

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie

Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

**Determination der genetischen Grundlagen der Tetrazyklinresistenz an
einer Stammkollektion multiresistenter Gram-negativer Organismen aus
Äthiopien, Ost-Afrika**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Wolf Steinkirchner

aus Ingolstadt

2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter:

PD Dr. med. Andreas Wieser

Mitberichterstatter:

PD Dr. Martin Alberer

Prof. Dr. Johannes Bogner

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

09.12.2021

In Dankbarkeit meinen Eltern und Geschwistern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	1
1. Bakterien	1
1.1. Infektionskrankheiten allgemein	1
1.2. Gram-negative Bakterien	3
1.2.1. <i>Enterobacterales</i>	4
1.2.2. Taxonomie der Enterobakterien	5
1.2.3. Andere	5
2. Antibiotika	5
2.1. Allgemein	5
2.2. Tetrazykline allgemein	7
2.2.1. Klassische Tetrazykline	8
2.2.2. Tigazyklin	9
2.2.3. Antibakterielle und andere Wirkungen der Tetrazykline	10
2.2.3.1. Aufnahmemechanismen von Tetrazyklin in die Zelle	10
2.2.3.2. Bindung des Tetrazyklin an die 30S Untereinheit	11
2.2.3.3. Strukturelle Voraussetzungen für die Wirksamkeit der Tetrazykline	12
2.2.3.4. Weitere Wirkungen der Tetrazykline	12
2.3. Resistenz allgemein	13
2.4. Antibiotikaresistenz gegen Tetrazykline	13
2.4.1. Intrinsische Tetrazyklinresistenz	14
2.4.2. Erworbene Tetrazyklinresistenz	14
2.4.2.1. Vier grundsätzliche Mechanismen der Resistenz	14
2.4.2.2. Nomenklatur der Tetrazyklin-Resistenzgene	15
2.4.2.3. Bekannte Tetrazyklin-Resistenzgene und ihre Verteilung auf verschiedene Spezies	16
2.4.2.4. Efflux-Pumpen	17
2.4.2.5. Ribosomale Schutzproteine	19
2.4.2.6. Enzymatische Degradation	19
2.4.2.7. Mutationen der rRNA	20
2.4.2.8. Gemischte Resistenz	20
3. Situation in Äthiopien	20
4. Fragestellung	22
4.1. Verteilung der phänotypischen Tetrazyklinresistenz innerhalb der Stammkollektion	22
4.2. Verteilung der genotypischen Tetrazyklinresistenz innerhalb der Stammkollektion	23
4.3. Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp	23
4.4. Ist PCR Testung dazu geeignet, Resistenzmechanismen aufzudecken?	23
B Material	24

1. Geräte	24
2. Materialien	25
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, Enzyme	25
2.2. Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	26
2.3. Kits	26
2.4. Synthetische Oligonukleotide und Primer	27
2.5. Primer für Universal-PCR und sonstige Primer	28
2.6. Primer zur Herstellung der Hybridgene	28
2.7. Bakterienstämme und Plasmide	29
2.8. Nährmedien und Zusatzlösungen	31
2.9. Antibiotika	32
C Methoden	33
1. Rechtlich-ethische Grundlagen	33
2. DNA Methoden	33
2.1. Extraktion bakterieller chromosomaler DNA	33
2.2. Extraktion bakterieller Plasmid-DNA	34
2.3. Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	35
2.4. Agarosegelelektrophorese	35
2.5. Aufreinigung von PCR-Produkt aus dem Agarosegel	36
2.6. DNA Sequenzierung	37
2.7. Transformation/Klonierung	37
2.7.1. Ligationsansatz	37
2.7.2. Elektrottransformation	38
2.7.3. Chemische Transformation (Hitzeschock)	38
2.8. Gen-Synthese (Hybridgene)	39
2.9. Polymerase-Kettenreaktion	40
2.9.1. PCR allgemein	40
2.9.2. Primerdesign	43
2.9.3. Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen	44
3. Bakterien Methoden	45
3.1. Probenentnahme	45
3.2. Isolierung	45
3.3. Identifizierung	45
3.4. Resistenzmessung	46
3.5. Kryokonservierung	46
3.6. Selektion von Bakterien durch Antibiotikaresistenz	47
3.7. Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	47
D Ergebnisse	48

1. Probenkollektiv	48
1.1. Untersuchte Bakterienspezies	48
1.2. Intrinsisch resistente und nicht-intrinsisch resistente Arten	50
2. Phänotypische Antibiotikaresistenz innerhalb der Stammkollektion	52
2.1. Ergebnisse der Resistenzmessung der nicht-intrinsisch resistenten Organismen gegenüber Tetrazyklin	53
2.2. Hemmhofdurchmesser der intrinsisch resistenten Organismen (gelistet nach EUCAST).....	58
3. PCR Assay.....	60
3.1. Ausgewählte Tetrazyklin-Resistenzgene: Ergebnisse einer Literaturrecherche	60
3.2. Entwickelte PCR Primer und Reaktionsbedingungen	61
3.3. Entwickelte Positivkontrollen (Hybridgene, Klonierung in <i>E. coli</i> und Plasmidmaps)	63
4. Genotyp	64
4.1. Detektierte Gene	65
4.1.1. Detektierte Gene in nicht-intrinsisch resistenten Erregern.....	68
4.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	68
4.1.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	70
4.1.1.3. <i>Enterobacter cloacae</i>	71
4.1.2. Detektierte Gene in intrinsisch resistenten Erregern	71
4.1.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	72
4.1.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
4.2. Genkombinationen von Tetrazyklin-Resistenzgenen.....	73
4.3. Bekannte und neu detektierte Tetrazyklin-Resistenzgene	74
5. Korrelation des Phänotyps mit dem Genotyp	75
E Diskussion	77
1. Gram-negatives Erregerspektrum	77
2. Phänotypisches Resistenzmuster.....	77
2.1. Vergleich der Hemmhofdurchmesser-Verteilung der <i>E. coli</i> Isolate unserer Stammkollektion mit den Wildtyp-Werten von EUCAST	77
2.2. Intrinsische Resistenz gegen Tetrazyklin lässt sich durch phänotypische (labordiagnostische) Untersuchungen nicht belegen	79
2.3. Problematik der Einteilung in sensibel, intermediär und resistent anhand der EUCAST und CLSI Richtlinien	80
2.4. Messungen der Tetrazyklinresistenz an vergleichbaren Erregerkollektiven.....	82
2.5. Übereinstimmung der Einteilung nach CLSI in sensibel, intermediär und resistent mit der EUCAST-Angabe über intrinsische Resistenz.....	83
3. Genotypen	83
4. Genotyp-Phänotyp Vergleich bei <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> und <i>E. cloacae</i>	84

Inhaltsverzeichnis

F Zusammenfassung	86
G Abkürzungsverzeichnis.....	87
H Literatur	88
I Abbildungsverzeichnis.....	94
J Tabellenverzeichnis.....	96
K Danksagung.....	97
L Lebenslauf.....	98
M Eidesstattliche Versicherung	99
O Anhang.....	100

A Einleitung

1. Bakterien

1.1. Infektionskrankheiten allgemein

Bakterien sind ubiquitär vorkommende Lebewesen. Menschen und Tiere sind ständig den verschiedensten bakteriellen Spezies ausgesetzt und leben mit ihnen zusammen. Die schiere Menge der Bakterien auf und im menschlichen Körper ist beeindruckend: es handelt sich dabei um etwa die 10- bis 100-fache Anzahl der menschlichen Körperzellen, die den Organismus auf der äußeren Haut und auf den Schleimhäuten des Verdauungstraktes, des respiratorischen Traktes und des Urogenitaltraktes besiedeln. Die unterschiedlichen Regionen sind abhängig von den jeweiligen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Nahrungsangebot) von verschiedenen bakteriellen Spezies kolonisiert, man spricht vom jeweiligen Mikrobiom. Für den tierischen/menschlichen Organismus erfüllen diese „kommensalen“ Bakterien wichtige Aufgaben: sei es die bakterielle Darmflora, die einen großen Teil der Stoffwechselaktivität im menschlichen Darm bewerkstelligt, oder die verschiedenen Spezies auf Haut und Schleimhäuten, die zur Homöostase derselben beitragen. Die verschiedenen Mikrobiota werden physiologisch durch die vorherrschenden Grundbedingungen (wie Temperatur, pH, Nährstoffangebot, Sauerstoffpartialdruck), die sich in verschiedenen Körperregionen stark voneinander unterscheiden, und durch hemmende oder fördernde Interaktionen der Spezies untereinander relativ stabil gehalten. Allerdings können Bakterien Probleme verursachen, wenn sie in primär sterile Kompartimente wie das Blut, Liquor oder Gewebe vordringen. Die Eigenschaft von Bakterien, sich an diesen Stellen einzunisten und Krankheiten zu verursachen, wird als Pathogenität bezeichnet. Man unterscheidet fakultativ und obligat pathogene Erreger. Fakultativ pathogene Erreger sind in der Lage, bestimmte Körperregionen zu besiedeln und in einer für sie „günstigen“ Situation eine Krankheit zu verursachen (beispielsweise besiedelt *S. aureus* symptomlos die Nasenschleimhaut, kann aber auch eine Endokarditis verursachen). Obligat pathogene Erreger verursachen hingegen bei einer Infektion immer eine Krankheit (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*). Aus Infektion und Pathogenität entstehen somit Infektionskrankheiten wie Wundinfektionen, Harnwegsinfekte, Pneumonien und Gastroenteritiden, welche bei immunsupprimierten Patienten schnell bedrohliche Ausmaße annehmen können. Um diese Infektionen zu behandeln, werden antibakterielle Substanzen

(Antibiotika) eingesetzt. Zunehmende Resistenzen der Bakterien gegen diese Substanzen stellen bereits heute eine große Herausforderung für die erfolgreiche Therapie dar.

Bakterien sind Prokaryoten, sie haben unterschiedliche Größen (üblicherweise Durchmesser von 0,2-1µm und Längen von 1-15µm) und Formen (kugel-, stab-, spiralförmig). Anhand dieser mikroskopisch beschreibbaren Morphologie werden sie historisch grob in Kokken, Stäbchen und Spirochäten eingeteilt. Außerdem werden Bakterien traditionell anhand des Aufbaus ihrer Zellwand eingeteilt. Alle Bakterien weisen eine Phospholipid-Doppelmembran auf, die das Zytoplasma begrenzt. Darum befindet sich meist eine umgebende Zellwand aus einem Peptidoglykan-Grundgerüst. Bestimmte Bakterien weisen als Besonderheit um diese Zellwand noch eine weitere äußere Membran auf.

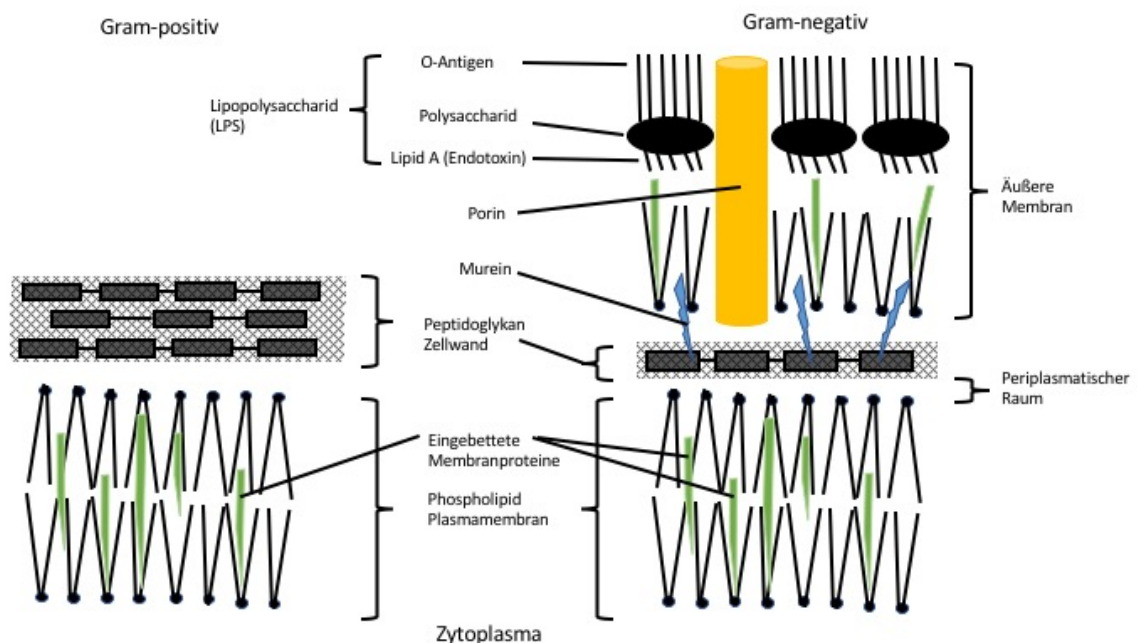


Abbildung 1: Darstellung der Besonderheiten des Aufbaus von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Abhängig vom Färbeverhalten der Zellwand werden Bakterien in Gram-positive (dicke Hülle aus Peptidoglykan) und Gram-negative (dünne Hülle aus Peptidoglykan plus eine weitere umgebende äußere Membran aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden) Organismen eingeteilt. Im Zytoplasma befinden sich die Ribosomen, die DNA und die meisten für den Stoffwechsel benötigten Enzyme. Diese Enzyme sind häufig der Zellmembran angelagert. Bei den Ribosomen handelt es sich im Gegensatz zu denen eukaryotischer Zellen um 70S-Ribosomen. Dies ist relevant für die Wirkungsweise von einigen Antibiotika, die selektiv die Proteinsynthese bakterieller, prokaryotischer 70S-Ribosomen hemmen, ohne eukaryotische 80S-Ribosomen signifikant zu beeinflussen. Die bakterielle DNA liegt nicht wie bei Eukaryonten in einem abgeschlossenen Kompartiment in der Zelle vor (d.h. Zellkern, Nukleus),

sondern liegt meist als doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Molekül mit einer Länge von 1000-6000kbp frei im Zytoplasma, an manchen Stellen an die Zellmembran assoziiert. Manche Bakterien besitzen allerdings mehrere Chromosomen, auch lineare Chromosomen sind möglich. Neben dem Bakterienchromosom finden sich häufig weitere kleinere, ringförmige DNA-Moleküle, sog. Plasmide mit Längen zwischen 0,8-300kbp, welche zusätzliche Geninformationen, etwa zu Resistenzmechanismen gegen Antibiotika, Produktion von Toxinen und anderen Virulenzfaktoren codieren können und den Bakterien einen Selektionsvorteil verschaffen können. Viele Plasmide können leicht zwischen individuellen Bakterienzellen, auch unter Überschreitung der Artenschranke, weitergegeben werden. Dies stellt einen effektiven Austausch von genetischer Information dar.

1.2. Gram-negative Bakterien

Nachdem in dieser Arbeit die Resistenz von Gram-negativen Stäbchen gegen Tetracycline untersucht wird, soll genauer auf den Aufbau Gram-negativer Organismen eingegangen werden. Die Zytoplasmamembran wird von einer dünnen Peptidoglykan-Zellwand umgeben, die sich im periplasmatischen Raum befindet. Innere Membran, Zellwand und äußere Membran sind mit Lipoproteinen und Porinen verbunden. Die äußere Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, deren äußere Lage zum Großteil aus Lipopolysacchariden (LPS) besteht. Diese können beim Zerfall der Bakterien freigesetzt werden und toxische Wirkungen entfalten. Sie werden daher als Endotoxine bezeichnet. In die äußere Membran eingelassen befinden sich auch Außenmembranproteine (engl.: *outer membrane proteins* „omp“). Viele dieser Omps sind als Porinmoleküle für den geregelten Stoffaustausch über diese Membran verantwortlich, welche für hydrophile Stoffe andernfalls ein fast unüberwindbares Hindernis darstellt. Das LPS besteht aus einem Lipidanteil (Lipid A), einem Kernteil und einer je nach Erregerart spezifischen Oligosaccharidkette, die sogenannte O-Seitenkette [1]. Gram-negative Erreger können eine Vielzahl unterschiedlicher Infektionskrankheiten auslösen. Neben Infektionen des Gastrointestinaltraktes können Gram-negative Bakterien unter anderem Infektionen der Atemwege und der Lunge (z.B. Pneumonie), der Harnwege (Pyelonephritis, Zystitis), des Herz-Kreislaufsystems (Endokarditis, Bakteriämie, Sepsis), des Nervensystems (Meningitis), der Weichteile (Wundinfektionen), des Knochen- (Osteomyelitis) und Muskelgewebes (Pyomyositis) hervorrufen. Die Erreger werden deshalb aus geeigneten Patientenproben wie Abstrichen, Urinproben oder Blutkulturen gewonnen und isoliert.

1.2.1. *Enterobacteriales*

Die Mitglieder der Familie der *Enterobacteriales* sind laut Definition Gram-negative, nicht sporenbildende, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die ein gemeinsames Antigen, das ECA (*Enterobacteriales-common-Antigen*) besitzen. Wie bereits der Namensbestandteil „Entero“ vermuten lässt, leben sie fast alle im Darm und gehören zur physiologischen Bakterienflora des Menschen. Trotzdem sind sie bedeutende Erreger von Infektionen, insbesondere auch von nosokomialen Infektionen. In der untersuchten Stammsammlung befinden sich die Gattungen *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* und *Serratia*, welche allesamt extraintestinale Infektionen verursachen können.

Tabelle 1: Vertreter der *Enterobacteriales* in vorliegender Arbeit. Mögliche Infektionen ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Adaptiert übernommen von <https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/infectious-diseases/enterobacteriaceae/> [2]

Escherichia (<i>E. coli</i> , <i>E. hermannii</i>)	Harnwegsinfektionen, Peritonitis, Cholangitis, Divertikulitis, Appendizitis, peritoneale Abszesse, Neugeborenen Pneumonie, Meningitis, Zellulitis, Osteomyelitis, Endokarditis, intestinale Infektionen, Sepsis
Enterobacter (<i>E. cloacae</i> , <i>E. asburiae</i>)	Nosokomiale Infektionen, gesunde Patienten selten kolonisiert. Pneumonie, Harnwegsinfektionen, postoperative Infektionen, Meningitis, Bakteriämie
Klebsiella (<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>)	Pneumonie (<i>community acquired</i> und <i>hospital acquired pneumonia</i> , VAP (<i>ventilator-associated pneumonia</i>) bei beatmeten Patienten, Harnwegsinfektionen, abdominale Infektionen, Sepsis. Hochvirulente <i>K. pneumoniae</i> können eine metastatische Infektionsausbreitung vom ursprünglichen Ort der Infektion zu allen anderen Körperregionen verursachen (häufig Zentrales Nervensystem, Lungen, Augen)
Serratia (<i>S. marcescens</i>)	Weit verbreitet in Krankenhausumgebung (Personal und Oberflächen). Ähnliches Infektionsspektrum wie andere <i>Enterobacteriales</i> . Community-acquired Infektionen womöglich häufiger als angenommen
Proteus (<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>)	Harnwegsinfektionen, andere Infektionen selten
Morganella (<i>M. morganii</i>)	Ähnlich wie <i>Proteus</i> . Harnwegsinfektionen bei langfristiger Dauerkatheterversorgung
Providencia (<i>P. stuartii</i>)	

1.2.2. Taxonomie der Enterobakterien

Domäne: Bakterien; Abteilung: Proteobacteria; Klasse: Gammaproteobacteria; Ordnung: Enterobacteriales; Familie: *Enterobacterales*

1.2.3. Andere

Außer den oben genannten *Enterobacterales* wurden Bakterien der Gattungen *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, und *Stenotrophomonas* untersucht. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über häufig verursachte Infektionen.

Tabelle 2: Häufige Infektionen Gram-negativer nicht-Enterobacterales in dieser Arbeit, ohne Anspruch auf Vollständigkeit

Acinetobacter (<i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i> , <i>A. haemolyticus</i>)	zunehmend multiresistent; Pneumonie, Wundinfektionen. In Deutschland noch niedrige Prävalenz, weltweit problematisch. Biofilmbildung
Alcaligenes (<i>A. faecalis</i>)	Bei immunsupprimierten Patienten lokale Infektionen (Peritonitis, Meningitis, Otitis media, Appendizitis) und Sepsis
Pseudomonas (<i>P. aeruginosa</i>) Stenotrophomonas (<i>S. maltophilia</i>)	bedeutsame nosokomiale Keime, <i>ventilator-associated pneumonia</i> , Wundinfektionen, Harnwegsinfektionen, Endokarditis, Sepsis.

2. Antibiotika

2.1. Allgemein

Sobald es pathogenen Bakterien gelungen ist, eine Körperregion zu besiedeln und sich zu vermehren, sei es durch invasive medizinische (chirurgische) Eingriffe oder eine Schwäche der körpereigenen Abwehr- und Barrierefunktionen, sind sie in der Lage, mit Hilfe verschiedener Virulenzfaktoren Infektionskrankheiten zu verursachen. Diese sind, abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten (Situation des Immunsystems, Grunderkrankungen, körperliche Verfassung), vom Ort der Infektion und vom auslösenden Erreger, unterschiedlich bedrohlich und bedürfen nicht selten einer medikamentösen antibiotischen Behandlung. Lange

Zeit ging man davon aus, dass Krankheiten durch krankhafte Körpersäfte (Miasmenlehre nach Hippokrates; 460 – 370 v. Chr.) oder durch Krankheitssamen („Kontagienlehre“ nach Girolamo Fracastoro; 1476 – 1553) ausgelöst werden. Nachdem schließlich Bakterien entdeckt und allmählich mehr und mehr über ihre Lebensweise und Vermehrung bekannt wurde, gelang es dem Arzt Robert Koch im Jahre 1876, einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einem bakteriellen Erreger und einer Krankheit herzustellen: Milzbrand werde durch *Bacillus anthracis* verursacht [3]. Vor dieser bahnbrechenden Entdeckung versuchten Menschen, die bis dahin unbekannten Auslöser von Krankheiten u.a. mit allerlei pflanzlichen Substanzen – recht ungezielt – zu bekämpfen. Mit der Entdeckung der Bakterien als Krankheitserreger und zunehmend besserem Verständnis konnte nun mit der Entwicklung spezifischer „antibakterieller“ Substanzen begonnen werden. Paul Ehrlich war einer der ersten Chemiker, der die Wirkung von chemischen Verbindungen auf Bakterien systematisch untersuchte. 1910 wurde die Substanz „Salvarsan“ bzw. „Arsphenamin“ mit Wirkung gegenüber Spirochäten und Trypanosomen entdeckt. Sie gilt als das erste entdeckte Antibiotikum der Geschichte und wird der Klasse der Sulfonamide zugerechnet. Es ermöglichte eine effiziente und relativ ungefährliche Therapie der damals weit verbreiteten Syphilis. Durch die Entdeckung des antibakteriellen Penicillins 1928 durch Alexander Fleming konnten Wundinfektionen von im Krieg verwundeten Soldaten effektiv behandelt werden und dadurch viele Leben gerettet werden. Im Laufe der Jahre wurden immer weitere Substanzklassen entdeckt, welche auf verschiedene Art und Weise das Wachstum von Bakterien hemmen. Es werden derzeit 5 grundsätzliche Wirkungsweisen von antibakteriellen Substanzen unterschieden:

- Störung der Zellwandbiosynthese,
- Störung der Proteinbiosynthese,
- Störung des Nukleinsäuremetabolismus,
- Schädigung der Zytoplasmamembran und
- Störung der Synthese essenzieller Metaboliten [4].

Auf diesem Wege wirken Antibiotika entweder bakterizid, d.h. sie töten große Teile einer Bakterienkultur direkt, oder bakteriostatisch, d.h. sie hemmen die Vermehrung einer Bakterienkultur. Wie alle Arzneimittel müssen Antibiotika bestimmte Voraussetzungen erfüllen: sie sollen spezifisch auf die krankmachenden Erreger wirken, ohne dem Wirtsorganismus über Gebühr zu schaden. Zum Beispiel wäre eine starke inhibitorische Wirkung auf Ribosomen eukaryotischer (menschlicher) Zellen schädlich, da die Proteinbiosynthese einen fundamentalen Ablauf der menschlichen Existenz darstellt. Trotzdem haben alle Antibiotika mehr oder weniger starke toxische Nebenwirkungen und greifen in die

normale Flora des menschlichen Organismus ein. Dadurch entstehen Ungleichgewichte im Mikrobiom des Menschen. Eine Folge davon kann beispielsweise die antibiotika-assoziierte Diarrhoe nach oder während dem Einsatz von Antibiotika sein. Des Weiteren sollen neue Antibiotika einfach und günstig in Entwicklung und Anwendung und möglichst beständig gegen bakterielle Resistenzmechanismen sein. Die Entwicklung neuer Substanzklassen geht nur langsam voran, nur wenige neue Medikamente befinden sich derzeit in klinischen Zulassungsstudien. Durch den weltweit unverantwortlichen Einsatz von Antibiotika in der Tier- und Humanmedizin werden viele Erreger antimikrobiellen Substanzen ausgesetzt. Dadurch entwickeln sie Mechanismen, um den Angriffen zu widerstehen (Resistenz) und geben diese Fähigkeiten an ihre eigenen Nachkommen, aber auch an andere Bakterienspezies mittels horizontalem Gentransfer weiter. Es entwickeln sich weitreichende Resistenzen. Dies nimmt inzwischen weltweit bedrohliche Ausmaße an. Panresistente Erreger, also Bakterien, die auf keines der gängigen Antibiotika mehr empfindlich reagieren, vermehren sich ungeachtet der Gabe eines oder mehrerer Antibiotika und stellen Ärzte und Patienten vor dramatische Situationen, in denen einst banale Infektionskrankheiten wieder zur lebensbedrohlichen Gefahr werden. Nur wenige „Reserveantibiotika“ bieten dann noch eine Therapiemöglichkeit, doch auch diese werden häufig verantwortungslos und inflationär eingesetzt. Die Gruppe der Polymyxine beispielsweise zeigt gute Wirksamkeit gegen eine Vielzahl Gram-negativer Keime, doch treten auch hier bereits Resistenzen auf [5]. Manche Experten sprechen bereits von der drohenden „postantibiotischen Zeit“.

2.2. Tetracycline allgemein

Die Familie der Tetracyclin-Antibiotika wurde bereits in den 1940er Jahren erstmals beschrieben. Duggar [6] fand heraus, dass die Myzele der Gram-positiven *Streptomyces aureofaciens*, eine Bakterienart der Gattung der Aktinobakterien, eine gelbliche Substanz sezernieren, das sog. Aureomycin oder auch Chlortetracyclin, welches bei Resistenzmessung durch Bestimmung der Hemmhofdurchmesser das Wachstum vieler verschiedener anderer Bakterienspezies hemmte. Unter den gehemmten Gram-negativen Erregern fanden sich folgende Spezies: *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella pullorum*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria catarrhalis*, und *Eberthella typhosa*. *Pseudomonas aeruginosa* und *Serratia marcescens* zeigten bereits damals eine relative Resistenz gegen diese Substanz. In dieser Veröffentlichung wurde allein die antibakterielle Wirksamkeit der Bakterienart bzw. ihres Sezernierungsproduktes beschrieben. Der Autor wies bereits in den

Nachkriegsjahren auf den langen Weg von der Entdeckung über die Isolierung und Entwicklung eines Therapeutikums bis zur breiten Anwendbarkeit hin. Die Entwicklung wurde fortgeführt und es folgte 1953 durch Conover die Entdeckung einer potenteren Substanz, das Tetrazyklin [7]. Die chemische Struktur der damals bereits auf dem Markt befindlichen Substanzen Terramycin und Aureomycin wurde erst deutlich später, 1952, erforscht und publiziert [8]. Im Laufe der Jahre wurden neben den natürlich von *Streptomyces aureofaciens* und *Streptomyces rimosus* produzierten Substanzen Chlortetrazyklin und Oxytetrazyklin weitere von anderen Spezies produzierte Substanzen entdeckt oder chemisch weiterentwickelt: Doxycyclin [9], Lymecyclin und Methacyclin [10]; Minocyclin und zuletzt Tigecyclin [11] sind semisynthetische Substanzen. Aktuell befinden sich mindestens zwei neue Tetrazykline in klinischen Studien: Omadacycline [12] und Eravacycline [13].

2.2.1. Klassische Tetrazykline

Das Grundgerüst der Tetrazykline (Abbildung 2) wird durch eine polyzyklische Verbindung gebildet und besteht aus vier linear anellierten Sechseringen (A, B, C, D). Die Kohlenstoffatome C1, C10, C11 und C12 sind durch oxygenierte Verbindungen ersetzt, C14 durch ein Diethylamin. C5, C6 und C7 werden durch verschiedene Verbindungen ersetzt.

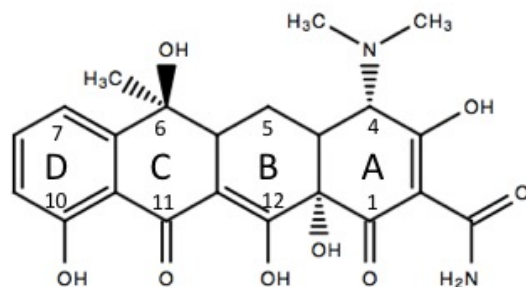


Abbildung 2: Strukturformel des Tetrazyklins, gezeichnet mit <http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>

Tetrazyklin war wegen seiner breiten Anwendbarkeit eines der am meisten produzierten Antibiotika. Allerdings wurden große Teile davon (>70%) nicht für die Bekämpfung von Krankheiten beim Menschen eingesetzt, sondern als Nahrungszusatz für Wachstumsförderung und Krankheitsprophylaxe in der Tierzucht [14]. Durch die wechselnde Bezeichnung der Tetrazykline als eine Familie von Wirkstoffen einerseits und dem bestimmten Wirkstoff Tetrazyklin andererseits, ist es schwer nachzuvollziehen, in welchem Maße und für welche

Indikationen die Wirksubstanz Tetrazyklin in der Humanmedizin eingesetzt wurde und wird. Tetrazyklin ist heute in Deutschland nur noch in wenigen Präparaten vorhanden: als Salbe in Verbindung mit Amphotericin B zur Behandlung von Infektionen des weiblichen Genitaltraktes durch Tetrazyklin-empfindliche Krankheitserreger; als Monopräparat-Salbe zur Behandlung entzündlicher Formen der Akne; in Verbindung mit Metronidazol und anderen Zusätzen in Form von Hartkapseln zur Eradikationstherapie von *Helicobacter pylori* Infektionen; zur Behandlung von Infektionen der Atemwege (z.B. atypische Pneumonien durch Mykoplasmen, Rickettsien und Chlamydien), des Urogenitaltraktes, des Magen-Darm-Traktes und anderen Infektionen (z.B. Konjunktivitis) durch einen begrenzten, Tetrazyklin-empfindlichen Erregerkreis. Zusammenfassend wurden Tetrazykline noch vor zwanzig Jahren als wirksam gegen die häufigsten Krankheitserreger mit günstiger Pharmakokinetik und geringer Toxizität, mit wenigen Fällen von allergischen Reaktionen und als äußerst kostengünstig beschrieben. Tetrazykline werden oral, parenteral oder topisch verabreicht und werden nach oraler Einnahme im Magen und proximalen Dünndarm resorbiert. Die Aufnahme wird durch in der Nahrung vorhandenes Kalzium durch Bildung von Chelaten vermindert. Die meisten Tetrazykline werden in der Regel 4-mal täglich verabreicht und erreichen Serumspiegel von 2-5µg/ml, penetrieren gut in Körperflüssigkeiten und Gewebe und werden im Urin ausgeschieden. Vergleichsweise hohe Konzentrationen können in Sputum (ca. 20% des Serumspiegels) und in Talg und Schweiß erreicht werden, was den Einsatz gegen Atemwegsinfekte und Akne erklärt [15]. Die weitreichenden Resistenzen gegen die klassischen Tetrazyklinderivate und ihre in physiologischen Konzentrationen nur bakteriostatische Wirkung haben jedoch schon früh ihren Einsatz gegen gewöhnliche Infektionskrankheiten limitiert [16].

2.2.2. Tigazyklin

Tigazyklin ist ein Glycyl-Abkömmling des Minocyclins, welches in den 1990er Jahren nach einer langen Entwicklungspause nach der Entdeckung des letzten Tetrazyklins gefunden wurde. Es wurde versucht, neue Tetrazyklin-Analoga zu entwickeln, welche sowohl gegen Tetrazyklin empfindliche als auch gegen resistente Organismen wirken. Tigazyklin besitzt heute in Deutschland eine Zulassung für die Behandlung komplizierter Haut- und Weichgewebsinfektionen (cSSTI) und komplizierter intraabdomineller Infektionen (cIAI), wenn andere Behandlungsalternativen ungeeignet erscheinen. Allerdings wird der Nutzen durch einen Rote-Hand-Brief der AKDAE (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 17.03.2011) eingeschränkt, da wegen geringer Bakterizidie die Wirkung, und damit das

Outcome des Patienten, im Vergleich zu einer stärker bakteriziden Substanz schlechter sein könnte.

2.2.3. Antibakterielle und andere Wirkungen der Tetrazykline

2.2.3.1. Aufnahmemechanismen von Tetrazyklin in die Zelle

Die Aufnahme von Tetrazyklinen in die Bakterienzellen wurde anhand von *E. coli* erforscht. Bei Gram-positiven und Gram-negativen Organismen müssen die Tetrazyklin-Moleküle verschiedene Membranen durchdringen, um zu ihrem Wirkort, den Ribosomen im Zytoplasma, zu gelangen. Tetrazyklin-Moleküle gelangen durch OmpF und OmpC (Omp = *outer membrane protein*) Porine in der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien in das Periplasma [17]. Dazu komplexiert es erst mit divalenten Magnesium-Ionen und der kationische Magnesium-Tetrazyklin-Komplex wird anschließend durch das Donnan-Potential (elektrisches Potential zwischen Extra- und Intrazellulärraum) durch die Porine ins Periplasma gezogen [18]. Im Periplasma dissoziiert der Komplex wieder und das Tetrazyklin kann als schwach lipophiles Molekül die innere Phospholipid-Doppelmembran durchqueren. Die Zellmembran Gram-positiver Bakterien wird ebenfalls im dissoziierten, elektroneutralen, schwach lipophilen Zustand des Moleküls überquert [15]. Die Aufnahme von Tetrazyklin über die innere zytoplasmatische Membran, durch welche nur elektrisch neutrale Moleküle diffundieren können, wird vom pH-Gefälle angetrieben. Lebende Bakterien erhalten über ihrer Zellmembran einen Protonen-Gradienten aufrecht (externer pH 6,1 und zytoplasmatisch 7,8), der bewirkt, dass extrazellulär mehr Tetrazyklin-Moleküle in geladener Form vorliegen als intrazellulär (9,5 zu 5,0%). Um ein Gleichgewicht zwischen den beiden Kompartimenten herzustellen, diffundieren nun ungeladene Tetrazyklin-Moleküle vom Extrazellulärraum über die Plasmamembran ins Zellinnere. An der inneren Membran der Zelle findet die ATP Synthese statt, angetrieben durch einen aufrecht erhaltenen Protonengradienten. Nachdem der Ladungszustand der Moleküle von diesem energieabhängigen Protonen-Gradienten über der Zellmembran abhängig ist, ist der gesamte Diffusionsprozess energieabhängig [19]. Tetrazyklin liegt üblicherweise in einem Gleichgewicht zwischen protonierter und Magnesium-komplexierter Form (THMg⁺) vor. Im Zellinneren angekommen, chelieren Tetrazyklin-Moleküle ein weiteres Mal wegen des höheren intrazellulären pH und des höheren Magnesium-Spiegels in die Membran-undurchlässige Komplex-Form [20].

2.2.3.2. Bindung des Tetracyklin an die 30S Untereinheit

Dass Tetracyklin an Ribosomen bindet, ist schon lange bekannt. Nach anfänglichen Zweifeln am kausalen Zusammenhang [16] ist mittlerweile gut bewiesen, dass die typischen Tetracykline ihren bakteriostatischen Effekt durch die Bindung an Untereinheiten des bakteriellen Ribosoms und dadurch Inhibierung der Proteintranslation ausüben [21]. Die kleine 30S Untereinheit des Ribosoms besitzt drei Bindungsstellen für tRNA-Moleküle, genannt A- (aminoacyl), P- (peptidyl) und E- (Exit) Stellen. Tetracyklin besitzt an seiner Ringstruktur auf der einen Seite hydrophile (polare) funktionelle Gruppen und ist sonst apolar. Das Molekül kann deshalb mit geladenen oder hydrophoben Strukturen interagieren [22]. Die Bindung an das Ribosom erfolgt an unterschiedlichen Positionen: die sog. *primary binding site* an der A-Stelle, die normalerweise die Akzeptorregion für aa-tRNA (aminoacyl-tRNA) darstellt und mehrere *secondary binding sites* [22]. Mit der primären Bindungsstelle interagiert das Tetracyklin-Molekül über seine hydrophile Oberfläche mit der kleinen Furche von Helix 34 (h34) und Helix 31 (h31) der 16S rDNA [21]. Ein Verlust der hydrophilen funktionellen Gruppen der Tetracyklin Moleküle z.B. durch Synthese von Tetracyklin-Derivaten erklärt, warum dadurch ihre antibakteriellen Fähigkeiten verloren gehen [21]. Über Wasserstoffbrückenbindungen wird das Tetracyklin an Atome bestimmter Nukleotide (C1054, G1197, G1198) der ribosomalen 16S rDNA gebunden. Während der Translation werden aminoacyl-tRNA-Moleküle (aa-tRNA) durch den *elongation factor* (EF-tu) an das Ribosom geliefert. Wenn das Anticodon der aa-tRNA und das Codon der mRNA richtig zusammenpassen, vollzieht EF-tu einen Strukturwandel und lässt die Bindung von aa-tRNA an die A-Stelle zu [21]. Tetracyklin und aa-tRNA konkurrieren demnach um die Bindung an das Ribosom.

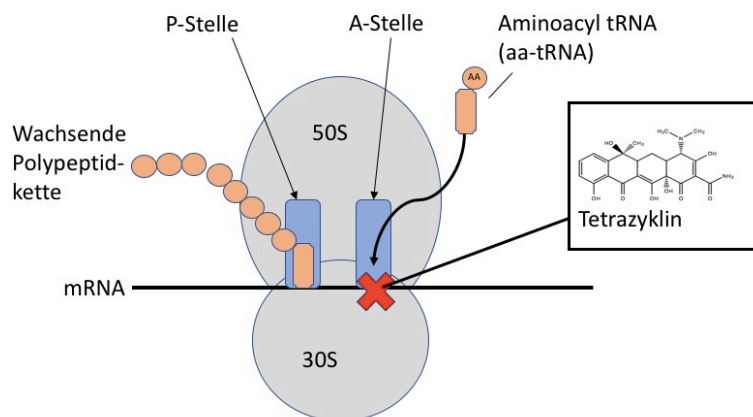


Abbildung 3: Darstellung des Angriffspunkts von Tetracyklin an der 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. aa-RNA konkurriert mit Tetracyklin um die Bindungsstelle an der A-Stelle.

Wenn ein Tetrazyklin-Molekül die A-Stelle besetzt kann das entstehende Proteinmolekül nicht weiter aufgebaut werden und die Proteinbiosynthese des Bakteriums wird gehemmt.

2.2.3.3. Strukturelle Voraussetzungen für die Wirksamkeit der Tetrazykline

Wichtige Strukturbestandteile zum Erhalt der antibiotischen Aktivität aller Tetrazykline sind der Erhalt der linearen Vierring-Struktur, der stereochemischen Konfiguration an den Positionen 4a, 12a (Verbindungsstelle zwischen Ring A und B) und 4 (Dimethylaminogruppe) und des Keto-Enol-Systems an den Positionen 11, 12 und 12a in Nähe zu Ring D [15]. Alle neu entwickelten Substanzen müssen mindestens diese chemischen Eigenschaften erfüllen, um antibiotische Wirksamkeit zu erlangen.

2.2.3.4. Weitere Wirkungen der Tetrazykline

- **Bakterizider Effekt:** Neben den typischen Tetrazyklinen, die durch die Unterbindung der bakteriellen Proteinbiosynthese einen reversiblen bakteriostatischen Effekt erzielen, gibt es atypische Tetrazykline, welche einen direkten bakteriziden Effekt haben. 1983 wurden zwei atypische Tetrazyklin-Derivate beschrieben, 6-Thiatetrazyclin und Chelocardin, welche offenbar bakterizid und nur sehr schwach bakteriostatisch wirkten [23]. 1991 wurden die weiteren Substanzen Anhydrotetrazyclin, Anhydrochlortetrazyclin und 4-epi-Anhydrochlortetrazyclin beschrieben, die ebenso kaum auf die Proteinsynthese wirkten, jedoch einen bakteriziden Effekt hatten [24]. Die Autoren nehmen an, dass sich diese Substanzen in der bakteriellen zytoplasmatischen Membran anreichern und diese dadurch zerstören [24]. Durch ihre bedeutenden Nebenwirkungen auch auf eukaryotische (humane) Zellen waren diese Substanzen jedoch als Therapeutika uninteressant [24].
- **Aktivität gegen Protozoen (Parasiten):** Tetrazykline besitzen Aktivität gegenüber den protozoischen Parasiten *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Gardia lamblia*, *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis* und *Toxoplasma gondii*, wahrscheinlich durch Wirkung auf deren Mitochondrien, oder wie im Falle von *Plasmodium falciparum* auf das Apicoplast. Tetrazyclin blockiert bei *P. falciparum* die Expression des Apicoplast Genoms, wodurch nicht-funktionale Apicoplasten an

nachfolgende Merozoiten weitergegeben werden. Der Verlust funktionierender Apicoplasten in Nachfolgegenerationen behandelter Parasiten führt zu einer langsamen, aber starken Wirkung gegen Malaria [15, 25].

2.3. Resistenz allgemein

Von einer Resistenz gegen ein Antibiotikum spricht man, wenn Bakterien in Anwesenheit therapeutisch relevanter Konzentrationen eines Antibiotikums ihre Vermehrung nicht einstellen. Somit sind sie gegenüber der Wirksubstanz unempfindlich [1]. Die fortschreitende Verbreitung von Antibiotikaresistenzen hat verschiedene Ursachen: Einerseits werden übertragbare Resistenzgene durch Gentransfer an bis dahin empfindliche Stämme weitergegeben, andererseits wird durch den Einsatz von Antibiotika ein Selektionsdruck ausgeübt, durch welchen nur diejenigen Bakterienstämme überleben und sich vermehren können, welche Resistenzmechanismen in sich tragen. Resistenzen können auch durch spontane Mutationen entstehen. Beispielsweise kann eine Mutation in demjenigen Gen auftreten, das für das Penicillin-bindende-Protein kodiert. Penicilline haben dann nicht mehr die gleiche Affinität zu ihrem modifizierten Wirkort und wirken deshalb weniger oder gar nicht mehr [26]. Durch Begrenzung der Entstehung und Verbreitung resistenter Keime (Einhaltung der Hygienevorschriften) und durch Vermeidung des Selektionsdruckes (kluge und rationale Auswahl und richtige Anwendung eines Antibiotikums) könnte die rasante globale Verbreitung resistenter und multiresistenter Keime zumindest verlangsamt werden [27].

2.4. Antibiotikaresistenz gegen Tetracycline

Bereits bei der Entdeckung des ursprünglichen Tetracyklins wurden zwei Erreger beschrieben, die gegen seine Wirkung resistent zu sein schienen. Das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* und *Serratia marcescens* ließ sich durch Aureomycin kaum behindern [6]. Trotzdem zeigten die Tetracycline meist ein breites Wirkungsspektrum gegenüber einer Vielzahl Gram-positiver und Gram-negativer Organismen, als auch gegenüber Chlamydien, Mycoplasmen, Plasmodien und Amöben. Sie wurden daher als Breitbandantibiotika bezeichnet [28]. In den 1950er bis 1960er Jahren war Tetracyclin das am häufigsten eingesetzte Antibiotikum, es verfügte über ein breites Wirkspektrum und geringe Nebenwirkungen [29]. Doch bereits in den 1990er Jahren waren resistente Erreger so stark verbreitet, dass kaum noch eine Infektionskrankheit mit Tetracyclin als Therapie der ersten Wahl behandelt wurde [29].

Heutzutage spielen die typischen Tetrazykline nur noch eine geringe Rolle in der klinischen Therapie. Grundsätzlich wird bei der Resistenz gegen Tetrazyklin eine intrinsische und eine erworbene Resistenz unterschieden.

2.4.1. Intrinsische Tetrazyklinresistenz

Das EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) benennt im Dokument „EUCAST intrinsic resistance and exceptional phenotypes, Expert Rules Version 3.1 (2016)“ die Gram-negativen Spezies *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii* und *Pseudomonas aeruginosa* als intrinsisch resistente Organismen. Diese nicht-R-Plasmid-vermittelte Resistenz (R-Plasmid = Resistenz-Plasmid) wird für *Pseudomonas aeruginosa* zum einen durch eine schlechter durchlässige Zellmembran erklärt, zum anderen durch Effluxpumpen und Degradierung des Wirkstoffes durch Proteinkomplexe, die Resistenzen neben der gegen Tetrazyklin auch gegen eine Vielzahl anderer Antibiotika (wie Chloramphenicol und Fluorochinolone) vermitteln [30].

2.4.2. Erworbene Tetrazyklinresistenz

Neben den wenigen Organismen, die intrinsisch resistent gegenüber der Wirkung von Tetrazyklin sind, gibt es eine Vielzahl, die durch die Aufnahme von Erbgut in Form von Plasmiden oder durch spontane Mutationen Resistenzen erwerben.

2.4.2.1. Vier grundsätzliche Mechanismen der Resistenz

Bakterien können über Gentransfer Erbgut in sich aufnehmen, welches Informationen für Resistenzmechanismen enthält. Es sind vier Wirkungsmechanismen dieser Resistenzen bekannt:

- Mittels Efflux-Pumpen werden Tetrazyklin-Moleküle durch aktiven Transport aus der Zelle gepumpt und stehen somit nicht mehr in ausreichender Konzentration am Wirkort zur Verfügung.
- Die sogenannten „*Ribosomal protection proteins*“ binden an die Bindungsstelle des Tetrazyklins und verhindern dadurch seine Wirkung.

- Weitere Gene kodieren für Monooxygenasen, welche die Struktur der Tetrazykline verändern oder sie abbauen.
- Mutationen im Erbgut der 16S rRNA verändern die Tetrazyklin-Bindungsstellen so, dass Tetrazyklin nicht mehr an sie binden kann.

Die Einzelnen Mechanismen werden im Folgenden detailliert beschrieben.

2.4.2.2. Nomenklatur der Tetrazyklin-Resistenzgene

1980 fanden Mendez et al. heraus, dass die Tetrazyklinresistenz durch unterschiedliche Gene auf natürlich vorkommenden Plasmiden vermittelt wird. Sie konnten vier verschiedene Gene durch DNA-DNA-Hybridisierung und Restriktionsenzymverfahren voneinander unterscheiden, welche sie als Klassen A, B, C und D bezeichneten [31]. Die Nomenklatur wurde durch eine Veröffentlichung von 1989 vereinheitlicht, nachdem in großer Geschwindigkeit immer neue Tetrazyklin-Resistenzgene entschlüsselt und die unterschiedlichen Bezeichnungen verwirrend wurden [32]. Diese Gene, die auf unterschiedliche Weise eine Resistenz gegen Tetrazykline vermitteln, werden als „tet“-Gene bezeichnet, ihre Proteinprodukte als „Tet“. Die verschiedenen Klassen werden mit einem Großbuchstaben (A, B, etc.) nach dem Präfix „tet“ benannt, also z.B. „tetA“ [32]. Falls in einer Klasse mehrere strukturelle Gene vorhanden sind, wie z.B. in der Klasse P, so wird das erste Gen als tetA(P) (kodiert in diesem Fall für eine Effluxpumpe) und das Zweite als tetB(P) (kodiert für ein RPP) bezeichnet [33]. Repressor-Gene werden mit einem „R“ bezeichnet, so steht z.B. tetR(A) für das Repressor-Gen der Klasse A [32]. Die Klassifizierung von tet-Genen beruhte damals auf DNA-DNA-Hybridisierung, somit wurde ein Gen als ein Neues bezeichnet, sofern es nicht an eines der bekannten tet-Gene band [34]. Durch die Entdeckung immer neuer Klassen gelangte man an das Ende des römischen Alphabetes und führte die Bezeichnung mit arabischen Zahlen, beginnend mit „tet 30“, fort [35]. Mit der Weiterentwicklung und Verbreitung von Sequenzierungsmethoden wurden die Sequenzen der unterschiedlichen Gene aufgedeckt. Diese dienen heutzutage zur Unterscheidung der verschiedenen Klassen der tet-Determinanten [15]. Ein sequenziertes Gen wird einer bekannten Klasse zugeordnet, wenn $\geq 80\%$ seiner Aminosäuresequenz mit der Sequenz der bekannten Klasse übereinstimmt. Wenn $\leq 79\%$ übereinstimmen wird das entsprechende Gen einer neuen Klasse zugeordnet [35]. Die Koordination der Bezeichnung neuer tet-Gene wurde zentral von S. B. Levy [35] übernommen. So gut wie alle bekannten Tetrazyklinresistenz-Determinanten wurden sequenziert und in der NCBI GenBank

veröffentlicht, dadurch ist ein Abgleich und eine Zuordnung der detektierten Gene zu den verschiedenen Klassen möglich [15]. Die Gene der Oxytetracyklinresistenz werden als „otr“-Gene bezeichnet, ihre Proteinprodukte als „Otr“, andernfalls ist die Nomenklatur identisch [34].

2.4.2.3. Bekannte Tetrazyklin-Resistenzgene und ihre Verteilung auf verschiedene Spezies

Prof. Roberts bietet einen aktuellen Überblick über alle bekannten tet-Gene, ihren Wirkmechanismus und die Spezies, in denen sie detektiert wurden. In einem online-Dokument werden diese Informationen halbjährlich aktualisiert und veröffentlicht (<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>; „Modified Oct. 9, 2020; letzter Abruf 16.12.2020). Bis heute wurden 63 verschiedene Klassen von tet-Genen beschrieben, davon kodieren 36 Klassen für Effluxpumpen, 13 Klassen für „*Ribosomal Protection Proteins*“ (RPP), 13 Klassen für Tetrazyklin-abbauende Enzyme. Bei einer Klasse konnte bisher kein Funktionsmechanismus nachgewiesen werden. Die Gene können einzeln auftreten oder auch in diversen Kombinationen. Die Tabelle 3 wurde aus den aktuellen Online-Dokumenten übernommen und bietet eine Zusammenfassung des aktuellen Forschungsstandes zu Vorkommen und Verteilung der tet-Gene (Letzter Abruf 16.12.2020; „*modified Oct. 10, 2020*“).

Tabelle 3: Vorhandensein verschiedener Tetrazyklin-Resistenzgene in den untersuchten Spezies. Adaptiert übernommen von Prof. Roberts (<http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>)

Spezies	Efflux	Ribosomaler Schutz (RPP)	Enzymatisch
<i>Acinetobacter</i> spp.	A, B, C, D, G, H, L, Y, 39	M, O, W	X
<i>Alcaligenes</i> spp.	A, E, 30, 39	M	
<i>Enterobacter</i> spp.	A, B, C, D, E, G, L, 39	M	X
<i>Escherichia</i> spp.	A, B, C, D, E, G, J, L, Y	M, W, 32	X
<i>Klebsiella</i> spp.	A, B, C, D, E, L	M, S, W	X
<i>Morganella</i> spp.	A, D, J, L	M	
<i>Proteus</i> spp.	A, B, C, E, G, H, L, J	M	X
<i>Providencia</i> spp.	B, E, G, H, J, 39, 57	M	
<i>Pseudomonas</i> spp.	A, B, C, D, E, G, K, L, Y, 39, 42	M, O, T, W	X, 34
<i>Serratia</i> spp.	A, B, C, E, 41	M, S	X, 34
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	B, H, 35, 39	M, O, T	

2.4.2.4. Efflux-Pumpen

Von den 63 tet-Klassen kodieren 36 für Effluxpumpen. Die für Efflux-Pumpen kodierenden Gene werden der „*Major Facilitator Superfamily*“ (MFS) zugerechnet. Die MFS ist eine der größten Gruppen von hunderten membran-assoziierten Transportsystemen in verschiedensten Zellen aller zellulären Organismen (Bakterien, Eukaryoten und Archaeen). Bei den Transportsystemen der MFS handelt es sich im Allgemeinen um Symporter oder Antiporter, die gelöste Substanzen mit oder gegen andere gelöste Substanzen oder Kationen in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus transportieren, exemplarisch dargestellt in Abbildung 4.

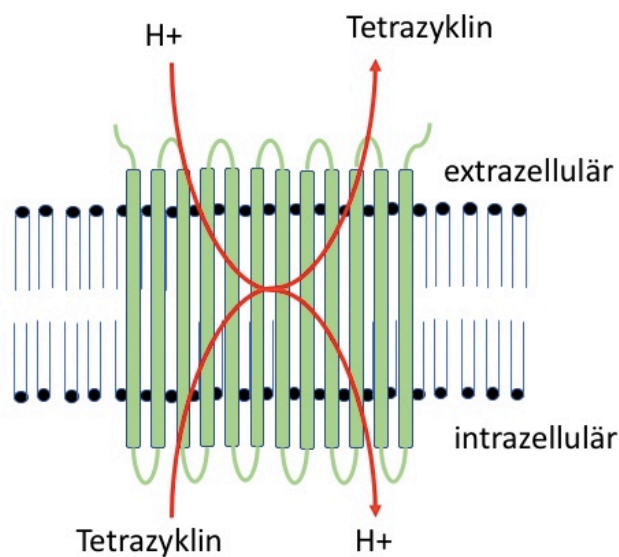


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Effluxpumpe. Sie wirkt als H⁺:Drug-Antiporter und transportiert Tetracyclin-Moleküle im Austausch mit Protonen aus der Zelle heraus. Es handelt sich um eine Form des aktiven Transports, die Energie wird durch einen Protonen-Gradienten geliefert.

Neben der MFS Familie gibt es vier weitere Gruppen von Efflux-Proteinen: SMR (small multidrug resistance), RND (resistance-nodulation-cell-division), ABC (ATP-binding-casette) und MATE (multidrug and toxic compound extrusion family). Diese fünf Familien von Efflux-Proteinen unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau, ihren Energiequellen, der Art der Substrate und den Spezies in denen sie vorkommen [36]. Alle Tetracyclin-Efflux-Gene kodieren für membranassoziierte Proteine, die Tetracyclin aus der Zelle hinaus pumpen und dadurch die intrazelluläre Konzentration von Tetracyclin verringern [15]. Dadurch kann weniger Tetracyclin an seinen Wirkort, den Ribosomen binden und das Bakterium wird resistent. Bei den Efflux-Pumpen handelt es sich um ca. 46kDa schwere membran-gebundene Proteine.

Sie wurden entsprechend Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz ursprünglich in 6 verschiedene Gruppen eingeteilt [15], heute spricht man von 7 Gruppen [37]: Die Pumpen aus Gruppe 1) (zu welcher tetA, B, C, D, E, G, H, Z, J, 30, 31 und 33 gezählt werden [37]) gehören zur Familie 3 der MFS (DHA12; Drug:H⁺ Antiporter 12 TMS Transmembransegmente) [38] und bestehen folglich aus 12 transmembranen Helices mit einer langen zentralen zytoplasmatischen Schleife, welche die Transmembranhelices 6 und 7 miteinander verbindet [15]. N- und C-Terminus sowie die große zentrale Schleife 6-7 und die Schleifen 8-9 und 10-11 befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite, die Schleifen 7-8, 9-10 und 11-12 auf der periplasmatischen Seite der zytoplasmatischen Membran [39]. Die Effluxpumpen transportieren ein Tetrazyklin-Kation im Austausch gegen ein Proton gegen den Konzentrationsgradienten aus der Zelle hinaus [40]. Der Austausch erfolgt elektrisch neutral, stöchiometrisch im Verhältnis 1:1 [41]. Die Gene der Pumpen der Gruppe 1 haben zwei funktionelle Domänen, alpha und beta, welchen die N- bzw. C-Terminus-Hälften des Proteins entsprechen [42]. Mutationen in einer der beiden Hälften führen zum Verlust der Pumpaktivität [15]: z.B. spielt das Dipeptid Ser65-Asp66 eine wichtige Rolle beim Transport des Tetrazyklin-Moleküls [40] und His257 ist entscheidend für die Translokation des Protons [43]. Die Gene der Gruppe 1 kommen bis auf tetZ ausschließlich in Gram-negativen Spezies vor und befinden sich auf großen konjugativen Plasmiden, welche häufig auch Gene für Resistenzen gegen andere Antibiotika, Schwermetalle und Toxine auf sich tragen [15, 44]. Durch Selektion werden diese Plasmide, welche mehrere Resistenzgene auf sich tragen, auch an Bakterien weitergegeben, die nicht unmittelbar dem Tetrazyklin ausgesetzt waren. Es entsteht eine „Co-Selektion“ und folglich eine Vermehrung derjenigen Keime, die eine Resistenz aufgenommen haben. Zu den Pumpen in Gruppe 2) gehören tetK und tetL. Sie bestehen aus 14 transmembranösen Helices und wurden damals ausschließlich in Gram-positiven Spezies beschrieben [15], mittlerweile sind tetK und tetL auch in Gram-negativen Spezies zu finden (siehe aktuelles Dokument von Prof. Roberts). Gruppe 3) beinhaltet otrB und tcr3 und besteht aus Proteinen mit 14 transmembranösen Helices; die beiden Gruppen 2 und 3 werden der Familie 2 der MFS (Drug:H⁺ Antiporter) zugeschrieben [38, 45]. Gruppe 4) tetA(P) mit 12 transmembranen Helices, Gruppe 5) tetV und Gruppe 6) eine Pumpe, die statt dem Protonengradienten eher ATP als Energiequelle nutzt [15]. Der Vertreter von Gruppe 6 wurde als tetY identifiziert, doch nach phylogenetischen Untersuchungen sollte er (aufgrund seiner ähnlichen Sequenz zu tetG) der Gruppe 1 zugerechnet werden [37]. Gruppe 7) umfasst tet35, dessen Sequenz Ähnlichkeit zu Na/K-Antiportern besitzt und tet34, dessen Resistenzmechanismus Magnesium-abhängig zu sein scheint [37]. Die meisten Tetrazyklin-

Efflux-Pumpen vermitteln eine Resistenz gegen Tetrazyklin, wirken jedoch weniger stark gegen Doxycyclin und Minocyclin und kaum gegen Glycylcycline wie Tigecyclin [15].

2.4.2.5. Ribosomale Schutzproteine

Es sind 13 verschiedene Klassen von tet-Genen bekannt, die für sog. ribosomale Schutzproteine (*ribosomal protection proteins*, RPP) kodieren. Dabei handelt es sich um lösliche zytoplasmatische Proteine, welche die Ribosomen vor der Wirkung von Tetrazyklin, aber auch Doxycyclin und Minocyclin beschützen [15]. Am besten untersucht wurden dabei die beiden Determinanten tetO und tetM, doch wird davon ausgegangen, dass alle Klassen der RPP auf ähnliche Art und Weise wirken [46]. Die Sequenzen der RPP haben große Ähnlichkeit zu den Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G, die entscheidende Funktionen bei der Translation während der Proteinbiosynthese haben [47]. In Anwesenheit eines RPP kann Aminoacyl-tRNA trotz vorhandenem Tetrazyklin an die Bindungsstelle des Ribosoms binden und die Translation fortgeführt werden [48]. RPP binden an das Ribosom, wodurch es zu einer Konformitätsänderung kommt, die verhindert, dass Tetrazyklin an das Ribosom binden kann [15]. Vereinfacht findet folgender Prozess statt: Tetrazyklin wird durch ein RPP von seiner Bindungsstelle am Ribosom entfernt, das RPP dissoziiert anschließend vom Ribosom und erlaubt es dem Ternärkomplex (EF-Tu-aa-tRNA-GTP) zu binden, wodurch die Proteinsynthese weiterläuft [46].

2.4.2.6. Enzymatische Degradation

13 tet-Klassen kodieren für ein zytoplasmatisches Protein, das Tetrazyklin chemisch modifiziert und dadurch unwirksam macht. 2001 war nur ein einziges solches Gen bekannt (tetX), welches als Oxidoreduktase Tetrazyklin unter Beteiligung von Sauerstoff, FAD und NADPH chemisch modifiziert und dadurch unwirksam macht [15]. 2016 wurde eine ganze Reihe weiterer Enzyme beschrieben. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Flavoenzyme, die zur Deaktivierung von Tetrazyklin unterschiedliche Reaktionen nutzen [49].

2.4.2.7. Mutationen der rRNA

Es sind einige Mutationen im Erbgut der 16S rRNA bekannt, die zu einer Resistenz gegenüber Tetrazyklin führen. Im Wildtyp-Ribosom interagiert G1058 mit U1199 in Helix 34. Eine Punktmutation G1058C verhindert diese Interaktion und sorgt dafür, dass die benachbarten Nukleotide G1197 und G1198 nicht mehr wie zuvor mit Tetrazyklin interagieren können [21, 50]. Weitere bekannte Mutationen bestehen in Helix 31, Positionen 965-967 der 16S rRNA. Bei diesen fällt auf, dass dreifach-Mutationen eine stärkere Resistenz als einfach-Mutationen verursachen [51].

2.4.2.8. Gemischte Resistenz

Alle oben beschriebenen Mechanismen der Resistenz gegenüber Tetrazyklin können einzeln, häufiger aber in vielzähligen Kombinationen in einem Organismus vorkommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einzelnen Bakterien bis zu vier verschiedene tet-Gene nachgewiesen. Dies ist Folge der enormen Verbreitung der tet-Gene auf Resistenzplasmiden und deren Austausch unter verschiedenen Spezies (Selektion).

3. Situation in Äthiopien

Die untersuchten Bakterienstämme dieser Arbeit stammen aus dem Universitätskrankenhaus Jimma (JUMC, Jimma University Medical Center) in West-Äthiopien, mit dem die LMU (Ludwig-Maximilians-Universität) München eine Kooperation betreibt. Äthiopien ist ein Entwicklungsland im Osten Afrikas (siehe Karte in Abbildung 5). Es grenzt an Eritrea, Sudan, Südsudan, Uganda, Kenia und Somalia. Es hat eine Einwohnerzahl von ca. 102,4 Mio. (2016), welche sich pro Jahr um etwa 2,5% erhöht. Damit gehört es zu einem der am schnellsten wachsenden Länder dieser Welt. Gleichzeitig handelt es sich bei Äthiopien um eines der am wenigsten entwickelten Länder. Im Index der menschlichen Entwicklung (*human development index*, HDI) des Entwicklungsprogramms der Vereinten Nationen (UNDP), der grundlegende Faktoren der menschlichen Entwicklung berücksichtigt (z.B. Lebenserwartung bei der Geburt, Bildungsniveau, Pro-Kopf-Einkommen) rankt Äthiopien auf Platz 173 von 189. Deutschland liegt im Vergleich dazu auf Platz 5. Das äthiopische Gesundheitswesen ist massiv unterfinanziert, die öffentlichen Gesundheitsausgaben betragen im Jahr 2016 2,87% des Bruttoinlandsprodukts (Deutschland im Vergleich 8,7%). Kinder werden häufig ohne

medizinische Betreuung zur Welt gebracht, 5,85% der lebend geborenen Kinder erreichen nicht das fünfte Lebensjahr (Deutschland im Vergleich 0,37%). Durch große finanzielle Unterstützung von Geberländern und Anstrengungen der Regierung sind aber Verbesserungen zu verzeichnen. So waren 2017 beispielsweise 73% der einjährigen Kinder gegen Diphtherie, Tetanus und Keuchhusten geimpft (Deutschland zum Vergleich 95%) [52].

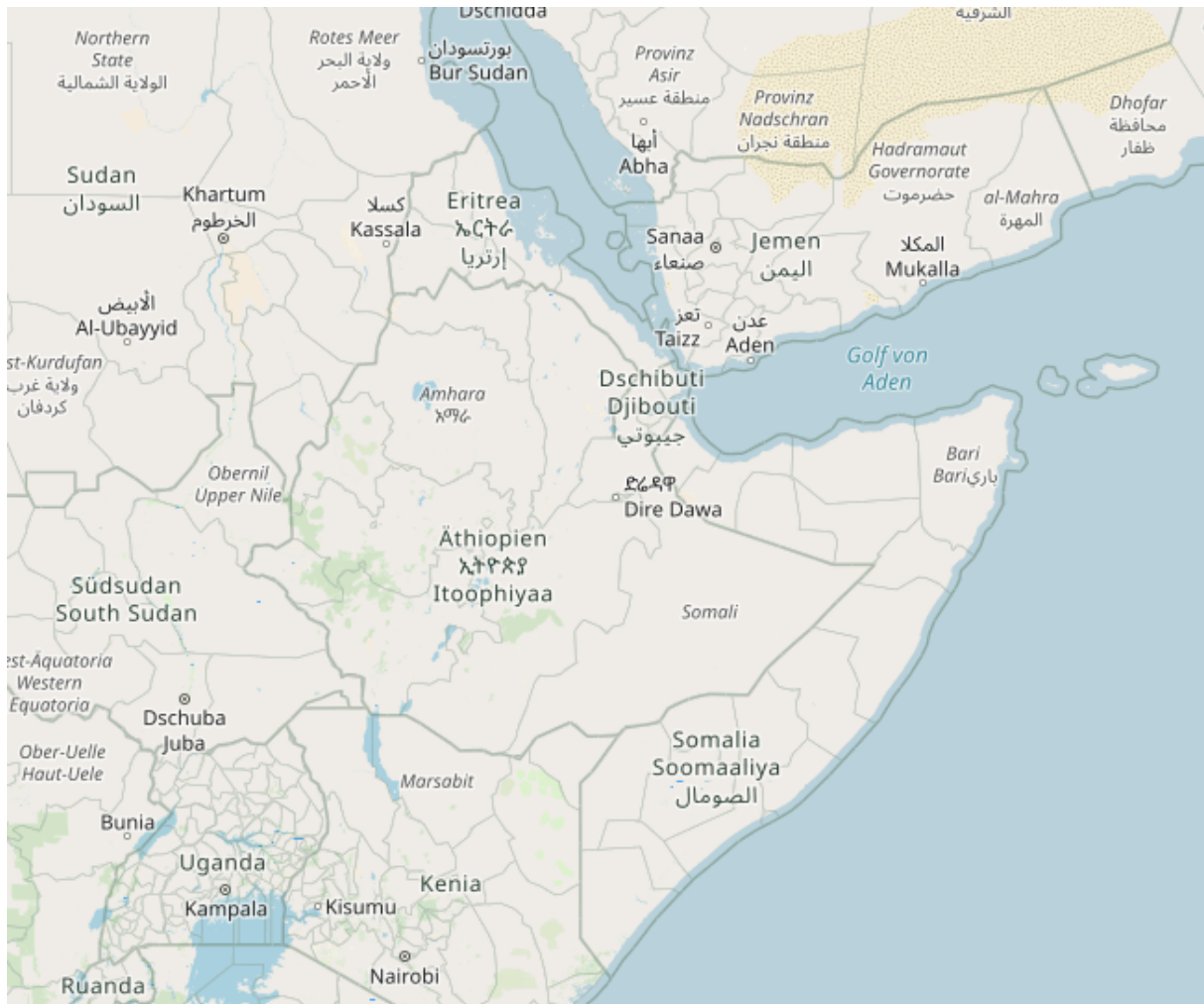


Abbildung 5: Lage von Äthiopien (Quelle: open street map)

Multiresistente Keime stellen insbesondere entwicklungsschwache Länder vor große Probleme. Faktoren, die dabei eine wichtige Rolle spielen, sind: Minderwertige Qualität der verwendeten Substanzen (Arzneimittelfälschungen, die unter Umständen *in vivo* nicht die notwendigen inhibitorischen Konzentrationen erreichen und so zu einer Selektion von Resistenzen führen können), wenig Regulierung staatlicherseits, falsche Verschreibungen, Verkauf ohne Rezept oder durch unqualifiziertes Personal auf Straßenmärkten, niedrige *Compliance* der Bevölkerung (hohe Rate an Selbstmedikation und Nichteinhalten von Therapieplänen). Ein

breiter Einsatz von Antibiotika in der Tierzucht übt großen Selektionsdruck auf resistente Umweltkeime aus [53]. Gashaw et al. untersuchten die vorliegende Stammkollektion aus Jimma auf ihre Resistenzen. Dabei stellten sich in der Gesamtkollektion 30,16% als multiresistent, 41,27% als erweitert-*(extended)* resistent und 19,00% als panresistent heraus. Vergleichswerte liegen kaum vor. Die Autoren weisen darauf hin, dass am JUMC kein Antibiotikaüberwachungsprogramm eingesetzt ist. Dies ist für große Teile dieser Region der Fall [54].

4. Fragestellung

Die Fragen über die Tetrazyklinresistenz sind ähnlich alt wie die Substanz Tetrazyklin selbst. Da es sich beim Tetrazyklin um einen natürlich vorkommenden Stoff handelt, haben sich im Laufe der Evolution bei einigen Organismen Resistenzmechanismen entwickelt. Dieser Vorgang der natürlichen Resistenzentwicklung ist bekannt und per se nicht weiter bedenklich. Durch unkritischen Einsatz sowohl in der Behandlung von Krankheiten bei Menschen, vor allem aber in der Tierzucht haben sich jedoch weitreichende Resistenzen entwickelt, die in westlichen Gesundheitssystemen einen klinischen Einsatz des Tetrazyklins heutzutage bis auf wenige Ausnahmen verhindern. In gering entwickelten Regionen stellt Tetrazyklin häufig noch eine günstige, jedoch unvorteilhafte Behandlungsalternative dar.

Bei Sichtung der Literatur fällt auf, dass Tetrazyklin innerhalb nur weniger Jahrzehnte von einem gut wirksamen Breitbandantibiotikum wegen hohen Resistenzraten zu einer kaum mehr medizinisch nutzbaren Substanz wurde. In rascher Folge wurden verschiedene Resistenzmechanismen und eine Vielzahl Resistenz-vermittelnder tet-Gene und andere Multiresistenz-Gene entdeckt, die in nahezu allen relevanten Spezies weit verbreitet sind.

Diese Studie untersucht verschiedene Aspekte an einer exemplarisch ausgewählten Gruppe Gram-negativer, multiresistenter Keime aus Äthiopien in Ost-Afrika (im Folgenden als „Stammkollektion“ bezeichnet):

4.1. Verteilung der phänotypischen Tetrazyklinresistenz innerhalb der Stammkollektion

Durch Antibiotika-Sensitivitätstestung (AST) sollte untersucht werden, welche phänotypischen Resistenzmuster die Keime der Stammkollektion aufweisen. Dadurch kann abgeschätzt werden, ob sich die phänotypische Resistenz in Äthiopien von der in anderen Regionen der Welt

unterscheidet und wie weit Resistenzen dort verbreitet sind. Dabei wurde insbesondere die phänotypische Resistenz gegen Tetrazyklin untersucht.

4.2. Verteilung der genotypischen Tetrazyklinresistenz innerhalb der Stammkollektion

Die Stammkollektion wurde mittels PCR auf das Vorhandensein typischer tet-Gene untersucht, welche häufig eine Tetrazyklinresistenz verursachen. Es wurde untersucht, ob die Keime der Stammkollektion die gleiche Verteilung der Resistenzgene aufweisen, welche in anderen Studien beschrieben worden ist.

4.3. Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp

Durch Vergleich der Ergebnisse der phänotypischen Resistenzmessung und den Ergebnissen der genetischen Untersuchungen sollte ermittelt werden, inwieweit das Vorhandensein der untersuchten Gene mit der Ausprägung der Resistenz korreliert.

4.4. Ist PCR Testung dazu geeignet, Resistenzmechanismen aufzudecken?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein PCR-Assay entwickelt, mit dem Bakterien auf das Vorhandensein von Tetrazyklinresistenz-vermittelnden tet-Genen untersucht wurden. Es soll geprüft werden, ob sich dieser Ansatz bewährt und ob sich damit eine Resistenz gegen Tetrazyklin voraussagen lässt.

B Material

1. Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Waagen	440-33N	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
	Präzisionswaage PCB	
	BP61	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bunsenbrenner	Fireboy plus	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischinkubator	Thermomixer compact	
	Thermomixer comfort	
Kühl- und Gefrierschränke	-80°C: Hera freeze	
Brutschränke	Function line 37°C	Heraeus, Kendro, Langensfeld, Deutschland
Schüttler Flüssigkulturen	Certomat HK	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	Certomat U	
Thermocycler	5 Geräte: GeneAmp PCR system 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Elektrophoresekammer	Spannungsquelle PowerPac 200	Biorad, Hercules, USA
	40-1214	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	UV-Tisch	
	Software: Intas science imaging	Intas, Göttingen, Deutschland
	Objektiv H6x8 8-48mm 1:1,0 ½“	
Sterilwerkbänke	Herasafe	Heraeus, Thermo electron corporation
	BDK	Weiss Pharmatechnik, Sonnenbühl, Deutschland
Elektroporationsgerät	GenePulser II	Biorad, Hercules, USA
Heizblock	Unitek Hb-130	
Vakuumrotationsgerät	DNA Speedvac DNA 110	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Zentrifugen	1k15	

Gerät	Modell	Firma
	1k30	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland
	Sorvall Super T21	Sorvall, Thermoscientific
Vortex	Genie2	Scientific industries, New York, USA
Magnetrührer	IKA RCT basic	
Spektralphotometer	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
	Drucker DPU-414	Seiko Instruments, Neu- Isenburg, Deutschland
Eismaschine	Scotsman AF 80	Scotsman, Frimont, Italien
MALDI-TOF	Bruker Microflex LT, Software: Bruker Biotyper 3.1	Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
Adagio automated System	Adagio System 93400	BioRad, Hercules, California, USA
VITEK2	VITRK2 Compact	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland
Nandodrop	Spectrophotometer 2000	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA

2. Materialien

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, Enzyme

TAQ DNA Core Kit (Cat# EPTQK109; LOT# 1645M0103)	Taq DNA Pol 5 U/ μ l dNTPs mix at 10 mM each 25 mM MgCl ₂ solution PCR buffers	MPBio, Eschwege, Germany
Lysozym		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2. Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen

Agarose		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
10x TAE Puffer	0,4 M Tris-HCl 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 7,6 einstellen	
Ethidiumbromid	Stock: 25 mM (10mg/ml in Abidest)	Sigma Aldrich, Munich, Germany
DNA Gel Loading Dye 6x		Thermo scientific

2.3. Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits

Isolierung chromosomaler DNA	High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Basel, Schweiz
Isolierung Plasmid DNA	QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
DNA-Aufreinigung aus Agarosegel	QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Transformation	TA Cloning™ Kit, with pCR™ 2.1 Vector	Invitrogen by life technologies, Carlsbad, USA; jetzt ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
	TOPO® XL PCR Cloning Kit	

2.4. Synthetische Oligonukleotide und Primer

Tabelle 8: Verwendete synthetische Oligonukleotide und Primer

Name der Primer	5'-...-3'-Sequenz	C°	Fragmentlänge (bp)
tet.A.for	5'-GCCTCCTGCGCGATCTGG-3'	51	848
tet.A.rev	5'-CGAABCAAGCAGGACCATG-3'		
tet.B.for	5'-CAGTGCTGTTGTTGTCATTAA-3'	52	571
tet.B.rev	5'-GCTTGGAATACTGAGTGTA-3'		
tet.C.for	5'-CTTGAGAGCCTTCAACCCAG-3'	55	417
tet.C.rev	5'-TGGTCGTCATCTACCTGCC-3'		
tet.D.for	5'-GGATATCTCACCGCATCTGC-3'	57	436
tet.D.rev	5'-CATCCATCCGGAAGTGATAGC-3'		
tet.E.for	5'-TCCATACGCGAGATGATCTCC-3'	59	442
tet.E.rev	5'-CGATTACAGCTGTCAGGTGGG-3'		
tet.G.for	5'-GCTCGGTGGTATCTCTGCTC-3'	55	468
tet.G.rev	5'-AGCAACAGAATCGGGAACAC-3'		
tet.H.for	5'-ATACTGCTGATCACCG-3'	45	1076
tet.H.rev	5'-TCCCAATAAGCGACGC-3'		
tet.J.for	5'-CGAAAACAGACTCGCCAATC-3'	61	182
tet.J.rev	5'-TCCATAATGAGGTGGGGC-3'		
tet.L.for	5'-TCGTTAGCGTGCTGTCATT-3'	55	267
tet.L.rev	5'-GTATCCCACCAATGTAGCC-3'		
tet.MOS.for	5'-GTTTATCACGGAAGYGCWA-3'	47	686
tet.MOS.rev	5'-GAAGCCCAGAAAGGATTYGGT-3'		
tet.T.for	5'-GCGTTAAGGGATCAAATCTTCC-3'	59	2408
tet.T.rev	5'-CAGGTATGCTCCCTCATCAAC-3'		
tet.W.for	5'-CAGAGCGTGGTTCAGTCTGT-3'	60	728
tet.W.rev	5'-TCCACTTCGCAACGCAAAAG-3'		
tet.X.for	5'-CAATAATTGGTGGTGGACCC-3'	55	468
tet.X.rev	5'-TTCTTACCTTGGACATCCCG-3'		
tet.Y.for	5'-CACTTATAACCGCACTGATTG-3'	53	1161
tet.Y.rev	5'-ATCGCAATAAACTGGCTGACTG-3'		
tet.34.for	5'-GAGTGGCACCTGATGGCTTA-3'	60	240
tet.34.rev	5'-TACCGGGTGCTATTCTTGCG-3'		
tet.35.for	5'-AGGCAACATCAACCCACACT-3'	60	310
tet.35.rev	5'-ACATGACACAAACGCCACTG-3'		
tet.39.for	5'-CTCCTTCTCTATTGTGGCTA-3'	49	711
tet.39.rev	5'-CACTAATACCTCTGGACATCA-3'		
tet.41.for	5'-TGATCGTCGTCCACCTTGTG-3'	60	352
tet.41.rev	5'-TGGCCGGCATTTATCTGGTT-3'		
tet.42.for	5'-GACTTCACCCACCTCTCTCAC-3'	60	191

Name der Primer	5'-...-3'-Sequenz	C°	Fragmentlänge (bp)
tet.42.rev	5'-AGAGGCCGTTGATCGCTTC-3'		

2.5. Primer für Universal-PCR und sonstige Primer

Tabelle 9: Primer für Universal-PCR und sonstige Primer

Name der Primer	5'-...-3'-Sequenz	Quelle
Uni-800r	5'-GAGTACCAGGGTATCTAATCC-3'	SOP eigenes Labor (GH-MOL-UNI_PCR-SOP-005)
Uni-FD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
M13 rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	TOPO TA Cloning Kit

2.6. Primer zur Herstellung der Hybridgene

Tabelle 10: Primer zur Herstellung der Hybridgene

Name der Primer	5'-...-3'-Sequenz
tet.E.for.synt	5'-AACCACATCCTCCATACGCGAGATGATCTCCCCATTATC GGTGGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.E.rev.synt	5'-GATAGTCATGCCCCGTGCACCAGTTTGACCCACCTGACA GCTGTAATCGGTCCACTTGT-3'
tet.G.for.synt	5'-TTGGTGGCATGCTCGGTGGTATCTCTGCTCATGCCCCGT TTGGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.G.rev.synt	5'-AGGAGCTGACTGGGTTGAAGGGGATGGATGGTGTTC GATTCTGTTGCTGCTTGCCGCC-3'
tet.L.for.synt	5'-TCTTTTCTTATCGTTAGCGTGCTGTCATTCCTGATATTT GGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.L.rev.synt	5'-GAAGGCTTGAGCGAGGGCCATTATTTTCGGCTACATTGG TGGGATACTTGTTGATAG-3'
tet.MOS.for.synt	5'-CCTGTTCCCTGTTTATCACGGAAGTGCAAAAAACAATAT TGGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.MOS.rev.synt	5'-CGATCTTCCCCATCGGTTTCGAAGTGCCGCCAAATCCTTT CTGGGCTTCCATTGGTTTA-3'
tet.T.for.synt	5'-CAAGTTAAATGCGTTAAGGGATCAAATCTTCCTTGACAA ATATGGTCGTCATCTACCTGCC-3'

Name der Primer	5'-...-3' -Sequenz
tet.T.rev.synt	5'-CGCTTTCTGGGTCGTCATATTTTAAAATAGTTGATGAGG GAGCATACTGTATCAATTAG-3'
tet.34.for.synt	5'-TCATCAAGAAGAGTGGCACCTGATGGCTTAGCGCAAAC AGTGGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.34.rev.synt	5'-CTGCTTCTCGCCGAAACGTCAAGTTCACGCGCAAGAAT AGCACCCGGTACTAGACCGCC-3'
tet.35.for.synt	5'-CAATGGCGCAAGGCAACATCAACCCACACTGGCTACCA GTTGGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.35.rev.synt	5'-ATGCCGCAAGCGACAGGCTATGCATTATCAGTGGCGTTT GTGTCATGTATTGGCTTTA-3'
tet.39.for.synt	5'-ATGGCTGCTGCTCCTTCTCTATTGTGGCTATATATTGGTC TGGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.39.rev.synt	5'-GGCGATATAAGCGCCAGCTTGCAAGCAATGATGTCCAG AGGTATTAGTGATGAAAGACA-3'
tet.41.for.synt	5'-CTCGCCCTGATGATCGTCGTCCACCTTGTGCGCCATCAG CTGGTCGTCATCTACCTGCC-3'
tet.41.rev.synt	5'-GCGATATAAGCGCCAGCACCAGCGCCATAACCAGATAA ATGCCGGCCAGCGGCAGCAG-3'
tet.42.for.synt	5'-ATGACTTCACCCACCTCTCTCACGCGACGGGACTGGTCG TCATCTACCTGCC-3'
tet.42.rev.synt	5'-CAGCAAGACGTAGCCCAGCGGCGTGCTCGAAGCGATCA ACGGCCTCTGCGCCTTCCT-3'

2.7. Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 11: Bakterienstämme

Stämme/Plasmide	Eigenschaften	Herkunft
TOP10	für Klonierungen	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 12: Plasmide

Plasmid	Klon	laufende Stammnummer, alle ff. aus dieser Arbeit	Herstellungsdatum
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(A)	TetA(1)	8193	4.3.16
	TetA(2)	8194	4.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(B)	TetB(1)	8195	6.7.16
	TetB(2)	8196	6.7.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(C)	TetC(1)	8197	11.3.16
	TetC(2)	8198	11.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(D)	TetD(1)	8199	11.3.16
	TetD(2)	8200	11.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(E)	TetE(1)	8201	20.7.16
	TetE(2)	8202	20.7.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(G)	TetG(1)	8203	11.3.16
	TetG(2)	8204	11.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(H)	TetH(1)	8205	11.3.16
	TetH(2)	8206	11.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(J)	TetJ(1)	8207	11.3.16
	TetJ(2)	8208	11.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(MOS)	TetMOS(1)	8211	8.3.16
	TetMOS(2)	8212	8.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(W)	TetW(1)	8215	11.3.16
	TetW(2)	8216	11.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(X)	TetX(1)	8217	6.7.16
	TetX(2)	8218	6.7.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(Y)	TetY(1)	8219	11.3.16
	TetY(2)	8220	11.3.16
Plasmid PCR4- TOPO_Tet(35)	Tet35(1)	8223	4.3.16

Plasmid	Klon	laufende Stammnummer, alle ff. aus dieser Arbeit	Herstellungsdatum
	Tet35(2)	8224	4.3.16
Plasmid PCR4-TOPO_Tet(39)	Tet39(1)	8225	4.3.16
	Tet39(2)	8226	4.3.16
Plasmid PCR4-TOPO_Tet(41)	Tet41(1)	8227	8.3.16
	Tet41(2)	8228	8.3.16
Plasmid PCR4-TOPO_Tet(42)	Tet42(1)	8229	4.3.16
	Tet42(2)	8230	4.3.16
Plasmid PCR_TOPO_XL_Tet(L)	TetL(1)	8209	8.3.16
	TetL(2)	8210	8.3.16
Plasmid PCR_TOPO_XL_Tet(34)	Tet34(1)	8221	8.3.16
	Tet34(2)	8222	8.3.16

2.8. Nährmedien und Zusatzlösungen

Tabelle 13: Verwendete Nährmedien und Zusatzlösungen

LB-Medium	5 g (85 mM) NaCl 5 g Bacto Hefeextrakt (Difco, Kansas City, MO, USA) 10 g Bacto Trypton (Difco) in 1000 ml Abidest pH 7,4-7,6 mit NaOH einstellen
Einfriermedium für Bakterien	für -80°C: 25% Glycerin (v/v, E. Merck) in LB-Medium für -20°C: 10% Glycerin (v/v, E. Merck) in LB-Medium
Blutplatten	(PAN-Biotech)
SOC-Medium	2% Trypton (10 g) 0,5% Hefeextrakt (2,5 g) 10mM NaCl (0,29 g) jetzt pH 7,5 einstellen und autoklavieren 10 mM MgCl ₂ (5 ml 1 M Stock) 10 mM MgSO ₄ (5 ml 1 M Stock) 20 mM Glukose (0,5 ml von 2 M Stock -20°C) auf 500 ml mit Abidest auffüllen, pH 7,5 Aufbewahrung in Aliquots bei -20°C

2.9. Antibiotika

Tabelle 14: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	Amp	Adest	100	100
Kanamycin	Km	Adest	50	50
Tetrazyklin	Tet	Adest	12	12

C Methoden

1. Rechtlich-ethische Grundlagen

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienkulturen handelt es sich um eine im Rahmen einer früheren Studie erhobene Stammsammlung. Die Isolate liegen *in vitro* angezüchtet und anonymisiert vor und können mit keinem Patientenmaterial mehr in Verbindung gebracht werden. Für die genetische und phänotypische Untersuchung dieser Stammkollektion ist kein gesondertes Ethikvotum erforderlich.

Die Probenentnahme wurde im Rahmen des Promotionsprojektes von Ahmed Zeynudin Kasim PhD im Zeitraum März bis Oktober 2014 am JUSH (Jimma University Specialized Hospital) durchgeführt (Titel: „Genotypic and Phenotypic Resistance Traits of Gram-Negative Bacteria isolated from clinical and environmental sample, Jimma University Hospital, Jimma Zone, Ethiopia“, Promotionsarbeit von Ahmed Zeynudin Kasim, 2017). Die Studie einschließlich der Probenentnahme und der zukünftigen genetischen und phänotypischen Untersuchung der Isolate wurde zuvor durch die Ethikkommission der Universität Jimma, Äthiopien freigegeben, ist aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2. DNA Methoden

2.1. Extraktion bakterieller chromosomaler DNA

Zur weiteren Analyse des bakteriellen Erbgutes wurde die bakterielle chromosomale DNA mit Hilfe des „High Pure PCR Template Preparation Kit“ von Roche gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert. Das Kit dient unter anderem der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Zellkulturen, aber auch aus Vollblut und Gewebeproben. 200 µl (enthalten ca. 10^9 Zellen) einer Übernachtskultur wurden zentrifugiert (1000 g, 3-5 min.), der Überstand dekantiert und das Pellet in 200 µl PBS Puffer rückgelöst. Zu der Lösung wurden 5 µl Lysozym hinzugegeben und bei 37°C für 15 min. inkubiert. Das Lysozym spaltet die Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand und führt so zur Lyse der Zellen. Anschließend wurden 200 µl „*binding buffer*“ und 40 µl rekonstituierte Proteinase K zugegeben, sofort gründlich gevortext und bei 70°C für 10 min. inkubiert. Die Proteinase lysiert bakterielle Proteine und setzt Nukleinsäuren frei. Nach kurzer Abkühlung (unter den Siedepunkt von Isopropanol von 82,5°C) wurden 100 µl

Isopropanol hinzugegeben und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gründlich durchmischt, wodurch es zum Ausfallen der bakteriellen DNA kam. Die Mischung wurde in ein Zentrifugationsfiltrerröhrchen überführt und zentrifugiert (8000 g, 1 min.). Das Filtrerröhrchen enthält ein dichtes Glasfasernetz, an welches die zellulären Nukleinsäuren binden. Es wurden 500 µl „*inhibitor removal buffer*“ (welcher die gebundenen Nukleinsäuren von potentiell PCR störenden Kontaminationen befreien soll) hinzugegeben und zentrifugiert (8000 g, 1 min.). Anschließend wurde das Produkt zweimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen (je 8000 g, 1 min.), um die im Filter gebundenen Nukleinsäuren von überschüssigem Salz, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen zu befreien; kurz geschleudert (max. Drehzahl, 13000 g, 10 sec.), um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen und schließlich mit 200 µl auf Raumtemperatur vorgewärmtem Elutionspuffer gelöst und in ein frisches 1,5 ml Röhrchen zentrifugiert (8000 g, 1 min.). Die so gewonnene DNA wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert und in der PCR weiterverwendet (siehe Abschnitt zur PCR), für längerfristige Lagerung bei -20°C.

2.2. Extraktion bakterieller Plasmid-DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fremde Gen-Sequenzen in Form von Plasmiden in *E. coli* Bakterien transferiert (siehe Abschnitt Klonierung). Um die so klonierten Plasmide durch PCR weiter analysieren zu können (Screening der Klone), mussten diese zunächst aus den Bakterien extrahiert werden. Dazu wurde das "QIAprep® Spin Miniprep Kit" der Firma Qiagen© anleitungsgemäß verwendet. Das Prinzip beruht auf der selektiven alkalischen Denaturierung und anschließender Abspaltung chromosomaler DNA hoher molekularer Masse, während kovalent geschlossene ringförmige DNA (cccDNA, *covalently closed circular DNA*) doppelsträngig bleibt und somit isoliert werden kann [55]. Dazu wurden 1-5 ml einer Übernacht-Kultur pelletiert (9000 g, 3 min.) und das Pellet anschließend in 250 µl Puffer „P1“ resuspendiert. Dieser Puffer enthält EDTA und RNase, welche zur Destabilisierung der Zellmembranen und Verdauung freiwerdender bakterieller DNA führt. Durch Zugabe und kräftiges Mischen von 250 µl eines alkalischen (pH 12,0-12,5) NaOH- und SDS- (Natriumdodecylsulfat)- enthaltenden Lysepuffers „P2“ werden die Bakterien vollständig lysiert, chromosomale DNA denaturiert, bakterielle RNA degradiert und Protein-SDS-Komplexe gebildet. Dadurch werden kontaminierende Makromoleküle ausgefällt und können abzentrifugiert werden [55]. Die ringförmige Plasmid-DNA bleibt erhalten. Nach 4-5 min.

wurden 350 µl eines neutralisierenden (sauren) Puffers „N3“ zugegeben und kräftig durchmischt, durch welchen chromosomale DNA zu einem unlöslichen Klümpchen denaturiert wird, welches anschließend mit den SDS-Protein-Komplexen abzentrifugiert werden kann (13000 g, 10 min.). Der Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in beiliegende Säulen pipettiert und zentrifugiert und anschließend mit 750 µl Puffer „PE“ gewaschen (13000 g, 1 min.). Nach dem Ausschleudern von restlichem Waschpuffer wurde die Plasmid-DNA mit 30-50 µl Elutionspuffer „EB“ eluiert. Die gewünschte DNA-Endkonzentration kann mittels Zugabe von Wasser oder Eintrocknung in der Vakuumentrifuge (SpeedVac) eingestellt werden.

2.3. Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde spektrophotometrisch mit dem „NanoDrop 2000“ (Thermo Scientific) bestimmt, wobei die Absorption von Licht durch Nukleinsäuren bei 260 nm Wellenlänge gemessen wird. Dafür wurde je 1 Tropfen der Lösung auf den Sensor aufgebracht. Als Vergleichsmedium diente Wasser. Die Software bestimmt die Konzentration der DNA-Lösung mittels der Formel

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = OD_{260} \cdot V \cdot F$$

[56], wobei c = Konzentration der DNA-Lösung, OD_{260} = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm, V = Verdünnungsfaktor, F = Multiplikationsfaktor (=50 für doppelsträngige DNA). Jede Messung wurde dreifach wiederholt.

2.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Standardverfahren, um DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe (Länge in Basenpaaren, bp) voneinander zu trennen und zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden 1%-Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der 1%igen Gele wurde 1,2 g Agarosepulver in 120 ml TAE- (Tris-Acetat-EDTA-) Puffer gegeben und in der Mikrowelle für 8-10 min. erhitzt und durch kurzes Aufkochen gelöst. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid (exakte Konzentration nicht entscheidend; ca. 0,1 µg/ml) wurde die geschmolzene Agarose zum Aushärten in einen abgedichteten Schlitten gegossen und je nach Verwendungszweck 8-

24 Kammern mittels eines Kammes offengehalten. Die Gele wurden in TAE Lösung bis zur Verwendung für einige Stunden bis Tage zwischengelagert. Für die Elektrophorese wurden sie in eine Elektrophoresekammer gelegt und TAE-Puffer zugegeben, bis die Gele knapp bedeckt waren. Je nach weiterem Verwendungszweck der Elektrophorese und Taschengröße der Gele wurden zwischen 5 µl (Plasmide) und bis zu 50 µl (PCR-Produkt) der zu analysierenden DNA jeweils mit einer geringen Menge eines Ladepuffers gemischt und in die Geltaschen von links nach rechts mit einer Pipette aufgetragen. Der Ladepuffer enthält u.a. Glycerin, welches die Dichte der Probe erhöht und sie in die Geltasche herabsinken lässt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend für 40 min. im elektrischen Feld (600 V/m) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Als Vergleichsmaßstab zur Größenbestimmung wurde in die jeweils erste Tasche eines Gels 5-10 µl eines 100 bp- bzw. 1000 bp-DNA-Größenstandards aufgetragen.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele in einer Dunkelkammer mit UV-Licht beleuchtet. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die beiden Stränge der DNA und bindet somit an sie. Durch die Beleuchtung mit UV-Licht wird das Ethidiumbromid zur Emission von Licht (rot-orange Fluoreszenz; 590 nm) angeregt und die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Gele mit enthaltenen Banden wurden photographisch dokumentiert. Falls ein spezifisches PCR-Produkt weiterverwendet werden sollte, wurde die entsprechende Bande unter Sichtkontrolle auf einem UV-Leuchttisch möglichst genau mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Beim Ausschneiden ist darauf zu achten, die UV-Beleuchtungszeit möglichst kurz zu halten, um ungewollte Mutationen zu vermeiden.

2.5. Aufreinigung von PCR-Produkt aus dem Agarosegel

Zur Aufreinigung und Weiterverwendung, z.B. zum Klonieren von PCR-Produkten wurde das QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Bande wurde unter UV-Sichtkontrolle aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen, und das dreifache Volumen (3 Vol.) Puffer „QG“ hinzugegeben (3µl/1mg). Durch Erhitzung auf 50°C und gelegentlichem Schütteln löste sich das Gelstück innerhalb von 10 min. auf. Nach Abkühlung wurde 1 Vol. Isopropanol hinzugegeben und gründlich gemischt. Die Aufreinigung fand in einer Säule mit Silica-Membran (Siliciumdioxid) statt, welche die DNA auffängt. Anschließend wurden Reste der Agarose mit 500 µl Puffer „QG“ entfernt und das Produkt mit 750 µl Puffer „PE“ gewaschen. Überschüssiger Waschpuffer wurde abzentrifugiert, bevor das

Produkt mit 25-50 µl Elutionspuffer eluiert wurde (alle Schritte 13000 g, 1 min.). Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde bis zur Weiterverwendung gekühlt bei max. 4°C aufbewahrt.

2.6. DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter und unbekannter PCR-Produkte wurde durch die Firma Eurofins genomics (München) durchgeführt. Dazu wurden je 20 µl des PCR-Produktes und 10 µl Primer (10 pmol/µl) eingeschickt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm SeqMan (DNASTAR Lasergene package, Madison, USA) ausgewertet und in Online-Datenbanken (z.B. NCBI Blast) mit bekannten Sequenzen verglichen.

2.7. Transformation/Klonierung

Unter Transformation versteht man das Einbringen fremden Erbgutes in ein Bakterium. Dies kann mittels eines Vektors, in dieser Arbeit Plasmide, erfolgen. Dazu wurde das gewünschte Gen in Form eines PCR-Produktes (funktionstüchtig bzw. funktionsuntüchtig) in einen Vektor ligiert und anschließend durch Elektroporation oder chemisch durch einen Hitzeschock in das kompetente aufnehmende Bakterium transferiert. Die Klonierungen in dieser Arbeit wurden mit dem TOPO® TA Cloning Kit und dem TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Life Technologies/Thermo Scientific) weitgehend nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese Kits sind für die Klonierung von amplifizierten PCR-Produkten vorgesehen. Die Kits enthalten aktivierte Vektoren, in die das PCR-Produkt mittels Topoisomerase I eingebaut wird.

2.7.1. Ligationsansatz

Als Vorbereitung für den Ligationsansatz wurden 200 µl PCR-Produkt produziert, aus dem Agarosegel gereinigt und in 30-50 µl Elutionspuffer eluiert (näheres siehe jeweilige Kapitel). Bei der Mischung des Ligationsansatzes ist streng darauf zu achten, dass alle Schritte auf Eis ausgeführt werden. Für die Ligation wurden anschließend 2-3 µl (je nach DNA-Konzentration) mit 1 µl mitgelieferter Salzlösung und 5 µl Wasser gemischt, danach 1 µl des vorgefertigten Vektors zugegeben. Dieser Ligationsansatz wurde dann 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis bis zur Verwendung gekühlt. Wenn die Ligation mittels Hitzeschock in die Zellen transformiert werden sollte, wurde die Salzlösung des Herstellers verwendet. Falls der

Ansatz elektrotransformiert werden sollte, wurde die Salzlösung verdünnt bzw. der Ligationsansatz vor Verwendung 40 min. auf Aqua bidest dialysiert, um einen elektrischen Durchschlag bei der Elektrotransformation aufgrund zu hoher Salzkonzentration zu verhindern. Außer der Schnittstelle für das einzubringende PCR-Produkt enthält der vorgefertigte Vektor außerdem ein/zwei Gen(e), die eine Antibiotikaresistenz vermitteln (i.e. Kanamycin und Ampicillin bei TOPO TA Kit bzw. Ampicillin bei TOPO XL Kit). Dies kann nach erfolgter Klonierung dazu genutzt werden, nur erfolgreich transformierte Bakterien anzuzüchten. Außerdem wird bei stattgefunder Autoligation durch Aktivierung des *ccdB* Genes der Fehltransformant getötet.

2.7.2. Elektrotransformation

Die im Ligationsansatz (s.o.) hergestellten Plasmide mit der zu klonierenden DNA wurden durch Elektrotransformation in die elektrokompenten Zellen (Herstellung siehe Kapitel Herstellung elektrokompenter Zellen) eingebracht [57]. Dabei werden durch kurze elektrische Impulse Poren in der bakteriellen Zellmembran ausgenutzt, durch welche die Plasmide entlang des Spannungsfeldes in die Zellen gelangen können. Elektrokompente Zellen wurden kurz vor der Reaktion aus -80°C geholt und auf Eis für 10 min. aufgetaut. Dann wurden 2 μl des Ligationsansatzes in die Zellen gegeben, kurz gemischt und das Ganze in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser II (Fa. BIORAD). Der Schock erfolgt bei 1800 V für bis zu 5 ms. Unmittelbar nach dem Schock wurden die Zellen in 250 μl vorgewärmtes SOC-Medium überführt und bei 37°C für 1 h bei leichtem Schütteln (350 rpm) inkubiert und anschließend pelletiert (8000 g, 7-10 min.). 100 μl des Überstandes und das gesamte Pellet wurden jeweils auf vorgewärmten LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

2.7.3. Chemische Transformation (Hitzeschock)

Die mitgelieferten chemisch kompetenten Zellen wurden kurz vor der Transformation aus -80°C geholt und für 10 min. auf Eis aufgetaut. 2 μl des Ligationsansatzes wurden zugegeben, vorsichtig gemischt und das Ganze für 15 min. (Angabe des Herstellers 5-30 min.) auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock, indem die Röhren für 30 sec. in einen auf 42°C vorgewärmten Heizblock gestellt wurden und danach sofort wieder im Eisbad gekühlt wurden.

Die transformierten Zellen wurden wiederum in 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium überführt und bei 37°C für 1h bei leichtem Schütteln (350 rpm) inkubiert und anschließend pelletiert (8000 g, 7-10 min.). 100 µl des Überstandes und das gesamte Pellet wurden jeweils auf vorgewärmten LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Diesen Nährmedien wurden Antibiotika zugesetzt (Ampicillin bzw. Kanamycin), welche nur das Wachstum erfolgreich transformierter Organismen erlauben (die Konzentrationen sind unter B 2.9. ersichtlich).

2.8. Gen-Synthese (Hybridgene)

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der eingesetzten PCR-Primer mussten diese anhand von Positivkontrollen, also Organismen, welche das gesuchte Gen in sich tragen, getestet werden. Für einige der untersuchten Gene standen dafür Bakterienproben mit den entsprechenden Genen aus Fremdlaboren zur Verfügung, für die Gene tet (L, M, O, S, T, 35, 39, 41, 42) waren diese jedoch nicht erhältlich. Deshalb wurden Hybrid-Gene entworfen, die der Größe der gesuchten Gensequenz entsprechen und an den beiden Enden Nukleotidsequenzen aufweisen, welche die Bindestellen der verwendeten Primer beinhalten. Diese Gene wurden anschließend in *E. coli* Bakterien transferiert, welche der Überprüfung der verwendeten Primer dienen. Bei den synthetisierten Genen handelt es sich um nonfunktionale Ausschnitte des Gesamtgens. Es handelt sich nicht um die vollständigen Gene, sondern um Nukleotidsequenzen, welche jeweils am Anfang und am Ende Sequenzen tragen, welche die Primer-Bindestelle beinhalten. Ziel dieser Synthese war es, ein artifizielles Gen als PCR Target zu erzeugen und in *E. coli* Zellen einzuschleusen und anschließend als Kontrolle zu verwenden. Die Schritte der Gensynthese werden im Folgenden am Beispiel von tet(L) kurz beschrieben. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 6. Als grundlegende Nukleotidsequenz wurde die Sequenz von tet(C) gewählt. Der in dieser Arbeit verwendete Rückwärtsprimer tet.C.rev liegt in Vorwärtsrichtung gleich gerichtet wie das tet(C) Gen und wurde als Startpunkt bestimmt. Ein weiterer Bestandteil ist der entsprechende Vorwärtsprimer (z.B. tet.L.for), welcher tet.C.rev vorgeschaltet wurde. Der Komplex aus (tet.L.for + tet.C.rev) bildet den neuen Vorwärtsprimer und wurde tet.L.for.synt genannt. Für den Rückwärtsprimer wurde anschließend von tet.L.for beginnend ein Fragment entsprechend der erwarteten Bandengröße auf tet(C) abgemessen und das letzte Stück durch tet.L.rev ersetzt. Somit besteht der neue Rückwärtsprimer tet.L.rev.synt aus (x bp + tet(C) + tet.L.rev). Das Gesamtprodukt besteht folglich aus tet.L.for.synt + einem abgezähltem Stück von tet(C) + tet.L.rev.synt. Die

synthetisierten Primer enthalten jeweils eine Bindungsstelle auf dem tet(C)-Gen sowie vor- bzw. nachgeschaltet eine Bindungsstelle für den ursprünglichen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer. Die nachstehende Grafik stellt ein solches Gen dar.

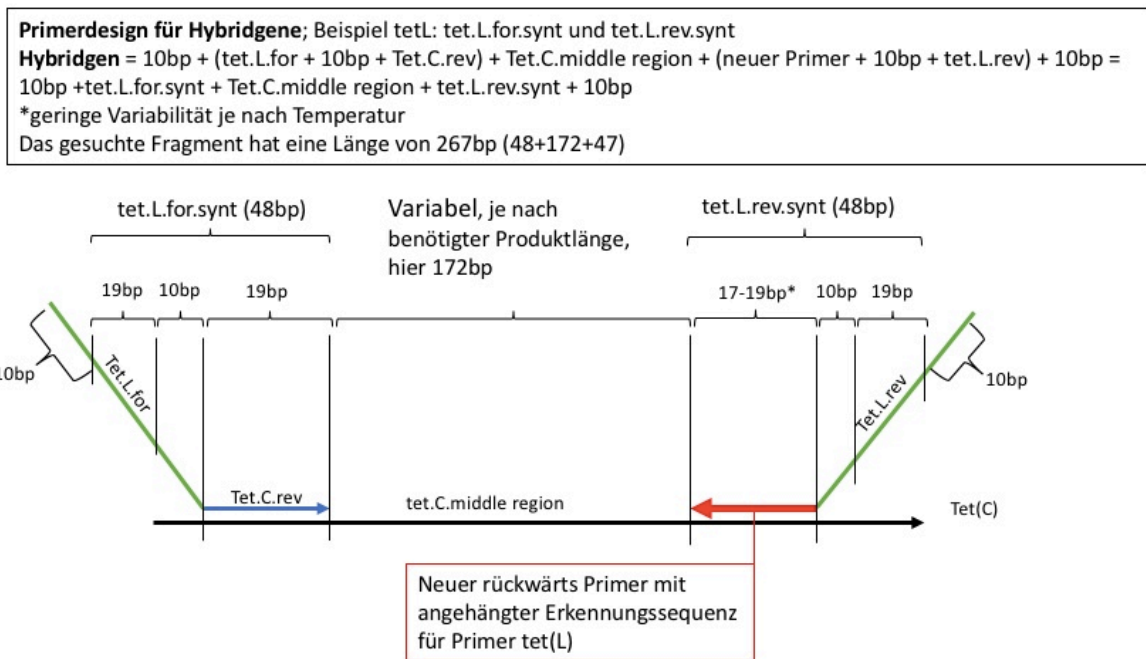


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Hybridgens

Die optimalen Temperaturen der Primer wurden bestimmt (siehe Kapitel Primerdesign) und die Primer demnach noch optimiert. Dann wurden sie der PCR zugeführt, das PCR Produkt aufgereinigt und in kompetente *E. coli* Bakterien kloniert.

2.9. Polymerase-Kettenreaktion

2.9.1. PCR allgemein

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) ist ein molekularbiologisches Standardverfahren zur gezielten spezifischen Vervielfältigung bestimmter Abschnitte einer DNA-Sequenz [58]. Mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase werden dabei gewünschte Abschnitte des Genoms um den Faktor 10^6 mit hoher Spezifität amplifiziert. Die Sensitivität dieser Methode ist beeindruckend: In einer Probe mit 10^5 Zellen kann bereits ein einzelnes DNA-Molekül des gesuchten Gen-Abschnittes durch die PCR nachgewiesen werden [59].

Für den Ablauf der PCR werden folgende Bestandteile in einem Reaktionsansatz zusammengefügt, welcher anschließend in einer PCR Maschine (engl.: *Thermocycler*) dem Reaktionszyklus zugeführt wird: die nachzuweisende Ziel-DNA als Vorlage für neu zu synthetisierende DNA, dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) als Bausteine der DNA Synthese, Primer (Oligonukleotidsequenzen) als Startpunkte der DNA Replikation und hitzestabile Taq-DNA-Polymerase. Wasser und Puffer mit einer bestimmten (Mg^{++})-Konzentration sorgen für möglichst optimale Reaktionsbedingungen auch bei stark wechselnden Temperaturen (die DNA Polymerase arbeitet am besten bei einem $pH > 8$) [56].

Die PCR besteht im Wesentlichen aus den drei Schritten Denaturierung, *Annealing* (Anlagerung des Primers an das Template) und Elongation und läuft nach folgendem Prinzip ab: Die DNA wird zunächst durch Erhitzung auf $95^{\circ}C$ in ihre beiden Einzelstränge denaturiert. Anschließend wird die Temperatur auf eine primerspezifische *Annealing*temperatur gesenkt, bei welcher sich die Primer an ihre komplementäre Gegenstruktur der DNA-Einzelstränge anlagern können. In der darauffolgenden Elongationsphase wird die Temperatur wiederum auf das Arbeitsoptimum der Taq-DNA-Polymerase von $72^{\circ}C$ erhöht, welche dadurch am Einzelstrang der eingesetzten Ziel-DNA anhand der dNTPs eine komplementäre DNA-Sequenz synthetisiert. Die Dauer der Elongation ist abhängig von der Länge des erwarteten PCR-Produktes, da die Taq-Polymerase ca. 1kb/min. synthetisiert. Die so kopierte DNA wird erneut bei $95^{\circ}C$ denaturiert, wobei sich ursprüngliche DNA und neu-synthetisierte DNA-Stränge trennen. Die Primer hybridisieren abermals mit den Einzelsträngen, welche in der folgenden Elongation ihrerseits als Vorlagen für die DNA-Synthese dienen. Durch mehrmalige (üblicherweise 30-35-fache) Wiederholung dieser drei Schritte wird die ursprüngliche Ziel-DNA exponentiell vervielfältigt. In einer letzten Elongationsphase von 7-10 Minuten werden unvollständige DNA-Fragmente vervollständigt, bevor das PCR-Produkt für die Lagerung und Weiterverwendung auf $4^{\circ}C$ gekühlt oder eingefroren wird.

Die PCR kam in dieser Arbeit zu verschiedenen Zwecken zur Anwendung:

- Mit **Screening-PCRs** wurde das Vorhandensein Tetrazyklinresistenz-vermittelnder Gene in den zu testenden Bakterienstämmen überprüft.
- Das **PCR-Produkt** wurde **kloniert**, und anschließend anhand eines Vektors in ein anderes Bakterium eingebracht (Transformation). Die erfolgreiche Klonierung wurde wiederum durch PCR bestätigt. Die erfolgreiche Transformation wurde durch Selektion mittels Antibiotika bestätigt.

- Zum Nachweis bakterieller DNA nach der DNA Extraktion wurde die **16S PCR** angewendet, bei welcher bakterielle DNA, die für rRNA des Bakteriums codiert amplifiziert wurde.

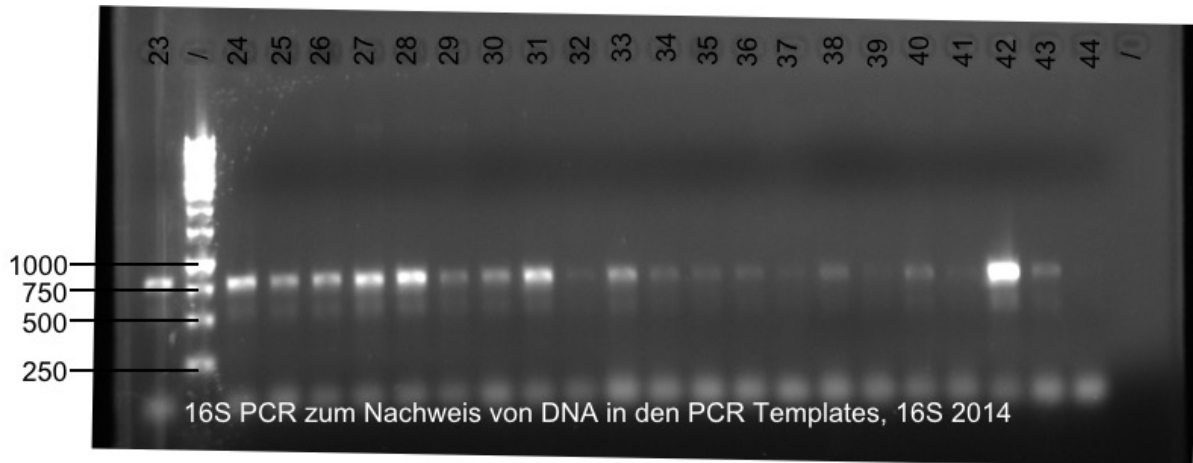


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der 16S PCR. Jede leuchtende Bande enthält demnach DNA.

- Außerdem wurde mittels PCR überprüft, in welcher Richtung die klonierten Produkte in den Plasmiden (**Richtungskontrolle**, schematische Darstellung in Abbildung 8) vorlagen, um die Plasmide entsprechend kartieren zu können.

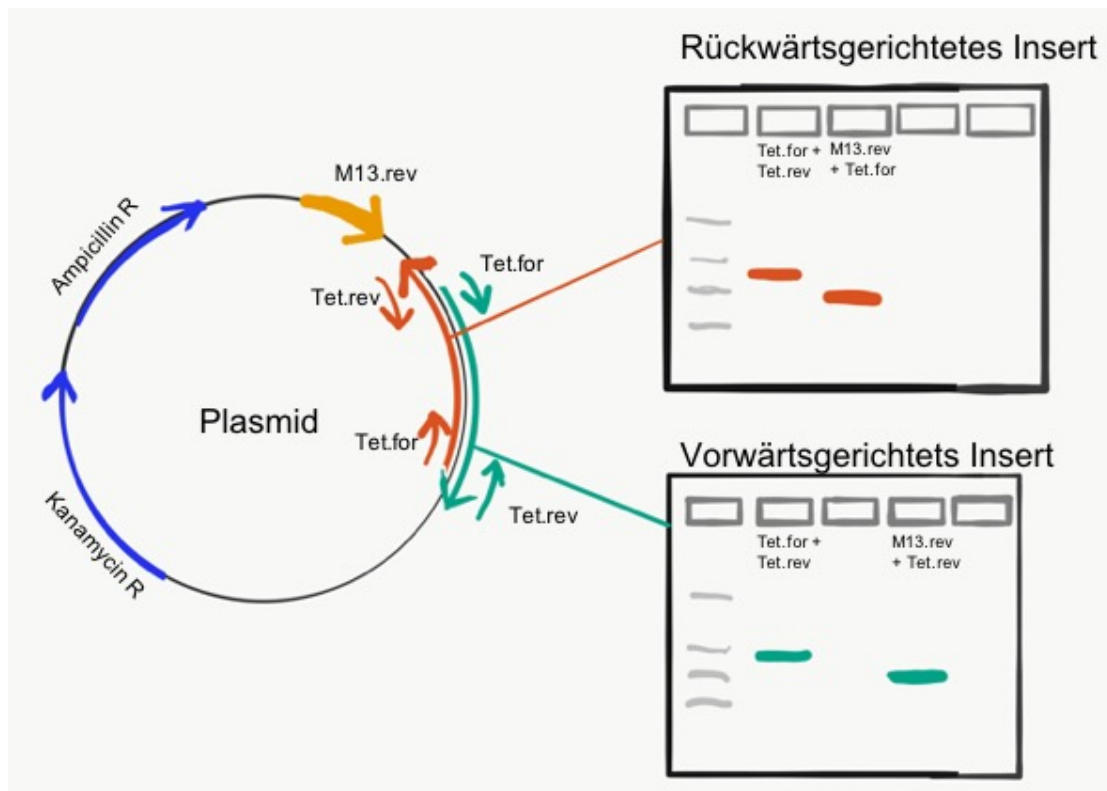


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Richtungskontrolle von Genen innerhalb eines Plasmides. Nach Klonierung kann das Gen in zwei Richtungen eingebaut sein. Ist das Gen in Vorwärtsrichtung eingebaut (grün), so entsteht eine entsprechende Bande bei M13.rev + Tet.rev, nicht aber bei M13.rev + Tet.for. Ist das Gen in Rückwärtsrichtung eingebaut entsteht eine Bande bei M13.rev + Tet.for, nicht aber bei M13.rev + Tet.rev. Somit kann die Richtung des Gens eindeutig bestimmt werden. Tet.for + Tet.rev dient der Positivkontrolle.

Als Template (Vorlage) für die PCR kann DNA in verschiedener Form eingebracht werden: Für die meisten PCR-Reaktionen wurde extrahierte bakterielle DNA (siehe Abschnitt DNA Extraktion) eingesetzt. Für manche Reaktionen wurden außerdem gekochte Zellen als Template verwendet: Dazu wurde eine Pipettenspitze einer Kolonie von der Agarplatte genommen und in 100 µl Aqua bidest gelöst, das Ganze in einem Heizblock bei ca. 100°C bzw. im Thermocycler bei 95°C für 10-15 min. gekocht und anschließend 1-4 µl (abhängig vom Zweck der PCR) als Template eingesetzt. Als weitere PCR-Vorlage wurde extrahierte Plasmid-DNA (siehe Abschnitt Plasmid-DNA Extraktion) genutzt.

2.9.2. Primerdesign

In dieser Arbeit wurden Bakterienstämme auf das Vorhandensein von Genen untersucht, die eine Resistenz gegen Antibiotika der Klasse der Tetrazykline vermitteln und deren Gensequenzen bereits dekodiert und veröffentlicht wurden. Manche Primer wurden aus bereits

veröffentlichten Quellen übernommen, andere wurden mit der Software SeqMan (DNASTAR Lasergene package, Madison, USA) und Onlinedatenbanken (*National Center For Biotechnology Information*, NCBI) selbst entworfen und von der Firma Metabion international AG (Planegg) hergestellt. Um die Primer für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR zu entwerfen, wurde wie folgt vorgegangen: Die Gensequenz wurde jeweils aus einer Veröffentlichung übernommen und abgespeichert. Auf ihrer Grundlage wurde mit dem Programm NCBI PrimerBlast nach Primern gesucht und aus den Ergebnissen ein Primerpaar bestehend aus einem vorwärts (*forward*) und einem rückwärts (*reverse*) gerichteten Primer gewählt. Von diesen Primern wurde näherungsweise die Schmelztemperatur mit der Formel $T_m = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$ berechnet und die Annealingtemperatur mit dem Programm SeqBuilder (DNASTAR, Lasergene) bestimmt. Falls die Temperaturen sehr unterschiedlich waren, wurden die Primer um wenige Basen verlängert oder verkürzt, um die Temperaturen anzugleichen. Schließlich wurden die entworfenen Primer mit dem Gen graphisch dargestellt, das erwartete PCR Produkt berechnet und die Darstellungen (Alignments) gespeichert.

2.9.3. Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen

Die einzelnen Reaktionseinsätze variierten zwischen 25 und 50 μl und setzten sich folgendermaßen zusammen.

Reaktionsansatz	Endkonzentration	25 μl	50 μl
Vorwärtsprimer (20 μM)	0,1-0,5 μM	0,5 μl	1 μl
Rückwärtsprimer (20 μM)	0,1-0,5 μM	0,5 μl	1 μl
Template (DNA)	50-500 ng	2,5 μl	5 μl
10x Taq Reaktionspuffer	1x	2,5 μl	5 μl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (jedes 10 mM)	1 mM	1 μl	2 μl
Aqua _{bidest}		ad 25 μl	ad 50 μl
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,04 U/ μl	0,2 μl	0,4 μl

Tabelle 15: allgemeiner Reaktionsansatz der PCR

Wiederholungen	Phase	Temperatur (°C)	Zeit (min.)
1x	Denaturierung	95	5:00
30-35x	Denaturierung	95	0:45
	Annealing	*	0:45
	Elongation	72	**
1x	Elongation	72	10:00
1x	Abkühlung	4	bis Abbruch

Tabelle 16: allgemeiner Ablauf der PCR; *abhängig von Primersequenz- und Länge; ** abhängig von erwartetem Produkt (1 kb/min.)

Für die einzelnen Primer und Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 18 und Tabelle 19 im Ergebnisteil.

3. Bakterien Methoden

3.1. Probenentnahme

Im Zeitraum März bis Oktober 2014 wurden Gram-negative Stäbchen aus verschiedenen klinischen Untersuchungsmaterialien gewonnen. Diese Proben wurden zur mikrobiologischen Untersuchung und Resistenztestung in das Routinelabor in Jimma eingeschickt. Die Isolierung, Identifikation und Resistenztestung wurde mit den Standardlaborverfahren in Jimma durchgeführt. Die reinen Isolate wurden kryokonserviert und zur weiteren Untersuchung in die Bakteriologie des Max-von-Pettenkofer-Instituts (LMU) München verbracht [60]. Dort wurden sie erneut angezchtet, identifiziert und kryokonserviert.

3.2. Isolierung

Die Bakterien wurden aus den klinischen Materialien mittels Kultur auf McConkey oder Columbia 5% Schafsblut isoliert.

3.3. Identifizierung

Die vereinzelt Bakterien wurden mit MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectroscopy*) massenspektrometrisch identifiziert [61, 62]. Dies ist heutzutage eine Routineuntersuchung im mikrobiologischen Labor. Eine

Pipettenspitze der angezüchteten, zu testenden Bakterienkultur wird mit 1 µl einer bestimmten Matrix (Alpha-Hydroxy-Zimtsäure) auf der Stahloberfläche des Objektträgers (engl. *Target*) gemischt und getrocknet. Auf einen Objektträger können bis zu 384 Proben aufgebracht werden. Dieser Objektträger wird anschließend in die Maschine eingelegt, welche die Platte luftdicht in die permanent evakuierte Messkammer transportiert. Innerhalb der Messkammer werden die Proben mit kurzen Laser-Impulsen verdampft und ein Teil der darauf befindlichen Biomoleküle inklusive der ribosomalen Proteine dabei ionisiert. Durch ein elektromagnetisches Feld werden die Ionen beschleunigt und entlang der Flugröhre auf einen Detektor geleitet. Hierbei treffen sie gemäß ihrer Masse und dem Grad der Ionisierung (m/z) nach unterschiedlichen Zeiten auf dem Sensor auf. Durch die gemessenen Flugzeiten (engl. *Time Of Flight*: TOF) ergibt sich ein für die jeweilige Spezies spezifisches Spektrum, welches durch die Software automatisiert mit Online-Datenbanken abgeglichen wird. Das Ergebnis wird mit einem Wahrscheinlichkeitsscore, den richtigen Keim identifiziert zu haben, direkt von der Software ausgegeben.

3.4. Resistenzmessung

Alle Bakterien dieser Studie wurden automatisiert entsprechend den Angaben der Geräte-Hersteller auf Resistenzen gegen verschiedenste Antibiotika getestet. Der Vitek 2 (Biomérieux) verwendet als Maßstab die MHK (Mindest-Hemm-Konzentration) und lieferte u.a. die Ergebnisse für die phänotypische Tigezyklin-Resistenz. Der Adagio (BIO-RAD) maß die Antibiotikaempfindlichkeit durch Messung der Hemm-Hof-Durchmesser um Hemmstoffplättchen auf Müller-Hinton Medium in mm und lieferte die Werte für Tetrazyklin. Anhand eines Abgleiches mit Onlinedatenbanken (z.B. EUCAST, CLSI, CAFSM) wird das Ergebnis als sensitiv (S), resistent (R) oder intermediär (I) bewertet.

3.5. Kryokonservierung

Die Kryokonservierung dient der vorübergehenden oder dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienkulturen. Durch die Kälte werden die Stoffwechselfvorgänge verlangsamt und die Bakterien können somit zu einem späteren Zeitpunkt unverändert weiterverwendet werden. Zur Konservierung von Bakterien oder Klonen wurde jeweils eine Pipettenspitze einer Kolonie abgenommen und in 2ml Röhrchen mit 25% Glycerin in Wasser suspendiert, vermischt und bei -80°C eingefroren. Sollten die Bakterien für eine Dauer von weniger als 3 Monaten bei -20°C eingefroren werden, wurde 12% Glycerin verwendet. Das Glycerin verhindert die Bildung von

großen Wasserkristallen, welche vor allem die Bakterienmembran schädigen würden und begünstigt damit das Überleben der Bakterien beim Einfrieren und Auftauen.

3.6. Selektion von Bakterien durch Antibiotikaresistenz

Transformierte Bakterien wurden mit Hilfe selbst gegossener LB-Selektionsplatten selektiert. Mit der Transformation eines klonierten Plasmids wurde den Bakterien auch ein Gen zugeführt das eine Resistenz gegen eines oder mehrere Antibiotika vermittelt. So wuchsen nur diejenigen Bakterien an, welche das Gen aufgenommen hatten und somit erfolgreich kloniert worden waren. Nach dem Aufkochen des LB-Agar-Agar (1,5% w/v) und anschließendem Abkühlen auf unter 50°C wurde das Antibiotikum, gegen das die Resistenz zu erwarten war, zugesetzt und anschließend die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen (Konzentrationen siehe B.2.9.) Nach dem Abkühlen wird das Medium fest und kann verwendet werden.

3.7. Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* für die Elektrotransformation wurde folgendes Protokoll verwendet [63, 64]: 1 ml einer Übernacht-Kultur eines *E. coli* TOP10 Stammes wurde morgens in 50 ml frisches Nährmedium überimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,6$ angezüchtet. Nach Erreichen der optischen Dichte wurde die Kultur sofort auf Eis gestellt, um weiteres Wachstum zu vermeiden. Die Bakteriensuspension wurde dann in einer vorgekühlten Zentrifuge pelletiert (3800 g, 20 min., 4°C) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in einem Eppendorf Röhrchen in 1 ml 10% Glycerin gründlich resuspendiert und gevortext, abermals pelletiert (3800 g, 1 min., 4°C) und diese Schritte 4-5-mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 500µl eiskaltem Aqua dest mit 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen aliquotiert und unverzüglich bei -80°C eingefroren. Kurz vor der Elektrotransformation wurden sie jeweils frisch aus der Kühlung geholt und 10 min. auf Eis aufgetaut.

D Ergebnisse

1. Probenkollektiv

Bei den in die Stammkollektion eingeschlossenen Bakterienstämmen handelt es sich primär um Isolate Gram-negativer Stäbchenbakterien, die aus Probenmaterial von erkrankten Patienten des Universitätskrankenhauses Jimma, Äthiopien angezüchtet wurden und im Verdacht standen, für eine Infektion kausal gewesen zu sein. Außerdem sind (zu einem kleinen Anteil) Abstriche von Stethoskopen enthalten.

1.1. Untersuchte Bakterienspezies

In den Jahren 2014 und 2015 wurden im Universitätskrankenhauses Jimma in Äthiopien Laborproben der verschiedensten klinischen Isolate mikrobiologisch untersucht. 87% der untersuchten Stämme stammen aus klinischem Material, 13% von Abstrichmaterial von Stethoskopen. Die Quellen der Erreger sind in Abbildung 9 aufgeschlüsselt. Aus diesen Proben wurden die pathogenen Erreger angezüchtet, isoliert und zur Vorauswahl bestimmt. In die Studie wurden ausschließlich Gram-negative Organismen eingeschlossen, da die Gruppe der MRGN und ESBL produzierenden Erreger ein großes klinisches Problem darstellen. Für die weitere Untersuchung wurden die Bakterienstämme nach München verbracht und mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS; *Matrix Assisted Laser Desorption, Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry*) bis auf die Speziesebene differenziert.

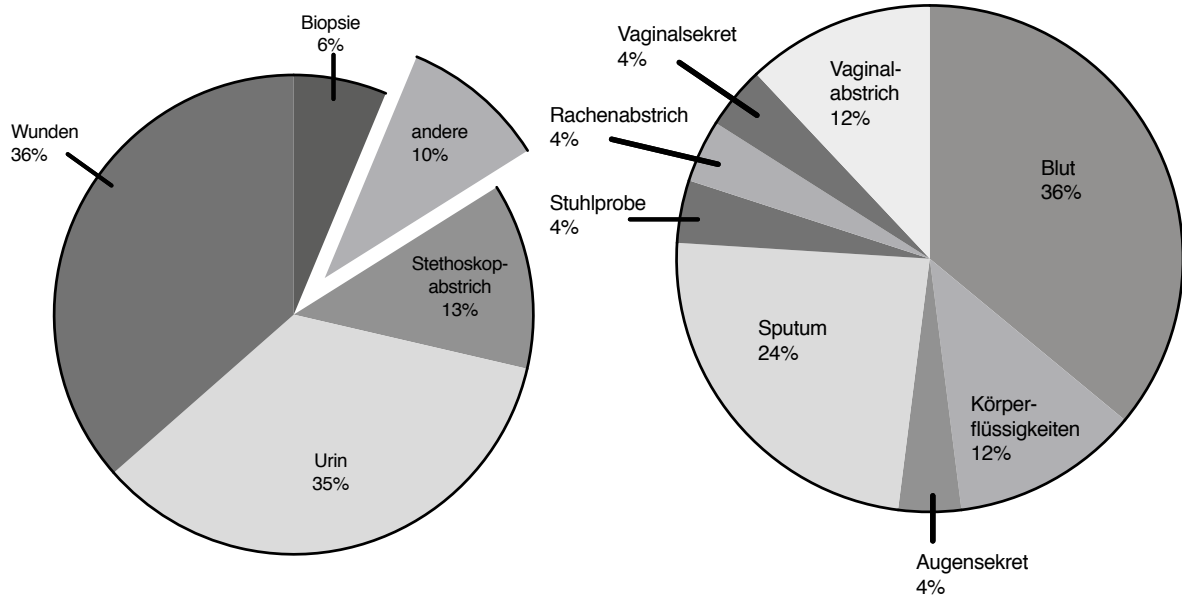


Abbildung 9: Quellen der untersuchten Bakterienstämme

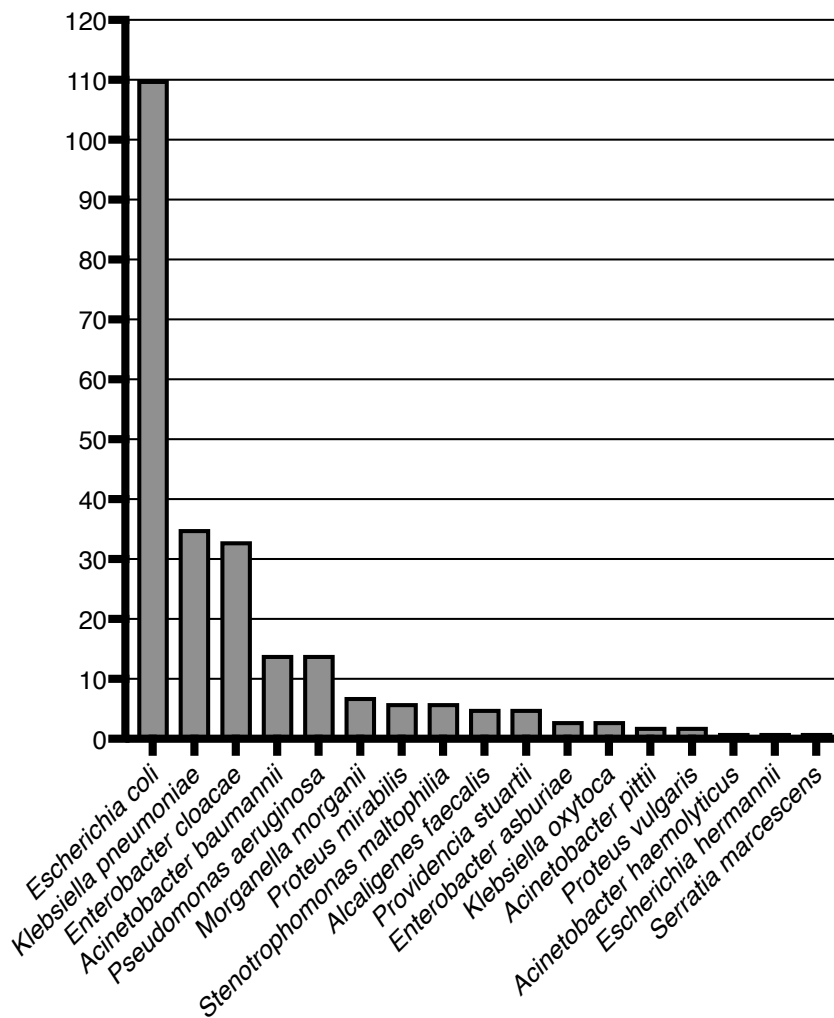


Abbildung 10: Bakterienarten innerhalb der Stammkollektion

Insgesamt konnten aus 234 untersuchten Laborproben 255 Bakterienstämme isoliert werden, welche aus 17 verschiedenen Bakterienspezies zusammengesetzt waren. Die Verteilung der Bakterienarten innerhalb der Stammkollektion ist aus Abbildung 10 ersichtlich. Innerhalb dieser Stammkollektion waren 5 Isolate von *P. stutzerii*, ein *E. coli* und ein *P. stuarti* entweder verunreinigt oder ließen sich nicht erneut anzüchten, so dass sie aus der Studie ausgeschlossen wurden. Somit ergibt sich eine Anzahl von 248 Bakterienstämmen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit bezüglich ihrer Tetrazyklinresistenz tiefergehend untersucht wurden.

1.2. Intrinsisch resistente und nicht-intrinsisch resistente Arten

Einige Organismen weisen eine intrinsische Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika auf, darunter auch gegenüber Tetrazyklin und Tigazyklin. In unserer Stammkollektion waren 23% der Erreger intrinsisch resistent gegenüber Tetrazyklin und 11% gegenüber Tigazyklin. Es wurden alle Bakterienstämme unabhängig ihrer intrinsischen Resistenz auf das Vorhandensein der Tetrazyklin-Resistenzgene überprüft.

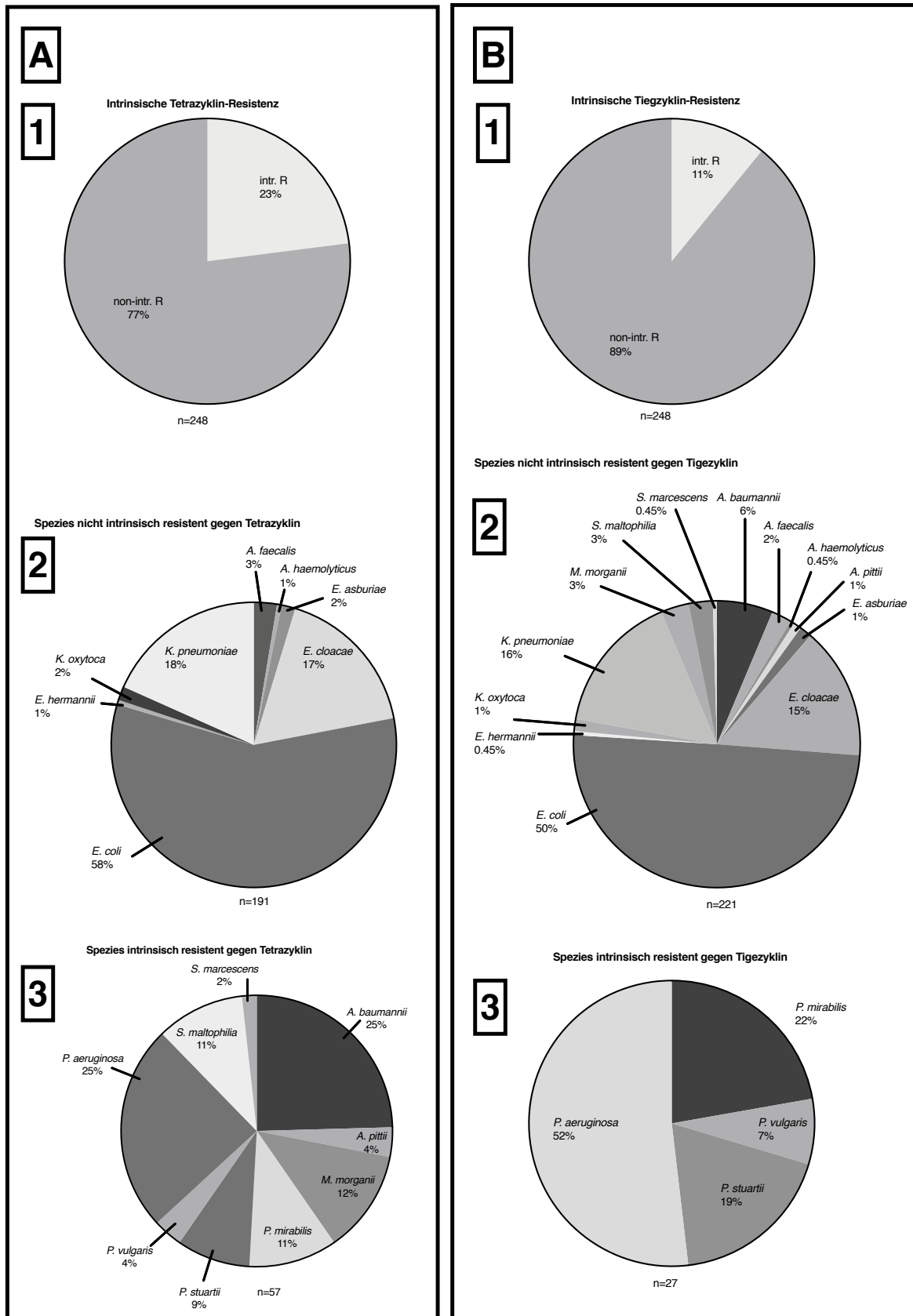


Abbildung 11: Verteilung der intrinsischen Tetrazyklin- und Tigazyklinresistenz innerhalb der Stammkollektion. A: intrinsische Tetrazyklinresistenz. B: intrinsische Tigazyklinresistenz (Rational documents EUCAST Tetrazyklin 2009 und Tigazyklin 2006 jeweils Version 1.0)

2. Phänotypische Antibiotikaresistenz innerhalb der Stammkollektion

Bei der durchgeführten automatisierten Resistenzmessung mittels Mikrodilutionstest (Abschätzung der MIC anhand der Wachstumskurve durch VITEK2) und Agardiffusionstest (Bestimmung der Hemmhofdurchmesser durch Adagio) fiel auf, dass eine große Anzahl der untersuchten Stämme kleine Hemmhofdurchmesser für Tetrazyklin aufwies. Die gemessenen Hemmhofdurchmesser wurden in den folgenden Analysen mit Grenzwerten aus dem CLSI (*Clinical And Laboratory Standards Institute*) Dokument M100-S27 von Januar 2017 verglichen. Diese Grenzwerte für Tetrazyklin sind bei allen untersuchten Spezies dieselben: Hemmhofdurchmesser ≥ 15 mm gelten als sensibel, 12-14mm gelten als „intermediär“ und ≤ 11 mm gelten als resistent.

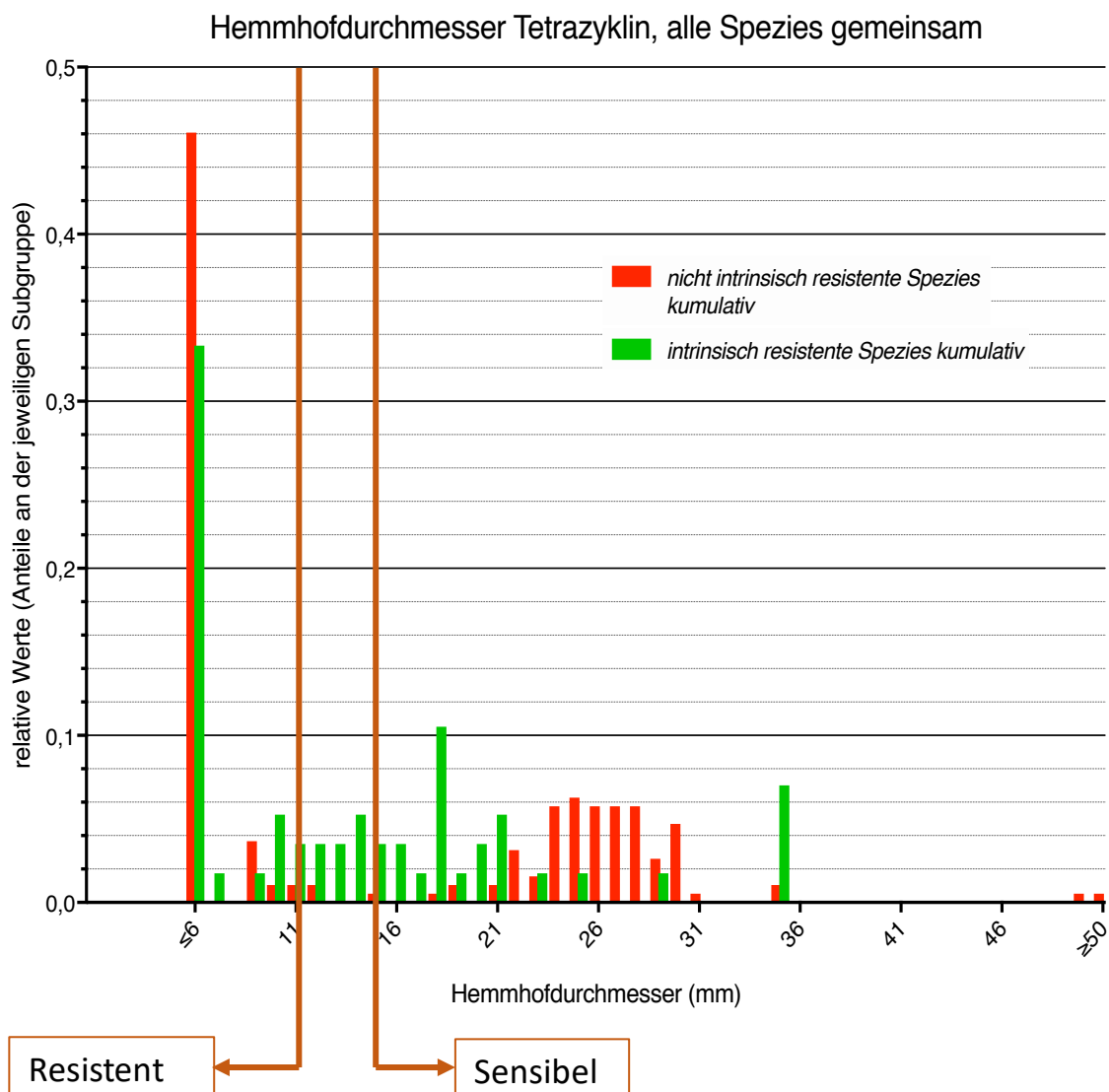


Abbildung 12: Durchschnittliche Hemmhofdurchmesser der gesamten Stammkollektion, der intrinsisch- und der nicht-intrinsisch resistenten Organismen mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin. Die Grenzwerte sind für alle untersuchten Spezies gleich. Der Bereich 12-14mm gilt als „intermediär“. Verwendet wurde das CLSI Dokument M100-S27 im Januar 2017.

Auffallend hierbei ist, dass jeweils ein großer Anteil der intrinsisch resistenten Organismen (ca. 33%) als auch der nicht-intrinsisch resistenten Erreger (44%) mit einem Hemmhofdurchmesser von 6mm (das entspricht dem Durchmesser des Testplättchens) gegenüber Tetrazyklin resistent ist. Von den restlichen intrinsisch resistenten Organismen weisen die meisten einen eher kleinen Hemmhof (7-21mm) auf, die nicht-intrinsisch resistenten Erreger hingegen einen tendenziell größeren Hemmhof (21-50mm). Die einzelnen Spezies der beiden Untergruppen werden im Folgenden separat behandelt.

2.1. Ergebnisse der Resistenzmessung der nicht-intrinsisch resistenten Organismen gegenüber Tetrazyklin

Um eine Verfälschung der gemessenen Hemmhofdurchmesser durch intrinsisch resistente Organismen zu vermeiden, wurden im Folgenden die nicht-intrinsisch resistenten Organismen aufgeschlüsselt betrachtet. In Abbildung 13 sind alle Graphen übereinandergelegt, die drei größten Untergruppen *E. coli* (n = 110), *K. pneumoniae* (n = 35) und *E. cloacae* (n = 33) sind jeweils in den Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt.

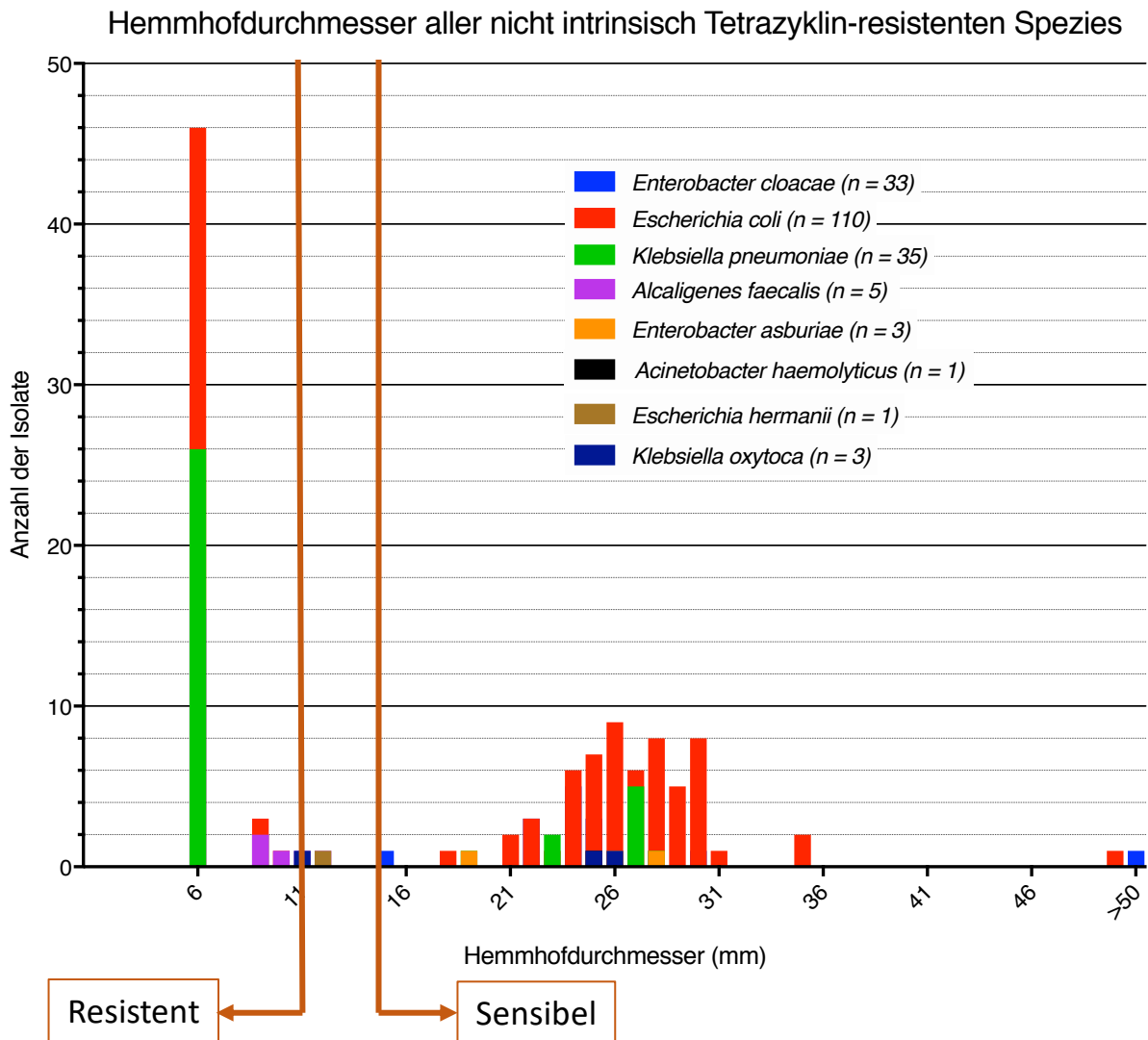


Abbildung 13: Hemmhofdurchmesser der nicht-intrinsisch resistenten Organismen mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin

Bei der Betrachtung aller nicht-intrinsisch resistenten Organismen gemeinsam fällt auf, dass die gemessenen Hemmhofdurchmesser tendenziell klein sind. Die Anzahl der gezeigten Spezies *A. faecalis* (n = 5), *E. asburiae* (n = 3), *A. haemolyticus* (n = 1), *E. hermanii* (n = 1) und *K. oxytoca* (n = 3) ist sehr gering, sodass hier auf diese Organismen nicht weiter eingegangen wird.

Die Resistenzmessung zeigte, dass 48% der *E. cloacae* Isolate, 42% der *E. coli* Isolate und 74% der *K. pneumoniae* Isolate einen Hemmhofdurchmesser von 6mm besitzen. Obwohl bei EUCAST keine Grenzwerte für die Einteilung der Organismen in resistent, intermediär oder sensibel vorliegen, kann hier davon ausgegangen werden, dass diese Organismen mit einem Durchmesser von 6mm resistent sind, da sie durch die Antibiotikatestblättchen nicht im

Wachstum gehemmt worden sind (die Testblättchen haben einen Durchmesser von 6mm). Gemäß der CLSI Grenzwerte für Tetrazyklin gelten die Organismen mit einem Hemmhofdurchmesser kleiner 11mm als resistent.

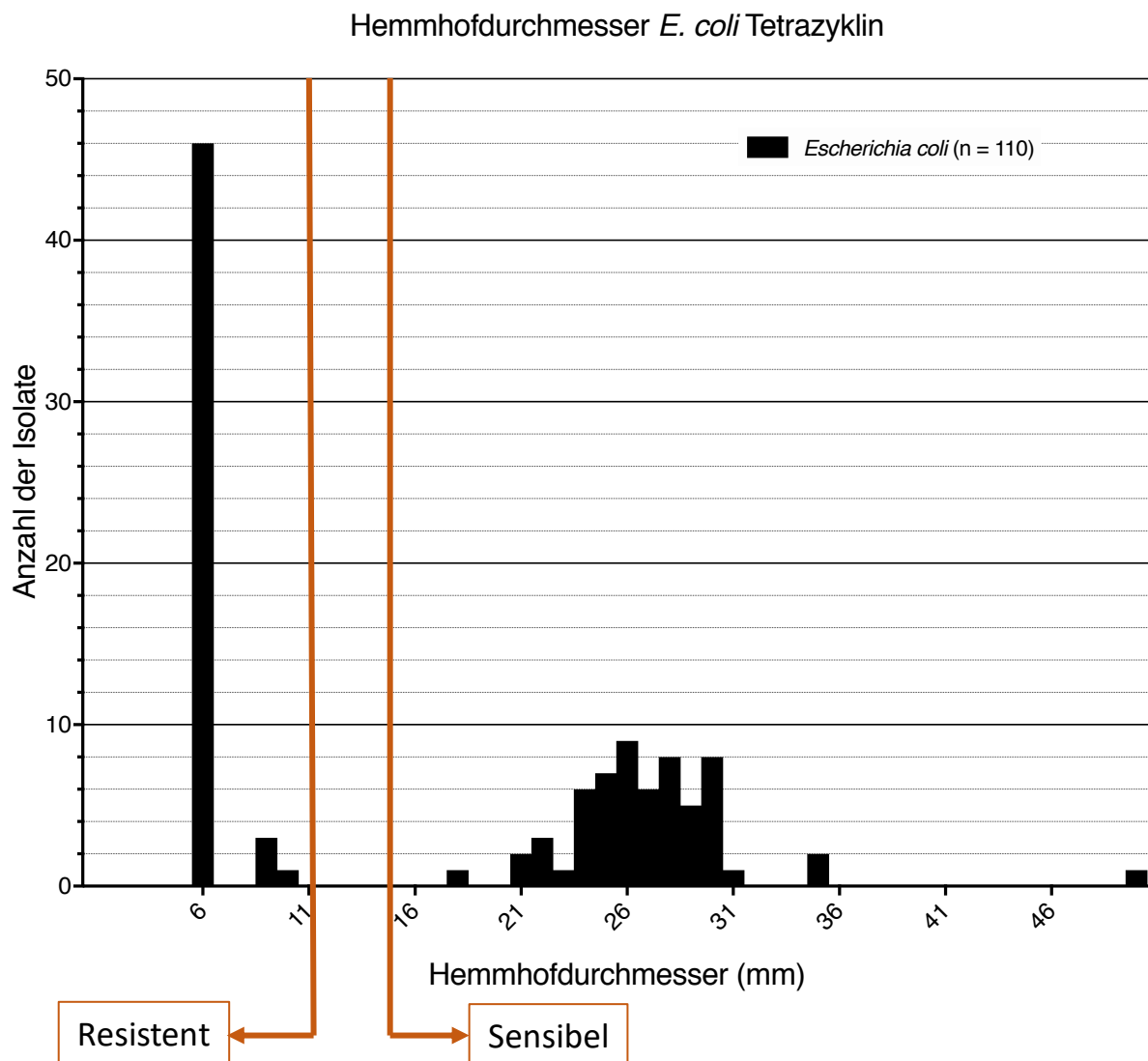


Abbildung 14: Hemmhofdurchmesser der *E. coli* mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin

Die untersuchten *E. coli* stellen mit einer Anzahl von 110 die größte Einzelgruppe dar. Die Verteilung der Hemmhofdurchmesser zeigt zwei Gipfel. Der erste Gipfel bei 6mm bedeutet, dass 42% der *E. coli* Isolate resistent gegenüber Tetrazyklin sind, da sie bis ganz an das Testblättchen herangewachsen sind. Ein zweiter Gipfel findet sich im Bereich zwischen 23 und 30mm. Diese Organismen wurden also durch das Testblättchen in ihrem Wachstum gehemmt. Da es jedoch auch vereinzelte Proben gibt, welche einen Hemmhofdurchmesser von über 30mm (i.e. 1 x 31mm, 2 x 35mm und 1 x 50mm) aufwiesen, kann das bedeuten, dass die Organismen des zweiten Gipfels nur eingeschränkt sensibel auf Tetrazyklin reagieren.

Eine ähnliche Verteilung der Hemmhofdurchmesser zeigte sich auch bei den untersuchten *E. cloacae* Isolaten. Von den 33 untersuchten Stämmen hatten 48% einen Hemmhofdurchmesser von 6mm, damit ist fast die Hälfte von ihnen als resistent einzustufen. Der zweite Gipfel mit 33% der untersuchten *E. cloacae* liegt bei etwa 22-25mm. Der größte ermittelte Wert war 30mm, somit kann davon ausgegangen werden, dass die oben genannten 33% relativ sensibel auf Tetrazyklin reagieren.

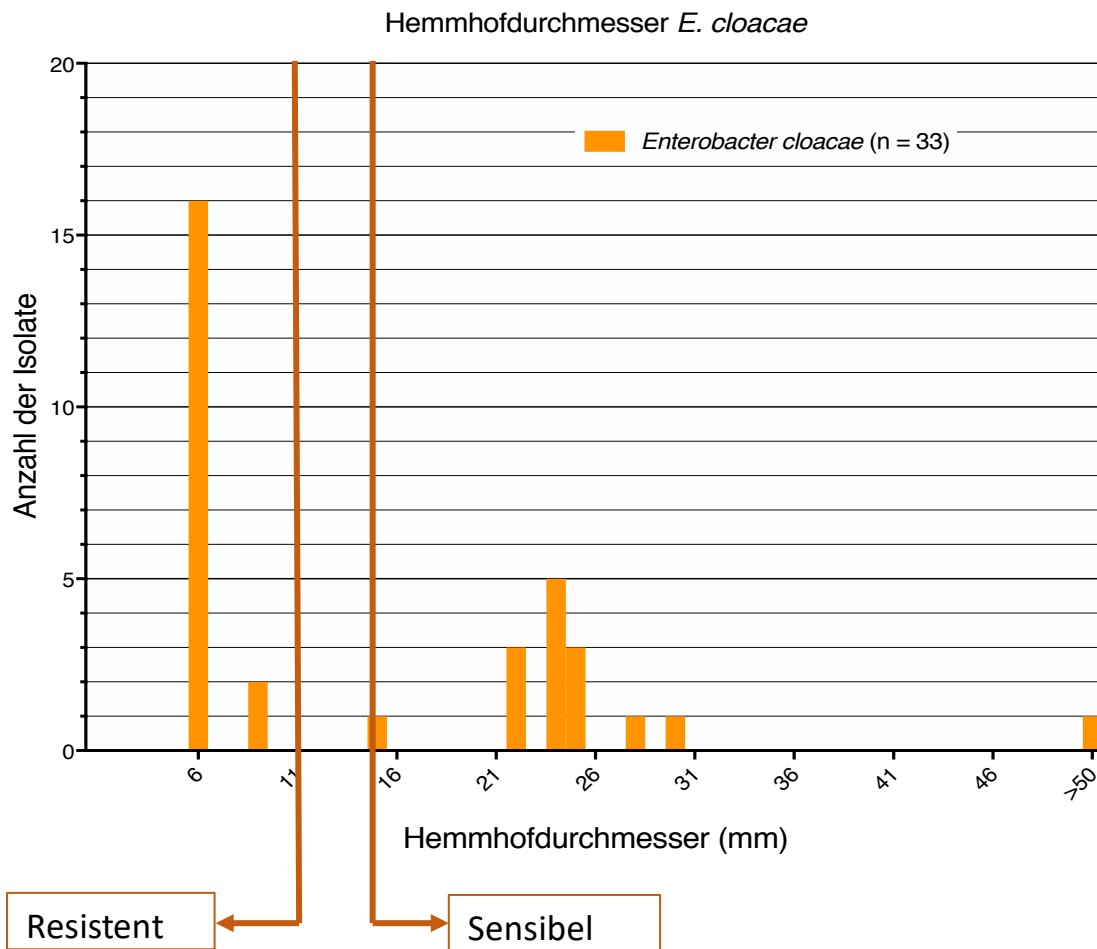


Abbildung 15: Hemmhofdurchmesser der *E. cloacae* mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin

Ebenfalls interessant ist, dass immerhin 74% der 35 getesteten *K. pneumoniae* Isolate einen Hemmhofdurchmesser von 6mm aufwiesen. Damit ist ein Großteil dieser Isolate resistent gegenüber Tetrazyklin. Ein zweiter Gipfel ist bei 27mm zu erkennen. Da der größte gemessene Wert 28mm betrug kann wieder angenommen werden, dass die oben genannten Isolate mit großem Hemmhofdurchmesser sensibel auf Tetrazyklin reagieren.

Somit lässt sich feststellen, dass die drei hier behandelten Spezies im Vergleich eine ähnliche Verteilung der Hemmhofdurchmesser mit ihren zwei Gipfeln jeweils bei 6mm und 22-30mm aufweisen.

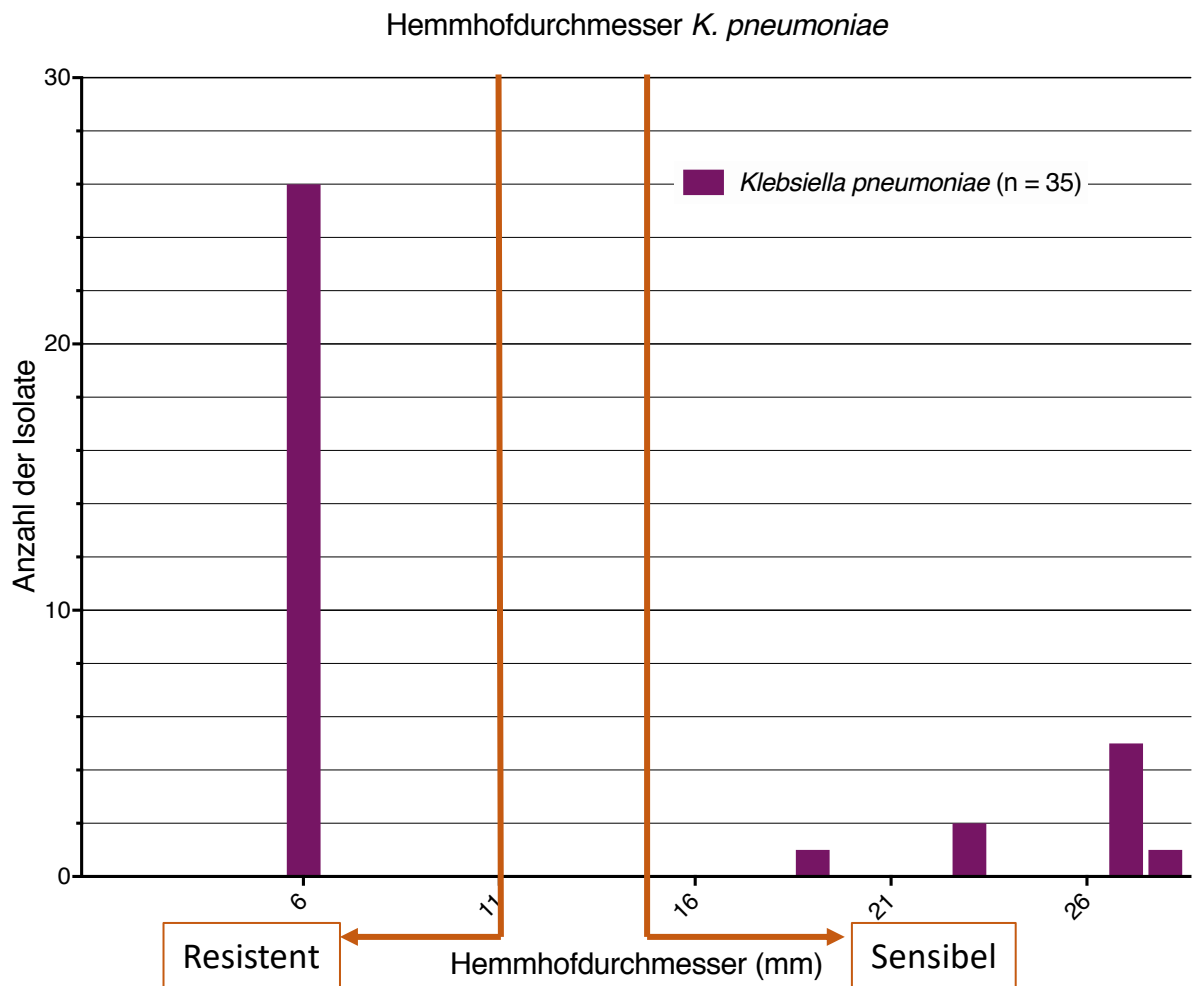


Abbildung 16: Hemmhofdurchmesser der *K. pneumoniae* mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetracyclin

2.2. Hemmhofdurchmesser der intrinsisch resistenten Organismen (gelistet nach EUCAST)

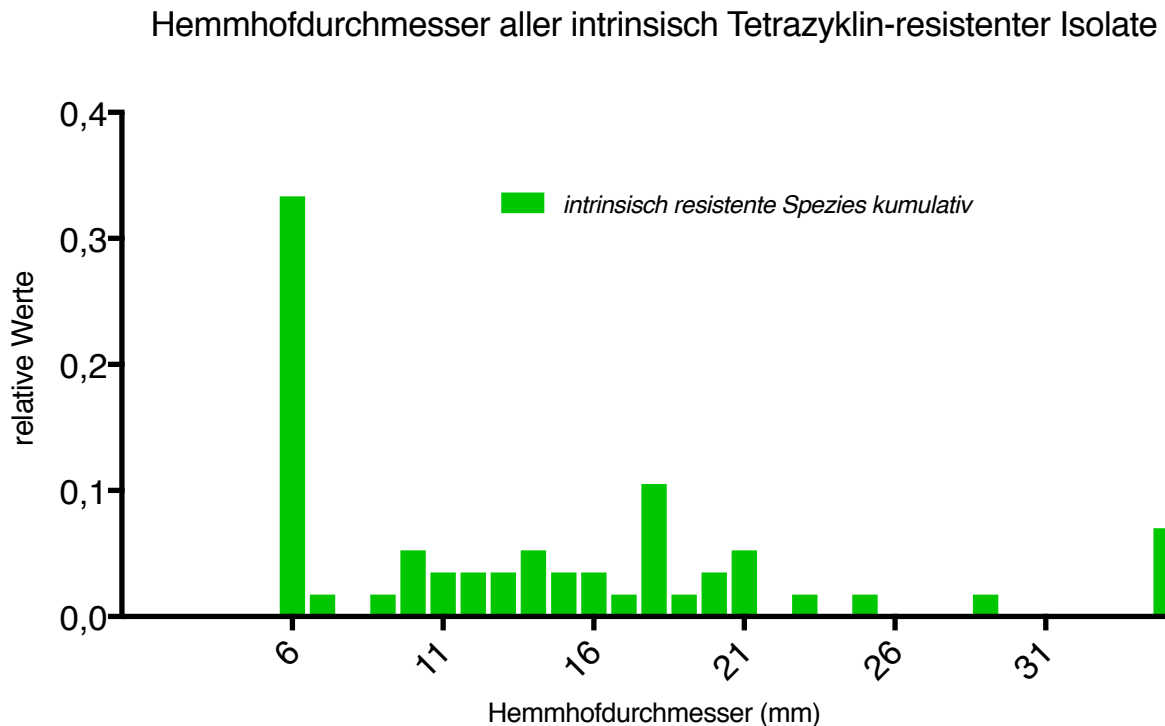


Abbildung 17: Durchschnittliche Hemmhofdurchmesser der intrinsisch resistenten Isolate (kumulative Anzahl)

In Abbildung 17 wurden die Hemmhofdurchmesser aller derjenigen Spezies gemeinsam dargestellt, welche in den EUCAST „expert rules“ (Version 3.1. (2016)) als intrinsisch resistent gegenüber Tetrazyklin bezeichnet werden. Insgesamt handelt es sich dabei in der Stammkollektion um 57 Isolate der Spezies *A. baumannii* (n = 14), *A. pittii* (n = 2), *M. morgani* (n = 7), *P. mirabilis* (n = 6), *P. stuartii* (n = 5), *P. vulgaris* (n = 2), *P. aeruginosa* (n = 14), *S. maltophilia* (n = 6) und *S. marcescens* (n = 1). Bei intrinsisch resistenten Erregern wäre eigentlich davon auszugehen, dass sich diese bei der Resistenztestung durch das Vorhandensein des Tetrazyklintestplättchens nicht in ihrem Wachstum hemmen lassen. Allerdings ist dies nur bei 33% der Fall, ersichtlich an einem Hemmhofdurchmesser von 6mm. Alle anderen Durchmesser sind relativ weit gestreut zwischen 7-35mm.

Die getrennte Betrachtung der beiden größeren Untergruppen *A. baumannii* und *P. aeruginosa* zeigt für jeweils 29% einen Hemmhofdurchmesser von 6mm, alle anderen getesteten Isolate wiesen Durchmesser von >6 mm auf und sind somit zumindest labordiagnostisch als auch nach den CLSI Grenzwerten weniger resistent gegenüber Tetrazyklin.

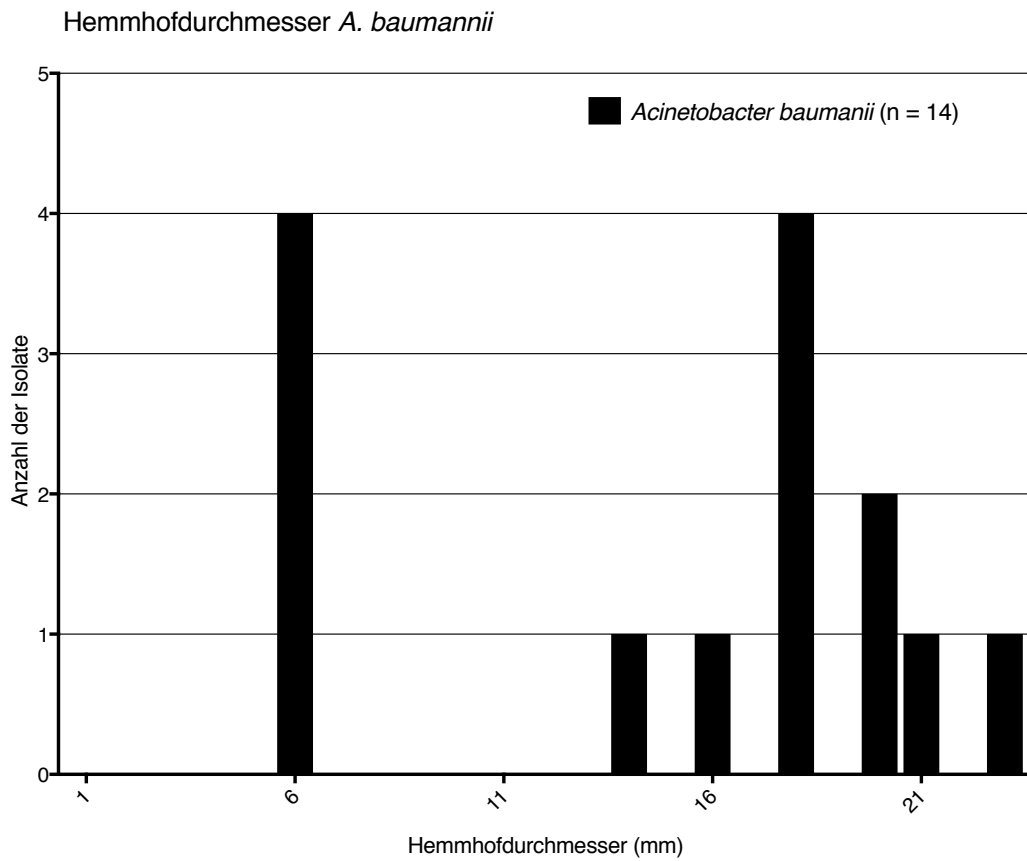


Abbildung 18: Hemmhofdurchmesser der *A. baumannii* Isolate

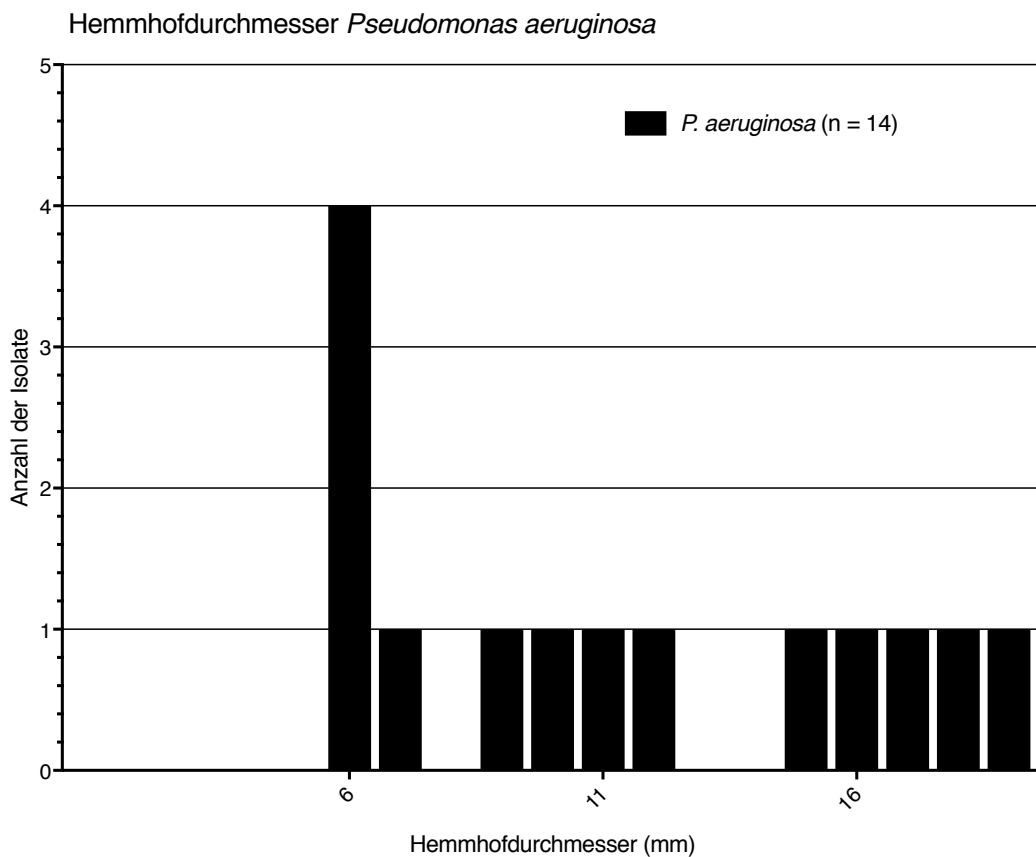


Abbildung 19: Hemmhofdurchmesser der *P. aeruginosa* Isolate

3. PCR Assay

Um der Ursache der verbreiteten Resistenz der multiresistenten Gram-negativen Erreger gegenüber Tetrazyklin auf den Grund zu gehen, wurde eine ausführliche Literaturrecherche zu den Ursachen der Tetrazyklinresistenz durchgeführt. Daraus wurde ersichtlich, dass die Resistenz zu großen Teilen auf bestimmten Tetrazyklin-Resistenzgenen beruht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein Ansatz entwickelt, die gesamte Stammkollektion mittels PCR auf das Vorhandensein bestimmter, in den untersuchten Spezies vorbeschriebener Tetrazyklin-Resistenzgene zu screenen.

3.1. Ausgewählte Tetrazyklin-Resistenzgene: Ergebnisse einer Literaturrecherche

Aus einem halbjährlich aktualisierten Onlinedokument

(<https://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb2.pdf>, abgelesen zuletzt 16.01.2020) wurde abgelesen, welche Gene bis dato in welchen Bakterienspezies nachgewiesen werden konnten. Durch die regelmäßige Aktualisierung konnte davon ausgegangen werden, dass diese Tabelle den aktuellen Stand der Forschung zum Thema beinhaltet, deshalb wurde sie als eine Grundlage der vorliegenden Arbeit verwendet.

Tabelle 17: Vorbeschriebene Gene bei den einzelnen Spezies

Spezies	vorbeschriebene Gene
<i>Acinetobacter spp.</i>	A, B, G, H, L, M, O, W, X, Y, 39
<i>Alcaligenes spp.</i>	A, E, M, 30, 39
<i>Enterobacter spp.</i>	A, B, C, D, E, G, L, M, 39, X
<i>Escherichia spp.</i>	A, B, C, D, E, G, J, L, M, W, Y, X, 32
<i>Klebsiella spp.</i>	A, B, C, D, E, L, M, S, W, X
<i>Morganella spp.</i>	A, D, J, L, M, W
<i>Providencia spp.</i>	B, E, G, M, 39
<i>Proteus spp.</i>	A, B, C, E, H, G, L, J, M, X
<i>Pseudomonas spp.</i>	A, B, C, D, E, G, K, L, M, O, T, W, X, Y, 34, 39, 42
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	B, H, M, O, T, 35, 39
<i>Serratia spp.</i>	A, B, C, E, M, S, X, 34, 41

3.2. Entwickelte PCR Primer und Reaktionsbedingungen

Anhand der bekannten Gene wurden anschließend PCR Primer ermittelt, mit welchen die Stammkollektion auf das Vorhandensein der Tetrazyklin-Resistenzgene untersucht werden konnte. Für einige der Gene waren in der veröffentlichten Literatur Primerpaare zu finden, für einige Gene mussten jedoch eigene Primerpaare entwickelt werden. Die Vorgehensweise ist im Methodenteil beschrieben. Dadurch ergaben sich die in Tabelle 18 dargestellten Primerpaare.

Tabelle 18: Primer PCR Assay

Gen	Name der Primer	Primersequenz (5'-...-3')	Anmerkungen, Referenz
tet(A)	tet.A.for	GCCTCCTGCGCGATCTGG	[65] (A3-F)
	tet.A.rev	CGAABCAAGCAGGACCATG	(A2-R)
tet(B)	tet.B.for	CAGTGCTGTTGTTGTCATTAA	[65]
	tet.B.rev	GCTTGAATACTGAGTGTA	
tet(C)	tet.C.for	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	[65]
	tet.C.rev	TGGTCGTCATCTACCTGCC	
tet(D)	tet.D.for	GGATATCTCACCGCATCTGC	[65]
	tet.D.rev	CATCCATCCGGAAGTGATAGC	
tet(E)	tet.E.for	TCCATACGCGAGATGATCTCC	[65]
	tet.E.rev	CGATTACAGCTGTCAGGTGGG	
tet(G)	tet.G.for	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	[66]
	tet.G.rev	AGCAACAGAATCGGGAACAC	
tet(H)	tet.H.for	ATACTGCTGATCACCG	[65]
	tet.H.rev	TCCAATAAGCGACGC	
tet(J)	tet.J.for	CGAAAACAGACTCGCCAATC	[67]
	tet.J.rev	TCCATAATGAGGTGGGGC	
tet(L)	tet.L.for	TCGTTAGCGTGCTGTCATT	[66]
	tet.L.rev	GTATCCCACCAATGTAGCC	
tet(M,O,S)	tet.MOS.for	GTTTATCACGGAAGYGCWA	[65]
	tet.MOS.rev	GAAGCCCAGAAAGGATTYGGT	
tet(T)	tet.T.for	GCGTTAAGGGATCAAATCTTCC	[65]
	tet.T.rev	CAGGTATGCTCCCTCATCAAC	
tet(W)	tet.W.for	CAGAGCGTGGTTCAGTCTGT	diese Arbeit
	tet.W.rev	TCCACTTCGCAACGCAAAG	
tet(X)	tet.X.for	CAATAATTGGTGGTGGACCC	[66]
	tet.X.rev	TTCTTACCTTGGACATCCCG	
tet(Y)	tet.Y.for	CACTTATAACCGCACTGATTG	[65]
	tet.Y.rev	ATCGCAATAAACTGGCTGACTG	diese Arbeit

Gen	Name der Primer	Primersequenz (5'-...-3')	Anmerkungen, Referenz
tet(34)	tet.34.for	GAGTGGCACCTGATGGCTTA	diese Arbeit
	tet.34.rev	TACCGGGTGCTATTCTTGCG	
tet(35)	tet.35.for	AGGCAACATCAACCCACACT	diese Arbeit
	tet.35.rev	ACATGACACAAACGCCACTG	
tet(39)	tet.39.for	CTCCTTCTCTATTGTGGCTA	[68]
	tet.39.rev	CACTAATACCTCTGGACATCA	
tet(41)	tet.41.for	TGATCGTCGTCCACCTTGTG	diese Arbeit
	tet.41.rev	TGGCCGGCATTATCTGGTT	
tet(42)	tet.42.for	GACTTCACCCACCTCTCTCAC	diese Arbeit
	tet.42.rev	AGAGGCCGTTGATCGCTTC	

Die Reaktionsbedingungen der Primer wurden durch wiederholte PCR bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität optimiert, woraus sich der fertige PCR Assay, dargestellt in Tabelle 19 ergab. Auch die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen ist im Methodenteil eingehend beschrieben.

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen PCR Assay

Primerpaar	Annealingtemp. (C°)	verwendete Temp. (C°)	erwartete Produktlänge (bp)	Elongationszeit (Sek.)
tet(A)	51	44	848	60
tet(B)	52	48	571	40
tet(C)	55	44	417	30
tet(D)	57	44	436	30
tet(E)	59	44	442	30
tet(G)	55	50	468	30
tet(H)	45	38	1076	60
tet(J)	61	48	182	20
tet(L)	55	38	267	30
tet(MOS)	47	38	686	40
tet(T)	59	38	2408	150
tet(W)	60	38	728	60
tet(X)	55	38	468	30
tet(Y)	53	38	1161	80
tet(34)	60	38	240	30
tet(35)	60	38	310	30
tet(39)	49	38	711	60
tet(41)	60	38	352	30
tet(42)	60°	38°C	191	20

3.3. Entwickelte Positivkontrollen (Hybridgene, Klonierung in *E. coli* und Plasmidmaps)

Um die Primerpaare und PCR-Reaktionsbedingungen auf ihre Funktionalität zu untersuchen wurden Positivkontrollen benötigt, also Stämme, von denen bekannt ist, dass sie die gesuchte Gensequenz in sich tragen. Positivkontrollen wurden für tet(A, B, C, D, E, G, H, J, O, W, X und Y) in Form von klonierten *E. coli* und für tet(34) in Form von gelöster DNA von Dr. Karen Scott (Rowett Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen, Schottland) zur Verfügung gestellt. Für tet(L, MOS, T, 35, 39, 41, 42) waren diese jedoch nicht erhältlich. Deshalb wurden die entsprechenden Positivkontrollen selbst durch Klonieren hergestellt, wodurch sich *E. coli* Stämme mit Hybridgenen auf Plasmiden ergaben. Eine beispielhafte Plasmid Karte (Abbildung 20) zeigt das Plasmid innerhalb eines *E. coli* Stammes.

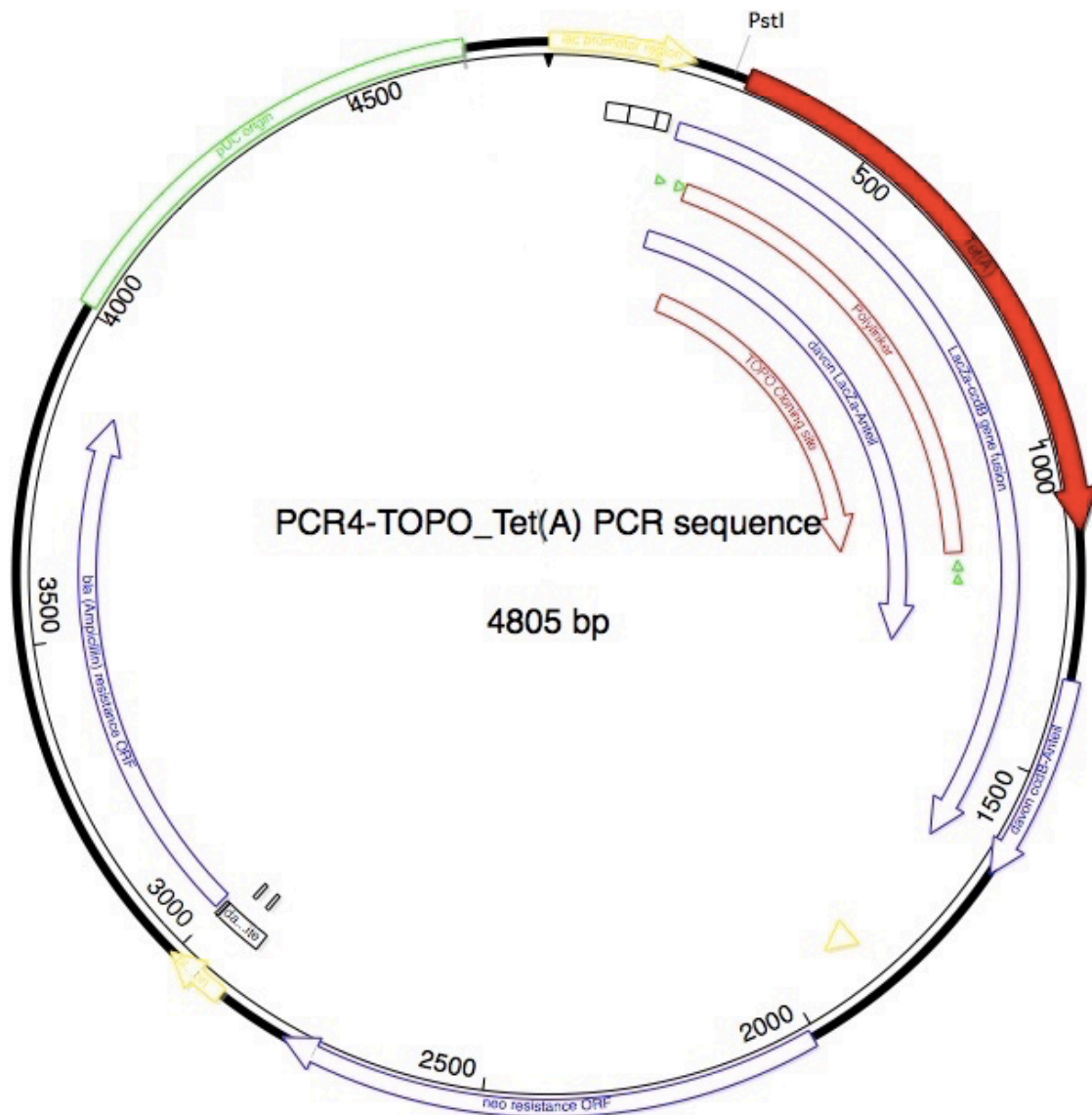


Abbildung 20: Exemplarische Plasmidkarte: Auf dem ringförmig dargestellten Plasmid mit einer Gesamtlänge von 4805 Basenpaaren (bp) ist das ligierte Genfragment *tet(A)* mit einem roten Pfeil eingetragen. Außerdem findet sich die Schnittstelle, an welcher das Gen eingebaut worden ist (TOPO cloning site) und das Gen für die Ampicillin Resistenz

Als Ergebnis wurde eine Stammkollektion von Organismen hergestellt, die zur Validierung und als Kontrolle des vorliegenden PCR Assays genutzt werden kann.

4. Genotyp

Die gesamte Stammkollektion wurde anhand des oben beschriebenen PCR Assays auf das Vorhandensein der 21 verschiedenen Allele von Tetrazyklin-Resistenzgenen untersucht. Hierbei wurde nacheinander die gesamte Stammkollektion jeweils auf das Vorliegen aller

Allele getestet. Abbildung 21 zeigt exemplarisch getestete Stämme mit positiven Banden, welche im jeweiligen Stamm das detektierte Gen zeigen.

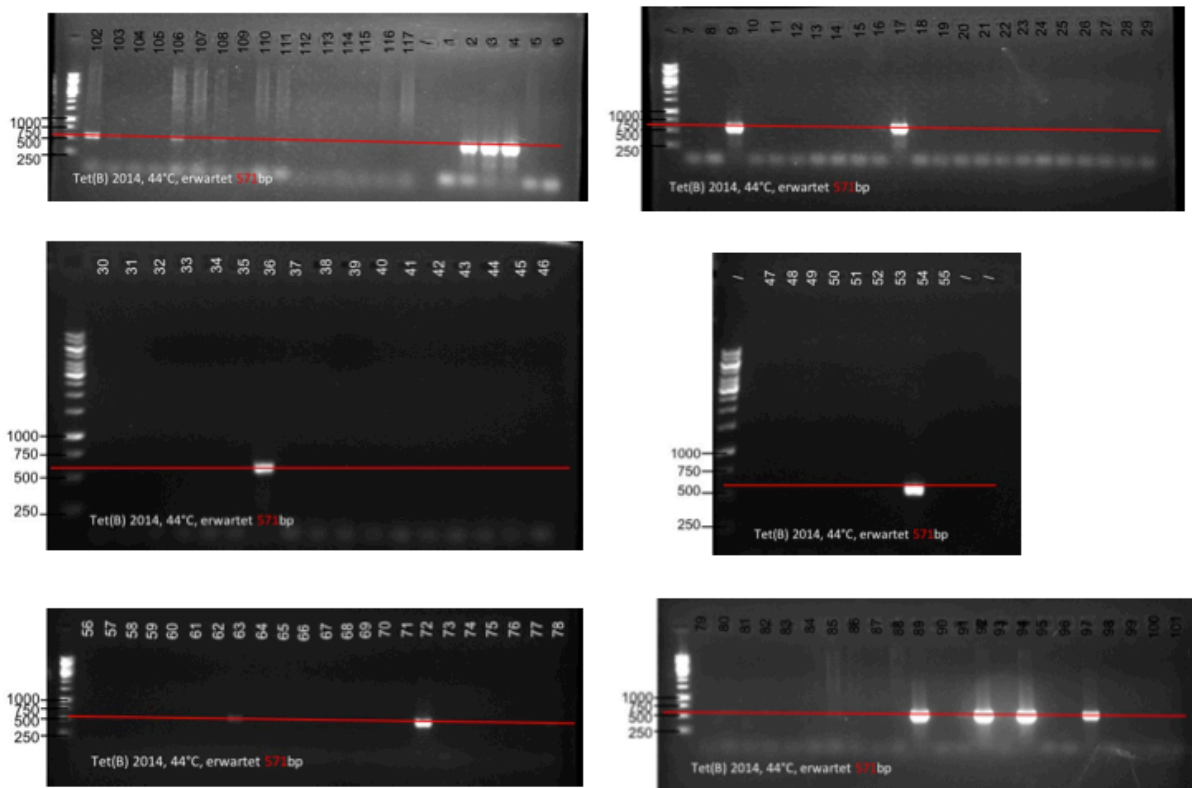


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der Geldokumentation des PCR Screenings, hier das Screening eines Teils der Stammkollektion, getestet auf das Tetrazyklin-Resistenzgen tet(B)

Die Ergebnisse des PCR Screenings wurden tabellarisch zusammengefasst, sodass für jeden untersuchten Stamm die detektierten Gene ersichtlich wurden.

4.1. Detektierte Gene

Von den 21 untersuchten Allelen von Tetrazyklin-Resistenzgenen wurden in der vorliegenden Stammkollektion 9 verschiedene Resistenzgene detektiert. Diese sind tet(A, B, C, D, G, H, Y, 39, 41). Insgesamt wurden in 129 Stämmen 164 tet-Gene detektiert, d.h. dass einige Isolate über mehrere Allele (tet-Genkombinationen von bis zu 4 tet-Genen) verfügen.

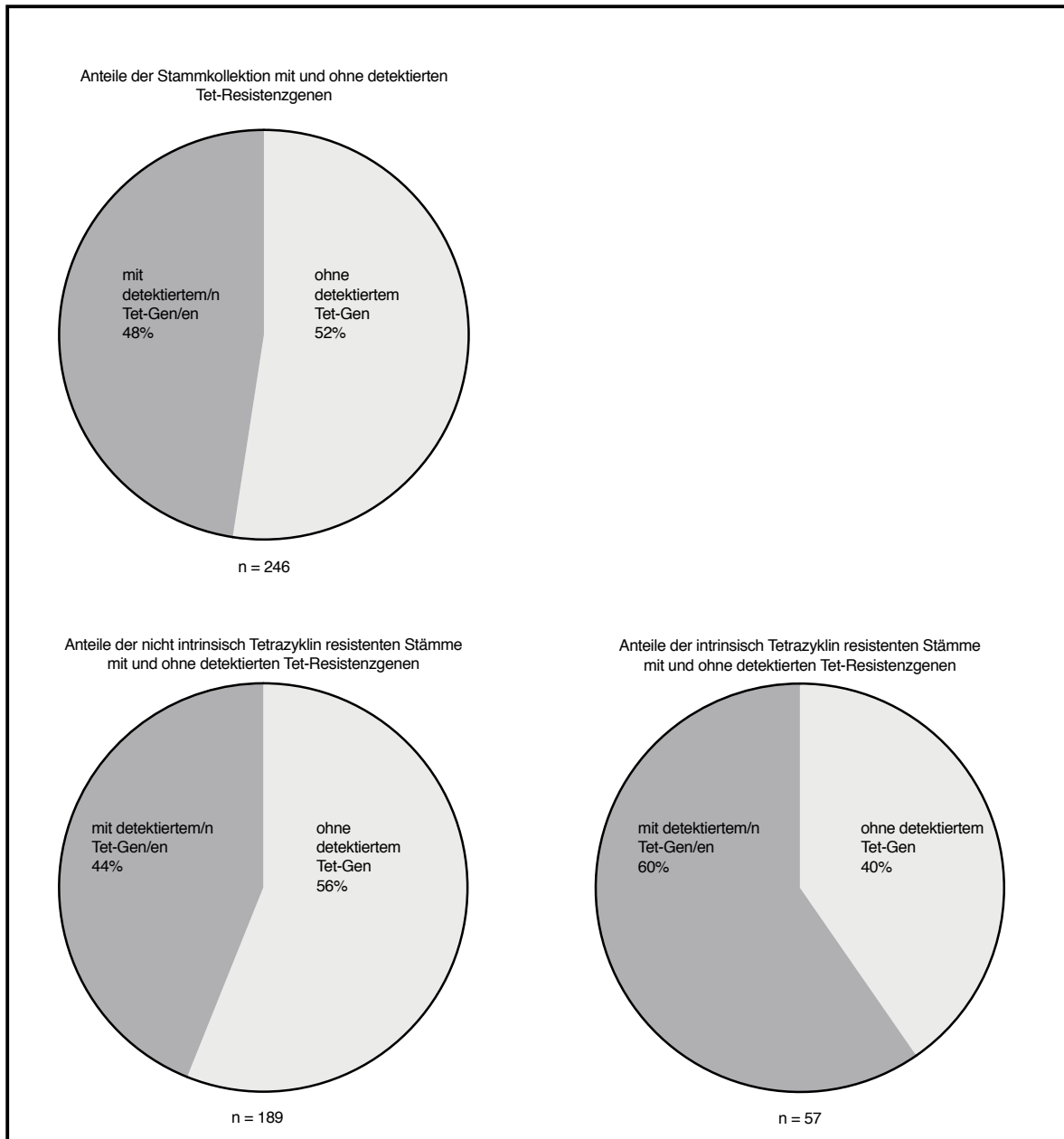


Abbildung 22: Anteile der Stammkollektion mit und ohne detektierte Tetrazyklin-Resistenzgenen

Von den getesteten 248 Stämmen tragen 129, also 52% eines oder mehrere tet-Gene in sich. Von den nicht-intrinsisch resistenten Erregern besitzen 56% mindestens ein tet-Gen, von den intrinsisch Resistenten sind dies 40%, bezogen auf die jeweilige Untergruppe (nicht-intrinsisch resistent, intrinsisch resistent).

Tabelle 20: Häufigkeit und Verteilung der detektierten tet-Gene

Tetrazyklin-Resistenzgen	Anzahl Absolut [n]	Relativ [%]
tet(A)	30	18,3
tet(B)	32	19,5
tet(C)	12	7,3
tet(D)	29	17,6
tet(G)	6	3,7
tet(H)	12	7,3
tet(Y)	17	10,4
tet(39)	7	4,3
tet(41)	19	11,6

In Tabelle 20 sind die Häufigkeit und Verteilung der detektierten tet-Gene dargestellt. tet(A), (B), und (D) wurden mit 18%, 20% und 18% am häufigsten detektiert, gefolgt von tet(41), (Y), (C), (H), (39) und (G).

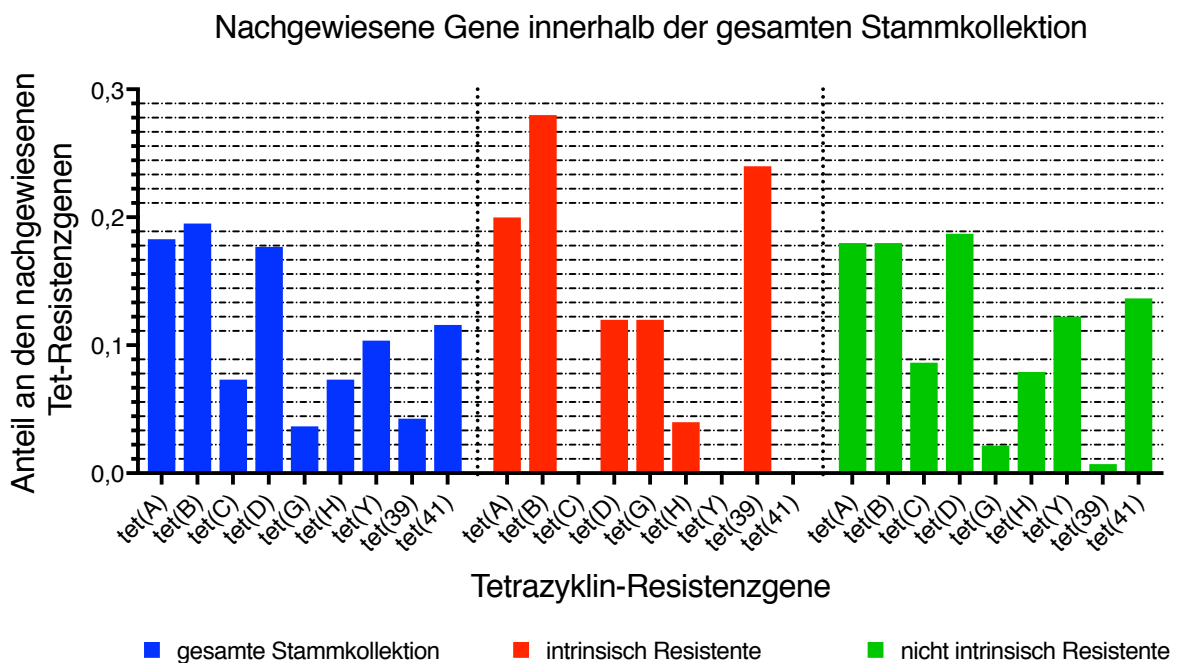


Abbildung 23: Detektierte Genklassen in der gesamten Stammkollektion, bei den intrinsisch resistenten und den nicht-intrinsisch resistenten Organismen kumulativ

Die Betrachtung der Gesamtkollektion mit ihren beiden Untergruppen intrinsisch resistente Organismen und nicht-intrinsisch resistente Organismen zeigt ähnliche Häufigkeiten für tet(A) und tet(B). Die Resistenzgene tet(C, Y, 41) wurden innerhalb der untersuchten

Stammkollektion nur in nicht-intrinsisch resistenten Organismen detektiert; tet(39) hingegen fast ausschließlich in den intrinsisch resistenten *A. baumannii* Isolaten.

4.1.1. Detektierte Gene in nicht-intrinsisch resistenten Erregern

Die Gruppe der nicht-intrinsisch resistenten Erreger in der Stammkollektion umfasst 191 Isolate aus 10 verschiedenen Spezies. Die drei größten Untergruppen sind *E. coli*, *K. pneumoniae* und *E. cloacae*, weshalb diese im Folgenden einzeln betrachtet werden. Bis auf die drei Spezies *A. haemolyticus*, *E. asburiae* und *E. hermannii* (welche mit insgesamt 4 Isolaten keine bedeutende Rolle innerhalb der Stammkollektion spielen) wurden in allen nicht-intrinsisch resistenten Spezies Tetrazyklin-Resistenzgene nachgewiesen. Tabelle 21 gibt einen Überblick über die detektierten tet-Gene innerhalb verschiedener Spezies. Insgesamt wurden 106 von 191 nicht-intrinsisch resistenten Keime positiv getestet, sie enthielten also mindestens ein bekanntes Tetrazyklin-Resistenzgen.

Tabelle 21: Detektierte tet-Gene innerhalb verschiedener Spezies

Spezies	A	B	C	D	G	H	Y	39	41	abs pos. (mind. 1 Gen)	rel. pos. (%)
<i>A. faecalis</i>		X			X					4/5	80
<i>A. haemolyticus</i>										0/1	0
<i>E. asburiae</i>										0/3	0
<i>E. cloacae</i>	X	X	X	X				X		15/33	45
<i>E. coli</i>	X	X	X			X	X		X	67/110	61
<i>E. hermannii</i>										0/1	0
<i>K. oxytoca</i>		X								1/3	33
<i>K. pneumoniae</i>	X	X		X						19/35	55
Summe										106/191	56

4.1.1.1. *Escherichia coli*

E. coli stellt mit 110 untersuchten Isolaten die größte Untergruppe der nicht-intrinsisch resistenten Spezies dar. Es wurde in 67 Isolaten mindestens ein tet-Gen detektiert. Von den 97

detektierten tet-Genen wurden die Allele tetA (21x), B (18x), Y (17x) und 41 (19x) zu etwa gleichen Anteilen gefunden, H (11x) und C (11x) in geringerer Anzahl, ersichtlich aus Abbildung 24.

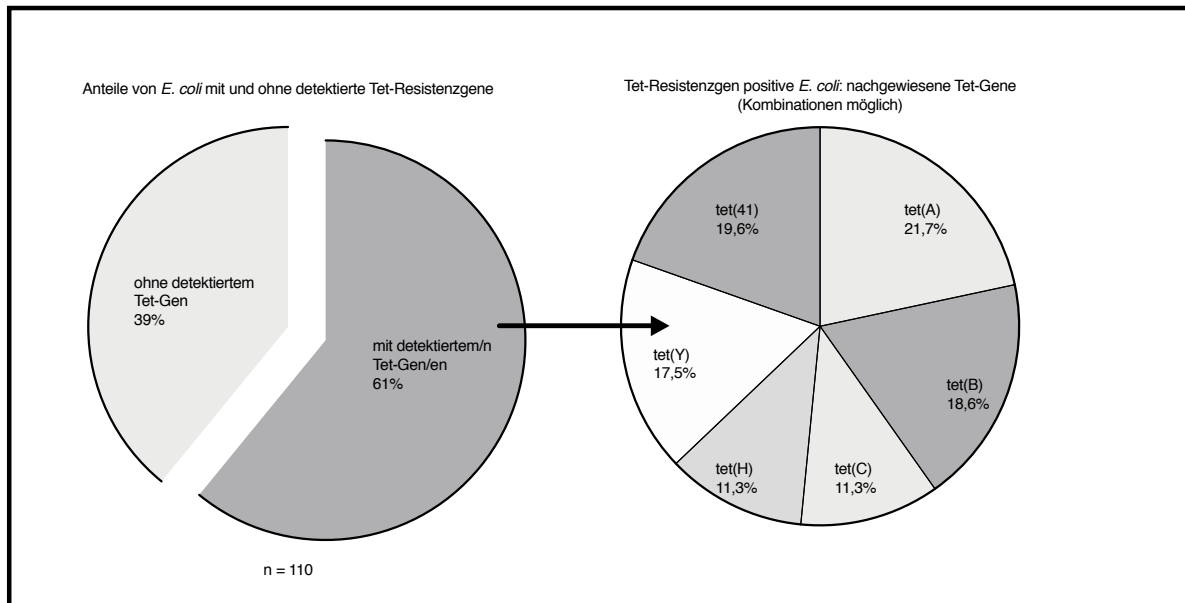


Abbildung 24: Detektierte tet-Gene in *E. coli*

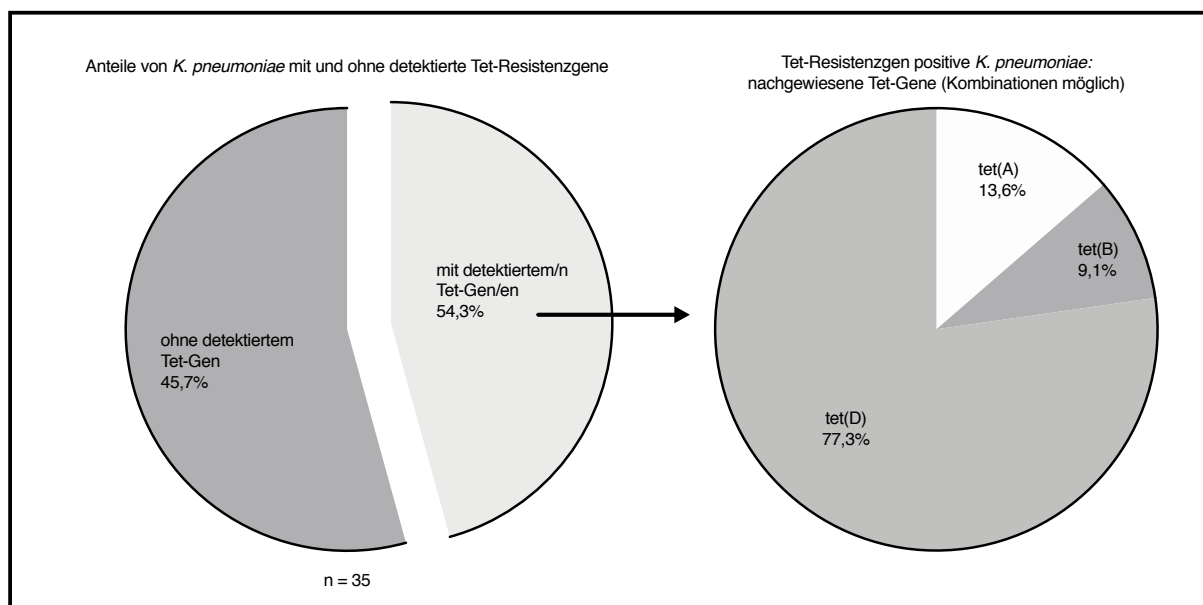
Von den 67 *E. coli* Isolaten, in denen Tetrazyklin-Resistenzgene nachgewiesen wurden, trugen 29 ein einziges tet-Gen, 29 eine Kombination aus 2 tet-Genen, 8 eine Kombination aus 3 tet-Genen und eines eine Kombination aus 4 tet-Genen. Kombinationen und relative Häufigkeiten in Bezug auf alle *E. coli* Isolate bzw. auf die tet-Gen tragenden sind in Tabelle 22 aufgelistet. Die Kombination aus 4 Genen wurde nur in einem einzigen Isolat detektiert.

Tabelle 22: Übersicht über nachgewiesene Tet-Resistenzgene/Kombinationen bei *E. coli*

Anzahl der Tet-Gene	Tet-Gen/Kombinationen	absolute Anzahl	relative Anzahl (aller <i>E. coli</i>) n=110	relative Anzahl (Tet-Gen pos. <i>E. coli</i>) n=67
kein Gen		43	39,1%	
1 Gen	A, B, C, H, Y, 41	29	26,4%	43,3%
2 Gene	A+B, A+H, B+C, B+H, B+Y, B+41, C+41, H+41	29	26,4%	43,3%
3 Gene	A+B+C, A+B+H, A+B+Y, C+H+41, C+Y+41	8	7,3%	11,9%
4 Gene	C+H+Y+41	1	0,9%	1,5%
Summe		110	100%	100%

4.1.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

Anders stellt sich die Verteilung der tet-Gene bei den *K. pneumoniae* Isolaten dar. Insgesamt trugen 19 (54,3%) der 35 Isolate mindestens ein tet-Gen. Innerhalb der 19 tet-Gen positiven Isolate wurden 22 tet-Gene der Klassen tet(A) (3x), (B) (2x) und am häufigsten (D) (17x) detektiert. In 16 Isolaten wurde ein einzelnes tet-Gen detektiert (14x D, 2xB), in 3 Isolaten eine Kombination aus zwei tet-Genen (3x A+D).

Abbildung 25: Detektierte tet-Gene in *K. pneumoniae*

4.1.1.3. *Enterobacter cloacae*

Von 33 untersuchten *E. cloacae* Isolaten trugen 15 (45,5%) ein einziges tet-Gen. Detektiert wurden 15 tet-Gene der Klassen tet(A) (1x), (B) (3x), (C) (1x), (D) (9x) und (39) (1x).

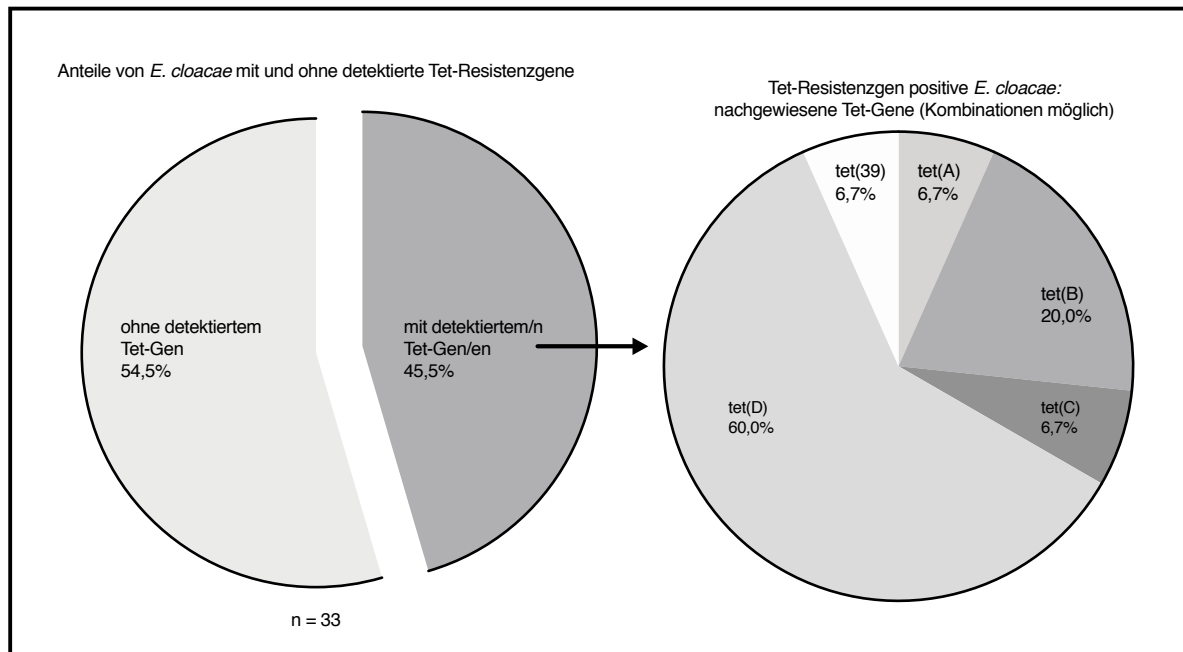


Abbildung 26: Detektierte tet-Gene in *E. cloacae*

4.1.2. Detektierte Gene in intrinsisch resistenten Erregern

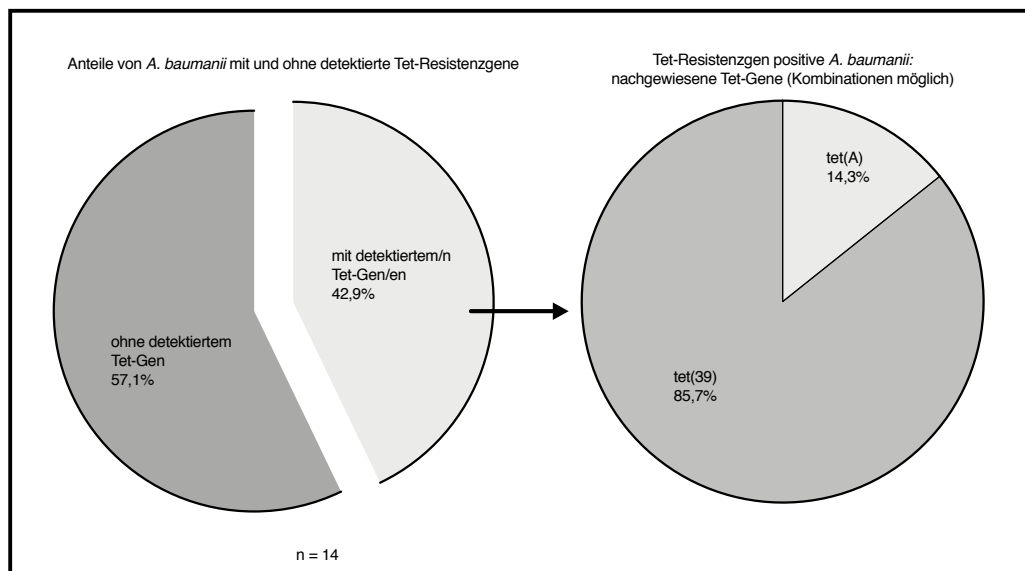
Untersucht wurden 57 von EUCAST als intrinsisch resistent bezeichnete Erreger aus 9 verschiedenen Spezies. Bis auf die Spezies *A. pittii*, *P. vulgaris* und *S. marcescens* wurden in allen übrigen Spezies tet-Gene detektiert. Mit Insgesamt 5 Isolaten stellen diese Erreger nur einen kleinen Teil der Stammkollektion dar. Tabelle 23 gibt einen Überblick über die untersuchten intrinsisch resistenten Spezies und die in ihnen detektierten tet-Gene. Die zwei größeren Untergruppen sind mit jeweils 14 Isolaten *A. baumannii* und *P. aeruginosa*, diese werden deshalb noch einzeln betrachtet.

Tabelle 23: Detektierte tet-Gene in intrinsisch resistenten Stämmen

Spezies	A	B	C	D	G	H	Y	39	41	absolut positiv (mind. 1 Gen)	relativ positiv (%)
<i>A. baumannii</i>	X							X		6/14	43
<i>A. pittii</i>										0/2	0
<i>M. morgani</i>	X	X				X				4/7	57
<i>P. mirabilis</i>	X	X								4/6	66
<i>P. stuartii</i>	X			X						3/5	60
<i>P. vulgaris</i>										0/2	0
<i>P. aeruginosa</i>		X			X					4/14	29
<i>S. maltophilia</i>		X		X						2/6	33
<i>S. marcescens</i>										0/1	0
Summe										23/57	

4.1.2.1. *Acinetobacter baumannii*

Von 14 untersuchten *A. baumannii* Isolaten trugen 6 (42,9%) insgesamt 7 tet-Gene. 6 Isolate trugen tet(39) in sich, ein Isolat besaß die Kombination tet(A+39).

Abbildung 27: Detektierte tet-Gene in *A. baumannii*

4.1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Von 14 untersuchten *P. aeruginosa* Isolaten trugen 4 (28,6%) jeweils ein einziges tet-Gen. Ein Isolat besaß tet(B), die drei anderen tet(G).

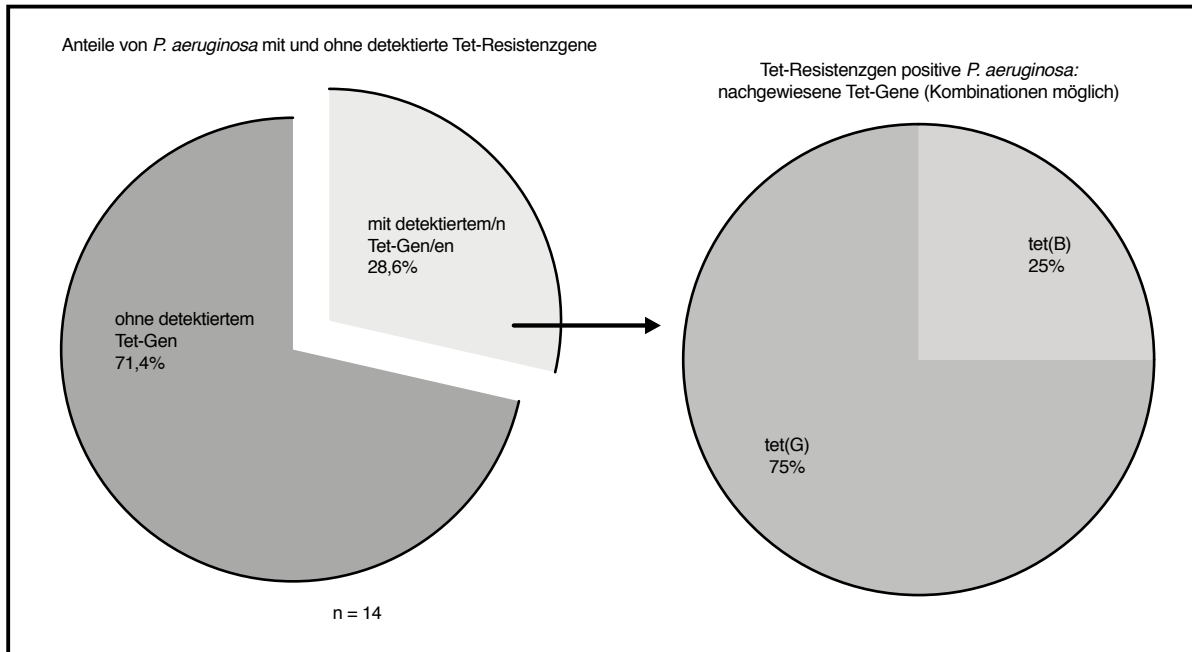


Abbildung 28: Detektierte tet-Gene in *P. aeruginosa*

4.2. Genkombinationen von Tetrazyklin-Resistenzgenen

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Tetrazyklin-Resistenzgene Großteils einzeln in den Isolaten vorkamen, mitunter aber auch in unterschiedlichen Kombinationen aus bis zu vier verschiedenen tet-Genen.

Tabelle 24: Detektierte tet-Gene und Kombinationen in der Stammkollektion

Anzahl der Gene	tet-Gene/ Kombinationen	Spezies	Anzahl relativ zu allen tet-Gen-positiven (n=129)	Anzahl relativ zur gesamten Stammkollektion (n=248)
eins	A, B, C, D, G, 39	<i>A. faecalis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>M. organii</i>	86/129 (66,6%)	86/248 (34,6%)
zwei	A+B, A+H, B+C, B+H, B+Y, B+41, C+41, H+41	<i>E. coli</i> , <i>M. organii</i>	30/129 (23,3%)	34/248 (13,7%)
	A+D	<i>K. pneumoniae</i>	3/129 (2,3%)	
	B+39	<i>A. baumannii</i>	1/129 (0,8%)	
drei	A+B+C, A+B+H, A+B+Y, C+H+41, C+Y+41	<i>E. coli</i>	8/129 (6,2%)	8/248 (3,2%)
vier	C+H+Y+41	<i>E. coli</i>	1/129 (0,8%)	1/248 (0,4%)
Summe			129/129 (100%)	129/248 (51,9%)

Aus Tabelle 24 ist ersichtlich, dass 66,6% der tet-Gen-positiven Stämme genau ein tet-Gen der Klassen A, B, C, D, G oder 39 tragen. Das letzte Drittel der tet-Gen-positiven Organismen trägt somit eine Kombination aus mindestens zwei tet-Genen (26,4%), wobei Kombinationen aus drei (6,2%) bzw. vier (0,8%) tet-Genen nur in *E. coli* Isolaten nachgewiesen werden konnten.

4.3. Bekannte und neu detektierte Tetrazyklin-Resistenzgene

Im Rahmen des durchgeführten Screenings wurden 19 verschiedene Erregerspezies auf das Vorhandensein von 21 verschiedenen Tetrazyklin-Resistenzgenen untersucht. Als Grundlage wurde die Auflistung von Prof. Roberts (Tabelle 3) verwendet. Die detektierten Gene stimmen teilweise mit diesen Angaben überein, in einigen Spezies wurden jedoch Gene nachgewiesen, die laut dieser Auflistung noch nicht in der jeweiligen Spezies beschrieben wurden. Tabelle 25 gibt hierüber einen Überblick.

Tabelle 25: Vorbeschriebene und neu detektierte tet-Gen-Spezies-Kombinationen

Spezies (nur tet-Gen-positiv)	vorbeschriebene tet-Gene (zur jeweiligen Spezies)	in dieser Studie detektierte vorbeschriebene tet-Gene	in dieser Studie detektierte nicht-vorbeschriebene tet-Gen-Spezies-Kombinationen
<i>A. baumannii</i>	A, B, G, H, L, M, O, W, X, Y, 39	A, 39	
<i>A. faecalis</i>	A, E, M, 30, 39		B, G
<i>E. cloacae</i>	A, B, C, D, E, G, L, M, 39, X	A, B, C, D, 39	
<i>E. coli</i>	A, B, C, D, E, G, J, L, M, W, Y, X, 32	A, B, C, Y	H, 41
<i>K. oxytoca</i>	A, B, C, D, E, L, M, S, W, X	B	
<i>K. pneumoniae</i>	A, B, C, D, E, L, M, S, W, X	A, B, D	
<i>M. morgani</i>	A, D, J, L, M	A	B, H
<i>P. mirabilis</i>	A, B, C, E, H, G, L, J, M, X	A, B	
<i>P. stuartii</i>	B, E, G, H, J, M, 39, 57		A, D
<i>P. aeruginosa</i>	A, B, C, D, E, G, K, L, M, O, T, W, X, Y, 34, 39, 42	B, G	
<i>S. maltophilia</i>	B, M, O, T, 35, 39	B	D

5. Korrelation des Phänotyps mit dem Genotyp

Bei einer Korrelation der Hemmhofdurchmesser mit der Detektion eines oder mehrerer Tetrazyklin-Resistenzgene fällt auf, dass durch das Wissen über das Vorhandensein eines solchen Gens keine sichere Aussage über die phänotypische Resistenz getroffen werden kann. Es lassen sich gewisse Tendenzen in Abbildung 29 erkennen. So verfügen bei den dargestellten nicht-intrinsisch resistenten Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae* und *E. cloacae* besonders viele derjenigen mit kleinen Hemmhofdurchmessern über eines oder mehrere Tetrazyklin-Resistenzgene, besonders eindrücklich sichtbar bei *E. coli*.

Korrelation Hemmhofdurchmesser mit Resistenzgenen: *E. coli*, *E. cloacae* und *K. pneumoniae* ($n = 178$)

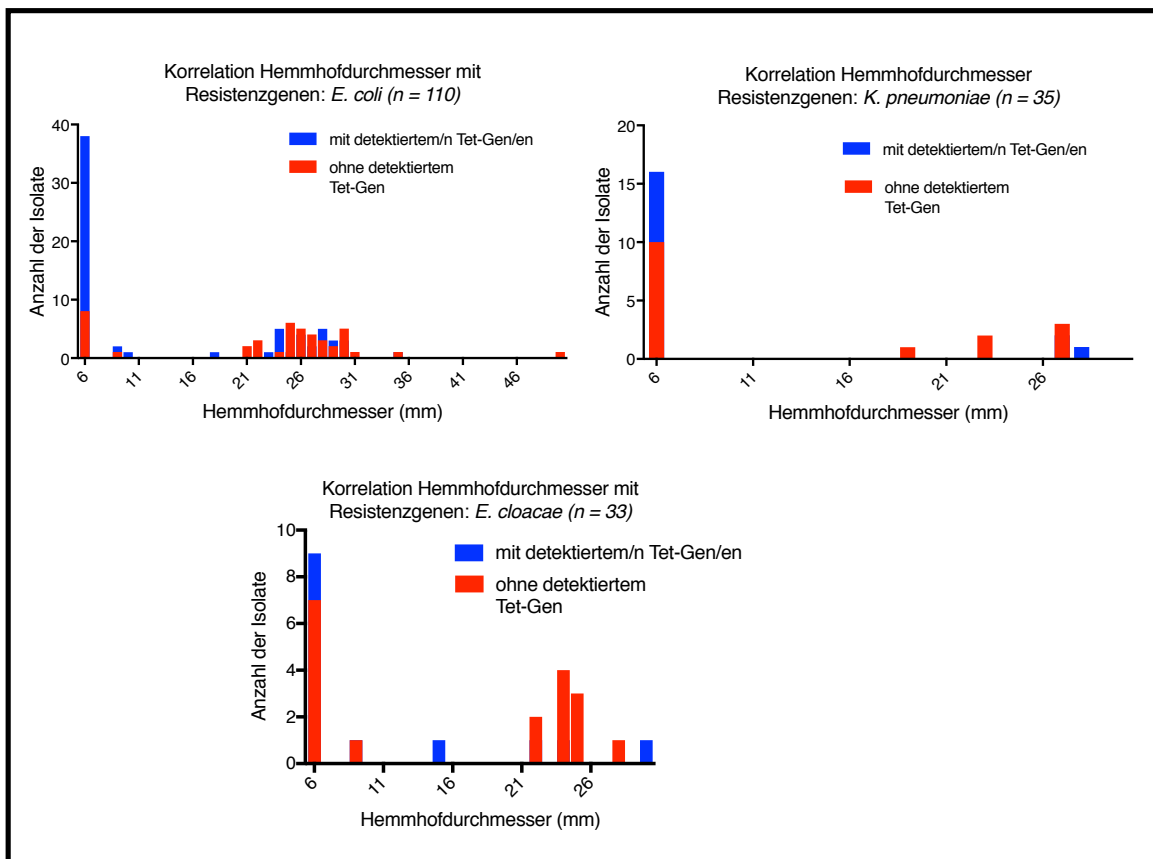
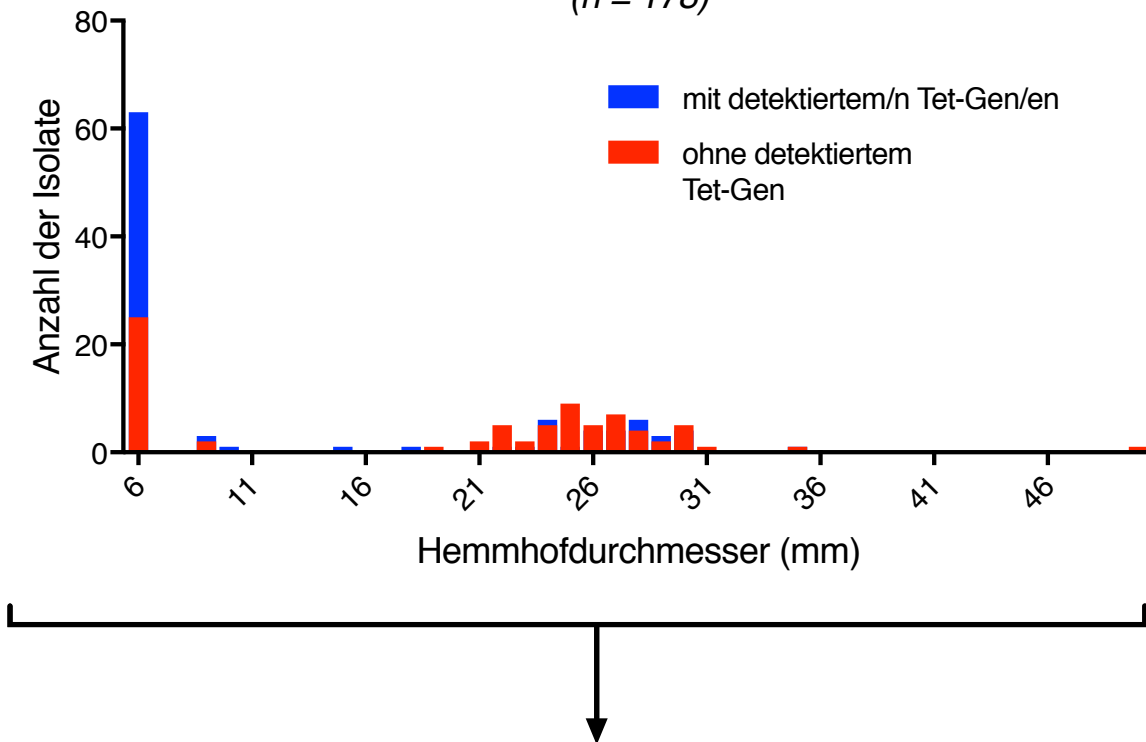


Abbildung 29: Korrelation des Genotyps mit der Größe des Hemmhofdurchmessers für nicht-intrinsisch resistente Erreger

E Diskussion

1. Gram-negatives Erregerspektrum

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 255 Bakterienstämme aus 234 klinischen Laborproben isoliert und 248 davon einer genaueren Untersuchung zugeführt. Einige Proben waren verunreinigt bzw. ließen sich nicht anzüchten. Die Probenquellen umfassten eine Vielzahl unterschiedlicher Infektionsfoci, die größten Untergruppen waren Abstriche von Wundinfektionen (36%) und Urinproben (35%), das übrige Drittel setzte sich aus verschiedensten Probenquellen zusammen. Das Erregerspektrum war breit gefächert und umfasste 17 verschiedene Gram-negative Spezies. Die meisten isolierten Spezies waren *E. coli* (n=110; 44,4%), gefolgt von *K. pneumoniae* (n=35; 14,1%) und *E. cloacae* (33; 13,3%). Jeweils 14 Isolate (5,6%) waren *A. baumannii* und *P. aeruginosa*, alle anderen Spezies hatten Anteile zwischen einem und 7 Isolaten (0,4 bis 2,8%) an der Stammkollektion. Eine Studie [69] aus Dar es Salaam (Tanzania) untersuchte eine Stammkollektion Gram-negativer Organismen (n=172, ebenfalls aus dem stationären und dem ambulanten Sektor) auf das Vorhandensein von ESBL, in welcher das Erregerspektrum ähnlich ist: *E. coli* (64%), *K. pneumoniae* (15,7%), *E. cloacae* (6,4%), gefolgt von kleineren Untergruppen. Eine andere Studie [70] untersuchte das Erregerspektrum und die Antibiotikaresistenzraten bei Erregern von Haut- und Weichteilinfektionen (n=285), davon waren die meisten typischerweise Gram-positiv (*S. aureus* 71,4%), gefolgt von *E. cloacae* (14,6%), *K. pneumoniae* (12,4%) und *P. aeruginosa* (11,4%). Eine weitere Untersuchung von Harnwegsinfektionen in Kenia [71] wies *E. coli* (30%), *K. pneumoniae* (18%), *Enterococcus* spp. (18%) und *Enterobacter* (9%) auf. Somit zeigte die untersuchte Stammkollektion ein ähnliches Gram-negatives Erregerspektrum wie andere Studien aus Ostafrika.

2. Phänotypisches Resistenzmuster

2.1. Vergleich der Hemmhofdurchmesser-Verteilung der *E. coli* Isolate unserer Stammkollektion mit den Wildtyp-Werten von EUCAST

Durch EUCAST wurden aktuelle Plattendiffusionstestwerte von Tetrazyklin zu Wildtyp *E. coli* veröffentlicht.

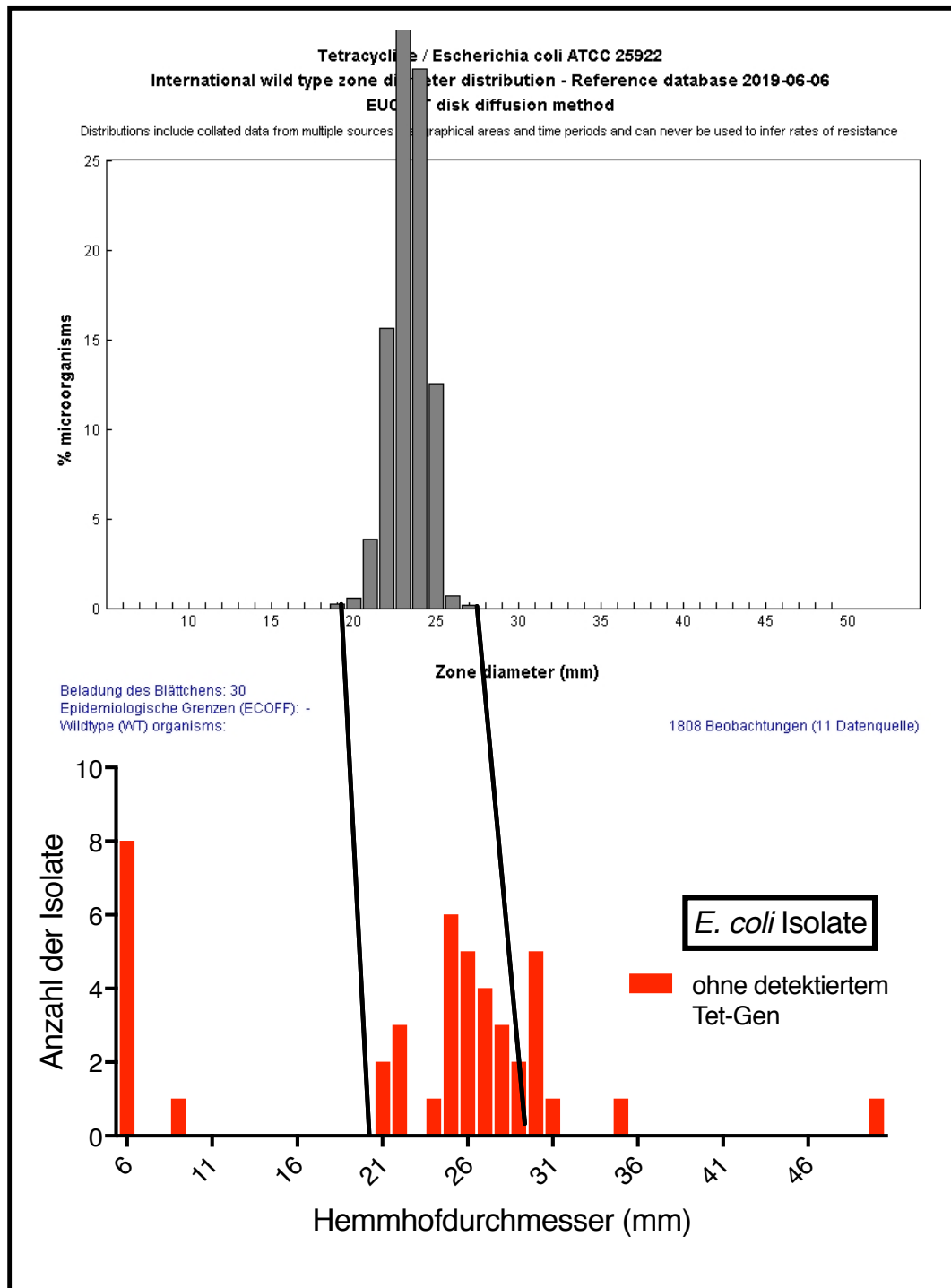


Abbildung 30: Vergleich der Verteilung der Hemmhofdurchmesser von *E. coli* Wildtyp nach EUCAST und denjenigen *E.coli* Isolaten unserer Stammkollektion, in denen kein untersuchtes Tetrazyklin-Resistenzgen nachgewiesen wurde

Vergleicht man die Verteilung der Hemmhofdurchmesser des Wildtyps mit denjenigen *E. coli* Isolaten der Stammkollektion, in denen keines der untersuchten Tetrazyklin-Resistenzgene detektiert wurde, so sind die Verteilungen ähnlich. Die Abweichungen ergeben sich vermutlich durch die geringe Anzahl (n=43) der *E. coli* Isolate unserer Stammkollektion, in denen kein

gesuchtes tet-Gen nachgewiesen wurde. 79% dieser Isolate haben Hemmhofdurchmesser >15mm und gelten dadurch auch nach den CLSI Grenzwerten als sensibel. Die übrigen 21% der Isolate mit Hemmhofdurchmessern von 6 bzw. 9mm besitzen einen Resistenzmechanismus, der durch unsere Studie nicht erfasst wurde. Dabei könnte es sich beispielsweise um ein nicht untersuchtes Tetrazyklin-Resistenzgen handeln. Die annähernde Deckungsgleichheit der beiden Kurven in Abbildung 30 kann dazu dienen, unsere durchgeführte Antibiotikaresistenzmessung der *E. coli* Isolate für Tetrazyklin zu bestätigen. Für alle anderen Organismen dieser Untersuchung existieren von EUCAST keine Grenzwerte für den Plattendiffusionstest.

2.2. Intrinsische Resistenz gegen Tetrazyklin lässt sich durch phänotypische (labordiagnostische) Untersuchungen nicht belegen

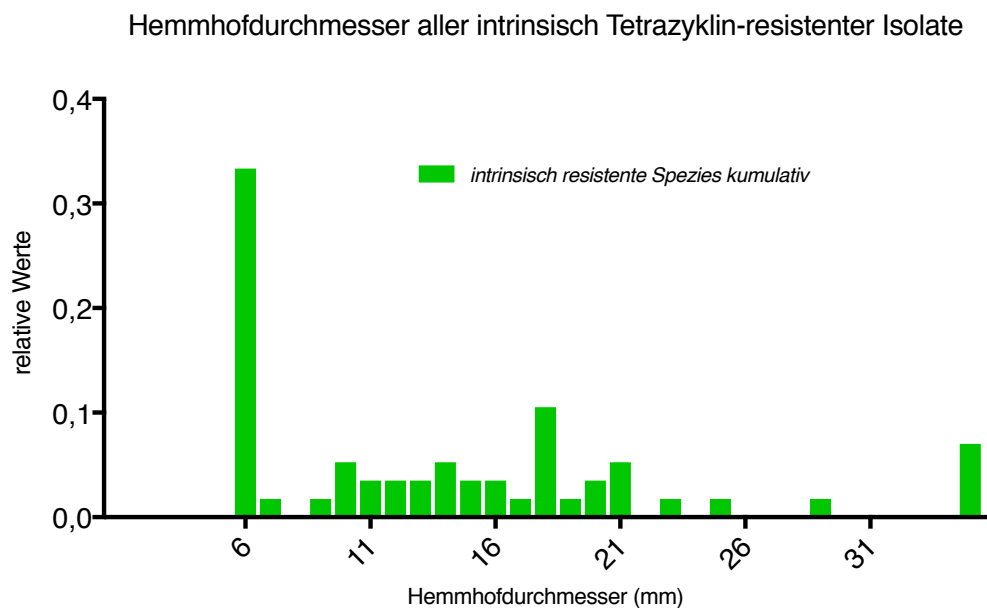


Abbildung 31: Hemmhofdurchmesser intrinsisch resistenter Organismen

Die von EUCAST als intrinsisch resistent beschriebenen Organismen weisen im Plattendiffusionstest mit Tetrazyklin eine weite Streuung der Hemmhofdurchmesser auf (siehe Abbildung 31). Diese reichen in unserer Arbeit von 6mm bis über 30mm. Etwa 45,6% dieser Organismen zeigten einen Hemmhofdurchmesser <11mm und sind damit nach CLSI als resistent zu bezeichnen. 38,7% hatten einen Durchmesser von >15mm und gelten somit nach CLSI als sensibel.

Gram-negative Erreger, die gegenüber Tetrazyklin resistent sind besitzen häufig eine Kreuzresistenz gegen Minozyklin und Doxyzyklin, nicht jedoch gegenüber Tigezyklin, was an der Spezifität der Resistenz vermittelnden Export-Pumpen liegt. Die Substratpräferenz klassischer Tetrazyklin Effluxpumpen zeigte sich bei Grossman et. al in folgender absteigender Reihenfolge: Tetrazyklin > Minozyklin, Doxyzyklin > Tigezyklin, Eravazyklin [72]. Tigezyklin wird von den klassischen Resistenzmechanismen gegen Tetrazyklin (z.B. tet(A) Efflux Pumpe oder tet(M) „ribosomal protection protein“) nicht erfasst. Vielmehr beruht die Tigezyklin Resistenz bei *Enterobacterales* hauptsächlich auf Pumpen der RND Familie, durch übermäßige Exprimierung von MexXY-OprD und AcrAB [73]. Intrinsische Resistenz beruht auf einer gesteigerten Exprimierung von intrinsischen Efflux-Pumpen wie AcrAB (aus der RND Familie) [74]. Dabei fällt auf, dass innerhalb derselben Stammkollektion wesentlich mehr Bakterienarten gegenüber Tetrazyklin intrinsisch resistent sind als gegenüber Tigezyklin, was wiederum an der Substratpräferenz der Pumpen liegen mag.

2.3. Problematik der Einteilung in sensibel, intermediär und resistent anhand der EUCAST und CLSI Richtlinien

Die Resistenz der Bakterienstämme wurde für Tetrazyklin mit dem Agardiffusionstest und für Tigezyklin anhand der minimalen Hemmkonzentration bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich die Tetrazyklinresistenz behandelt, jedoch wurden für Tetrazyklin keine Werte (Größe der Hemmhofdurchmesser) für die untersuchten Bakterienstämme von EUCAST veröffentlicht, die eine einfache, klinisch relevante Einteilung in sensibel, intermediär bzw. resistent zuließen.

In den CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) Richtlinien zur Resistenztestung existieren solche Breakpoints seit 1980. Sie wurden 2007 das letzte Mal anhand einer Stammkollektion von 504 Stämmen für die große Gruppe der *Enterobacterales* überarbeitet [75]. Die Ergebnisse dieser Studie wurden im CLSI Dokument (M100-S17) veröffentlicht: Tetrazyklin ($S \geq 15\text{mm}/R \leq 11\text{mm}$), Doxyzyklin ($S \geq 14\text{mm}/R \leq 10\text{mm}$) und Minozyklin ($S \geq 16\text{mm}/R \leq 12\text{mm}$). Die gleichen Grenzwerte gelten nach diesen Angaben auch für *A. baumannii*. Keine Tetrazyklin-spezifischen Grenzwerte existieren für *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, und andere „Non-Enterobacterales“, in dieser Studie *A. faecalis* und *A. haemolyticus*.

Eine Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen Hemmhofdurchmessern und minimaler Hemmkonzentration von Tetrazyklin und Doxyzyklin an 189 *S. pneumoniae* Isolaten und kam

zu dem Schluss, dass für beide Substanzen zwar verschiedene MICs anzuwenden sind, die Hemmhofdurchmesser aber dieselben sind [76]. Tetrazyklin wurde in den EUCAST Richtlinien nicht näher untersucht, vermutlich weil in Europa bessere Behandlungsalternativen zur Therapie der betreffenden Keime zur Verfügung stehen. Die EUCAST Richtlinien beruhen auf ECOFF-Werten (*epidemiological MIC cut-offs*) und pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften der Substanzen und sollen im Endeffekt dem behandelnden Arzt eine Empfehlung geben, ob die getestete Substanz gegen den betreffenden Krankheitserreger klinisch sinnvoll zu verwenden ist. Sie sind evidenzbasiert. Bei den CLSI Richtlinien werden solche klinischen Angaben oft außer Acht gelassen, sie beruhen auf der gemessenen MIC-Verteilung, pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften und den Resistenzmechanismen. Außerdem ist die Erhebung der Grenzwerte bei EUCAST wesentlich transparenter als bei CLSI. Die Grenzwerte lassen somit also eine Einteilung in resistent oder sensibel zu, jedoch könnte der klinische Erfolg der Therapie schlechter abzuschätzen sein. Dieser ist allerdings in der vorliegenden Arbeit unerheblich. Bei der Festlegung der Grenzwerte wird die Hemmung des Wachstums durch antimikrobielle Substanzen *in vitro* gemessen.

Eine zuverlässige Information darüber, ob Tetrazyklin gegenüber den getesteten Krankheitserregern Wirksamkeit besitzt, ist für gut entwickelte und finanzierte Gesundheitssysteme momentan irrelevant, da modernere alternative Präparate zur Verfügung stehen (bessere Wirksamkeit bei geringeren Nebenwirkungen). Für andere Regionen jedoch – z.B. Äthiopien, woher die Keime dieser Studie stammen – ist Tetrazyklin aufgrund geringer Kosten und theoretisch breitem Wirkungsspektrum (Einschränkungen durch Resistenzentwicklung) nach wie vor eine wichtige Substanz. Da Tetrazyklin außerdem in der Antibiotika-Resistenzmessung als Testsubstanz für andere Substanzen der Klasse der Tetrazykline verwendet wird, sind Kenntnisse über die Resistenzlage durchaus relevant.

Wenn man nun die nicht-intrinsisch resistenten Spezies anhand der von CLSI veröffentlichten Grenzwerte in sensibel, intermediär und resistent einteilt, zeigt sich folgendes Ergebnis in Tabelle 26.

Tabelle 26: Einteilung der nicht-intrinsisch resistenten Spezies in S, I, R anhand CLSI. Für die wenigen durchgestrichenen Organismen (*A. faecalis* und *A. haemolyticus*) bestehen bei CLSI keine Tetrazyklin-spezifischen Grenzwerte, eine Einteilung der gesamten Stammkollektion in sensibel bzw. resistent ist daher nicht möglich.

	n	S (%)	S	I (%)	I	R (%)	R
nicht-intrinsich resistent	191						
<i>E. coli</i>	110	54,5	60	0	-	45,5	50
<i>K. pneumoniae</i>	35	25,7	9	0	-	74,3	26
<i>E. cloacae</i>	33	45,5	15	0	-	54,5	18
<i>A. faecalis</i>	5	-	-	-	-	-	-
<i>K. oxyltoca</i>	3		2		-		1
<i>E. asburiae</i>	3		3		-		-
<i>E. hermanii</i>	1		1		-		-
<i>A. haemolyticus</i>	1	-	-	-	-	-	-

Phänotypisch resistent wären demnach 45,5% der *E. coli* Isolate, 74,3% der *K. pneumoniae* Isolate und 54,5% der *E. cloacae* Isolate.

Eine Einteilung der von EUCAST als intrinsisch resistent beschriebenen Organismen anhand der CLSI Grenzwerte ist nicht zielführend, da die Messergebnisse in dieser Gruppe keine Aussage über den klinischen Erfolg einer Tetrazyklintherapie zulassen. Intrinsisch resistente Organismen können in der Messung durchaus einen großen Hemmhof aufweisen und dadurch labordiagnostisch (phänotypisch) sensibel erscheinen. Durch sie verursachte Infektionen sind im klinischen Kontext jedoch nicht evidenzbasiert mit Tetrazyklin zu therapieren.

2.4. Messungen der Tetrazyklinresistenz an vergleichbaren Erregerkollektiven

Eine indische Untersuchung [77] Gram-negativer Organismen zeigte hohe Resistenzraten gegen Tetrazyklin: *E. coli* 72,4%, *Klebsiella* spp. 36,2%, *Enterobacter* spp. 46,2%, *P. aeruginosa* 85,5%, *A. baumannii* 40,9%. Eine andere Studie [78] untersuchte 11327 *Enterobacterales* und stellte eine Tetrazyklinresistenzrate von 32,8% fest. Unter den Vorbehalten, dass die Resistenz gegenüber Tetrazyklin in den allermeisten Erhebungen mittels der MHK (und nicht anhand der Plattendiffusionsmethode) gemessen wird, und dass die CLSI Grenzwerte auf unsere Messergebnisse sinnvoll anzuwenden sind, kann bei unserer Stammkollektion von einer recht hohen Rate der Tetrazyklinresistenz ausgegangen werden.

2.5. Übereinstimmung der Einteilung nach CLSI in sensibel, intermediär und resistent mit der EUCAST-Angabe über intrinsische Resistenz

Laut EUCAST sind einige Spezies intrinsisch resistent gegenüber Tetrazyklin. In der untersuchten Stammkollektion werden 57 (neun verschiedene Spezies) von 248 Stämmen als intrinsisch resistent klassifiziert. Der Unterschied zwischen intrinsisch resistenten und nicht-intrinsisch resistenten Spezies ließ sich anhand unserer Messergebnisse jedoch *in vitro* nicht zweifelsfrei demonstrieren. So wiesen die nicht-intrinsisch resistenten Keime durchschnittlich kleinere Hemmhöfe auf als die intrinsisch resistenten ($\leq 11\text{mm}$: 51,8 vs. 45,6%). Die intrinsische Tetrazyklinresistenz beruht groÙtenteils auf intrinsisch exprimierten Multi-Efflux-Pumpen der RND Familie, hauptsächlich AcrAB, welche unabhängig von Tetrazyklin-Resistenzgenen exprimiert werden [30, 72].

3. Genotypen

Es gibt zahlreiche Studien, welche das Vorkommen und die Verteilung der Tetrazyklin-Resistenzgene untersucht haben. Diese wurden regelmäßig in einer Datenbank zusammengefasst, welche somit einen aktuellen Überblick liefert. Ausgehend davon wurden 21 Tetrazyklin-Resistenzgene ausgewählt, auf deren Vorhandensein die Stammkollektion untersucht wurde. Es wurden 9 verschiedene Tet-Allele (A, B, C, D, G, H, Y, 39, 41) detektiert. Alle dieser Allele kodieren für Effluxpumpen. Einige Spezies wiesen tet-Gene auf, welche bis dato in den betreffenden Spezies nicht beschrieben worden sind. Erstmals detektiert wurden folgende tet-Gene in: *A. faecalis* (B, G), *E. coli* (H, 41), *M. morgani* (B, H), *P. stuartii* (A, D) und *S. maltophilia* (B, D). Dies mag ein Hinweis darauf sein, dass Tetrazyklin-Resistenzgene rasch zwischen verschiedenen Spezies ausgetauscht und übertragen werden können [28].

Häufig wurden die Tetrazyklin-Resistenzgene in Kombinationen aus mehreren tet-Genen nachgewiesen. Ein Drittel (34,6%) aller untersuchten Organismen (n=248) trugen ein einzelnes tet-Gen, 13,7% trugen zwei, 3,2% drei und ein Isolat (0,4%) eine Kombination aus vier tet-Genen.

Tuckman et al. untersuchten das Vorhandensein der tet (A, B, C, D, E, G, K, L, M, Y) Gene an 488 Tetrazyklin-resistenten *E. coli* Isolaten aus verschiedenen Ländern [79]. Dabei wurde bei 93% der Isolate mindestens ein tet-Gen nachgewiesen (am häufigsten A (26%), B (32%), C (1%), D (3%) und E (0,2%)), bei 7% der resistenten Keime kein tet-Gen. 30,6% trugen Kombinationen aus 2 tet-Genen, 2,2% aus 3 und 0,2% (ein Isolat) aus 4 tet-Genen. In dieser

Studie wurden die Bakterien vor dem Screening anhand der phänotypischen Tetrazyklinresistenz vorsortiert. Somit ist zu erwarten, dass der Anteil der tet-Gen-tragenden Keime höher ist als in unserer Stammkollektion, da wir alle Keime unabhängig der Resistenz auf das Vorhandensein der Gene untersucht haben. Wahrscheinlich wegen dieser Vorauswahl war bei unseren Proben der Anteil der Isolate ohne nachgewiesenes tet-Gen deutlich höher (39,1% der von uns untersuchten *E. coli* Isolate trugen kein betreffendes Tetrazyklin-Resistenzgen). Von den 110 untersuchten *E. coli* Isolaten wiesen 50 einen Hemmhofdurchmesser <11mm auf und gelten somit nach CLSI als resistent. Von diesen resistenten Organismen trugen 82% mindestens eines der untersuchten Tetrazyklin-Resistenzgene, die übrigen 19% keines.

Das Vorkommen von Kombinationen ist in unserer Stammkollektion ähnlich hoch, allerdings wurden in dieser Studie andere tet-Gene nachgewiesen (hier in *E. coli*: A, B, C, H, Y, 41 vs. Tuckman: A, B, C, E, M) [79]. Eine andere Studie aus dem Oman zeigte 4-fach Kombinationen aus (A+B+C+32) und (A+B+M+32) [80].

4. Genotyp-Phänotyp Vergleich bei *E. coli*, *K. pneumoniae* und *E. cloacae*

Die Korrelation zwischen Hemmhofdurchmesser und Phänotyp ist bei unserer Stammkollektion nachweisbar, jedoch nicht vollständig kongruent. Es wäre zu erwarten, dass diejenigen Keime mit kleinen Hemmhöfen (i.e. mit Resistenz gegenüber Tetrazyklin) über entsprechende Resistenzgene verfügen. Diesbezüglich wurden die 3 Gruppen der nicht-intrinsisch resistenten Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae* und *E. cloacae* ausgewertet. Bei 28,4% der resistenten Isolate (nach CLSI Hemmhofdurchmesser <11mm) konnte kein Tetrazyklin-Resistenzgen nachgewiesen werden. Das könnte einerseits daran liegen, dass tet-Gene vorliegen, die in unserem Screening nicht einbezogen waren, oder aber auch an ganz anderen Genen, die für (Multi-)resistenz kodieren. Im Gegensatz dazu wiesen 39,7% der Isolate trotz Vorhandensein mindestens eines tet-Gens Hemmhöfe >15mm auf und gelten damit nach den CLSI Richtlinien als sensibel gegenüber Tetrazyklin. Bei diesen Isolaten handelt es sich nach aller Wahrscheinlichkeit um Träger dysfunktionaler tet-Gene, die unter Umständen erst bei Vorhandensein eines gewissen Selektionsdruckes in nachfolgenden Generationen der Isolate reaktiviert und wirksam würden, oder primär nicht funktionell oder nicht induzierbar sind.

Die Frage, ob das Tragen eines gewissen Gens eine Resistenz sicherer produziert als ein anderes kann nicht eindeutig beantwortet werden.

Tabelle 27: Detektierte tet-Gene in *E. coli* in Bezug auf den Hemmhofdurchmesser

tet-Gen	HH-Durchmesser <15mm	HH-Durchmesser >15mm	rel. resistent von tet-Gen positiven Organismen
A	18	5	78,3%
B	26	8	76,4%
C	5	6	45,5%
H	8	3	72,7%
Y	4	14	22,2%
41	15	3	83,3%

In unserer Studie scheinen besonders jene *E. coli* resistent, welche die Tetrazyklin-Resistenzgene tet(A, B, H, 41) alleine oder in Kombination tragen. Träger der Gene tet(C, H) waren nur zu 45,5 bzw. 22,2% auch phänotypisch (nach CLSI) resistent.

Bei anderen Studien korreliert die phänotypische Tetrazyklinresistenz besser mit den detektierten Genen, weil eine Vorauswahl der resistenten Organismen getroffen worden ist. Das bedeutet, es wurden zuerst die resistenten Keime ausgewählt und danach die entsprechenden Gene nachgewiesen, während wir die Keime unabhängig ihrer phänotypischen Resistenz testeten.

F Zusammenfassung

Bei Tetrazyklin handelte es sich um einen der ersten Vertreter der Breitspektrum-Antibiotika. Unter anderem durch unverantwortlichen Einsatz nicht nur in der Medizin, sondern v.a. als Mastmittel in der Tierzucht verbreiteten sich Resistenzen rasend schnell und schon wenige Jahrzehnte später war das Medikament in der Behandlung von Infektionskrankheiten von Menschen nicht mehr sinnvoll einzusetzen. Die reduzierte Einsatzfähigkeit liegt einerseits an der Verfügbarkeit von nebenwirkungsärmeren Alternativen, aber auch die Resistenz vieler Erreger schränkt den Nutzen des Tetrazyklins ein. Es ist damit ein Beispiel für die schnelle Verbreitung von Resistenzen unter verschiedenen bakteriellen Spezies und die weltweite Verbreitung der Resistenzen.

Äthiopien gilt als eines der ärmsten Länder der Welt. Sie sind auf günstige Behandlungsoptionen von Infektionskrankheiten angewiesen. Somit kommt Tetrazyklin dort nach wie vor zum Einsatz.

Die LMU München betreibt eine Zusammenarbeit mit dem Universitätskrankenhaus Jimma in Äthiopien. Mitarbeiter der Münchener Arbeitsgruppe sammelten dort gemeinsam mit einheimischen Kollegen über einen gewissen Zeitraum Proben von ganz unterschiedlichen Infektionskrankheiten und verbrachten sie nach München zur eingehenden bakteriologischen und molekularbiologischen Untersuchung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Kollektion von Bakterienstämmen anhand des Plattendiffusionstests auf ihre phänotypische Resistenz gegenüber Tetrazyklin untersucht. Anschließend wurde über die Gründe der Tetrazyklinresistenz recherchiert und anhand dieser Suche versucht, die Grundlagen der Resistenz an der Stammkollektion aus Ost-Afrika aufzudecken. Die PCR wurde als Untersuchungsmethode ausgewählt, da sich mit ihr Resistenzgene nachweisen lassen. Die Stammkollektion wurde mit Hilfe des hier entwickelten PCR Assays auf das Vorhandensein verschiedener für die Tetrazyklinresistenz verantwortlich gemachter Gene untersucht und somit der Genotyp der Stammkollektion bestimmt.

Anschließend wurde versucht, den Genotyp (d.h. das Vorhandensein bestimmter Tetrazyklin-Resistenzgene) mit dem Phänotyp (d.h. die Größe der Hemmhofdurchmesser beim Plattendiffusionstest mit Tetrazyklin) zu korrelieren.

Diese Arbeit gibt somit einen Überblick über die vorkommenden Tetrazyklin-Resistenzgene und die Resistenzlage Gram-negativer Krankheitserreger gegenüber Tetrazyklin in Ost-Afrika.

G Abkürzungsverzeichnis

AST	Antibiotikasensitivitätsmessung
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ECA	Enterobacterales common antigen
ECOFF	epidemiologischer Cutt-Off-Wert
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung Time-of-flight
MIC	minimal inhibitory concentration
NCBI	National Center for Biotechnology Information
omp	outer membrane protein
RPP	ribosomal protection protein
tet-Gen	Tetrazyklin-Resistenzgen

H Literatur

Bibliographie

1. Hof, H., R. Dörries, and G. Geginat, *Medizinische Mikrobiologie*. 2014, Stuttgart: Thieme. 752 S. :.
2. Russo, T., *Enterobacteriaceae*. infectiousdiseaseadvisor.
3. onmeda. *Entdeckung der Krankheitserreger*. 2016; Available from: https://www.onmeda.de/krankheitserreger/entdeckung_krankheitserreger.html.
4. Suerbaum, S., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2012, Berlin [u.a.]: Springer. XXV, 932 S. :.
5. Liu, Y.Y., et al., *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(2): p. 161-8.
6. Duggar, B.M., *Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics*. *Ann N Y Acad Sci*, 1948. **51**(Art. 2): p. 177-81.
7. Conover, L., et al., *Terramycin. Xi. Tetracycline*. *Journal of the American Chemical Society*, 1953. **75**: p. 4622-4623.
8. Stephens, C.R., et al., *TERRAMYCIN. VIII. STRUCTURE OF AUREOMYCIN AND TERRAMYCIN*. *Journal of the American Chemical Society*, 1952. **74**(19): p. 4976-4977.
9. Stephens, C.R., et al., *6-Deoxytetracyclines. IV.1,2 Preparation, C-6 Stereochemistry, and Reactions*. *Journal of the American Chemical Society*, 1963. **85**(17): p. 2643-2652.
10. Boothe, J.H., et al., *TOTAL SYNTHESIS OF TETRACYCLINES. I. (\pm)-DEDIMETHYLAMINO-12 α -DEOXY-6-DEMETHYLANHYDROCHLOROTETRACYCLINE*. *Journal of the American Chemical Society*, 1959. **81**(4): p. 1006-1007.
11. Petersen, P.J., et al., *In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycylicycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936)*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(4): p. 738-44.
12. Draper, M.P., et al., *Mechanism of action of the novel aminomethylcycline antibiotic omadacycline*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(3): p. 1279-83.
13. Grossman, T.H., et al., *Target- and resistance-based mechanistic studies with TP-434, a novel fluorocycline antibiotic*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(5): p. 2559-64.
14. Johnson, R. and J. Adams, *The ecology and evolution of tetracycline resistance*. *Trends Ecol Evol*, 1992. **7**(9): p. 295-9.
15. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial*

- resistance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 232-60 ; second page, table of contents.
16. Schnappinger, D. and W. Hillen, *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*. Arch Microbiol, 1996. **165**(6): p. 359-69.
 17. Thanassi, D.G., G.S. Suh, and H. Nikaido, *Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1995. **177**(4): p. 998-1007.
 18. Chopra, I., P.M. Hawkey, and M. Hinton, *Tetracyclines, molecular and clinical aspects*. J Antimicrob Chemother, 1992. **29**(3): p. 245-77.
 19. Nikaido, H. and D.G. Thanassi, *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(7): p. 1393-9.
 20. Yamaguchi, A., et al., *Delta pH-dependent accumulation of tetracycline in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(1): p. 53-6.
 21. Nguyen, F., et al., *Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms*. Biol Chem, 2014. **395**(5): p. 559-75.
 22. Brodersen, D.E., et al., *The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit*. Cell, 2000. **103**(7): p. 1143-54.
 23. Bakhtiar, M. and S. Selwyn, *Antibacterial activity of a new thiatetracycline*. J Antimicrob Chemother, 1983. **11**(3): p. 291.
 24. Rasmussen, B., et al., *Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(11): p. 2306-11.
 25. Dahl, E.L., et al., *Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 3124-31.
 26. Haenni, M. and P. Moreillon, *Mutations in penicillin-binding protein (PBP) genes and in non-PBP genes during selection of penicillin-resistant Streptococcus gordonii*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(12): p. 4053-61.
 27. Fuessle, R., *Prinzipien der Antibiotikatherapie*.
 28. Roberts, M.C., *Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants*. Ciba Found Symp, 1997. **207**: p. 206-18; discussion 219-22.
 29. Speer, B.S., N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers, *Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance*. Clin Microbiol Rev, 1992. **5**(4): p. 387-99.
 30. Li, X.Z., D.M. Livermore, and H. Nikaido, *Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of Pseudomonas aeruginosa: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(8): p. 1732-41.

31. Mendez, B., C. Tachibana, and S.B. Levy, *Heterogeneity of tetracycline resistance determinants*. Plasmid, 1980. **3**(2): p. 99-108.
32. Levy, S.B., et al., *Nomenclature for tetracycline resistance determinants*. Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(8): p. 1373-4.
33. Sloan, J., et al., *The Clostridium perfringens Tet P determinant comprises two overlapping genes: tetA(P), which mediates active tetracycline efflux, and tetB(P), which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants*. Mol Microbiol, 1994. **11**(2): p. 403-15.
34. Roberts, M.C., *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution*. FEMS Microbiol Rev, 1996. **19**(1): p. 1-24.
35. Levy, S.B., et al., *Nomenclature for new tetracycline resistance determinants*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(6): p. 1523-4.
36. Munita, J.M. and C.A. Arias, *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(2).
37. Guillaume, G., et al., *Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited*. Microb Drug Resist, 2004. **10**(1): p. 11-26.
38. Paulsen, I.T., M.H. Brown, and R.A. Skurray, *Proton-dependent multidrug efflux systems*. Microbiol Rev, 1996. **60**(4): p. 575-608.
39. Kimura, T., et al., *Membrane topology of the transposon 10-encoded metal-tetracycline/H⁺ antiporter as studied by site-directed chemical labeling*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 580-5.
40. Yamaguchi, A., et al., *Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of Escherichia coli encoded by a transposon, Tn10. The role of the conserved dipeptide, Ser65-Asp66, in tetracycline transport*. J Biol Chem, 1990. **265**(26): p. 15525-30.
41. Kaneko, M., A. Yamaguchi, and T. Sawai, *Energetics of tetracycline efflux system encoded by Tn10 in Escherichia coli*. FEBS Lett, 1985. **193**(2): p. 194-8.
42. Rubin, R.A. and S.B. Levy, *Tet protein domains interact productively to mediate tetracycline resistance when present on separate polypeptides*. J Bacteriol, 1991. **173**(14): p. 4503-9.
43. Yamaguchi, A., et al., *Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of Escherichia coli encoded by a transposon Tn10. Histidine 257 plays an essential role in H⁺ translocation*. J Biol Chem, 1991. **266**(10): p. 6045-51.
44. Tauch, A., et al., *TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems*. Plasmid, 2000. **44**(3): p. 285-91.
45. Pao, S.S., I.T. Paulsen, and M.H. Saier, Jr., *Major facilitator superfamily*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 1-34.

46. Connell, S.R., et al., *Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(12): p. 3675-81.
47. Sanchez-Pescador, R., et al., *Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(3): p. 1218.
48. Burdett, V., *Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent*. *J Bacteriol*, 1996. **178**(11): p. 3246-51.
49. Forsberg, K.J., et al., *The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes*. *Chem Biol*, 2015. **22**(7): p. 888-97.
50. Ross, J.I., et al., *16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(7): p. 1702-5.
51. Dailidienė, D., et al., *Emergence of tetracycline resistance in Helicobacter pylori: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(12): p. 3940-6.
52. Entwicklung, B.f.w.Z.u. Äthiopien. 2019 [cited 2019 8. April]; information about Ethiopia comparison to germany]. Available from: http://www.bmz.de/de/laender_regionen/subsahara/aethiopien/index.jsp.
53. Ayukekbong, J.A., M. Ntemgwa, and A.N. Atabe, *The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies*. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2017. **6**: p. 47.
54. Gashaw, M., et al., *Emergence of high drug resistant bacterial isolates from patients with health care associated infections at Jimma University medical center: a cross sectional study*. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018. **7**: p. 138.
55. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
56. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 6th ed. 2009, Heidelberg: Spektrum. 316.
57. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
58. Mullis, K.B. and F.A. Faloon, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
59. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
60. Zeynudin, A., et al., *Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates*

- of gram-negative bacilli in Jimma, Ethiopia*. BMC Infect Dis, 2018. **18**(1): p. 524.
61. Wieser, A., et al., *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review)*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **93**(3): p. 965-74.
 62. Fenselau, C. and P.A. Demirev, *Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2001. **20**(4): p. 157-71.
 63. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
 64. Gonzales, M.F., et al., *Rapid protocol for preparation of electrocompetent Escherichia coli and Vibrio cholerae*. J Vis Exp, 2013(80).
 65. Miranda, C.D., et al., *Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(3): p. 883-8.
 66. Ng, L.K., et al., *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes*. Mol Cell Probes, 2001. **15**(4): p. 209-15.
 67. Aminov, R.I., et al., *Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(4): p. 1786-93.
 68. Agerso, Y. and L. Guardabassi, *Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in Acinetobacter spp. of environmental and clinical origin*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(4): p. 566-9.
 69. Manyahi, J., et al., *Detection of CTX-M-15 beta-lactamases in Enterobacteriaceae causing hospital- and community-acquired urinary tract infections as early as 2004, in Dar es Salaam, Tanzania*. BMC Infect Dis, 2017. **17**(1): p. 282.
 70. Kazimoto, T., et al., *Causative agents and antimicrobial resistance patterns of human skin and soft tissue infections in Bagamoyo, Tanzania*. Acta Trop, 2018. **186**: p. 102-106.
 71. Magale, H.I., et al., *Antibiotic Susceptibility of Organisms Causing Urinary Tract Infection in Patients Presenting at Kenyatta National Hospital, Nairobi*. East Afr Med J, 2015. **92**(7): p. 333-337.
 72. Grossman, T.H., *Tetracycline Antibiotics and Resistance*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(4): p. a025387.
 73. Pournaras, S., et al., *Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance*. Int J Antimicrob Agents, 2016. **48**(1): p. 11-18.
 74. Li, X.Z., P. Plesiat, and H. Nikaido, *The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria*. Clin Microbiol Rev, 2015. **28**(2): p. 337-418.

75. Sader, H.S., et al., *Reevaluation of Clinical and Laboratory Standards Institute disk diffusion breakpoints for tetracyclines for testing Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(5): p. 1640-3.
76. Dallas, S.D., et al., *Development of doxycycline MIC and disk diffusion interpretive breakpoints and revision of tetracycline breakpoints for Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(6): p. 1798-802.
77. Hariharan, P., et al., *Antibiotic susceptibility pattern of Enterobacteriaceae and non-fermenter Gram-negative clinical isolates of microbial resource orchid*. J Nat Sci Biol Med, 2015. **6**(1): p. 198-201.
78. Fritsche, T.R., et al., *Activity of tigecycline tested against a global collection of Enterobacteriaceae, including tetracycline-resistant isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **52**(3): p. 209-13.
79. Tuckman, M., et al., *Occurrence of tetracycline resistance genes among Escherichia coli isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(9): p. 3205-11.
80. Al-Bahry, S., *Diversity of Tetracycline Resistant Genes in Escherichia coli from Human and Environmental Sources*. The open biotechnology journal, 2016. **10**(Suppl-2, M2): p. 289-300.

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Besonderheiten des Aufbaus von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.....	2
Abbildung 2: Strukturformel des Tetrazyklins, gezeichnet mit http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx	8
Abbildung 3: Darstellung des Angriffspunkts von Tetrazyklin an der 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. aa-RNA konkurriert mit Tetrazyklin um die Bindungsstelle an der A-Stelle.....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Effluxpumpe. Sie wirkt als H ⁺ :Drug-Antiporter und transportiert Tetrazyklin-Moleküle im Austausch mit Protonen aus der Zelle heraus. Es handelt sich um eine Form des aktiven Transports, die Energie wird durch einen Protonen-Gradienten geliefert.....	17
Abbildung 5: Lage von Äthiopien (Quelle: open street map)	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Hybridgens.....	40
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der 16S PCR. Jede leuchtende Bande enthält demnach DNA.	42
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Richtungskontrolle von Genen innerhalb eines Plasmides. Nach Klonierung kann das Gen in zwei Richtungen eingebaut sein. Ist das Gen in Vorwärtsrichtung eingebaut (grün), so entsteht eine entsprechende Bande bei M13.rev + Tet.rev, nicht aber bei M13.rev + Tet.for. Ist das Gen in Rückwärtsrichtung eingebaut entsteht eine Bande bei M13.rev + Tet.for, nicht aber bei M13.rev + Tet.rev. Somit kann die Richtung des Gens eindeutig bestimmt werden. Tet.for + Tet.rev dient der Positivkontrolle.	43
Abbildung 9: Quellen der untersuchten Bakterienstämme	49
Abbildung 10: Bakterienarten innerhalb der Stammkollektion	49
Abbildung 11: Verteilung der intrinsischen Tetrazyklin- und Tigazyklinresistenz innerhalb der Stammkollektion. A: intrinsische Tetrazyklinresistenz. B: intrinsische Tigazyklinresistenz (Rational documents EUCAST Tetrazyklin 2009 und Tigazyklin 2006 jeweils Version 1.0) 51	
Abbildung 12: Durchschnittliche Hemmhofdurchmesser der gesamten Stammkollektion, der intrinsisch- und der nicht-intrinsisch resistenten Organismen mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin. Die Grenzwerte sind für alle untersuchten Spezies gleich. Der Bereich 12-14mm gilt als „intermediär“. Verwendet wurde das CLSI Dokument M100-S27 im Januar 2017.	52
Abbildung 13: Hemmhofdurchmesser der nicht-intrinsisch resistenten Organismen mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin.....	54
Abbildung 14: Hemmhofdurchmesser der E. coli mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin.....	55
Abbildung 15: Hemmhofdurchmesser der E. cloacae mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin	56
Abbildung 16: Hemmhofdurchmesser der K. pneumoniae mit eingezeichneten CLSI Grenzwerten für Tetrazyklin	57
Abbildung 17: Durchschnittliche Hemmhofdurchmesser der intrinsisch resistenten Isolate (kumulative Anzahl).....	58
Abbildung 18: Hemmhofdurchmesser der A. baumannii Isolate.....	59

Abbildung 19: Hemmhofdurchmesser der <i>P. aeruginosa</i> Isolate	59
Abbildung 20: Exemplarische Plasmidkarte: Auf dem ringförmig dargestellten Plasmid mit einer Gesamtlänge von 4805 Basenpaaren (bp) ist das ligierte Genfragment tet(A) mit einem roten Pfeil eingetragen. Außerdem findet sich die Schnittstelle, an welcher das Gen eingebaut worden ist (TOPO cloning site) und das Gen für die Ampicillin Resistenz.....	64
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der Geldokumentation des PCR Screenings, hier das Screening des 2014 gewonnenen Teils der Stammkollektion, getestet auf das Tetrazyklin-Resistenzgen tet(B)	65
Abbildung 22: Anteile der Stammkollektion mit und ohne detektierte Tetrazyklinresistenzgenen	66
Abbildung 23: Detektierte Genklassen in der gesamten Stammkollektion, bei den intrinsisch resistenten und den nicht-intrinsisch resistenten Organismen kumulativ	67
Abbildung 24: Detektierte tet-Gene in <i>E. coli</i>	69
Abbildung 25: Detektierte tet-Gene in <i>K. pneumoniae</i>	70
Abbildung 26: Detektierte Tet-Gene in <i>E. cloacae</i>	71
Abbildung 27: Detektierte tet-Gene in <i>A. baumannii</i>	72
Abbildung 28: Detektierte tet-Gene in <i>P. aeruginosa</i>	73
Abbildung 29: Korrelation des Genotyps mit der Größe des Hemmhofdurchmessers für nicht-intrinsisch resistente Erreger	76
Abbildung 30: Vergleich der Verteilung der Hemmhofdurchmesser von <i>E. coli</i> Wildtyp nach EUCAST und denjenigen <i>E.coli</i> Isolaten unserer Stammkollektion, in denen kein untersuchtes Tetrazyklin-Resistenzgen nachgewiesen wurde.....	78
Abbildung 31: Hemmhofdurchmesser intrinsisch resistenter Organismen	79

J Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vertreter der Enterobacterales in vorliegender Arbeit. Mögliche Infektionen ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Adaptiert übernommen von https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/infectious-diseases/enterobacteriaceae/ [2]	4
Tabelle 2: Häufige Infektionen Gram-negativer nicht-Enterobacterales in dieser Arbeit, ohne Anspruch auf Vollständigkeit	5
Tabelle 3: Vorhandensein verschiedener Tetrazyklin-Resistenzgene in den untersuchten Spezies. Adaptiert übernommen von Prof. Roberts (http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf)	16
Tabelle 4: Verwendete Geräte	24
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, Enzyme	25
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen	26
Tabelle 7: Verwendete Kits	26
Tabelle 8: Verwendete synthetische Oligonukleotide und Primer	27
Tabelle 9: Primer für Universal-PCR und sonstige Primer	28
Tabelle 10: Primer zur Herstellung der Hybridgene	28
Tabelle 11: Bakterienstämme	29
Tabelle 12: Plasmide	30
Tabelle 13: Verwendete Nährmedien und Zusatzlösungen	31
Tabelle 14: Verwendete Antibiotika	32
Tabelle 15: allgemeiner Reaktionsansatz der PCR	44
Tabelle 16: allgemeiner Ablauf der PCR; *abhängig von Primersequenz- und Länge; **abhängig von erwartetem Produkt (1 kb/min.)	45
Tabelle 17: Vorbeschriebene Gene bei den einzelnen Spezies	60
Tabelle 18: Primer PCR Assay	61
Tabelle 19: Reaktionsbedingungen PCR Assay	63
Tabelle 20: Häufigkeit und Verteilung der detektierten tet-Gene	67
Tabelle 21: Detektierte tet-Gene innerhalb verschiedener Spezies	68
Tabelle 22: Übersicht über nachgewiesene Tet-Resistenzgene/Kombinationen bei E. coli	70
Tabelle 23: Detektierte tet-Gene in intrinsisch resistenten Stämmen	72
Tabelle 24: Detektierte tet-Gene und Kombinationen in der Stammkollektion	74
Tabelle 25: Vorbeschriebene und neu detektierte tet-Gen-Spezies-Kombinationen	75
Tabelle 26: Einteilung der nicht-intrinsisch resistenten Spezies in S, I, R anhand CLSI. Für die wenigen durchgestrichenen Organismen (A. faecalis und A. haemolyticus) bestehen bei CLSI keine Tetrazyklin-spezifischen Grenzwerte, eine Einteilung der gesamten Stammkollektion in sensibel bzw. resistent ist daher nicht möglich.	82
Tabelle 27: Detektierte Tet-Gene in E. coli in Bezug auf den Hemmhofdurchmesser	85

K Danksagung

Mein tiefer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn PD Dr. med. Andreas Wieser. Mit außerordentlichem Engagement hat er mich persönlich in die Laborpraxis und die verschiedenen Versuche eingewiesen und mir stets alle Fragen und Unklarheiten ausführlich erklärt. Ich habe großen Respekt vor seiner Fachkenntnis und seinem Wissen gewonnen und bin froh, ein freundschaftliches Verhältnis zu ihm gefunden zu haben.

Ebenso herzlich danken möchte ich den Laborassistentinnen Gabi, Sarah und Birgit, ohne deren Hilfe ich bei so manchem Versuch alt ausgesehen hätte. Die freundliche Aufnahme ins Labor und die große Hilfsbereitschaft werde ich ihnen nicht vergessen.

Dem Max von Pettenkofer-Institut unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum danke ich für die Bereitstellung der Laborräume.

Herrn PD Dr. med. Michael Pritsch danke ich für die Vermittlung an Herrn PD Dr. med. Andreas Wieser. Für mich als Student einer ausländischen Hochschule wäre der Zugang zu einer Promotion vermutlich verwehrt geblieben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Roman und Christine haben mir zu dem verholfen, der ich heute bin. Ohne ihre Unterstützung wäre mein Werdegang ein anderer geworden. Dafür bin ich ihnen unendlich dankbar.

Meine beiden Geschwister Felix und Melanie sind mir sehr verbunden, dafür danke ich ihnen. Für ihren eigenen Weg wünsche ich ihnen alles Gute.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei allen, die mich immer motiviert haben, auch nach langer Zeit am Promotionsvorhaben festzuhalten, die sich so manches Leid immer wieder geduldig angehört haben. Stellvertretend bedanke ich mich bei meinen Freunden Jakob, Johanna und Fabian.

L Lebenslauf

Auf den Lebenslauf wurde in der elektronischen Version der Dissertationsarbeit verzichtet.

M Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Dr. medic Thomas Wolf Steinkirchner, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Determination der genetischen Grundlagen der Tetrazyklinresistenz an einer Stammkollektion multiresistenter Gram-negativer Organismen aus Äthiopien, Ost-Afrika“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ingolstadt, den 13.12.2021, gez. Thomas Wolf Steinkirchner

O Anhang

Plasmidmaps

