

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Evaluation von diagnostischen Nachweismethoden
der AmpC Betalaktamase
in *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Chaib geb. Grimm, Mirjam Carmen

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Peter

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Riethmüller

Tag der Disputation: 05.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.1.1 Nosokomiale Infektionen.....	1
1.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.3 Grundlagen der Antibiotikaresistenz	3
1.2 Problemstellung.....	5
1.3 Kenntnisstand und Grundlagen	5
1.3.1 Rolle von Betalaktamantibiotika für die Therapie von <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	5
1.3.2 Betalaktamasen in <i>P. aeruginosa</i>	6
1.3.2.1 ESBL	9
1.3.2.2 Carbapenemasen.....	9
1.3.2.3 AmpC	9
1.3.3 Chromosomal-kodierte Resistenzmechanismen	10
1.3.3.1 Äußeres Membranprotein OprD.....	10
1.3.3.2 Multidrug-Efflux Pumpen	10
1.3.4 Regulation und Expression der chromosomal kodierten AmpC- Betalaktamase	11
1.3.5 Klinische Relevanz der AmpC Überproduktion.....	12
1.4 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Bakterienisolate, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden	14
2.2 Antibiogramm.....	14
2.2.1 Benötigte Reagenzien.....	14

2.2.2	Benötigte Geräte	16
2.2.3	Durchführung	17
2.2.4	Kriterien der Beurteilung	18
2.3	Phänotypische Test für die Detektion von AmpC Betalaktamase mittels kombiniertem Disk Test.....	19
2.3.1	Benötigte Reagenzien:.....	19
2.3.2	Benötigte Geräte:.....	21
2.3.3	Durchführung:	21
2.3.4	Kriterien der Beurteilung:	23
2.4	Phänotypischer Test für Detektion von AmpC Betalaktamase anhand eines Synergietests	23
2.4.1	Benötigte Materialien:	24
2.4.2	Benötigte Geräte:.....	25
2.4.3	Durchführung:	25
2.4.4	Kriterien der Beurteilung:	26
2.5	E-Test	27
2.5.1	Benötigte Reagenzien:.....	28
2.5.2	Benötigte Geräte:.....	28
2.5.3	Durchführung:	29
2.5.4	Kriterien der Beurteilung:	29
2.6	Hydrolyse Assay:.....	29
2.6.1	Benötigte Reagenzien:.....	30
2.6.2	Benötigte Geräte	31
2.6.3	Durchführung:	32
2.6.4	Kriterien der Beurteilung:	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Bestimmung der Resistenzprofile der untersuchten Isolate	33
3.2	Auswertung des kombinierten Disk Test und Festlegung eines Goldstandards	34
3.3	Evaluierung des Nitrocephin basierten Hydrolyse Tests zum AmpC Nachweis	36

3.4	Induzierbarkeit der AmpC Betalaktamase	37
3.5	Untersuchung der Isolate bezüglich des Vorliegens einer Extended-spektrum AmpC Betalaktamase.....	39
3.6	Charakterisierung der Meropenem resistenten <i>P. aeruginosa</i> Stämme bezüglich des Vorhandenseins einer AmpC Betalaktamase	41
3.7	Charakterisierung der Metallo-Betalaktamase exprimierenden multiresistenten <i>P. aeruginosa</i> Isolate.....	43
3.8	Weitere Nachweismethoden von AmpC	44
4	Diskussion	45
4.1	Phänotypische Methoden zum Nachweis von AmpC.....	45
4.2	Bedeutung der AmpC Betalaktamase in den untersuchten klinischen <i>P. aeruginosa</i> Isolaten dieser Studie	47
4.2.1	Hoher Anteil von AmpC positiven Isolaten bei den untersuchten Stämmen	47
4.2.2	Induzierbarkeit von AmpC.....	48
4.2.3	Extended-Spektrum Cephalosporinasen	49
4.2.4	Nachweis von AmpC Betalaktamase in multiresistenten <i>P.aeruginosa</i> Stämmen	50
4.3	Klinische Relevanz der AmpC Betalaktamase	51
4.4	Fazit.....	52
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	56
7	Anhang.....	61
8	Erklärung zum Eigenanteil	85
9	Danksagung.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Schema der Antibiotikaplatzierung.....	22
Abb. 2.2:	Schema der Antibiotikaplättchenplatzierung	26
Abb. 2.3:	D-Phänomen. Deutlich gehemmter Hof zwischen CAZ und IMP	27
Diagr. 3.1:	Prozentuale Verteilung der Antibiotikaresistenzen der 130 untersuchten <i>P. aeruginosa</i> Isolate.....	33

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Anteil der wichtigsten Erreger von nosokomialen Infektionen pro 100 nosokomiale Infektionen in Deutschland über alle Stationen verteilt [6].	2
Tab. 1.2:	Modifiziertes Übersichtsschema zur Einteilung der wichtigsten Betalaktamasen [18].	8
Tab. 2.1:	Für das Antibiogramm verwendete Reagenzien	14
Tab. 2.2:	Für das Antibiogramm verwendete Geräte	16
Tab. 2.3:	EUCAST-Richtlinien zur Bewertung der Hemmhöfe [27] Angaben in mm	18
Tab. 2.4:	Richtlinie zur Bewertung der Colistinresistenzlage nach den Breakpoints der CLSI [28]. Angaben in mm	19
Tab. 2.5:	Für den kombinierten Disk Test verwendete Reagenzien	19
Tab. 2.6:	Für den kombinierten Disk Test verwendete Geräte.....	21
Tab. 2.7:	Für den Synergietest verwendete Materialien.....	24
Tab. 2.8:	Für den Synergietest verwendete Geräte	25
Tab. 2.9:	Für den E-Test verwendete Reagenzien	28
Tab. 2.10:	für den E-Test verwendete Geräte	28
Tab. 2.11:	Für den Hydrolyse Assay verwendete Reagenzien	30
Tab. 2.12:	Für den Hydrolyse Assay verwendete Geräte	31
Tab. 2.13:	Pipettierschema Beispielhaft:.....	32
Tab. 3.1:	Übersicht über die positiven Ergebnisse im kombinierten Disk Test unterteilt in Ceftazidim resistente und Ceftazidim sensible Isolate.	35
Tab. 3.2:	Übersicht über die Ergebnisse an Isolaten, die nur in einem, zwei oder allen drei kombinierten Disk Tests ein positives Ergebnis aufwiesen.....	35
Tab. 3.3:	Verteilung vom AmpC positiven und AmpC negativen Stämmen. Als Goldstandard wurden 2 von 3 positiven Ergebnissen im kombinierten Disk Test definiert.	36
Tab. 3.4:	Zusammenfassung der Ergebnisse des Nitrocephin Hydrolyse Tests zum Nachweis von AmpC	37

Tab. 3.5:	Zusammenfassung der Induzierbarkeit von AmpC durch Imipenem unterteilt nach Ceftazidim sensiblen und Ceftazidim resistenten Stämmen.	38
Tab. 3.6:	Zusammenfassung der Induzierbarkeit von AmpC durch Imipenem aufgeteilt in AmpC positive und AmpC negative Isolate.....	39
Tab. 3.7:	Zusammenfassung der Ergebnisse des kombinierten Disk Tests und Induktionstest mit Cefepim als Basis, aufgeteilt in Cefepim resistente und sensible Stämme.....	40
Tab. 3.8:	Zusammenfassung der Ergebnisse des kombinierten Disk Tests und Induktionstest mit Cefepim als Basis, aufgeteilt in AmpC positive und negative Stämme	40
Tab. 3.9:	Übersicht der kombinierten Disk Test und Induktionstest Ergebnisse mit Aztreonam in 56 Meropenem resistenten Stämmen.....	42
Tab. 3.10:	Übersicht über Meropenem resistente Stämme mit Metallo-Betalaktamasen.	43
Tab. 3.11:	Übersicht über IMP und VIM Typen der Metallo-Betalaktamasen	44
Tab. 4.1:	Resistenzphänotypen für den Nachweis von ESBL, AmpC-Betalaktamasen und Metallo-Betalaktamasen [14, 36].....	45
Tab. 7.1:	Übersicht über die Antibiotikaresistenz der untersuchten <i>P. aeruginosa</i> Stämme.	61
Tab. 7.2:	Übersicht über die Resultate des kombinierten Disk Test.	65
Tab. 7.3:	Positive Ergebnisse im Nitrocephin Hydrolyse Test.....	69
Tab. 7.4:	Negative Ergebnisse im Hydrolyse Nitrocephin Test.....	71
Tab. 7.5:	Übersicht über die Ergebnisse der AmpC Induzierbarkeit.	74
Tab. 7.6:	Untersuchung auf das Vorliegen einer Extended-Spektrum AmpC Betalaktamase, die auch Cefepim hydrolysieren können.	79
Tab. 7.7:	AmpC Charakterisierung bei Meropenem resistenten Stämmen auf der Basis von Aztreonam.....	83

Abkürzungsverzeichnis

AN	Amicacin
ATM	Aztreonam
AZT	Aztreonam
CAZ	Ceftazidim
CCT	Cefotetan
CIP	Ciprofloxacin
CL	Colistin
CLS	Clavulansäure
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLX	Cloxacillin
CTX	Cefotaxim
CPD	Cefpodoxim
ESBL	Extended Spectrum Betalaktamasen
EUCAST	European Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	Cefepim
FOS	Fosfomycin
FOX	Cefoxitin
GM	Gentamicin
I.f.	Institut für
IMP	Imipenem
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
LVX	Levofloxacin
MBL	Metallo-Betalaktamase
MDR	multidrug resistant
MEM	Meropenem
MER	Meropenem
MRSA	Meticillin resistente Staphylococcus aureus
NN	Tobramycin

NRZ	Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen
PBP	Penicillin-Binde-Protein
PIP	Piperacillin
pos.	positiv
RKI	Robert Koch Institut
Tab.	Tabelle
TE	Tetracyclin
TZP	Piperacillin/Tazobactam
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken

1 Einleitung

1.1 Einführung

1.1.1 Nosokomiale Infektionen

Bei jedem Aufenthalt im Krankenhaus besteht die Gefahr, dass ein Patient mit einem Keim aus der Krankenhausumgebung kolonisiert oder infiziert wird. Unter einer „nosokomialen Infektion“ versteht man eine Infektion, die bei Aufnahme in das Krankenhaus weder vorhanden noch in Inkubation war [1]. Die meisten nosokomialen Infektionen sind durch Bakterien verursacht und werden durch verschiedene Faktoren begünstigt, wie steigender Einsatz invasiver Techniken, höheres Alter der Patienten und eine zunehmende Anzahl der immunsupprimierten Patienten [1]. Das Nationale Referenzzentrum für die Surveillance von nosokomialen Infektionen (NRZ) hat 2012 in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (RKI) eine Prävalenzstudie zum Vorkommen von nosokomialen Infektionen durchgeführt, an der sich 134 Krankenhäuser beteiligten [2]. Die häufigsten Infektionen waren Harnwegsinfektionen (22,4%), postoperative Wundinfektionen (24,7%) und untere Atemwegsinfektionen (21,5%), gefolgt von *Clostridium difficile*-Infektionen (6,6%) und primärer Sepsis (6,0%)[2]. Die Prävalenz aller Patienten mit nosokomialen Infektionen war 4,99%[2], wobei die höchste Prävalenz aller Fachrichtungen mit 18,6% auf der Intensivstation vorlag [2].

Das nosokomiale Erregerspektrum unterscheidet sich von dem Erregerspektrum ambulant erworbener Infektionen (Tabelle 1.1), weshalb meist andere Antibiotika zur Therapie eingesetzt werden als bei ambulant erworbenen Pneumonien oder Harnwegsinfekten. Außerdem kommen im Krankenhaus auch immer häufiger multiresistente Keime wie z.B. Meticillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Extended Spectrum Betalaktamasen (ESBL) bildende Enterobakterien, Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) und AmpC-bildende Enterobakterien vor [3, 4]. In den letzten Jahren haben die Resistenzen der verschie-

denen Bakterien stark zugenommen, wodurch die zur Therapie zur Verfügung stehenden Antibiotika eingeschränkt werden[5].

Tab. 1.1: Anteil der wichtigsten Erreger von nosokomialen Infektionen pro 100 nosokomiale Infektionen in Deutschland über alle Stationen verteilt [6].

Erreger	Invasive/nicht invasiv assoziierte Atemwegsinfektionen	ZVK assoziierte Sepsis	HWK assoziierte Harnwegsinfektionen
<i>S.aureus</i>	37,6	14,0	1,5
<i>E.coli</i>	26,7	4,7	30,1
<i>P.aeruginosa</i>	28,9	3,0	15,0
Enterokokken	3,7	14,9	16,7
Koagulase-negative Staphylokokken	0,8	32,2	1,3
<i>Klebsiella</i> spp.	22,9	5,0	8,8

1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein gram negatives Stäbchenbakterium und kommt natürlicherweise in feuchtem Milieu wie im Erdreich, Gewässern und Pflanzen vor, im Alltag ist es beispielsweise in Waschbecken, Toiletten, Duschen und Blumenwasen zu finden [7]. *P. aeruginosa* gehört außerdem zu der Gruppe der Nonfermenter. Für diese Bakteriengruppe ist bezeichnend, dass sie Glukose fermentiv nicht abbauen kann [7].

P. aeruginosa gehört zu den opportunistischen Krankheitserregern, was bedeutet, dass er in der Regel nur dann eine Infektion verursacht, wenn weitere Risikofaktoren seitens des Wirts vorliegen, wie beispielsweise ein geschwächtes Immunsystem, eine nicht intakte Barriere der Haut oder Schleimhaut. *P. aeruginosa* ist in der Lage, sich auf geschädigtem oder totem Gewebe der lokalen angeborenen Immunabwehr zu entziehen [7], was z. B. bei Patienten mit Cysti-

scher Fibrose und chronischen Wunden der Fall ist. Durch seine Pili und Flagellen ist er in der Lage, Biofilme auszubilden und an Wirtszellen zu adhären [7]. Mikroorganismen, die in der Lage sind, Biofilme auszubilden, sezernieren eine schützende Matrix, welche den Biofilm fest an einer organischen oder unbelebten Oberfläche wie z.B. Blasenkatheter oder Endotrachealkanülen verankert [8]. Diese Schutzschicht schützt *P. aeruginosa* im Biofilm vor äußeren Einflüssen [8]. *P. aeruginosa* wächst in Biofilmen langsamer, was auch wiederum zur Antibiotikaresistenzbildung beitragen könnte [9].

Für die Nonfermenter, zu denen noch Burkholderia, Stenotrophomonas und Acinetobacter gehören, ist typisch, dass sie sehr anpassungsfähig sind und gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika eine Resistenz aufweisen können.[7] Auch *P. aeruginosa* ist in der Lage, unter Therapie eine Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika zu entwickeln [3]. Die hohe Rate an sehr resistenten Pseudomonaden [9] ist mit einer hohen Mortalität belastet [1]. 2009 starb beispielsweise das 20-jährige brasilianische Modell Mariana Bridi da Costa an einer Harnwegsinfektion mit *P. aeruginosa*, nachdem sie zunächst wegen Nierensteinen im Krankenhaus gewesen war [10].

1.1.3 Grundlagen der Antibiotikaresistenz

Keines der verschiedenen Antibiotika kann alle Mikroorganismen hemmen oder abtöten, einige Mikroorganismen sind von Natur aus resistent gegen bestimmte Antibiotika, was als intrinsische Resistenz bezeichnet wird. Beispielsweise sind die meisten gramnegativen Bakterien resistent gegen Penicillin G, da sie eine für Penicillin G undurchlässige Außenhülle besitzen. Auch wenn dem Organismus die Zielstruktur fehlt, gegen die das Antibiotikum gerichtet ist, kann es vom Antibiotikum nicht angegriffen werden. Antibiotikaresistenz, die nicht intrinsischer Natur ist, kann durch Akkumulation von chromosomalen Mutationen oder durch plasmidvermittelte Resistenz, sogenannte R-Plasmide entstehen. Viele R-Plasmide sind in der Lage, Resistenzen gegen mehrere Antibiotika gleichzeitig zu verleihen [3].

Die verschiedenen Resistenzmechanismen sind folgende [3],[11]:

- Bildung von inaktivierenden Enzymen wie z.B. Betalaktamasen, die den Betalaktamring eines Betalaktamantibiotikums spalten können oder Aminoglykosidmodifizierende Enzyme, die das Aminoglykosid phosphorylieren, acetylieren oder adenylieren und es auf diese Weise unwirksam machen.
- Veränderung der Zielstruktur, z. B. liegen der Resistenz von Methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* veränderte Penicillin-Binde-Proteine (PBP) zugrunde.
- Veränderte Permeabilität der Zellhülle durch Veränderung der darin verankerten Porine, durch die die Antibiotika eingeschleust werden. Beispielsweise basiert die Imipenem-Resistenz von *P. aeruginosa* auf einem solchen Mechanismus.
- Verstärkte Ausschleusung des Antibiotikums aus der Zelle durch die Induktion von Effluxpumpen, worauf z.B. die Resistenz von Enterobakterien gegen Tetracycline beruht.
- Überproduktion des Zielmoleküls, so dass die erreichbare Konzentration des Antibiotikums nicht mehr ausreicht um eine Inhibition zu bewirken, dieser Mechanismus spielt bei der Resistenz gegen Folsäureagonisten eine Rolle.

1.2 Problemstellung

Das Spektrum der möglichen Antibiotika, die für die Therapie von *P. aeruginosa* Infektionen eingesetzt werden können, ist im Vergleich zur Therapie von Enterobakterien einsetzbarem Spektrum deutlich eingeschränkt. Einen wichtigen Pfeiler der Therapie stellen Betalaktamantibiotika, wie Piperacillin-Tazobactam, Ceftazidim und Carbapeneme dar [12]. Kommt es zu einer Resistenzentwicklung, verkleinert sich das einsetzbare Spektrum nochmals weiter [13]. Eine Überexpression der chromosomal kodierten AmpC Betalaktamase, die zu einer Resistenz gegenüber den Pseudomonas wirksamen Betalaktamantibiotika der Penicillin und Cephalosporin Gruppe führt, stellt daher einen wichtigen Resistenzmechanismus dar [14]. In einer amerikanischen Studie mit *P. aeruginosa* Isolaten aus Blutkulturen wurde bei 18,4% dieser Stämme eine AmpC Überproduktion nachgewiesen [15], ähnlich wie bei einer anderen Studie aus Spanien, bei der bei 24,2% der Isolate eine AmpC Überproduktion nachgewiesen wurde [16]. Diese Pseudomonaden werden meist primär sensibel auf bestimmte Betalaktamantibiotika wie z.B. Piperazillin/Tazobactam getestet, im Verlauf der Therapie regulieren sie AmpC hoch, wodurch sie dann resistent auf dieses Antibiotikum werden [17]. Bei diesen Patienten besteht die große Gefahr, dass sie initial falsch therapiert werden.

1.3 Kenntnisstand und Grundlagen

1.3.1 Rolle von Betalaktamantibiotika für die Therapie von *P. aeruginosa*

1928 wurde von Herrn Flemming das Penicillin entdeckt. Es brauchte dann noch eine Weile bis es in den klinischen Alltag integriert wurde, aber seit den 1960er Jahren werden Betalaktamantibiotika sehr intensiv zur Behandlung von Infektionen eingesetzt [4]. Es gibt 4 große Gruppen von Betalaktamantibiotika, alle 4 Gruppen haben gemeinsam dass sie einen Betalaktamring, der aus 4 Atomen besteht, besitzen [12]. Aufgrund der anderen Molekülkomponenten werden vier große Wirkstoffklassen unterschieden: Penicilline, Cephalosporine,

Monobactame und Carbapeneme [19]. Der Wirkmechanismus von Betalaktamantibiotika auf Pseudomonaden erklärt sich folgendermaßen:

Ein Gram negatives Bakterium wie *P. aeruginosa* besitzt eine innere und eine äußere Membran. Zwischen diesen beiden Membranen ist eine Zellwand, die aus Peptidoglycanen besteht [20]. Die Betalaktamantibiotika, sowie viele andere Antibiotika, gelangen durch die Außenmembran, durchdringen dann die Zellwand und binden an ein Penicillin-Binde-Protein (PBP) an der inneren Membran des Bakteriums [19, 21]. Durch die Bindung an PBPs werden diese blockiert, was zur Hemmung der Zellwandsynthese und Morphogenese führt, es kommt zum Absterben des Bakteriums.

Betalaktamantibiotika sind die am meisten verwendeten Antibiotika, die auch für die Behandlung von *P.aeruginosa*-Infektionen am häufigsten verwendet werden [12]. Für die *P. aeruginosa* Therapie können insgesamt folgende Antibiotika eingesetzt werden: Betalaktame (Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Cefepime, Imipenem, Doripenem, Meropenem), Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Levofloxacin), Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin, Amikacin) und Colistin [22].

1.3.2 Betalaktamasen in *P. aeruginosa*

Die Zunahme der Resistenzen in gram negativen Bakterien ist hauptsächlich der Bildung von Betalaktamasen zuzuschreiben [12]. Diese Enzyme können den Betalaktamring spalten.

In den 60iger Jahren wurde die erste Betalaktamase TEM-1 in *E.coli* isoliert. TEM-1 liegt auf einem Plasmid und ist in der Lage Penicilline und Schmalspektrum-Cephalosporine zu hydrolisieren. Heutzutage besitzen die meisten Enterobakterien TEM-1, welches auch die häufigste Ursache für Ampicillinresistenz ist. Etwa zur gleichen Zeit wurde die Betalaktamase SHV-1 in *K. pneumoniae*, welche chromosomal vorliegt, entdeckt. SHV-1 zeigt ein ähnliches Resistenzspektrum wie TEM-1. Ein großer Fortschritt in der Bekämpfung von Resistenzen war deshalb die Entwicklung von Cephalosporinen der 3. Generation. Diese konnten von TEM-1 und SHV-1 nicht mehr hydrolisiert werden. Wenige Jah-

re später wurden modifizierte Betalaktamasen in Enterobakterien isoliert. Diese Betalaktamasen sind in der Lage, 3. Generationscephalosporine wie Ceftazidim, Cefotaxim und Cefpodoxim zu hydrolysieren, sie werden Extended-Spektrum Beta-Laktamasen (ESBL) genannt. Zu ihrer Bekämpfung werden Betalaktamaseinhibitoren wie Clavulansäure, Sulbactam und Tazobaktam eingesetzt. Betalaktamaseinhibitoren haben eine ähnliche Struktur wie die Betalaktamantibiotika bewirken jedoch eine irreversible Blockade der Betalaktamase. In den 1990er Jahren wurden viele weitere Betalaktamasen entdeckt, darunter auch die AmpC Betalaktamase. Betalaktamaseinhibitoren haben keinen Effekt auf AmpC Betalaktamasen, weshalb sie nicht als ESBL bezeichnet werden. AmpC Betalaktamasen vermitteln Resistenzen gegenüber allen Betalaktamantibiotika mit Ausnahme von Cefepim, Cefpirom und Carbapenemen. Eine weitere große Herausforderung stellen die sich weltweit ausbreitenden Carbapenemasen dar, die zusätzlich in der Lage sind, Carbapeneme wie beispielsweise Meropenem zu hydrolysieren [4, 20].

Es gibt zwei Systeme der Einteilung der Betalaktamasen, zum einen die Einteilung nach Ambler - oder auch Molekulare Klassifikation und zum anderen die Einteilung nach Bush. In der vorliegenden Arbeit wird die Einteilung nach Bush verwendet (Tab.1.2), wobei in dieser Einteilung die Substrate und Inhibitorprofile der Enzyme mitberücksichtigt werden. Die Hauptgruppen korrelieren mit der Molekularen Klassifikation nach Ambler [18]. Die Betalaktamasen der molekularen Klassen A, C und D benötigen Serine zur Hydrolyse der Betalaktame. Die Enzyme der molekulare Klasse B hingegen benötigen zweiwertige Zinkionen, weshalb sie auch Metallo-Betalaktamasen genannt werden [18].

Tab. 1.2: Modifiziertes Übersichtsschema zur Einteilung der wichtigsten Betalaktamasen [18].

Bush Gruppe 2009	Molekulare Klasse	Bevorzugte Substrate	Inhibiert durch Clavulansäure	Inhibiert durch EDTA	Repräsentative Enzyme
1	C	Cephalosporine Cephamycine	-	-	AmpC- Betalaktamasen <i>E.coli</i> AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
2b	A	Penicilline, Schmal-Spektrum-Cephalosporine	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Extended-Spectrum Cephalosporine, Monobactame	+	-	ESBL-Betalaktamasen TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2ber	A	Extended-Spectrum Cephalosporine, Monobactame	-	-	TEM-50
2d	D	Cloxacillin	+/-	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Extended-Spectrum Cephalosporine	+/-	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapeneme	+/-	-	OXA-23, OXA-48
2f	A	Carbapeneme	+/-	-	Carbapenemasen KPC-2, IMI-1 SME-1
3a	B	Carbapeneme	-	+	Carbapenemasen IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1

1.3.2.1 ESBL

Es gibt verschiedene Klassen von ESBLs, die zu den Serin-Betalaktamasen gehören [14]. In *P. aeruginosa* wurden ESBLs erfasst, die alle zur molekularen Klasse A und D gehören [12]. Sie können Penicilline, Breit- und Schmal-Spektrum Cephalosporine und Aztreonam spalten. Carbapeneme und Cephamycine können sie nicht spalten [12]. Zu der Klasse A gehören unter anderem TEM und SHV-Typen, Klasse D sind OXA-Typen [12].

1.3.2.2 Carbapenemasen

Carbapeneme sind gegenüber den meisten Betalaktamasen stabil und stellen daher eine wichtige Antibiotikagruppe bei der Therapie von Infektionen mit *P. aeruginosa* dar, vor allem bei solchen die durch AmpC bildenden Stämme verursacht sind [9]. Das Auftreten von Carbapenemasen, die nahezu alle Betalaktamantibiotika spalten können, ist deshalb besonders problematisch [12]. In klinischen *P. aeruginosa* Isolaten wurden bisher Carbapenemasen der Klasse A und B (Metallo-Betalaktamasen) nachgewiesen [12]. Klasse A Carbapenemasen sind in der Lage, Penicilline, Cephalosporine, Aztreonam und Carbapeneme zu hydrolysieren. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Enzyme vom GES und der KPC-Typ [12]. Metallo-Betalaktamasen (MBL) der Klasse B sind die klinisch bedeutsamste Gruppe von Carbapenemasen bei *P. aeruginosa* und ebenfalls in der Lage, Carbapeneme und andere Betalaktame mit Ausnahme von Aztreonam zu spalten, am häufigsten werden Enzyme vom VIM- und IMP-Typ nachgewiesen [12].

1.3.2.3 AmpC

AmpC Betalaktamasen können sowohl chromosomal kodiert, als auch auf Plasmiden vorliegen. Plasmidkodierte AmpC Betalaktamasen wurden vor allem in *K. pneumoniae* gefunden, was zur Entdeckung der Übertragung von *ampC* Genen auf Plasmiden führte. In *P. aeruginosa* ist die chromosomal kodierte AmpC Betalaktamase von Bedeutung, wohingegen eine Plasmid vermittelte AmpC Resistenz in *P. aeruginosa* nicht relevant ist [14].

1.3.3 Chromosomal-kodierte Resistenzmechanismen

P. aeruginosa besitzt eine Vielzahl von Resistenzmechanismen die chromosomal kodiert sind. Darunter fallen unter anderem die AmpC Betalaktamasen, das äußere Membranprotein OprD und Multidrug-Efflux Pumpen [20].

1.3.3.1 Äußeres Membranprotein OprD

Der häufigste Mechanismus der Carbapenemresistenz ist der Verlust der Funktion des äußeren Membranproteins OprD, durch das die Carbapeneme in die Bakterienzelle gelangen. Bei Carbapenem resistenten *P. aeruginosa* Stämmen, die keine Metallobetalaktamasen haben, spielt dieser Resistenzmechanismus eine wichtige Rolle. Meistens kommen modifizierte OprD Proteine in Kombination mit anderen Resistenzmechanismen vor, wie beispielsweise einer Überexpression der AmpC Betalaktamase. [9, 23]

1.3.3.2 Multidrug-Efflux Pumpen

Multidrug Efflux-Pumpen sind Systeme, die Antibiotika aktiv aus der Bakterienzelle pumpen und somit eine Wirkung der Antibiotika an ihrer jeweiligen Zielstruktur verhindern. Es wurden bisher 5 verschiedene Efflux Pumpen Systeme beschrieben, von denen die Familie der Resistance Nodulation Division (RND) Pumpen für die Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber Antibiotika in klinischen Isolaten die wichtigste Rolle spielt [9]. Die RND-Familie sind sekundär aktive Transporter, die typischerweise aus einem dreiteiligen System aufgebaut sind, das aus einem periplasmatisches Membran Fusions Protein (MFP), einem äußeren Membranprotein (OMF) und einem Cytoplasmatischem Membran (RND) Transporter besteht. Die Pumpen können verschiedene Substanzen vom Innenraum der Zelle nach außen schleusen, wobei verschiedene Pumpen auch teilweise gleiche Substanzen erfassen können. In *P. aeruginosa* wurden 10 verschiedene RND-Typen beschrieben, die für die Resistenzentstehung relevant sind, wobei drei davon zu einer Resistenz gegenüber Betalaktamantibiotika führen. Eines davon ist das sogenannte MexAB-OprM Efflux-Pumpensystem, welches das breiteste Spektrum an Betalaktamen erfasst und auch am

häufigsten in klinischen Isolaten gefunden wird [9]. Ein Teil der Efflux-Pumpensysteme können auch eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und Aminoglykoside vermitteln [9, 20, 24].

1.3.4 Regulation und Expression der chromosomal kodierten AmpC-Betalaktamase

P. aeruginosa besitzt eine chromosomal kodierte induzierbare AmpC-Betalaktamase. Wildtyp *P. aeruginosa* Isolate produzieren nur niedrige Grundmengen von AmpC und sind sensibel auf die Pseudomonas wirksamen Betalaktamantibiotika, wie Piperacillin, Piperacilin-Tazobactam, Ceftazidim und Carbapeneme [18]. Kommt es jedoch zu einer vermehrten AmpC Bildung, entsteht eine Resistenz gegen die oben genannten Antibiotika, mit Ausnahme der Carbapeneme. Um eine Resistenz verursachen zu können, muss AmpC überexprimiert werden. Zu einer Überexpression von AmpC kann es auf zweierlei Weise kommen. Zum einen können bestimmte Betalaktamantibiotika oder Betalaktamaseinhibitoren wie beispielsweise Cefoxitin und Clavulansäure zu einer reversiblen Induktion des Enzyms führen. Zum anderen gibt es den Prozess der „Derepression“, bei dem die Wirkung der Inhibitoren der *ampC* Expression beeinträchtigt werden und es über eine komplexe Kaskade zu einer konstitutiven Überexpression von AmpC kommt [20]. Grundsätzlich können alle Veränderungen von Proteinen, die an dem Induktionsvorgang des *ampC* Promotors beteiligt sind zu einer Derepression der Expression des *ampC* Genes führen. Die häufigste Ursache einer AmpC Überexpression ist eine Mutation in AmpD. In den allermeisten Fällen kommt es durch Mutationen zur Inaktivierung oder Abnahme der Expression von AmpD, einem Repressorprotein des AmpC [17]. Im Gegensatz zu den Enterobakterien ist der Mechanismus der AmpC Expression bei *P. aeruginosa* noch nicht vollständig aufgeklärt. Z.B. ist der Prozess der Derepression von AmpC in *P. aeruginosa* kein Einzelschritt, sondern wird durch mehrere Faktoren beeinflusst [17].

P. aeruginosa besitzt drei *ampD* Gene, was den stufenweisen Anstieg von der AmpC Produktion erklären könnte [17]. Die Derepression von AmpC in *P. aeruginosa* stellt den häufigsten Resistenzmechanismus gegenüber Be-

talaktamantibiotika dar [9]. Durch die vollständige Sequenzierung des Genes von *P. aeruginosa* konnte durch Juan et al. herausgefunden werden, dass es in diesem Organismus 3 verschiedene AmpD Homologe gibt, AmpD, AmpDh2 und AmpDh3. Sie konnten zeigen, dass es bei *P. aeruginosa* zu einem stufenweisen Anstieg der AmpC Expression kommt. So führte die Deletion von einem *ampD* Gen zu einer niedrigen AmpC Expression, wohingegen Mutationen in *ampD* und *ampdh3* zu einem signifikanten Anstieg der *ampC* Expression führten. Bei der Derepression aller drei *ampD* Gene kam es zu einem hohen basalen Level von AmpC. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Expression von AmpD Homologen nicht durch AmpC Induktoren beeinflusst wird indem sie die Expression von *ampD*, *ampDH2*, *ampDH3* auch unter der Einwirkung von Cefoxitin gewachsenen Pseudomonaden bestimmten [17, 25]

1.3.5 Klinische Relevanz der AmpC Überproduktion

Die klinische Bedeutung von AmpC Betalaktamase Expression wurde für Enterobacteriaceae bereits gut belegt. Schon 1991 konnte in einer Studie gezeigt werden, bei der insgesamt 129 Patienten wegen einer Sepsis behandelt wurden, dass bei den Patienten, die mit Cephalosporinen der dritten Generation behandelt wurden ein viel größeres Aufkommen von multiresistenten Keimen während der Behandlung auftrat, im Vergleich zu einer Therapie mit beispielsweise Aminoglykosiden oder anderen Betalaktamenantibiotika. Diese multiresistenten Keime hatten nachweislich eine um 2 bis 5000fach erhöhte Betalaktamaseaktivität [26].

Eine Studie aus den USA von Tam et al 2007 über die Prävalenz von AmpC bei Ceftazidim resistenten *P. aeruginosa* Stämmen zeigte, dass 18,4% der 76 getesteten Isolate AmpC-Bildner waren [15]. Eine weitere Prävalenzstudie, die in einem spanischen Krankenhaus von Cabot et al 2011 durchgeführt wurde, kam zu einem ähnlichen Ergebnis, bei ihnen zeigten 24,2% der getesteten 190 Isolate eine Überexpression von AmpC, gefolgt von Effluxpumpen *mexY* und *mexB*, die beide Anteile über 10% an dem resistenten Phänotypen der Stämme hatten [16].

1.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, bei klinischen *P. aeruginosa* Isolate mit Resistenzen gegenüber Piperacillin-Tazobactam, Ceftazidim oder Cefepim aber auch voll sensiblen Stämme zu untersuchen, ob sich eine AmpC Betalaktamase mittels phänotypischer Tests nachweisen lässt. Der kombinierte Disk Test wird hierfür als Goldstandard gewählt und soll mit verschiedenen phänotypischen Tests verglichen werden. Anschließend soll bestimmt werden, welchen Anteil die Expression von AmpC bei der Resistenz gegenüber Ceftazidim bei Isolatn aus unserem epidemiologischen Setting hat. Bei den AmpC positiven Stämmen soll des Weiteren untersucht werden, inwieweit das AmpC Enzymspektrum auch Cefepim mit einschließt. Außerdem soll mittels eines phänotypischen Test überprüft werden, ob sich in den Isolatn die Expression der AmpC Betalaktamase induzieren lässt. Abschließend soll die Untergruppe der Isolate, die zusätzlich eine Resistenz gegenüber Meropenem aufweisen, näher bezüglich des Vorhandensein einer AmpC Betalaktamase charakterisiert werden. Wünschenswert wäre es, wenn die Ergebnisse die Etablierung eines einfachen Algorithmus zum Nachweis von AmpC Betalaktamase in *P. aeruginosa* zuließen, der in die mikrobiologische Routinediagnostik übernommen werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienisolate, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden

Für die Versuche wurden *P. aeruginosa* Stämme verwendet die aus unterschiedlich gewonnenen diagnostischen Routineproben am Institut für Mikrobiologie der Universitätskliniken Tübingen isoliert wurden. Es wurden sowohl Ceftazidim resistente Stämme ausgewählt, als auch Ceftazidim sensible Stämme. Es wurde pro Patient immer nur ein Isolat eingeschlossen. Die Stämme wurden bis zur Analyse bei -20° C in glycerinhaltigem Einfriermedium aufbewahrt.

2.2 Antibiogramm

Durch ein Antibiogramm kann man bestimmen wie ein Bakterium auf ein Antibiotikum reagiert. Hierfür wird ein Agardiffusionstest durchgeführt, wobei die Hemmhöfe um die antibiotikahaltigen Disks ausgemessen werden. Die Beurteilung der Hemmhofdurchmesser erfolgt nach den klinischen Breakpoints der EUCAST [27]. Es erfolgt die Einteilung des Isolates in sensibel, intermediär oder resistent.

2.2.1 Benötigte Reagenzien

Tab. 2.1: Für das Antibiogramm verwendete Reagenzien

Name	Herstellerbezeichnung	Bestellnummer	Hersteller	Ort
Blutagar	Columbia-Agar mit Schafsblut Plus	PB5039A	Oxoid GmbH	Postfach 1007, 46467 Wesel
MH-Testagar	Müller-Hinton Testagar (30% Rindfleischauflage, 1,75% hydrolysiertes Casein,		I.f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede-Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen

Name	Hersteller- bezeichnung	Bestell- nummer	Hersteller	Ort
	0,15% Stärke, 1,7% Agar ph neut- ral eingestellt bei 25 °C)			
0,85%ige NaCl-Lösung			I.f. Medizini- sche Mikrobi- logie und Hy- giene	Elfriede- Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen
GM 10	Sensi.-Disc Gentamicin 10µg	231227	Becton Dickinson GmbH Heidel- berg	Tullastraße 8-12 69126 Heidelberg
NN 10	Sensi-Disc Tobramycin 10µg	231569	-dito-	-dito-
TZP 36	Sensi-Disc Piperacillin30µg, Tazobactam 6µg	232229	-dito-	-dito-
CAZ10	Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Ceftazidim 10µg	CT1629B	Oxoid Ltd.	Oxoid Ltd.Basingloke, Hampshire, England
PIP 30	Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Piperacillin 30µg	CT1619	-dito-	-dito-
LVX 5	Sensi-Disc Levofloxacin 5µg	231705	Becton Dickinson GmbH Heidel- berg	Tullastraße 8-12 69126 Heidelberg
CIP 5	Sensi-Disc Cipro- floxacin 5µg	231658	-dito-	-dito-
MER 10	Sensi-Disc Mero- penem 10µg	231704	-dito-	-dito-
FEP 30	Sensi-Disc Cefe- pim 30µg	254893	-dito-	-dito-

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
TE 30	Sensi-Disc Tetra-zyklin 30µg	231344	-dito-	-dito-
FOS 200	Sensi-Disc Fosfo-mycin 200µg	231755	-dito-	-dito-
AZT 30	Sensi-Disc Aztreo-nam 30µg	231640	-dito-	-dito-
CL10	Sensi-Disc Colistin 10µg	231278	-dito-	-dito-
AN 30	Sensi-Disc Amika-cin 30µg	231597	-dito-	-dito-

2.2.2 Benötigte Geräte

Tab. 2.2: Für das Antibiogramm verwendete Geräte

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
Inkubator	Inkubator Typ BBD 6220		Heraeus, heute: Thermo Fischer GmbH	Robert-Bosch-straße 1, 63505 Langenselbold
Sterile Impf-schlingen 10µl	Impföse, 10µl 200MM, Blau, steril	731170	Greiner Bio-One GmbH	Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen
Densimeter	Vitek Densichek	Serien-nummer: IDK 207823	bioMérieux Deutschland GmbH	Weberstraße 8, 72622 Nürtingen
Densimeter-Röhrchen	Röhren, 5ml, 75x12mm, PS	55.476	Sarstedt AG&Co.	Sarstedtstraße 1, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
Watteträger unsteril	Mai med-Tip (kleiner Kopf)	PZN 0352012	Mai Med Medical	MaiMed GmbH Robert-Koch-Str. 1-7, 29643 Neuenkirchen

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
Antibio-grammstem-pel	BD Sensi-Disc Sispenser II für 6 Kartuschen	4301009G	Becton dickin-son GmbH	Tullastraße 8, 69126 Heidelberg

2.2.3 Durchführung

- Ausgewählte *P. aeruginosa* Stämme, wurden auf Blutagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- McFarland-Einstellung: 1-2 Bakterienkolonien wurden in 0,85% NaCl resuspendiert und auf einen McFarland Wert zwischen 0,48 und 0,52 eingestellt.
- Nun konnten die für die Antibiogramme notwendigen Platten mit einem Watteträger auf Müller-Hinton Testagar ausgestrichen werden. Ausstreichverfahren: Nach dem vortexen des Kulturröhrchens wurde der Watteträger in die Bakteriensuspension getaucht. Auf der Platte wurde dann zuerst ein Kreuz markiert. Dann setzte man den Watteträger seitlich am Rand der Platte auf und strich von einem Ende der Platte bis zum anderen in waagerechten Strichen ohne den Watteträger abzusetzen. Danach erfolgte eine 1/3 Drehung sowohl der Platte als auch des Watteträgers und es wurde nochmals von einem Ende der Platte bis zum anderen ausgestrichen. Anschließend wiederholtes Drehen der Platte und des Watteträgers, insgesamt wurden die Bakterien also 3mal auf der Platte ausgestrichen, so erhielt man auf allen Platten eine gleichmäßige Verteilung der Pseudomonaden.
- Die Antibiotikaplättchen wurden mit den verschiedenen Antibiogrammstem-pel auf die Platten gestempelt.
- Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Inkubator bebrütet.
- Am darauffolgenden Tag wurden die Hemmhofgröße mit einem Lineal ausgemessen und in mm-Angabe dokumentiert.

2.2.4 Kriterien der Beurteilung

Die Beurteilung ob der *P. aeruginosa* Stamm sensibel, intermediär oder resistent gegenüber einem bestimmten Antibiotikum ist, erfolgte nach den EUCAST Richtlinien, dargestellt in Tab.2.3. Für Tetrazyklin und Fosfomycin existieren keine klinischen Breakpoints für *P. aeruginosa*, für Colistin wurden die Breakpoints der CLSI für die Beurteilung zu Grunde gelegt, die in Tab.2.4 dargestellt ist [28]. Darüber hinaus werden die Multiresistenten Bakterien von der KRINKO beim RKI in 3MRGN (Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen 3 der 4 Antibiotikagruppen) und 4 MRGN (Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen 4 der 4 Antibiotikagruppen) eingeteilt [29]. In diesen 4 Antibiotikagruppen sind die Antibiotika vertreten, die als primäre bakterizide Therapeutika (Acylureidopenicilline, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme und Fluorchinolone) [29] bei schweren Infektionen eingesetzt werden.

Tab. 2.3: EUCAST-Richtlinien zur Bewertung der Hemmhöhe [27] Angaben in mm

Pseudomonas spp.		
		<r ≥s
GM	Gentamicin	15/15
NN	Tobramycin	16/16
PIP	Piperacillin	19/19
TCP	Piperacillin/Tazobactam	19/19
CAZ	Ceftazidim	16/16
LVX	Levofloxacin	17/20
CIP	Ciprofloxacin	22/25
MER	Meropenem	18/24
FEP	Cefepim	18/18
AZT	Aztreonam	16/50
AN	Amikacin	15/18

Tab. 2.4: Richtlinie zur Bewertung der Colistinresistenzlage nach den Breakpoints der CLSI [28]. Angaben in mm

		<r ≥:s
CL	Colistin	10/11

2.3 Phänotypische Test für die Detektion von AmpC Betalaktamase mittels kombiniertem Disk Test

Beim kombinierten Disk Test werden wie bei den Antibiogrammen Antibiotikaplättchen gelegt und danach die Größe der verschiedenen Hemmhöfe bestimmt. Einem Antibiotikaplättchen wird der Inhibitor Cloxacillin zugesetzt. Beim kombinierten Disk Test bestimmt man, ob es einen Größenunterschied $\geq 5\text{mm}$ zwischen Antibiotika X und Antibiotika X + Cloxacillin gibt [23, 30].

2.3.1 Benötigte Reagenzien:

Tab. 2.5: Für den kombinierten Disk Test verwendete Reagenzien

Name	Herstellerbezeichnung	Bestellnummer	Hersteller	Ort
Blutagar	Columbia-Agar mit Schafsblut Plus	PB5039A	Oxoid GmbH	Postfach 1007, 46467 Wesel
MH-Testagar	Müller-Hinton Testagar (30% Rindfleischauflage, 1,75% hydrolysiertes Casein, 0,15% Stärke, 1,7% Agar pH neutral eingestellt bei 25 °C)		I.f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede-Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen
0,85%ige NaCl-Lösung			I.f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede-Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen

Name	Hersteller- bezeichnung	Bestell- nummer	Hersteller	Ort
Cloxacillin	Cloxacillin Sodi- umsalt monohydra- te	C9393-5G	Sigma-Aldrich	
CAZ10	Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Ceftazidim 10µg	CT1629B	Oxoid Ltd.	Oxoid Ltd.Basingsloke, Hampshire, England
FEP 30	Sensi-Disc Cefepim 30µg	254893	Becton Di- ckinson GmbH Heidelberg	Tullastraße 8-12, 69126 Heidelberg
AZT	Sensi-Disc Aztreo- nam 30µg	231640	-dito-	-dito-
FOX 30	Sensi-Disc Ce- foxitin 30µg	231590	-dito-	-dito-
CTT	Sensi-Disc Cefote- tan 30µg	231655	-dito	-dito-
TZP 36	Sensi- DiscPiperacil- lin30µg, Tazobactam 6µg	232229	-dito-	-dito-
Blanc Discs unbeschich- tet	BD-Sensi-Disc	254862	-dit-	-dito-

2.3.2 Benötigte Geräte:

Tab. 2.6: Für den kombinierten Disk Test verwendete Geräte

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
Inkubator	Inkubator Typ BBD 6220		Heraeus, heute: Thermo Fischer GmbH	Robert-Boschstraße 1, 63505 Langenselbold
Sterile Impfschlingen 10µl	Impföse, 10µl 200MM, Blau, steril	731170	Greiner Bio-One GmbH	Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen
Densimeter	Vitek Densichek	Seriennummer:IDK 207823	bioMérieux Deutschland GmbH	Weberstraße 8, 72622 Nürtingen
Densimeter-Röhrchen	Röhren, 5ml, 75x12mm, PS	55.476	Sarstedt AG&Co.	Sarstedtstraße 1, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
Watteträger unsteril	Mai med-Tip (kleiner Kopf)	PZN 0352012	Mai Med Medical	MaiMed GmbH Robert-Koch-Str. 1-7 29643 Neuenkirchen
Antibiogrammstempel	BD Sensi-Disc Sispenser II für 6 Kartuschen	4301009G	Becton dickinson GmbH	

2.3.3 Durchführung:

- Wie bei den Antibiogrammen, wurden die Stämme auf Blutagar ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Die optische Dichte wurde mit Hilfe des McFarland Messgerätes zwischen 0,48 und 0,52 eingestellt und danach wie bei den Antibiogrammen ausgestrichen.
- Die Antibiotikaplättchen stempelte man mit Hilfe des Antibiogrammstempels auf die Platten, wobei das Cloxacillin bei den entsprechenden Plättchen dazu pipettiert wurde. Die Cloxacillin-Stocklösung, wurde mit destilliertem

Wasser angesetzt und entsprach 300µg/µl Cloxacillin. Für einen 10ml Ansatz wurden 3g Cloxacillin in 10ml destilliertem Wasser gelöst, was somit bei 10µl pro Plättchen einer Menge von 3000 µg Cloxacillin pro Plättchen entsprach.

- Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Inkubator bebrütet.
- Am darauffolgenden Tag wurde die Hemmhofgröße mit einem Lineal bestimmt.
- Folgende Kombinationen der Antibiotikaplättchen für die Antibiogramme zur Austestung auf Vorliegen von AmpC Betalaktamasen wurden aufgetragen:
 - Ceftazidim 10µg (CAZ), Ceftazidim 10µg + Cloxacillin 3000µg (CLX)
 - Cefepim 10µg (FEP), Cefepim 10µg+ Cloxacillin 3000µg
 - Aztreonam 10µg (AZT), Aztreonam 10µg+ Cloxacillin 3000µg
 - Cefoxitin 10µg (FOX), Cefoxitin 10µg+ Cloxacillin 3000µg
 - Cefotetan 10µg (CTT), Cefotetan 10µg Cloxacillin 3000µg
 - Piperazillin/Tazobactam 30/6µg (TZP), Piperazillin/Tazobactam 30/6µg + Cloxacillin 3000µg

Schema der Antibiotikaplatzierung:

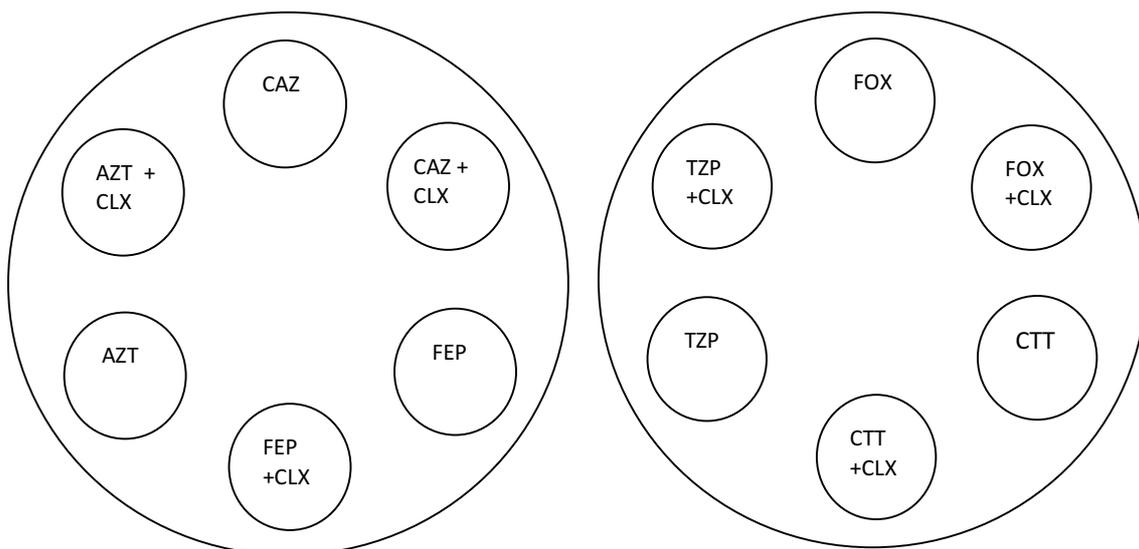


Abb. 2.1: Schema der Antibiotikaplatzierung

2.3.4 Kriterien der Beurteilung:

Die Hemmhofgröße wurde mit einem Lineal ausgemessen und danach die Differenz zwischen Antibiotika X und dem Antibiotika X + Cloxacillin bestimmt. Je stärker die Hemmhofgröße eines Stammes bei verschiedenen Antibiotika zunahm, umso wahrscheinlicher kann ein AmpC-Resistenzmechanismus angenommen werden. Alle Stämme die auf Ceftazidim und Piperazillin/Tazobactam eine ≥ 5 mm Zunahme des Hemmhofes hatten, wurden als AmpC-Bildner gewertet.

2.4 Phänotypischer Test für Detektion von AmpC Betalaktamase anhand eines Synergietests

Beim Synergietest wird ein Cephalosporin haltiges Antibiotikaplättchen im Abstand von 20 mm neben ein Cloxacillin haltiges Plättchen gelegt. Zeigt sich nach Inkubation eine sogenannter Champagnerkorken-förmiger Hemmhof (Ellipsenform), besteht ein synergetischer Effekt. Das heißt, dass das Cloxacillin im Agar diffundiert und durch Hemmung der AmpC Betalaktamase zu dieser Deformierung des Hemmhofes führt.

Ein D-Phänomen entsteht, wenn es durch Diffusion eines Antibiotikums zu einer resistenzvermittelnden Enzyminduktion kommt. Bei dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Induzierbarkeit von AmpC ein Antibiotika Disk mit einem 3. Generationscephalosporin, (Ceftazidim, Cefepin, Cefoxitin, Cefotetan) und Aztreonam und Piperacillin/Tazobactam im Abstand von 20 mm neben ein Imipenem Disk gelegt. Das Imipenem hat eine AmpC hochregulierende Wirkung wodurch es bei AmpC besitzenden Bakterien zu einer Abschwächung der Wirkung des Cephalosporin's kommen kann. Es entsteht ein D-Phänomen [31].

2.4.1 Benötigte Materialien:

Tab. 2.7: Für den Synergietest verwendete Materialien

Name	Hersteller- bezeichnung	Bestell- nummer	Hersteller	Ort
Blutagar	Columbia-Agar mit Schafsblut Plus	PB5039A	Oxoid GmbH	Postfach 1007, 46467 Wesel
MH-Testagar	Müller-Hinton Testagar, (30% Rindfleischauflösung, 1,75% hydrolysiertes Casein, 0,15% Stärke, 1,7% Agar pH neutral eingestellt bei 25 °C)		I.f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede-Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen
0,85%ige NaCl-Lösung			I.f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede-Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen
Cloxacillin 3000	Cloxacillin Natriumsalt monohydrate	C9393-5G	Sigma-Aldrich	
CAZ 10	Ceftazidim 10µg	CT 1629B	Oxoid GmbH	Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England
IMP 10	Imipenem 10µg	231644	Becton Dickinson GmbH Heidelberg	Tullastraße 8-12, 69126 Heidelberg
FEP 30	Cefepim 30µg	254893	-dito-	-dito-
ATM 30	Aztreonam 30µg	231640	-dito-	-dito-
FOX 30	Cefoxitin 30µg	231590	-dito-	-dito-
CCT 30	Cefotetan 30µg	231655	-dito-	-dito-
TZP36	Piperacillin 30µg/Tacobactam 6µg	232229	-dito-	-dito-

Das Cloxacillin wurde mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 3000µg/ml eingestellt.

2.4.2 Benötigte Geräte:

Tab. 2.8: Für den Synergietest verwendete Geräte

Name	Herstellerbezeichnung	Bestellnummer	Hersteller	Ort
Inkubator	Inkubator Typ BBD 6220		Heraeus, heute: Thermo Fischer GmbH	Robert-Boschstraße 1, 63505 Langenselbold
Sterile Impfschlingen 10µl	Impföse, 10µl 200MM, Blau, steril		Greiner Bio-One GmbH	Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen
Densimeter	Vitek Densichek		bioMérieux Deutschland GmbH	Weberstraße 8, 72622 Nürtingen
Densimeter-Röhrchen	Röhren, 5ml, 75x12mm, PS		Sarstedt AG&Co.	Sarstedtstraße 1, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
Watteträger unsteril	Mai Med Tip (kleiner Kopf)	PZN 0352012	Mai Med Medical	MaiMed GmbH Robert-Koch-Str. 1-7 29643 Neuenkirchen

2.4.3 Durchführung:

- Wie bei den Antibiogrammen wurden die Stämme am Tag zuvor aus der Stammsammlung aufgetaut, auf Blutagar ausgestrichen und über Nacht bei 37° C bebrütet. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte mit Hilfe des McFarland Messgerätes zwischen 0,48 und 0,52 eingestellt, danach wurden die Stämme analog zur Vorgehensweise bei der Erstellung der Antibiogramme auf Müller-Hinton Agar ausgestrichen.

- Mit Hilfe einer Schablone, die so angelegt war, dass zwischen den einzelnen Plättchenmitten 20 mm Abstand war, wurden 8 Antibiotikaplättchen auf eine Test-Nährbodenagarplatte gelegt.
- Inkubation der Platten über Nacht bei 37° C

Schema der Antibiotikaplättchenplatzierung:

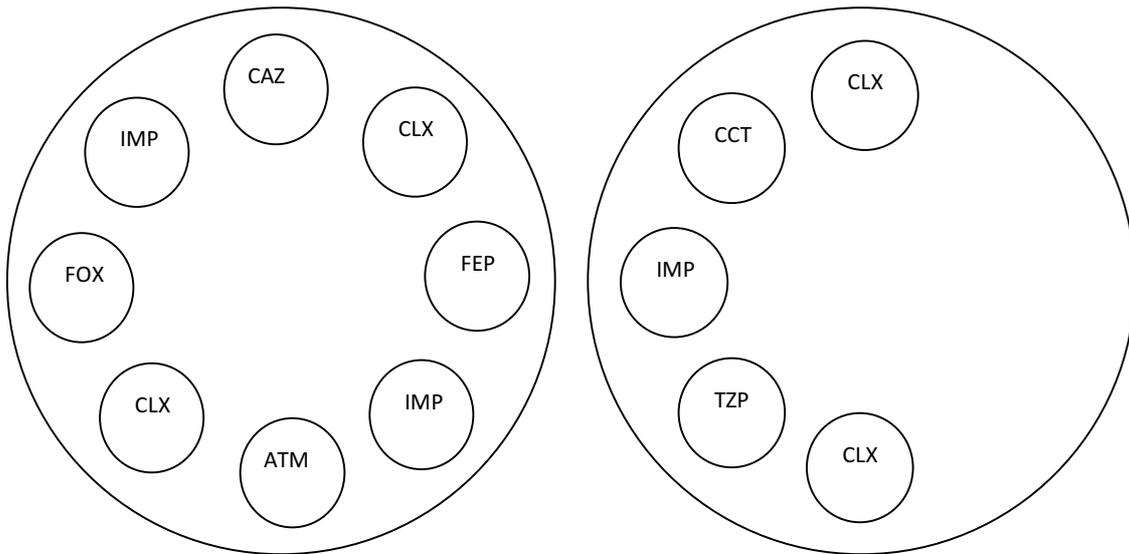


Abb. 2.2: Schema der Antibiotikaplättchenplatzierung

2.4.4 Kriterien der Beurteilung:

Zeigt sich zwischen dem Antibiotikum und dem Cloxacillin ein ellipsenförmiger Hemmhof (Champagnerkorken), so kann von einem synergetischen Effekt ausgegangen werden. Cloxacillin führt durch eine Hemmung der AmpC Beta-laktamase zu der Hemmhofverziehung, so dass bei einem Vorliegen eines Synergismus die AmpC-Bildung des Stammes wahrscheinlich ist.

Im Gegensatz dazu ist beim Vorliegen eines D-Phänomens zwischen Beta-laktam Antibiotikum und Imipenem von einer Induzierbarkeit von AmpC auszugehen. Die Induktion von AmpC führt zu einer verminderten Wirksamkeit des Cephalosporins und damit zu einer Abplattung des Hemmhofes auf der entsprechenden Seite.



Abb. 2.3: D-Phänomen. Deutlich gehemmter Hof zwischen CAZ und IMP

2.5 E-Test

Beim E-test handelt es sich um einen Gradienten-basierten Streifentest, wobei auf die eine Seite des Streifens von der Mitte bis zum einen Ende mit einer stetig steigenden Konzentration des Cephalosporins Cefotetan beschichtet ist. Die gegenüberliegende Seite des Streifens ist ebenfalls mit Cefotetan und zusätzlich mit Cloxacillin beschichtet, wiederum von der Mitte bis zum Ende in aufsteigender Konzentration. Nach Inkubation bei 37° C über Nacht, werden die beiden ellipsenförmigen Hemmhöfe jeweils an der Schnittstelle mit dem Streifen abgelesen.

2.5.1 Benötigte Reagenzien:

Tab. 2.9: Für den E-Test verwendete Reagenzien

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
Blutagar	Columbia-Agar mit Schafsblut Plus	PB5039A	Oxoid GmbH	Postfach 1007, 46467 Wesel
MH-Testagar	Müller-Hinton Testagar (30% Rindfleischauflage, 1,75% hydrolysiertes Casein, 0,15% Stärke, 1,7% Agar pH neutral eingestellt bei 25 °C)		I.f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede-Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen
0,85%ige NaCl-Lösung			I. f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede-Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen
E-Test CN/CNI	E-Test Cefotetan/Cefotetan+ Cloxacillin	537108	Biomerieux	Biomerieux Postfach 1204, 72602 Nürtingen

2.5.2 Benötigte Geräte:

Tab. 2.10: für den E-Test verwendete Geräte

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
Inkubator	Inkubator Typ BBD 6220		Heraeus, heute: Thermo Fischer GmbH	Robert-Boschstraße 1, 63505 Langenselbold
Sterile Impfschlingen 10µl	Impföse, 10µl 200MM, Blau, steril		Greiner Bio-One GmbH	Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen
Densimeter	Vitek Densichek		bioMérieux Deutschland GmbH	Weberstraße 8, 72622 Nürtingen

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
Densimeter-Röhrchen	Röhren, 5ml, 75x12mm, PS		Sarstedt AG&Co.	Sarstedtstraße 1, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
Sterile Wat-teststäbchen	Mai Med- Tip (kleiner Kopf)	PZN 0352012	Mai Med Medical	MaiMed GmbH Robert-Koch-Str. 1-7 29643 Neuenkirchen

2.5.3 Durchführung:

- Analog dem Vorgehen zur Erstellung eines Antibiogramms wurden die Stämme aufgetaut, ein McFarland zwischen 0,48 und 0,52 eingestellt und die Stämme auf Müller-Hinton Testagar ausgestrichen.
- Der E-Teststreifen wurde mit einer Pinzette auf die mit Pseudomonaden bestrichenen MH-Platten gelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Die Ablesung erfolgte an der Schnittstelle des Hemmhofes mit dem E-Test-Streifen auf dem die Antibiotikakonzentration abgelesen werden konnte.
- Die abgelesene MHK (minimale Hemmkonzentration) für Cefotetan und Cloxacillin wurden dokumentiert.

2.5.4 Kriterien der Beurteilung:

Wenn der Quotient aus MHK für Cefotetan + Cloxacillin und Cefotetan ≥ 8 ist, kann von einer AmpC-Bildung ausgegangen werden.

2.6 Hydrolyse Assay:

Das Prinzip des Hydrolyse Assay beruht auf dem Nachweis der Spaltung des Betalactamrings durch Betalaktamasen. Nitrocephin ist ein gelbliches Cephalosporin, das nach hydrolytischer Spaltung des Betalactamringes seine Farbe von gelb nach rot verfärbt, was man durch die Änderung der Absorption nach-

weisen kann [32]. Die Durchführung fand ähnlich wie von Peter-Getzlaff et al beschrieben statt [33].

2.6.1 Benötigte Reagenzien:

Tab. 2.11: Für den Hydrolyse Assay verwendete Reagenzien

Name	Hersteller-bezeichnung	Bestell-nummer	Hersteller	Ort
Blutagar	Columbia-Agar mit Schafsblut Plus	PB5039A	Oxoid GmbH	Postfach 1007, 46467 Wesel
0,85%NaC L-Lösung			I.f. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede- Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen
Cloxacillin	Cloxacillin Sodi- umsalt monohydrate	C9393-5G	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 82024 Taufkirchen
Nitrocephin	Nitrocephin 5g	184400	EMD Chemicals	EMD Chemicals, Inc. San Diego CA 92121
1x PBS- Puffer			I.f.Medizinische Mikrobiologie und Hygiene	Elfriede- Aulhornstraße 6, 72076 Tübingen

- Der PBS-Puffer wurde auf 0,1mM eingestellt, d.h. er wurde mit destilliertem Wasser 1:100 verdünnt. In einem 10ml Ansatz kamen 100µl 1xPBS und 9900µl destilliertes Wasser hinzu.
- Nitrocephin (0,5mg/ml) in 0,1mM PBS: Das Nitrocephin wurde in 0,1mM PBS-Puffer auf eine Konzentration von 0,5mg/ml eingestellt. In einen 10ml Ansatz kamen 5mg Nitrocephin, die in 10ml 0,1mM PBS gelöst wurden. Der Ansatz wurde auf 10 1,5ml große Eppendorfgefäße verteilt und bei -26°C aufbewahrt

- 500 μM Cloxacillin in 0,1 mM PBS: Das Cloxacillin wurde auf eine Konzentration von 500 μM mit 0,1mM PBS-Puffer eingestellt. Dabei wurde 0,0024g des Cloxacillins in 10ml 0,1mM PBS gelöst, in 1,5ml Eppendorfgefäße verteilt und bei -26°C aufbewahrt.

2.6.2 Benötigte Geräte

Tab. 2.12: Für den Hydrolyse Assay verwendete Geräte

Name	Herstellerbezeichnung	Bestellnummer	Hersteller	Ort
Inkubator	Inkubator Typ BBD 6220		Heraeus, heute: Thermo Fischer GmbH	Robert-Boschstraße 1, 63505 Langenselbold
Sterile Impfschlingen 10 μl	Impföse, 10 μl 200MM, Blau, steril		Greiner Bio-One GmbH	Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen
Densimeter	Vitek Densichek		bioMérieux Deutschland GmbH	Weberstraße 8, 72622 Nürtingen
Densimeter-Röhrchen	Röhren, 5ml, 75x12mm, PS		Sarstedt AG&Co.	Sarstedtstraße 1, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
Elisa 96-Well Platten	Nunc Microwell Plates, Nunclon Delta Surface	163320	Nuncbrand	Nunc Kampstufvef 90 P.O.BOX 280 DK-4000
Spectrometer	Tecan Sunrise TM		Tecan Group Ltd.	Seestraße 103 8708 Männerdorf Schweiz
Datenanalysesoftware	Magellan TM		Tecan Group Ltd.	Seestraße 103 8708 Männerdorf Schweiz

2.6.3 Durchführung:

- Frische Übernachtskulturen wurden auf McFarland 0,48 bis 0,52 in 0,85%NaCl mit Hilfe des Densimeters eingestellt.
- Nun wurden je 50 µl der verschiedenen Pseudomonadenkulturen in die Mikrotiterplatte pipettiert.
- Anschließend wurde 25 µl Cloxacillin bzw. 25 µl 0,1mM PBS hinzugefügt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
- Anschließend wurden 25 µl Nitrocephinlösung hinzugefügt und für weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert.
- Die Optische Dichte wurde bei 490nm gemessen, wobei die erste Messung nach 10 Minuten, die zweite nach 30 Minuten, die dritte nach 1 Stunde und die vierte nach 4 Stunden stattfand. Dazwischen wurde die Mikrotiterplatte immer wieder bei 37°C inkubiert.

Tab. 2.13: Pipettierschema Beispielhaft:

	Stamm1	Stamm 2	Stamm 3
A	50µl Bakterienkultur+ 25µl Cloxacillin+ 25µl Nitrocephin	50µl Bakterienkultur+ 25µl Cloxacillin+ 25µl Nitrocephin	50µl Bakterienkultur+ 25µl Cloxacillin+ 25µl Nitrocephin
B	50µl Bakterienkultur+ 25µl 10mM PBS+ 25µl Nitrocephin	50µl Bakterienkultur+ 25µl 10mM PBS+ 25µl Nitrocephin	50µl Bakterienkultur+ 25µl 10mM PBS+ 25µl Nitrocephin
C	50µl Bakterienkultur+ 50µl PBS	50µl Bakterienkultur+ 50µl PBS	50µl Bakterienkultur+ 50µl PBS

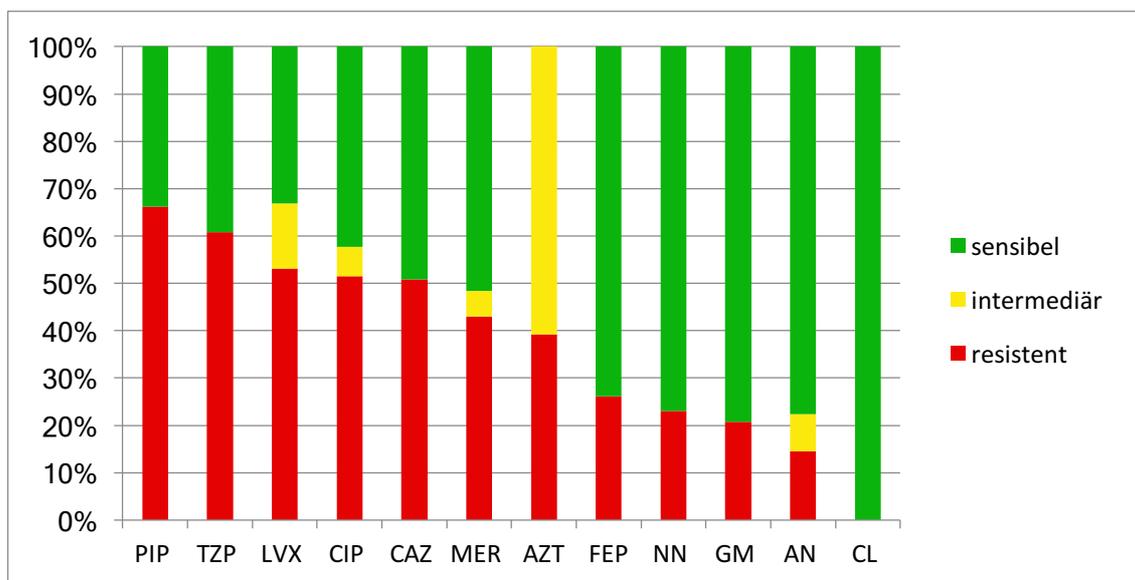
2.6.4 Kriterien der Beurteilung:

Jeder Stamm wurde mit Nitrocephin und mit Nitrocephin + Cloxacillin inkubiert. Wenn das Absorptionsmaximum eines Stammes, der mit Nitrocephin + Cloxacillin inkubiert wurde, signifikant niedriger war als die alleinige Absorption des Stammes mit Nitrocephin, spricht dies für das Vorliegen einer AmpC Beta-laktamase. Ein Unterschied um den Faktor 1,5 wurde als AmpC positiv gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Resistenzprofile der untersuchten Isolate

Für die vorgelegte Arbeit wurden *P. aeruginosa* Isolate untersucht, die aus der Routinediagnostik der medizinischen Mikrobiologie des UKT isoliert wurden. Die Auswahl der Stämme beinhaltet ein Isolat pro Patient, möglichst konsekutiv, wobei die Auswahl durch Einschluss von Ceftazidim resistenten und multiresistenten Stämmen angereichert wurde, um eine ausreichend hohe Anzahl resistenter Stämme für die Testevaluierung zu haben. Die Übersicht über die Ergebnisse der Resistenztestung der einzelnen Stämme ist in Tab.7.1 im Anhang dargestellt.



Diagr. 3.1: Prozentuale Verteilung der Antibiotikaresistenzen der 130 untersuchten *P. aeruginosa* Isolate

Insgesamt waren 66 von 130 (50,8%) der untersuchten Stämme Ceftazidim resistent. Bei der Ermittlung der Ko-Resistenzen der eingeschlossenen Isolate zeigte sich ein hoher Anteil von Stämmen mit einer Piperacillin 66,3% und Piperacillin/Tazobactam 60,8% Resistenz. Die Ko-Resistenz gegenüber Ciprofloxacin betrug 51,5%, die Resistenz gegenüber den Aminoglykosiden Gentamycin 20,8% und Amikacin 14,6%. Der hohe Anteil von Meropenem re-

sistenten Isolaten mit 43,1% liegt in der Auswahl der Isolate begründet, da bevorzugt multiresistente Isolate eingeschlossen wurden. Alle untersuchten Stämme waren sensibel gegenüber Colistin.

Drei-Klassen-Resistenz (3MRGN) und Vier-Klassen-Resistenz (4MRGN)

Die Einteilung von Multiresistenten Bakterien erfolgt in Deutschland nach der Klassifikation der KRINKO (Details siehe Material und Methoden), wobei 3 MRGN Isolate sich dadurch auszeichnen, dass sie eine Resistenz gegen 3 der 4 Antibiotikagruppen: Acylureidopenicilline (Piperacillin), 3./4. Generations-Cephalosporine (Ceftazidim), Carbapeneme (Meropenem) oder Fluorchinolone (Ciprofloxacin) aufweisen und 4 MRGN gegen alle 4 Vertreter der vorangehend aufgeführten Antibiotika resistent sind [29]. Von den 130 untersuchten Stämmen wurden 22 (16,9%) der Stämme als 3 MRGN klassifiziert und 37 (28,5%) der Stämme als 4 MRGN eingestuft. Bei der Beurteilung werden intermediäre Ergebnisse als resistent gewertet.

3.2 Auswertung des kombinierten Disk Test und Festlegung eines Goldstandards

Die in diese Arbeit eingeschlossenen Stämme wurden mit Hilfe des kombinierten Disk Tests auf das Vorhandensein der AmpC Betalaktamase untersucht. Analog zu dem Vorgehen bei Enterobakterien wurde angenommen, dass ein AmpC Test positiv ist, wenn durch Cloxacillin eine Vergrößerung des Hemmhofes um 5 mm oder mehr erreicht wurde. Als Basis für den Test wurden Ceftazidim, Cefoxitin und Piperacillin/Tazobactam verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Stämme sind in der Tab.7.2 im Anhang dargestellt. Die erzielten Ergebnisse wurden in Tab.3.1, Tab.3.2 und Tab.3.3 zusammengefasst. Um eine AmpC Expression möglichst sicher nachzuweisen und möglichst wenig falsch positive Ergebnisse zu erhalten, habe ich mich entschieden, strenge Kriterien für den Goldstandard anzusetzen. Ein Isolat wurde nur dann als AmpC Bildner eingestuft, wenn mindestens 2 der 3 Tests positiv bewertet wurden.

Tab. 3.1: Übersicht über die positiven Ergebnisse im kombinierten Disk Test unterteilt in Ceftazidim resistente und Ceftazidim sensible Isolate.

	Positiver kombinierter Disk Test n (%) basierend auf		
	Ceftazidim (CAZ) n (%)	Cefoxitin (FOX) n (%)	Piperacillin/ Tazobactam (TZP) n (%)
Ceftazidim resistent n=66	41 (62,1%)	13 (19,7%)	40 (60,6%)
Ceftazidim sensibel n=64	2 (3,1%)	8 (12,5%)	6 (9,4%)
Total n=130	43 (33,1%)	21 (16,2%)	46 (35,5%)

Der kombinierte Disk Test war positiv mit Ceftazidim als Basis in 43 (33,1%) Isolaten, mit Cefoxitin bei 21 (16,2%) Isolaten und mit Piperacillin/Tazobactam bei 46 (35,5%) Isolaten. Der Cefoxitin Disk Test gab bei deutlich weniger Isolaten ein positives Resultat. Die überwiegende Mehrheit der Isolate mit einem positiven kombinierten Disk Test war im Antibiogramm Ceftazidim resistent.

Tab. 3.2: Übersicht über die Ergebnisse an Isolaten, die nur in einem, zwei oder allen drei kombinierten Disk Tests ein positives Ergebnis aufwiesen.

	Positiver kombinierter Disk Test n (%)							
	3 Tests	2 Tests			1 Test			keiner
	CAZ + TZP + FOX	CAZ +TZP	TZP + FOX	CAZ + FOX	TZP	FOX	CAZ	alle ne- gativ
Ceftazidim resistent n=66	12	25	0	1	2	0	2	24
Ceftazidim sensibel n=64	1	2	2	0	2	5	0	52
Total n=130	13	27	2	1	4	5	2	76

Ein übereinstimmend positives Testresultat bei allen drei als Basis für den kombinierten Disk Test eingesetzten Antibiotika lag bei 13 Stämmen vor. Die beste Übereinstimmung bei zwei positiven kombinierten Disk Test Resultaten war bei 27 Stämmen zwischen Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam. Insgesamt war bei 11 Stämmen nur ein Test positiv. Von diesen Stämmen waren 7 Isolate Ceftazidim sensibel.

Definiert man den Goldstandard so, dass ein Stamm als AmpC positiv gewertet wird, wenn mindestens 2 der 3 kombinierten Disk Test Isolate positiv sind, ergibt sich die in Tab.3.3 zusammengefasste Verteilung von AmpC positiven und negativen Studienisolaten.

Tab. 3.3: Verteilung vom AmpC positiven und AmpC negativen Stämmen. Als Goldstandard wurden 2 von 3 positiven Ergebnissen im kombinierten Disk Test definiert.

	AmpC positiv n(%)	AmpC negativ n(%)
Ceftazidim resistent n=66	38 (57,6%)	28 (42,4%)
Ceftazidim sensibel n=64	5 (7,8%)	59 (92,2%)
Total n=130	43 (33,1%)	87 (66,9%)

3.3 Evaluierung des Nitrocephin basierten Hydrolyse Tests zum AmpC Nachweis

Als eine weitere Möglichkeit AmpC Produktion nachzuweisen, wurde ein auf einer enzymatischen Reaktion basierender Hydrolyse Test bei *Escherichia coli* beschrieben [15, 33]. Hierbei wird die Hydrolyse von Nitrocephin mit und ohne Zugabe von Cloxacillin verglichen. Kommt es nach Zugaben von Cloxacillin zu einer mehr als 1,5x fachen Inhibition der Nitrocephinhydrolyse, wird von einer AmpC Produktion ausgegangen. Die Übersicht über die Ergebnisse des Hydrolyse Tests sind im Anhang in Tab.7.3 und Tab.7.4 dargestellt. Sie sind dort den

Ergebnissen des Induktionstest aus Kapitel 3.4 gegenüber gestellt. Die Zusammenfassung ist in Tab.3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Nitrocephin Hydrolyse Tests zum Nachweis von AmpC

	Hydrolyse Test positiv n (%)	Hydrolyse Test negativ n (%)
AmpC positiv n=43	31 (72,1%)	12 (27,9%)
AmpC negativ n=87	15 (17,2%)	72 (82,8%)

Eine Übereinstimmung des Hydrolysetests mit dem Goldstandard lag bei den AmpC positiven Stämmen bei 31 (72,1%) Isolaten und bei den AmpC negativen Isolaten bei 72 (82,8%) Stämmen vor. Ein positiver Hydrolyse Test bei als AmpC negativ bewerteten Stämmen trat bei 15 (17,2%) der Stämme auf, wohingegen ein negativer Hydrolyse Test bei 12 (27,9%) der als AmpC positiv bewerteten Isolate auftrat. Um zu überprüfen, ob die AmpC Betalaktamase bei den im Hydrolyse Test negativen Isolaten noch weiter induzierbar gewesen wäre, wurden die Isolate bezüglich einer AmpC Induzierbarkeit weiter untersucht (siehe Kapitel 3.4).

3.4 Induzierbarkeit der AmpC Betalaktamase

Es wird davon ausgegangen, dass die Überexpression der AmpC Betalaktamase in *P. aeruginosa* ein mehrstufiger Prozess ist [15, 25]. Im nachfolgenden Experiment haben wir untersucht ob sich durch Imipenem die Expression der AmpC Betalaktamase der einzelnen Stämme weiter steigern lässt. Hierzu wurde eine mit *P. aeruginosa* bestrichene Platte mit zwei nebeneinanderliegenden Antibiotikahaltigen Plättchen bestückt, in diesem Fall Ceftazidim bzw. Piperacillin/Tazobaktam und daneben ein Imipenem Plättchen platziert. Kommt es durch Imipenem zu einer Expressionssteigerung, so verengt sich der Hemmhof für Piperacillin/Tazobactam beziehungsweise Ceftazidim (D-Phänomen). Die Indu-

zierbarkeit der Stämme ist in Tab.3.5 und Tab.3.6 dargestellt. In Tabelle 7.5 des Anhangs ist die Induzierbarkeit dem AmpC Status und der Ceftazidim Resistenz der Stämme gegenüber gestellt.

Tab. 3.5: Zusammenfassung der Induzierbarkeit von AmpC durch Imipenem unterteilt nach Ceftazidim sensiblen und Ceftazidim resistenten Stämmen.

	Induktionstest positiv in der Kombination		
	CAZ+IMP n (%)	TZP+IMP n (%)	CAZ+IMP und/oder TZP+IMP n (%)
Ceftazidim resistent n=66	21 (31,8%)	24 (36,4%)	28 (42,4%)
Ceftazidim sensibel n=64	49 (76,6%)	43 (67,2%)	52 (81,3%)
Total n=130	70 (53,8%)	67 (51,5%)	80 (61,5%)

In unserem Versuch wurde bei 70 (53,8%) Stämmen AmpC durch Ceftazidim + Imipenem induziert, bei Piperacillin/Tazobaktam waren es 67 (51,5%). Insgesamt konnte bei 28 von 66 Ceftazidim resistenten Stämmen durch Induktion mit Ceftazidim und/oder Pip/Tazo die AmpC Betalaktamase weiter induziert werden, das entspricht 42,4%. Im Gegensatz dazu war bei den Ceftazidim sensiblen bei 52 von 64 Stämmen eine Induktion durch Ceftazidim und/oder Piperacillin/Tazobaktam möglich, das entspricht 81,3%. Es ist noch zu bemerken, dass es bei einem Ceftazidim resistenten, AmpC positiven Stamm anstatt einem D-Phänomen zu einer Synergie kam, d.h. der Hemmhof hat sich noch vergrößert.

Tab. 3.6: Zusammenfassung der Induzierbarkeit von AmpC durch Imipenem aufgeteilt in AmpC positive und AmpC negative Isolate.

	Induktionstest positiv in der Kombination		
	CAZ+IMP n (%)	TZP+IMP n (%)	CAZ+IMP und/oder TZP+IMP n (%)
AmpC positiv n=43	11 (25,6%)	10 (23,3%)	14 (32,6%)
AmpC negativ n=87	59 (67,8%)	57 (65,5%)	66 (75,8%)
Total n=130	70 (53,8%)	67 (51,5%)	80 (61,5%)

Es zeigte sich, dass bei den AmpC positiven Stämmen in insgesamt 14 von 43 Isolaten durch Imipenem eine weitere AmpC Induktion hervorgerufen werden konnte, dies entspricht 32,6%. Bei den AmpC negativen Stämmen waren es 66 von 87 Stämmen, dies entspricht 75,8%. Insgesamt waren 95 der 130 Stämme, dies entspricht 73%, entweder direkt AmpC positiv im kombinierten Disk Test oder es ließ sich durch Imipenem eine AmpC Induktion hervorrufen.

3.5 Untersuchung der Isolate bezüglich des Vorliegens einer Extended-spektrum AmpC Betalaktamase

In der Regel umfasst das Hydrolyse Spektrum der AmpC Betalaktamase die 3. Generationscephalosporine Cefotaxim und Ceftazidim, wobei das Cefepim häufig nicht erfasst wird [4, 34]. Allerdings sind auch sogenannte Extended-spektrum AmpC Betalaktamasen beschrieben worden, die Cefepim hydrolysieren können [17]. In der nachfolgenden Untersuchung soll bestimmt werden, inwiefern bei *P. aeruginosa* das Spektrum der AmpC Betalaktamase Cefepim mit einschließt. Hierzu wurde ein kombinierter Disk Test und ein AmpC Induktionstest mit Cefepim als Basis durchgeführt. Die Tab.7.6 zur Untersuchung auf das Vorliegen einer Extended-Spektrum AmpC Betalaktamase ist im Anhang zu

finden. Die Tab.3.7 und Tab.3.8 fassen die Ergebnisse zur Untersuchung auf eine Extended –Spektrum AmpC Betalaktamase zusammen.

Tab. 3.7: Zusammenfassung der Ergebnisse des kombinierten Disk Tests und Induktionstest mit Cefepim als Basis, aufgeteilt in Cefepim resistente und sensible Stämme.

	Kombinierter Disk Test Cefepim positiv n (%)	Induktionstest FEP+IMP positiv n (%)
Cefepim resistent n= 36	16 (44,4%)	3 (8,3%)
Cefepim sensibel n= 94	11 (11,7%)	34 (36,2%)
Total n=130	27 (20,8%)	37 (28,5%)

Tab. 3.8: Zusammenfassung der Ergebnisse des kombinierten Disk Tests und Induktionstest mit Cefepim als Basis, aufgeteilt in AmpC positive und negative Stämme

	Kombinierter Disk Test positiv n (%)	Induktionstest FEP+IMP positiv n (%)
AmpC positiv n=43	22 (51,2%)	7 (16,3%)
AmpC negativ n=87	5 (5,7%)	30 (34,5%)
Total n=130	27 (20,8%)	37 (28,5%)

Bei den 36 Cefepim resistenten Isolaten zeigte sich bei 44,4% ein positives Ergebnis im kombinierten Disk Test. Bei 3 (8,3%) wurde eine Induzierbarkeit durch Imipenem nachgewiesen. Unter den AmpC positiven Stämmen lagen die positiven Ergebnisse im kombinierten Disk Test bei 22 von 43 Stämmen, das entspricht 51,2%, so dass Cefepim Resistenz bei diesen Stämmen sehr wahr-

scheinlich auf Vorliegen von AmpC zurückzuführen ist. Weitere 30 von 87 der AmpC negativen Stämme, was 34,5% entspricht, zeigen eine positive Induktion mit Imipenen, das heißt, es liegt potenziell eine AmpC Betalaktamase mit einem verbreiterten Spektrum vor.

Bei den als AmpC positiv eingeteilten Stämme sind 15 Stämme Cefepim resistent (34,9%), wobei davon 13 Stämme (87,7%) einen positiven kombinierten Cefepim Disk Test aufweisen, was ebenfalls darauf hindeutet, dass bei diesen Stämmen AmpC für die Cefepim Resistenz verantwortlich ist.

Unter den Stämmen waren 3 Isolate bei denen sich zwischen Imipenem und Ceftazidim eine Synergie zeigte und sich der Hemmhof vergrößerte.

3.6 Charakterisierung der Meropenem resistenten *P. aeruginosa* Stämme bezüglich des Vorhandenseins einer AmpC Betalaktamase

Meropenem Resistenz kann durch verschiedene Resistenzmechanismen wie Effluxpumpen, Porinmutationen oder Carbapenemasen vermittelt werden [9, 12, 35]. Die Detektion der Expression einer AmpC-Betalaktamase ist daher in diesen Isolaten durch das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Resistenzmechanismen erschwert. Aztreonam ist in der Regel nicht durch Enzyme wie Carbapenemasen vom Metallo-Betalaktamase Typ betroffen [12], so dass im Folgenden das Vorhandensein beziehungsweise eine potentielle Induktion von AmpC im kombinierten Disk Test und Induktionstest mit Aztreonam als Basis untersucht wurde. Die AmpC Charakterisierung bei Meropenem resistenten Stämmen auf der Basis von Aztreonam ist in Tabelle 7.7 im Anhang zu finden. Die Übersicht dazu ist in Tab.3.9 dargestellt.

Tab. 3.9: Übersicht der kombinierten Disk Test und Induktionstest Ergebnisse mit Aztreonam in 56 Meropenem resistenten Stämmen.

Total n=56		Aztreonam intermediär n=24	Aztreonam resistent n=32	Total n=36
AmpC positiv n=22	Kombinierter Disk Test AZT positiv	3 (13,6%)	9 (40,9%)	12 (54,5%)
	Induktionstest AZT+IMP positiv	7 (31,8%)	1 (4,5%)	8 (36,4%)
AmpC negativ n=34	Kombinierter Disk Test AZT positiv	0 (0%)	2 (5,9%)	2 (5,9%)
	Induktionstest AZT+IMP positiv	10 (29,4%)	4 (11,85)	14 (41,2%)

Bei den Meropenem resistenten Stämmen waren 14 der 56 Stämme positiv im kombinierten Disk Test mit Aztreonam als Basis. Bei diesen Stämmen könnte eine AmpC Betalaktamase exprimiert werden. Hiervon waren 11 der Stämme auch Aztreonam resistent, drei der Stämme waren als intermediär gegenüber Aztreonam beurteilt worden. Aztreonam kann bei *P. aeruginosa* maximal als intermediär bewertet werden, da auf Grund der Definitionen für die Hemmhofgrößen keine sensiblen Isolate in der Wildtyppopulation vorkommen. Von den 14 Stämmen, die ein positives Ergebnis im kombinierten Disk Test zeigten gehörten 12 der Stämme zu den AmpC positiven Isolaten und zwei zu den AmpC negativen Isolaten. Die Induktion durch Imipenem bei Aztreonam intermediären Stämmen sowohl der AmpC positiven mit 31,8%, als auch der AmpC negativen mit 29,4% ist relativ hoch. Bei den Meropenem resistenten Stämmen ist eine Induktion von AmpC Betalaktamase bei insgesamt 22 (39,3%) der Stämme möglich.

Zwei Meropenem resistente und zusätzlich Aztreonam resistente Stämme zeigten in der Kombination Aztreonam und Imipenem einen Synergieeffekt.

3.7 Charakterisierung der Metallo-Betalaktamase exprimierenden multiresistenten *P. aeruginosa* Isolate

Von den Meropenem resistenten Stämmen wurde bei einer Untergruppe (n=10) in der Routine Diagnostik mittels PCR eine Metallo-Betalaktamase nachgewiesen. Die Ergebnisse davon sind in der nachfolgenden Tabelle Tab.3.10 und Tab.3.11 noch einmal gesondert dargestellt.

Tab. 3.10: Übersicht über Meropenem resistente Stämme mit Metallo-Betalaktamasen.

Angegeben sind die Hemmhofdurchmesser für die einzelnen getesteten Substanzen in mm. D-Phänomen zwischen Imipenem und Cefepim vorhanden (+) orange hinterlegt, sehr stark ausgeprägt (++) rot hinterlegt; grün steht für einen Synergieeffekt (S).

Stammnummer	AmpC Status	Carbapenem PCR	AZT	MER	AZT	AZT + CLX	Differenz in mm	AZT + IMP
5	negativ	IMP	29	5	29	29	0	+
124	negativ	IMP	15	5	15	16	1	S
146	negativ	IMP	29	5	28	29	1	++
162	negativ	IMP	28	5	29	29	0	++
241	positiv	IMP	20	5	20	25	5	+
261	negativ	IMP	5	5	5	5	0	-
341	negativ	IMP	11	5	13	14	1	-
403	negativ	IMP	5	5	5	5	0	-
184	negativ	VIM	24	5	25	25	0	-
689	negativ	VIM	22	5	20	22	2	-

Tab. 3.11: Übersicht über IMP und VIM Typen der Metallo-Betalaktamasen

Total n=10		IMP positiv n=8	VIM positiv n=2
Aztreonam intermediär n=6	Kombinierter Disk Test AZT positiv	1	0
	Induktionstest AZT+IMP positiv	4	0
Aztreonam resistent n=4	Kombinierter Disk Test AZT positiv n=0	0	0
	Induktionstest AZT+IMP positiv n=0	0	0

Die *P. aeruginosa* Stämme, bei denen eine Carbapenemase nachgewiesen werden konnte, war lediglich bei einem Stamm der kombinierte Disk Test bei Aztreonam positiv. Bei weiteren 4 Stämmen war eine Induktion von AmpC möglich. Alle fünf Stämme hatten eine Carbapenemase vom IMP Typ. Keiner der Stämme vom VIM Typ war positiv im kombinierten Disk Test oder zeigte eine AmpC Induktion.

3.8 Weitere Nachweismethoden von AmpC

Weitere AmpC Nachweismethoden, die in Enterobakterien, wie beispielsweise in *E. coli* oder Klebsiellen eingesetzt werden, sind der sogenannte Synergietest und der E-Test. Beim Synergietest werden Cloxacillin Disk in einem bestimmten Abstand zum 3. Generationscephalosporin platziert. Besteht ein Synergieeffekt durch Cloxacillin wird von einem AmpC produzierenden Stamm ausgegangen.

Der Synergietest war schwierig zu interpretieren und zu standardisieren, so dass er nicht weiter evaluiert wurde. Der E-Test ist ein Gradienten-basierter Streifen-test, bei dem ein Quotient zwischen der MHK mit und ohne Cloxacillin abgelesen wird. Aufgrund der für *P. aeruginosa* unpassenden Antibiotika Konzentrationen erbrachte dieser Test für den Nachweis von *P. aeruginosa* ebenfalls keine verwertbaren Informationen.

4 Diskussion

4.1 Phänotypische Methoden zum Nachweis von AmpC

Zum Nachweis von Betalaktamasen gibt es eine Reihe an phänotypischen Methoden, die vor allem bei Enterobakterien zum Einsatz kommen. Sie werden meist bei einem bestimmten beobachteten Resistenzphänotypen eingesetzt, um die zugrunde liegende Betalaktamase nachzuweisen. Beispiele des Nachweises klinischer Resistenzphänotypen sind in Tab.4.1 dargestellt. Für Enterobakterien gibt es verschiedene Nachweisverfahren, wobei die am häufigsten eingesetzten Tests der kombinierte Disk Test, der Synergietest oder der gradientenbasierte E-Test sind. In der Regel beruhen diese Tests auf dem Unterschied bezüglich der Resistenz zwischen dem Antibiotikum alleine und in Kombination mit seinem Inhibitor [14]. Bei dem Nachweis von AmpC wird dabei der Effekt ausgenutzt, dass AmpC durch Cloxacillin inhibiert werden kann [36].

Tab. 4.1: Resistenzphänotypen für den Nachweis von ESBL, AmpC-Betalaktamasen und Metallo-Betalaktamasen [14, 36].

Betalaktamase	Resistenzphänotyp					Hemmung durch		
	CAZ	CTX	CPD	FOX	IMP/MEM	CLS	CLX	EDTA
ESBL	(R)	(R)	R	S	S	+	-	-
AmpC	R	R	R	R	S	-	+	-
Metallo-Betalaktamase	R	R	R	R	R	-	-	+

So konnte beispielsweise bei einer Studie aus dem Jahr 2011 die an 51 *E. coli* Isolaten durchgeführt wurde, gezeigt werden, dass die phänotypischen Nachweismethoden auch bei komplexen zugrundeliegenden Resistenzmechanismen, wie chromosomal kodierte Mutationen im Promotor oder verschiedene plasmidkodierte AmpC Enzyme nachgewiesen werden können [33]. Am besten

schnitt hierbei der kombinierte Disk Test mit Cefoxitin als Basis Antibiotikum ab, aber auch die anderen phänotypischen Tests, einschließlich des E-Tests, zeigten bei > 90% der AmpC positiven Isolate ein positives Resultat [33].

Die kommerziell erhältlichen kombinierten Disk Tests sind für den Nachweis von AmpC bei Enterobacteriaceae in der Routinediagnostik weit verbreitet. Im Gegensatz dazu werden *P. aeruginosa* Isolate in der mikrobiologischen Diagnostik in der Regel nicht darauf hin überprüft, ob eine AmpC Betalaktamase gebildet wird. *P. aeruginosa* besitzt eine chromosomale AmpC Betalaktamase, deren Expression stufenweise durch Mutationen oder Enzyminduktion hochreguliert werden kann [17]. Für den Nachweis von AmpC in *P. aeruginosa* gibt es unterschiedliche Nachweismethoden und keinen allgemein gültigen Goldstandard. Bei den bislang durchgeführten Studien, die AmpC Bildung in *P. aeruginosa* in unterschiedlichen Ländern und Krankenhäusern untersucht haben, wurden verschiedene Nachweismethoden als Goldstandard gewählt [23, 30]. Diese umfassten unter anderem Synergietests [31], Resistenztestung von Ceftazidim auf Cloxacillinhaltigen Agarplatten [37], Betalaktamase Aktivitätstest [38] oder den kombinierten Disk Test [30].

Ich habe mich dafür entschieden, den kombinierten Disk Test als Goldstandard zu wählen, da er gut zu standardisieren ist und bereits zum Nachweis von AmpC bei Enterobakterien weit verbreitet ist. Zudem zeigte er eine hohe Sensitivität beim Nachweis von AmpC in *E. coli*, einschließlich in Isolaten, bei denen eine Hochregulation der chromosomalen AmpC Betalaktamase vorlag [33]. Um eine AmpC Expression möglichst sicher nachzuweisen und möglichst wenig falsch positive Ergebnisse zu erhalten, habe ich mich entschieden strenge Kriterien für den Goldstandard anzusetzen. Ein Isolat wurde nur dann als AmpC Bildner eingestuft, wenn mindestens 2 der 3 durchgeführten kombinierten Disk Tests positiv bewertet wurden, wobei als Basisantibiotikum Ceftazidim, Cefoxitin und Piperacillin-Tazobaktam eingesetzt wurden.

Insgesamt wurden 43 der 130 untersuchten Stämme als AmpC Bildner eingestuft.

Insgesamt zeigte der kombinierte Disk Test eine gute Übereinstimmung mit dem Hydrolyse basierten Test. 31 Stämme (72,1%) der 43 im kombinierten Disk Test als positiv bewerteten Stämme waren auch im Hydrolyse Test positiv. Im Hydrolyse Test zeigen sich 15 (17,2%) Stämme als positiv die im kombinierten Disk Test als nicht positiv gewertet wurden. 12 (27,9%) Stämme wurden im Hydrolyse Test negativ auf AmpC gewertet, welche im kombinierten Disk Test positiv waren. Gründe für die diskrepanten Ergebnisse könnten zum einen darin liegen, dass die AmpC Betalaktamase unterschiedlich stark induziert war in den Isolaten, als der Test durchgeführt wurde. Zudem kann ein Unterschied im Testergebnis auch darin begründet sein, dass das Spektrum der AmpC Betalaktamase der verschiedenen Stämme für die den Tests zugrunde liegenden Antibiotika unterschiedlich ist.

Der Synergietest war schwierig zu interpretieren und standardisieren, so dass er nicht weiter evaluiert wurde. Der E-Test hat aufgrund der für *P. aeruginosa* unpassenden Antibiotika Konzentrationen keine interpretierbaren und verwertbaren Ergebnisse geliefert, so dass er für *P. aeruginosa* nicht eingesetzt werden kann.

4.2 Bedeutung der AmpC Betalaktamase in den untersuchten klinischen *P. aeruginosa* Isolaten dieser Studie

4.2.1 Hoher Anteil von AmpC positiven Isolaten bei den untersuchten Stämmen

Unter den *P. aeruginosa* Stämmen fand sich eine hohe Rate an AmpC positiven Stämmen, von den 130 Stämmen waren 43 Isolate (33,1%) AmpC-Bildner. Insgesamt waren von den 66 Ceftazidim resistenten Stämmen in der vorliegenden Studie 39 Stämme (59,1%) AmpC positiv. Das bedeutet, dass bei deutlich über der Hälfte der getesteten Ceftazidim resistenten Stämme die Expression der AmpC Betalaktamase sehr wahrscheinlich zu dem resistenten Phänotyp der Isolate beiträgt.

In einer Studie von Tam et al wurde eine Gesamtprävalenz von AmpC positiven Stämmen von 18.3% im Jahr 2007 aus *P. aeruginosa* Isolaten eines Krankenhauses in Houston, USA, beschrieben [15]. In einer Folgestudie desselben Autors aus dem Jahre 2009 waren insgesamt 42 von 263 (16,0%) der untersuchten *P. aeruginosa* Stämme AmpC positiv [39]. Der Anteil der AmpC positiven Stämme bei den 63 Ceftazidim resistenten Stämmen lag mit den 42 Stämmen bei 66,7% [39]. Bei einer multizentrischen Studie, die in Spanien durchgeführt wurde, sind 190 *P. aeruginosa* Isolate aus Blutkulturen bezüglich ihres Resistenzmechanismus untersucht worden. Insgesamt wurde in 24,2% der Isolate eine AmpC Überexpression festgestellt. In der Gruppe der Ceftazidim resistenten Isolaten wurde eine AmpC Überexpression in 84% der Stämme nachgewiesen [16]. Meine Ergebnisse, sowie die anderenorts durchgeführten Studien demonstrieren, dass AmpC eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Ceftazidim Resistenz in *P. aeruginosa* spielt.

4.2.2 Induzierbarkeit von AmpC

Die Expression der AmpC Betalaktamase kann durch verschiedene Faktoren induziert werden. Verschiedene Antibiotika unterscheiden sich in ihrem Potenzial, AmpC induzieren zu können. Imipenem beispielsweise ist ein sehr potenter Induktor der AmpC Betalaktamase, ebenso Tazobaktam [40-42]. Es ist denkbar, dass es bei einem Ceftazidim sensiblen Stamm nach Kontakt mit Imipenem zu einer Induktion von AmpC kommt und der Stamm Ceftazidim resistent wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Induzierbarkeit der AmpC Betalaktamase dadurch überprüft, dass man den Ceftazidim Hemmhof beurteilt hat, nachdem der Stamm mit Imipenem oder Tazobaktam in Kontakt war.

Eine Induktion von AmpC konnte bei 80 (61,5%) Stämmen der insgesamt 130 untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Hierbei waren insgesamt 14 (32,6%) der induzierbaren Stämme bereits als AmpC positiv detektiert worden, bei 66 (75,8%) Stämmen war AmpC negativ. Unter den Ceftazidim resistenten Stämmen konnte bei 28 Stämmen der 66 Stämme (42,4%) eine weitere Induk-

tion von AmpC nachgewiesen werden; bei den Ceftazidim sensiblen Stämmen waren es 52 Stämme (81,3%).

Rechnet man die Stämme zusammen, bei denen AmpC induziert werden kann und die AmpC positiv sind, kommt man auf 109 Stämme, bei denen AmpC entweder exprimiert oder durch Imipenem oder Piperacillin/Tazobaktam induzierbar ist. Insbesondere besorgniserregend sind die Isolate, bei denen Ceftazidim sensibel getestet wurde und gleichzeitig AmpC positiv sind (n=4) oder AmpC induziert werden kann (n=52).

4.2.3 Extended-Spektrum Cephalosporinasen

Ceftazidim ist eines der klassischen Substrate der AmpC Betalaktamase. Eine ständige Evolution der AmpC Betalaktamasen durch Mutationen können dazu führen, dass das Spektrum erweitert wird und auch eine Resistenz gegenüber Cefepim durch die AmpC Betalaktamase verursacht wird [17]. Sie werden dann als Extended-Spektrum Cephalosporinase (ESACs) bezeichnet [43]. Um zu überprüfen, inwieweit auch die Resistenz unserer Stämme gegenüber Cefepim auf AmpC zurückzuführen ist, wurde der kombinierte Disk Test und der Induktionstest mit Cefepim als Basis durchgeführt. Insgesamt waren 36 der 130 untersuchten Stämme resistent gegenüber Cefepim. Von diesen Cefepim resistenten Stämmen waren 16 von 36 Stämme (44,4%) im kombinierten Disk Test mit Cefepim positiv. Von den Cefepim sensiblen Isolaten zeigten 11 Stämme (11,7%) einen positiven kombinierten Disk Test und bei 34 (36,2%) Stämmen war der Induktionstest positiv. Das bedeutet, dass es einen starken Hinweis darauf gibt, dass bei etwas weniger als der Hälfte unserer Cefepim resistenten Stämmen AmpC als Ursache für den beobachteten Phänotyp beteiligt zu sein scheint. Zudem kann bei ungefähr einem Drittel der Cefepim sensiblen Stämme durch AmpC Induktion Cefepim potenziell auch resistent werden. Neben AmpC spielt auch die Überexpression von Effluxpumpen eine Rolle. In einer spanischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von mexB bei 25% und von mexY bei 29% der untersuchten Cefepim resistenten Isolate vorlag [16].

4.2.4 Nachweis von AmpC Betalaktamase in multiresistenten *P.aeruginosa* Stämmen

Bei Meropenem resistenten Stämmen können verschiedene Resistenzmechanismen wie Effluxpumpen, Porinmutationen oder Carbapenemasen die Meropenemresistenz vermitteln [16, 31, 44]. Die Detektion der Expression einer AmpC ist daher durch gleichzeitig vorliegende Resistenzmechanismen insbesondere in diesen Isolaten erschwert.

Da Aztreonam ein Substrat der AmpC Betalaktamase ist, eignet sich Aztreonam in den MBL positiven Isolaten als Basis für den kombinierten Disk Test und für einen Induktionstest mit Imipenem. Die Ergebnisse für die Meropenem resistenten Stämme und die MBL positiven Stämme ließen keine eindeutige Zuordnung zu einem Phänotyp zu. So war nur bei 12 der insgesamt 22 AmpC positiven Isolate ein positiver kombinierter Disk Test mit Aztreonam als Basis vorhanden. Bei den MBL bildenden Stämme (n=10) war der kombinierte Disk Test in nur einem Isolat positiv. Wegen den verschiedenen Resistenzmechanismen, die in *P.aeruginosa* teilweise alle gleichzeitig vorkommen, ist es schwierig, den zugrunde liegenden Mechanismus eines klinischen Isolates genau zu kennen. So wurde beispielsweise bei der Untersuchung von 43 Blutkulturisolaten aus einem Lehrkrankenhaus in Brasilien gezeigt, dass bei den Ceftazdim resistenten Stämmen häufig mehrere Betalaktamasen gleichzeitig vorlagen. So wurde nur in 9,3% der Isolate AmpC alleine als mögliche Ursache der Ceftazdim Resistenz detektiert. In allen anderen Isolaten lagen weitere Betalaktamasen wie GES-1, CTX-M-2, GES-5, IMP-1 oder SPM-1 vor [37].

Liegen bei *P. aeruginosa* Stämmen gleichzeitig mehrere Resistenzmechanismen vor, wie dies bei multiresistenten Stämmen häufig der Fall ist, haben phänotypische Nachweisverfahren ihre Grenzen erreicht. PCR basierte Nachweisverfahren sind aufgrund der schwierigen regulatorischen Einflussfaktoren und der Vielzahl von Resistenzmechanismen ebenfalls schwierig. Neue Methoden, wie beispielsweise die komplette Genomsequenzierung von Bakterien, könnten eine Möglichkeit darstellen, in der Zukunft zu versuchen, die zugrundeliegenden

Resistenzmechanismen aufzuklären und mit der phänotypischen Resistenz zu korrelieren.

4.3 Klinische Relevanz der AmpC Betalaktamase

Die effektive Behandlung von *P. aeruginosa* stellt für die Kliniker auf Grund seiner vielen Resistenzmechanismen und Anpassungsmöglichkeiten eine große Herausforderung dar. Deshalb ist es wichtig diesen Organismus sehr genau zu verstehen und auf seine Resistenzmechanismen passende Antworten zu finden [35]. In einigen Studien wurde nachgewiesen, dass das Outcome von Patienten mit Infektionen durch multiresistente *P.aeruginosa* Stämmen signifikant schlechter ist, als bei Infektionen mit *P.aeruginosa* Stämmen, die nicht multiresistent sind, wobei die Multiresistenz in jeder Studie etwas anders definiert wurde; auch in einer klinischen Studie konnte von Aloush et al. 2006 gezeigt werden, dass eine Infektion mit einem multiresistenten *P. aeruginosa* Isolat mit einer signifikant höheren Mortalität einhergeht [45]. Das Vorliegen eines MDR *P. aeruginosa* stellt dabei keinen unabhängigen Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität dar. Die Applikation einer wirksamen Antibiotika Therapie konnte von Willmann et al 2013 als ein solcher identifiziert werden [46].

In einer retrospektiven Studie, bei der 42 *P.aeruginosa* Isolate, die AmpC Bildner waren mit 33 Isolaten einer Kontrollgruppe verglichen wurden, berichtet Tam et al., dass Patienten mit Infektionen die durch AmpC bildenden *P. aeruginosa* Stämmen verursacht wurden 67,5 mal häufiger mit einem uneffektiven Antibiotikum behandelt wurden, als Patienten, die mit einem AmpC negativen Stamm infiziert waren [39]. In der Schlussfolgerung empfiehlt der Autor, dass es möglicherweise angebracht ist, in einem epidemiologischen Setting mit einem hohen Anteil an AmpC produzierenden Stämmen, die Auswahl der initialen Therapie so zu wählen, dass auch AmpC bildende Stämme mit abgedeckt werden.

Die Auswahl der Therapie richtet sich nach einer initial empirisch begonnenen Therapie meist nach den Ergebnissen der Resistenztestung des isolierten Stammes. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei vie-

len Ceftazim sensiblen Stämmen AmpC positiv war oder eine AmpC Betalaktamase induziert werden kann. Bei einer Hochregulation von AmpC durch beispielsweise Tazobaktam oder Imipenem könnte der Stamm dann unter Therapie resistent gegenüber Piperacillin/Tazobaktam oder Ceftazidim werden. Bei Enterobacteriaceae beispielsweise, die eine induzierbare chromosomale AmpC Betalaktamase besitzen, wie *Enterobacter cloacae* oder auch *Citrobacter freundii* [17], hat die EUCAST empfohlen, bei einer sensiblen Testung im Antibiogramm ein Kommentar hinzuzufügen, der von einer Monotherapie mit 3. Generationscephalosporinen abrät [47].

4.4 Fazit

In der Arbeit konnte dargestellt werden, dass das AmpC einen großen Anteil an der Vermittlung von Resistenz gegenüber Ceftazidim und Piperacillin/Tazobaktam, sowie zu einem geringeren Anteil auch gegenüber Cefepim hat. Es konnte auch die Induktion von AmpC bei initial Ceftazidim sensiblen Isolaten dargestellt werden. Aufgrund der Vielzahl von Resistenzmechanismen, die sich gegenseitig beeinflussen können ist es insbesondere bei multiresistenten Isolaten schwierig durch phänotypische Tests eindeutige Rückschlüsse auf den Resistenzmechanismus zu ziehen. Der Einsatz eines der evaluierten Nachweisverfahren in der Routinediagnostik erscheint daher derzeit noch nicht empfehlenswert. Weitere Untersuchungen bei denen beispielsweise die Resistenzgene des kompletten Genoms mit der phänotypischen Resistenztestung verglichen werden stellen vielversprechenden Ansätze für die Zukunft dar.

5 Zusammenfassung

P. aeruginosa ist zusammen mit *S. aureus* und *E. coli* einer der häufigsten Keime, der für nosokomiale Infektionen in den Krankenhäusern verantwortlich ist. *P. aeruginosa* kann eine Vielzahl von Resistenzmechanismen besitzen, was eine zunehmende Herausforderung bei der Auswahl einer geeigneten antibiotischen Therapie darstellt. Einen wichtigen Resistenzmechanismus stellt die Hochregulation der chromosomal kodierten AmpC Betalaktamase dar, die eine Resistenz gegenüber wichtigen therapeutischen Antibiotika wie Ceftazidim und Piperacillin/Tazobaktam vermitteln kann.

Während der Nachweis von AmpC bei Enterobacteriaceae durch den kommerziell erhältlichen kombinierten Disk Test in der Routinediagnostik weit verbreitet ist, werden *P. aeruginosa* Isolate in der mikrobiologischen Diagnostik in der Regel nicht darauf hin überprüft, ob eine AmpC Betalaktamase gebildet wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, 130 klinischen *P. aeruginosa* Isolaten mit Resistenzen gegenüber Piperacillin-Tazobactam, Ceftazidim oder Cefepim, aber auch sensible Stämme auf das Vorhandensein einer AmpC Betalaktamase, sowie der Induzierbarkeit von AmpC hin zu untersuchen. Verschiedene phänotypische Nachweismethoden sollten bezüglich ihres Einsatzes in der mikrobiologischen Routinediagnostik evaluiert werden. Als Goldstandard wurden mindestens zwei positive Ergebnisse von drei durchgeführten kombinierten Disk Tests gewählt.

Insgesamt waren 43 (33,1%) der 130 untersuchten Stämme AmpC Betalaktamase positiv und 87 Stämme AmpC negativ. Eine Übereinstimmung mit dem evaluierten Nitrocephin Hydrolysetest lag für die AmpC positiven Stämmen bei 31 Isolaten (72,1%) und bei den als AmpC negativen Isolaten bei 72 Stämmen (82,8%) vor. Der ebenfalls evaluierte Synergietest war schwierig zu standardisieren und abzulesen, so dass er ebenso wie der ETest zum AmpC Nachweis bei *P. aeruginosa* als ungeeignet für einen Routineeinsatz anzusehen ist.

Insgesamt waren von den 66 Ceftazidim resistenten Stämmen in der vorliegenden Studie 39 Stämme (59,1%) AmpC positiv. Das bedeutet, dass bei deutlich über der Hälfte der getesteten Ceftazidim resistenten Stämme die Expression der AmpC Betalaktamase sehr wahrscheinlich zu dem resistenten Phänotyp der Isolate beiträgt.

Eine Induktion von AmpC durch Imipenem oder Tazobaktam konnte bei 80 (61,5%) Stämmen der insgesamt 130 untersuchten Stämme nachgewiesen werden. Hierbei waren insgesamt 14 (32,6%) der induzierbaren Stämme bereits als AmpC positiv detektiert worden, 66 (75,8%) Stämme waren AmpC negativ. Unter den Ceftazidim resistenten Stämmen konnte bei 28 Stämmen der 66 Stämme (42,4%) eine weitere Induktion von AmpC nachgewiesen werden; bei den Ceftazidim sensiblen Stämmen waren es 52 Stämme (81,3%). Insgesamt fanden sich 109 Isolate die entweder AmpC positiv waren oder bei denen durch Imipenem oder Piperacillin/Tazobaktam AmpC induzierbar werden konnte. Insbesondere besorgniserregend sind die Isolate, bei denen Ceftazidim sensibel getestet wurde und die AmpC positiv sind (n=4) oder AmpC induziert werden kann (n=52).

Um zu überprüfen, inwieweit auch die Resistenz unserer Stämme gegenüber Cefepim auf AmpC zurückzuführen ist, wurde der kombinierte Disk Test und der Induktionstest mit Cefepim als Basis durchgeführt. Von den Cefepim resistenten Stämmen waren 16 von 36 Stämme (44,4%) im kombinierten Disk Test mit Cefepim positiv. Von den Cefepim sensiblen Isolate zeigten 11 Stämme (11,7%) einen positiven kombinierten Disk Test und bei 34 (36,2%) Stämmen war der Induktionstest positiv. Das bedeutet, dass es einen starken Hinweis darauf gibt, dass bei etwas weniger als der Hälfte unserer Cefepim resistenten Stämmen AmpC als Ursache für den beobachteten Phänotyp beteiligt zu sein scheint. Zudem kann bei ungefähr einem Drittel der Cefepim sensiblen Stämme durch AmpC Induktion Cefepim potenziell auch resistent werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in unserem epidemiologische Setting AmpC eine wichtige Rolle als Ursache für eine Ceftazidim Resistenz und zu einem geringeren Anteil auch bei Cefepim spielt. Mit dem kombi-

nierten Disk Test steht ein gut durchführbarer phänotypischer Test zur Verfügung, wobei die Aussagekraft eines phänotypischen Tests bei multiresistenten Stämmen limitiert sein wird. Zur Auflösung komplexer parallel vorliegender Resistenzmechanismen wird die komplette Genomsequenzierung zukünftig an Bedeutung gewinnen. Prospektive klinische Studien werden benötigt, um einen Zusammenhang zwischen AmpC positiven und AmpC induzierbaren Stämmen mit dem Outcome der Patienten bei den verschiedenen Therapieregimen zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Gastmeier, P., Nosokomiale Infektionen, in Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, S. Suerbaum, et al., Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 882-885.
2. Robert Koch Institut. Deutsche Daten im Rahmen der ersten europäischen Prävalenzerhebung zum Vorkommen nosokomialer Infektionen und zur Antibiotikaaanwendung, Epidemiologisches Bulletin Nr. 26, 2012.
3. Madigan T.M. , Martinko J.M. Brock Mikrobiologie 11.Auflage, p.786-795. 2006: Pearson Studium.
4. Pfeifer, Y., ESBL, AmpC und Carbapenemasen: Vorkommen, Verbreitung und Diagnostik β -Lactamase-bildender Gram-negativer Krankheitserreger / ESBL, AmpC and carbapenemases: emergence, dissemination and diagnostics of β -lactamase-producing Gram-negative pathogens, Vol 34, Nr. 4, in LaboratoriumsMedizin. 2010. p. 205-215.
5. Slonczewski, J.L., and John W. Foster, Mikrobiologie: Eine Wissenschaft mit Zukunft, Übersetzung: J.Hilbig, B.Jarosch, L.Seidler, O.Werner 2ed. 2012: Springer-Verlag. p. 1197-2236.
6. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin Charité Berlin, ITS-KISS 8/2013, alle Stationen. Veröffentlicht 07.08.2013 [hvtp://http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/its/200801_201212_ITS_reference.pdf](http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/its/200801_201212_ITS_reference.pdf) , letzter Zugriff: 07.05.2016.
7. Steinmetz, I., Nichtfermentierende Bakterien (Nonfermenter): Pseudomonas, Burkholderia, Stenotrophomonas, Acinetobacter, in Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, S. Suerbaum, et al., Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 265-274.
8. Phillips, P.L., R.D. Wolcott, and J. Fletcher, Biofilme einfach erklärt, Wounds international Band1,Auflage 3 http://www.woundsinternational.com/media/issues/334/files/content_9607.pdf, letzter Zugriff: 07.05.2016. 2010.
9. Poole, K., Pseudomonas aeruginosa: resistance to the max. Front Microbiol, 2011. 2: p. 65.
10. Medheadlines, Brasilien Model dies of Pseudomonas Infektion, Medheadlines vom 24.01.2009 <http://medheadlines.com/2009/01/urinary-tract-infection-leads-to-multiple-amputations-for-brazilian-model-2/> letzter Zugriff: 07.05.2016.

11. Ziesing, S. and M. Fille, Resistenz, in Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, S. Suerbaum, et al., Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 699-701.
12. Zhao, W.-H. and Z.-Q. Hu, β -Lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology*, 2010. 36(3): p. 245-258.
13. M.E.A., d.K., et al., The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clinical Microbiology and Infektion*, 2013. 19: p. 860-868.
14. Witte, W. and M. Mielke, β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 2003. 46(10): p. 881-890.
15. Tam, V.H., et al., Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007. 13(4): p. 413-418.
16. Cabot, G., et al., Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011. 55(5): p. 1906-1911.
17. Jacoby, G.A., AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009. 22(1): p. 161-182.
18. Bush, K. and G.A. Jacoby, Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010. 54(3): p. 969-976.
19. Aktories, K., et al., Allgemeine und Spezielle Pharmakologie, Kap. 36.2: β -Lactam Antibiotika, Urban & Fischer Verlag. Vol. 10. Auflage. 2009. 753-759.
20. Lister, P.D., D.J. Wolter, and N.D. Hanson, Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009. 22(4): p. 582-610.
21. Josenhans, C. and H. Hahn, Bakterien: Definition und Aufbau, in Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, S. Suerbaum, et al., Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 173-182.
22. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. ECDC, 34-46 (2013). <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>, letzter Zugriff: 31.05.2016.

23. Rodríguez-Martínez, J.-M., L. Poirel, and P. Nordmann, Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009. 53(11): p. 4783-4788.
24. Poole, K., Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, 2007. 39(3): p. 162-176.
25. Juan, C., et al., Stepwise Upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Chromosomal Cephalosporinase Conferring High-Level β -Lactam Resistance Involves Three AmpD Homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. 50(5): p. 1780-1787.
26. Chow, J.W., et al., Enterobacter Bacteremia: Clinical Features and Emergence of Antibiotic Resistance during Therapy. *Annals of Internal Medicine*, 1991. 115(8): p. 585-590.
27. Testing, E.C.o.A.S., EUCAST: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Clinical Breakpoint Version 3.1. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf letzter Zugriff: 8.03.2016 2013.
28. Institute, C.a.L.S., M 100- S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement.; http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf letzter Zugriff: 08.05.2016. 2013: p. CLSI document M100-S23.
29. KRINKO: Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen, Bundesgesundheitsblatt 2012 ,Vol 55, Issue10, 1311-1354, https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Kommission/Downloads/Gramneg_Erreger.pdf?__blob=publicationFile letzter Zugriff: 08.05.2016. 2012.
30. Rawat, V., M. Singhai, and P.K. Verma, Detection of Different β -Lactamases and their Co-existence by Using Various Discs Combination Methods in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Journal of Laboratory Physicians*, 2013. 5(1): p. 21-25.
31. Upadhyay, S., M.R. Sen, and A. Bhattacharjee, Presence of different beta-lactamase classes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* expressing AmpC beta-lactamase enzyme. 2010. Vol. 4. 2010.
32. Sutton, L.D., et al., Development, characterization and initial evaluations of S1. A nev chromogenic cephalosporin for β -lactamase detection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 1-8. 1995.

33. Peter-Getzlaff, S., et al., Detection of AmpC Beta-Lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of Three Phenotypic Confirmation Assays and Genetic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011. 49(8): p. 2924-2932.
34. Wiegand, I., *Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch Beta-Lactamasen*. Vol. 12. 2003. 151.
35. Hirsch, E.B. and V.H. Tam, Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, 2010. 10(4): p. 441-451.
36. Drieuxa, L., et al., Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008. 14: p. 90-103.
37. Picao, R.C., et al., Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(9): p. 3908-13.
38. Rodríguez-Martínez, J.-M., L. Poirel, and P. Nordmann, MECHANISMS OF RESISTANCE: Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.* May 2009 53:5 1766-1771; 2009.
39. Tam, V.H., et al., Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009. 63(3): p. 279-285.
40. Dunne, W.M. and D.J. Hardin, Use of Several Inducer and Substrate Antibiotic Combinations in a Disk Approximation Assay Format To Screen for AmpC Induction in Patient Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, and *Serratia spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. 43(12): p. 5945-5949.
41. Bagge, N., et al., *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(4): p. 1175-87.
42. Bush, K., et al., Penicillin-binding proteins and induction of AmpC beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Impact Factor: 4.48)*. 10/1997; 41(9):2013-5., 1997.

43. Rodríguez-Martínez, J.M., et al., Genetic characterization of an extended-spectrum AmpC cephalosporinase with hydrolysing activity against fourth-generation cephalosporins in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* selected in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012. 67(1): p. 64-68.
44. Wolter, D.J., N.D. Hanson, and P.D. Lister, AmpC and OprD are not involved in the mechanism of imipenem hypersusceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates overexpressing the mexCD-oprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(11): p. 4763-6.
45. Aloush, V., et al., Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. 50(1): p. 43-48.
46. Willmann, M., et al., Time series analysis as a tool to predict the impact of antimicrobial restriction in antibiotic stewardship programs using the example of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57.
47. Leclercq, R., et al., EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*, 2011. 19.

7 Anhang

Tab. 7.1: Übersicht über die Antibiotikaresistenz der untersuchten *P. aeruginosa* Stämme.

Sensible Resultate sind in grün, intermediäre Resultate in gelb und ein resistentes Testergebnis in rot hinterlegt. Die Zahlen sind die Durchmesser der Hemmhöfe in mm. Hellgrüne Hinterlegung: zur Beurteilung der 3 bzw. 4 Klassen Resistenz zugrundeliegenden Antibiotika.

Stammnummer	GM	NN	PIP	TZP	CAZ	LVX	CIP	MER	FEP	AZT	AN	CL
5	5	5	15	24	5	5	5	5	10	29	24	14
8	21	24	20	22	21	23	30	27	21	17	21	14
9	20	23	15	13	18	28	35	35	26	24	24	14
15	5	5	14	23	5	5	5	5	10	25	23	15
16	14	19	5	5	5	5	5	13	18	14	16	15
17	21	23	13	16	15	29	34	34	25	24	22	14
25	24	28	7	8	10	7	14	5	20	10	29	16
27	20	24	5	5	5	9	16	5	13	11	25	14
36	20	#	5	5	5	8	17	5	15	11	24	12
47	19	23	5	5	5	27	31	9	17	12	20	14
56	21	24	20	23	21	5	13	27	27	21	26	13
61	21	22	23	24	21	28	32	30	30	25	27	13
73	22	23	9	10	9	24	30	5	25	20	26	14
74	21	23	24	25	23	26	34	34	28	25	26	14
89	18	22	5	11	9	24	30	31	22	20	21	14
90	19	22	13	14	11	5	12	28	20	10	24	13
95	22	26	5	8	5	26	33	33	19	15	25	15
110	20	23	16	18	15	16	23	5	23	16	23	14
111	19	22	12	16	11	20	28	30	20	23	22	14
112	18	21	12	13	15	5	5	5	17	10	20	15
122	16	20	24	26	22	22	31	35	25	27	20	15
124	5	5	5	5	5	5	5	5	5	15	5	15
127	5	5	5	5	5	5	5	5	5	15	10	15
137	5	12	36	36	26	22	30	44	28	40	5	19
145	21	24	25	27	22	9	15	35	25	27	25	14
146	5	5	15	24	5	5	5	5	8	29	21	14
147	19	18	5	13	25	5	5	33	34	30	20	14

Stamm- nummer	GM	NN	PIP	TZP	CAZ	LVX	CIP	MER	FEP	AZT	AN	CL
157	21	23	29	20	19	18	23	8	23	12	28	13
159	20	23	23	27	27	25	31	34	27	26	24	13
162	5	5	12	20	5	5	5	5	5	28	22	14
163	18	21	5	8	8	20	28	5	19	14	24	14
172	20	22	27	27	23	25	30	33	26	26	23	14
184	5	16	9	10	10	5	8	5	20	24	25	14
185	21	24	13	15	14	8	15	16	21	21	25	13
188	25	24	25	24	24	23	32	30	30	28	28	13
193	20	23	19	18	18	16	25	31	22	14	25	15
206	22	23	26	25	24	26	35	35	28	25	27	14
209	5	5	20	18	19	5	12	25	20	31	5	16
232	18	23	5	7	5	5	13	14	18	17	23	14
239	18	22	23	21	21	22	26	30	24	20	23	13
241	5	5	9	10	5	5	5	5	9	20	20	14
244	13	19	5	5	5	5	5	10	11	14	17	15
261	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	12	13
262	5	5	5	5	26	5	5	5	18	17	17	14
271	5	5	5	5	28	5	5	5	17	19	18	14
272	15	20	25	24	22	5	8	32	23	17	20	14
273	18	22	13	16	12	8	15	20	23	20	21	15
278	22	25	16	17	16	5	20	21	26	10	26	15
281	23	25	20	20	20	5	5	28	29	15	28	13
286	22	24	24	25	24	28	34	34	30	25	25	14
288	11	19	5	9	9	5	5	7	22	14	16	16
316	19	19	14	16	16	13	19	28	17	15	26	16
329	21	24	20	20	20	5	5	24	23	20	26	14
341	5	5	5	5	5	5	5	5	5	11	17	15
342	5	5	25	24	13	20	15	13	5	5	5	11
347	25	24	19	19	18	18	24	16	21	14	30	13
354	20	23	20	20	20	18	25	33	24	18	26	14
363	5	5	5	5	16	5	5	5	20	22	18	11
371	22	25	21	23	22	17	22	17	27	22	25	15
379	25	23	12	13	11	20	27	27	20	11	32	15
387	5	5	5	5	22	5	5	5	5	5	14	14
403	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	14	15
429	5	5	30	34	19	14	13	13	16	5	5	16

Stamm- nummer	GM	NN	PIP	TZP	CAZ	LVX	CIP	MER	FEP	AZT	AN	CL
441	15	19	5	8	12	5	5	12	20	17	17	15
447	5	5	5	5	5	5	5	5	15	21	11	15
451	21	23	5	5	5	26	30	30	15	10	22	14
495	18	23	23	25	20	28	34	34	28	23	23	15
501	21	26	13	17	10	30	36	34	23	20	25	14
526	19	23	23	24	20	17	28	32	28	23	20	11
543	24	27	5	5	5	10	19	23	19	13	25	14
547	5	15	27	27	23	24	29	44	26	34	5	18
549	7	15	5	5	5	17	27	5	16	12	9	15
604	27	34	26	28	28	18	27	29	21	38	30	11
623	15	20	10	14	10	14	14	15	23	28	17	15
628	19	23	13	18	20	17	30	25	27	18	21	14
630	22	23	16	18	18	20	30	23	25	20	26	13
641	19	22	5	8	5	25	30	16	19	15	23	14
652	18	15	10	20	10	5	5	5	25	20	23	13
656	20	25	20	22	23	5	10	42	30	25	21	20
657	20	22	12	14	12	5	13	5	18	9	25	14
661	19	22	16	17	19	17	22	6	25	18	25	15
677	20	22	17	15	13	18	24	5	20	11	26	15
682	17	18	5	10	8	5	5	18	18	15	13	14
689	5	5	7	10	10	5	5	5	11	22	15	15
693	18	20	11	12	9	19	28	5	18	7	23	14
713	21	23	5	8	8	30	35	32	26	20	23	14
718	21	29	18	20	15	18	27	30	23	12	27	15
727	20	22	18	18	20	21	30	32	24	17	19	14
735	23	10	12	15	6	5	5	22	21	21	20	13
740	22	26	21	23	22	5	5	27	27	23	30	18
755	22	24	17	17	15	17	26	30	22	16	26	15
784	17	21	21	21	20	23	30	32	22	23	20	15
787	30	30	6	11	8	5	5	13	19	16	33	14
789	25	28	27	27	27	22	29	33	34	28	25	17
797	5	5	6	7	10	5	5	6	11	17	12	13
815	16	21	5	8	6	13	21	11	15	13	22	13
831	5	5	23	23	21	5	5	30	22	22	27	13
836	25	28	22	23	22	13	23	33	27	20	27	17
844	17	21	20	22	20	5	5	32	20	21	21	15

Stamm- nummer	GM	NN	PIP	TZP	CAZ	LVX	CIP	MER	FEP	AZT	AN	CL
845	16	20	10	13	11	13	20	13	20	16	20	14
847	22	25	15	16	15	5	5	26	23	12	24	16
851	13	12	15	17	12	16	18	17	15	9	9	14
864	20	24	5	6	5	5	15	30	16	12	22	14
865	22	24	20	20	18	17	23	32	23	15	26	12
868	25	27	17	19	20	22	32	30	27	19	28	16
870	12	22	23	24	23	18	26	33	24	25	18	15
877	8	9	27	27	16	8	5	5	10	5	8	15
881	16	18	16	18	16	5	6	27	17	16	19	13
906	12	18	21	25	25	5	5	16	13	12	16	14
908	5	10	8	20	20	10	7	28	23	18	18	12
915	16	22	7	10	9	10	15	32	20	16	20	16
954	21	23	5	6	8	29	33	29	15	14	25	13
966	20	21	25	25	23	27	33	30	27	25	25	13
967	21	24	13	13	14	24	30	29	22	17	14	25
989	21	23	10	12	11	28	34	22	28	16	25	12
991	17	20	16	18	17	5	6	7	20	15	20	13
995	20	21	5	6	8	30	35	28	15	15	23	12
1032	20	22	20	20	18	28	33	25	20	20	22	16
1057	22	25	19	19	20	18	25	12	25	18	27	13
1084	16	20	16	18	16	5	5	16	19	14	18	13
1085	18	21	17	18	18	5	5	24	23	13	14	21
1131	10	17	18	20	19	24	32	32	20	23	12	15
1138	23	24	5	8	7	32	35	30	18	18	25	14
1161	23	25	5	7	6	30	35	29	17	15	26	14
1183	19	23	27	28	25	6	8	31	30	27	24	14
1185	18	23	9	13	13	19	30	27	21	17	25	13
1191	23	24	15	16	17	18	25	29	22	15	27	12
1236	22	24	6	7	9	21	25	11	19	13	26	14
1237	19	22	20	21	21	22	28	32	24	21	23	14
1252	5	5	5	5	22	5	5	5	9	11	16	13

Tab. 7.2: Übersicht über die Resultate des kombinierten Disk Test.

Angegeben sind die Hemmhofdurchmesser für die einzelnen getesteten Substanzen in mm. Blau hinterlegt sind die Stämme, bei denen es durch Cloxacillin zu einer Vergrößerung des Hemmhofes um mindestens 5 mm kam. Der AmpC Status ist in der rechten Spalte wie folgt dargestellt: die AmpC negativen Stämme (kein oder nur ein Test positiv) sind grün hinterlegt, die AmpC positiven Stämme (mindestens 2 positive Testergebnisse) sind gelb hinterlegt. AmpC positive Stämme, die Cefprozidim empfindlich sind, wurden rot hinterlegt.

Stammnummer	CAZ	CAZ + CLX	Differenz	FOX	FOX + CLX	Differenz	TZP	TZP + CLX	Differenz	AmpC Status
5	5	8	3	5	8	3	22	25	3	negativ
8	22	22	0	5	5	0	23	25	2	negativ
9	21	25	4	5	13	8	20	27	7	positiv
15	5	10	5	5	10	5	23	26	3	positiv
16	5	21	16	5	8	3	5	21	16	positiv
17	19	24	5	5	12	7	17	25	8	positiv
25	10	15	5	5	5	0	8	17	9	positiv
27	5	14	9	5	5	0	5	16	11	positiv
36	5	15	10	5	5	0	5	16	11	positiv
47	5	12	7	5	5	0	5	18	13	positiv
56	24	25	1	5	5	0	20	22	2	negativ
61	23	23	0	5	8	3	23	27	4	negativ
73	15	20	5	5	5	0	10	19	9	positiv
74	23	24	1	5	10	5	24	26	2	negativ
89	10	20	10	5	8	3	8	20	12	positiv
90	14	15	1	5	5	0	14	16	2	negativ
95	5	20	15	5	12	7	5	19	14	positiv
110	16	18	2	5	5	0	17	20	3	negativ
111	15	23	8	5	5	0	18	25	7	positiv
112	17	17	0	5	5	0	14	17	3	negativ
122	22	23	1	5	5	0	25	26	1	negativ
124	5	5	0	5	5	0	5	5	0	negativ
127	5	5	0	5	5	0	5	5	0	negativ
137	26	30	4	5	30	25	36	36	0	negativ
145	25	26	1	5	8	3	28	28	0	negativ
146	5	9	4	5	9	4	26	26	0	negativ
147	27	28	1	17	23	6	17	23	6	positiv

Stamm- nummer	CAZ	CAZ + CLX	Differenz	FOX	FOX + CLX	Differenz	TZP	TZP + CLX	Differenz	AmpC Status
157	15	17	2	5	5	0	20	20	0	negativ
159	26	26	0	5	7	2	30	30	0	negativ
162	5	5	0	5	5	0	21	23	2	negativ
163	11	18	7	5	5	0	8	20	12	positiv
172	24	24	0	5	5	0	20	22	2	negativ
184	11	11	0	5	5	0	10	11	1	negativ
185	16	21	5	5	11	6	14	21	7	positiv
188	22	22	0	5	5	0	23	25	2	negativ
193	17	18	1	5	5	0	18	19	1	negativ
206	24	24	0	5	10	5	21	22	1	negativ
209	16	25	9	5	21	16	18	26	8	positiv
232	5	19	14	5	5	0	8	22	14	positiv
239	20	22	2	5	5	0	21	21	0	negativ
241	5	11	6	5	10	5	14	22	8	positiv
244	5	16	11	5	5	0	5	16	11	positiv
261	5	5	0	5	5	0	5	5	0	negativ
262	28	28	0	5	5	0	5	5	0	negativ
271	27	27	0	5	5	0	5	5	0	negativ
272	24	24	0	5	9	4	21	24	3	negativ
273	15	22	7	5	14	9	18	25	7	positiv
278	19	19	0	5	5	0	19	18	-1	negativ
281	17	18	1	5	5	0	20	20	0	negativ
286	24	24	0	5	20	15	23	22	-1	negativ
288	12	19	7	5	5	0	9	18	9	positiv
316	14	26	12	5	5	0	16	21	5	positiv
329	20	20	0	5	5	0	22	27	5	negativ
341	5	5	0	5	5	0	5	5	0	negativ
342	14	12	-2	5	5	0	24	29	5	negativ
347	18	18	0	5	5	0	19	20	1	negativ
354	19	19	0	5	5	0	20	21	1	negativ
363	19	19	0	5	5	0	5	5	0	negativ
371	23	25	2	5	7	2	23	25	2	negativ
379	12	14	2	5	5	0	10	14	4	negativ
387	20	20	0	5	5	0	5	5	0	negativ
403	5	5	0	5	5	0	5	5	0	negativ

Stamm- nummer	CAZ	CAZ + CLX	Differenz	FOX	FOX + CLX	Differenz	TZP	TZP + CLX	Differenz	AmpC Status
429	20	20	0	5	5	0	36	36	0	negativ
441	9	18	9	5	5	0	8	18	10	positiv
447	5	10	5	5	5	0	5	15	10	positiv
451	5	17	12	5	7	2	5	18	13	positiv
495	23	23	0	5	5	0	24	27	3	negativ
501	8	20	12	5	12	7	16	22	6	positiv
526	22	26	4	5	5	0	25	30	5	negativ
543	5	15	10	5	5	0	5	18	13	positiv
547	24	27	3	5	20	15	34	36	2	negativ
549	5	15	10	5	5	0	5	17	12	positiv
604	21	20	-1	5	5	0	27	27	0	negativ
623	10	20	10	5	10	5	10	23	13	positiv
628	20	20	0	5	5	0	20	20	0	negativ
630	22	22	0	5	5	0	22	23	1	negativ
641	5	22	17	5	13	8	10	24	14	positiv
652	23	22	-1	5	5	0	22	23	1	negativ
656	25	26	1	5	5	0	23	23	0	negativ
657	13	14	1	5	5	0	16	17	1	negativ
661	19	20	1	5	5	0	22	22	0	negativ
677	21	21	0	5	5	0	23	23	0	negativ
682	11	21	10	5	5	0	10	20	10	positiv
689	7	12	5	5	5	0	5	8	3	negativ
693	12	13	1	5	5	0	14	14	0	negativ
713	8	20	12	5	5	0	7	19	12	positiv
718	19	19	0	5	5	0	21	22	1	negativ
727	21	21	0	5	5	0	22	22	0	negativ
735	8	11	3	5	5	0	15	18	3	negativ
740	21	23	2	5	5	0	23	25	2	negativ
755	21	21	0	5	5	0	21	21	0	negativ
784	23	23	0	5	5	0	24	25	1	negativ
787	5	20	15	5	10	5	7	21	14	positiv
789	27	28	1	5	5	0	30	30	0	negativ
797	10	15	5	5	5	0	8	9	1	negativ
815	5	19	14	5	10	5	8	20	12	positiv
831	21	23	2	5	5	0	23	25	2	negativ

Stamm- nummer	CAZ	CAZ + CLX	Differenz	FOX	FOX + CLX	Differenz	TZP	TZP + CLX	Differenz	AmpC Status
836	17	20	3	5	5	0	25	25	0	negativ
844	20	22	2	5	5	0	24	26	2	negativ
845	12	20	8	5	5	0	12	20	8	positiv
847	15	17	2	5	5	0	16	17	1	negativ
851	13	17	4	5	5	0	18	18	0	negativ
864	18	19	1	5	5	0	13	19	6	negativ
865	19	21	2	5	5	0	22	22	0	negativ
868	20	23	3	5	5	0	20	21	1	negativ
870	24	26	2	5	5	0	28	25	-3	negativ
877	15	16	1	5	5	0	33	33	0	negativ
881	18	19	1	5	5	0	20	20	0	negativ
906	25	25	0	5	5	0	26	27	1	negativ
908	22	22	0	5	5	0	22	22	0	negativ
915	13	25	12	5	14	9	14	25	11	positiv
954	5	20	15	5	8	3	5	20	15	positiv
966	24	26	2	5	5	0	27	27	0	negativ
967	12	22	10	5	5	0	14	23	9	positiv
989	5	5	0	5	5	0	15	17	2	negativ
991	16	18	2	5	5	0	19	19	0	negativ
995	5	20	15	5	10	5	5	21	16	positiv
1032	18	20	2	5	5	0	23	23	0	negativ
1057	19	20	1	5	5	0	20	20	0	negativ
1084	17	19	2	5	5	0	20	20	0	negativ
1085	18	18	0	5	5	0	18	19	1	negativ
1131	19	23	4	5	5	0	24	24	0	negativ
1138	7	19	12	5	7	2	5	21	16	positiv
1161	7	18	11	5	7	2	5	18	13	positiv
1183	25	25	0	5	6	1	28	30	2	negativ
1185	11	21	10	5	5	0	18	23	5	positiv
1191	17	18	1	5	5	0	18	19	1	negativ
1236	21	21	0	5	5	0	22	22	0	negativ
1237	23	23	0	5	5	0	5	5	0	negativ
1252	5	19	14	5	5	0	10	20	10	positiv

Tab. 7.3: Positive Ergebnisse im Nitrocephin Hydrolyse Test.

Die Ergebnisse des Hydrolysetests sind den Ergebnissen des im Kapitel 3.4 dargestellten Induktionstest gegenüber gestellt. Der AmpC-Status ist analog zu Tab.7.2 dargestellt. Eine mehr als 1,5-fache Inhibition der Nitrocephin Hydrolyse gemessen in Absorption bei 490 nm Wellenlänge ist blau hinterlegt dargestellt. Die Induzierbarkeit von AmpC durch Imipenem wurde mittels der Beurteilung von Synergiephänomen auf Agarplatten zwischen Piperacillin/Tazobactam oder Ceftazidim und Imipenem beurteilt. War eine Induktion von AmpC vorhanden (D-Phänomen) wurde das Ergebnis „+“ orange hinterlegt. Ein sehr starkes Phänomen mit „++“ rot hinterlegt. Ein Synergieeffekt wurde „S“ grün hinterlegt.

Stammnummer	AmpC Status	Hydrolysetest			Induktionstest	
		30min mit CLX OD490	30min ohne CLX OD 490	ohne CLX / mit CLX	CAZ + IMP	TZP + IMP
5	negativ	0,089	0,163	1,8	-	+
9	positiv	0,028	0,041	1,5	++	-
16	positiv	0,033	0,414	12,5	-	-
17	positiv	0,033	0,05	1,5	+	-
27	positiv	0,032	0,059	1,8	-	-
47	positiv	0,038	0,058	1,5	-	-
89	positiv	0,033	0,05	1,5	+	-
95	positiv	0,064	0,326	5,1	-	-
111	positiv	0,037	0,168	4,5	+	+
124	negativ	0,072	0,108	1,5	-	-
127	negativ	0,045	0,075	1,7	-	-
146	negativ	0,104	0,164	1,6	-	+
163	positiv	0,025	0,04	1,6	-	-
184	negativ	0,041	0,067	1,6	-	-
209	positiv	0,039	0,057	1,5	-	-
241	positiv	0,11	0,175	1,6	-	-
244	positiv	0,046	0,276	6	-	-
261	negativ	0,095	0,141	1,5	-	-
271	negativ	0,03	0,048	1,6	++	-
272	negativ	0,02	0,141	7,1	+	+

Stammnummer	AmpC Status	Hydrolysetest			Induktionstest	
		30min mit CLX OD490	30min ohne CLX OD 490	ohne CLX / mit CLX	CAZ + IMP	TZP + IMP
273	positiv	0,018	0,144	8	-	+
341	negativ	0,205	0,302	1,5	-	-
363	negativ	0,039	0,062	1,6	++	-
403	negativ	0,135	0,284	2,1	-	-
441	positiv	0,034	0,086	2,5	+	+
447	positiv	0,033	0,054	1,6	-	-
451	positiv	0,044	0,198	4,5	-	S
501	positiv	0,04	0,144	3,6	-	-
543	positiv	0,039	0,402	10,3	-	-
549	positiv	0,039	0,08	2,1	-	-
623	positiv	0,034	0,218	6,4	+	+
641	positiv	0,042	0,375	8,9	-	-
677	negativ	0,035	0,054	1,5	+	+
689	negativ	0,035	0,151	4,3	-	-
787	positiv	0,031	0,094	3	-	-
797	negativ	0,035	0,096	2,7	-	-
815	positiv	0,051	0,347	6,8	-	-
845	positiv	0,046	0,194	4,2	+	-
915	positiv	0,03	0,203	6,8	-	-
954	positiv	0,033	0,198	6	-	-
967	positiv	0,029	0,048	1,7	+	+
995	positiv	0,031	0,304	9,8	-	-
1138	positiv	0,026	0,054	2,1	-	-
1161	positiv	0,024	0,098	4,1	-	-
1237	negativ	0,048	0,098	2	+	-
1252	positiv	0,033	0,371	11,2	-	-

Tab. 7.4: Negative Ergebnisse im Hydrolyse Nitrocephin Test.
Die Darstellung erfolgte analog zu Tabelle 7.3.

Stammnummer	AmpC Status	Hydrolysetest			Induktionstest	
		30 min mit CLX OD 490	30min ohne CLX OD 490	ohne CLX / mit CLX	CAZ + IMP	CAZ + IMP
8	negativ	0,032	0,031	1	+	+
15	positiv	0,073	0,104	1,4	-	+
25	positiv	0,039	0,037	0,9	-	-
36	positiv	0,03	0,039	1,3	-	-
56	negativ	0,032	0,033	1	++	++
61	negativ	0,038	0,035	0,9	++	++
73	positiv	0,03	0,038	1,3	++	++
74	negativ	0,037	0,034	0,9	++	+
90	negativ	0,037	0,034	0,9	+	+
110	negativ	0,037	0,042	1,1	+	-
112	negativ	0,048	0,039	0,8	+	+
122	negativ	0,044	0,043	1	++	++
137	negativ	0,041	0,055	1,3	-	-
145	negativ	0,032	0,037	1,2	++	++
147	positiv	0,034	0,047	1,4	-	-
157	negativ	0,046	0,037	0,8	+	+
159	negativ	0,041	0,043	1	+	+
162	negativ	0,122	0,176	1,4	-	+
172	negativ	0,028	0,03	1,1	++	++
185	positiv	0,043	0,058	1,3	-	+
188	negativ	0,031	0,034	1,1	+	+
193	negativ	0,034	0,028	0,8	++	+
206	negativ	0,029	0,03	1	++	+
232	positiv	0,044	0,059	1,3	-	-
239	negativ	0,027	0,03	1,1	+	+
262	negativ	0,085	0,052	0,6	++	-
278	negativ	0,081	0,063	0,8	-	-
281	negativ	0,08	0,081	1	+	+
286	negativ	0,066	0,077	1,2	-	+
288	positiv	0,062	0,076	1,2	-	-

Stamm- nummer	AmpC Status	Hydrolysetest			Induktionstest	
		30 min mit CLX OD 490	30min ohne CLX OD 490	ohne CLX / mit CLX	CAZ + IMP	CAZ + IMP
316	positiv	0,068	0,059	0,9	+	+
329	negativ	0,053	0,053	1	++	++
342	negativ	0,036	0,047	1,3	-	-
347	negativ	0,031	0,041	1,3	+	+
354	negativ	0,045	0,044	1	-	-
371	negativ	0,032	0,034	1,1	++	++
379	negativ	0,032	0,03	0,9	-	-
387	negativ	0,029	0,031	1,1	-	-
429	negativ	0,039	0,045	1,2	-	+
495	negativ	0,033	0,035	1,1	++	+
526	negativ	0,039	0,044	1,1	+	+
547	negativ	0,05	0,041	0,8	+	+
604	negativ	0,037	0,041	1,1	-	+
628	negativ	0,031	0,032	1	+	-
630	negativ	0,029	0,036	1,2	++	+
652	negativ	0,037	0,053	1,4	++	++
656	negativ	0,039	0,043	1,1	-	-
657	negativ	0,053	0,036	0,7	+	+
661	negativ	0,077	0,053	0,7	+	++
682	positiv	0,043	0,047	1,1	-	-
693	negativ	0,038	0,035	0,9	+	+
713	positiv	0,037	0,042	1,1	-	-
718	negativ	0,035	0,042	1,2	++	+
727	negativ	0,037	0,033	0,9	++	+
735	negativ	0,064	0,07	1,1	-	+
740	negativ	0,035	0,036	1	+	-
755	negativ	0,029	0,035	1,2	++	++
784	negativ	0,059	0,047	0,8	+	+
789	negativ	0,038	0,039	1	-	-
831	negativ	0,04	0,038	1	++	++
836	negativ	0,037	0,038	1	-	-
844	negativ	0,069	0,067	1	++	++

Stamm- nummer	AmpC Status	Hydrolysetest			Induktionstest	
		30 min mit CLX OD 490	30min ohne CLX OD 490	ohne CLX / mit CLX	CAZ + IMP	CAZ + IMP
847	negativ	0,043	0,054	1,3	+	++
851	negativ	0,029	0,029	1	-	-
864	negativ	0,048	0,055	1,1	+	+
865	negativ	0,052	0,042	0,8	+	-
868	negativ	0,032	0,042	1,3	-	-
870	negativ	0,029	0,037	1,3	++	+
877	negativ	0,033	0,034	1	+	++
881	negativ	0,053	0,052	1	-	-
906	negativ	0,031	0,029	0,9	++	++
908	negativ	0,043	0,045	1	++	++
966	negativ	0,03	0,035	1,2	+	+
989	negativ	0,035	0,038	1,1	-	-
991	negativ	0,031	0,033	1,1	+	+
1032	negativ	0,038	0,038	1	++	++
1057	negativ	0,044	0,05	1,1	+	+
1084	negativ	0,026	0,034	1,3	+	+
1085	negativ	0,033	0,034	1	++	++
1131	negativ	0,03	0,042	1,4	+	+
1183	negativ	0,076	0,061	0,8	++	++
1185	positiv	0,023	0,03	1,3	+	+
1191	negativ	0,03	0,03	1	+	-
1236	negativ	0,034	0,043	1,3	+	+

Tab. 7.5: Übersicht über die Ergebnisse der AmpC Induzierbarkeit.

Ceftazidim resistente Stämme wurden rot hinterlegt dargestellt; Ceftazidim sensible Stämme sind grün hinterlegt. Angegeben sind die Hemmhofdurchmesser für die einzelnen getesteten Substanzen in mm. AmpC Status ist analog zu Tab.7.2 dargestellt. Der Induktionstest ist analog zu Tab.7.3 dargestellt.

Stamm- nummer	CAZ	AmpC Status	Induktionstest	
			CAZ + IMP	TZP + IMP
5	5	negativ	-	+
15	5	positiv	-	+
16	5	positiv	-	-
17	15	positiv	+	-
25	10	positiv	-	-
27	5	positiv	-	-
36	5	positiv	-	-
47	5	positiv	-	-
73	9	positiv	++	++
89	9	positiv	+	-
90	11	negativ	+	+
95	5	positiv	-	-
110	15	negativ	+	-
111	11	positiv	+	+
112	15	negativ	+	+
124	5	negativ	-	-
127	5	negativ	-	-
146	5	negativ	-	+
162	5	negativ	-	+
163	8	positiv	-	-
184	10	negativ	-	-
185	14	positiv	-	+
232	5	positiv	-	-
241	5	positiv	-	-
244	5	positiv	-	-
261	5	negativ	-	-

Stamm- nummer	CAZ	AmpC Status	Induktionstest	
			CAZ + IMP	TZP + IMP
273	12	positiv	-	+
288	9	positiv	-	-
341	5	negativ	-	-
342	13	negativ	-	-
379	11	negativ	-	-
403	5	negativ	-	-
441	12	positiv	+	+
447	5	positiv	-	-
451	5	positiv	-	S
501	10	positiv	-	-
543	5	positiv	-	-
549	5	positiv	-	-
623	10	positiv	+	+
641	5	positiv	-	-
652	10	negativ	++	++
657	12	negativ	+	+
677	13	negativ	+	+
682	8	positiv	-	-
689	10	negativ	-	-
693	9	negativ	+	+
713	8	positiv	-	-
718	15	negativ	++	+
735	6	negativ	-	+
755	15	negativ	++	++
787	8	positiv	-	-
797	10	negativ	-	-
815	6	positiv	-	-
845	11	positiv	+	-
847	15	negativ	+	++
851	12	negativ	-	-
864	5	negativ	+	+

Stamm- nummer	CAZ	AmpC Status	Induktionstest	
			CAZ + IMP	TZP + IMP
915	9	positiv	-	-
954	8	positiv	-	-
967	14	positiv	+	+
989	11	negativ	-	-
995	8	positiv	-	-
1138	7	positiv	-	-
1161	6	positiv	-	-
1185	13	positiv	+	+
1236	9	negativ	+	+
8	21	negativ	+	+
9	18	positiv	++	-
56	21	negativ	++	++
61	21	negativ	++	++
74	23	negativ	++	+
122	22	negativ	++	++
137	26	negativ	-	-
145	22	negativ	++	++
147	25	positiv	-	-
157	19	negativ	+	+
159	27	negativ	+	+
172	23	negativ	++	++
188	24	negativ	+	+
193	18	negativ	++	+
206	24	negativ	++	+
209	19	positiv	-	-
239	21	negativ	+	+
262	26	negativ	++	-
271	28	negativ	++	-
272	22	negativ	+	+
278	16	negativ	-	-
281	20	negativ	+	+

Stamm- nummer	CAZ	AmpC Status	Induktionstest	
			CAZ + IMP	TZP + IMP
286	24	negativ	-	+
316	16	positiv	+	+
329	20	negativ	++	++
347	18	negativ	+	+
354	20	negativ	-	-
363	16	negativ	++	-
371	22	negativ	++	++
387	22	negativ	-	-
429	19	negativ	-	+
495	20	negativ	++	+
526	20	negativ	+	+
547	23	negativ	+	+
604	28	negativ	-	+
628	20	negativ	+	-
630	18	negativ	++	+
656	23	negativ	-	-
661	19	negativ	+	++
727	20	negativ	++	+
740	22	negativ	+	-
784	20	negativ	+	+
789	27	negativ	-	-
831	21	negativ	++	++
836	22	negativ	-	-
844	20	negativ	++	++
865	18	negativ	+	-
868	20	negativ	-	-
870	23	negativ	++	+
877	16	negativ	+	++
881	16	negativ	-	-
906	25	negativ	++	++
908	20	negativ	++	++

Stamm- nummer	CAZ	AmpC Status	Induktionstest	
			CAZ + IMP	TZP + IMP
966	23	negativ	+	+
991	17	negativ	+	+
1032	18	negativ	++	++
1057	20	negativ	+	+
1084	16	negativ	+	+
1085	18	negativ	++	++
1131	19	negativ	+	+
1183	25	negativ	++	++
1191	17	negativ	+	-
1237	21	negativ	+	-
1252	22	positiv	-	-

Tab. 7.6: Untersuchung auf das Vorliegen einer Extended-Spektrum AmpC Beta-laktamase, die auch Cefepim hydrolysieren können.

Folgende Farbkodierung wurde verwendet: Cefepim resistent rot, Cefepim sensibel grün. Der AmpC Status ist analog zu Tab.7.2 dargestellt. Kombiniertes Disk Test: Blau hinterlegt sind die Stämme, bei denen es im kombinierten durch Cloxacillin zu einer Vergrößerung des Hemmhofes um mindestens 5 mm kam. Angegeben sind die Hemmhofdurchmesser für die einzelnen getesteten Substanzen in mm. Der Induktionstest ist analog zu Tab.7.3 dargestellt.

Stammnummer	FEP	AmpC Status	Kombinierter Disk Test			Induktionstest
			FEP	FEP + CLX	Differenz in mm	FEP + IMP
5	10	negativ	9	14	5	-
15	10	positiv	12	14	2	-
27	13	positiv	17	22	5	-
36	15	positiv	17	22	5	-
47	17	positiv	19	24	5	-
112	17	negativ	18	18	0	+
124	5	negativ	5	5	0	-
127	5	negativ	5	5	0	-
146	8	negativ	10	13	3	-
162	5	negativ	5	11	6	-
241	9	positiv	9	15	6	-
244	11	positiv	15	20	5	-
261	5	negativ	5	5	0	-
271	17	negativ	17	17	0	S
316	17	positiv	15	19	4	-
341	5	negativ	5	5	0	-
342	5	negativ	5	5	0	-
387	5	negativ	5	5	0	-
403	5	negativ	5	5	0	-
429	16	negativ	16	15	-1	-
447	15	positiv	15	20	5	-
451	15	positiv	14	23	9	S
549	16	positiv	15	20	5	-
689	11	negativ	9	12	3	-
797	11	negativ	14	15	1	-
815	15	positiv	13	24	11	-
851	15	negativ	10	22	12	-

Stamm- nummer	FEP	AmpC Status	Kombinierter Disk Test			Induktions- test
			FEP	FEP + CLX	Differenz in mm	FEP + IMP
864	16	negativ	22	26	4	-
877	10	negativ	13	13	0	+
881	17	negativ	22	23	1	-
906	13	negativ	24	26	2	+
954	15	positiv	23	28	5	-
995	15	positiv	20	25	5	-
1161	17	positiv	18	23	5	-
1252	9	positiv	23	28	5	-
8	21	negativ	30	30	0	-
9	26	positiv	34	34	0	+
16	18	positiv	22	26	4	-
17	25	positiv	30	32	2	+
25	20	positiv	21	24	3	-
56	27	negativ	26	27	1	-
61	30	negativ	28	28	0	+
73	25	positiv	25	27	2	+
74	28	negativ	28	31	3	-
89	22	positiv	20	24	4	+
90	20	negativ	18	18	0	-
95	19	positiv	13	23	10	-
110	23	negativ	21	23	2	+
111	20	positiv	22	25	3	-
122	25	negativ	23	24	1	+
137	28	negativ	25	32	7	-
145	25	negativ	25	25	0	+
147	34	positiv	34	34	0	-
157	23	negativ	23	23	0	-
159	27	negativ	29	29	0	-
163	19	positiv	21	24	3	-
172	26	negativ	25	27	2	+
184	20	negativ	20	22	2	-
185	21	positiv	25	25	0	-
188	30	negativ	29	29	0	+
193	22	negativ	25	26	1	+
206	28	negativ	30	32	2	+

Stamm- nummer	FEP	AmpC Status	Kombinierter Disk Test			Induktions- test
			FEP	FEP + CLX	Differenz in mm	FEP + IMP
209	20	positiv	22	26	4	-
232	18	positiv	19	22	3	-
239	24	negativ	28	28	0	+
262	18	negativ	18	18	0	S
272	23	negativ	21	23	2	+
273	23	positiv	22	25	3	-
278	26	negativ	24	25	1	-
281	29	negativ	24	25	1	-
286	30	negativ	28	29	1	+
288	22	positiv	19	21	2	++
329	23	negativ	22	22	0	+
347	21	negativ	20	24	4	-
354	24	negativ	24	26	2	-
363	20	negativ	17	16	-1	-
371	27	negativ	27	29	2	+
379	20	negativ	19	23	4	+
441	20	positiv	20	25	5	++
495	28	negativ	28	30	2	+
501	23	positiv	20	27	7	-
526	28	negativ	28	31	3	-
543	19	positiv	18	23	5	-
547	26	negativ	23	30	7	+
604	21	negativ	20	22	2	-
623	23	positiv	20	25	5	+
628	27	negativ	24	26	2	-
630	25	negativ	26	29	3	-
641	19	positiv	21	26	5	-
652	25	negativ	27	28	1	++
656	30	negativ	30	32	2	-
657	18	negativ	20	20	0	-
661	25	negativ	24	25	1	+
677	20	negativ	23	26	3	+
682	18	positiv	20	28	8	-
693	18	negativ	20	20	0	-
713	26	positiv	23	27	4	-

Stamm- nummer	FEP	AmpC Status	Kombinierter Disk Test			Induktions- test
			FEP	FEP + CLX	Differenz in mm	FEP + IMP
718	23	negativ	24	24	0	++
727	24	negativ	26	26	0	-
735	21	negativ	24	24	0	+
740	27	negativ	27	27	0	-
755	22	negativ	25	23	-2	+
784	22	negativ	23	23	0	-
787	19	positiv	23	27	4	-
789	34	negativ	33	33	0	-
831	22	negativ	25	25	0	+
836	27	negativ	30	30	0	-
844	20	negativ	21	23	2	-
845	20	positiv	21	24	3	-
847	23	negativ	21	24	3	+
865	23	negativ	22	22	0	+
868	27	negativ	30	30	0	-
870	24	negativ	28	18	-10	-
908	23	negativ	28	28	0	-
915	20	positiv	25	29	4	-
966	27	negativ	32	33	1	-
967	22	positiv	27	29	2	-
989	28	negativ	23	23	0	-
991	20	negativ	23	23	0	-
1032	20	negativ	20	20	0	-
1057	25	negativ	24	25	1	-
1084	19	negativ	20	22	2	-
1085	23	negativ	24	24	0	-
1131	20	negativ	24	23	-1	-
1138	18	positiv	18	23	5	-
1183	30	negativ	31	31	0	+
1185	21	positiv	23	28	5	-
1191	22	negativ	23	26	3	-
1236	19	negativ	22	22	0	+
1237	24	negativ	8	8	0	-

Tab. 7.7: AmpC Charakterisierung bei Meropenem resistenten Stämmen auf der Basis von Aztreonam.

Folgende Farbkodierung wurde verwendet: AmpC Status analog zu Tab.7.2, Meropenem bzw. Aztreonam resistent rot, Aztreonam intermediär gelb. Kombiniertes Disk Test: Blau hinterlegt sind die Stämme, bei denen es durch Cloxacillin zu einer Vergrößerung des Hemmhofes um mindestens 5 mm kam. Angegeben sind die Hemmhofdurchmesser für die einzelnen getesteten Substanzen in mm. Der Induktionstest ist analog zu Tab.7.3 dargestellt.

Stammnummer	AmpC Status	MER	AZT	Kombiniertes Disk Test			Induktionstest AZT + IMP
				AZT	AZT + CLX	Differenz in mm	
25	positiv	5	10	12	15	3	-
1252	positiv	5	11	17	21	4	-
27	positiv	5	11	10	15	5	-
36	positiv	5	11	11	16	5	-
549	positiv	5	12	10	18	8	-
47	positiv	9	12	15	24	9	-
815	positiv	11	13	15	22	7	-
288	positiv	7	14	17	21	4	++
244	positiv	10	14	15	20	5	-
163	positiv	5	14	13	21	8	-
16	positiv	13	14	12	25	13	-
641	positiv	16	15	16	26	10	-
845	positiv	13	16	19	21	2	-
787	positiv	13	16	24	30	6	++
232	positiv	14	17	23	26	3	-
441	positiv	12	17	17	21	4	++
73	positiv	5	20	22	24	2	+
241	positiv	5	20	20	25	5	+
447	positiv	5	21	20	22	2	+
185	positiv	16	21	24	26	2	+
15	positiv	5	25	29	29	0	+
623	positiv	15	28	15	25	10	-
261	negativ	5	5	5	5	0	-
387	negativ	5	5	5	5	0	-
403	negativ	5	5	5	5	0	-
877	negativ	5	5	5	5	0	-

Stamm- nummer	AmpC Status	MER	AZT	Kombinierter Disk Test			Induktions- test
				AZT	AZT + CLX	Differenz in mm	AZT + IMP
342	negativ	13	5	5	5	0	-
429	negativ	13	5	5	5	0	-
693	negativ	5	7	9	10	1	-
657	negativ	5	9	9	15	6	+
851	negativ	17	9	5	15	10	-
112	negativ	5	10	10	14	4	-
341	negativ	5	11	13	14	1	-
677	negativ	5	11	21	23	2	+
157	negativ	8	12	15	16	1	+
906	negativ	16	12	27	28	1	++
1236	negativ	11	13	22	22	0	-
347	negativ	16	14	15	15	0	-
1084	negativ	16	14	15	18	3	-
991	negativ	7	15	14	15	1	-
124	negativ	5	15	15	16	1	S
127	negativ	5	15	15	17	2	S
110	negativ	5	16	13	15	2	-
262	negativ	5	17	22	22	0	+
797	negativ	6	17	25	27	2	+
661	negativ	6	18	20	20	0	+
1057	negativ	12	18	18	18	0	+
271	negativ	5	19	20	21	1	+
652	negativ	5	20	21	23	2	++
363	negativ	5	22	21	22	1	-
371	negativ	17	22	23	24	1	+
689	negativ	5	22	20	22	2	-
184	negativ	5	24	25	25	0	-
162	negativ	5	28	29	29	0	++
5	negativ	5	29	29	29	0	+
146	negativ	5	29	28	29	1	++

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. med. Silke Peter, Oberärztin im Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Tübingen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD Dr. med. Silke Peter. Sämtliche Versuche zur Bestimmung von AmpC wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Erhebung des Resistenzphänotyps (Antibiogramm) der Stämme wurde in Zusammenarbeit mit Hellen Mumu durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch mich nach Anleitung durch Frau PD Dr. Silke Peter.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau PD Dr. med. Silke Peter verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Mirjam Chaib

9 Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Autenrieth für die Annahme als Doktorandin und die damit verbundene Arbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene. Die Arbeit im Labor hat mir sehr viel Freude bereitet.

Mein größter Dank gilt vor allem meiner Betreuerin PD Dr. med. Silke Peter für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation, ihre freundliche Hilfe und ihr großes Engagement während der Entstehung dieser Arbeit. Sie hat mich über einige Jahre kontinuierlich unterstützt und immer wieder sehr geduldig motiviert. Herzlichen Dank!

Bei Kerstin Fischer möchte ich mich für ihre sehr freundliche und stets hilfsbereite Art während den Labortätigkeiten bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Nadine Hoffmann für ihr offenes Ohr und die Unterstützung bei der Erfüllung meiner Belange bedanken.

Danken möchte ich auch für den guten und wertschätzenden Austausch von Gedanken und Informationen mit den Doktoranden Hellen Mumu und Adrian Lacher. Wir hatten eine sehr schöne gemeinsame Zeit.

Des Weiteren will ich meinen Eltern für die Unterstützung in finanzieller, psychischer und physischer Form in den zurückliegenden Jahren danken. Ihr wart und seid immer zur Stelle, wenn ich bzw. wir Eure Unterstützung benötigen, wovon wir sehr dankbar sind. Meine Geschwister sollten an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, ich bzw. wir konnten immer auf ihre tatkräftige Unterstützung bei unseren zahlreichen Umzügen setzen.

Ferner will ich auch meinen sechs engen Freundinnen aus der Lahrer Gymnasialzeit, sowie Andrea Zipp und Anna-Lena Blaich für den treuen Kontakt und immer regen, konstruktiven Gedankenaustausch danken. Es ist schön Euch zu haben.

Ganz besonders will ich meinem lieben Mann Nabil Chaib danken. Er hat schon vor Beginn des Medizinstudiums an meinen Erfolg geglaubt und mich vom 1. bis zum 12. Semester unterstützt. Dabei hat er immer sehr viel Geduld und liebevolles Verständnis gezeigt. Auch während den Endzügen meiner Promotionsarbeit hat er mich immer wieder motiviert und aufgebaut. Danke dafür!