

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse von „Extended-Spectrum“-Beta-Laktamasen und
Klebsiella pneumoniae Carbapenemasen mittels Capture Compound
Mass SpectrometryTM

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gayane Hovhannisyan

aus Aschtarak (Armenien)

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ABSTRAKT (DEUTSCH)	4
ABSTRACT (ENGLISCH).....	5
1. EINLEITUNG.....	7
1.1 β -LAKTAM-ANTIBIOTIKA.....	7
1.2 PENICILLINE	7
1.3 CEPHALOSPORINE.....	8
1.5 MONOBACTAME	10
1.6 INHIBITOREN	10
1.7 WIRKUNGSMECHANISMUS DER β -LAKTAM-ANTIBIOTIKA	13
1.8 ANTIBIOTIKARESISTENZ.....	14
1.9 EVOLUTION DER β -LAKTAMASEN	16
1.10 β -LAKTAMASEN: EINTEILUNG DER β -LAKTAMASEN	17
1.10.1 Die molekulare Klassifikation nach Ambler	18
1.10.2 Die funktionelle Einteilung nach Bush, Jacoby und Medieros	20
1.11 EPIDEMIOLOGIE DER ESBL-BILDNER	23
1.12 KLINISCHE BEDEUTUNG DER ESBL-BILDNER	24
1.13 EPIDEMIOLOGIE DER KPC-BILDNER	25
1.14 KLINISCHE BEDEUTUNG DER KPC-BILDNER	26
1.15 AKTUELLE METHODEN ZUM NACHWEIS VON ESBL UND KPC	26
1.15.1 Phänotypische Methoden.....	27
1.15.1.1 Screening	27
1.15.1.2 Bestätigungstests	28
1.15.1.2.1 ESBL-Bestätigungstests	29
1.15.1.2.1.1 Double-disc synergy Test (DDS)	29
1.15.1.2.1.2 Combined-disc Methode	30
1.15.1.2.1.3 E-Test	30
1.15.1.2.1.4 Automatisierte Methoden – Vitek [®] 2-, Phoenix [®] - und MicroScan [®] WalkAway-96-System	31
1.15.1.2.1.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Massenspektrometrie für ESBL... ..	32
1.15.1.2.1.6 ESBL NDP Test.....	33
1.15.1.2.2 KPC-Bestätigungstests.....	33
1.15.1.2.2.1 Modified-Hodge-Test	33
1.15.1.2.2.2 Combined-disc Methode	34
1.15.1.2.2.3 MALDI-TOF MS für KPC	35
1.15.2 Genotypische Methoden	35
1.16 CAPTURE COMPOUND MASS SPECTROMETRY (CCMS).....	37
2. FRAGESTELLUNG	40
3. MATERIAL UND METHODEN.....	41
3.1 MATERIAL.....	41
3.1.1 Bakterienstämme	41
3.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	41
3.1.3 Puffer und selbst gegossene Medien	43
3.1.4 Kommerzielle Kits	44
3.1.5 Primersequenzen	45
3.1.6 Protein- und DNA-Längenmarker, Enzyme	45
3.1.7 Antikörper.....	46
3.1.8 Nährmedien und Seren	46
3.1.9 Geräte und Plastikwaren.....	46
3.1.10 Sonstiges	48
3.2 METHODEN	49
3.2.1 Keimidentifikation und Bestimmung des Resistenzphänotyps mit Vitek [®] 2 und Mikrobouillondilution	49

Inhaltverzeichnis

3.2.1.1 Keimidentifikation und Resistenztestung mit Vitek [®] 2	49
3.2.1.1.1 Das Testprinzip der Keimidentifikation mit Vitek [®] 2	50
3.2.1.1.2 Das Testprinzip der Resistenzbestimmung mit Vitek [®] 2	50
3.2.1.1.3 Die Durchführung der Methode	51
3.2.1.2 Mikrobouillondilution	54
3.2.2 Plasmidpräparation	54
3.2.3 PCR-Amplifikation	55
3.2.4 Aufreinigung der PCR-Produkte	56
3.2.5 Gesamtgenom Sequenzierung	57
3.2.6 Herstellung bakterieller Zelllysate	57
3.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration	57
3.2.8 Photometrische Assays zur Bestimmung der β -Laktamase-Aktivität	58
3.2.8.1. ESB NDP Test	58
3.2.8.2 Nitrocefin-Assay	59
3.2.8.2.1 Die Analyse des hydrolysierten Meropenems im Nitrocefin-Assay	60
3.2.8.2.2 Die Analyse verschiedener β -Laktamase-Inhibitoren bei unterschiedlichen Bedingungen (pH, Temperatur, Zeit) mittels Nitrocefin-Assay	60
3.2.9 Capture Experimente und nachfolgende biochemische Analyse	61
3.2.9.1 Das Off-Bead-Capture-Experiment	61
3.2.9.2 Protein Analytik: Massenspektrometrie. SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot	62
3.2.9.2.1 Massenspektrometrie	62
3.2.9.2.2 SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot	63
3.2.9.3 Das On-Bead-Capture-Experiment	64
3.2.9.4 Das Pulldown-Experiment	65
3.2.9.5 Das Off-Bead-Capture-Experiment mit einer hoher Mero-CC-Konzentration (763 μ M)	65
3.2.9.6 Chemische Struktur und die Synthese von Mero-CC	66
4. ERGEBNISSE	68
4.1 DIE BAKTERIENSTÄMME	68
4.2 NACHWEIS VON <i>bla</i> -GENEN MITTELS PCR	68
4.3 AUSWAHL EINES STAMMES MIT EINER HOHEN β -LAKTAMASE-AKTIVITÄT	71
4.4 DER KONTROLLSTAMM <i>E. COLI 11</i>	72
4.4.1 Bestimmung des Resistenzphänotyps des <i>E. coli 11</i> -Stammes	72
4.4.2 Charakterisierung von <i>bla</i> -Gene des <i>E. coli 11</i> -Stammes	73
4.5 ANALYSE DER BINDUNGS-AFFINITÄT DES MERO-CC CAPTURE COMPOUNDS IM ESBL NDP TEST	73
4.6 ETABLIERUNG EINES QUANTITATIVEN PHOTOMETRISCHEN ASSAYS ZUR DETEKTION DER β -LAKTAMASE-ENZYM-AKTIVITÄT	75
4.6.1 Die Bestimmung der Substrat-Eigenschaften von Nitrocefin und der Inhibitor-Eigenschaften von Meropenem	75
4.6.2 Analyse des Mero-CC Capture Compounds im Nitrocefin-Assay	77
4.6.3 Analyse der Bindungsaffinität von hydrolysiertem Meropenem an β -Laktamasen	79
4.6.4 Analyse verschiedener β -Laktame unter verschiedenen Bedingungen mittels Nitrocefin-Assay	80
4.7 CAPTURE-EXPERIMENTE MIT DEM MERO-CC CAPTURE COMPOUND	86
4.8 GESAMTGENOMSEQUENZIERUNG	92
4.8.1 KPC-bildender <i>K. pneumoniae 3</i>	92
4.8.2 Die Ergebnisse der Gesamtgenomsequenzierung	93
5. DISKUSSION	94
5.1 DIE MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE DER ESBL-BILDNER	94
5.2 CAPTURE EXPERIMENTE: AFFINITÄTSANALYSEN VON MERO-CC ZU β -LAKTAMASEN	97
LITERATURVERZEICHNIS	103
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	113
LEBENS-LAUF	115
DANKSAGUNG	116

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ACA	eng: 7-aminocephalosporanic acid/Aminocephalosporansäure
6-APA	eng: 6-aminopenicillanic acid/6-Aminopenicillansäure
APBA	engl: aminophenylboronic acid/Aminophenylborsäure
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARS	Antibiotika-Resistenz Surveillance
AST	Antimicrobials Susptibility Testing
ATCC	engl: American Type Culture Collection
bla	β-Laktamase-Gen
bzw.	beziehungsweise
β	Beta
°C	Grad Celsius
CC	Capture Compound
CCMS	engl: capture compound mass spectrometry
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPC	Cephalosporin C
D-Ala-D-Ala	engl: D-alanyl-D-alanine
D-Ala-D-Lactat	engl: D-alanyl-D-lactate
DDS Test	engl: double disc synergy Test
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl: deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EARS-Net	engl: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESBL	engl: extended-spectrum-beta-lactamases
EUCAST	engl: European Committee on the Antimicrobial Susceptibility Testing
g	Gramm
x g	Zentrifugalkraft (Vielfaches der Erdbeschleunigung/Erdbeschleunigungskraft)

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HRP	Horseradish Peroxidase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ID-GN	Identifizierungskarte für gramnegative Bakterien
kDa	Kilodalton
KoAc	Kaliumacetat
l	Liter
LC-MS	engl: liquid chromatography - mass spectrometry
M	Molar (mol/l)
MALDI	engl: matrix-assisted laser desorption/ionization
MBL	Metallo-β-Laktamasen
MDR	engl: multiple drug resistance
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MHK	minimale Hemmkonzentration
MHT	engl: Modified-Hodge-Test
min	Minuten
MRSA	Meticillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	engl: molecular weight
μ	Mikro
n	Nano
NGS	engl: next generation sequencing
NMA	N-Acetylmuraminsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBA	engl: phenylboronic acid/Phenylborsäure
PBP	Penicillin-bindende-Proteine
PBS	engl: Phosphate-Buffered-Saline

Abkürzungsverzeichnis

PCR	polymerase chain reaction
rcf	engl: relative centrifugal force
RIPA-Puffer	engl: radioimmunoprecipitation assay buffer
s	Sekunden
SDS	engl: Sodiumdodecylsulfat
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	engl: Tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween 20
TCA	Engl: trichloroacetic acid
TOF	engl: time of flight
UV	ultraviolett
V	Volt

Abstrakt

Abstrakt (Deutsch)

Die wissenschaftliche Forschung zum Thema Antibiotikaresistenz bei Bakterien ist von fundamentaler praktischer Bedeutung in der modernen Medizin. β -Laktam-Antibiotika sind die am häufigsten eingesetzten Antibiotika für die kausale Therapie bakterieller Infektionen. Der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber β -Laktam-Antibiotika ist die bakterielle Synthese von β -Laktamasen, die durch die Spaltung des Laktam-Rings die antibakterielle Aktivität des Antibiotikums zerstören. Unter den β -Laktamasen mit Aktivität gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation kommen die β -Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL – extended-spectrum beta-lactamases) bei medizinisch relevanten Erregern am häufigsten vor. Für die Therapie von Infektionen mit ESBL-Bildnern werden oft Carbapenem-Antibiotika eingesetzt, was wiederum zur Entstehung und Verbreitung der Resistenz gegenüber diesen Antibiotika beiträgt. Für die erfolgreiche Therapie bakterieller Infektionen wie auch für die Verhinderung der Übertragung resistenter Klone in medizinischen Einrichtungen und im Nutztierbestand sowie für epidemiologische Studien ist eine schnelle Resistenzanalyse von entscheidender Bedeutung. In vorliegender Arbeit wurde deshalb eine innovative Technologie – Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS) – zur Anreicherung und Charakterisierung von β -Laktamasen erprobt, mit der Perspektive, auf dieser Basis einen schnellen Nachweis dieser Enzyme direkt aus klinischem Material zu entwickeln.

Capture Compound Mass Spectrometry ist eine Technologie zur funktionellen Isolierung zellulärer Makromoleküle (vornehmlich Proteine) aus komplexen Molekülmischungen (z.B. Zellextrakte) aufgrund ihrer Affinität zu spezifischen Fänger-Kleinmolekülen – Capture Compounds. Ein Capture Compound ist ein trifunktionelles Konstrukt bestehend aus i) Selektivitätsfunktion (z.B. Substrat (analogon), Inhibitor, Medikament oder Wirkstoff) zur reversiblen Bindung an das/die Zielprotein(e), ii) Photo-Reaktivitätsfunktion (z.B. aromatische Azide oder Diazirine) zur kovalenten Bindung des/der Zielprotein(e) und iii) Sortierfunktion (z.B. Biotin) zur Isolierung der Capture Compound – Protein – Konjugate mittels einer festen Phase. Die so isolierten Proteine können anschließend massenspektrometrisch charakterisiert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde in der Fa. caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, ein Capture Compound für die Isolierung und Charakterisierung von β -Laktamasen, insbesondere für ESBLs und *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasen (KPC-Enzyme) konstruiert und

Abstrakt

synthetisiert. Als Selektivitätsfunktion innerhalb des Capture Compounds diene wegen seiner hohen Affinität zu β -Laktamasen das Carbapenem-Antibiotikum Meropenem. Dabei lag Meropenem in dem Konstrukt als C3-Carboxyl-Derivat vor. Es konnte gezeigt werden, dass das Capture Compound im Vergleich zu freiem Meropenem eine um Größenordnungen schlechtere Affinität für β -Laktamasen hatte (ca. 1/500). Deshalb war das vorliegende Capture Compound für die Anreicherung von ESBLs und KPC-Enzyme nicht geeignet. Auf der Basis unserer Ergebnisse werden Vorschläge für die Synthese alternativer Capture Compounds dargestellt.

Abstract (Englisch)

Scientific research on the problem of bacterial resistance to antibiotics is of both fundamental and practical significance in the modern medicine. β -lactam antibiotics are the most commonly used antibiotics against bacterial infections. The most common mechanism of resistance to β -lactam antibiotics is the bacterial synthesis of β -lactamases, which cleave the β -lactam ring and, thus, inactivate the antibacterial activity of the drug. β -lactamases with the ability to inactivate the 3rd generation cephalosprins, the so called extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), are most common among clinically relevant bacteria. To treat infections caused by ESBL-producing bacteria, carbapenem antibiotics are used, which in turn results in resistance against this class of antibiotics. For the successful therapy of bacterial infections, for epidemiological studies and for the prevention of spreading ESBL producing bacteria both in health care facilities and livestock farming, a quick and reliable resistance analysis is necessary. Therefore, in this work, a new method - Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS) – is tested to enrich and characterize β -lactamases to enable a quick detection of these enzymes directly from clinical samples.

Capture Compound Mass Spectrometry is a novel technology for functional isolation of cellular macromolecules (mainly proteins) from complex molecular mixture (e.g. cell extracts) based on their affinity to specific small capture molecules – Capture Compounds. A Capture Compound is a tri-functional small molecule consisting of i) selectivity function (substrate (analog), inhibitor, drug, active agent) reversibly binding the target protein(s); ii) photo-reactivity function (e.g. aromatic azide, diazirine) irreversibly forming a covalent bond with the target protein(s); and iii) a sorting/pull-out function (e.g. biotin) allowing to enrich

Abstrakt

the Capture Compound – protein – conjugates using a solid phase. Enriched proteins may then be analysed by mass spectrometry.

In this study, a Capture Compound synthesized by caprotec bioanalytics, GmbH, Berlin, was tested for enrichment of β -lactamases, especially ESBLs and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC enzymes). Due to its high affinity to β -lactamases, the carbapenem antibiotic meropenem was employed as selectivity function within the Capture Compound. Therefore, Meropenem was derivatized at the C3-carboxylic acid moiety. This study showed that the Capture Compound exhibits a significantly reduced affinity for β -lactamases (approx. 1/500) in comparison with free meropenem. Therefore, the present Capture Compound was not suitable for the enrichment of β -lactamases. Based on the results of this study, syntheses of alternative Capture Compounds are suggested.

Einleitung

1. Einleitung

1.1 β -Laktam-Antibiotika

Im Jahre 1929 machte Alexander Fleming in seinem Labor eine revolutionäre Beobachtung: Die Kultur von Schimmelpilz aus der Gattung *Penicillium* hatte ein Substrat produziert, das das Wachstum von *Staphylococcus aureus* inhibieren konnte. Diese Substanz wurde von Fleming als Penicillin bezeichnet (95). Neue phylogenetischen Analysen identifizierten diesen Stamm als *Penicillium rubens* (65). Für die medizinische Anwendung stand Penicillin erst ab 1941 zur Verfügung und konnte bei Patienten mit Infektionskrankheiten, verursacht durch Streptokokken und Gonokokken, erfolgreich eingesetzt werden (95). Später, im Jahre 1950, ermöglichte die Entdeckung der 6-Aminopenicillansäure (isoliert aus der Fermentationskultur von *Penicillium chrysogenum*) die Entwicklung semisynthetischer Penicilline (33). Der Zeitraum zwischen den 1940er bis den 1960er Jahren gilt als goldene Ära für die Entwicklung neuer Antibiotika (88). Heutzutage repräsentieren die β -Laktam-Antibiotika zusammen mit den Makroliden und Fluorchinolonen die drei großen Antibiotikagruppen (143). Allein β -Laktam-Antibiotika machen etwa 65 % des gesamten Antibiotikamarktes aus (129). Alle β -Laktam-Antibiotika besitzen den namengebenden viergliedrigen Laktam-Ring (44). β -Laktam-Antibiotika bilden die Basis bei der Therapie vieler nosokomialer und ambulant-erworbener Infektionskrankheiten (80). Sie wirken bakterizid durch die Hemmung der Zellwandsynthese bei der Zellteilung. Die Zielmoleküle für β -Laktam-Antibiotika sind die D,D-Transpeptidasen, mit denen sie einen stabilen Acyl-Enzym Komplex bilden (64). Derzeit gehören β -Laktam-Antibiotika aufgrund ihrer guten Wirksamkeit, ihres niedrigen Preises und der geringen Nebenwirkungen zu den am meisten verwendeten Antibiotika (139). Zur Gruppe der β -Laktam-Antibiotika zählen Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme.

1.2 Penicilline

Die Grundstruktur der Penicilline, die 6-Aminopenicillansäure (6-APA), besteht aus dem β -Laktam-Ring, der mit einem Thiazolidinring verbunden ist. Diese Struktur ist für die biologische Aktivität verantwortlich (57; 95). Durch chemische Modifikation der Penicillin-

Einleitung

Basisstruktur verliert das Molekül seine antibakterielle Aktivität. Mit dem Thiazolidinring ist eine Seitenkette verknüpft, die das jeweilige antibakterielle Spektrum und die pharmakologischen Eigenschaften bestimmt. Daher wird heute die 6-Aminopenicillansäure in großen Mengen fermentativ aus Kulturen von *P. chrysogenum* mit Hilfe einer Amidase hergestellt. Dieses Enzym spaltet die Peptid-Brücke, womit die Seitenkette mit der 6-APA verbunden ist. Die erhaltene 6-APA wird für die Synthese semisynthetischer Penicilline verwendet (57). Penicillin G (Benzylpenicillin) ist als einziges natürliches Penicillin für die medizinische Anwendung geeignet. Entsprechend ihrer antibakteriellen Spektren werden Penicilline in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (57):

- Penicillin G und V sind aktiv gegen empfindliche grampositiven Kokken, werden aber schnell von Penicillinasen hydrolysiert, weshalb sie ineffektiv sind gegen die meisten Stämme von *Staphylococcus aureus*.
- Penicillinase-resistente Penicilline wie z. Beispiel Methicilin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, sind wenig aktiv gegen Penicillin G empfindliche Isolate, jedoch sind sie für Penicillinase-produzierende *S. aureus* und *Staphylococcus epidermidis* Therapeutika der ersten Wahl, aber nicht für Methicillin-resistente Staphylokokken, einschließlich *S. aureus* (MRSA).
- Aminopenicilline wie Ampicillin und Amoxicillin erweitern ihre antibakterielle Aktivität gegen gramnegative Mikroorganismen wie *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, und *Proteus mirabilis*. Oft werden sie mit β -Laktamase Inhibitoren eingesetzt.
- Carboxypenicilline wie Carbenicillin and Ticarcillin erweitern die Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* und Indolpositiven *Proteus*-Stämmen.
- Ureidopenicilline wie Mezlocillin, Azlocillin und Piperacillin, diese zeigen eine starke Aktivität gegen die Isolate von *Pseudomonas*.

1.3 Cephalosporine

Die Entdeckung der Cephalosporine geht auf das Jahr 1948 zurück als Giuseppe Brotzu den Schimmelpilz *Cephalosporinum acremonium* (heute *Acremonium chrysogenum*) aus Meerwasser vor der sardischen Küste isoliert (57). Kulturfiltrate dieser Schimmelpilze

Einleitung

inhibierten *in vitro* das Wachstum von *S. aureus* und wurden mit Erfolg zur Therapie von Typhus und Staphylokokken-Infektionen eingesetzt (57). Diese natürliche Cephalosporin-Form heißt Cephalosporin C (CPC). Der aktive Kern von Cephalosporin C ist die 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA). Durch Modifikation der Seitenketten auf dem aktiven Nukleus 7-ACA können semisynthetische Cephalosporine mit breiten, antibakteriellen Spektren hergestellt werden (78). Für diesen Zweck wird die 7-ACA durch die Deacylierung von Cephalosporin C erhalten.

Cephalosporine werden aufgrund ihres antimikrobiellen Spektrums klassifiziert. Sie werden in fünf Generationen eingeteilt und mit der Zahl der jeweiligen Generation erweitert sich das Spektrum (134). Die Cephalosporine der 1. Generation, wie z. B. Cefalotin und Cefazolin, haben eine gute Aktivität gegen grampositive Bakterien (außer Enterokokken, Methicillin-resistente *S. aureus* und *S. epidermidis*) und relativ schlechte Aktivität gegen gramnegative Bakterien. Die Cephalosporine der 2. Generation (z.B. Cefoxitin und Cefotetan – Cephamycine, die ziemlich stabil gegenüber die hydrolytische Aktivität vieler Plasmid-kodierten β -Laktamasen sind und Cefuroxim) zeigen eine etwas stärkere Aktivität gegen gramnegative Bakterien, die jedoch deutlich geringer ist als die Aktivität der Cephalosporine der 3. Generation (57; 134). Letztere Gruppe umfasst u.a. Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon und zeichnet sich durch eine besonders hohe Aktivität gegen *Enterobacteriaceae* aus, obwohl die Resistenz gegen diese Antibiotika durch ESBLs dramatisch zunimmt (33; 57). Manche Cephalosporine der 3. Generation, wie z.B. Ceftazidim, sind auch gegen *Pseudomonas aeruginosa* aktiv. Das Aktivitätsspektrum bei den Cephalosporinen der 4. Generation wie Cefepim ist breiter als bei den Cephalosporinen der 3. Generation. Außerdem sind sie viel stabiler gegenüber der Hydrolyse durch die β -Laktamasen, allerdings nicht gegenüber Carbapenemasen. Ceftarolin gehört zu den Cephalosporinen der 5. Generation, welches eine hohe Aktivität gegenüber Penicillin-bindendem-Protein 2A (PBP2A) hat und dadurch auch eine gute Aktivität gegenüber MRSA zeigt (57; 134).

1.4 Carbapeneme

Die Kernstruktur der Carbapeneme unterscheidet sich von der Penicillin-Basisstruktur dadurch, dass im Thiazolidinring in Position 1 an Stelle eines Schwefelatoms ein Kohlenstoffatom vorhanden ist und somit die Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen in

Einleitung

den Positionen 2 und 3 ungesättigt ist. Die ersten zwei natürlichen Carbapeneme (Olivansäure, produziert durch *Streptomyces olivaceus* und Thienamycin, produziert durch *Streptomyces cattleya*) wurden fast zeitgleich Mitte der 70er Jahre entdeckt (92). Thienamycin war instabil, doch wurde das stabilere N-Formimidoyl-Derivat, Imipenem, daraus entwickelt. 1985 war Imipenem als erstes Carbapenem-Antibiotikum für die medizinische Anwendung verfügbar und konnte bei komplexen mikrobiellen Infektionen erfolgreich eingesetzt werden (104). In der Folge wurden weitere stabile Carbapeneme entwickelt: Meropenem, Panipenem, Biapenem, Ertapenem, und Doripenem. Panipenem und Biapenem sind in Japan und in Südkorea erhältlich (124; 151). Unter den β -Laktam-Antibiotika haben die Carbapeneme das breiteste antimikrobielle Spektrum. Carbapeneme sind stabil gegenüber den meisten β -Laktamasen, darunter auch ESBLs und AmpC β -Laktamasen. Deshalb gelten Carbapeneme als Reserveantibiotika für die gramnegativen Keime, die gegenüber Cephalosporine der 3. Generation resistent sind (151). Imipenem, Panipenem und Doripenem zeigen gute Aktivität auch gegenüber grampositiven Bakterien. Meropenem, Biapenem und Ertapenem sind hingegen effektiver gegenüber gramnegativen Bakterien. Imipenem und Doripenem besitzen Aktivität gegen *P. aeruginosa*. Ertapenem zeigt keine ausreichende Aktivität gegen *P. aeruginosa*. Für *Acinetobacter baumannii*-Stämme sind Meropenem, Imipenem und Doripenem sehr gut geeignet (48; 104).

1.5 Monobactame

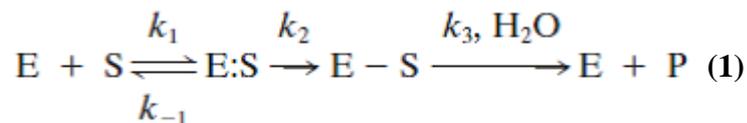
Aztreonam ist das einzige kommerziell erhältliche Monobactam Antibiotikum. Das monozyklische Aztreonam wurde 1981 von Sykes et al. aus *Chromobacterium violaceum* isoliert. Aztreonam besitzt ein breites Aktivitätsspektrum gegenüber gramnegativen Erregern einschließlich *P. aeruginosa* (101; 127). Die antimikrobielle Aktivität von Aztreonam unterscheidet sich von der anderer β -Laktam-Antibiotika und ähnelt stark den Aminoglykosiden, wie Gentamicin, Tobramycin (55). Aztreonam ist resistent gegen die Hydrolyse durch viele β -Laktamasen, einschließlich der Metallo- β -Laktamasen (MBL). Es ist allerdings nicht stabil gegenüber KPC β -Laktamasen (136).

1.6 Inhibitoren

Die zunehmende β -Laktam Resistenz gegenüber stellt ein globales Problem dar, das meist

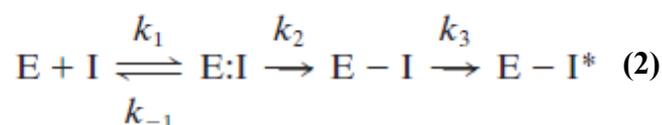
Einleitung

durch die Bildung einer oder mehrerer β -Laktamasen verursacht wird (79). Eine erfolgreiche Strategie zur Überwindung dieses Problems stellt der Einsatz von reversiblen oder irreversiblen β -Laktamase-Inhibitoren – oftmals β -Laktame – dar (38). Reversible Inhibitoren binden mit einer hohen Affinität an das Enzym ($k_1 \gg k_{-1}$ in Gleichung 1), die Enzymaktivität kann jedoch mit der Zeit wiederhergestellt werden (14). Beispiele dafür sind Breitspektrum-Cephalosporine, Monobactame oder Carbapeneme. Diese Moleküle fungieren als Inhibitoren, indem sie eine Art „schlechtes Substrat“ darstellen: Sie binden mit hoher Affinität an β -Laktamasen; dadurch entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex E-S, welcher nur sehr langsam hydrolysiert wird (14; 38). Durch folgende Gleichung lässt sich die Reaktion zwischen dem reversiblen Inhibitor und der Serin- β -Laktamase darstellen:



dabei entspricht E einer β -Laktamase, S einem Substrat (ein β -Laktam-Antibiotikum), E:S dem Michaelis Komplex, E-S dem Acyl-Enzym-Komplex und P dem inaktiven Abbauprodukt des Antibiotikums. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für jede Reaktionsschritt sind folgende: k_1 und k_{-1} sind die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante des Michaelis Komplexes, k_2 und k_3 sind die Konstante der Acylierungs- bzw. der Deacylierungsreaktionen (38).

Die irreversiblen Inhibitoren oder Suizidinhibitoren (Mechanismus-basierte Inhibitoren) inaktivieren die β -Laktamasen durch sekundäre chemische Reaktionen im aktiven Zentrum des Enzyms. Durch folgende Gleichung lässt sich der Inaktivierungsmechanismus darstellen:



wobei der Inhibitor (I) zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms (E) führt ($E-I^*$) (38). Irreversible Inhibitoren können gemeinsam mit den β -Laktam-Antibiotika eingesetzt werden.

Derzeit gibt es drei kommerzielle, für medizinische Anwendungen erhältliche, irreversible β -Laktamase-Inhibitoren (Clavulansäure-, Tazobactam- und Sulbactam-Suizidinhibitoren). Diese sind hauptsächlich gegenüber Klasse A β -Laktamasen wirksam (77). Clavulansäure

Einleitung

wurde in den 1970er Jahren vom Bakterium *Streptomyces clavulgerus* isoliert. Tazobactam und Sulbactam sind synthetische Penicillansäure-Sulfone (83). Die chemische Struktur aller drei β -Laktamase Inhibitoren ähnelt der des Penicillins. Aber im Vergleich zu den Penicillinen und anderen β -Laktam-Antibiotika inaktivieren sie nicht die Penicillin-bindenden-Proteine (PBPs) und besitzen daher auch keine antibakterielle Aktivität (38). Eine bemerkenswerte Ausnahme ist die intrinsische bakterizide Wirksamkeit von Sulbactam gegenüber *Acinetobacter spp.* Tazobactam ist deutlich effektiver als Clavulansäure und Sulbactam. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Tazobactam beträgt zwischen 2 und 10 nM. Für Clavulansäure und Sulbactam beträgt die IC_{50} zwischen 0.1 bis 4.5 μ M (12). Zurzeit sind folgende β -Laktam/ β -Laktamase-Inhibitor Kombinationen erhältlich: Amoxicillin-Clavulansäure, Ampicillin-Sulbactam, Ticarcillin-Clavulansäure, Piperacillin-Tazobactam, Cefoperazon-Sulbactam und Ceftolozan-Tazobactam (38; 135). Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam sind klinisch ineffektiv gegenüber β -Laktamasen der Klassen C und D. Daher besteht dringender Bedarf, neue β -Laktamase-Inhibitoren mit breitem Spektrum zu entwickeln. Damit ließe sich die Effektivität der β -Laktam-Antibiotika zurückgewinnen (82).

Avibactam (früher bekannt als NXL104 oder AVE1330A) ist ein synthetischer nicht- β -Laktam-Inhibitor (Diazabicyclooctan), der sich momentan noch in der klinischen Entwicklung befindet. Avibactam inhibiert die Klassen A und C β -Laktamasen und einige Enzyme der Klasse D. Obwohl Avibactam kein β -Laktam ist, besitzt es Ähnlichkeiten der Molekülstruktur sowie wesentliche Aktivitäts-Eigenschaften von β -Laktamen (150). Es wurden zwei Kombinationen von Avibactam entwickelt: Ceftazidim-Avibactam und Ceftarolin-Avibactam (49; 138; 150). Avibactam hat einen anderen Wirkungsmechanismus als die β -Laktamase-Inhibitoren aus der β -Laktam-Gruppe. Avibactam hemmt die β -Laktamase-Aktivität durch reversible kovalente Bindung an das Enzym. Im Vergleich zu Clavulansäure und Tazobactam weist Avibactam eine besonders hohe Affinität zu KPC- und AmpC β -Laktamasen auf (150).

Klasse D β -Laktamasen können *in vitro* durch Natriumchlorid (NaCl) gehemmt werden. Dieses Merkmal kann erfolgreich für die Identifizierung dieser Enzyme genutzt werden (114).

In den 1970er Jahren wurden Borsäure und Borate als reversible Inhibitoren der Serin- β -Laktamasen beschrieben. Kinetische Studien hatten gezeigt, dass Borsäure und ihre Derivate

Einleitung

die enzymatische Aktivität von AmpC-Enzymen und mancher Klasse A β -Laktamasen (z.B. KPC-, manche CTX-M-Enzyme) schnell und reversibel inhibieren. Bis jetzt sind keine Kombinationen von β -Laktam-Antibiotika und Boraten für die medizinische Anwendung entwickelt worden. Das hängt mit der Toxizität dieser Bor-Derivate zusammen (38; 116; 147).

Die β -Laktamasen der Klasse B (Metallo- β -Laktamasen, MBL) besitzen in ihrem aktiven Zentrum ein oder zwei Zn^{2+} -Ionen. Diese sind resistent gegenüber allen Mechanismus-basierten-Inhibitoren der Serin-Enzyme (38). MBLs sind durch Ethylendiamintetraacetat (EDTA, ein Metallchelator) inhibierbar. Wegen seiner Toxizität ist EDTA für die medizinische Anwendung allerdings nicht geeignet und wird daher nur für die Labordiagnostik genutzt (9; 117). Bisher gibt es kaum Fortschritte bei der Entwicklung klinisch relevanter MBL-Inhibitoren. In diesem Zusammenhang sind D- und L-Diastereomere von Captopril (Mercaptoparboxamid Inhibitor für einige Zn^{2+} -Enzyme) vielversprechende Kandidaten, weil sie gegenüber MBLs ein breites inhibitorisches Spektrum zeigen (79).

1.7 Wirkungsmechanismus der β -Laktam-Antibiotika

Alle β -Laktam-Antibiotika hemmen wichtige Enzyme, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind und wirken daher bakterizid. Ein essentieller Bestandteil der Zellwand bei grampositiven und gramnegativen Bakterien ist das Peptidoglykan (Murein), das Bakterien ihre charakteristische Zellform und osmotische Stabilität in hypertonischen Umweltbedingungen verleiht (38; 71). Die Peptidoglykan-Kette besteht aus zwei miteinander verknüpften Bausteinen: N-Acetylmuraminsäure (NMA) und N-Acetylglucosamin. Mit jeder NMA ist ein Pentapeptid verknüpft. Im Fall von *E. coli* besteht dieses Pentapeptid aus folgenden Aminosäuren: L-Alanin-D-Glutaminsäure-meso-Diaminopimelinsäure-D-Alanyl-D-Alanin. Durch die Transpeptidierung wird eine Peptidbrücke zwischen den benachbarten Peptidoglykan-Ketten hergestellt. Bei dieser Vernetzungsreaktion wird die freie Aminogruppe der Diaminopimelinsäure (L-Lysin bei grampositiven Bakterien) von einer Kette mit der Carboxylgruppe des vorletzten D-Alanins der benachbarten Kette verknüpft. Diese Reaktion wird durch D-Alanin Transpeptidasen katalysiert. Der letzte D-Alanin-Rest wird von D,D-Carboxypeptidasen entfernt. Die Transpeptidasen haben Serin in ihrem aktiven Zentrum und leisten ihre katalytische Aktivität durch eine Acylierung/Deacylierungsreaktion.

Einleitung

Die β -Laktam-Antibiotika ähneln in ihrer chemischen Struktur dem D-Alanyl-D-Alanin Dipeptid. Deswegen werden sie von Transpeptidasen in ihrem aktiven Zentrum gebunden. Bei der Öffnung des β -Laktam-Ringes entsteht ein kovalenter Acyl-Enzym Komplex. Daher werden diese Enzyme häufig als Penicillin-bindende Proteine (PBP) bezeichnet. Durch die Blockierung der Transpeptidasen wird die Synthese des Mureins inhibiert, was zur Zellyse führt (38; 71; 123; 139; 149).

1.8 Antibiotikaresistenz

Die meisten klinisch relevanten Antibiotika stammen aus im Boden lebenden Mikroorganismen, die in ihrem Genom Resistenzelemente haben (32). Dafür spricht auch, dass die erste β -Laktamase (isoliert von *E. coli*) 1940, kurz vor der Einführung des Penicillins, von Abraham und Chain beschrieben worden war (35). Die intensive Anwendung von Antibiotika durch den Menschen – Humanmedizin, Tiermedizin und Landwirtschaft – (100.000-200.000 Tonnen jährlich weltweit: geschätzt 2002; das macht gut 1 Million Tonnen seit den 1940er Jahren) (7) erhöhte das Vorkommen resistenter humanpathogener Keime dramatisch. Das Resistenzproblem verringert die Therapiemöglichkeiten bei bakteriellen Infektionen (7). Die Antibiotikaresistenz kann natürlich (intrinsisch oder primär) oder erworben (sekundär) sein. Unter natürlicher Resistenz versteht man die angeborene Eigenschaft einer Bakterien-Spezies. Bei den Organismen dieser Spezies fehlt entweder das Zielmolekül für das Antibiotikum oder das Zielmolekül besitzt eine niedrige Affinität zum Antibiotikum. Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht darin, dass der Zugang des Antibiotikums zur Bakterienzelle durch natürliche Barrieren verhindert wird. So haben beispielsweise gramnegative Bakterien eine natürliche Resistenz gegen Vancomycin, weil es die äußere Zellmembran gramnegativer Bakterien nicht durchdringen kann. Bei Enterokokken liegt eine intrinsische Resistenz gegenüber Cephalosporinen vor, weil deren PBPs eine niedrige Affinität zu Cephalosporinen haben (62; 76). Die erworbene Resistenz beruht auf den Mutationen im Erbgut der Bakterien oder auf der Übertragung des genetischen Materials von anderen Bakterien (z.B. durch Plasmide). Dadurch verliert ein ehemals wirksames Antibiotikum seine Aktivität gegen diese Bakterien (76).

Die Hauptmechanismen, die von Bakterien entwickelt wurden, um der abtötenden Wirkung von Antibiotika zu widerstehen, sind folgende:

Einleitung

- **Veränderung der Zielstruktur des Antibiotikums:**

Punktmutationen in Target-Genen führen häufig zu einem modifizierten Target, welches dann nicht mehr gebunden werden kann. Beispielsweise inhibiert das synthetische Flouorchinolon Ciprofloxacin die Funktion von Typ II Topoisomerase (DNA Replikation). Punktmutationen in dem Target-Gen *gyrA* führen zur Entstehung Flouorchinolon-resistenter Keime (145).

- **Bypass der Antibiotika:**

Manche Bakterien umgehen die abtötende Wirkung der Antibiotika durch die Synthese alternativer Targets. So bindet Vancomycin an den D-Ala-D-Ala Terminus des Peptidoglycan-Vorläufers und verhindert damit die weitere Biosynthese der Zellwand. Bei Vancomycin resistenten Enterokokken ist der D-Ala-D-Ala Terminus durch einen D-Ala-D-Lactat Terminus ersetzt, das D-Ala-D-Lactat kann Vancomycin nicht mehr binden (62; 145).

- **Verringerung der Konzentration des Antibiotikums in der bakteriellen Zelle:**

Die Bakterien werden durch die Modifikation von Porinen oder durch hoch effiziente Efflux-Pumpen resistent: Der Zugang des Antibiotikums in die bakterielle Zelle wird entweder verhindert oder das Antibiotikum wird aktiv aus der bakteriellen Zelle herausgepumpt. Bei *P. aeruginosa* führt der Verlust von Porin OprD2 zur Resistenz gegenüber Imipenem, die Überexpression der MexAB-OprM Efflux-Pumpe führt zur Resistenz gegenüber Meropenem (62; 121).

- **Enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums:**

Inaktivierung ist eine häufige Form der Antibiotikaresistenz bei Bakterien. In diesem Fall behalten die resistenten Stämme das Target für das Antibiotikum, allerdings wird das Antibiotikum inaktiviert, bevor es an sein Target binden kann (62). Das geschieht durch drei unterschiedliche biochemische Prozesse:

1. **Inaktivierung des Antibiotikums durch enzymatische Hydrolyse:**

Viele Antibiotika besitzen hydrolysierbare Bindungen in ihrer chemischen Struktur (Amide, Ester), die für ihre biologische Aktivität eine wesentliche Bedeutung haben. Bakterien haben hydrolytische Enzyme gezielt für diese Bindungen entwickelt, wodurch sie diese Bindungen spalten und damit die Aktivität des Antibiotikums

Einleitung

aufheben. Die wichtigsten unter diesen Enzymen sind die β -Laktamasen (Amidasen), die in der Lage sind, den Laktam-Ring von β -Laktam-Antibiotika zu spalten. Ein anderes Beispiel sind die Esterasen, die Resistenz gegenüber Makroliden vermitteln (144; 145).

2. Inaktivierung des Antibiotikums durch Transferasen:

Die Inaktivierung kann durch Transferasen vermittelt werden. Kinasen, Adenyltransferasen und Acetyltransferasen kommen meist bei klinisch relevanten Bakterien vor. Glycosyltransferasen und Ribosyltransferasen sind dagegen eher bei Umweltkeimen bekannt (145).

3. Inaktivierung des Antibiotikums durch Oxidation oder Reduktion (Redox-Enzyme):

Es handelt sich hierbei um eine seltenere Form der Antibiotikaresistenz bei pathogenen Bakterien. Beispielhaft dafür ist die Oxidation des Tetracyclins durch das TetX Enzym (144).

1.9 Evolution der β -Laktamasen

Die chemische Modifizierung von Antibiotika durch die Mikroorganismen ist der Hauptmechanismus der Antibiotikaresistenz (36). Die Hydrolyse von β -Laktam-Antibiotika durch β -Laktamasen gehört zu den häufigsten Resistenzmechanismen gegenüber dieser Gruppe von Antibiotika. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass β -Laktam-Antibiotika derzeit bei der Therapie unterschiedlicher Infektionskrankheiten als Mittel der ersten Wahl eingesetzt werden, ist die klinische Relevanz dieser Enzyme sehr hoch (16).

Der Selektionsdruck für die Entstehung der β -Laktamasen entstand aus der natürlichen Bildung der β -Laktam-Antibiotika durch Mikroorganismen und deren Sekretion in die Umwelt. In Gegenwart von Antibiotika in der Umgebung waren β -Laktamase-produzierende Bakterien im Vorteil gegenüber den nicht-produzierenden Bakterien. Erstere konnten dadurch unter dem bestehenden Selektionsdruck überleben und sich verbreiten. Dieser Prozess wurde durch die Anwendung der Antibiotika in Human- und Tiermedizin sowie in Landwirtschaft deutlich beschleunigt (90).

Die große Mehrheit von β -Laktamasen wie auch von PBPs sind Serin-Enzyme. Für ihre

Einleitung

enzymatische Aktivität brauchen sie im aktiven Zentrum die Aminosäure Serin. Im Gegensatz zu den PBPs sind β -Laktamasen jedoch in der Lage, β -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren und deren antibakterielle Aktivität aufzuheben. Nach strukturbasierten Sequenzanalysen (59) sind Serin- β -Laktamasen (aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit eingeteilt in die Klassen: A, C und D) mit D,D-Transpeptidasen verwandt. Aus der strukturbasierten Phylogenie lässt sich Folgendes zusammenfassen: Die β -Laktamasen der Klassen A, D und C haben denselben Vorläufer. Als Erste entwickelten sich die Klasse C β -Laktamasen und erst nach diesen die Klassen A und D β -Laktamasen. Siehe Abbildung 1 (59).

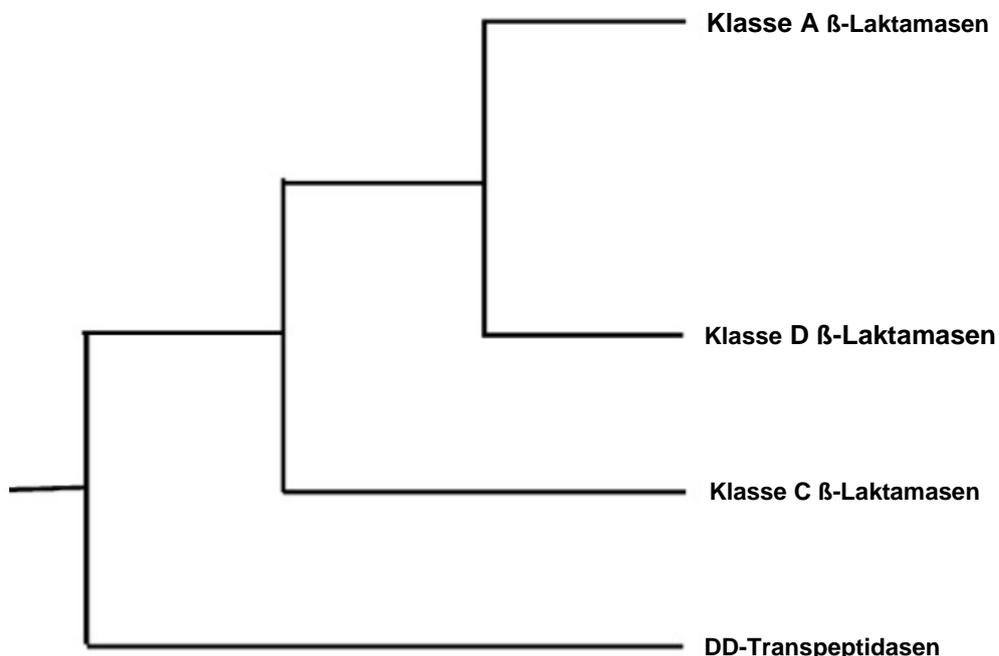


Abbildung 1: Evolution der β -Laktamasen (nach Hall und Barlow, 2004)

Die Evolution der Klasse B β -Laktamasen oder Metallo- β -Laktamasen fand unabhängig von den Serin- β -Laktamasen statt. Die genetische Entwicklung der Metallo- β -Laktamasen ist unabhängig von der der Serin- β -Laktamasen (60).

1.10 β -Laktamasen: Einteilung der β -Laktamasen

Zwei Klassifikationssysteme zur Einteilung der β -Laktamasen sind gängig:

- molekulare Klassifikation nach Ambler

Einleitung

- funktionelle Klassifikation nach Bush, Jacoby und Medeiros.

1.10.1 Die molekulare Klassifikation nach Ambler

Die molekulare Einteilung nach Ambler von 1980 beruht auf der Homologie der Aminosäuresequenzen. Nach der Ambler Klassifikation werden β -Laktamasen in vier Gruppen eingeteilt: Klasse A, B, C und D. Die Klassen A, C und D sind Serin- β -Laktamasen. Die Klasse B umfasst alle Metallo- β -Laktamasen (38; 60). Ursprünglich hatte Ambler die β -Laktamasen in zwei Gruppen eingeteilt: Klasse A Serin- β -Laktamasen und Klasse B Metallo- β -Laktamasen. Serin- β -Laktamasen der Klassen C und D wurden erst später entdeckt und beschrieben (3; 60).

β -Laktamasen der Ambler Klasse A: Die β -Laktamasen der Ambler Klasse A sind die am häufigsten vorkommenden β -Laktamase-Enzyme weltweit. Das erste Plasmid-kodierte β -Laktamase-Enzym TEM-1 wurde in Griechenland 1965 bei *E. coli* identifiziert. Die Bezeichnung TEM bezieht sich auf den Namen des Patienten Temoniera, bei dem das Enzym entdeckt wurde. 1974 wurde bei *K. pneumoniae* ein anderes Enzym entdeckt. Dieses Enzym zeigte eine 68 %-ige Sequenzhomologie mit TEM-1 und wurde als SHV-1 bezeichnet (Sulphhydryl variable) (38). TEM-1 ist die häufigste Plasmid-kodierte β -Laktamase bei den Ampicillin-resistenten gramnegativen Stäbchen, besonders bei *E. coli*. SHV-1 kommt hingegen meist bei *K. pneumoniae* vor. TEM-2 teilt zwar die biochemischen Eigenschaften mit TEM-1, ist aber seltener (105). 1983 wurde in Deutschland ein β -Laktamase-Enzym von *K. ozaenae* isoliert, welches Cefotaxim spalten konnte. Die Sequenzanalysen haben gezeigt, dass sich dieses Enzym von SHV-1 nur durch eine Aminosäure unterscheidet. In Position 238 hatte es ein Serin anstelle von Glycin. Diese Mutation ist verantwortlich für die ESBL-Aktivität und das Enzym wurde als SHV-2 bezeichnet (105). Von TEM-1, TEM-2 und SHV-1 Penicillinasen sind die meisten ESBL-Varianten durch Punktmutationen entstanden, wodurch diese Enzyme in der Lage sind, nicht nur Penicilline sondern auch Oxyimino-Cephalosporine und Aztreonam zu hydrolysieren. Die Einführung von Cephem- und Penem-Antibiotika in den frühen 1980er Jahren hatte diesen Prozess begünstigt (38). Ende der 1980er und Anfang der 1990er Jahre wurden neue Plasmid-kodierte β -Laktamasen in Westeuropa und Südamerika entdeckt. Die Sequenzanalysen hatten gezeigt, dass diese Enzyme zu 39 % mit TEM- und SHV-Enzymen identisch waren. Aufgrund dessen, dass diese Enzyme eine hohe

Einleitung

hydrolytische Aktivität gegenüber Cefotaxim hatten, wurden sie CTX-M genannt (13). CTX-M β -Laktamasen sind eng mit den chromosomalen β -Laktamasen von *Kluyvera spp.* verwandt. Heutzutage sind CTX-M β -Laktamasen weltweit die am häufigsten vorkommenden β -Laktamasen (105).

Serin-Carbapenemasen der Ambler Klasse A (SME, NMC, IMI, GES, KPC) kommen meist bei *E. cloacae*, *S. marcescens*, und *K. pneumoniae* vor. Neben den Penicillinen, Cephalosporinen und Aztreonam sind sie in der Lage, auch Carbapeneme zu spalten (117).

β -Laktamasen der Ambler Klasse B: Im Gegensatz zu den Serin- β -Laktamasen, die für ihre enzymatische Aktivität die Aminosäure Serin brauchen, besitzen die β -Laktamasen der Ambler Klasse B ein bis zwei Zn^{2+} -Ionen in ihrem aktiven Zentrum, weshalb sie als Metallo- β -Laktamasen (MBL) bezeichnet werden. Die enzymatische Aktivität der Metallo- β -Laktamasen unterscheidet sich von der Aktivität der Serin- β -Laktamasen dadurch, dass sie zusätzlich zu den Penicillinen und Oximinoccephalosporinen noch Carbapeneme spalten, jedoch nicht Monobactame. Die enzymatische Aktivität von MBLs wird nicht durch die klinisch verfügbaren β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt (38; 117).

β -Laktamasen der Ambler Klasse C oder AmpC β -Laktamasen: Mitte der 1980er Jahre waren die β -Laktamasen der Ambler Klasse C bei *Enterobacteriaceae* als chromosomal-kodierte Enzyme entdeckt worden und bereits Ende der 1980er Jahre war die erste Plasmid-kodierte β -Laktamase der Ambler Klasse C beschrieben worden (59). Aufgrund ihrer Abstammung werden Plasmid-kodierte AmpC β -Laktamasen in sechs Gruppen eingeteilt. Diese sind: ACC (abgeleitet von *Hafnia alvei*), FOX (Abstammung ist unbekannt), MOX (Abstammung ist unbekannt), DHA (abgeleitet von *Morganella morganii*), CIT (abgeleitet von *Citrobacter freundii*), und EBC (abgeleitet von *Enterobacter cloacae*) (108). Das hydrolytische Aktivitätsspektrum von AmpC β -Laktamasen ist breiter als das der ESBL-Enzyme, auch werden sie nicht von kommerziell verfügbaren β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt (111).

β -Laktamasen der Ambler Klasse D: β -Laktamasen der Ambler Klasse D bilden eine genetisch diverse Gruppe, deren Gene sowohl chromosomal- als auch Plasmid-lokalisiert sind. Ambler Klasse D β -Laktamasen werden auch als OXA-Typ- β -Laktamasen bezeichnet, weil ein Großteil von ihnen eine hohe hydrolytische Aktivität gegen Oxacillin und Cloxacillin zeigt (59). OXA-Typ-ESBL-Enzyme sind Derivate von OXA-2 und OXA-10. Sie kommen

Einleitung

vornehmlich in *P. aeruginosa* Stämmen vor. Sie wurden aber auch schon bei anderen gramnegativen Keimen, darunter *Enterobacteriaceae*, entdeckt (93). Manche OXA-Typ- β -Laktamasen (z.B. OXA-48) sind in der Lage, Carbapenem-Antibiotika zu hydrolysieren. Damit gehören sie zu den Serin-Carbapenemasen.

1.10.2 Die funktionelle Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros

Die funktionelle Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros von 1995 beruht auf der Fähigkeit der β -Laktamase-Enzyme, eine bestimmte Klasse der β -Laktam-Antibiotika zu spalten und auf deren Hemmbarkeit durch die β -Laktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam). Deswegen ist dieses Klassifikationssystem mehr für die Labordiagnostik relevant.

Gruppe 1 Cephalosporinasen: Die Enzyme der Gruppe 1 sind Cephalosporinasen, die zur Ambler Klasse C gehören. Sie sind aktiver gegenüber Cephalosporinen als gegenüber Benzylpenicillinen, jedoch nicht gegenüber Cefepim und Cefpirom. Carbapeneme können von ihnen auch nicht hydrolysiert werden. Die Cephalosporinasen der Gruppe 1 zeigen eine hohe Aktivität gegenüber Aztreonam (die K_i -Werte liegen im 1 bis 2 nM Bereich). Normalerweise werden diese Enzyme nicht durch β -Laktamase-Inhibitoren gehemmt (16; 69).

Gruppe 2 Serin- β -Laktamasen: Die funktionelle Gruppe 2 umfasst die Ambler Klassen A und D, und ist damit die größte Gruppe. Diese Gruppe ist in Subgruppen von 2a bis 2f unterteilt. Außer den Subgruppen 2d und 2e gehören die β -Laktamasen der Gruppe 2 zur Ambler Klasse A (16).

Subgruppe 2a Penicillinasen kommen meistens bei grampositiven Kokken vor, besonders bei Staphylokokken, seltener bei Enterokokken. Sie hydrolysieren sehr gut Penicilline und können durch Clavulansäure oder Tazobactam gehemmt werden (IC_{50} weniger als $1\mu M$). Die Mehrheit dieser Enzyme sind chromosomal kodiert, obwohl bei Staphylokokken manche Penicillinasen Plasmid-kodiert sind (16).

Subgruppe 2b β -Laktamasen können gut Penicilline und Cephalosporine der 1. Generation (z.B. Cefalotin) hydrolysieren. Sie werden durch Clavulansäure und Tazobactam sehr stark inhibiert. Die Subgruppe 2b repräsentiert die am häufigsten vorkommenden, Plasmid-kodierten TEM-1, TEM-2 und SHV-1 β -Laktamasen (16).

Einleitung

Subgruppe 2be umfasst die β -Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (ESBL-extended-spectrum-beta-lactamses). ESBLs hydrolysieren Penicilline und Cephalosporine der 1. Generation, wie die Subgruppe 2b β -Laktamasen. Weiterhin sind sie in der Lage, eines oder mehrere Oxyimino-Cephalosporine, wie Cefotaxim, Ceftazidim und Aztreonam zu hydrolysieren. Die ersten ESBL-Enzyme der Subgruppe 2be wurden durch Aminosäure-Substitutionen von TEM-1, TEM-2 und SHV-1 abgeleitet. Diese Substitutionen haben das Substratspektrum erweitert. Infolgedessen wurde aber die hydrolytische Aktivität gegenüber Benzilpenicillin und Cephaloridin verringert. Dann traten CTX-M Enzyme hervor, die mit TEM- und SHV-ESBL-Enzymen funktionelle Ähnlichkeiten aufwiesen. Wie der Name andeutet, hydrolysieren CTX-M Enzyme Cefotaxim schneller als Ceftazidim. Deswegen wurden diese Enzyme CTX-M genannt. Im Gegensatz zu den TEM- und SHV-ESBL-Enzymen werden die CTX-M Enzyme von Tazobactam besser gehemmt als von Clavulansäure. Es gibt seltener vorkommende, mit TEM, SHV und CTX-M unverwandte ESBL-Enzyme, wie z.B. BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, VEB-1 oder PER-1. Für alle Enzyme dieser Subgruppe ist die Hemmung durch Clavulansäure typisch. Diese Eigenschaft wird für die Labordiagnostik eingesetzt (16).

Subgruppe 2br β -Laktamasen haben das gleiche Wirkspektrum wie β -Laktamasen der 2b Subgruppe. Zusätzlich besitzen sie eine erworbene Resistenz gegenüber Clavulansäure ($IC_{50} \geq 1 \mu M$) und anderen β -Laktamase-Inhibitoren. Nach den Angaben von Bush et al. gehören 36 von 135 charakterisierten TEM-Enzymen und 5 von 72 charakterisierten SHV Enzymen zu dieser Subgruppe, z.B. TEM-30 und TEM-31 (bzw. IRT-2 und IRT-1) sowie SHV-10.

Subgruppe 2ber schließt TEM- β -Laktamasen mit erweitertem Wirkspektrum ein, die gegenüber Clavulansäure resistent sind, wie z. B. TEM-50 (16).

Subgruppe 2c Penicillinasen zeichnen sich durch gute Hydrolyse von Carbenicillin aus. Dahingegen spalten sie schlecht Oxacillin und Cloxacillin. Diese Penicillinasen werden durch Clavulansäure und Tazobactam sehr gut inhibiert ($IC_{50} < 1 \mu M$) (16).

Subgruppe 2ce umfasst die Breitspektrum-Carbenicillinasen, wie z.B. CARB-10. Diese Enzyme zeigen gegenüber Cefepim und Cefpirom eine erweiterte Wirksamkeit (16).

Subgruppe 2d β -Laktamasen gehören zu der Ambler Klass D. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, Cloxacillin und Oxacillin zu hydrolysieren. Daher heißen sie OXA-Enzyme. β -Laktamasen dieser Subgruppe können durch NaCl gehemmt werden. Die mittlere

Einleitung

inhibitorische Konzentration von Clavulansäure auf diese Enzyme liegt bei $\geq 1 \mu\text{M}$ (16).

Subgruppe 2de β -Laktamasen sind Cloxacillin- und Oxacillin-hydrolysierende Enzyme mit erweitertem Wirkspektrum, das Oxyimino- β -Laktam-Antibiotika einschließt, nicht aber Carbapeneme. 2de β -Laktamasen repräsentieren die OXA-Typ-ESBL-Enzyme, deren Mehrheit von OXA-2 und OXA-10 abgeleitet wurde. OXA-Typ-ESBLs kommen meistens in *P. aeruginosa* vor (16).

Subgruppe 2df β -Laktamasen sind in der Lage, Carbapenem-Antibiotika zu hydrolysieren. Daher stammt die Bezeichnung OXA-Typ-Carbapenemasen. Die Carbapenemasen dieser Subgruppe gehören zur Ambler Klasse D. Sie kommen am häufigsten in *A. baumannii* vor, aber Plasmid-kodierte OXA-23 und OXA-48 sind auch schon bei *Enterobacteriaceae* identifiziert worden. Normalerweise sind diese Enzyme unempfindlich gegenüber Inhibition durch Clavulansäure (16).

Subgruppe 2e Cephalosporinasen spalten Breitspektrum-Cephalosporine und werden durch Clavulansäure gehemmt. Diese Enzyme haben eine geringe Affinität zu Aztreonam (16).

Subgruppe 2f umfasst die Serin-Carbapenemasen der Ambler Klasse A. Die β -Laktamasen dieser Subgruppe hydrolysieren Carbapenem-Antibiotika und können besser durch Tazobactam gehemmt werden als durch Clavulansäure. In epidemiologischer Hinsicht sind KPC- und GES-Carbapenemasen aus der 2f Subgruppe Besorgnis erregender (16).

Gruppe 3 Metallo- β -Laktamasen: Diese Gruppe umfasst alle Metallo- β -Laktamasen (MBL) und entspricht der Ambler Klasse B. In ihrer chemischen Struktur unterscheiden sie sich von anderen β -Laktamasen dadurch, dass sie in ihrem aktiven Zentrum ein bis zwei Zn^{2+} -Ionen besitzen. Sie sind – mit Ausnahme von Aztreonam – in der Lage, alle β -Laktam-Antibiotika zu spalten. MBL können nicht durch Clavulansäure oder Tazobactam gehemmt werden. Hingegen werden sie von Metall-Ion Chelatoren, wie EDTA, Dipicolinsäure, inhibiert. Metallo- β -Laktamasen der Gruppe 3 werden aufgrund ihrer Struktur in drei Subgruppen unterteilt: B1, B2 und B3. Die Subgruppe B1 beinhaltet die wichtigsten Plasmid-kodierten Metallo- β -Laktamasen, wie beispielweise IMP- und VIM-Enzyme. Sie sind weltweit verbreitet, kommen am häufigsten in Nonfermentern vor, aber auch bei *Enterobacteriaceae* (16).

Eine aktuelle Übersicht über die Anzahl der zurzeit bekannten β -Laktamasen findet man in der Datenbank der Lahey-Clinic Burlington (<http://www.lahey.org/studies/>).

Einleitung

1.11 Epidemiologie der ESBL-Bildner

ESBL-Enzyme sind in der Lage, Oxyimino-Cephalosporine (Cephalosporine der 3. Generation), sowie auch Monobactame und Cefepim (Cephalosporin der 4. Generation) zu hydrolysieren. Carbapenemen und Cephamyne (Cefoxitin, Cefotetan) gegenüber sind sie jedoch unwirksam. Die hydrolytische Aktivität dieser Enzyme kann durch β -Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam, gehemmt werden.

Die Mehrheit der klinisch relevanten ESBL-Enzyme gehört zu den TEM-, SHV- oder CTX-M-Familien. Seit Mitte der 1990er Jahre sind CTX-M β -Laktamasen weltweit vorherrschend geworden. Die Enzyme der CTX-M-Familie können aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz in fünf Gruppen eingeteilt werden: Gruppe 1 (z.B. CTX-M-1), Gruppe 2 (z.B. CTX-M-2), Gruppe 8 (z.B. CTX-M-8), Gruppe 9 (z.B. CTX-M-9) und Gruppe 25 (z.B. CTX-M-25) (75). Die ESBL-Gene sind normalerweise auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert. Das ermöglicht die schnelle Verbreitung dieser Resistenz-Gene sowohl innerhalb der Spezies als auch zwischen den unterschiedlichen Spezies (21).

Seltener vorkommende ESBL-Enzyme, wie BEL-1-, BES-1-, SFO-1-, TLA-1-, TLA-2-, PER- und VEB- β -Laktamasen sind mit TEM-, SHV- und CTX-M-ESBL-Enzymen nicht eng verwandt und gehören zu den „minor“-ESBL Familien (93).

Manche OXA-Typ-Enzyme haben die Fähigkeit der ESBL-Enzyme, Breitspektrum-Cephalosporine zu hydrolysieren und gelten als ESBL, obwohl sie durch Clavulansäure schlecht gehemmt werden (93).

Nach den Angaben der globalen Multicenter-Surveillance-Studie T.E.S.T. (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial), die im Zeitraum 2004-2006 gemacht wurden, waren die ESBL-Bildner in Europa seltener als in Südamerika und Asien aber häufiger als in Nordamerika (27).

In den 1990er Jahren waren TEM- und SHV-ESBL-Enzyme häufiger und kamen in erster Linie bei *K. pneumoniae*-Isolaten vor (klonale Verbreitung). Diese Isolate waren meistens mit nosokomialen Ausbrüchen verbunden (hauptsächlich in Intensivpflegestationen). Während des 21. Jahrhunderts hat die Anzahl von CTX-M-produzierenden *E. coli*-Isolaten dennoch zugenommen. Diese Isolate sind heute nicht nur mit nosokomialen sondern auch mit

Einleitung

ambulant erworbenen Infektionen (besonders mit Harnwegsinfektionen) verbunden (18; 21). In der letzten Dekade wurden TEM- und SHV-ESBLs durch die CTX-M Familie verdrängt. Bestimmte CTX-M Enzyme kommen nur in einigen Regionen der Erde vor; CTX-M-15 ist aber weltweit verbreitet. CTX-M-15-bildende *E. coli*-Stämme sind meistens mit dem hochvirulenten Klon O25:H4-ST131 verbunden. Dessen klonale Ausbreitung führte zur CTX-15 Pandemie (15; 21; 102).

Der Vergleich der Trendanalysedaten von EARS-Net aus dem Jahr 2009 mit Daten aus 2012 zeigte, dass die Anzahl der invasiven *E. coli* und *K. pneumoniae*-Isolate mit einer Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation (C3R) in den meisten Ländern zugenommen hat. Der Anteil von ESBL-positiven Isolaten an C3R-Isolaten war mit 62-100 % hierbei sehr hoch (25; 26).

Zur Bestimmung der Häufigkeit und Verbreitung der Resistenz-Gene sind in Deutschland auch unterschiedliche Surveillance-Systeme entstanden. In den Jahren 2004, 2008, und 2011 wurden deutschlandweite Studien durchgeführt: 2004 die Limbach-Laborstudie, 2008 die ARS-ESBL-Studie und 2011 erneut die Limbach-Laborstudie. Dabei wurde die Häufigkeit der ESBL-Varianten bei nosokomialen *E. coli* untersucht. Zu allen Zeitpunkten hatten CTX-M-Enzyme eine erhebliche Dominanz gegenüber anderen ESBL-Typen, wobei die höchste Prävalenz der Genotyp CTX-M-15 hatte. Im Jahr 2011 machte dieser Genotyp etwa die Hälfte aller identifizierten ESBL-Varianten aus. Die Prävalenz des CTX-M-1-Enzyms war mit über 30 % ebenfalls sehr hoch (109; 110).

1.12 Klinische Bedeutung der ESBL-Bildner

Die Eindämmung der zunehmenden Ausbreitung der ESBLs bei nosokomial und ambulant erworbenen Enterobakteriazeen ist eine wichtige Herausforderung für die Kliniker, weil die Therapiemöglichkeiten für diese Bakterien beschränkt sind. Die Epidemiologie der ESBL-Enzyme ist komplex und mit genetischen mobilen Elementen, sowie klonaler Ausbreitung verbunden (113; 120). Chong et al. hatten in einer Meta-Analyse gezeigt, dass die Infektionen mit ESBL-bildenden Bakterien mit Verzögerung einer effektiven Therapie und mit erhöhter Mortalität verbunden sind. Die Infektionen mit ESBL-bildenden Bakterien sind auch mit verlängerten Klinikaufenthalten der Patienten und mit höheren Behandlungskosten verbunden (21; 120).

Einleitung

ESBLs sind resistent gegen alle β -Laktam-Antibiotika außer Carbapeneme. Sehr oft zeigen ESBL-Bildner Co-Resistenz gegenüber anderen Antibiotika-Gruppen, wie Sulfonamide, Aminoglykoside oder Fluorchinolone. Die Multiresistenz (multiple drug resistance, MDR) hat eine bedeutende Auswirkung auf die Auswahl einer angemessenen empirischen Therapie. Antibiotika, die für die empirische Therapie einer seriösen ambulant-erworbenen Infektion regelmäßig eingesetzt werden, sind oft nicht effektiv gegen ESBL-Bildner (21; 113). Deswegen sind die Therapiemöglichkeiten bei einer Infektion mit ESBL-bildenden Bakterien eingeschränkt (21). Daher müssen bei empirischen Antibiotikatherapien oft Carbapeneme eingesetzt werden. Dieses wiederum hat zur Entstehung und Verbreitung der Resistenz gegen Carbapenem-Antibiotika unter *Enterobacteriaceae* geführt (15; 21; 107).

1.13 Epidemiologie der KPC-Bildner

Klebsiella pneumoniae Carbapenemasen (KPC) sind in der Lage, Carbapeneme, Oxyimino-Cephalosporine, sowie auch Cephamicine und Monobactame zu hydrolysieren. Ihre hydrolytische Aktivität wird besser durch Tazobactam als durch Clavulansäure gehemmt (16; 133). Die Hemmbarkeit der KPC-Enzyme durch Borsäure und deren Derivate wird erfolgreich in der Labordiagnostik für die Detektion der KPC-Enzyme eingesetzt (133). Die *bla*_{KPC}-Gene sind auf Plasmiden lokalisiert und von dem Transposon *Tn4401* flankiert (99; 133).

KPC-Enzyme sind weltweit verbreitet. Die Varianten KPC-2 und KPC-3 sind die am häufigsten vorkommenden KPC-Enzyme (8). Der erste KPC-Bildner (KPC-2) wurde in 1996 in der USA (Nord-Carolina) aus *K. pneumoniae* isoliert. Bis 2001 waren die KPC-Enzyme nicht häufig vorgekommen (20; 99). Kurz darauf haben sich KPC-Bildner schnell in Puerto Rico, Columbia, Griechenland, Israel und China verbreitet. Es wurden auch Ausbrüche durch KPC-Bildner in vielen europäischen Ländern und Südamerika berichtet (20; 99). Die höchste Prävalenz der KPC-Enzyme unter europäischen Ländern haben Griechenland und Italien. In diesen beiden Ländern herrscht eine endemische Situation (56). KPC-Enzyme werden häufiger aus den nosokomialen *K. pneumoniae* als aus *E. coli* isoliert (99). Die Mehrzahl der KPC-bildenden *K. pneumoniae*-Isolate gehört zum weltweit ausgebreiteten multiresistenten Klon ST258 (8; 99).

Nach Daten des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger sind

Einleitung

KPC-Enzyme nach OXA-48 die zweithäufigsten Carbapenemasen in Deutschland und der häufigste Träger von *bla_{KPC}*-Genen ist *K. pneumoniae* (73). KPC-Bildner haben in Deutschland eine regionale Verbreitung (56).

1.14 Klinische Bedeutung der KPC-Bildner

Carbapenem-Antibiotika werden als Reserveantibiotika bei der Therapie von Infektionskrankheiten mit ESBL-bildenden Bakterien eingesetzt. Aus diesem Grund ist das Auftreten Carbapenem-resistenter Krankheitserreger ein großes Problem (99; 106). Das zunehmende Vorkommen der KPC-Bildner ist eine Herausforderung für die Diagnostik und Therapie, weil das Resistenzniveau der KPC-Bildner gegenüber Carbapenem-Antibiotika stark variiert und diese Keime oft in der Routinediagnostik mit phänotypischen Nachweismethoden als Carbapenem-empfindlich erscheinen (11; 99). Weiterhin sind KPC-Bildner oft multiresistent (insbesondere gegen alle β -Laktam-Antibiotika) und dadurch sind die Therapiemöglichkeiten bei Infektionskrankheiten mit KPC-Bildnern stark eingeschränkt. Aus diesem Grund müssen Kliniker oft auf Tigecyclin und Polymyxine zurückgreifen (11; 20). Allerdings ist die klinische Anwendung dieser Antibiotika wegen ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften und Toxizität eingeschränkt. Außerdem gibt es in der Literatur eine zunehmende Zahl an Berichten über Colistin- und Tigecyclin-resistente Isolate bei Infektionskrankheiten mit KPC-Bildnern (11; 20). Die Kombinationstherapie mit Polymyxin B oder Tigecyclin und einem Carbapenem-Antibiotikum kann die Überlebensrate der Infektionskrankheiten mit KPC-Bildnern erhöhen (20; 118). Dennoch bleibt die Mortalitätsrate bei Erkrankungen mit KPC-Bildnern mit ≥ 50 % hoch (20; 99).

1.15 Aktuelle Methoden zum Nachweis von ESBL und KPC

Die Methoden zur Detektion der ESBL- und KPC-Bildung bei Bakterien lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: phänotypisch und genotypisch.

Phänotypische Methoden zum Nachweis der ESBL-Bildung beruhen auf der Fähigkeit der ESBL-Enzyme, Oxyimino-Cephalosporine zu hydrolysieren und auf deren Hemmbarkeit durch Clavulansäure. Der phänotypische Nachweis zur Detektion der KPC-Bildung basiert auf der verminderten Empfindlichkeit der KPC-Bildner gegenüber Carbapenem-Antibiotika.

Einleitung

Diese muss weiterhin durch den Modified-Hodge-Test (MHT) (132) oder durch einen Synergismuskachweis mit einem Carbapenem und KPC-Inhibitoren (Borsäure und deren Derivate) bestätigt werden.

Genotypische Methoden basieren auf molekularen Techniken, mit Hilfe derer ESBL- und KPC-Gene nachgewiesen werden.

Für die Routinediagnostik werden hauptsächlich phänotypische Methoden eingesetzt. Genotypische Methoden sind eher für epidemiologische Untersuchungen geeignet.

1.15.1 Phänotypische Methoden

Die phänotypische Detektion der ESBL- und KPC-Bildner besteht aus zwei Schritten: Screening und Bestätigung.

1.15.1.1 Screening

Für das Screening der ESBL-Bildner muss ein Indikator-Chephalosporin eingesetzt werden, das von den meisten ESBL-Varianten hydrolysiert wird. Hierbei wurde Cefpodoxim als das beste Antibiotikum für diesen Zweck gefunden (119). Mit diesem zusammen können auch Ceftazidim und Cefotaxim eingesetzt werden. Gegenüber Cetazidim sind alle TEM- und SHV-ESBL-Varianten resistent. Und nur manche CTX-M-Enzyme können Ceftazidim spalten. Dahingegen sind alle CTX-M-Enzyme gegenüber Cefotaxim resistent, und nur manche TEM- und SHV-ESBL-Varianten können Cefotaxim spalten.

Für das Screening der ESBL-Bildner gibt es unterschiedliche kommerziell erhältliche chromogene Medien, wie z.B. chromID[®] ESBL (bioMérieux, Lyon, France), Brilliance[™] ESBL (Oxoid, Hampshire, United Kingdom), und BLSE Agar als bi-Platte (AES Chemunex, Bruz, France). ChromID[®] ESBL und Brilliance[™] ESBL basieren auf einer reichhaltigen Nährstoffbasis und auf einer Antibiotikamischung (für die Inhibition des Wachstumes der grampositiven Bakterien und Hefepilze) mit Cefpodoxim. Dieses Antibiotikum gilt als „Marker der Wahl“ für den ESBL-Resistenzmechanismus. Der Abbau des chromogenen Substrates in Nährmedium resultiert in farbigen Kolonien. BLSE Agar ist eine kommerziell erhältliche bi-Platte aus zwei Selektivmedien: Drigalski und MacConkey. Ersteres ist mit Cefotaxim (1,5 µg/mL) und zweites mit Ceftazidim (2 µg/mL) angereichert (54; 119; 141).

Einleitung

Willems et al. haben diese drei chromogenen Medien für das Screening der ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* direkt mit biologischem Material evaluiert. Laut dieser Studie hatten Brilliance™ ESBL und BLSE Agar eine höhere Sensitivität (88 %) als chromID® ESBL (81 %). In Bezug auf die Spezifität war die Differenz zwischen chromID®- und Brilliance™ ESBL nicht signifikant (81 % und 82 %). Die Spezifität von BLSE Agar war niedrig: 61 % (141). Im Vergleich zu anderen Studien (67; 119; 141) waren in dieser Studie die Sensitivität und Spezifität von chromID® ESBL und Brilliance™ ESBL niedriger. Die Sensitivität von BLSE Agar war vergleichbar mit der Sensitivität, die in der Studie von Reglier-Poupet et al. festgestellt wurde. Hier war jedoch die Spezifität niedriger (119; 141).

Für das Screening der Carbapenemase-Bildner, darunter auch für die KPC-Bildner gibt es kommerziell erhältliche chromogene Medien, wie z.B. chromID® Carba (bioMérieux, Lyon, France), Colorex KPC (Biomed Diagnostics, White City, OR, USA) und Brilliance™ CRE (Oxoid, Hampshire, United Kingdom). Diese Selektivmedien basieren auf einer reichhaltigen Nährstoffbasis (angereichert mit spezifischen Agenzien für die Inhibition des Wachstums der grampositiven- und nicht-Carbapenemase-bildenden Bakterien) und auf einer firmeneigenen Antibiotikamischung für das selektive Wachstum der Carbapenemase-Bildner. Durch den Abbau der chromogenen Substrate im Nährmedium werden die Bakterienkolonien mit verschiedenen Farben gefärbt.

In einer Studie haben Wilkinson et al. die Isolierung Carbapenemase-bildender Enterobakteriaceen mittels Brilliance™ CRE, Colorex KPC, chromID® ESBL und Prototyp chromID® Carba evaluiert (140). Es wurden 130 Carbapenemase-Bildner (darunter 12 KPC-positive Stämme) untersucht. Von diesen vier Selektivmedien hat chromID® Carba die beste Sensitivität und Spezifität gezeigt (91-96 % bzw. 76-89 %).

Obwohl chromogene Medien die schnelle Detektion von ESBL- und KPC-Bildnern direkt aus biologischem Material erlauben, sind jedoch Bestätigungstests erforderlich.

1.15.1.2 Bestätigungstests

Bei Resistenz gegenüber den Indikator-Antibiotika müssen Bestätigungstests eingesetzt werden. Die Bestätigungstests zum Nachweis der ESBL-Bildung beruhen auf der Hemmung der ESBL-Enzyme durch Clavulansäure. Dieses Test-Prinzip wird nur eingeschränkt, wenn bei Bakterienstämmen zusätzlich zu ESBLs andere β -Laktamasen gebildet werden.

Einleitung

Beispielweise führen KPC-Enzyme oder eine überproduzierte K1 β -Lactamase (KOXY) zu falsch positiven Ergebnissen. Auch kann die Bildung der AmpC-Enzyme zu falsch negativen Ergebnissen (130) führen.

Die Bestätigung der KPC-Bildung wird entweder mittels MHT oder durch die Inhibition der KPC-Enzyme von einem KPC-Inhibitor (Borsäure und deren Derivate) nachgewiesen (132).

Die Bestätigungstests werden entweder durch Mikrobouillonverdünnungstest oder durch Agardiffusionstest durchgeführt. Bei einem Mikrobouillonverdünnungstest wird die β -Laktamase-Bildung durch die Reduktion der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Zugabe des Inhibitors bestätigt. Bei einem Agardiffusionstest erfolgt die Bestätigung durch die Reduktion des Hemmhofdurchmessers mit einem β -Laktamase-Inhibitor.

Die gültigen MHK-Breakpoints bei Mikrobouillonverdünnungstests, bzw. der gültige Hemmhofdurchmesser bei Agardiffusionstests werden von EUCAST (<http://www.eucast.org>) und CLSI (<http://clsi.org>) vorgegeben.

1.15.1.2.1 ESBL-Bestätigungstests

1.15.1.2.1.1 Double-disc synergy Test (DDS)

Der Double-disc synergy Test wurde als erster phänotypischer Bestätigungstest für Detektion ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* entwickelt. Es handelt sich um einen Agardiffusionstest, bei dem auf dem inokulierten Agar die Antibiotika-Testblättchen mit Cefpodoxim, Ceftazidim, Cefotaxim, Aztreonam und Cefepim (jeweils 30 μ g) von 20 bis 30 mm Entfernung von Amoxicillin-Clavulansäure haltigen Blättchen (10 μ g Clavulansäure) platziert werden. Der Test wird dann als ESBL-positiv interpretiert, wenn der Hemmhofdurchmesser zumindest bei einem Antibiotika-Testblättchen von der Seite des Amoxicillin-Clavulansäure haltigen Blättchens vergrößert wird. Dies geschieht typischerweise in sogenannter Champagnerkorkenform oder Schlüssellochform (40; 53). Garrec et al. hatten in einer Studie publiziert, dass bei einer Disk-Entfernung von 30 mm Cefepim mit 89 % und Aztreonam mit 90 % eine relativ hohe Sensitivität zeigen. Die Spezifitäten betragen hierbei 98 % bzw. 100 %. Sensitivität und Spezifität wurden erhöht, als die Ergebnisse von Cefotaxim und Cefepim mit dem Ergebnis eines dritten Cephalosporines der 3. Generation in Betracht gezogen

Einleitung

wurden (96 % und 98 %). Die Reduktion der Disk-Distanz auf 20mm erhöhte die Sensitivität von Cefepim und Aztreonam auf bis zu 100 %. Für Cefotaxim, Ceftazidim und Cefpodoxim blieb die Sensitivität hingegen niedrig. Die Kombination von zwei oder drei dieser Antibiotika erhöhte die Sensitivität allerdings auf bis zu 100 % (53).

Die Antibiotika-Testblättchen werden routinemäßig mit einem Disk-Verteiler 30mm entfernt voneinander platziert. Ist das Ergebnis bei einem Testblättchen zweideutig, muss ein weiterer manueller Test mit geringerem Plättchen-Abstand durchgeführt werden (40).

1.15.1.2.1.2 Combined-disc Methode

Bei dieser Methode handelt es sich um einen Agardiffusionstest, wobei entsprechende Antibiotika-Testblättchen *mit-* und *ohne* Clavulansäure auf dem inokulierten Mueller-Hinton Agar platziert werden. Nach einer Bebrütung von 16-24 Stunden bei 37°C werden die Testergebnisse nach den Anweisungen des Herstellers interpretiert (40). Bei Oxoid-Testblättchen wird beispielsweise bei einer Vergrößerung des Hemmhofdurchmessers von mindestens 5 mm durch Clavulansäure der Stamm als ESBL-positiv wahrgenommen. In der Studie von Garrec et al. hatten Cefepim + Clavulansäure-haltige Testblättchen mit 89 % die höchste Sensitivität und solche mit Ceftazidim + Clavulansäure mit 91 % die höchste Spezifität. Die Kombination von Cefotaxim + Clavulansäure mit Cefepim + Clavulansäure erhöhte die Sensitivität auf bis zu 96 %, die Spezifität blieb mit 84 % jedoch gering (53).

1.15.1.2.1.3 E-Test

Im E-Test wird ein Kunststoffträgermaterial benutzt, das aus zwei Teilen besteht: Eine Hälfte enthält einen Cephalosporin-Gradienten und die andere Hälfte den gleichen Cephalosporin-Gradienten plus Clavulansäure in konstanter Konzentration. Es gibt drei kommerziell erhältliche E-Tests, und zwar mit Cefotaxim, mit Ceftazidim, und mit Cefepim (die Konzentration von Clavulansäure ist 4 mg/L). Der Test wird als ESBL-positiv bewertet, wenn der MHK-Wert mit Clavulansäure drei Titer-Stufen (bzw. $MHK \geq 8$) niedriger ist als ohne Clavulansäure (40). Laut der Studie von Garrec et al. hatte der E-Test mit Cefepim die höchste Sensitivität und Spezifität gezeigt, jeweils 90 % und 89 %. In dieser Studie sind fünf falsch-negative Ergebnisse mit SHV-12-produzierenden *E. cloacae* und ein unklares Ergebnis

Einleitung

mit CTX-M-produzierenden *K. pneumoniae* ermittelt worden. Die Kombination von mehr als einem ESBL E-Teststreifen erhöhte die Sensitivität nicht (53).

1.15.1.2.1.4 Automatisierte Methoden – Vitek[®] 2-, Phoenix[®]- und MicroScan[®] WalkAway-96-System

Das Prinzip der Synergie zwischen den Oxyimino-Cephalosporinen und Clavulansäure wurde erfolgreich eingesetzt, um automatisierte Analysesysteme, wie Vitek[®] 2, Phoenix[®] und Microscan[®] WalkAway-96 System zu entwickeln.

Vitek[®] 2-System: Bei dieser Methode handelt es sich um eine automatisierte Methode, die auf der gleichzeitigen Testung von drei unterschiedlichen Antibiotika *mit* und *ohne* Clavulansäure beruht. Die Messkarten enthalten Cefepim, Cefotaxim und Ceftazidim allein und in Kombination mit Clavulansäure. Nach der Inokulation werden die Karten in die Vitek[®] 2 Maschine eingesteckt. Die Trübung wird für jedes Antibiotikum in regelmäßigen Intervallen gemessen. Die logarithmische Reduktion des bakteriellen Wachstumes in den wells *mit* Clavulansäure wird mit denen *ohne* Clavulansäure verglichen. Die Ergebnisse werden dann durch ein computerisiertes Expertensystem (Advanced Expert System) als ESBL-positiv oder -negativ interpretiert (40).

Phoenix[®]-System: Hierbei handelt es sich um eine andere automatisierte Methode zur Bestimmung der ESBL-Bildung bei Bakterien. Die Messkarten von Phoenix enthalten fünf Wells mit unterschiedlichen Cephalosporinen *mit* oder *ohne* Clavulansäure:

- Cefpodoxim
- Ceftazidim
- Ceftazidim mit Clavulansäure
- Cefotaxim mit Clavulansäure
- Ceftriaxon mit Clavulansäure

Die Ergebnisse werden durch das computerisierte System interpretiert (40).

MicroScan[®] WalkAway-96 System: Diese ist eine weitere automatisierte Methode zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz. Für die Detektion der ESBL-Bildner werden im MicroScan[®] WalkAway-96 System Cefpodoxim (4 µg/ml) und Ceftazidim (1 µg/ml) *mit* und

Einleitung

ohne Clavulansäure eingesetzt. Die Messergebnisse werden durch das MicroScan LabPro Expert System interpretiert (70).

Espinar et al. hatten 182 *E. coli* und *K. pneumoniae*-Stämme, die schon durch das Vitek[®] 2 System als ESBL-positiv identifiziert worden waren, durch vier weitere Methoden evaluiert: zwei automatisierte Methoden (wie das Phoenix[®] System und das MicroScan[®] WalkAway-96 System) und zwei manuelle Methoden (wie Double-disc synergy Test und E-Test) (43). 23 der 182 ESBL-positiven Isolate waren nur beim Vitek[®] 2 System positiv, während 27 zusätzliche Isolate mindestens in einer Methode diskrepant waren. Diese Diskrepanz variierte zwischen 15 % und 27 %. Durch molekulare Charakterisierung hatten die Autoren gezeigt, dass diese diskrepanten Isolate für bla_{TEM}, bla_{SHV} und bla_{CTX-M} negativ waren. Daraus folgern die Autoren, dass das Vitek[®] 2 System teilweise zu falsch-positiven Resultaten führt.

Bei den E-Tests war es oft notwendig, drei Cephalosporine zu testen. Daraus resultieren die hohen Kosten der E-Tests. Die Ergebnisse des Double-disc synergy Tests waren mit 140 von 182 Isolaten zu 77 % mit den Ergebnissen des Vitek2[®] Systems konkordant. Zwischen dem Double-disc synergy Test und dem MicroScan[®] WalkAway-96- und dem Phoenix[®]-System war die Übereinstimmung 90 % (164/182 Isolate) bzw. 92 % (167/182 Isolate) (43).

1.15.1.2.1.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Massenspektrometrie für ESBL

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) ist eine relativ neue Methode, die bereits in der Routinediagnostik zur Differenzierung von Bakterien/Pilzen und der Resistenzbestimmung erfolgreich eingesetzt wird. Das Testprinzip beruht auf der Hydrolyse der β -Laktam-Antibiotika durch die β -Laktamasen und deren Hemmbarkeit durch β -Laktamase-Inhibitoren. Die Hydrolyse des β -Laktam-Rings führt zu einer Veränderung der Molekülmasse von + 18 Da. Mit Hilfe von MALDI-TOF MS werden die Massenpeaks von nicht hydrolysiertem Antibiotikum und vom Degradationsprodukt analysiert (66; 125).

Oviano et al. hatten in einer Studie analysiert, ob ESBL-Bildner direkt von positiven Blutkulturen mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden können (103). Als Substrat haben die Autoren Cefotaxim und Ceftazidim *ohne* und *mit* Clavulansäure eingesetzt. Die Sensitivität und Spezifität dieser Methode für die Detektion der ESBL-Bildner bei positiven

Einleitung

Blutkulturen betragen 99 % bzw. 100 %.

1.15.1.2.1.6 ESBL NDP Test

Dies ist ein neues, von Nordmann et al. entwickeltes Verfahren zum Nachweis der Aktivität von ESBL-Enzymen. Der Name NDP bezieht sich auf die Initialbuchstaben der Autoren (Nordmann/Dortet/Poirel), die den Test entwickelt haben. Das Testprinzip beruht auf der Hydrolyse des β Laktam-Rings eines Breitspektrum-Cephalosporins (Cefotaxim) durch β -Laktamasen mit ESBL-Aktivität. Der Nachweis der Aktivität erfolgt durch Säurebildung, die wiederum durch Farbumschlag eines pH-Indikators (Phenolrot) nachgewiesen wird. Die Reaktion wird von ESBL-Inhibitoren, wie z.B. Tazobactam, gehemmt, was als Bestätigung für die ESBL-Bildung dient (97). In einer Studie haben Nordmann et al. gezeigt, dass der NDP Test mit 100 % eine exzellente Sensitivität für CTX-M Enzyme hatte. Für TEM- und SHV-ESBL-Varianten viel der Test weniger sensitiv aus (97).

1.15.1.2.2 KPC-Bestätigungstests

1.15.1.2.2.1 Modifed-Hodge-Test

Das CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) empfiehlt für Stämme mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Carbapenem-Antibiotika, den MHT durchzuführen (6). Bei einem MHT wird eine Suspension von 0,5 MacFarland eines Carbapenem-empfindlichen Stammes von *E. coli* ATCC[®] 25992TM hergestellt. Die Suspension wird dann 1:10 verdünnt und diese auf einer Müller-Hinton-Platte ausplattiert. Ein 10 μ g Meropenem- oder Ertapenem-haltigen Testblättchen wird ins Zentrum dieser Platte platziert. Die Positiv- und Negativkontrollen (Positivkontrolle- MHT-positiv *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1705TM, Negativkontrolle- MHT-negativ *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1706TM), sowie die Testmikroorganismen werden sternförmig vom Antibiotikum-Testblättchen zum Plattenrand in einer geraden Linie aufgetragen (6). Nach der Über-Nacht-Bebrütung wird die Platte abgelesen. Ein Carbapenemase-Bildner ist in der Lage, das Antibiotikum, das aus dem Testblättchen in das Medium diffundiert, zu inaktivieren. Dadurch kann *E. coli* ATCC[®] 25992TM auf das Testblättchen zuwachsen. Das spricht für einen positiven Test, wohingegen kein Wachstum für einen negativen Test spricht.

Einleitung

In einer Studie haben Cury et al. zur Evaluierung des MHT 1521 Ertapenem-nicht-empfindliche Enterobacteriaceen analysiert. Dabei hatten sie das Vorhandensein des *bla_{KPC}*-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) untersucht (30). Die Autoren haben gezeigt, dass 98 % der MHT-positiven Isolate für ein *bla_{KPC}*-Gen positiv waren.

MHT ist zwar eine zweckmäßige Methode zur Detektion der KPC-Enzyme; allerdings kann diese Methode nicht zwischen KPC und anderen Carbapenemasen unterscheiden. Außerdem ist diese Methode zeitaufwendig (mindestens 24-48 h) (98; 132). Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass CTX-M-Enzyme und AmpC-Hyperproduktion bei Enterobacteriaceen zu einem falsch-positiven MHT-Ergebnis führen können (98; 132).

1.15.1.2.2.2 Combined-disc Methode

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Agardiffusionsverfahren, bei dem Imipenem- oder Meropenem-haltige Testblättchen (jeweils 10 µg) *ohne* und *mit* KPC-Inhibitoren auf der angeimpften Mueller-Hinton Agar Platten platziert werden. Als KPC-Inhibitoren werden die Derivate der Borsäure, wie Aminophenylborsäure (APBA) oder Phenylborsäure (PBA) eingesetzt. Nach einer Bebrütung von 18 h bei 37°C wird die Platte abgelesen. Bei einer Vergrößerung des Hemmhofdurchmessers durch APBA oder PBA um mindestens 5 mm wird der Test als KPC-positiv angenommen (132).

Tsakris et al. haben in einer Studie den Combined-disc-Test mit unterschiedlichen Derivaten der Borsäure (APBA und PBA) für die Detektion KPC-bildender Enterobacteriaceen evaluiert (132). Es wurden 112 KPC-positive- und 127 KPC-negative Isolate untersucht. Dabei wurden Imipenem- und Meropenem-enthaltende Testblättchen *ohne* und *mit* 300 µg APBA, 600 µg APBA und 400 µg PBA eingesetzt. Die Autoren konnten zeigen, dass für die Detektion der KPC-Enzyme Meropenem unabhängig von den jeweils verwendeten Derivaten der Borsäure und deren Konzentration sensitiver ist als Imipenem. In dieser Studie war die Sensitivität von Imipenem *ohne* und *mit* 300 µg APBA, 600 µg APBA und 400 µg PBA entsprechend 64 %, 82 % und 100 %. Die Sensitivität von Meropenem *ohne* und *mit* 300 µg APBA, 600 µg APBA und 400 µg PBA war entsprechend 78 %, 96 % und 100 %. Die Spezifität dieses Verfahrens betrug in dieser Studie sowohl mit Imipenem als auch mit Meropenem 98 %. Die Autoren haben gezeigt, dass mittels Combined-disc-Test mit 400 µg PBA sogar die KPC-

Einleitung

Bildner mit sehr niedrigen Carbapenem-MHKs identifiziert wurden. Nach dieser Studie ist der Combined-disc Test mit Meropenem und PBA ein zuverlässiges Verfahren für die Detektion der KPC-Enzyme (132).

1.15.1.2.2.3 MALDI-TOF MS für KPC

Wie schon im Kapitel 1.13.1.2.7 erwähnt, kann die MALDI-TOF MS Technologie erfolgreich in der Routinediagnostik eingesetzt werden, um die β -Laktamase-Aktivität bei Bakterien nachzuweisen. In einer Studie haben Johansson et al. die MALDI-TOF MS für die Detektion der KPC-Enzyme und deren Differenzierung von Metallo- β -Laktamasen (NDM und VIM) in *K. pneumoniae*-Isolaten evaluiert (72). Als Substrat für den Nachweis der Carbapenemase-Aktivität verwendeten sie Ertapenem und die hydrolytische Aktivität der KPC-Enzyme wurde durch APBA gehemmt. Die Autoren haben gezeigt, dass MALDI-TOF MS eine effektive und schnelle (45-150 min, einschließlich der Vorbereitungsschritte, der Inkubation und der MALDI-TOF Analyse) Technologie für die Verifizierung der Carbapenemase-Bildung und für die Differenzierung der KPC-Enzyme von anderen Carbapenemasen ist.

1.15.2 Genotypische Methoden

Genotypische Methoden ermöglichen die Identifizierung verschiedener β -Laktamasen und die Bestimmung des präzisen Genotyps der einzelnen Enzyme. Mit Hilfe von molekularen Techniken können auch die „low level“ exprimierte Resistenz-Gene nachgewiesen werden. Die PCR-Amplifikation und Sequenzierung der *bla*-Gene bleiben der Gold-Standard für die Identifizierung der *bla*-Gene (4; 31; 54). In der Literatur finden sich unterschiedlich gut etablierte PCRs für den Nachweis der ESBL- und KPC-Enzyme. Universale Primer erfassen nahezu alle Genvarianten der ESBL- und KPC-Enzyme (75; 112; 115; 146). Gesamtgenomsequenzierungen sind derzeit nur bei den epidemiologischen Fragestellungen relevant.

Die in der klinischen Diagnostik verfügbare molekulare Methoden zum Nachweis von ESBL- und KPC-Bildnern beruhen weitgehend auf der DNA-Amplifikation und nachfolgender Detektion der Amplifikate durch DNA-Microarray (Check-Points Assays-Check-Points Health, Wageningen, Niederlande und Identibac AMR-ve Assays,-Alere GmbH, Köln,

Einleitung

Deutschland) oder durch ELISA (Hyplex Assays, Amplex Diagnostics GmbH, Gars-Bahnhof, Germany) (54).

Die Check-Points Assays beruhen auf der Ligation-vermittelten Kettenreaktion und auf Hybridisierung des amplifizierten Produktes mit Oligonukleotidsonden mittels Microarray. Diese werden dann vom Check-Points Tube Reader gescannt und von der zugehörigen Software interpretiert (42; 54). Diese Assays sind in verschiedenen Kombinationen zur Identifizierung von ESBLs erhältlich. Sie decken 95 % TEM-ESBLs, 77 % SHV-ESBLs, und 100 % CTX-M-Enzyme ab, die in der Lahey Datenbank beschrieben sind. „Minor ESBLs“ wie *bla_{VEB}*, *bla_{PER}* und *bla_{GES}* sind nicht im Microarray enthalten und können nicht detektiert werden. Der Check-ESBL-Assay ermöglicht die Differenzierung der Schmalspektrum TEM- und SHV- β -Laktamasen von ESBL-Varianten und die Einteilung der CTX-M-Enzyme in die phylogenetischen Gruppen 1, 2, 9 und 8/25 (54). Obwohl der Check-KPC ESBL Microarray das gleiche Detektionsprofil hat wie der Check-ESBL, es können jedoch mit Hilfe von Check-KPC-ESBL zusätzlich zu den ESBL-Genen noch *bla_{KPC}*-Gene detektiert werden. Laut Studienangaben hat der Check-KPC ESBL Microarray eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Detektion der ESBL- und *bla_{KPC}*-Gene (95-100 % und 99-100 %) (24; 54).

Der Identibac AMR-ve Assay basiert auf der linearen Multiplexen-PCR-Amplifikation und Hybridisierung der Biotin-markierten Amplifikate mit den entsprechenden Sonden im Microarray. Das hybridisierte PCR-Produkt wird mittels Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP)-Konjugat kolorimetrisch detektiert (54). Laut Studienangaben von Gazin et al. hat dieser Assay eine Sensitivität von 93 % für die Detektion der ESBLs. In der gleichen Studie konnten die ESBL-Genotypen richtig zu den ESBL-Varianten von *bla_{TEM}* (96 %), *bla_{SHV}* (29 %) und *bla_{CTX-M}* (61 %) zugeordnet werden (54).

Die Hyplex Assays (Hyplex ESBL ID, Hyplex SuperBug ID) beruhen auf der Multiplexen-PCR-Amplifikation und der Hybridisierung der Amplifikate mit Oligonukleotidsonden, die auf ELISA-Mikrotiterplatten immobilisiert sind. Die hybridisierten Komplexe werden mit Hilfe eines HRP-konjugierten Antikörpers visualisiert (54). In einer Studie haben Kaase et al. den Hyplex SuperBug ID evaluiert, wobei 132 Carbapenemase-bildende Enterobakteriaceen (darunter auch KPC-Bildner) untersucht wurden. Die Ergebnisse stimmten in 96,7 % der Fälle mit den Ergebnissen der PCR und Sequenzierung überein (74).

Einleitung

Die PCR-Microarray-basierten Techniken benötigen jedoch bakterielle-DNA als Template, und sind somit auf kultur-basierte Methoden angewiesen. Die molekularen Methoden bleiben für die Routinediagnostik teuer und zeitaufwendig (54; 97).

1.16 Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS)

Proteine erfüllen zahlreiche Funktionen und spielen dabei eine zentrale Rolle in fast allen Prozessen in einer lebenden Zelle (68). Es gibt unterschiedliche Isolierungs- und Analysemethoden; die Isolierung und Analyse von Proteinen aus Proteinmischungen sind in der chemischen Proteomik sehr wichtige Fragestellungen. Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS) ist eine neue innovative Technologie entwickelt von der Fa. caprotec™ bioanalytics GmbH. Diese Methode ermöglicht die selektive und funktionelle Isolierung der Zielproteine durch kleine multifunktionelle Moleküle, den Capture Compounds (Fänger-Konstrukt) (41; 81). Capture Compounds sind kleine trifunktionelle Moleküle bestehend aus Selektivitätsfunktion (variabel, kann praktisch jedes beliebige biologisch aktive Kleinmolekül sein, z.B. Substrat (Analogon), Inhibitor, Medikament), Reaktivitätsfunktion (z.B. photo-reaktive aromatische Azide oder Diazirine) und Sortierfunktion (z.B. Biotin). Die Selektivitätsfunktion vermittelt eine reversible Affinitätsinteraktion zwischen Capture Compound und Zielproteinen. Anschließend bildet die Reaktivitätsfunktion nach Photoaktivierung eine kovalente Bindung mit den interagierenden Proteinen aus und die Sortierfunktion ermöglicht die Isolierung des Capture Compound – Protein – Konjugats aus der Mischung (41; 81).

Auch praktisch erfolgt die selektive Isolierung der Zielproteine durch drei Schritte. Im ersten Schritt wird das Capture Compound mit der biologischen Probe inkubiert. In dieser Phase bindet das Capture Compound durch die Selektivitätsfunktion reversibel an die Zielproteine. Im zweiten Schritt bildet die Reaktivitätsfunktion eine kovalente, irreversible Bindung mit den im ersten Schritt reversibel gebundenen Zielproteinen via UV-Bestrahlung in der caproBox™ aus. Im dritten Schritt ermöglicht die Sortierfunktion die Isolierung der Capture Compound – Zielprotein – Konjugate durch sehr starke Interaktion mit einer entsprechend modifizierten festen Phase (z.B. Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel für Biotin als Sortierfunktion). Nach dem Waschen der festen Phase können die isolierten Proteine durch gängige biochemische Methoden analysiert werden (SDS-PAGE, Western Blot, etc.). Eine

Einleitung

umfassende Analyse des isolierten Sub-Proteoms gelingt durch Massenspektrometrie nach tryptischem Verdau und flüssigkeitschromatographischer Auftrennung der resultierenden Peptide (41; 81).

Vorteile von CCMS: Für die CCMS Technologie können Proteinproben aus unterschiedlichen Materialien eingesetzt werden (z.B. Zellkultur, Bakterien, Pflanzen, oder Gewebe). Da der Assay nicht auf der Umwandlung des Substrates basiert, müssen die Zielmoleküle nicht unbedingt aktive Enzyme sein (41).

Die CCMS Technologie ergänzt und verbessert andere traditionelle Anreicherungs-Methoden wie Affinitäts-Anreicherung durch die kovalente Bindung zwischen Capture Compound und Zielproteinen in der Photo-Crosslinking Reaktion (41).

Der Selektivität des Capture-Prozesses kann durch die Zugabe des Competitors (das freie Molekül der Selektivitätsfunktion) auf Spezifität kontrolliert werden (41).

Durch Photo-Crosslinking hat man die Möglichkeit auch Proteine mit relativ geringer Affinität, sowie niedrig abundante Proteine aus komplexen Molekülgemischen zu isolieren bzw. anzureichern und weiter zu untersuchen. Der Nachteil der Reaktivitätsfunktion ist, dass durch UV-Bestrahlung Proteine unspezifisch mit dem Capture Compound gekoppelt werden können; aber dieser Nachteil wird meist von dem Nutzen der Reaktivitätsfunktion übertroffen (86).

Da das reversible dynamische Gleichgewicht zwischen Selektivitätsfunktion und Zielproteinen im UV-Crosslinking-Schritt „eingefroren“ /fixiert/ irreversibel stabilisiert wird, kann man Informationen über die K_d -Werte zwischen Ligand und mit ihm wechselwirkende Proteine erlangen (34).

Durch CCMS können z.B. mit einem Medikament interagierende Proteine direkt aus einer biologischen Probe identifiziert werden und dadurch können unvoreingenommene Schlussfolgerungen gezogen werden, welche molekulare Signalwege von dem Medikament beeinflusst werden können (47).

Die Vorteile der CCMS Methode geben Anlass diese Technologie in der medizinischen Mikrobiologie zu verwenden. Weil als Selektivitätsfunktion fast jedes beliebige Kleinmolekül in der Struktur des Capture Compounds eingebaut werden kann, ist es möglich, unterschiedliche Konstrukte zu entwerfen und mit diesen unterschiedliche Zielproteine aus

Einleitung

bakteriellen Zellen zu adressieren. Diese Vorteile machen die Methode interessant im Vergleich zu den o.g. etablierten Methoden, die alle Kultur-basiert sind.

Eine Möglichkeit für eine relevante Verwendung der CCMS Technologie in der medizinischen Mikrobiologie, ist die Methode für die Untersuchung molekularer Resistenzmechanismen in Routinediagnostik und Grundlagenforschung einzusetzen. So kann ein Capture Compound konstruiert werden, bei dem als Selektivitätsfunktion ein Molekül eines β -Laktam-Antibiotikums mit hoher Affinität zu β -Laktamasen und Penicillin-bindenden-Proteine eingebaut ist. Da β -Laktamasen aus gramnegativen Organismen gewöhnlich sekretiert (ausgeschleust) werden – besonders wenn Antibiotika in der Umgebung anwesend sind (96) – könnte man mit solch einem Konstrukt im Prinzip Resistenzenzyme direkt aus biologischem Material, z.B. aus Blut oder Stuhl, isolieren und mittels Massenspektrometrie charakterisieren.

Fragestellung

2. Fragestellung

Die Entwicklung neuer, präziser und schneller Nachweismethoden zur Detektion von ESBL-Bildnern ist eine wichtige Voraussetzung für die Bekämpfung der sich rasch ausbreitenden ESBL-Genotypen (43). Die konventionellen phänotypischen Methoden zum Nachweis der ESBLs (wie E-Test oder Combined-disc-Test) sind zeitaufwendig, sie brauchen meist eine Übernacht-Inkubation. Die bestehenden genotypischen Methoden, wie Microarrays, sind präziser; aber dennoch benötigen sie mindestens 7 Stunden und sind relativ teuer (142).

Ziel dieser Arbeit war die Erprobung der CCMS Technologie für die Anreicherung/Isolierung und Charakterisierung von ESBL- und KPC-Enzymen mit der Perspektive, auf dieser Basis einen schnellen und preisgünstigen Nachweis dieser Enzyme direkt aus klinischem Material zu etablieren. Die Arbeit wurde in Kooperation mit Fa. caprotec bioanalytics GmbH durchgeführt, dem Halter des Patentes dieser Technologie. Zu diesem Zweck wurde bei Fa. caprotec bioanalytics GmbH ein neues Fänger-Konstrukt (Capture Compound) für β -Laktamasen konstruiert und synthetisiert. In diesem Konstrukt wurde Meropenem als Bindungspartner für β -Laktamasen eingebaut. Die Bindung des neu synthetisierten Konstruktes – Mero-CC – an die β -Laktamasen wurde erst mit gereinigten, rekombinanten β -Laktamasen untersucht. Danach wurde das Konstrukt mit den Zellysaten klinischer Isolate analysiert. Dafür wurden 175 ESBL-bildende Enterobakteriazeen Isolate von den klinischen Standorten der Charité-Universitätsmedizin Berlin asserviert. Mittels PCR wurden die ESBL-Genotypen identifiziert.

Nach den Capture Experimenten wurden die Capture Compound – Zielprotein – Konjugate zunächst durch SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie (MS) charakterisiert. Zwei Isolate wurden zur Verifizierung phänotypischer Methoden mittels Gesamtgenomsequenzierung (GNS) auf das Vorhandensein von *bla*-Genen untersucht.

Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Für diese Arbeit wurden 175 ESBL-bildende Enterobakteriazeen (118 *E. coli*-, 49 *K. pneumoniae*-, 5 Isolate *K.oxytoca*- und 3 *P. mirabilis*-Isolate) aus Routine-Kulturen im Zeitraum von September 2011 bis Januar 2012 in der Labor Berlin Charité Vivantes GmbH konsekutiv gesammelt. Die Isolate wurden meist aus klinischen Proben wie Urin, Wunden, Sekreten, Blutkulturen und Punktaten gewonnen. Die Speziesidentifizierung und die Untersuchung auf der ESBL-Bildung wurden unter der Leitung von Privatdozent T. Adam durchgeführt. Sie wurden während der gesamten Arbeit im CryoBank-System™ bei -80°C gelagert. Für die An- und Weiterzüchtung der Bakterien wurden Columbia Schafblut Agar und chromID ESBL Platten benutzt.

Tabelle 1: ESBL-positive Enterobakteriazeen, die aus der Routinediagnostik für diese Arbeit gesammelt wurden

Spezies:	Anzahl der Stämme:
<i>Escherichia coli</i>	118
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
<i>Proteus mirabilis</i>	3
Summe:	175

3.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Material und Methoden

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammonium Bicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim ($\geq 99\%$)
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Avibactam	Hözeldiagnostika, Köln
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Cefotaxim Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Clavulanate Kalium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
Doripenem	Hözeldiagnostika, Köln
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Invanz-Ertapenem	Heppenheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
KoAc	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilch Pulver	Kaufland, Berlin
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Mg(OAc) ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mercaptoetanol	Roth, Karlsruhe
Meropenem	Sigma-Aldrich, Steinheim

Material und Methoden

Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Midori Green	Biozym, Hessisch Oldendorf
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Nitrocefin	Merck, Darmstadt
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol rot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau-S Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Tazobactam Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tris-base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.3 Puffer und selbst gegossene Medien

Tabelle 3: Puffer und selbst gegossene Medien

Puffers und selbst gegossene Medien	Herstellung
Assay-Puffer, pH 7,0	0,788 g Tris-HCl, 0,5 ml 1M MgCl ₂ , 0,008g Dithiothreitol (DTT), Aqua dest. auf 500ml

Material und Methoden

Capture-Puffer	20 mM HEPES, 50 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc) ₂ , 10% Glycerin, 0.2% (w/v) Triton X-100, pH 7.5
DNA-Ladepuffer (2x)	9,5 ml Formamid, 0,4 ml 500 mM EDTA, 5 mg Bromphenolblau, 5 mg Xylencyanol FF, 0,1 ml Aqua bidest.
Elektroblot-Transferpuffer (10x)	58 g Tris-base, 29 g Glycin, 3,7 g SDS, Aqua dest. auf 1000 ml
Elektroblot-Transferpuffer (1x)	100 ml 10x Elektroblot-Transfer Puffer, 200 ml methanol, Aqua dsest. auf 1000 ml
Phosphat-Puffer pH 7,0 (1M)	61,5 ml 1 M Dikaliumhydrogenphosphat, 38,5 ml 1 M Kaliumdihydrogenphosphat
SDS-Laufpuffer (10x)	30,2 g Tris-base, 144 g Glycin, 10g SDS, Aqua dest. auf 1000 ml
SDS-Probenpuffer, pH 6,8 (4x)	200 mM Tris-HCl, 10 % SDS, 40 % Glycerol, 1,3 mM β -Mercaptoetanol, 0,2 % Bromphenolblau
TB-Medium	12 g Triptone/Peptone, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, Aqua dest. auf 900 ml, 100 ml Phosphat Puffer, 0,1 mg/ml Ampicillin
TBE-Puffer, pH 8,0 (10x)	108 g Tris-base, 55 g Borsäure, 6,42 g EDTA, Aqua dest. auf 1000 ml
TBS, pH 7,5 (10x)	60,57 g Tris-base, 87,66 g NaCl, HCl für pH-Einstellung, Aqua dest. auf 1000 ml
TBS-T	100 ml 10x TBS, 1 ml Tween-20, Aqua dest. auf 1000 ml
Waschpuffer 1 (5x)	250 mM Tris, 5 mM EDTA, 5 M NaCl

3.1.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 4: Kommerzielle Kits

Kitbezeichnung	Hersteller
Dream Taq TM PCR Master Mix (2X)	Fermentas/Thermo Scientific, Schwerte

Material und Methoden

Proteo Plus Silver Stain Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg

3.1.5 Primersequenzen

Tabelle 5: Primersequenzen

Zielgen	Primer	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Amplikongröße
<i>bla_{TEM}</i>	TEM univ F	ATGAGTATTCAACAT TTC CG	sense	851 bp
	TEM univ R	TTAATCAGTGAGGCACCTAT	antisense	
<i>bla_{SHV}</i>	SHVMP-1 F	TTCGCCTGTGTATTATCTCC	sense	750 bp
	SHVMP-1 R	TCCGCTCTGCTTTGTTATTC	antisense	
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 1	CTXM1-F3	GACGATGTCACTGGCTGAGC	sense	499 bp
	CTXM1-R2	AGCCGCCGACGCTAATACA	antisense	
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 2	TOHO1-2F	GCGACCTGGTAACTACAATCC	sense	351 bp
	TOHO1-1R	CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC	antisense	
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppen 8/25	CTXM825F	CGCTTTGCCATGTGCAGCACC	sense	307 bp
	CTXM825R	GCTCAGTACGATCGAGCC	antisense	
<i>bla_{CTX-M}</i> Gruppe 9	CTXM914F	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG	sense	474 bp
	CTXM914R	GTAAGCTGACGCAACGTCTG	antisense	

Alle Primer wurden von der Firma TIB Molbiol Berlin mit der höchsten Reinheitsstufe hergestellt.

3.1.6 Protein- und DNA-Längenmarker, Enzyme

Tabelle 6: Protein- und DNA-Längenmarker, Enzyme

Produktbezeichnung	Hersteller
--------------------	------------

Material und Methoden

Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St Leon-Rot
Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (0,5µg/µl)	Fermentas, St Leon-Rot
<i>LacBuster</i> - rekombinante β-Laktamase	Eucodis Bioscience, Wien
<i>LACTB</i> (β-Laktamas, EC 3.5.2.6)	Prospec-Tany TechnoGene Ltd., Israel
<i>Penase</i> - rekombinante β-Laktamase	Eucodis Bioscience, Wien
Protein Marker Page Ruler Plus	Thermo Scientific, Schwerte

3.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti-Maus Antikörper (HRP)	1:1000	Thermo Scientific, Schwerte
anti-TEM-1 β-Laktamase Antikörper	1: 100	Thermo Scientific, Schwerte

3.1.8 Nährmedien und Seren

Tabelle 8: Nährmedien, Seren und Zusätze

Nährmedien/Seren/Zusätze	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ChromID ESBL Agar	bioMérieux, Nürtingen
Columbia Schafblut Agar	Oxoid, Wesel
Cryobank	Mast, Amiens

3.1.9 Geräte und Plastikwaren

Material und Methoden

Tabelle 9: Geräte und Plastikwaren

Gerät/ Plastikware	Hersteller
200 µl PCR-Reaktionsgefäße	Thermo Scientific, Schwerte
Amicon Ultra-0,5 Zentrifugalfilter (Ultracel-10)	Millipore, Darmstsd
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
caproBox™	caprotec bioanalytics, Berlin
caproMag™	caprotec bioanalytics, Berlin
Einmal Küvetten 1,5 ml	Brand, Wertheim
Eppendorf 5415 C Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf 5418 R Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
G Box F3	Syngene, Cambridge
Gefrierschrank -80 (New Brunswick)	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank -20	Liebherr, Rostock
Heraeus Megafuge 1.0 R Zentrifugen	Thermo Scientific, Schwerte
Horizontale Gelelektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen
Impföse	Copan, Brescia
Kühl-Zentrifuge Hettich Universal 320 R	Hettich, Tuttlingen
Mikrotiterplatte	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Mini-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
MS 3 basic Schüttler	IKAWerke, Staufen
Multisteppipette	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Petrischalen

Material und Methoden

Pipetten (serol.) 5, 10, 25 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Pipetten versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenleser	Tecan, Männedorf
Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15/ 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Sicherheitswerkbank	Millipore, Darmstsd
SMART CARRIER STATION (SCS)	bio-Mérieux, Nürtingen
Spectronic 20+	Milton Roy, Ivyland PA
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbehandlungsgerät, Sonifer 250	Branson, Danbury
Vitek [®] -DensiCheck	bio-Mérieux, Nürtingen
Vitek [®] 2 Gerät	bio-Mérieux, Nürtingen
Western-Blot Kammer	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
xcell sureLock [™] Mini-Cell Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.10 Sonstiges

Tabelle 10: Sonstiges

Material	Hersteller
0,45 % Natriumchlorid (NaCl)	bio-Mérieux, Nürtingen
Bakterinelysat	Im-Hause hergestellt

Material und Methoden

Mero-CC Capture Compound	caprotec bioanalytics, Berlin
Dynabeads [®] MyOne [™] Streptavidin C1	Life Technologies, Darmstadt
Glaswaren	Schott Duran, Wertheim/Simax, Selb
IRDye-800CW-Streptavidin	LI-COR Biosciences, Lincoln Nebraska
Nitrocellulose-Membran Protran [®]	Roth, Karlsruhe
Pehanon pH-Streifen	Macherey-Nagel, Düren
Pro-Gele Tris-Glycin 4-20 %, 1 mm, 15 Bahnen	Anamed, Berlin
Vitek [®] -Identifikationskarte GN	bio-Mérieux, Nürtingen
Vitek [®] -Resistenzkarte AST-116	Bio-Mérieux, Nürtingen
Vitek [®] -Resistenzkarte AST-248	bio-Mérieux, Nürtingen
Zirkonium Beads	Roth, Karlsruhe

3.2 Methoden

3.2.1 Keimidentifikation und Bestimmung des Resistenzphänotyps mit Vitek[®] 2 und Mikrobouillondilution

3.2.1.1 Keimidentifikation und Resistenztestung mit Vitek[®] 2

Es handelt sich um eine automatische Identifizierung und Resistenzbestimmung von schnellwachsenden grampositiven und gramnegativen Bakterien. Die Identifizierungsergebnisse der Analyse von biochemischen Reaktionen der getesteten Spezies liegen mit dem Vitek[®] 2-Gerät bei Bakterien bereits in 4 bis 8 Stunden vor. Die Resistenztestungsergebnisse sind zu über 80 % nach 6 bis 10 Stunden verfügbar. Das Vitek[®] 2-Gerät kombiniert die Arbeitsgänge Probenvorbereitung, Testkartenbeimpfung sowie Inkubation und Lesen der Testkarten.

Material und Methoden

3.2.1.1.1 Das Testprinzip der Keimidentifikation mit Vitek[®] 2

Die Identifizierungskarte für gramnegative Bakterien (ID-GN) des Vitek[®] 2-Systems identifiziert klinisch relevante Glukose-fermentierende gramnegative Bakterien und Nonfermenter. ID-GN basiert auf etablierten biochemischen Testmethoden. Die Karte enthält 41 biochemische Tests, Kohlenhydrat-Tests und Decarboxylase-Tests. Die Ergebnisse erscheinen in Form von „+“, „-“ oder „?“ . Ein „?“ bedeutet, dass Testreaktionen so nahe am Schwellenwert liegen, dass sie nicht eindeutig als positiv oder negativ bewertet werden können. Wenn ein Identifizierungsmuster einer Spezies nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird eine Liste mit anderen in Frage kommenden Spezies angegeben, oder es erscheint die Anmerkung, dass der Stamm nicht innerhalb der vorhandenen Datenbank identifizierbar ist. Weiterhin werden Vorschläge für Zusatztests gemacht, die durchgeführt werden können (z. B. der Oxidase-Test, Indol- u. Pigmentbildung u.a.). Reichen diese Tests nicht aus, um die Identifizierung abzuschließen, müssen zusätzlich konventionelle Identifizierungstests durchgeführt werden. Am Ende des Identifizierungsprozesses vergibt Vitek[®] 2 eine Zuverlässigkeitsbeurteilung. Ein Identifizierungsergebnis wird akzeptiert, wenn die Zuverlässigkeitsbeurteilung „Akzeptabel“, „Gut“, „Sehr gut“ oder „Exzellent“ lautet, der T-Index-Koeffizient einen Wert von 0,25 bis 1 hat. Ein Identifizierungsergebnis wird nicht akzeptiert, wenn die Zuverlässigkeitsbeurteilung „Geringe Selektivität“, „Identifizierung nicht schlüssig“ oder „Nichtidentifizierter Keim“ ergibt und ein T-Index-Koeffizient < 0,25 vorhanden ist.

3.2.1.1.2 Das Testprinzip der Resistenzbestimmung mit Vitek[®] 2

Die Resistenzbestimmung (AST- Antimicrobial Susceptibility Testing) wird im Vitek[®] 2-System als automatische, kinetische Resistenzbestimmung von klinisch bedeutsamen aeroben gramnegativen Bakterien sowie Staphylococcus spp. Enterococcus spp. und Streptococcus pneumoniae durchgeführt. Jede Vitek[®] 2 AST-Karte enthält ein lyophilisiertes Kulturmedium sowie ausgewählte Antibiotika in mindestens drei Konzentrationen. Jede Vitek[®] 2 AST-Karte enthält 64 Mikronäpfchen und eine Wachstumskontrolle, die nur Kulturmedium enthält. Das zu testende Isolat muss in einer 0,45 %-igen NaCl-Lösung verdünnt werden, ehe es zum Rehydrieren des in der Karte enthaltenen Antibiotikums verwendet werden kann. Die Karte wird dann automatisch gefüllt, versiegelt und in das Vitek[®] 2-Inkubator-Karussell

Material und Methoden

transportiert. Das Vitek[®] 2-Gerät misst das Wachstum in den einzelnen Nöpfchen der Karte über einen definierten Zeitraum. Es findet eine Transmissionsmessung bei 660 nm statt, insgesamt 3x16 Messungen pro Nöpfchen. Der Transmissionswert in den Antibiotikumnöpfchen wird mit der jeweiligen Wachstumskontrolle verglichen. Die Wachstumsrate wird alle 15 Minuten kinetisch analysiert. Am Ende des Inkubationszyklus werden die Rohdaten mit Hilfe eines spezifischen Algorithmus als MHK-Werte für alle in der Vitek[®] 2 AST-Karte enthaltenen Antibiotika angegeben.

3.2.1.1.3 Die Durchführung der Methode

Für das Inokulum dürfen nur Bakterien aus einer Reinkultur getestet werden, die nicht länger als 24 Stunden auf geeigneten Testmedien (Columbia-Schafblut-Agar, MacConkey Agar) angezüchtet wurden. Mit einem sterilen Wattetupfer werden die Bakterienkolonien vom Testmedium abgenommen und in die 0,45 %-ige NaCl-Lösung eingerieben. Mit Hilfe einer Trübungsmessung mit dem Vitek[®] 2-DensiCheck wird eine Trübung entsprechend 0,5 bis 0,63 McFarland eingestellt. Das Teströhrchen mit der Bakteriensuspension wird auf einen Vitek[®] 2-Carrier gestellt und dieser auf die Smart Carrier Station (SCS). Der Memory Chip im Carrier dient dem Speichern von Daten und dem Übertragen dieser Daten von der SCS zum Vitek[®] 2-Gerät. An der Lade- und Entladeeinheit für Carrier wird das Vitek[®] 2-Gerät mit Carrier beladen. Im Vitek[®] 2-Gerät befinden sich 4 Transportschlitten, die dem Transport eines Carriers von einer Verarbeitungseinheit zur nächsten dienen. Nach dem Beladen eines Transportschlittens mit einem Carrier wird dieser mit Hilfe des Transportsystems zur Barcode-Leseinheit befördert. Hier werden die Daten gelesen, die in den Barcodes auf den Vitek[®] 2-Testkarten verschlüsselt sind. In der Vitek[®] 2-Dispenser-/Pipettiereinheit wird die Bakteriensuspension für AST-Karten automatisch vorbereitet. Das Vitek[®] 2-Gerät stellt sicher, dass zusammengehörige ID- und AST-Karten aus derselben Bakteriensuspension beimpft werden und ermöglicht damit eine wesentliche Zeitersparnis.

Wenn ein Transportschlitten mit einem Carrier die Füllereinheit erreicht, wird die Oberseite der Vakuumkammer auf den Transportschlitten abgesenkt. Die Pumpe erzeugt in der Kammer ein Vakuum. Der entstehende Unterdruck lässt die Luft in den Testkarten über das Transferröhrchen durch die Suspension entweichen. Nach kurzer Zeit wird langsam wieder Luft eingelassen. Durch den zunehmenden Luftdruck in der Kammer wird die Suspension in

Material und Methoden

den einzelnen Teströhrchen durch das Transferröhrchen gedrückt und in die Kanäle und Kavitäten der Testkarte hineingepresst. Die Versiegelungseinheit schließt die Arbeitsschritte im Vitek[®] 2-Gerät schließlich ab, die zum Vorbereiten der Testkarten für das Inkubieren und Lesen dienen. Während der Transportschlitten und der Carrier durch diese Einheit transportiert werden, kommt ein erhitzter Draht mit jedem der Transferröhrchen in Kontakt. Das Kunststoffröhrchen schmilzt, wodurch der größte Teil des Röhrchens von der Testkarte abgetrennt wird und in das Röhrchen fällt. Der in der Testkarte verbleibende Rest wird mit dem geschmolzenen Kunststoff versiegelt und die Karte dadurch verschlossen. Sobald die Testkarten versiegelt sind, können sie inkubiert und gelesen werden.

Das MHK-Ergebnis muss mit einer Identifizierung verknüpft werden, um die Kategorie-Interpretation zu erhalten. Ausgehend von der MHK wird auf der Basis der DIN-Grenzwerte (entsprechend der Interpretationstabelle für Deutschland „GER 1“) die Interpretation sensibel, intermediär, resistent (S, I, R) vorgenommen. Befindet sich eine Spezies nicht in der Vitek[®] 2-Datenbank, werden keine Ergebnisse freigegeben. Mit dem Advanced Expert System (AES) ist im Vitek[®] 2-System ein Softwareprogramm enthalten, das automatisch die Testergebnisse auf Richtigkeit, Plausibilität und Konsistenz überprüft, indem es sie mit einer umfangreichen, auf den neuesten wissenschaftlichen Stand befindlichen Datenbibliothek vergleicht. Die Validierung durch das AES erfolgt in verschiedenen Stufen. Die ID und MHK-Werte werden nach S, I, R-Kriterien interpretiert. Diese Ergebnisse werden zum AES-Server gesendet, wo als:

- Stufe 1 die biologische Validierung von ID und MHK erfolgt.
- Stufe 2 eventuell eine Korrektur der S, I, R-Kategorien vorgenommen wird.
- Stufe 3 das Ergebnis durch Kommentare ergänzt wird.

Das Testkartentransportsystem befördert den Transportschlitten mit dem Carrier in die Position für den Auto-Lader-Mechanismus, mit dem jede Testkarte in eine Position in das Karussell eingesetzt wird. Dort bleibt die Testkarte während des gesamten Inkubationszyklus.

Die Transmissionsoptik misst das Bakterienwachstum direkt anhand von sichtbarem Licht. Dieses Optiksysteem misst zuerst das Licht, das durch eine Kavität dringt, bevor ein signifikantes Wachstum eingesetzt hat. Die nachfolgenden Messungen folgen im 15 minütigen Abstand. Registriert wird die infolge der Trübung abnehmende Lichtmenge. Das Optik-System arbeitet mit lichtemittierenden Dioden (LEDs), die Licht der geeigneten

Material und Methoden

Wellenlänge erzeugen, sowie mit Silizium-Photozellendetektoren, die das Licht einfangen. Das System kalibriert sich selbst.

Mit Hilfe der Kartenentladefunktion werden die Testkarten nach der Messung kontinuierlich aus dem Karussell entfernt und in einem Abwurfbehälter gesammelt.

Der Abwurfbehälter kann bis zu 60 Testkarten aufnehmen. Das Gerät zählt die Testkarten im Behälter und zeigt mit einer Meldung auf dem Bildschirm an, wenn der Behälter voll ist. Ein Sensor registriert die Leerung des Behälters.

Für die Resistenzbestimmung wurde die Vitek[®]-Resistenzkarte AST-N116 benutzt. Die in der Vitek[®]-Resistenzkarte AST-N116 enthaltenen Antibiotika ist in Tabelle 11 aufgelistet. Bei Resistenz gegenüber mindestens ein von drei Cephalosporinen (Cefpodoxin, Ceftazidim, Caefotaxim) erfolgte eine Bestätigungstest mit Mikrobouillondilution.

Tabelle 11: Auflistung der in Vitek[®]-Resistenzkarte AST-N116 enthaltenen Antibiotika

Antibiotika	Antibiotika
Ampicillin	Ceftazidim
Ampicillin/Sulbactam	Cefepim
Piperacillin	Imipenem
Piperacillin/Tazobactam	Meropenem
Cefazolin	Gentamicin
Cefuroxim	Tobramycin
Cefuroxim Axetil	Ciprofloxacin
Cefoxitin	Levofloxacin
Cefpodoxim	Tigecycline
Cefotaxim	Trimethoprim /Sulfamethoxazol

Material und Methoden

3.2.1.2 Mikrobouillondilution

Der Mikrobouillondilutionstest ist eine standardisierte quantitative Resistenztestung zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die MHK (in mg/l) des zu testenden Erregers (standardisiertes Inokulum) wird in einer Bouillonverdünnungsreihe (Faktor 2) des zu testenden Antibiotikums bestimmt. Die MHK ist die kleinste Konzentration des Antibiotikums, bei der kein sichtbares Wachstum (keine Trübung der Bouillon) zu verzeichnen ist. Es handelt sich um eine Endpunktablesung, wobei eine Differenz von +/- einer Verdünnungsstufe in der Streubreite der Methode liegt.

Mehrere Kolonien einer 18-24 Stunden alten Reinkultur (*E. coli* ESBL-positiv *EARSS1528* und *E. coli* 25922 *ATCC* wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet) wurden mit einem sterilen Glasstab entnommen und in 5 ml einer 0,85 %-igen NaCl-Lösung suspendiert. Anschließend wurde diese Lösung auf McFarland-Trübung 0,5 eingestellt. Von dieser Lösung wurden 200 µl in 20 ml der 0,85 %-igen NaCl-Lösung mit Tween-80 pipettiert. Das Inokulum wurde in eine Wanne gegeben und mit Hilfe des Multipoint-Inokulators jede Vertiefung der aufgetauten Mikrotiterplatte, welche Cefoxitin, Ceftazidim und Cefpodoxim *ohne* und *mit* Clavulansäure (2 mg/l) und 3-Aminophenylboronsäure (300 mg/l) beinhalteten, angeimpft. Anschließend wurde die MHK-Mikrotiterplatte mit Deckel verschlossen und für 12–18 Stunden bebrütet. Die Inokulumkontrolle wurde auf einer Blutplatte ausgestrichen. Der Test wurde als ESBL-positiv angenommen, wenn eine Verringerung des MHK-Wertes von 3 oder mehr Stufen bei Ceftazidim und Cefpodoxim durch die Clavulansäure stattfand. Gleichzeitig soll APB keine Verringerung des MHK-Wertes verursachen und das Isolat soll Cefoxitinempfindlich sein.

3.2.2 Plasmidpräparation

Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit von Zymo Research laut Protokoll. Das Protokoll basiert auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (Birnboim, und Doly 1979), wobei durch die chaotropen Salze die selektive Bindung der freigesetzten Plasmid-DNA an eine Silikamembran vermittelt wird. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend mit 30 µl H₂O in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert und bei –20°C gelagert.

Material und Methoden

3.2.3 PCR-Amplifikation

Das Vorhandensein der *bla*-Gene wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Die PCR-Reaktionsansätze wurden unter der Sicherheitswerkbank in 0,2 ml PCR-Tubes auf Eis pipettiert. Der Reaktionsansatz bestand dabei aus dem Dream Taq™ PCR Master Mix (2X), DNase freiem Wasser (Fermentas/Thermo Scientific) und den jeweiligen Primern. 50 ng Plasmid-DNA wurden als Template in der PCR mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Es wurden *bla_{TEM}*-, *bla_{SHV}*- und *bla_{CTX-M}*-Gene durch die PCR-Amplifikation, wie zuvor beschrieben (29; 112), nachgewiesen. Die Amplifikation der *bla_{TEM}*- und *bla_{SHV}*-Gene wurde in einer Multiplex-PCR durchgeführt. CTX-M Gene wurden in vier Einzel-PCRs nachgewiesen: je eine PCR für die Gruppen 1, 2 und 9. Eine vierte PCR wurde so konzipiert, dass die Gruppen 8 und 25 amplifiziert wurden. Die Primersequenzen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 12: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes pro Probe

Reagenz	Volumen
DNase freies Wasser (Fermentas/Thermo Scientific)	11 µl
Dream Taq™ PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Primer-sense	0,5 µl
Primer-antisense	0,5 µl
Template-DNA	0,5 µl
Summe	25 µl

Die PCR-Tubes wurden in den T3 Thermocycler (Biometra) eingesetzt und die Amplifikation bei folgendem Programm gestartet:

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen der PCR zur Genotypisierung

<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-2}</i> , <i>bla_{CTX-M-8/25}</i>	<i>bla_{CTX-M-9}</i>
--	------------------------------

Material und Methoden

Initiale Denaturierung	2 min, 95°C	2 min, 95°C
Denaturierung	30 s, 95°C	30 s, 95°C
Anlagerung der Oligonukleotide	30 s, 55°C	30 s, 62°C
Strangverlängerung	30 s, 72°C	30 s, 72°C
Finale Strangverlängerung	4 min, 72°C	4 min, 72°C
Zyklen	30	30

bla_{CTX-M-1}- ein bla_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 1, bla_{CTX-M-2}- ein bla_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 2, bla_{CTX-M-8/25}- ein bla_{CTX-M}-Gen aus den Gruppen 8/25, bla_{CTX-M9}- ein bla_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 9.

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2 %) analysiert. Zur Herstellung des Gels wurden 100 ml 1x TBE-Puffer mit 2 g Agarose gemischt und bis zum Sieden in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe von 5 µl Midori Green wurde die Flüssigkeit zum Aushärten in eine Form gegossen.

Die DNA wurde im Verhältnis 1:1 mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Um die Größe der Reaktionsprodukte vergleichen zu können, wurde ein Standard in Form eines 50- und 100-bp DNA-Markers aufgebracht. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer in 1x TBE für 30 min bei 120 V. Durch die Verwendung von Midori Green, welches sich in die DNA einlagert, war es möglich, die DNA unter UV-Licht als Bande sichtbar zu machen. Abschließend wurde das Gel fotografiert.

3.2.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Vorbereitung der DNA-Sequenzierung wurde die Aufreinigung der PCR-Produkte mit einem Aufreinigungskit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Dadurch wurden für die PCR verwendete Primer, dNTP's, Polymerasen und Salze entfernt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden zwecks Sequenzierung zu LGC Genomics, Berlin, geschickt, wo die Sequenzierung mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger erfolgte (Sanger, Nicklen und Coulson, 1977).

Material und Methoden

3.2.5 Gesamtgenom Sequenzierung

Zwecks Gesamtgenom Sequenzierung wurden zwei Kontrollstämme- *E. coli* 11 und *K. pneumoniae* 11- zur Arbeitsgruppe von Prof. Lothar Wieler (Director Institute of Microbiology and Epizootics, Centre for Infection Medicine, Freie Universität Berlin) geschickt.

Die Sequenzierung wurde auf einem Illumina MiSeq Sequenzierer durchgeführt. Bei der Sequenzierung wurden paired end reads mit eine Länge von je 250 bp erzeugt. Mit den reads wurde ein de novo assembly mit Velvet und CLC Genomics Workbench durchgeführt. Diese wurden mit dem RAST Server (RAST: Rapid Annotations using Subsystems Technology.) annotiert.

3.2.6 Herstellung bakterieller Zelllysate

Mit einer sterilen Impföse wurden 4-5 Kolonien vom selektiven Festnährmedium (chromID ESBL, biomerieux) in 1 ml TB-Medium (Tabelle 3) resuspendiert. Mit dieser Keimsuspension wurde 500 ml TB-Medium inokuliert und bei 37°C unter Schütteln ungefähr 16 h inkubiert. Zuerst wurden die Zellen durch Zentrifugation (1639 x g für 20 min bei Raumtemperatur) aus dem Kulturmedium pelletiert. Das Pellet wurde zweimal in 1x PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Pellet gewogen und die gleiche Menge 1x PBS dazugegeben. Der Zellaufschuss erfolgte mit einem Ultraschall Homogenisator (output-5, cycle-30, Timer-1 min, 4°C). Diese Ultraschall-Behandlung wurde fünfmal wiederholt. Das Lysat wurde dann bei 16.873 x g für 3,5 h bei 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 3.2.7) konnten die Lysate für weitere Untersuchungen verwendet werden.

3.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der bakteriellen Zelllysate erfolgte mittels Trübungsmessung nach Trichloressigsäure (TCA)-Fällung. Zu 35µl bakteriellen Zelllysaten wurden 100 µl 37 % HCl und 25µl 20 % TCA gegeben. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer Standardkurve von Bovin Serum Albumin (BSA).

Material und Methoden

3.2.8 Photometrische Assays zur Bestimmung der β -Laktamase-Aktivität

3.2.8.1. ESB NDP Test

Der ESBL NDP Schnelltest wurde nach der Anweisung der Autoren durchgeführt (97). Mit diesem Test wurde die enzymatische Aktivität der ESBLs in den bakteriellen Zelllysaten nachgewiesen. Das Testprinzip basiert auf der Hydrolyse von Cefotaxim. Die dadurch entstehende pH-Änderung wird mit einem pH-Indikator (Phenolrot) nachgewiesen. Die Reaktion wird mit einem β -Laktamasen-Inhibitor (Tazobactam) gehemmt.

Es wurde eine 0,5 %-ige Phenolrot Stammlösung (pH 8,0) hergestellt. Durch die 1:8 Verdünnung wurde von der Stammlösung die Arbeitslösung des Phenolrotes hergestellt (pH mit 1 N NaOH auf 7,8 einstellen). Von der Arbeitslösung des Phenolrotes wurden Arbeitslösungen des Cefotaxim-Natriumsalzes *mit* und *ohne* Tazobactam hergestellt. Wobei die Konzentration des Cefotaxim Natriumsalzes 6,3 mM und die von Tazobactam 13,3 mM betragen.

Die Reaktionen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen pro Probe betrug 130 μ l. Für jeden Bakterienstamm wurden zwei Reaktionen gestartet:

- Assay-Ansatz: 30 μ l Zelllysate + 100 μ l Arbeitslösung des Cefotaxim-Natriumsalzes in Phenolrot *ohne* Tazobactam.
- Inhibitionsansatz: 30 μ l Zelllysate + 100 μ l Arbeitslösung des Cefotaxim-Natriumsalzes in Phenolrot *mit* Tazobactam.

Die Eppendorfgefäße wurden im Brutschrank bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktionen wurden mit einem Farbumschlag von rot zu gelb/orange angezeigt.

Der Test wurde modifiziert und als Tropfentest (um die eingesetzte Menge an Mero-CC zu reduzieren) direkt mit frischen Bakterienkolonien durchgeführt. Dafür wurden 1-2 frische Bakterienkolonien vom Festnährmedium auf einen Objektträger gerieben und dann in 30 μ l Arbeitslösung des Cefotaxim-Natriumsalzes in Phenolrot *mit* und *ohne* Tazobactam resuspendiert. Der Objektträger wurde schließlich erst in eine Feuchtkammer gestellt und dann in einen Brutschrank. Die Reaktionsergebnisse wurden nach 15 und anschließend nach 30 min protokolliert.

Material und Methoden

Für die Analyse von Mero-CC als Inhibitor wurden drei Inhibitionsansätze durchgeführt: mit Tazobactam, Mero-CC und freiem Meropenem, wobei Mero-CC und Meropenem wie Tazobactam in einer Endkonzentration von 13,3 mM eingesetzt wurden.

3.2.8.2 Nitrocefin-Assay

Die Aktivität der β -Laktamasen in den Zellysaten wurde durch Nitrocefin-Abbau gemessen. Nitrocefin ist ein chromogenes β -Laktam-Antibiotikum, das durch die Spaltung des Laktam-Rings von gelb nach rot umschlägt. Die Konzentration des gespaltenen Produktes in der Enzymreaktion kann photometrisch über die Absorption bei 486 nm und bei einem pH von 7,0 bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient beträgt $20500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Für die Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetik wurde die Geschwindigkeit der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Nitrocefinkonzentration nach jeder Minute für insgesamt fünf Minuten aufgenommen. Es wurden Nitrocefinkonzentrationen von 8,8 μM bis 250 μM eingesetzt. Die Messungen wurden im Assay-Puffer (Tabelle 3) bei Raumtemperatur in einer Halbmikroküvette durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 700 μl . Die Nitrocefinlösung wurde vorgelegt und die Enzymreaktion durch die Zugabe von 10 μl 1:40 verdünntem Zellysat (0,25 μl) und anschließendem Mischen gestartet. Die Reaktionen wurden mit einem Spectronic 20+ UV/Vis Photometer bei 486 nm aufgezeichnet. Bei höheren Konzentrationen des Zellysates lief die Reaktion zu schnell ab und die lineare Produktzunahme konnte nicht mehr beobachtet werden. Im Fall von rekombinant hergestellter β -Laktamase (*LACTB*, Tabelle 6) wurde das Enzym in einer finalen Konzentration von 49 nM eingesetzt. Die K_m - und V_{\max} -Werte wurden durch Auftragen im Lineweaver-Burk-Plot und anschließender linearer Regression bestimmt.

Die kompetitive Inhibition von β -Laktamasen wurde mit Meropenem durchgeführt. Um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Meropenem berechnen zu können, wurden Meropenemkonzentrationen von 1,1 μM bis 17,5 μM eingesetzt, wobei die Nitrocefinkonzentration 35 μM betrug. Mero-CC als kompetitiver Inhibitor wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 70 μM , 700 μM und 1 mM. Wegen der geringen vorhandenen Menge von Mero-CC konnte keine Konzentrationsreihe gemessen werden, um die IC_{50} bestimmen zu können. Deswegen wurde das Messvolumen der Küvette bei den Messungen von Mero-CC von 700 μl auf 400 μl minimiert.

Material und Methoden

Zur Bestimmung des K_i -Wertes des Inhibitors wurde die Cheng-Prusoff Gleichung angewendet (148):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (3)$$

3.2.8.2.1 Die Analyse des hydrolysierten Meropenems im Nitrocefin-Assay

Um die β -Laktamase-Affinität von Meropenem nach Spaltung des Laktam-Rings zu bestimmen, wurde Meropenem mit dem rekombinant-hergestellten Enzym-*LacBuster* hydrolysiert und danach im Nitrocefin Assay als kompetitiver Inhibitor eingesetzt. Die Reaktion wurde in 100 μ l Assay-Puffer (Tabelle 3) durchgeführt. Die Konzentration von Meropenem betrug 100 μ M und mit der Zugabe von 0,5 μ l *LacBuster* in einer Konzentration von 2 U/ μ l wurde die Reaktion gestartet. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in einer Amicon Ultra-0,5 Zentrifugalfilter Unit mit einer Ultracel-10 Membran für 30 min bei 16.873 x g bei 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden alle Substanzen, deren Molekulargewicht größer als 10 kDa ist (darunter auch *LacBuster*), von der Membran zurückgehalten. Das Filtrat, welches das gesplante Meropenem beinhaltet, wurde im Nitrocefin-Assay in einer Konzentration von 20 μ M eingesetzt. Die Nitrocefinkonzentration betrug 35 μ M. Als Kontrolle zu dem gespaltenen Meropenem wurde auch eine Reaktion mit dem intakten Meropenem (20 μ M) gestartet. Der Test wurde in Assay-Puffer in einer 96-well Mikrotiterplatte durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 300 μ l. Die Produktkonzentration wurde im Tecan Plattenleser bei 492 nm alle 3 Minuten innerhalb 6 Minuten und abschließend noch einmal nach einer Stunde ausgelesen.

3.2.8.2.2 Die Analyse verschiedener β -Laktamase-Inhibitoren bei unterschiedlichen Bedingungen (pH, Temperatur, Zeit) mittels Nitrocefin-Assay

Bei der Synthese und Aufreinigung des Mero-CC war die Öffnung des β -Laktam-Rings problematisch. Deswegen wurde die Stabilität von verschiedenen β -Laktamen wie Clavulansäure, Tazobactam, Meropenem, Doripenem und Ertapenem (diese werden hier als Inhibitor genannt), unter äquivalenten Bedingungen getestet, um das beste β -Laktam als

Material und Methoden

Selektivitätsfunktion für die Synthese eines neuen Capture Compounds für β -Laktamasen herauszufinden. Es wurden die Auswirkungen folgender Parameter auf die Molekülstabilität untersucht: pH, Zeit und Temperatur. Es wurden 20 mM Na_3PO_4 in 20 % Acetonitril in H_2O (pH 12,36) und 20 mM H_3PO_4 in 20 % Acetonitril in H_2O hergestellt (pH 2,04). Von den beiden Lösungen wurde eine Lösung mit pH 7,26 hergestellt. Es wurde eine 1 mM Lösung der oben erwähnten Inhibitoren in diesen drei pH-Puffern (pH 2,04; pH 7,26; pH 12,36) hergestellt. Zu jedem Reaktionsgemisch wurde 2,5 % DMSO gegeben. Diese Reaktionsgemische wurden bei folgenden Parametern inkubiert:

- Raumtemperatur: 0 Stunden, 1 Stunde, 8 Stunden
- 4°C: 1 Stunde und 8 Stunden

Es wurden auch gleichzeitig die drei pH-Puffer mit 2,5 % DMSO ohne Inhibitoren bei gleichen Bedingungen inkubiert, um zu prüfen, ob die pH-Puffer eine Auswirkung auf den Nitrocefin-Assay haben. Nach der Inkubation dieser Reaktionsgemische wurden die Reaktionsprodukte im Nitrocefin-Assay als kompetitive Inhibitoren in einer finalen Konzentration von 20 μM eingesetzt. Der Nitrocefin-Assay erfolgte wie unter Kapitel 3.2.8.2 beschrieben.

3.2.9 Capture Experimente und nachfolgende biochemische Analyse

Alle Capture-Experimente wurden laut Protokollen von caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, durchgeführt.

3.2.9.1 Das Off-Bead-Capture-Experiment

Die Capture-Experimente wurden in 200 μl PCR-Reaktionsgefäßen mit flachen Deckeln durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug insgesamt 100 μl . Es wurden pro Ansatz zum Lysat (Proteinkonzentration: 6,5 mg/ml) oder zum rekombinanten Enzym in einer Endkonzentration von 0,5 μM das entsprechende Capture Compound (Mero-CC) in einer Endkonzentration von 1, 2,5 oder 10 μM bzw. das Scaffold (Capture Compound ohne Selektivitätsfunktion) in einer Endkonzentration von 2,5 μM zugegeben. Im Competitions-Ansatz wurde Meropenem (Konzentration der Stammlösung in DMSO: 20 mM, Competitor des Mero-CC) in einer Endkonzentration von 1000, 200, 100 oder 20 μM zugegeben. Eine

Material und Methoden

entsprechende Menge DMSO wurde dem Assay-Ansatz (ohne Competitor) zugegeben. Die Reaktionsgemische wurden für die folgende Belichtung ohne Deckel für 5 min in der CaproBox (0 - 4°C, $\lambda_{\max} = 310$ oder $\lambda_{\max} = 350$ nm) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden 10 % von jedem Ansatz als Probe entnommen und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Zu den Resten der Reaktionsgemische wurde pro Ansatz 25 μl 5x Waschpuffer 1 (Tabelle 3) und danach 50 μl einer 10 mg/ml Beadsuspension (Dynabeads SA C1) zugegeben und für 2 Stunden unter Rotation bei 0-4°C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden erneut 10 % von jedem Ansatz als Probe entnommen. Die Beads und Überstände dieser Probe wurden mittels caproMag (Tool zum Sammeln der Magnetpartikel, caprotec bioanalytics, Berlin) getrennt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Von den Resten der Reaktionsgemische wurden die Beads mittels caproMag gesammelt und gewaschen: 3x mit jeweils 200 μl 1x Waschpuffer 1 (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) und anschließend mit je 200 μl ddH₂O. Bei jedem Waschschrift wurden die Beads resuspendiert und erneut mittels caproMag gesammelt. Die entnommenen Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

3.2.9.2 Protein Analytik: Massenspektrometrie. SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot

3.2.9.2.1 Massenspektrometrie

Für massenspektrometrische Analysen wurden die Beads erneut mittels caproMag gesammelt und 3x mit je 200 μl eines Acetonitril/ddH₂O-Gemisch (4:1), sowie 1x mit 200 μl ddH₂O gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Beads resuspendiert und erneut mittels caproMag gesammelt. Anschließend erfolgte eine enzymatische Fragmentierung (tryptischer Verdau) unter einer Cleanbench. Dazu wurden die Beads in 10 μl 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin in 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung resuspendiert und für 15-17 Stunden im Brutschrank bei 37°C auf einem MS 3 basic Schüttler mit einem MS 3.4 Mikrotiteraufsatz geschüttelt. Anschließend wurden die Beads mittels caproMag fixiert, die Überstände abgenommen und für 2 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Danach wurden die Überstände erneut abgenommen und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck mittels einer *miVac DNA vacuum* Zentrifuge entfernt. Die erhaltenen Proben wurden zur Analyse an die Analytik-Abteilung der

Material und Methoden

caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, übergeben.

3.2.9.2.2 SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot

Für die SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot wurden die Proben auf folgende Weise behandelt: Die nach der Bestrahlung abgenommenen Proben wurden mit 4 µl 4x SDS-Probenpuffer (Tabelle 3) versetzt, die Beads und Überstände (entnommen nach dem Bead-Inkubations-Schritt) in 8 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert bzw. mit 6 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 95-100°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese mit 4-20 % Acrylamid Fertiggradientengelen in 1x SDS-Laufpuffer (Tabelle 3) für 30 min bei 300 V.

Für die Silberfärbung wurden die Gele anschließend nach der Herstelleranweisung mit dem ProteoSilver™: High Sensitivity Silver Stain-Kit entwickelt.

Für Streptavidin-Blots zur Detektion der durch das Mero-CC biotinylierten Proteine (Mero-CC – Protein – Konjugate) wurden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine in einer Nass-Blot-Kammer auf eine Nitrocellulosemembran für 60 min bei 100 V übertragen. Dazu wurde 1x Elektroblot-Transferpuffer verwendet (Tabelle 3). Nach Ablauf des Transfers wurde die Blotmembran mit Ponceau-S angefärbt, um den Gesamtproteininhalt zu detektieren. Die Proteinbanden färbten sich rot. Dann wurde die Hintergrundfärbung der Membran mit 1 % Essigsäure entfernt und die Proteinfärbung dokumentiert. Danach wurde die Blotmembran mit reichlich Leitungswasser gewaschen und anschließend freie Proteinbindestellen der Membran mit ca. 10 ml 2 % Magermilchpulver in TBS-T (Tabelle 3) blockiert. Für die Detektion der biotinylierten Proteine wurde die Membran mit ca. 5 ml 1:500 IRDye-800CW-Streptavidin-Konjugat in 2 % Magermilchpulver in TBS-T für 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Blotmembran erst mit reichlich Leitungswasser und dann 15 min in ca. 10 ml TBS-T unter leichtem Schwenken gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurde der Waschschriff mit Leitungswasser erneut wiederholt und anschließend wurden die biotinylierten Proteine anhand der Fluoreszenz von IRDye-800CW mit der G:BOX (Syngene) detektiert. Die Blotmembran wurde anschließend für einen anti-TEM-1 Western Blot genutzt. Zur Detektion der β-Laktamase TEM-1 wurde die Blotmembran erst für 10 min mit 2 % Magermilchpulver in TBS-T und anschließend 30 min mit 1:100 anti-TEM-1 Antikörper (aus Maus) in 2 % Magermilchpulver in TBS-T unter

Material und Methoden

leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Blotmembran erst mit reichlich Leitungswasser und dann 10 min in TBS-T unter leichtem Schwänken gewaschen. Nach den Waschschritten wurde die Membran mit 1:1000 sekundärem, anti-Maus HRP-gekoppeltem (**Horse Raddish Peroxidase**) Antikörper in 2 % Magermilchpulver in TBS-T für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Blotmembran 3x für 10 min in TBS-T und anschließend einmal für 2-3 min in TBS unter leichtem Schwenken gewaschen. Danach wurde die Blotmembran mit Pierce ECL Western Blot Substrate (chemilumineszent) für 1-2 min inkubiert (gemäß der Herstelleranweisung). Die dadurch erzeugten Lichtsignale wurden mit der G:BOX (Syngene) detektiert.

3.2.9.3 Das On-Bead-Capture-Experiment

Die On-Bead-Capture-Experimente wurden in 200 µl Reaktionsgefäßen mit flachen Deckeln durchgeführt. Dafür wurde 0,7 ml einer 10 mg/ml Beadsuspension (Dynabeads SA C1) mit 2 µl einer 21,8 mM Lösung des Capture Compounds (Mero-CC) versetzt und für 5 min gut geschüttelt. Die Beads wurden danach mittels caproMag gesammelt und 2x in ca. 2 ml Capture-Puffer (Tabelle 3) resuspendiert und erneut gesammelt. Nach diesen Waschschrritten wurden die mit Capture Compound beladenen Beads in 700 µl Capture-Puffer resuspendiert. Danach wurde pro Ansatz 10 µl (100 µg Beads) oder 100 µl (1000 µg Beads) mit Capture Compound beladene Beads in 100 µl Zelllysat (Proteinkonzentration: 6,5 mg/ml, oder 100 µl rekombinantem Enzym in einer Endkonzentration von 0,25 µM) resuspendiert. Der Competitions-Ansatz enthielt freies Meropenem (Konzentration der Stammlösung in DMSO: 20 mM, Competitor von Mero-CC) in einer Endkonzentration von 200 µM. Zu dem Assay-Ansatz (ohne Competitor) wurde eine entsprechende Menge DMSO gegeben. Die Proben wurden für 2 Stunden unter Rotation bei 0-4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für die folgende Belichtung ohne Deckel 8x 2,5 min in der caproBox (0-4°C, $\lambda_{\max} = 310$) bestrahlt. Nach jeder 2,5-minütigen Bestrahlung wurden die Proben mit geschlossenen Deckeln kurz geschüttelt. Nach der Bestrahlung wurden 10 % von jedem Ansatz als Probe entnommen und anschließend mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Vom Hauptteil der Reaktionsgemische wurden die Beads mittels caproMag gesammelt und gewaschen: 3x mit jeweils 200 µl 1x Waschpuffer 1 und anschließend mit je 200 µl ddH₂O. Bei jedem Waschschriff wurden die Beads resuspendiert und erneut mittels CaproMag gesammelt. Die

Material und Methoden

weiteren Probenvorbereitungen für die massenspektrometrischen Analyse und für die SDS-PAGE bzw. Western Blot erfolgten nach der Beschreibung von den Kapiteln 3.2.9.2.1 und 3.2.9.2.2.

3.2.9.4 Das Pulldown-Experiment

Pulldown Experimente wurden ähnlich zu On-Bead-Capture-Experimenten allerdings ohne UV-Bestrahlung durchgeführt. Dafür wurde 50 µl einer 10 mg/ml Beadsuspension (Dynabeads SA C1) mit 12,5 µl 200 µM Mero-CC versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde gut gemischt (ca. 5 min), dann wurden die Beads mittels caproMag gesammelt und die Überstände verworfen. Danach wurden die Beads 3x mit jeweils 200 µl PBS gewaschen (resuspendiert und erneut mittels caproMag gesammelt). Anschließend wurden die Beads erneut in 50 µl PBS resuspendiert und in 2 PCR-Reaktionsgefäße zu jeweils 25 µl (Assay-Ansatz und Competitions-Ansatz) überführt. Zu dem Competitions-Ansatz wurde freies Meropenem (Konzentration der Stammlösung in DMSO: 20mM, Competitor von Mero-CC) gegeben. Das Meropenem hatte eine Endkonzentration von 20 µM. Zu dem Assay-Ansatz wurde eine entsprechende Menge DMSO gegeben. Danach wurde zu jedem Reaktionsansatz Zellyast gegeben, sodass das Reaktionsvolumen insgesamt 100 µl betrug. Anschließend wurden die Proben 2-3 h unter Rotation bei 0-4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads mittels caproMag gesammelt und der Überstand verworfen. Die Beads wurden 7x mit jeweils 15 µl PBS resuspendiert und erneut gesammelt. Nach jedem Waschschrift wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße für die SDS-PAGE/Western-Blot überführt. Nach dem siebten Waschschrift wurden die Beads zur Elution Meropenem-bindender Proteine 4x in jeweils 15 µl PBS + 2 mM Meropenem resuspendiert und gesammelt. Nach jedem Elutionsschrift wurden die Überstände wieder in frische Reaktionsgefäße für die SDS-PAGE/Western-Blot überführt. Für die SDS-PAGE wurden die Beads in 8 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Wasch- und Elutionsfraktionen mit 6 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 95-100°C inkubiert. SDS-PAGE und Streptavidin Blot bzw. Western Blot für die Detektion biotinylierter Proteine und der β-Laktamase TEM-1 erfolgten wie es im Kapitel 3.2.9.2.2 beschrieben ist.

3.2.9.5 Das Off-Bead-Capture-Experiment mit einer hoher Mero-CC-Konzentration

Material und Methoden

(763 μM)

Da im Nitrocefin-Assay herausgefunden wurde, dass die Affinität von Mero-CC zu β -Laktamasen im Vergleich zum freien Meropenem deutlich niedriger war, wurde ein Experiment nach dem Off-Bead Protokoll (Kapitel 3.2.9.1) durchgeführt, bei dem die Konzentration von Mero-CC 763 μM betrug. Weil die Stoffmenge an eingesetztem Capture Compound (76,3 nmol) die Kapazität der einzusetzenden Menge an Streptavidin-gekoppelten Magnetbeads (50 μl 10 mg/ml bei ca. 4 nmol/mg, d.h. ca. 2 nmol) weit überstieg, musste nach der Bestrahlung überschüssiges, nicht an Protein gekoppeltes Capture Compound abgetrennt werden. Die Trennung erfolgte durch „Proteinfällung mit Methanol/Chloroform“. Dafür wurden die Reaktionsgemische nach der Bestrahlung in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu jedem Ansatz (Assay und Competition) wurden je 80 μl Chloroform, 240 μl Methanol und 160 μl Wasser gegeben. Nach jeder Zugabe wurde gemischt. Die Proben wurden bei 21.000 x g für 10 min bei 2°C zentrifugiert. Es entstanden zwei flüssige Phasen: in der oberen Methanol mit Wasser, in der unteren Chloroform. Dazwischen befanden sich die Proteine in einer weißen Schicht. Die obere Phase wurde abgenommen, dann pro Ansatz erneut 240 μl Methanol zugegeben und geschüttelt. Anschließend wurden die Proben wieder unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde verworfen und die Pellets 5x mit je 100 μl RIPA Puffer resuspendiert und bei 21.000 x g für 10 min bei 2°C zentrifugiert. Danach wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Davon wurde 10 μl für SDS-PAGE entnommen und zum Rest je 50 μl 10 mg/ml Beadsuspension (Dynabeads SA C1) zugegeben. Die Proben wurden für 2 Stunden unter Rotation bei 0-4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads mittels caproMag gesammelt. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und davon jeweils 10 μl (Assay und Competition) für SDS-PAGE/Western Blot entnommen. Der Rest wurde bei -20° C gelagert. Die Beads wurden 2x in je 200 μl RIPA-Puffer resuspendiert und erneut gesammelt. Es folgten in Kapitel 3.2.9.1 beschriebene Waschstschritte: 3x mit 200 μl Waschpuffer 1 und 1x mit 200 μl ddH₂O. Im Anschluss wurden SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.9.2.2).

3.2.9.6 Chemische Struktur und die Synthese von Mero-CC

Zum Nachweis von β -Laktamasen im bakteriellen Zelllysate wurde ein Capture Compound

Material und Methoden

(Mero-CC) bei der Fa. caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, entworfen und synthetisiert. Wie schon in Kapitel 1.16 beschrieben, ist ein Capture Compound ein trifunktionelles Molekül, welches eine Grundstruktur aus der Reaktivitätsfunktion (RF), Selektivitätsfunktion (SF) und dem Biotin als Sortierfunktion (Pullout-Funktion) besitzt. Als Selektivitätsfunktion wurde Meropenem (ein β -Laktam-Antibiotikum aus der Gruppe Carbapeneme) verwendet. Als Reaktivitätsfunktion wurde Trifluormethylaryldiazirin verwendet, das bei Photo-Aktivierung ein Carben bildet und über einen dreiarmligen Kern (Asparaginsäure) mit Meropenem (SF) und Biotin verbunden ist. Die chemische Struktur des Mero-CC Capture Compounds ist in Abbildung 2 dargestellt.

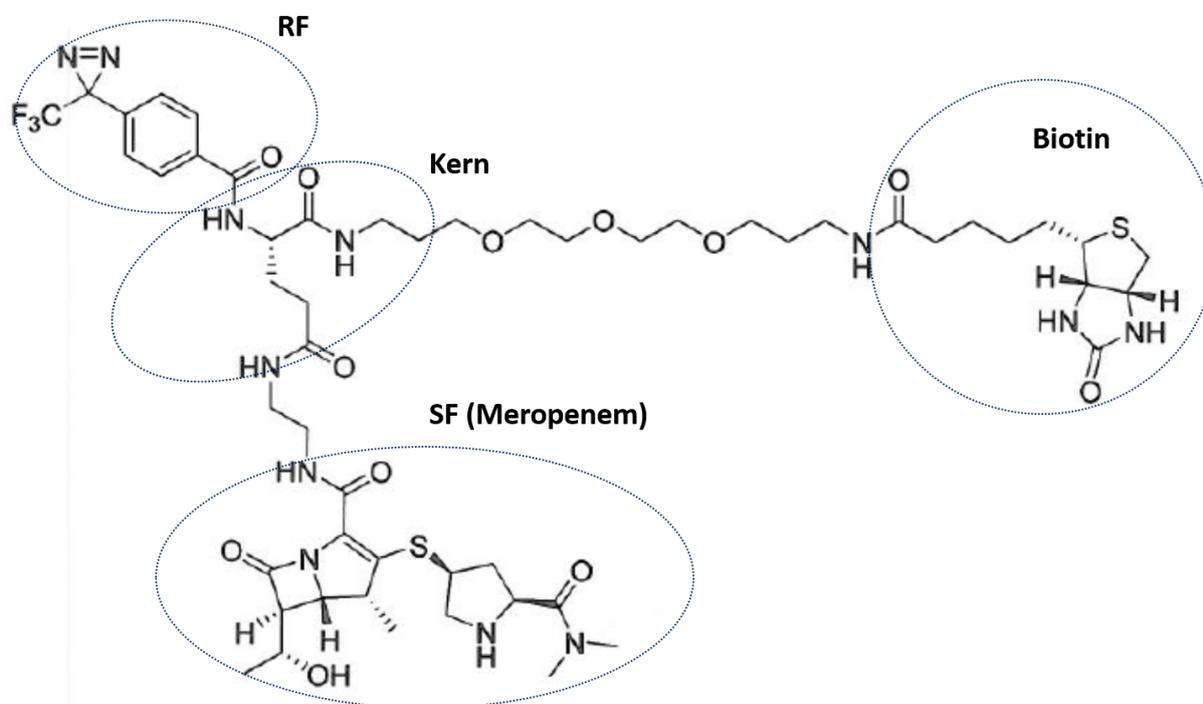


Abbildung 2: Chemische Struktur des Mero-CC.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

Es ist zu beachten, dass ein Teil der Ergebnisse bereits in einem wissenschaftlichen Artikel publiziert wurde. Deshalb ist die Darstellung eines Teiles der Ergebnisse mit der Publikation identisch. Dies betrifft auch die Diskussion der entsprechenden Ergebnisse.

4.1 Die Bakterienstämme

Die Keimidentifikation und Bestimmung des Resistenzphänotyps der für diese Arbeit gesammelten Stämme erfolgte mittels Vitek[®] 2 und der AST-N116 Karte (Kapitel 3.2.1.1). 118 Stämme wurden als *E. coli*, 49 Stämme als *K. pneumoniae*, 5 Stämme als *K. oxytoca* und 3 Stämme als *P. mirabilis* identifiziert worden. Bei allen 175 Isolaten war eine Resistenz gegenüber mindestens einem der drei Cephalosporine der 3. Generation gefunden worden. Die Bestätigung der ESBL-Bildung erfolgte mittels Mikrobouillondilutionstest (Kapitel 3.2.1.2), wobei alle 175 Isolate als ESBL-Bildner phänotypisch bestätigt wurden.

4.2 Nachweis von *bla*-Genen mittels PCR

Dem phänotypischen Nachweis der ESBL-Bildung folgte die molekulare Charakterisierung der Stämme (Kapitel 3.2.3). Bei allen 175 Isolaten wurde das Vorhandensein der Plasmid-kodierten *bla*-Gene mit Hilfe von PCR untersucht: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-Gruppe 1}, *bla*_{CTX-M-Gruppe 2}, *bla*_{CTX-M-Gruppe 8/25} und *bla*_{CTX-M-Gruppe 9}.

Von den 175 getesteten Isolaten waren 77 Isolate (44,0 %) nur für ein ESBL-Gen positiv. Davon waren 58 *E. coli*-, 13 *K. pneumoniae*-, 4 *K. oxytoca*- und 2 *P. mirabilis*-Stämme. Bei 83 (46,8 %) Isolaten wurden 2 unterschiedliche Gene nachgewiesen, hiervon waren 60 *E. coli*-, 22 *K. pneumoniae*- und 1 *K. oxytoca*-Isolate. Bei 15 Isolaten (8,6 %) wurden 3 unterschiedliche Gene nachgewiesen. Davon waren 14 *K. pneumoniae*- und 1 *P. mirabilis*-Isolate (Abbildung 3).

Abbildung 4 zeigt den Anteil der *bla*_{TEM}-, *bla*_{SHV}- und *bla*_{CTX-M}-Gene bei ESBL-bildenden *E. coli*- und *Klebsiella spp.*- und *P. mirabilis*-Isolaten.

88 (50,3 %) der ESBL-Isolate waren positiv für ein *bla*_{TEM}-Gen, davon waren 62 (70,5 %) *E. coli*-, 23 (26,1 %) *K. pneumoniae*- und 3 *P. mirabilis*-Isolate. 52,5 % aller *E. coli*-, 46,9 %

Ergebnisse

aller *K. pneumoniae*-Isolate waren positiv für ein *bla*_{TEM}-Gen.

Bei 54 (30,9 %) Isolaten wurde ein *bla*_{SHV}-Gen nachgewiesen. Von diesen 54 Isolaten waren 4 (7,4 %) *E. coli*-Isolate, 47 (87,0 %) *K. pneumoniae*-Isolate und 3 (5,6 %) *K. oxytoca*-Isolate. 3,4 % aller *E. coli* Stämme und 92,6 % aller *Klebsiella spp.* Stämme hatten ein *bla*_{SHV}-Gen.

Bei 119 (68,0 %) Isolaten wurde ein *bla*_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 1 nachgewiesen. Davon waren 90 (75,6 %) *E. coli*-Isolate, 28 (23,5 %) *K. pneumoniae*-Isolate und 1 *K. oxytoca*-Isolate. 76,3 % aller getesteten *E. coli*-Isolate und 53,7 % aller getesteten *Klebsiella spp.*-Isolate hatten ein *bla*_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 1.

Ein *bla*_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 2 wurde lediglich bei einem *P. mirabilis*-Isolat nachgewiesen.

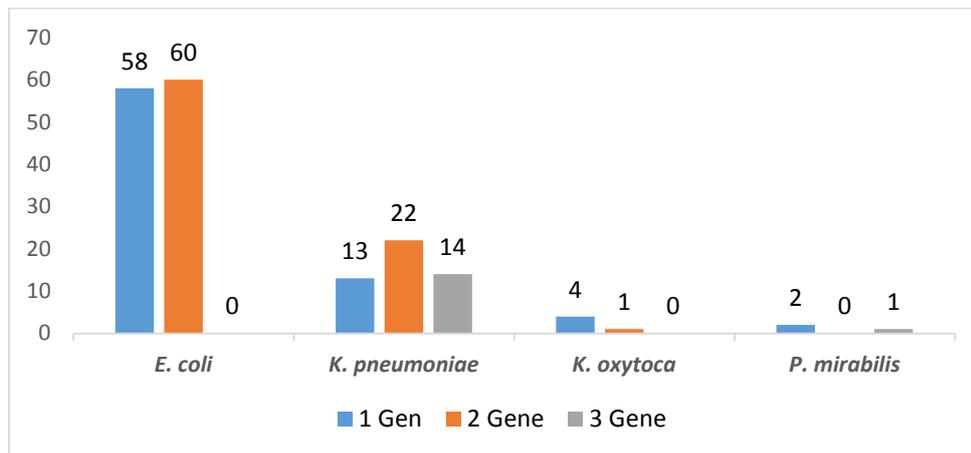


Abbildung 3: Multiples Vorkommen der *bla*-Gene bei *E. coli*-, *Klebsiella spp.*- und *P. mirabilis*-Isolaten.

Bei 24 (13,7 %) Isolaten war ein *bla*_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 9 nachzuweisen. Darunter waren 22 (91,7 %) *E. coli*-Stämme und jeweils 1 *K. oxytoca* und *P. mirabilis*-Isolat. 18,6 % der getesteten *E. coli*-Isolate waren positiv für ein *bla*_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 9.

Es wurde lediglich bei 2 (1,1 %) Isolaten ein *bla*_{CTX-M} -Gen aus den 8/25 Gruppen nachgewiesen: Ein *K. pneumoniae*- und ein *K. oxytoca*-Isolat.

Ergebnisse

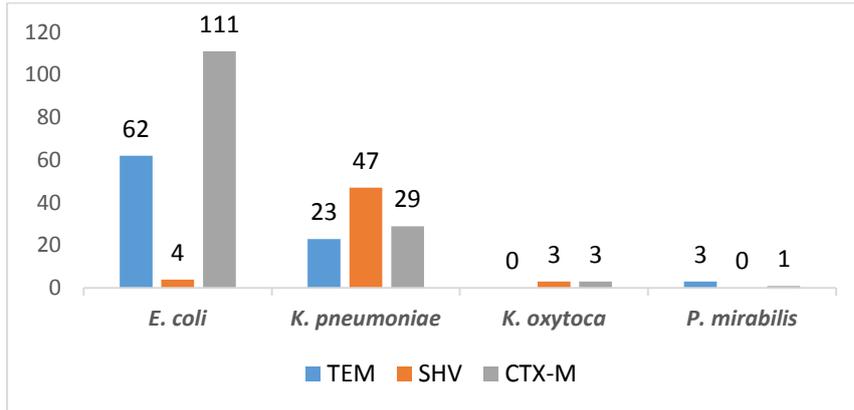


Abbildung 4: Unterschiedliche Häufigkeiten von bla_{TEM} -, bla_{SHV} - und bla_{CTX-M} -Gene bei ESBL-bildenden *E. coli*-, *Klebsiella spp.*- und *P. mirabilis*-Isolaten.

Abbildung 5 zeigt die Häufigkeit des Vorkommens der bla_{TEM} -, bla_{SHV} - und bla_{CTX-M} -Gene.

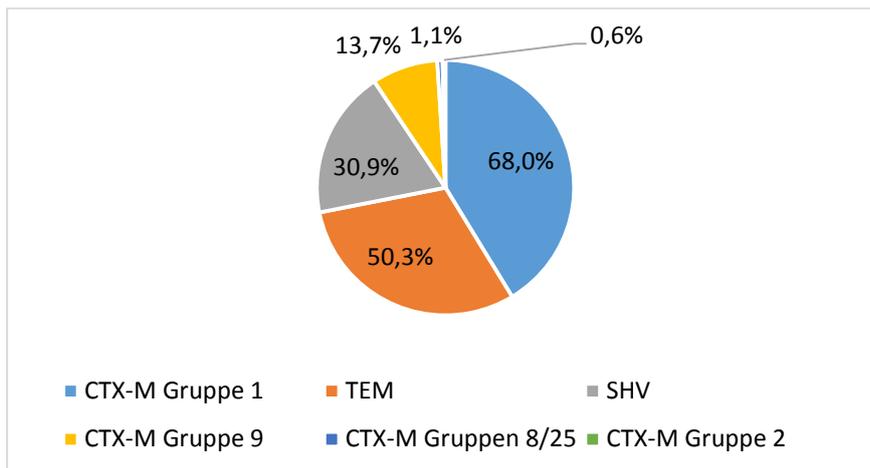


Abbildung 5: Das Vorkommen der bla_{TEM} -, bla_{SHV} - und bla_{CTX-M} -Gene.

Bei den 60 *E. coli*-Isolaten mit mehreren Resistenzgenen waren folgende Kombinationen von bla_{TEM} -, bla_{SHV} - und bla_{CTX-M} -Genen vorhanden: Bei 49 Isolaten wurde eine Kombination von bla_{TEM} + bla_{CTX-M} aus der Gruppe 1, bei 7 Isolaten eine Kombination von bla_{TEM} + bla_{CTX-M} aus der Gruppe 9, bei 2 Isolaten eine Kombination von bla_{SHV} + bla_{CTX-M} aus der Gruppe 9, bei einem Isolat eine Kombination von bla_{TEM} + bla_{SHV} und bei einem weiteren Isolat eine Kombination von einem bla_{CTX-M} aus der Gruppe 1 und einem bla_{CTX-M} aus der Gruppe 9 nachgewiesen.

Bei den 22 *K. pneumoniae*-Isolaten mit mehreren Resistenzgenen wurden eine

Ergebnisse

Kombinationen aus zwei unterschiedlichen oben erwähnten *bla*-Genen nachgewiesen: Bei 13 Isolaten war eine Kombination von *bla_{SHV}* + *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 1, bei 7 Isolaten eine Kombination von *bla_{TEM}*+ *bla_{SHV}*, und bei 2 Isolaten eine Kombination von *bla_{TEM}* + *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 1 vorhanden. Bei 14 *K. pneumoniae*-Isolaten wurde eine Kombination von diesen drei Genen nachgewiesen. Bei 13 Isolaten war eine Kombinationen von *bla_{TEM}* + *bla_{SHV}* + *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 1, und lediglich bei einem Isolat eine Kombination von *bla_{TEM}* + *bla_{SHV}* + *bla_{CTX-M}* aus den Gruppen 8/25 vorhanden.

Bei einem *K. oxytoca*-Isolat wurde die folgende Kombination aus zwei Genen nachgewiesen: *bla_{SHV}*+ *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 9.

Bei einem *P. mirabilis*-Isolat wurde die folgende Kombination aus drei *bla*-Genen nachgewiesen: *bla_{TEM}* + *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 2 + *bla_{CTX-M}* aus den Gruppen 8/25.

4.3 Auswahl eines Stammes mit einer hohen β -Laktamase-Aktivität

Die Durchführung des ESBL NDP Tests für den Nachweis der β -Laktamase Aktivität ist in Kapitel 3.2.8.1 beschrieben. Nach der Etablierung der Methode wurde das Reaktionsvolumen auf 30 μ l reduziert und als Tropfentest durchgeführt. Der modifizierte Tropfentest diente als Screening um ein hochaktives Isolat aus der für diese Arbeit gesammelten Stammsammlung zu suchen. Zu diesem Zweck wurden Isolate untersucht, bei denen mit PCR 2 oder 3 *bla*-Gene nachgewiesen wurden. Bei mindestens einem dieser Gene handelte sich um *bla_{CTX-M}*. Es waren insgesamt 75 Isolate, davon 47 *E. coli*, 26 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca* und 1 *P. mirabilis*. Die molekulare Charakterisierung der untersuchten Stämme findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Molekulare Charakterisierung der im Phenolrot-Assay untersuchten Stämme

Isolate	SHV ¹ +	SHV+	TEM ⁴ +	TEM+	TEM+	TEM+	TEM+	Total
	CTX-	CTX-	CTX-	CTX-	SHV+	CTX-	SHV+	
	M-1 ²	M-9 ³	M-1	M-9	CTX-	M-2 ⁵ +	CTX-	
					M-1	CTX-	M-8/25 ⁶	
						M-9		
<i>E. coli</i>	1	1	36	5	3	1		47

Ergebnisse

<i>K. pneumoniae</i>	10	3	13	1	26
<i>K. oxtoca</i>		1			1
<i>P. mirabilis</i>				1	1
Insgesamt					75

¹ – positiv für ein *bla_{SHV}*, ² – positiv für ein *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 1, ³ – positiv für ein *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 9, ⁴ – positiv für ein *bla_{TEM}*, ⁵ – positiv für ein *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 2, ⁶ – positiv für ein *bla_{CTX-M}* aus der Gruppen 8/25.

Als Positivkontrolle wurde die rekombinante β -Laktamase *LacBuster* und für die Negativkontrolle der Stamm *E. coli* ATCC 25922 verwendet.

Die Ergebnisse wurden nach 15- und anschließend nach 30-minütiger Inkubationszeit protokolliert. Die Stämme, die innerhalb 15 min einen Farbumschlag verursachten, waren von besonderem Interesse (26 Isolate). Von diesen 26 Isolaten waren 15 *E. coli*, 1 *K. oxtoca* und 10 *K. pneumoniae*.

Die höchste β -Laktamase-Aktivität wurde bei dem Isolat *E. coli* 11 nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte innerhalb 1-2 min (schon beim Resuspendieren der Bakterienkolonien fand der Farbumschlag statt), vergleichbar zum Reaktionsausfall bei der rekombinanten β -Laktamase. Der Stamm *E. coli* 11 wurde deshalb als Kontrollstamm für die Etablierung der CCMS-Experimente verwendet.

4.4 Der Kontrollstamm *E. coli* 11

Der Stamm *E. coli* 11 wurde von einer 61 jährigen Patientin aus Sekret der Galle isoliert. Die Patientin wurde in der Abteilung Hämatologie und Onkologie behandelt. Die ID-Identifikation und Bestimmung des Resistenzphänotyps erfolgte mittels Vitek[®] 2 (Kapitel 3.2.1.1).

4.4.1 Bestimmung des Resistenzphänotyps des *E. coli* 11-Stammes

Die MHK-Werte aus dem Vitek[®] 2 sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Bestätigung der ESBL-

Ergebnisse

Bildung erfolgte durch Mikrobouillondilution.

Tabelle 15: MHK-Daten des *E. coli* 11-Isolates für Vitek® 2 AST-N116 Karte [$\mu\text{g/ml}$]

Antibiotika	MHK	Antibiotika	MHK
Ampicillin	≥ 32	Ceftazidim	≥ 64
Ampicillin/Sulbactam	≥ 32	Cefepim	≥ 64
Piperacillin	≥ 128	Imipenem	≤ 1
Piperacillin/Tazobactam	≥ 128	Meropenem	$\leq 0,25$
Cefazolin	≥ 64	Gentamicin	≤ 1
Cefuroxim	≥ 64	Tobramycin	≤ 1
Cefuroxim Axetil	≥ 64	Ciprofloxacin	≥ 4
Cefoxitin	8	Levofloxacin	≥ 8
Cefpodoxim	≥ 8	Tigecycline	$\leq 0,5$
Cefotaxim	≥ 64	Trimethoprim /Sulfamethoxazol	≥ 320

4.4.2 Charakterisierung von *bla*-Gene des *E. coli* 11-Stammes

Nach dem phänotypischen Nachweis der ESBL-Bildung wurden mit molekularen Nachweismethoden (PCR und nachfolgender Sequenzierung, siehe Kapitel 3.2.3 und 3.2.4) bei *E. coli* 11-Stamm zwei unterschiedliche β -Laktamasen nachgewiesen. Diese waren eine TEM-1 β -Laktamase (funktionelle Gruppe 2b) und eine CTX-M-15 Extended-Spektrum β -Laktamase (funktionelle Gruppe 2be).

4.5 Analyse der Bindungsaffinität des Mero-CC Capture Compounds im ESBL NDP Test

Der ESBL NDP Test, in dem die Hydrolyse von Cefotaxim durch β -Laktamasen einen

Ergebnisse

Farbumschlag verursacht, wurde erfolgreich eingesetzt, um die Bindungsaffinität des Mero-CC Capture Compounds zu den β -Laktamasen im Zelllysate von *E. coli 11* zu untersuchen (siehe Kapitel 3.2.8.1). Die Analyse wurde mit vier Reaktionsansätzen durchgeführt: Ein Ansatz ohne Competitor und entsprechende Ansätze mit den bekannten Inhibitoren Tazobactam und Meropenem, sowie dem als Inhibitor zu testenden Mero-CC. Die Hydrolyse von Cefotaxim durch die β -Laktamasen im Zelllysate des *E. coli 11*-Isolats erfolgte augenblicklich und die Farbe im Ansatz ohne Competitor schlug von rot nach gelb um. Bei den Ansätzen mit den Inhibitoren Tazobactam und Meropenem fand kein Farbumschlag statt. Der Reaktionsverlauf beim Ansatz mit Mero-CC war derselbe wie im Ansatz ohne Competitor. Der Farbumschlag von rot zu gelb fand unmittelbar nach der Zugabe von Zelllysate statt.

Durch den Vergleich der kompetitiven Inhibition des Assays durch Meropenem oder Mero-CC konnte gezeigt werden, dass Mero-CC im Vergleich zu freiem Meropenem entweder gar keine oder eine deutlich geringere Bindungsaffinität zu β -Laktamasen aufweist. Für die visuelle Darstellung der Analyse siehe Abbildung 6.

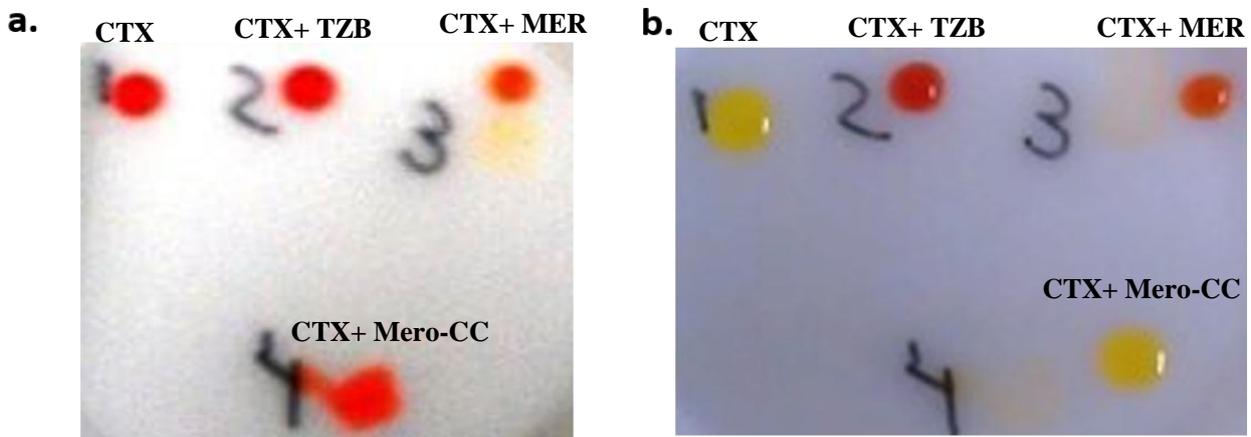


Abbildung 6: Analyse des Mero-CC Capture Compounds in ESBL NDP Test.

a: Vor der Zugabe des Zelllysates; **b:** Nach der Zugabe des Zelllysates. CTX: Cefotaxim, CTX+TZB: Cefotaxim + Tazobactam, CTX+MER: Cefotaxim + Meropenem, CTX+Mero-CC: Cefotaxim + Mero-CC.

Abbildung **b** zeigt, dass die Hydrolyse von Cefotaxim durch die β -Laktamasen des *E. coli 11*-Stammes von Tazobactam und Meropenem gehemmt wurde (kein Farbumschlag von Rot nach Gelb), während Mero-CC keine optisch sichtbare Inhibition erwirkte (Farbumschlag von Rot nach Gelb sowohl bei Positivkontrolle als auch bei Inhibitionskontrolle mit Mero-CC).

Ergebnisse

*die Farbe des Tropfens mit Meropenem war von Anfang an heller (mehr orange). Meropenem alleine führt zu einer geringen pH-Änderung.

4.6 Etablierung eines quantitativen photometrischen Assays zur Detektion der β -Laktamase-Enzymaktivität

Zur genaueren Analyse der Bindungsaffinität von Mero-CC zu β -Laktamasen wurde eine sensiblere, photometrische Messung nach Henderson et al. (63) etabliert. Als Substrat für die β -Laktamase-Aktivität im Zellysate wurde das chromogene β -Laktam-Antibiotikum Nitrocefin verwendet. Für die kompetitive Inhibition wurden freies Meropenem oder Mero-CC eingesetzt (Kapitel 3.2.8.2).

4.6.1 Die Bestimmung der Substrat-Eigenschaften von Nitrocefin und der Inhibitor-Eigenschaften von Meropenem

Für die Berechnung der Michaelis-Menten Kinetik wurden Nitrocefinkonzentrationen von 8,8 μM bis 250 μM eingesetzt und im Abstand von je einer Minute wurden die Enzym-Reaktionsgeschwindigkeiten insgesamt für 5 min in Abhängigkeit von der Nitrocefin-Konzentration photometrisch über die Absorption bei 486 nm gemessen. In Tabelle 16 sind die Angaben der photometrischen Messung aufgeführt. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) der Hydrolyse des Substrates (Nitrocefin) durch die β -Laktamasen des *E. coli* 11-Isoaltes wurden durch die Auftragung im Lineweaver-Burk Diagramm bestimmt.

Tabelle 16: Substratkonzentrationen und die Enzymreaktionsgeschwindigkeiten pro Minute in Abhängigkeit von der Nitrocefinkonzentration

Nitrocefin-Konzentrationen	Geschwindigkeit- V ($\mu\text{M}/\text{min}$)*	$1/S$ ($1/\mu\text{M}$)	$1/V$ ($\text{min}/\mu\text{M}$)
8,8	1,789	0,114	0,559
17,5	3,740	0,057	0,267
35	8,130	0,029	0,123

Ergebnisse

70	8,211	0,014	0,122
140	8,293	0,007	0,121
200	8,293	0,005	0,121
250	8,293	0,004	0,121

* - der molare Extinktionskoeffizient von hydrolysiertem Nitrocefin beträgt bei 486 nm $20500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Der Lineweaver-Burk Plot ist in Abbildung 7 dargestellt. Der R^2 Wert von fast 95 % zeigt eine gute Korrelation zwischen den Datenpunkten und der Regressionslinie. Die Zunahme von $1/S$ vergrößert $1/V$. Die Gleichung der Regressionsgeraden liefert die Informationen über die K_m - und V_{\max} -Werte des Enzymes. Der y-Achsenabschnitt ($0,0738 \text{ min}/\mu\text{M}$) ist gleich $1/V_{\max}$, daher ist $V_{\max} = 13,55 \mu\text{M}/\text{min}$. Die Steigung der Regressionslinie ($3,9786 \text{ min}$) ist gleich K_m/V_{\max} , daher ist $K_m = (V_{\max})(K_m/V_{\max}) = 53,9 \mu\text{M}$.

Für die kompetitive Inhibition der Hydrolyse des Nitrocefins durch die β -Laktamasen des *E. coli* 11-Isolates wurde Meropenem verwendet. Für die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) des Meropenems wurden Meropenemkonzentrationen

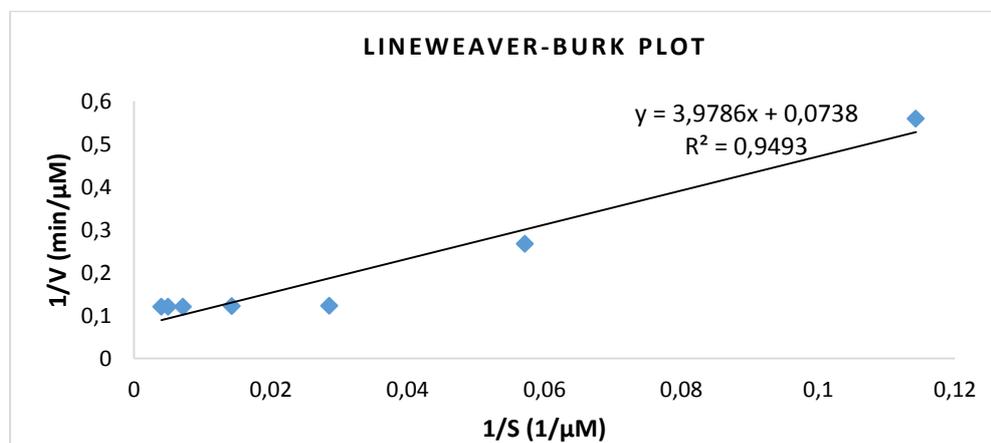


Abbildung 7: Lineweaver-Burk Plot für die Berechnung der K_m - und V_{\max} -Werte.

von $1,1 \mu\text{M}$ bis $17,5 \mu\text{M}$ im Nitrocefin-Assay eingesetzt. Das Substrat (Nitrocefin) war in einer konstanten Konzentration von $35 \mu\text{M}$ im Reaktionsansatz enthalten. Die Absorption (optische Dichte-OD) bei 486 nm wurde für insgesamt drei Minuten nach jeder Minute gemessen. Die Angaben der Messung sind in Abbildung 8 dargestellt. Aus der Kurve wird

Ergebnisse

erkenntlich, dass eine halbmaximale Inhibition (IC_{50}) der Hydrolyse des Nitrocefins bei ca. 4,4 μM Meropenem erreicht wurde.

Der K_i Wert des Meropenems (K_d des Inhibitors) wurde durch die Cheng-Prusoff-Gleichung bestimmt (148):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Nach dieser Gleichung beträgt der K_i Wert 4,6 μM .

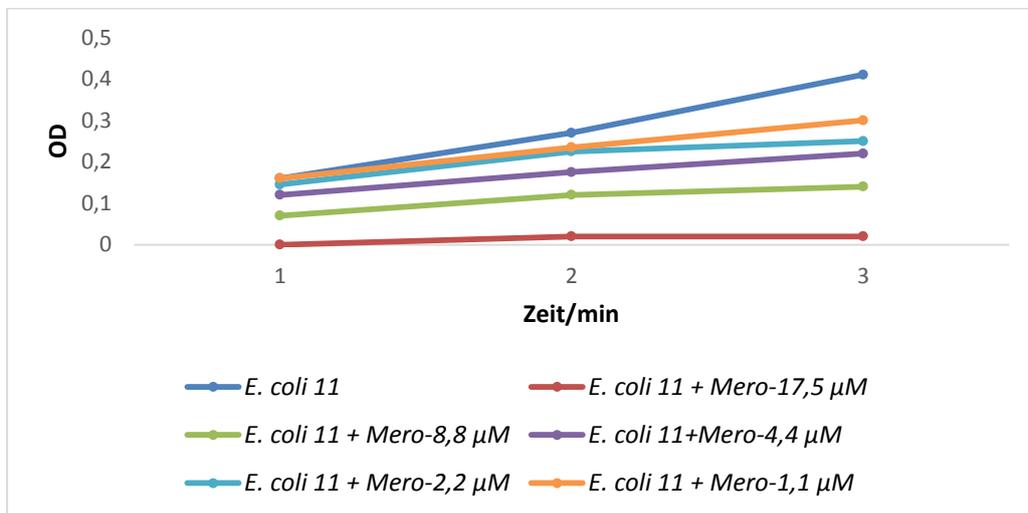


Abbildung 8: Bestimmung von IC_{50} des Meropenems.

Abbildung 8 zeigt die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von Meropenem mittels Nitrocefin-Hydrolyse durch β -Laktamasen aus dem Zellsat des Kontrollstammes *E. coli* 11.

E. coli 11- Assay-Reaktion ohne Inhibitor, *E. coli* 11 + 17,5 μM Mero, *E. coli* 11 + 8,8 μM Mero, *E. coli* 11 + 4,4 μM Mero, *E. coli* 11 + Mero-2,2 μM Mero, *E. coli* 11 + 1,1 μM Mero- sind die Reaktionsansätze mit entsprechenden Konzentrationen von Meropenem.

4.6.2 Analyse des Mero-CC Capture Compounds im Nitrocefin-Assay

Nach der Bestimmung des K_m -Wertes des Nitrocefins und des K_i -Wertes des kompetitiven Inhibitors Meropenem wurde Mero-CC (analog zu Meropenem) im Nitrocefin-Assay als kompetitiver Inhibitor analysiert. Es wurden folgende Konzentrationen von Mero-CC im Assay eingesetzt: 70 μM und 700 μM . Aufgrund der kleinen Menge des für dieses Projekt

Ergebnisse

synthetisierten Mero-CC war es unmöglich, eine Konzentrationsreihe für die Ermittlung des IC_{50} herzustellen. Daher war auch die Berechnung des K_i -Wertes des Mero-CC Capture Compounds unmöglich. Nitrocefins wurde nach dem etablierten Verfahren in einer konstanten Konzentration von $35 \mu\text{M}$ eingesetzt. Als Kontrolle zu Mero-CC wurde das freie Meropenem in einer Endkonzentration von $70 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Resultate der Analysen sind in Abbildung 9 gezeigt. Aus den Kurven wird erkenntlich, dass durch $70 \mu\text{M}$ freies Meropenem eine Vollinhibition der enzymatischen Hydrolyse des Nitrocefins durch β -Laktamasen erwirkt wurde. Bei der gleichen Konzentration erfolgte hingegen bei Mero-CC keine Inhibition. Die Enzymreaktionsgeschwindigkeit im Ansatz mit $70 \mu\text{M}$ Mero-CC war genauso schnell wie in der Reaktion ohne Zusatz von Competitor. Nur eine hohe Konzentration des Mero-CC von $700 \mu\text{M}$ hatte eine Inhibition von 14 % zufolge.

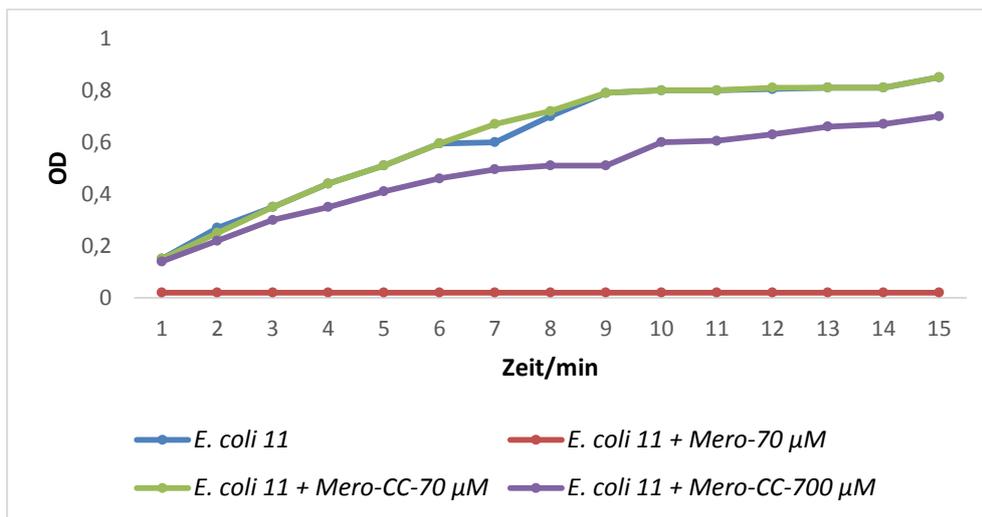


Abbildung 9: Inhibition der Hydrolyse des Nitrocefins durch $70 \mu\text{M}$ Meropenem und $700 \mu\text{M}$ Mero-CC.

E. coli 11- Assay-Reaktion ohne Inhibitor, *E. coli 11* + $70 \mu\text{M}$ Mero, *E. coli 11* + $70 \mu\text{M}$ Mero-CC, *E. coli 11* + $700 \mu\text{M}$ Mero-CC - sind die Inhibitionsreaktionen mit entsprechenden Konzentrationen von Meropenem bzw. Mero-CC.

Bei der Inhibitionsreaktion mit $700 \mu\text{M}$ Mero-CC wurde die enzymatische Hydrolyse des Nitrocefins der dritten Reaktionsminute im Vergleich zur Reaktion ohne Zusatz von Competitor zu 14 % inhibiert (Abbildung 9). 1 mM Mero-CC bewirkte eine ähnliche Inhibition (15 %) (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

4.6.3 Analyse der Bindungsaffinität von hydrolysiertem Meropenem an β -Laktamasen

Bei der Synthese und Aufreinigung des Mero-CC, in dem als Selektivitätsfunktion das Molekül Meropenem eingebaut ist, ergaben sich Schwierigkeiten bedingt durch die Öffnung des Laktam-Rings, weshalb die Ausbeute an intaktem Produkt relativ gering ausfiel. Um ggf. mit hydrolysiertem Meropenem als Selektivitätsfunktion im Mero-CC arbeiten zu können, wurde geprüft, welche Bindungsaffinität Meropenem mit geöffnetem Laktam-Ring an β -Laktamasen hat. Dafür wurde der Laktam-Ring des Meropenems mit einer rekombinant hergestellten, gereinigten β -Laktamase (*LucBuster*) hydrolysiert und dieses hydrolysierte Meropenem im Nitrocefin-Assay als kompetitiver Inhibitor eingesetzt. Für die Beschreibung der Methode siehe Kapitel 3.2.8.2.1.

Der Nitrocefin-Assay wurde nach dem etablierten Protokoll durchgeführt, wobei die Nitrocefin-Konzentration 35 μM betrug. Für die Ansätze mit (zu testenden) Inhibitoren wurden intaktes Meropenem und hydrolysiertes Meropenem, jeweils in einer Endkonzentration von 20 μM , eingesetzt. Die Konzentration des gespaltenen Nitrocefins wurde photometrisch (Absorption bei 492 nm) nach 1, 3, 6 und 60 min gemessen. Die graphische Darstellung der Analyseergebnisse findet sich in Abbildung 10. Aus diesem Diagramm ist ersichtlich, dass hydrolysiertes Meropenem im Gegensatz zu intaktem Meropenem keine signifikante Inhibition bewirkte. Die Enzymreaktionsgeschwindigkeiten beim Ansatz ohne Competitor und dem entsprechenden Ansatz mit 20 μM hydrolysiertem Meropenem waren gleich. Damit schied die Möglichkeit aus, mit chemisch leicht und damit kostengünstig herzustellenden Konstrukten zu arbeiten, die auf hydrolysiertem Meropenem als Selektivitätsfunktion basiert hätten.

Ergebnisse

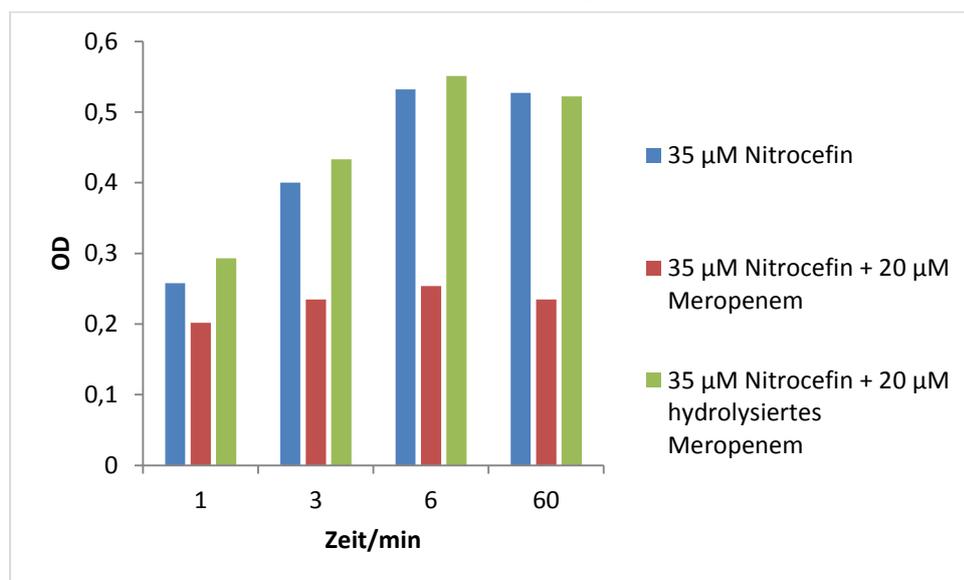


Abbildung 10: Analyse des hydrolysierten Meropenems als kompetitiver Inhibitor mittels Nitrocefin-Assay.

35 µM Nitrocefin- Assay-Reaktion ohne Inhibitor, 35 µM Nitrocefin + 20 µM Meropenem, 35 µM Nitrocefin + 20 µM hydrolysiertes Meropenem - sind die Inhibitionsreaktionen mit intaktem Meropenem bzw. hydrolysiertem Meropenem.

4.6.4 Analyse verschiedener β -Laktame unter verschiedenen Bedingungen mittels Nitrocefin-Assay

Für eine kostengünstige Synthese eines neuen Capture Compounds mit einem β -Laktam als Selektivitätsfunktion war die Stabilität des Laktam-Rings sehr wichtig. Um ein neues effektives Capture Compound zum Nachweis von β -Laktamasen zu konstruieren, wurden für die weitere Synthese fünf verschiedene β -Laktamae bei verschiedenen, für die Synthese wichtigen Bedingungen, analysiert. Hierbei sollte herausgefunden werden, welches β -Laktam potenziell am besten für eine Synthese geeignet ist, d.h. die größte Stabilität unter verschiedenen Bedingungen aufweist. Diese β -Laktame waren Clavulansäure, Tazobactam, Meropenem, Ertapenem und Doripenem. Die Bedingungen, unter denen sie analysiert wurden, waren folgende: pH (pH 2,04, pH 7.26, und pH 12,36), Temperatur (Raumtemperatur und 4°C) und Zeit (Nullwert, 1 h und 8 h). Nach der Behandlung unter diesen Bedingungen wurden die oben erwähnten β -Laktame als Inhibitoren im Nitrocefin-Assay eingesetzt. Für die Beschreibung der Methode siehe Kapitel 3.2.8.2.2. Nach den Analyseergebnissen wurde beurteilt, welches das stabilste Molekül war. In den Abbildungen 11-20 sind die graphischen

Ergebnisse

Darstellungen der inhibitorischen Aktivitäten der oben erwähnten β -Laktame nach ihrer Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten, Temperaturen und Zeiten dargestellt. Die Messergebnisse wurden standardisiert (OD des Ansatzes mit Inhibitor/OD des entsprechenden Ansatzes ohne Inhibitor).

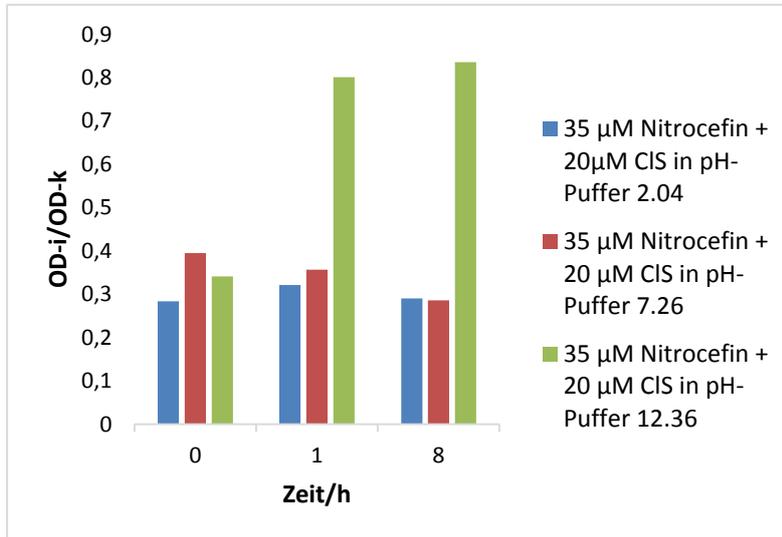


Abbildung 11: Analyse der Stabilität von Clavulansäure bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei Raumtemperatur ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei Raumtemperatur mit 35 μ M Nitrocefin und 20 μ M Clavulansäure (ClS). Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

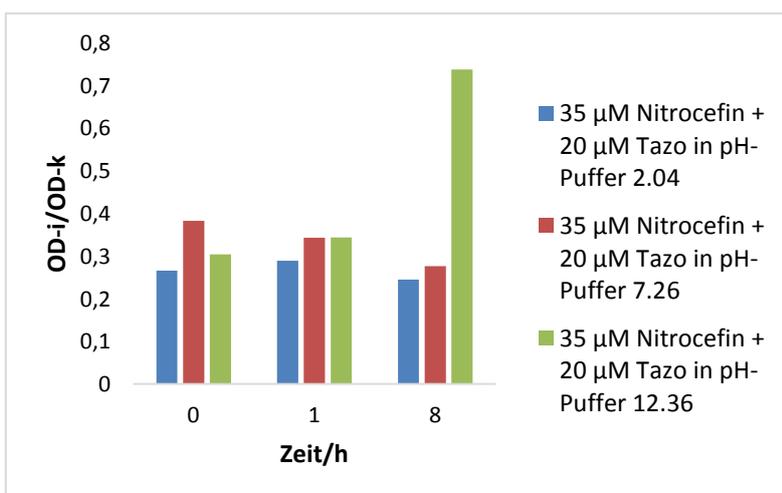


Abbildung 12: Analyse der Stabilität von Tazobactam bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei Raumtemperatur ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei Raumtemperatur mit 35 μ M Nitrocefin und 20 μ M Tazobactam (Tazo). Y-Achse: OD der

Ergebnisse

Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

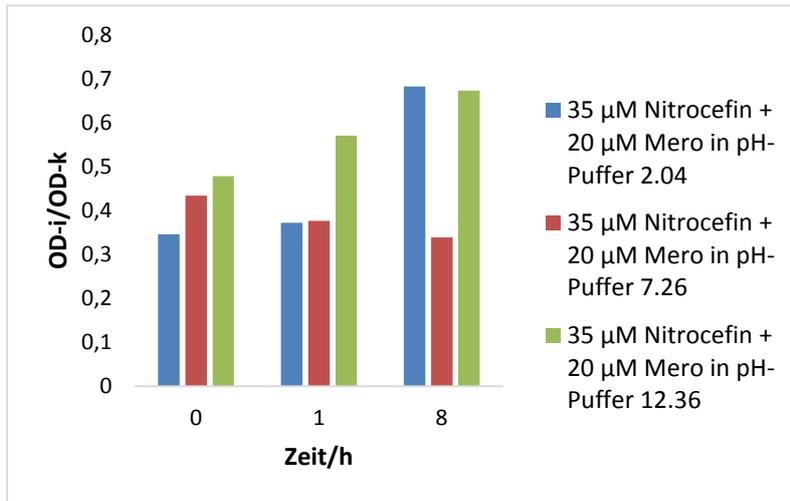


Abbildung 13: Analyse der Stabilität von Meropenem bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei Raumtemperatur ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei Raumtemperatur mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Meropenem. Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

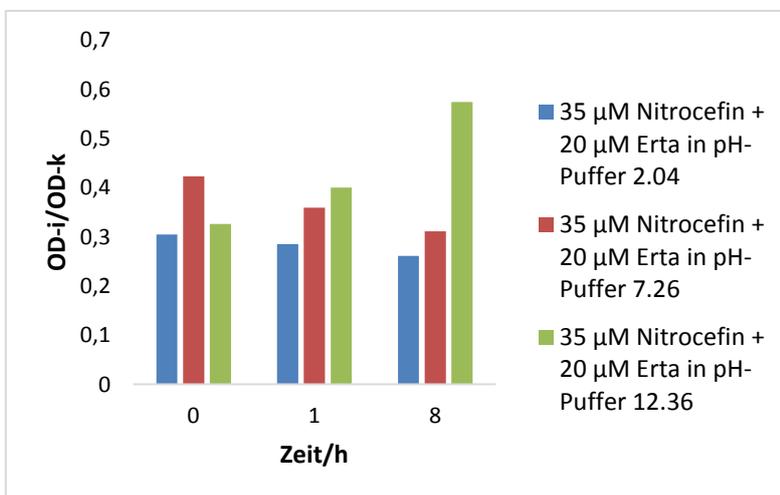


Abbildung 14: Analyse der Stabilität von Ertapenem (Erta) bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei Raumtemperatur ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei Raumtemperatur mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Ertapenem. Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

Ergebnisse

Aus den Diagrammen 11, 13 und 15 wird ersichtlich, dass die inhibitorischen Aktivitäten von Clavulansäure, Meropenem und Doripenem nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur im pH-Puffer 12.36 mit 20 % Acetonitril deutlich abnahmen. Nach der Inkubation von 8 Stunden bei Raumtemperatur im pH-Puffer 12.36 mit 20 % Acetonitril nahmen die inhibitorischen Aktivitäten von allen getesteten Inhibitoren stark ab (Abbildungen 11-15). Im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren, verlor Meropenem seine inhibitorische Aktivität auch nach der Inkubation im pH-Puffer 2.04 mit 20 % Acetonitril (Abbildung 13).

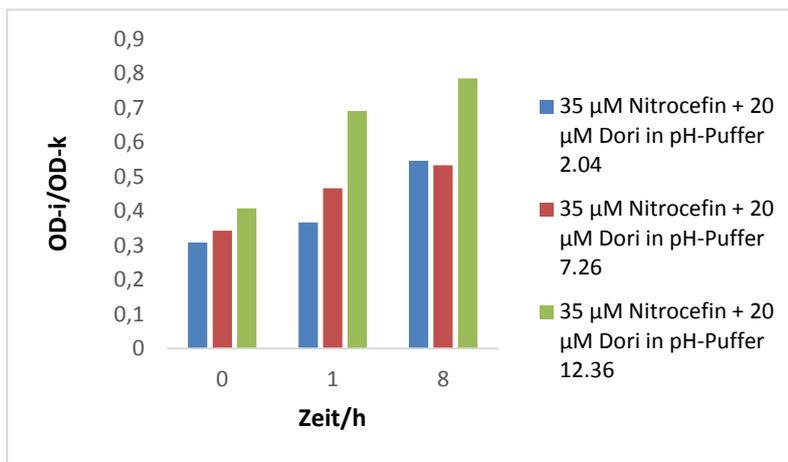


Abbildung 15: Analyse der Stabilität von Doripenem bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei Raumtemperatur ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei Raumtemperatur mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Doripenem (Dori). Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

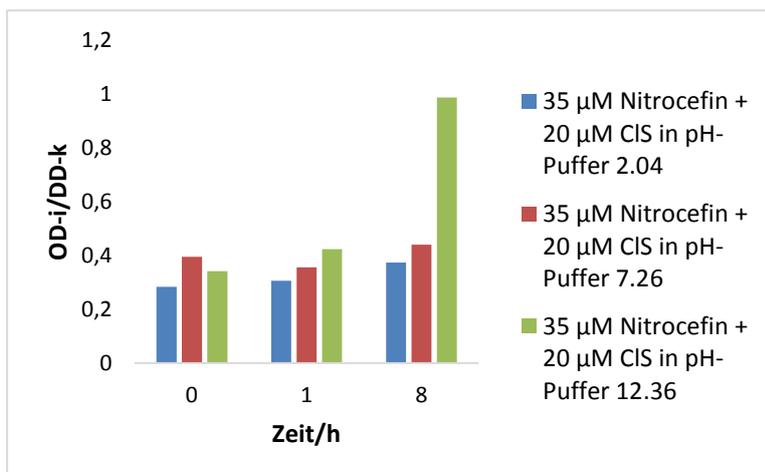


Abbildung 16: Analyse der Stabilität von Clavulansäure bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei 4°C ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Ergebnisse

Nitrocefin-Assay bei 4°C mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Clavulansäure (ClS). Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

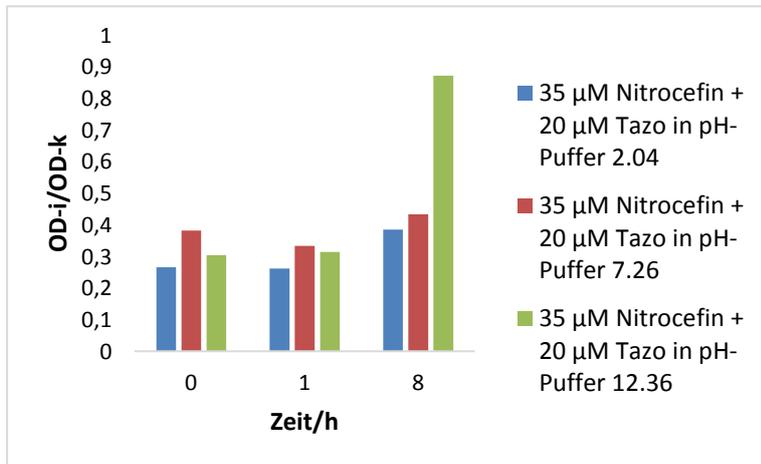


Abbildung 17: Analyse der Stabilität von Tazobactam bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei 4°C ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei 4°C mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Tazobactam (Tazo). Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

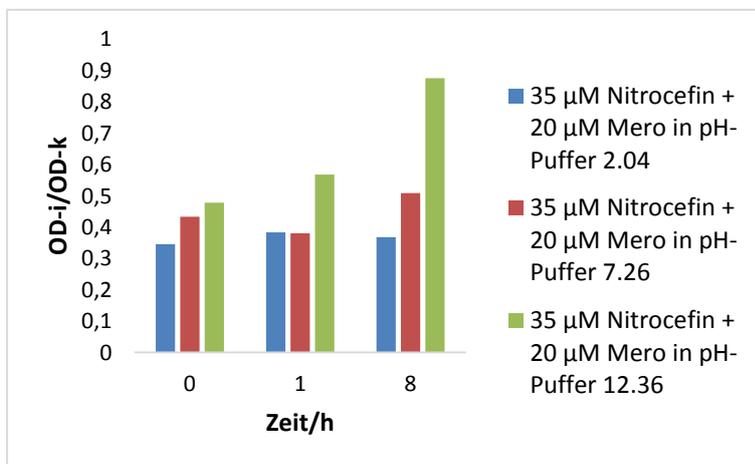


Abbildung 18: Analyse der Stabilität von Meropenem bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei 4°C ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei 4°C mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Meropenem (Mero). Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

Ergebnisse

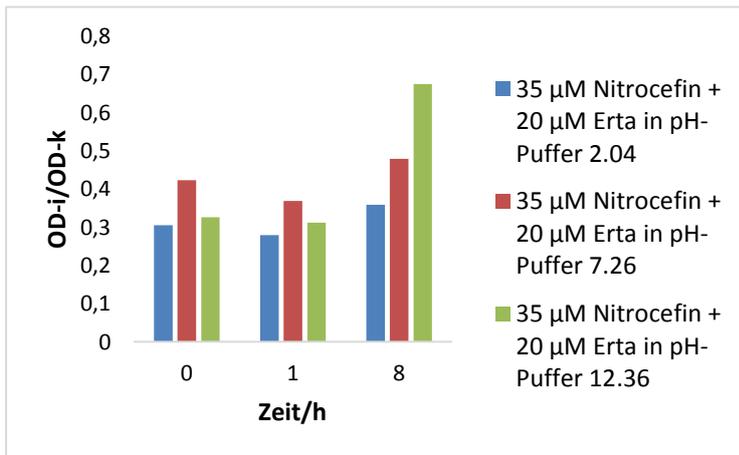


Abbildung 19: Analyse der Stabilität von Ertapenem bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei 4°C ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei 4°C mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Ertapenem (Erta). Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

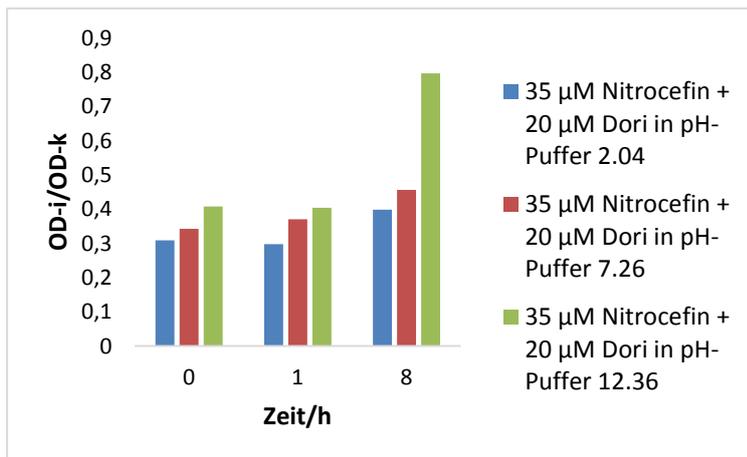


Abbildung 20: Analyse der Stabilität Doripenem bei pH 2.04, 7.26 und 12.36, bei 4°C ohne, nach einer und nach acht Stunden Inkubation.

Nitrocefin-Assay bei 4°C mit 35 µM Nitrocefin und 20 µM Doripenem (Dori). Y-Achse: OD der Inhibitionskontrolle/OD der entsprechenden Positivkontrolle ohne Inhibitor, x-Achse: variable Parameter: Inkubationszeit und pH.

Aus den Abbildungen 16-20 ist ersichtlich, dass bei 4°C, nach einer Stunde Inkubation im pH-Puffer 12.36 mit 20 % Acetonitril von allen fünf β-Laktamen nur bei Meropenem die inhibitorische Aktivität deutlich abnahm. Allerdings nahm unter den gleichen Bedingungen die inhibitorische Aktivität nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden bei allen fünf β-

Ergebnisse

Laktamen stark ab.

4.7 Capture-Experimente mit dem Mero-CC Capture Compound

Die Capture-Experimente wurden erst mit gereinigter, rekombinanter β -Laktamase (*LACTB*, EC 3.5.2.6, Tabelle 6) nach dem Off-Bead Protokoll durchgeführt (Kapitel 3.2.9.1). Das Enzym wurde in einer Endkonzentration von 0,5 μ M eingesetzt. Capture Compound (Mero-CC) und Competitor (Meropenem) wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt: 10 μ M und 1 μ M, bzw. 1000 μ M und 100 μ M. Die Proben wurden mit UV-Licht ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$) unter Kühlung (4° C) in der caproBox bestrahlt. Es wurden die drei unterschiedliche Bestrahlungszeiten 0 min, 0,5 min und 5 min getestet. Die Detektion erfolgte mittels Streptavidin-Infrarot-Farbstoff-Konjugat (IRDye-800CW-Streptavidin) nach SDS-PAGE und Western Blot. Es wird demnach der Anteil der β -Laktamase detektiert, der in der Photo-Reaktion mit dem Mero-CC reagiert hat und somit kovalent mit Biotin verknüpft ist.

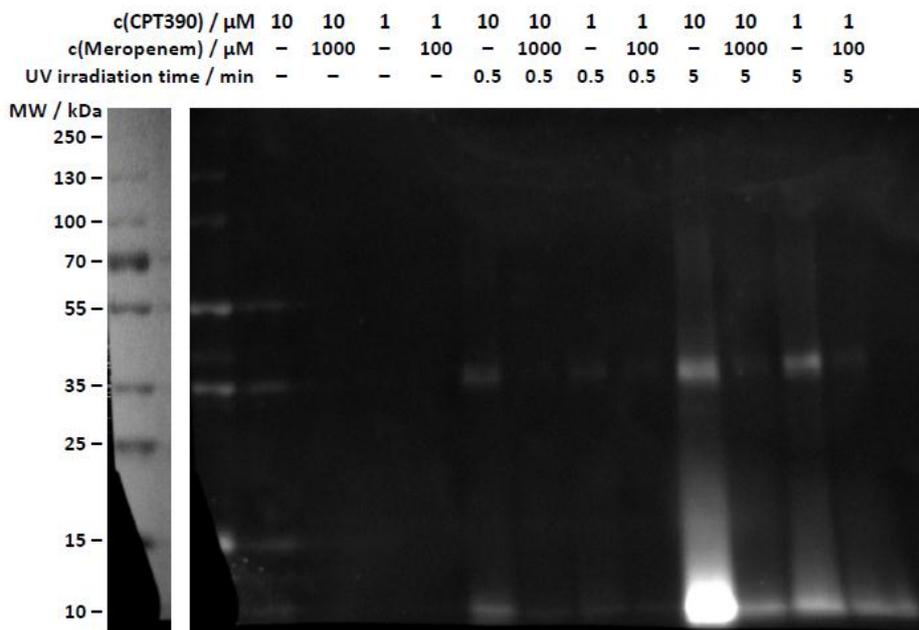


Abbildung 21: Streptavidin-Blot zur Detektion biotinylierter Proteine (Protein – Mero-CC – Konjugate) nach Photo-Crosslinking des Mero-CC mit rekombinant hergestellter β -Laktamase unter verschiedenen Bedingungen (siehe Beschriftung über den Gelspuren).

Abbildung 21 zeigt, dass ohne UV-Bestrahlung keine Reaktion zwischen dem Mero-CC und

Ergebnisse

der rekombinanten β -Laktamase stattfand (keine Photocrosslink-Reaktion). Bei den 0,5- und 5-minütigen Bestrahlungszeiten ist das β -Laktamase – Mero-CC – Konjugat sowohl bei 10 μ M Mero-CC als auch bei 1 μ M Mero-CC zu erkennen, die Photocrosslink-Reaktion bei der 5-minütigen Bestrahlungszeit liefert mehr β -Laktamase – Mero-CC – Konjugat. Die schwächeren Signalintensitäten bei An- im Vergleich zur Abwesenheit von Meropenem deuten zunächst darauf hin, dass Meropenem die Bindung des Mero-CC an die rekombinante β -Laktamase (kompetitiv) inhibiert, allerdings könnte der beobachtete Effekt in Betracht der Ergebnisse mit *E. coli* Lysat (Abbildung 22) auch durch Absorption des UV-Lichtes durch Meropenem verursacht worden sein (innerer Filtereffekt). Die scheinbare Meropenem-vermittelte Bindung des Mero-CC an die β -Laktamase kann also angezweifelt werden. Die detektierte β -Laktamase – Mero-CC – Konjugate könnten auch durch unspezifische (d.h. nicht durch die Meropenem-Selektivitätsfunktion des Mero-CC vermittelte) Photoreaktion entstanden sein.

Die Capture-Experimente wurden mit dem gleichem Protokoll auch im Zelllysat des Kontrollstammes *E. coli* 11 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Wie bei der rekombinant-hergestellter β -Laktamase sind im Zelllysat ohne UV-Bestrahlung ebenfalls kaum Protein – Mero-CC – Konjugate zu erkennen. Bei 0,5- und 5-minütigen Bestrahlungszeiten scheint es, dass 1 mM Meropenem bei 10 μ M Mero-CC für alle Proteine eine Competition verursacht. Das ist aber unwahrscheinlich und spricht eher für einen inneren Filtereffekt. Im Vergleich zu der rekombinant-hergestellten β -Laktamase wurden im Zelllysat mit 1 μ M Mero-CC und 100 μ M Meropenem keine spezifischen Signale detektiert. Der innere Filtereffekt des Meropenems wirkt sich hier wahrscheinlich wegen zugleich vorhandener Lysatabsorption weniger aus.

Ergebnisse

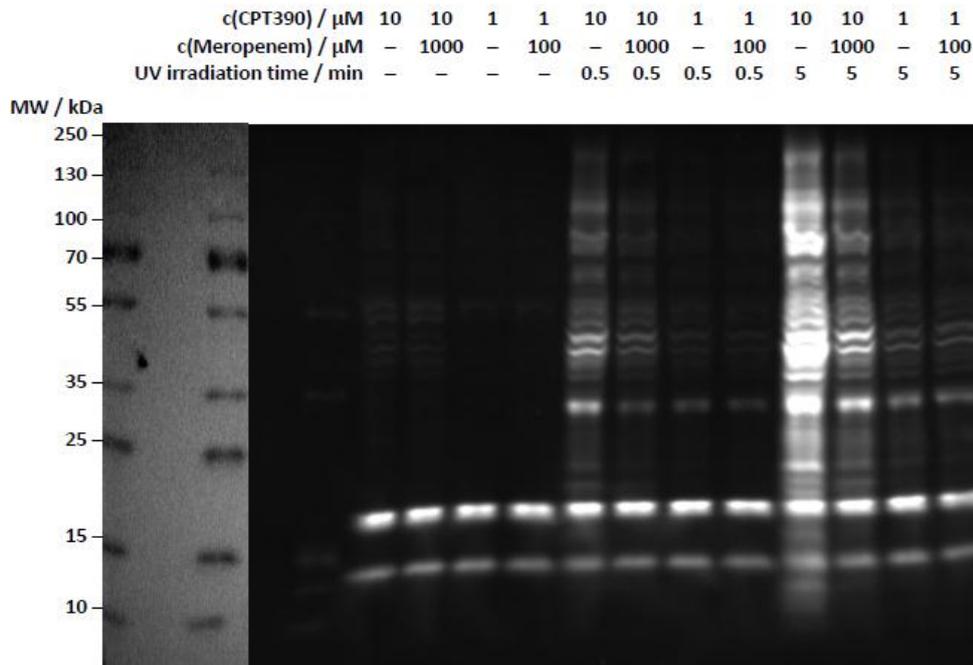


Abbildung 22: Streptavidin-Blot zur Detektion biotinylierter Proteine (Protein – Mero-CC – Konjugate) nach Photo-Crosslinking des Mero-CC mit Zellysat des Kontrollstammes *E. coli 11* unter verschiedenen Bedingungen (siehe Beschriftung über den Gelspuren).

Um zu prüfen, ob es mit 1 mM Meropenem bei $\lambda_{\text{max}} = 310$ nm Bestrahlung einen inneren Filtereffekt gab, wurde die Absorption von Meropenem ($8,8 \mu\text{M}$ in H_2O) photometrisch gemessen. Die Messergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Meropenem besitzt bei ca. 310 nm ein Absorptionsmaximum. Somit wurde wahrscheinlich das Licht der 310 nm UV-Lampe durch Meropenem absorbiert und stand nicht mehr für die Anregung der Reaktivitätsfunktion des Mero-CC zur Verfügung (innerer Filtereffekt). Bei 350 nm absorbiert Meropenem wesentlich weniger.

Ergebnisse

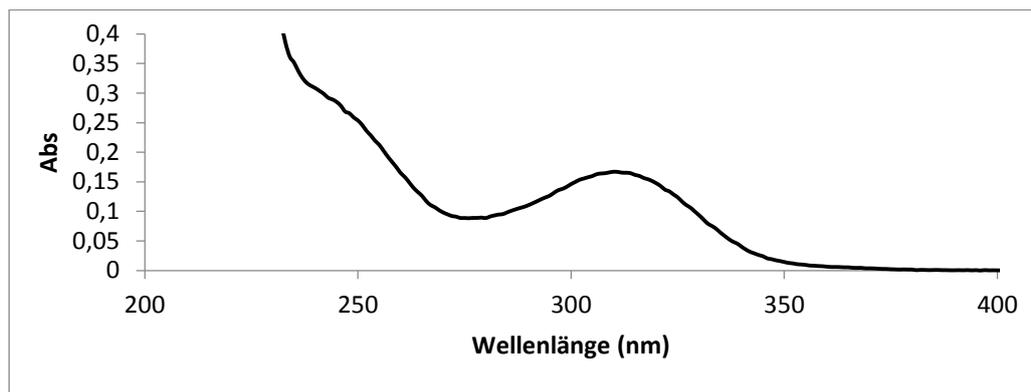
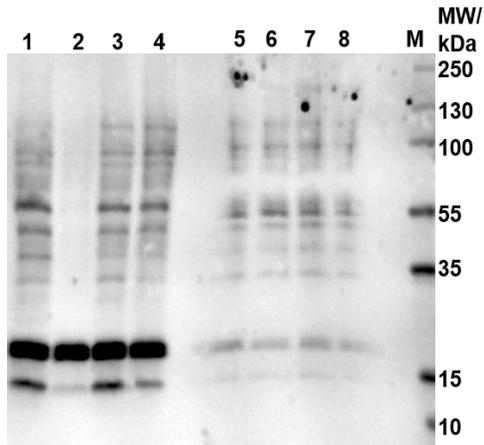


Abbildung 23: Absorptionsspektrum von Meropenem

Deswegen wurden weitere Capture-Experimente mit Zelllysate von *E. coli* 11 mit $\lambda_{\max} = 350$ nm zur Aktivierung des Capture Compounds durchgeführt (Abbildung 24), wobei die Endkonzentration von Mero-CC bzw. Scaffold 2,5 μM und die von Meropenem 20 oder 200 μM betragen. Die Bestrahlungszeit betrug 5 min. Die Analyse der biotinylierten Proteine zeigte, dass der innere Filtereffekt, der bei $\lambda_{\max} = 310$ nm Bestrahlung durch Meropenem verursacht wurde, wegfiel. Allerdings waren keine spezifischen Banden (mit Competition) zu erkennen. Das Scaffold-Molekül allein (ohne Meropenem-Selektivitätsfunktion) bindet kaum unspezifisch an Moleküle aus Zelllysate. Das bedeutet, dass die in den Proben 1, 3 und 4 nachgewiesenen Protein – Mero-CC – Konjugate durch die Meropenem-Selektivitätsfunktion bedingt wurden. Allerdings verursachen hier wohl durch Meropenem bedingte Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Capture Compounds wie Polarität oder Dipolmoment die beobachteten Änderungen im Photo-Crosslinking und nicht eine spezifische Bindung der Meropenem-Selektivitätsfunktion in ein aktives Zentrum eines Proteins, da ein hierdurch photo-gecrosslinktes Protein in der Competitionkontrolle nicht detektiert werden sollte.

Ergebnisse



Die Proben von 1 bis 4 sind die Bead-Phasen

1-Positivkontrolle mit Mero-CC (Mero-CC 2,5 μM)

2-Positivkontrolle mit Scaffold (Scaffold 2,5 μM)

3-Competition mit Meropenem (Meropenem 200 μM)

4-Competition mit Meropenem (Meropenem 20 μM)

Die Proben von 5 bis 8 sind die Überstände von den entsprechenden Proben von 1 bis 4.

Abbildung 24: Capture-Ergebnisse mit Mero-CC bzw. Scaffold mit Zelllysate des Kontrollstammes *E. coli* 11 bei $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ Bestrahlung. Streptavidin-Blot zur Detektion biotinylierter Proteine.

Aus der Abbildung 24 sieht man, dass der innere Filtereffekt, der durch Meropenem verursacht wurde, bei $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ Bestrahlung wegfiel.

Basierend auf den Ergebnissen des Nitrocefin-Assays, in dem Mero-CC in einer Konzentration von 700 μM eine Inhibition von 14 % bewirkte (Abbildung 9), wurde ein Capture-Experiment mit einer sehr hohen Konzentration von Mero-CC durchgeführt (Kapitel 3.2.9.5). Die Konzentration von Mero-CC betrug 763 μM und die des Competitors (Meropenem) 800 μM . Nach Western-Blot wurde die TEM-1 β -Laktamase mit anti-TEM-1 Antikörper spezifisch detektiert. Abbildung 25 zeigt, dass in den Proben 1 (Assay) und 2 (Competition) (nach Photo-Crosslinking, vor Anreicherung der Protein – Mero-CC - Konjugate mittels Streptavidin-Magnetbeads) ein starkes Signal bei dem entsprechenden Molekulargewicht (ca. 30 kDa) detektiert wurde. Das spricht dafür, dass im Zelllysate des Kontrollstammes *E. coli* 11 eine ausreichende Menge TEM-1 vorhanden war. Bei den Proben 3 (Assay) und 4 (Competition) (nach Photo-Crosslinking und Anreicherung der Protein – Mero-CC – Konjugate mittels Streptavidin-Magnetbeads) sieht man ein sehr schwaches Signal. Die Ausbeute der Mero-CC-vermittelten Anreicherung der TEM-1 ist sehr gering – wahrscheinlich durch die schwache Bindung des Mero-CC an TEM-1. Das etwa stärkere Signal beim Assay-Ansatz (Probe 3) im Vergleich zum Competitions-Ansatz (Probe 4) deutet auf eine Meropenem-vermittelte Bindung des Mero-CC an TEM-1 hin. Allerdings erlauben die sehr schwachen Signale keine eindeutige Aussage. Die Proben 5 und 6 sind jeweils die Lysat-Überstände nach Inkubation mit Streptavidin-Magnetbeads der entsprechenden Proben

Ergebnisse

3 und 4. Die starken TEM-1 Signale bedeuten, dass die β -Laktamase TEM-1 – wie bereits durch schwachen Signale der Proben 3 und 4 angedeutet – nicht nachweisbar aus dem Lysat isoliert wurde.

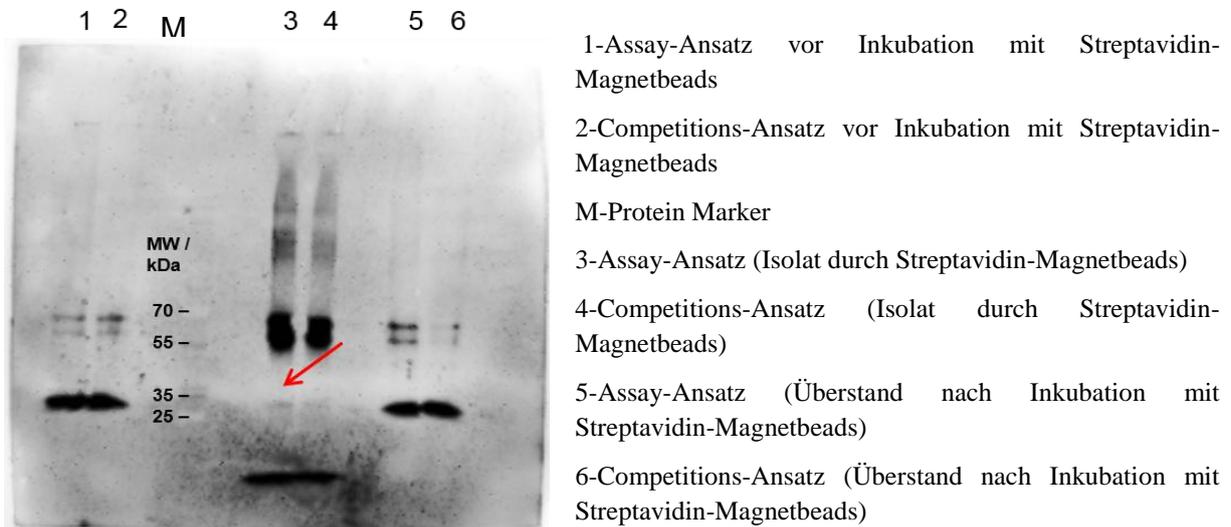


Abbildung 25: Capture-Ergebnisse mit Mero-CC im Zellysat des Kontrollstammes *E. coli 11*. SDS-PAGE, Detektion der β -Laktamase TEM-1 mittels Western-Blot.

Weiterhin wurden mittels Mero-CC angereicherte Proteine nach tryptischem Verdau auf den Streptavidin-Magnetbeads massenspektrometrisch untersucht. Es wurden neben vielen anderen Proteinen zwar auch β -Laktamasen (TEM-1, CTX-15) identifiziert, allerdings konnte keine Meropenem-vermittelte Bindung zum Mero-CC (geringere Intensität in Competitions-Ansatz mit Meropenem als Competitor) nachgewiesen werden. Die identifizierten β -Laktamasen wurden wahrscheinlich wie viele andere Proteine durch unspezifische Photo-Crosslink-Reaktion zum Mero-CC oder durch unspezifisches Anhaften an die Streptavidin-Magnetbeads identifiziert.

Es wurden Capture-Experimente auch mit On-Bead- und Pulldown-Protokoll (siehe Kapitel 3.2.9.3 bzw. 3.2.9.4) sowohl mit der rekombinanten β -Laktamase als auch mit Zellysaten des Kontrollstammes *E. coli 11* durchgeführt. Allerdings konnte keine spezifische Bindung zwischen Mero-CC und den β -Laktamasen gezeigt werden.

Nachdem die Capture-Experimente mit Mero-CC und dem Zellysat des Kontrollstammes *E. coli 11*, der zwei unterschiedliche β -Laktamasen – TEM-1 (funktionelle Gruppe 2b, broad-spectrum- β -lactamase) und CTX-M-15 (funktionelle Gruppe 2be, ESBL) – bildete, gezeigt

Ergebnisse

haben, dass die Bindung zwischen der Meropenem-Selektivitätsfunktion und den β -Laktamasen sehr schwach ist und somit Mero-CC für die Anreicherung dieser β -Laktamasen nicht geeignet ist, wurden keine weiteren Experimente mit dem KPC-positiven Kontrollstamm- *K. pneumoniae 3* durchgeführt.

4.8 Gesamtgenomsequenzierung

Zur Verifizierung anderer Nachweismethoden für die Detektion von ESBL- und KPC- β -Laktamasen wurden ein ESBL-bildender *E. coli 11* und ein KPC-bildender *K. pneumoniae 3* zur Gesamtgenomsequenzierung eingesetzt (Kapitel 3.2.5). Detaillierte Information zu beiden Stämmen sind in Kapiteln 4.4 und 4.8.1 zu finden.

4.8.1 KPC-bildender *K. pneumoniae 3*

Die KPC-bildende *K. pneumoniae 3* wurde aus Tracheobronchialsekret eines 48 jährigen Patienten in der Labor Berlin GmbH isoliert. Die ID-Identifikation und Bestimmung des Resistenzphänotyps erfolgte mittels VITEK[®] 2 (Kapitel 3.2.1.1). Die MHK-Werten von VITEk2 finden sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: MHK-Daten des *E. coli 11*-Isolates für Vitek[®] 2 AST-N248 Karte [$\mu\text{g/ml}$]

Antibiotika	MHK	Antibiotika	MHK
Ampicillin/Sulbactam	≥ 32	Gentamicin	≤ 1
Aztreonam	≥ 64	Tobramycin	≥ 16
Polymixin B	≤ 1	Amikacyn	≥ 16
Piperacillin	≥ 128	Ciprofloxacin	≥ 4
Piperacillin/Tazobactam	≥ 128	Moxifloxacin	≥ 8
Imipenem	≥ 8	Co-Trimoxacol	≥ 320
Meropenem	≥ 8	Fosfomycin	≥ 256
Cefotaxim	≥ 32	Tigecycline	≤ 2

Ergebnisse

Ceftazidim	≥64	Cefoxitin	≥64
Cefepim	≥16		

Zur Bestätigung einer Carbapenemase-Bildung wurde der Stamm zum Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger, Ruhr Universität Bochum geschickt. Dort wurden folgende phänotypische Bestätigungsteste durchgeführt: Modifizierter Hodge-Test (MHT), combined disc Test (CDT) mit EDTA und combined disc Test mit dem Borsäurederivat APB. Der MHT zeigte, dass der Stamm positiv für Imipenem, Meropenem und Ertapenem war. Der CDT zeigte keine Vergrößerung der Hemmhöfe um ≥ 7 mm nach Zugabe von EDTA bei Imipenem oder Meropenem, dahingegen zeigte sich eine Vergrößerung der Hemmhöfe nach Zugabe von APB um ≥ 4 mm bei Imipenem, Ertapenem, Meropenem und Cefepim. Mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung wurde bei dem Stamm eine KPC-3 β -Laktamase nachgewiesen.

Der *K. pneumoniae* 3 Stamm sollte als Kontrollstamm für die Etablierung der CCMS-Experimente für die Isolierung und Charakterisierung der KPC β -Laktamase verwendet werden.

4.8.2 Die Ergebnisse der Gesamtgenomsequenzierung

Bei dem ESBL-positiven *E. coli* 11 wurde mittels Gesamtgenomsequenzierung das Vorhandensein der beiden β -Laktamasen- TEM-1 (funktionelle Gruppe 2b) und CTX-M-15 (funktionelle Gruppe 2be), die schon mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurden, bestätigt. Bei dem Isolat *K. pneumoniae* 3 wurden neben KPC-3 (funktionelle Gruppe 2f), die im Nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauserreger, Ruhr Universität Bochum nachgewiesen worden war, noch zwei andere β -Laktamasen gefunden: TEM-1 und SHV-11 (beide gehören zur funktionellen Gruppe 2b).

Diskussion

5. Diskussion

5.1 Die molekulare Epidemiologie der ESBL-Bildner

Antibiotikaresistenzen stellen die Gesundheitssysteme weltweit vor große Herausforderungen und sind mit erhöhten Kosten, Therapieversagen und erhöhten Mortalitäten verbunden (25). Laut ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), sterben z.B. in Europa jährlich 25.000 Patienten an Infektionskrankheiten durch resistente Bakterien, die gegenüber den derzeit auf dem Markt verfügbaren Antibiotika resistent sind oder sie haben ihre Empfindlichkeit nur gegenüber den potenziell toxischen Antibiotika, wie zum Beispiel Polymyxine, behalten (19; 89).

Bei gramnegativen Bakterien beruht der häufigste Resistenzmechanismus auf β -Laktamasen, wobei ESBLs eine wichtige klinische Rolle einnehmen. Die häufigsten Erreger unter den ESBL-Bildnern sind *E. coli* und *K. pneumoniae*. Wobei in den letzten Jahren die Anzahl der ESBL-bildenden *P. mirabilis*-Isolate zugenommen hat (131).

Bei geographisch unterschiedlicher Verbreitung einzelner ESBL-Genotypen, ist die Prävalenz der ESBL-bildenden Enterobakteriaceen während der letzten Jahre europaweit angestiegen (27). Seit Ende des 20. Jahrhunderts kam es zu einer Verschiebung der ESBL-Genotypen: CTX-M Enzyme haben TEM- und SHV-Varianten abgelöst (17). Diese Verschiebung könnte nicht nur mit einer weiten Verbreitung der *bla*_{CTX-M}-Gene unter den hochmobilen genetischen Elementen wie Plasmids und Transposons verbunden sein, sondern auch mit der erfolgreichen Ausbreitung bestimmter Klone (17).

Nach einer deutschlandweiten Studie vom Robert-Koch Institut im Jahr 2004 war der Anteil von CTX-M bei *E. coli* sehr hoch (82 %), wobei 28 % dieser Isolate CTX-M-15 bildeten (Gruppe 1) (109). Hingegen war bei *Klebsiella spp.* der Anteil von SHV-ESBL höher. TEM-ESBL kamen bei *E. coli* häufiger vor als bei *Klebsiella spp.* Die Ergebnisse weiterer Studien (ARS-ESBL-Studie 2008, Limbach-Laborstudie RESET 2011) zeigten später eine Dominanz von CTX-M-Type ESBL sowohl bei *E. coli* als auch bei *K. pneumoniae* (109; 110).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 175 *E. coli*-, *Klebsiella spp.*- und *P. mirabilis*-Stämmen war, wie auch von anderen beschrieben (10; 22; 110), der Anteil von *bla*_{CTX-M} sehr hoch (83 %). Bei *E. coli*-Isolaten bleibt der Anteil der CTX-M Enzyme mit 94

Diskussion

% sehr hoch. Hingegen ist bei *Klebsiella spp.*-Isolaten der Anteil von SHV-Enzymen in unserer Studie etwas höher (93 %) (Abbildung 4). In einer Studie von Gürntke et al. (58), die am Universitätsklinikum-Charité im Zeitraum von 2008 bis 2011 durchgeführt wurde, war *bla_{CTX-M}*, wie auch nach den Daten vom Robert Koch Institut (110), der häufigste vorkommende ESBL-Genotyp bei ESBL-bildenden *K. pneumoniae*-Isolaten. Die Daten sind nicht vergleichbar, weil in unserer Studie die ESBL-Varianten unter den SHV-Enzymen nicht berücksichtigt wurden. In einer anderen Studie aus den USA waren SHV-ESBLs bei den ESBL-bildenden *K. pneumoniae*-Isolaten die häufigste isolierten ESBL-Enzyme (137). Die molekulare Epidemiologie der ESBL-bildenden *P. mirabilis*-Isolaten ist regional unterschiedlich. In einer Studie von Tonkic et al. wurden bei 38 ESBL-bildenden *P. mirabilis*-Isolaten aus Kroatien nur TEM-Enzyme nachgewiesen (131). Andere Studien sowohl aus Europa als auch aus Asien zeigten, dass bei ESBL-bildenden *P. mirabilis*-Isolaten vorwiegend CTX-M Enzyme isoliert wurden (1; 94; 131). In unserer Studie hatten alle drei *P. mirabilis*-Isolate ein *bla_{TEM}*-Gen und eines dieser drei Isolate hatte noch zusätzlich 2 unterschiedliche *bla_{CTX-M}*-Gene (ein *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 2 und ein weiteres *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 9).

Unter den CTX-M Enzymen war bei den untersuchten 175 Stämmen *bla_{CTX-M}* aus der phylogenetischen Gruppe 1 der am häufigsten vorkommende Genotyp. 80,4 % der *bla_{CTX-M}*-positiven *E. coli*-Stämme und 91 % der *bla_{CTX-M}*-positiven *Klebsiella spp.*-Stämme gehörten zu der Gruppe 1. Das entspricht sowohl den Daten der Studie von Leistner et al., die von 2008 bis Ende 2010 am Universitätsklinikum Charité durchgeführt wurde, als auch den Daten der Studie von Gürntke et al. (84). Hingegen hatten in einer japanischer Studie ESBL-bildende *E. coli*-Stämme mit CTX-M-9 (phylogenetische Gruppe 9) die höchste Prävalenz (61).

Im Gegensatz zu den Daten der Studie von Leistner et al., die eine Häufigkeit von 4,2 % fanden, ist das Vorkommen von CTX-M Enzymen aus der phylogenetischen Gruppe 9 bei *E. coli*-Isolaten in unserer Studie mit 18,6 % deutlich höher. Ob dies das Resultat einer klonalen Expansion ist oder mit der Verbreitung bestimmter mobiler genetischer Elementen zusammenhängt, ist nicht geklärt.

Bei geographisch unterschiedlicher Verbreitung der CTX-M Genotypen sind CTX-M-15 (Gruppe 1) und CTX-M-14 (Gruppe 9) weltweit bei weitem die wichtigsten CTX-M Enzyme, wobei CTX-M-15 mit weltweiter Verbreitung die höchste Prävalenz hat. CTX-M-14 hat eine

Diskussion

hohe Prävalenz in manchen europäischen Ländern und Asien. Hingegen sind CTX-M-2 (Gruppe 2) und CTX-M-8 (Gruppe 8) in Südamerika weit verbreitet (17; 137). Wie auch von anderen gezeigt (27), kommen in unserer Studie die CTX-M Enzyme aus der phylogenetischen Gruppen 1 und 9 wesentlich häufiger vor, als die Enzyme aus den Gruppen 8/25 und 2.

Die Koexistenz unterschiedlicher *bla*-Gene in einem Isolat wurde schon von unterschiedlichen Autoren in verschiedenen Regionen der Erde beschrieben (10; 27; 126).

So konnte in einer japanischen Studie gezeigt werden, dass etwa die Hälfte der ESBL-bildenden *E. coli*-Isolate zwei oder mehr *bla*-Gene besaßen (61). Laut dieser Studie war die Kombination *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} aus der Gruppe 9 mit 38,1 % die häufigste Kombination. In unserer Studie war hingegen *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} aus der Gruppe 1 mit 41,5 % bei *E. coli*-Isolaten die häufigste Kombination. Dieser folgte die Kombination *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} aus der Gruppe 9 (5,9 %). Im Unterschied zur Studie von Romero et al. (122) konnten wir bei *E. coli* keine 3-fach-Kombination von *bla*-Genen nachweisen.

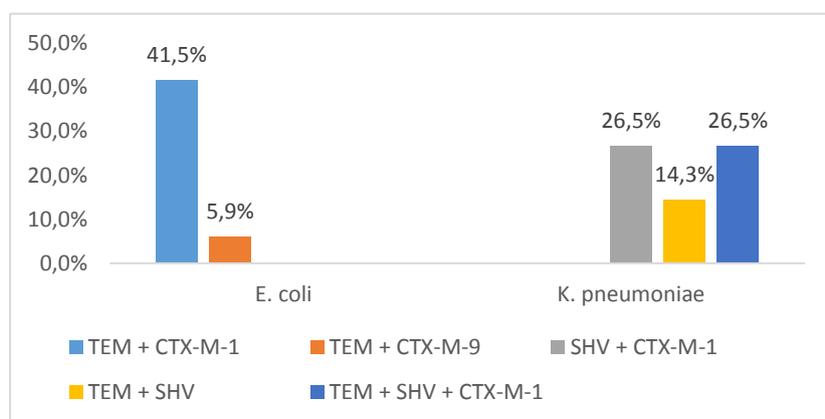


Abbildung 26: Die häufigsten Kombinationen von verschiedenen *bla*-Genen bei ESBL-bildenden *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Isolate.

*bla*_{CTX-M-1} ein *bla*_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 1, *bla*_{CTX-M-9} ein *bla*_{CTX-M}-Gen aus der Gruppe 9

In der oben erwähnten Arbeit aus Japan war *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} bei *K. pneumoniae*-Stämmen die häufigste Kombination (61). In einer anderen Studie aus Japan (23) wurde bei diesen Erregern die Kombination *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M} als am meisten prävalent beschrieben. In unserer Studie wurde bei *K. pneumoniae*-Isolaten die Kombination *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M} häufiger detektiert (26,5 %) als die Kombination von *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} (14,3 %). Die 3-fach-Kombination *bla*_{TEM} +

Diskussion

bla_{SHV} + bla_{CTX-M} aus der Gruppe 1, die schon von anderen Autoren beschrieben wurde (2), fand sich mit 26,5 % bei unseren *K. pneumoniae*-Isolaten recht häufig, während die Kombination *bla_{TEM} + bla_{SHV} + bla_{CTX-M}* aus den Gruppen 8/25 nur bei einem Isolat (2 %) nachgewiesen werden konnte. Die mehrfache Kombination von *bla*-Genen bei *P. mirabilis* ist schon von anderen beschrieben (22). In unserer Studie hatte einer der drei *P. mirabilis*-Isolate eine 3-fach-Kombination von *bla*-Genen, wobei zwei zur CTX-M-Familie gehörten: *bla_{TEM} + bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 2 + *bla_{CTX-M}* aus der Gruppe 9.

Zusammenfassend kann man sagen, dass CTX-M Genotypen bei den ESBL-bildenden *E. coli*- die häufigsten ESBL-Genotypen waren. Hingegen waren *bla_{SHV}* bei *Klebsiella spp.*-Isolaten und *bla_{TEM}* bei *P. mirabilis* die häufigsten isolierten Genotypen. Unter den CTX-M Enzymen war die Gruppe 1 mit 68 % dominant. Der Anteil der Isolate mit Koexistenz unterschiedlicher *bla*-Gene war hoch (56 %), wobei nur bei *K. pneumoniae* und *P. mirabilis* 3-fach-Kombinationen von *bla*-Genen nachgewiesen wurde.

Unsere Studie gibt einen Einblick in die aktuelle Prävalenz und molekulare Charakterisierung der ESBL-bildenden *E. coli*- und *Klebsiella spp.*-Isolate an der Universitätsmedizin Berlin, Charité. Die konventionelle PCR hatte eine hohe Sensitivität (100 %) für das Screening der Isolate auf das Vorhandensein von *bla*-Genen. Allerdings kann durch diese Methode nicht zwischen ESBL- und non-ESBL-Varianten der TEM- und SHV- β -Laktamasen unterschieden werden. Die in der EARS-Net Studie (25; 26) gezeigte Zunahme von ESBL-Bildnern unterstreicht die Bedeutung einer schnellen Diagnostik, um geeignete Hygienemaßnahmen im Krankenhaus umsetzen zu können. Künftige Studien sollten neben der Verteilung der ESBL-Genotypen den genetischen Hintergrund der ESBL-Isolate mit erfassen, um mögliche Zusammenhänge zwischen ESBL- und Virulenzmustern analysieren zu können. Für die Beantwortung dieser Fragestellungen erscheint die Gesamtgenomsequenzierung (Next Generation Sequencing – NGS) als am besten geeignet (52). Es ist absehbar, dass NGS in naher Zukunft zu wichtigen Teil der Routinediagnostik wird.

5.2 Capture Experimente: Affinitätsanalysen von Mero-CC zu β -Laktamasen

Die Aufklärung molekularer Wechselwirkungen gehört zu den wichtigsten Fragestellungen der Biochemie. Die Wechselwirkung zwischen kleinen Molekülen (z. B. Medikamente) und zellulären Proteinen ist dabei von besonderem medizinisch-pharmakologischem Interesse

Diskussion

(81). Die Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS) ist eine neue innovative Technologie für das Studium solcher Interaktionen, z.B. zwischen Signalproteinen und ihren Bindungspartnern (41; 81). Ein Capture Compound ist ein multifunktionelles Konstrukt mit Selektivitätsfunktion, Reaktivitätsfunktion und Sortierfunktion (Abbildung 27). Für die Selektivitätsfunktion kann jedes beliebige kleine Molekül, wie z.B. ein Enzyminhibitor zur Funktionsmodellierung in der Proteomik oder ein Medikament zur Identifizierung der Wirkungsmechanismen des Medikaments und zur Beschreibung von dessen Off-target-Effekten und Toxizität, verwendet werden (47; 87). Diese Selektivitätsfunktion interagiert mit Zielproteinen unter Gleichgewichtsbedingungen. Die Aktivierung der Reaktivitätsfunktion durch UV-Licht führt zum kovalenten, irreversiblen Cross-Linking zwischen CC und Zielproteinen. Infolgedessen wird das Gleichgewicht zwischen CC und Zielprotein fixiert. Durch diese Eigenschaft können sogar mit der Selektivitätsfunktion nur schwach interagierende Proteine mit Capture Compound gekoppelt und detektiert werden (45; 46; 87). Die kovalente Bindung ermöglicht dabei einerseits eine starke Anreicherung niedrig abundanter Proteine (41; 85), andererseits erlaubt sie den Einsatz stark selektiver Waschbedingungen zur Entfernung nicht kovalent gebundener Moleküle.

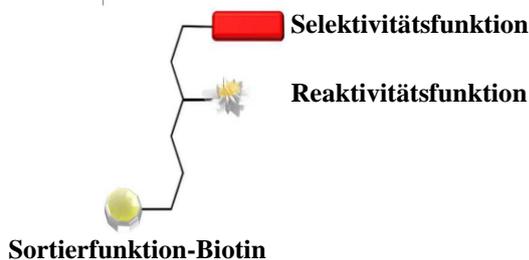


Abbildung 27: Die schematische Darstellung eines Capture Compounds.

Das hier eingesetzte Capture Compound (Mero-CC), das für die Isolierung und Charakterisierung der β -Laktamasen von Fa. caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, konstruiert und synthetisiert wurde, enthielt Meropenem als Selektivitätsfunktion. Meropenem ist ein Carbapenem-Antibiotikum mit einer sehr hohen Affinität zu β -Laktamasen und zu PBPs von grampositiven und gramnegativen Bakterien. Die Mehrzahl der β -Laktamasen der Klasse A, darunter klinisch relevante, weitverbreitete TEM-, SHV- und CTX-M-Familien bilden mit Carbapenemen einen stabilen Acyl-Enzym Komplex, wobei die Deacylierung des kovalenten Carbapenem- β -Laktamase Komplexes (k_3 , Gleichung 1, Kapitel 1.6) sehr langsam ist (50; 51;

Diskussion

91; 100). Deswegen funktionieren Carbapeneme als „langsameres Substrat“ oder Inhibitor für die β -Laktamasen, die keine Carbapenemase-Aktivität besitzen, wie z.B. ESBLs. Dadurch sind Carbapeneme in der Lage, der hydrolytischen Aktivität der meisten β -Laktamasen zu widerstehen (100; 104) (siehe reversible Inhibitoren, Gleichung 1, Kapitel 1.6).

Der katalytische Rest Ser70 im aktiven Zentrum der Klasse A β -Laktamasen ist verantwortlich für den nukleophilen Angriff auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe der β -Laktame. Dies führt zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Enzym und dem Substrat und somit zum Acyl-Enzym-Komplex (37). Das konservierte C3/C4-Carboxylat der β -Laktame (C3 bei Penicillinen und Carbapenemen, C4 bei Cephalosporinen) spielt dabei eine wesentliche Rolle (trägt wesentlich zur Affinität bei der Erkennung und Bindung des Enzymes bei) (39). Die Guanidin-Gruppe des Arginin-Restes (CH_5N_3^+) an den Positionen 244, 220 oder 276 bei den β -Laktamasen der Klasse A interagiert mit dem C3-Carboxylat der β -Laktame, wie beispielsweise der Carbapeneme, und führt zur Entstehung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem C₃-Carboxylat der β -Laktame und dem aktiven Zentrum der β -Laktamasen (39; 100). Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Affinität der β -Laktame zu β -Laktamasen und trägt dabei zur Stabilisierung des Acyl-Enzym Komplexes bei (12; 39; 100). Bei Carbapenemen spielt die C6-Hydroxyethyl-Gruppe (typisch für alle Carbapeneme) eine weitere wichtige Rolle durch die Entstehung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der C6-Hydroxyethyl-Gruppe und dem aktiven Zentrum der β -Laktamase. Durch diese Interaktion wird die Deacylierung extrem reduziert. Die C6-Hydroxyethyl-Gruppe der Carbapeneme ist ein Schlüsselement für die Carbapenem-Aktivität und die Derivatisierung dieser Gruppe kann die Hydrolyse der Carbapenem erleichtern (100; 104). In einer weiteren Studie von Anderluh et al. (5) haben die Autoren die Hypothese aufgestellt, dass die C6-Hydroxyethyl-Gruppe des Meropenems keine entscheidende Rolle bei der antimikrobiellen Aktivität spielt. Die Autoren haben ein C6-Ethyliden-Derivat von Meropenem synthetisiert, welches zwar seine antimikrobielle Aktivität bewahrt hatte aber im Vergleich zum Meropenem schlechter war (IC_{50} im niedrigen millimolaren Bereich) wodurch die Hypothese widerlegt war.

In der vorliegenden Studie konnten wir mit Mero-CC keine starke Bindung zwischen der Selektivitätsfunktion Meropenem und den β -Laktamasen im Zelllysate des Kontrollstammes *E. coli* H nachweisen werden. Im Vergleich zur hohen Affinität von intaktem Meropenem zu β -Laktamasen war die Affinität des Mero-CC mit Meropenem als Selektivitätsfunktion

Diskussion

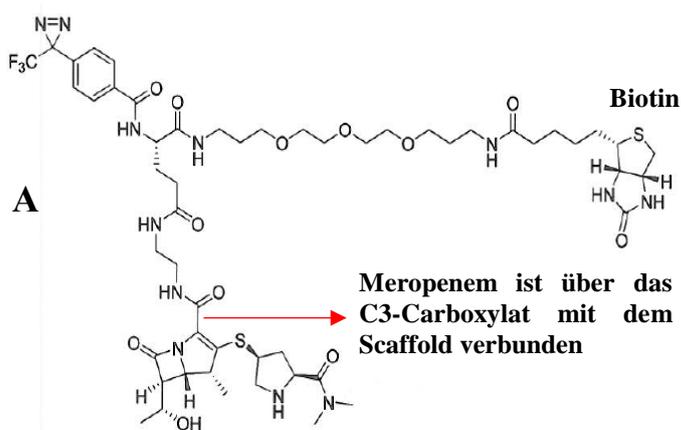
wesentlich geringer. Im Nitrocefin-Assay (siehe Kapitel 4.6.1 bzw. 4.6.2) konnte gezeigt werden, dass das freie Meropenem bei der enzymatischen Hydrolyse von Nitrocefin durch β -Laktamasen aus dem Zelllysate des Kontrollstammes *E. coli 11* einen IC_{50} -Wert von 4,4 μ M hatte (Abbildung 8). Dagegen bewirkte Mero-CC selbst in einer Konzentration von 700 μ M eine nur 14 %-ige Inhibition (Abbildung 9). Die Derivatisierung des Meropenems mit dem Scaffold zum Mero-CC verursachte offenbar eine sehr starke Affinitätsverringering. Basierend auf diesem Ergebnis wurde in einem Capture-Experiment mit Zelllysate des Kontrollstammes *E. coli 11* eine sehr hohe Konzentration von 763 μ M Mero-CC (vgl. Nitrocefin-Assay) eingesetzt (Abbildung 25). In diesem Experiment gab es Hinweise auf eine sehr schwache Bindung der β -Laktamase TEM-1 durch Mero-CC und auf eine Competition mit Meropenem (Abbildung 25, Probe 3- Ansatz ohne Competitor und Probe 4- Ansatz mit Competitor). Diese schwache Bindung durch 763 μ M Mero-CC ist also vergleichbar mit dem Ergebnis des o.g. Nitrocefin-Assays, wobei 700 μ M Mero-CC eine Inhibition von nur etwa 14 % bewirkte (Abbildung 9). Grob eingeschätzt würde man eine Inhibition um 50 % (IC_{50}) durch Mero-CC bei einer Konzentration von ca. 2,5 mM erwarten (aufgrund der kleinen Menge des vorhandenen Mero-CC war es unmöglich, ein entsprechendes Experiment für die Ermittlung von IC_{50} des Mero-CC durchzuführen). Die Bindung von Mero-CC an β -Laktamasen aus dem Zelllysate des Kontrollstammes *E. coli 11* war mehr als 500-fach schlechter als die des freien Meropenems. Der Grund hierfür lag wahrscheinlich daran, dass die Bindungsstelle des Meropenems über das C3-Carboxylat im Mero-CC-Konstrukt nicht optimal war (Abbildung 28). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass durch die Derivatisierung des C3-Carboxylates die Meropenem-Selektivitätsfunktion ihre Affinität zu den β -Laktamasen weitgehend verloren hat und die anderen zur Verfügung stehenden Interaktionen nicht ausreichend waren für eine starke Bindung zwischen Mero-CC und den β -Laktamasen. Zusammenfassend kann man sagen, dass Mero-CC eine ungünstige Anknüpfungsposition besaß und dadurch nur sehr schwach an die β -Laktamasen binden konnte. Deswegen war das in unserer Studie eingesetzte Mero-CC für die Anreicherung von β -Laktamasen ungeeignet. Für weitere Studien sollten ein Re-Design (andere Anknüpfungsposition) und eine entsprechende Neu-Synthese erfolgen.

Nach den Stabilitätsanalysen der fünf β -Laktamen – Clavulansäure, Tazobactam, Meropenem, Ertapenem und Doripenem – unter unterschiedlichen, für die Synthese wichtigen Bedingungen, kann man sagen, dass alle fünf β -Laktame im stark basischen Milieu eher

Diskussion

unstabil waren. Schon nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur im pH-Puffer 12.36 mit 20 % Acetonitril nahm die inhibitorische Aktivität bei allen getesteten β -Laktamen mit Ausnahme von Tazobactam stark ab (Abbildungen 11-15). Bei 4°C wurde nach einer Stunde Inkubation im basischen Milieu allerdings nur bei Meropenem eine Abnahme der inhibitorischen Aktivität beobachtet (Abbildung 18). Nach achtstündiger Inkubation im basischen Puffer sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C nahm die inhibitorische Aktivität bei allen fünf getesteten β -Laktamen deutlich ab (Abbildungen 11-20). Nach diesen Ergebnissen sollte bei der weiteren Synthese das basische Milieu vermieden werden. Meropenem war unter den getesteten Verbindungen am säureempfindlichsten. Von diesen fünf β -Laktamen sind Clavulansäure und Tazobactam irreversible β -Laktamase-Inhibitoren (Suizid-Inhibitoren, siehe Kapitel 1.6) und können damit sehr gut für Aktivitätsbasiertes Protein Profiling (ABPP, activity-based protein profiling) eingesetzt werden (28). Die Reaktivitätsfunktion ist bei ABPP obsolet, da die kovalente Bindung an die Zielproteine schon durch den Suizid-Inhibitor geschieht.

Reaktivitätsfunktion



Selektivitätsfunktion- Meropenem

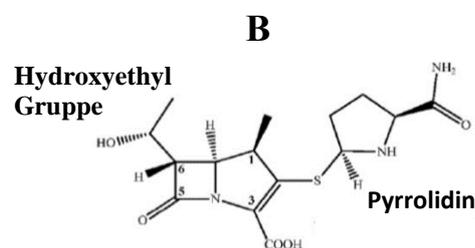


Abbildung 28 : Die Struktur des Mero-CC Capture Compounds (A) und die des freien Meropenems (B).

Für die Synthese eines neuen Capture Compounds zur Isolierung und Charakterisierung von β -Laktamasen, bleiben Carbapeneme weiter interessante Kandidaten für die Selektivitätsfunktion. Wie im Rahmen dieser Studie gezeigt wurde, führte die Derivatisierung des Meropenems zum C3-Carboxylat zu einem starken Affinitätsverlust. Nach den

Diskussion

Ergebnissen der oben erwähnten Studie von Anderluh et al. (5) kann die C6-Hydroxyethyl-Gruppe auch nicht als Anknüpfungsposition in Betracht kommen, da eine Derivatisierung an dieser Position einen gravierenden Aktivitätsverlust bedingte.

Als weitere Anknüpfungsposition kommt die basische Gruppe des Pyrrolidin-Rings an der Position N-1 in Betracht. Wie in der Studie von Tanaka et al. gezeigt wurde (128), ist die basische Gruppe des Pyrrolidin-Rings an der Position N-1 für die Derivatisierung gut geeignet; das Ziel dieser Studie war es, Carbapeneme mit erhöhter oraler Bioverfügbarkeit zu entwickeln. Insofern erscheint die in der vorliegenden Arbeit versuchte Etablierung eines Assays zum Nachweis und zur Charakterisierung von ESBL- β -Laktamasen mittels Capture Compound mit einem Carbapenem als Selektivitätsfunktion durchaus realisierbar; allerdings sollten ausreichend Ressourcen vorhanden sein, um ggf. mehrere unterschiedliche Konstrukte (Derivatisierungsposition und Spacerstruktur) zur Optimierung des Assays einsetzen zu können.

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Adler A, Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gniadkowski M, et al. 2013. A binational cohort study of intestinal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* in patients admitted to rehabilitation centres. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19:E51-8
2. Ali SZ, Ali SM, Khan AU. 2014. Prevalence of IncI1-Igama and IncFIA-FIB type plasmids in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the NICU of a North Indian hospital. *Microbiology (Reading, England)* 160:1153-61
3. Ambler RP. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 289:321-31
4. Ambretti S, Gaibani P, Berlinger A, Cordovana M, Tamburini MV, et al. 2013. Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 19:212-5
5. Anderluh PS, Vilfan G, Prezelj A, Urleb U. 2009. Synthesis of C6-Ethylidene Meropenem Derivative with Antimicrobial Activity. *Acta Chim. Slov.* 56:669–73
6. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, et al. 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 45:2723-5
7. Andersson DI, Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature reviews. Microbiology* 8:260-71
8. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, et al. 2011. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55:3579-83
9. Aoki N, Ishii Y, Tateda K, Saga T, Kimura S, et al. 2010. Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo-beta-lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:4582-8
10. Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Bourjilat F, Haouzane F, et al. 2011. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. *Journal of medical microbiology* 60:1344-52
11. Beirao EM, Furtado JJ, Girardello R, Ferreira Filho H, Gales AC. 2011. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 15:69-73
12. Bethel CR, Taracila M, Shyr T, Thomson JM, Distler AM, et al. 2011. Exploring the inhibition of CTX-M-9 by beta-lactamase inhibitors and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55:3465-75
13. Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48:1-14
14. Bush K. 1988. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical microbiology reviews* 1:109-23
15. Bush K. 2010. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current opinion in microbiology* 13:558-64
16. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:969-76

Literaturverzeichnis

17. Canton R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC. 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in microbiology* 3:110
18. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, et al. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 1:144-53
19. Cars O, Hedin A, Heddini A. 2011. The global need for effective antibiotics-moving towards concerted action. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 14:68-9
20. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. 2012. Overview of the epidemiology and the threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPC) resistance. *Infection and drug resistance* 5:133-41
21. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. 2011. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 11:1499-504
22. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, et al. 2013. Community spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Proteus mirabilis: a long-term study in Japan. *Journal of medical microbiology* 62:1038-43
23. Chong Y, Yakushiji H, Ito Y, Kamimura T. 2011. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a long-term study from Japan. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30:83-7
24. Cohen Stuart J, Dierikx C, Al Naiemi N, Karczmarek A, Van Hoek AH, et al. 2010. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65:1377-81
25. Control ECfDPa. 2013. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>
26. Control. ECfDPa. 2010. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_N_et_2009.pdf
27. Coque TM, Baquero F, Canton R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 13
28. Cravatt BF, Wright AT, Kozarich JW. 2008. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annual review of biochemistry* 77:383-414
29. Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W. 2010. A novel IS26 structure surrounds blaCTX-M genes in different plasmids from German clinical Escherichia coli isolates. *Journal of medical microbiology* 59:580-7
30. Cury AP, Andreatzi D, Maffucci M, Caiaffa-Junior HH, Rossi F. 2012. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out Klebsiella pneumoniae carbapenemase. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 67:1427-31
31. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. 2012. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX,

Literaturverzeichnis

- ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67:1865-9
32. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, N.Y.)* 311:374-7
 33. Dalhoff A, Thomson CJ. 2003. The art of fusion: from penams and cepheems to penems. *Chemotherapy* 49:105-20
 34. Dalhoff C, Huben M, Lenz T, Poot P, Nordhoff E, et al. 2010. Synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine capture compounds for selective photoinduced isolation of methyltransferases. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 11:256-65
 35. Davies J, Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74:417-33
 36. De Pascale G, Wright GD. 2010. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 11:1325-34
 37. Delmas J, Leyssene D, Dubois D, Birck C, Vazeille E, et al. 2010. Structural insights into substrate recognition and product expulsion in CTX-M enzymes. *Journal of molecular biology* 400:108-20
 38. Drawz SM, Bonomo RA. 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews* 23:160-201
 39. Drawz SM, Taracila M, Caselli E, Prati F, Bonomo RA. 2011. Exploring sequence requirements for C(3)/C(4) carboxylate recognition in the *Pseudomonas aeruginosa* cephalosporinase: Insights into plasticity of the AmpC beta-lactamase. *Protein science : a publication of the Protein Society* 20:941-58
 40. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 1:90-103
 41. Dölsner E, Lenz T, Jurinke C. 2008. CCMS technology enables improved proteomic analysis through functional isolation of subproteomes. *Nature Methods* 5
 42. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC, et al. 2010. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type beta-lactamase genes in Gram-negative isolates. *Journal of clinical microbiology* 48:2618-22
 43. Espinar MJ, Rocha R, Ribeiro M, Goncalves Rodrigues A, Pina-Vaz C. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* screened by the VITEK 2 system. *Journal of medical microbiology* 60:756-60
 44. Essack SY. 2001. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharmaceutical research* 18:1391-9
 45. Fischer JJ, Dalhoff C, Schrey AK, Graebner OY, Michaelis S, et al. 2011. Dasatinib, imatinib and staurosporine capture compounds - Complementary tools for the profiling of kinases by Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS). *Journal of proteomics* 75:160-8
 46. Fischer JJ, Graebner Baessler OY, Dalhoff C, Michaelis S, Schrey AK, et al. 2010. Comprehensive identification of staurosporine-binding kinases in the hepatocyte cell line HepG2 using Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS). *Journal of proteome research* 9:806-17
 47. Fischer JJ, Michaelis S, Schrey AK, Graebner OG, Glinski M, et al. 2010. Capture compound mass spectrometry sheds light on the molecular mechanisms of liver toxicity of two Parkinson drugs. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 113:243-53

Literaturverzeichnis

48. Fishbain J, Peleg AY. 2010. Treatment of Acinetobacter infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51:79-84
49. Flamm RK, Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. 2014. Ceftazidime/avibactam activity tested against Gram-negative bacteria isolated from bloodstream, pneumonia, intra-abdominal and urinary tract infections in US medical centres (2012). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69:1589-98
50. Fonseca F, Chudyk EI, van der Kamp MW, Correia A, Mulholland AJ, Spencer J. 2012. The Basis for Carbapenem Hydrolysis by Class A β -Lactamases: A Combined Investigation using Crystallography and Simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 18275–18285:18275–85

51. Franceschini N, Segatore B, Perilli M, Vessillier S, Franchino L, Amicosante G. 2002. Meropenem stability to β -lactamase hydrolysis and comparative in vitro activity against several β -lactamase-producing Gram-negative strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49:395-8
52. Frickmann H, Masanta WO. 2014. Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management. 2014:375681
53. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. 2011. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 49:1048-57
54. Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2012. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum-beta-lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 50:1140-6
55. Gibson RL, Retsch-Bogart GZ, Oermann C, Milla C, Pilewski J, et al. 2006. Microbiology, safety, and pharmacokinetics of aztreonam lysinate for inhalation in patients with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 41:656-65
56. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic Andrasevic A, Canton R, et al. 2013. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 18
57. Goodman LS, Brunton LL, Chabner B, Knollmann BrC. 2011. *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill. 2084 p. pp.
58. Gurntke S, Kohler C, Steinmetz I, Pfeifer Y, Eller C, et al. 2014. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Klebsiella pneumoniae from bloodstream infections and risk factors for mortality. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*
59. Hall BG, Barlow M. 2004. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 7:111-23
60. Hall BG, Barlow M. 2005. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 55:1050-1
61. Harada Y, Morinaga Y, Yamada K, Migiyama Y, Nagaoka K, et al. 2013. Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia Coli in a Japanese Tertiary Hospital. *Medical Microbiology & Diagnosis* 2:217
62. Hawkey PM. 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ (Clinical research ed.)* 317:657-60
63. Henderson TA, Young KD, Denome SA, Elf PK. 1997. AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 179:6112-21

Literaturverzeichnis

64. Henry X, Amoroso A, Coyette J, Joris B. 2010. Interaction of ceftobiprole with the low-affinity PBP 5 of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:953-5
65. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. 2011. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA fungus* 2:87-95
66. Hrabak J, Chudackova E, Walkova R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clinical microbiology reviews* 26:103-14
67. Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynski Y. 2010. Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 48:2091-6
68. Ishihama Y, Schmidt T, Rappsilber J, Mann M, Hartl FU, et al. 2008. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC genomics* 9:102
69. Jacoby GA. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 22:161-82, Table of Contents
70. Jang W, Park YJ, Park KG, Yu J. 2013. Evaluation of MicroScan WalkAway and Vitek 2 for determination of the susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates to cefepime, cefotaxime and ceftazidime. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68:2282-5
71. Jeong JH, Kim YS, Rojviriyaya C, Ha SC, Kang BS, Kim YG. 2013. Crystal structures of bifunctional penicillin-binding protein 4 from *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57:3507-12
72. Johansson A, Ekelof J, Giske CG, Sundqvist M. 2014. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC microbiology* 14:89
73. Kaase M. 2012. Carbapenemase bei gramnegativen Erregern in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl.* 55:1401-4
74. Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG. 2012. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 50:3115-8
75. Kanamori H, Navarro RB, Yano H, Sombrero LT, Capeding MR, et al. 2011. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae from the Philippines. *Acta tropica* 120:140-5
76. Kaye KS, Engemann JJ, Fraimow HS, Abrutyn E. 2004. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious disease clinics of North America* 18:467-511, viii
77. Ke W, Sampson JM, Ori C, Prati F, Drawz SM, et al. 2011. Novel insights into the mode of inhibition of class A SHV-1 beta-lactamases revealed by boronic acid transition state inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55:174-83
78. Kim Y, Hol WG. 2001. Structure of cephalosporin acylase in complex with glutaryl-7-aminocephalosporanic acid and glutarate: insight into the basis of its substrate specificity. *Chemistry & biology* 8:1253-64
79. King DT, Worrall LJ, Gruninger R, Strynadka NC. 2012. New Delhi metallo-beta-lactamase: structural insights into beta-lactam recognition and inhibition. *Journal of the American Chemical Society* 134:11362-5
80. Koliscak LP, Johnson JW, Beardsley JR, Miller DP, Williamson JC, et al. 2013. Optimizing empiric antibiotic therapy in patients with severe beta-lactam allergy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57:5918-23

Literaturverzeichnis

81. Koster H, Little DP, Luan P, Muller R, Siddiqi SM, et al. 2007. Capture compound mass spectrometry: a technology for the investigation of small molecule protein interactions. *Assay and drug development technologies* 5:381-90
82. Lahiri SD, Mangani S, Durand-Reville T, Benvenuti M, De Luca F, et al. 2013. Structural insight into potent broad-spectrum inhibition with reversible recyclization mechanism: avibactam in complex with CTX-M-15 and *Pseudomonas aeruginosa* AmpC beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57:2496-505
83. Lee N, Yuen KY, Kumana CR. 2003. Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs* 63:1511-24
84. Leistner R, Sakellariou C, Gurntke S, Kola A, Steinmetz I, et al. 2014. Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* from bloodstream infection. *Infection and drug resistance* 7:57-62
85. Lenz T, Fischer JJ, Dreger M. 2011. Probing small molecule-protein interactions: A new perspective for functional proteomics. *Journal of proteomics* 75:100-15
86. Lenz T, Poot P, Grabner O, Glinski M, Weinhold E, et al. 2010. Profiling of methyltransferases and other S-adenosyl-L-homocysteine-binding Proteins by Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS). *Journal of visualized experiments : JoVE*
87. Lenz T, Poot P, Weinhold E, Dreger M. 2012. Profiling of methyltransferases and other S-Adenosyl-L-homocysteine-binding proteins by Capture Compound mass spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 803:97-125
88. Lewis K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 12:371-87
89. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18:268-81
90. Massova I, Mobashery S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42:1-17
91. Minasov G, Wang X, Shoichet BK. 2002. An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *Journal of the American Chemical Society* 124:5333-40
92. Moellering RC, Jr., Eliopoulos GM, Sentochnik DE. 1989. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 24 Suppl A:1-7
93. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 1:42-52
94. Nakamura T, Komatsu M, Yamasaki K, Fukuda S, Miyamoto Y, et al. 2012. Epidemiology of *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Proteus mirabilis* strains producing extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples in the Kinki Region of Japan. *American journal of clinical pathology* 137:620-6
95. Nathwani D, Wood MJ. 1993. Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 45:866-94
96. Neu HC. 1969. Effect of beta-lactamase location in *Escherichia coli* on penicillin synergy. *Applied microbiology* 17:783-6
97. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Rapid detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 50:3016-22

Literaturverzeichnis

98. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18:432-8
99. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases* 17:1791-8
100. Nukaga M, Bethel CR, Thomson JM, Hujer AM, Distler A, et al. 2008. Inhibition of class A beta-lactamases by carbapenems: crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. *Journal of the American Chemical Society* 130:12656-62
101. O'Sullivan BP, Yasothan U, Kirkpatrick P. 2010. Inhaled aztreonam. *Nature reviews. Drug discovery* 9:357-8
102. Oteo J, Perez-Vazquez M, Campos J. 2010. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing Escherichia coli: changing epidemiology and clinical impact. *Current opinion in infectious diseases* 23:320-6
103. Oviano M, Fernandez B, Fernandez A, Barba MJ, Mourino C, Bou G. 2014. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*
104. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55:4943-60
105. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews* 18:657-86
106. Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, et al. 2014. Global Incidence of Carbapenemase-Producing Escherichia coli ST131. *Emerging infectious diseases* 20:1928-31
107. Peralta G, Lamelo M, Alvarez-Garcia P, Velasco M, Delgado A, et al. 2012. Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. bacteremia. A multicentric cohort study. *BMC infectious diseases* 12:245
108. Perez-Perez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 40:2153-62
109. Pfeifer Y. 2010. Surveillance und molekulare Epidemiologie von ESBL in Deutschland. Surveillance and molecular epidemiology of ESBL in Germany. *Hygiene & Medizin* 35:17
110. Pfeifer Y, Eller C. 2012. [Current data and trends about the resistance of Gram-negative pathogens to beta-lactams]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 55:1405-9
111. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46:1-11
112. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. 2004. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by Escherichia coli and Klebsiella spp. *Journal of clinical microbiology* 42:5715-21
113. Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet infectious diseases* 8:159-66
114. Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:24-38

Literaturverzeichnis

115. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 70:119-23
116. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. 2010. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65:1319-21
117. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 20:440-58, table of contents
118. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, et al. 2012. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56:2108-13
119. Reglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, et al. 2008. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of medical microbiology* 57:310-5
120. Rodriguez-Bano J, Pascual A. 2008. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert review of anti-infective therapy* 6:671-83
121. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:4783-8
122. Romero ED, Padilla TP, Hernandez AH, Grande RP, Vazquez MF, et al. 2007. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum beta-lactamases. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 59:433-7
123. Sainsbury S, Bird L, Rao V, Shepherd SM, Stuart DI, et al. 2011. Crystal structures of penicillin-binding protein 3 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of native and antibiotic-bound forms. *Journal of molecular biology* 405:173-84
124. Shah PM. 2008. Parenteral carbapenems. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 1:175-80
125. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *Journal of clinical microbiology* 50:927-37
126. Stein C, Makarewicz O, Pfeifer Y, Brandt C, Ramos JC, et al. 2013. Direct RNA-based detection and differentiation of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). *PloS one* 8:e80079
127. Sykes RB, Bonner DP. 1985. Discovery and development of the monobactams. *Reviews of infectious diseases* 7 Suppl 4:S579-93
128. Tanaka S, Matsui H, Kasai M, Kunishiro K, Kakeya N, Shirahase H. 2011. Novel prodrugs of meropenem with two lipophilic promoieties: synthesis and pharmacokinetics. *J Antibiot* 64:233-42
129. Thakuria B, Lahon K. 2013. The Beta Lactam Antibiotics as an Empirical Therapy in a Developing Country: An Update on Their Current Status and Recommendations to Counter the Resistance against Them. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 7:1207-14
130. Thomson KS. 2010. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *Journal of clinical microbiology* 48:1019-25
131. Tonkic M, Mohar B, Sisko-Kraljevic K, Mesko-Meglic K, Goic-Barisic I, et al. 2010. High prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta-

Literaturverzeichnis

- lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains in southern Croatia. *Journal of medical microbiology* 59:1185-90
132. Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, Vrioni G, Voulgari E, et al. 2011. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* 49:2804-9
133. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews* 25:682-707
134. UpToDate. 2015. *Cephalosporins*.
http://www.uptodate.com/contents/cephalosporins?source=search_result&search=cephalosporine&selectedTitle=1~150
135. UpToDate. 2015. *Combination beta-lactamase inhibitors, carbapenems, and monobactams*.
<http://www.uptodate.com/contents/combination-beta-lactamase-inhibitors-carbapenems-and-monobactams?source=machineLearning&search=carbapenems&selectedTitle=2~150§ionRank=1&anchor=H3#H3>
136. Walsh TR. 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. *Current opinion in infectious diseases* 21:367-71
137. Wang G, Huang T, Surendraiah PK, Wang K, Komal R, et al. 2013. CTX-M beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in suburban New York City, New York, USA. *Emerging infectious diseases* 19:1803-10
138. Werth BJ, Rybak MJ. 2014. Ceftaroline plus avibactam demonstrates bactericidal activity against pathogenic anaerobic bacteria in a one-compartment in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58:559-62
139. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current opinion in microbiology* 8:525-33
140. Wilkinson KM, Winstanley TG, Lanyon C, Cummings SP, Raza MW, Perry JD. 2012. Comparison of four chromogenic culture media for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 50:3102-4
141. Willems E, Cartuyvels R, Magerman K, Verhaegen J. 2013. Evaluation of 3 different agar media for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from surveillance samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 76:16-9
142. Willemsen I, Hille L, Vrolijk A, Bergmans A, Kluytmans J. 2014. Evaluation of a commercial real-time PCR for the detection of extended spectrum beta-lactamase genes. *Journal of medical microbiology* 63:540-3
143. Worthington RJ, Melander C. 2013. Overcoming resistance to beta-lactam antibiotics. *The Journal of organic chemistry* 78:4207-13
144. Wright GD. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews* 57:1451-70
145. Wright GD. 2011. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical communications (Cambridge, England)* 47:4055-61
146. Xia LN, Tao XQ, Shen JZ, Dai L, Wang Y, et al. 2011. A survey of beta-lactamase and 16S rRNA methylase genes among fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates and their horizontal transmission in Shandong, China. *Foodborne pathogens and disease* 8:1241-8
147. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, et al. 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology* 43:2551-8

Literaturverzeichnis

148. Yung-Chi C, Prusoff WH. 1973. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* 22:3099-108
149. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS microbiology reviews* 32:361-85
150. Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, et al. 2013. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination. *Drugs* 73:159-77
151. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, et al. 2007. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 67:1027-52

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Gayane Hovhannisyanyan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse von „Extended-Spectrum“-Beta-Laktamasen und *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasen mittels Capture Compound Mass SpectrometryTM“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgter Publikation

Gayane Hovhannisyanyan hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Hovhannisyanyan Gayane, Göbel Ulf, Adam Thomas. Molekulare Epidemiologie der ESBL-bildenden *Escherichia coli*- und *Klebsiella spp.*-Isolate an einem Universitätsklinikum. BÄMI, Der Mikrobiologe, Heft 1/März 2015/25. Jahrgang.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung des ganzen experimentellen Teiles der Arbeit (Asservierung der Bakterienstämme und deren genotypische Charakterisierung mittels PCR) und Auswertung der Ergebnisse. Anfertigung des Manuskriptes.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen:

Hovhannisyany Gayane, Göbel Ulf, Adam Thomas. Molekulare Epidemiologie der ESBL-bildenden *Escherichia coli*- und *Klebsiella spp.*-Isolate an einem Universitätsklinikum. BÄMI, Der Mikrobiologe, Heft 1/März 2015/25. Jahrgang.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2011 bis März von 2014 in Kooperation mit der Fa. caprotec bionanalytics GmbH Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ulf Göbel durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. U. Göbel, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Thema zu bearbeiten und für seine Unterstützung bei allen thematischen und wissenschaftlichen Fragestellungen.

Mein besonderer Dank richtet sich an PD Dr. Thomas Adam und an Herrn Thomas Lenz für ihre engagierte Betreuung und Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, und ihre Hilfe beim Korrekturlesen.

Herrn Prof. Dr. Huber Köster und seinem Team danke ich für die Möglichkeit die Arbeit in seinem Hause durchführen zu können.

Ich danke Herren Prof. Dr. Stefan Bereswill und seinem Team für die freundliche Zusammenarbeit.

Herzlich danke ich Herren PD Dr. L. Hamann für die motivierende wissenschaftliche Diskussion.

Mein Dank geht an alle meine Kollegen und Kommilitonen für die Unterstützung, Ermutigung und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein herzlicher Dank geht an meine ganze Familie, insbesondere meine Eltern, meine Nichte Hasmik und meine Neffen Andranik und Arthur für die Liebe und moralische Unterstützung.