larve (hell), C) und D) Injektion am letzten bzw. vorletzten Ring (Ramarao et al., 2012)	36
Abbildung 8 Absolute Häufigkeit der STs von Tierisolaten	40
Abbildung 9 Absolute Häufigkeit der STs von Humanisolaten	41
Abbildung 10 Verteilung von Resistenzgenen innerhalb der Bakterienisolate. Legende: weiß: Gen nicht vorhanden, schwarz: Gen vorhanden, V= Veterinärisolat, H= Humanisolat	43
Abbildung 11 Virulenzgene der Human- und Tierisolate	44
Abbildung 12 Pulsfeldgelelektrophorese mit Salmonellen- und Lambdamarker (Isolate: V40, V131, V268, V271 und V273)	46
Abbildung 13 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V111, V163, V238, V273. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.	49
Abbildung 14: Stammbaum der in dieser Arbeit untersuchten Isolate mit Referenzisolaten.	54
Abbildung 15 Regulationswege in <i>Gram-negativen</i> Bakterien zur Modifikation von Lipopolysacchariden	63
Abbildung 16 Pulsfeldgelelektrophorese mit Salmonellen- und Lambdamarker (Isolate: V40, V131, V268, V271 und V273)	75
Abbildung 17 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolate: V168, V228, V229 und V238)	76
Abbildung 18 Pulsfeldgelelektrophorese mit Salmonellenmarker (Isolate: H191, V111, V131, V268, V271 und V279)	77
Abbildung 19 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolat: TO116, TO132, TO152, TO184)	78
Abbildung 20 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V111, V163, V238, V273. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle. Für jedes Isolat wurden 30 Larven mit einer mittleren Infektionsdosis von 7×10^6 KbE infiziert und die Zahl der lebenden Larven nach jeweils 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen dokumentiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. p.i.: post injectionem	79
Abbildung 21 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit ESBL-produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V279, V283 und Human-Isolate TO116, TO119, TO132. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter	

Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.	79
Abbildung 22 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit <i>ESBL</i> -produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse des Tierisolates V131. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.....	80
Abbildung 23 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit <i>ESBL</i> -produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V40, V134. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.....	80
Abbildung 24 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit <i>ESBL</i> -produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V130, V268, V271 und der Humanisolate TO152, TO180, TO184. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.	81
Abbildung 25 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit <i>ESBL</i> -produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse des Tierisolates V168. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.....	81
Abbildung 26 Überlebensrate von <i>Galleria mellonella</i> -Larven gemessen über 6 Tage nach Infektion mit <i>ESBL</i> -produzierenden <i>E. coli</i> -Isolaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tierisolate V228 und V229. <i>E. coli</i> MG1655 diente als avirulenter Kontrollstamm und 1x PBS-Puffer als Negativkontrolle.....	82
Abbildung 27 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolate: NRZ14408, Transkonjugant, 112065, Transkonjugant).....	83
Abbildung 28 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker(Isolate: V163, Transkonjugant, R253, Transkonjugant, RL145, Transkonjugant, RL158 und Transkonjugant)	84
Abbildung 29 Pulsfeldgelelektrophorese mit Lambdamarker (Isolate: RL138, Transkonjugant, 142669, Transkonjugant, TO116, Transkonjugant, TO132, Transkonjugant)	85

13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klassifikation der bakteriellen <i>Beta-Laktamasen</i> nach Bush und Ambler (Bush & Jacoby, 2010)	16
Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	22
Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Antibiotikakarten und –teststreifen	22
Tabelle 4 Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	22
Tabelle 5 Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	23
Tabelle 6 Herkunft der verwendeten DNA-Marker.....	24
Tabelle 7 Herkunft und Verwendungszweck der verwendeten Enzyme	24
Tabelle 8 Kits.....	24
Tabelle 9 Übersicht über <i>mcr-I</i> -positive Bakterienisolate	28
Tabelle 10 Reaktionsansatz für die PCR	31
Tabelle 11: Ablauf der PCR.....	31
Tabelle 12 Plasmidprofil der Human- und Tierisolate (V: Veterinärisolat, H: Humanisolat)	47
Tabelle 13: Konjugationseffizienz der verwendeten Isolate bei 37°C	48
Tabelle 14 Herkunft, kodierter <i>ESBL</i> -Subtyp, eingesetzte Infektionsdosis im <i>Galleria mellonella</i> -Modell und der daraus resultierende larvizide Effekt der Human- und Tierisolat.....	
Tabelle 15 Einfluss bestimmter Variablen auf die Larvizidität (Hazard-Ratio)	52
Tabelle 16 Darstellung der SNP-Zahlen im Vergleich zu <i>E. coli</i> MG1655.....	55
Tabelle 17 Plasmidprofil, MHK und Interpretation der MHK der <i>mcr-I</i> -kodierenden Isolate.....	57
Tabelle 18 Konjugationseffizienz der <i>mcr-I</i> -kodierenden Isolate.....	58
Tabelle 19 Colistin-MHK-Bestimmung mittels Makrodilution, E-Test und VITEK und Plasmidprofil der Transkonjuganten.	59
Tabelle 20 Ergebnisse der Konjugation der <i>ESBL</i> -Isolate bei 37°C	73
Tabelle 21 Ergebnisse der Konjugation der <i>ESBL</i> -Isolate bei RT.....	73
Tabelle 22 Ergebnisse der Konjugation der <i>mcr-I</i> -Isolate bei 37°C	74
Tabelle 23 Ergebnisse der Konjugation der <i>mcr-I</i> -Isolate bei RT	74

14 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Für die Bereitstellung dieser Doktorarbeit bedanke ich mich bei Herrn Professor Chakraborty und Frau Dr. Falgenhauer. Darüber hinaus danke ich diesen beiden Personen für die zahlreichen, kritischen Diskussionen und die Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Dissertation.

Bei Konrad Gwozdziński bedanke ich mich für die kompetente Einarbeitung im Labor. Zudem war er immer hilfsbereit, wenn Unklarheiten bei einigen Laborexperimenten aufkamen. Seine Unterstützung kam mir sehr zugute.

Frau Christina Gerstmann danke ich für die Durchführung der Ganzgenomsequenzierung (NGS) und für die Ratschläge bei der Durchführung der PFGE. Außerdem möchte ich mich bei ihr für die tolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Einarbeitung in molekulargenetische Arbeiten bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank für Alexandra Amend, die mir im Labor viele hilfreiche Tipps gegeben und mir immer beigestanden hat.

Frau Anita Windhorst danke ich für die sehr gute Bearbeitung der Statistik für das *Galleria mellonella*-Experiment und für die Durchführung der Cox-Regressionsanalyse.

Mein besonderer Dank geht auch an alle Mitdoktoranden sowie Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Mikrobiologie. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit überhaupt nicht zustande gekommen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir während des Medizinstudiums und auch während der Doktorarbeit unterstützend zur Seite standen. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Geschwistern Sara und Mahdi bedanken, die mich immer wieder motiviert haben.

Dem RESET-Verbund und dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) gebührt für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit großer Dank.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.