Antibiotika-Multiresistenz bei *Pseudomonas aeruginosa*

Beate Henrichfreise*, Irith Wiegand*, Ingeborg Luhmer-Becker*,
Wolfgang Pfister** und Bernd Wiedemann*

*Universität Bonn, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie, Abteilung für Pharmazeutische Mikrobiologie;
**Universität Jena, Institut für Medizinische Mikrobiologie

Beate Henrichfreise
Universität Bonn
Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Immunologie und Parasitologie
Pharmazeutische Mikrobiologie
Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn
Tel.: +49-228-732111
E-mail: bhenrich@uni-bonn.de

EINLEITUNG

- *Pseudomonas aeruginosa* ist einer der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen und stellt eine ernsthafte Bedrohung insbesondere für immunsupprimierte Patienten in der Intensivmedizin dar. Darüber hinaus sind über 90% der Todesfälle bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) auf chronische Infektionen der Lunge durch *P. aeruginosa* zurückzuführen.
- Im Rahmen dieser Arbeit sollte auf molekularer Ebene die aktuelle Situation zur Multiresistenz bei *P. aeruginosa*-Stämmen von CF- und nicht-CF-Patienten in deutschen Krankenhäusern erfasst werden.
- Weiterführend wurde mit Hilfe von *in-vitro*-Simulationen therapeutischer Antibiotika-Konzentrations-Zeitverläufe die Entstehung von durch Mutationen verursachter Resistenz unter der Therapie analysiert, um aufzuklären, durch den Einsatz welcher Antibiotika und Dosierungen am ehesten Selektion von Multiresistenz verhindert werden kann.

Abb. 1. Schematische Übersicht zu den erworbenen Resistenzmechanismen bei *P. aeruginosa*

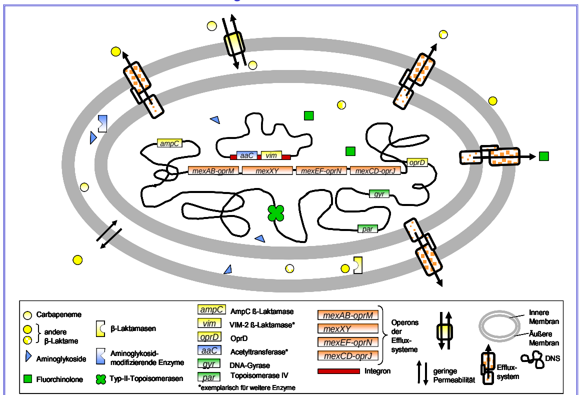
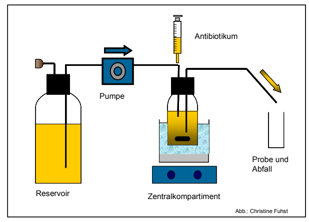


Abb. 2. (links) Agardiffusionstest mit einem Mutatorstamm

Abb. 3. (unten) Aufbau des *in-vitro*-Modells nach Grasso zur Simulation einer i.v. Bolus Applikation mit anschließender Elimination



MATERIAL und METHODEN

- Im Rahmen des Projekts wurden 22 multiresistente klonal nicht verwandte (durch PFGE-Typisierung bestätigt) *P. aeruginosa*-Stämme untersucht, die von Januar bis März 2004 im Zuge des GENARS-Projektes (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance) in drei deutschen Krankenhäusern isoliert wurden. Zwölf Stämme stammten von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) und zehn von Patienten ohne diese Erbkrankheit. Die Stämme zeigten reduzierte Empfindlichkeit (intermediär oder resistent entsprechend der DIN-Grenzwerte) gegenüber Imipenem, Ceftazidim, Piperacillin, Ciprofloxacin und Gentamicin.
- Bei der Evaluierung der Mechanismen, die der Multiresistenz zugrunde lagen (Abb. 1), wurden die Effluxsysteme MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN und MexXY-OprM, der Verlust des Porins OprD, Modifikationen in den Typ-II-Topoisomerasen und die Überproduktion der AmpC-β-Laktamase untersucht. Zusätzlich wurde die Präsenz von 25 erworbenen Resistenz-Determinaten geprüft.
- Für alle Stämme wurde das Vorhandenseins eines Mutatorphänotyps (Abb. 2) geprüft.
- Zusätzlich wurde die Entwicklung von mutationsvermittelter Resistenz unter der Therapie untersucht. Dazu wurden ein Wildtyp- und ein Mutatorstamm von *P. aeruginosa* in *in-vitro*-Modelle (Abb. 3) eingesetzt, welche die pharmakokinetischen Profile von Meropenem (3x 1g) und Ceftazidime (3x 2g) bei Standarddosierungen simulieren.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

- Analysen der Phäno- und Genotypen aller multiresistenten Stämme zeigten, dass die Überproduktion unterschiedlicher Effluxsysteme einen erheblichen und teilweise bislang unterschätzten Anteil an der Modulation des Gesamtphänotyps der Multiresistenz bei *P. aeruginosa* hat (1).
- Im Einklang mit anderen Studien wurde belegt, dass noch weitere unbekannte mutationsbedingte Mechanismen der Resistenz insbesondere im Zusammenhang mit der Regulation von Effluxsystemen bei *P. aeruginosa* einer Aufklärung harren.

- Der Erstnachweis einer VIM-Metallo-β-Laktamase in Deutschland ist ein weiteres Indiz der zunehmenden globalen Ausbreitung dieser Enzyme und untermauert die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Surveillance der in Krankenhäusern auftretenden Multiresistenz bei *P. aeruginosa* auf molekularer Ebene (3, 4).
- Elf der Stämme von CF-Patienten und drei der Stämme von nicht-CF-Patienten wiesen einen Mutatorphänotyp auf (Abb. 2) (1). Zum ersten Mal konnte ein Mutatorstamm molekular charakterisiert werden, der nicht im Kontext mit einer chronischen Infektion der Lunge stand. Der hohe Anteil an Mutatorstämmen sollte bei der Behandlung von Infektionen, die durch multiresistente *P. aeruginosa*-Stämme verursacht werden, berücksichtigt werden.

Tab. 1. Multiresistente *P. aeruginosa*-Stämme von CF- und nicht-CF-Patienten (1)

	Epidemiologie						Antibiotikaempfindlichkeit (MHK [mg/L])											Phänotypische Testergebnisse				Genotypische Testergebnisse									
																						Chromosomale Modifikationen									Erworbene Resistenz- und Integrasegene
	Stamm	Patient	Material	Abteilung	Art der Station	Zentrum	Piperacillin	Piperacillin/Tazobaktam	Ceftazidim	Cefepim	Imipenem	Meropenem	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Mutations-frequenz[1]	Cephalo-sporinase Inhibierungs-Test	MBL-Test[2]	EPI-Test[3]	MexR[4]	NalC[4]	NfxB[4]	MexT[4]	MexS[4]	MexZ[4]	OprD	GyrA	ParC	
CF-Patienten	I	A	SPU	CF	a	1	128	128	>32	>32	32	8	16	2	32	4	8	3.26±0.65x10^-9									**Leu138Arg* Deletion C595 frameshift***	Deletion bp745-748, frameshift	Thr83Ile	-	-
	II	A	SPU	CF	a	1	>128	>128	>32	>32	32	8	32	4	>32	2	4	**3.56±1.67x10^-6**	nr	-	+	-	Gly71Glu	-			**Gln134Stop***	Trp138stop	-	-	-
	III	B	SPU	CF	a	1	>128	>128	>32	>32	32	8	32	8	>32	4	8	**1.09±0.21x10^-5**	+	ng	-						**Tyr49Cys***	Trp277stop, Asp318Asn	Asp87Asn	-	-
	IV	C	SPU	CF	a	1	>128	>128	>32	>32	8	16	>32	32	>32	2	4	**2.00±0.19x10^-6**	nr	-	-						**Leu123Stop***	Tyr91stop	Asp87Asn	-	-
	V	D	SPU	CF	n	1	>128	>128	>32	>32	16	16	>32	8	>32	4	8	**1.27±0.93x10^-5**	nr	-	+	-	Gly71Glu	**Leu62Pro*** Arg186His			Val58Ala **Gly89Ser* Arg143Gln***	Trp138stop	Thr83Ile	-	-
	VI	E	SPU	CF	a	1	64	32	32	32	8	4	>32	4	>32	4	8	**6.57±1.14x10^-7**	+	ng	-				intakt	**Gly68Ser***	Arg65His	-	Thr83Ile	-	-
	VIa[5]																	3.61x10^-9, a		-	-						**Val23Gly***	C Insertion nach A1205, frameshift	-		
	VII	F	SPU	CF	a	1	>128	>128	>32	>32	16	16	16	2	32	8	8	**2.50±0.82x10^-6**	+	-	+	Val126Glu	Gly71Glu, Arg209Ser	-	intakt	**Phe273Ile***	**Deletion G142 frameshift***	-	Thr83Val	-	-
	VIIa[5]																								intakt Val199Ala				Thr83Ala		
	VIII	G	SPU	CF	a	1	64	32	8	32	8	4	16	2	>32	8	16	**7.30±4.91x10^-7**	-	ng	ng	-	Gly71Glu, Arg209Ser	-			**Thr32Ile*** Ala175Val	Deletion G1017, frameshift	Thr83Ile	-	-
	IX	H	SPU	CF	a	1	>128	>128	>32	>32	>32	32	16	4	32	>8	128	**1.94±0.24x10^-6**	+	-	-						**Ser44Phe***	Trp277stop	Thr83Ile	-	-
	X	I	SPU	CF	a	1	>128	>128	>32	32	16	4	4	1	8	4	4	**5.85±0.68x10^-7**	+	-	-						**Asp155Gly***	G Insertion nach G635, frameshift	Thr83Ile	-	-
	XI	J	SPU	CF	a	1	128	128	32	32	16	8	16	2	16	2	4	**1.43±0.15x10^-5**; 1,71x10^-7, a	+	-	-						**Arg45Leu***	Trp277stop	Asp87Asn	-	-
	XII	K	SPU	CF	a	2	>128	128	>32	32	16	4	4	4	32	>8	16	**1.20±0.14x10^-6**	+	-	+	Val126Glu	Gly71Glu, Arg209Ser	Arg21His **Asp56Gly* Ser167Pro**			**Leu138Arg* Deletion bp 447-630 frameshift***	Trp277stop	Thr83Ile	-	-
Nicht-CF-Patienten	XIII	L	SPU	MED	n	1	>128	>128	>32	>32	32	16	32	8	>32	4	8	8.03±3.68x10^-9	+	-	+	-	Gly71Glu, Arg209Ser	-			**bp318-592*,*** **	Trp277stop	Thr83Ile	-	-
	XIV	M	SPU	INF	n	1	>128	>128	>32	>32	>32	32	16	2	>32	4	8	1.47±0.48x10^-8	+	-	-						**Deletion bp491-496 frameshift***	Trp339stop	Thr83Ile	-	-
	XV	N	BAL	ID	i	2	64	32	16	>32	32	16	>32	>32	>32	>8	32	**3.06±1.26x10^-6**	+	-	-						Leu138Arg **Deletion bp515-532 frameshift***	deletion bp155-167, frameshift	Thr83Ile	-	-
	XVI	O	BAL	NEU	i	2	64	32	32	16	16	8	>32	16	8	>8	32	2.01±0.66x10^-8	+	-	+	Val126Glu	Gly71Glu,	-			-	deletion C393, frameshift	Thr83Ile	Ser80Leu	*aac(6')Ib' intI1*
	XVII	P	SPU	MED	i	2	64	32	>32	>32	32	16	>32	>32	16	>8	16	3.50±0.66x10^-8	+	-	-						**Gly89Ser* Asp155Gly***	Trp138stop	Thr83Ile	-	*aadA1 aadB aphA1-IAB intI1*
	XVIII	Q	BLO	MED	i	2	32	16	16	16	16	16	32	16	>32	>8	128	3.24±0.55x10^-8	+	-	+	**Lys44Met**** Val126Glu	Gly71Glu, Glu153Gln	-			**Val48Ala****	deletion A1007, frameshift	Thr83Ile Asp87His	Ser80Leu	*aacA7 aacA8 bla*$_{OXA-2}$ *intI1*
	XIX	R	URM	HGC	n	2	>128	>128	32	>32	32	16	16	16	32	>8	16	1.57±0.44x10^-8	+	-	-				intakt	-	-	-	Thr83Ile	Ser80Leu	*aac(6')Ib aadA2 bla*$_{PSE-1}$ *intI1*
	XX	S	SPU	INF	n	3	>128	>128	>32	>32	16	8	>32	16	16	>8	32	5.86±1.41x10^-8	+	-	+	**C Insertion nach G75, frameshift***		-			**Val48Ala****	Gln327stop	Thr83Ile	-	*aac(6')Ib' aadA2 intI1*
	XXI	T	WUP	ANA	i	3	32	32	16	8	4	2	8	2	16	>8	128	**2.26±0.23x10^-6**	-	-	+	**Asn Insertion nach Leu52***		-	intakt	-	-	-	Thr83Ile Asp87Gly	Ser80Leu	-
	XXII	U	TRS	NEC	n	3	32	32	16	16	16	16	2	1	8	2	8	**5.40±1.65x10^-6**	-	-	+	Val126Glu	**C19 Deletion,** Gly71Glu, Ala145Val	Arg21His, **Asp56Gly***			**Val48Ala**** Asn186Ser	C insertion after T1002, frameshift	-	-	-
	PAO1						4	4	2	2	2	0.5	2	0.5	4	0.13	0.5	3,07±0.58x10^-8	-	-	-										

[1]Die Mutationsfrequenz von Mutatorstämmen ist durch Fettdruck markiert. Jeder Stamm wurde dreifach getestet. Die zusätzlich getestete Variante von Stamm VI und ein weitere Stamm mit identischem PFGE-Muster wie Stamm XI zeigten abweichende Resultate zur Hypermutabilität (jeweils einmal getestet). [2]Test zum Nachweis einer Metallo-β-Laktamases. [3]Effluxpumpen-Inhibierungstest. nr: kein Ergebnis. ng: kein Wachstum in Anwesenheit des Inhibitors. [4]Modifikationen, die relevant für die Funktionalität des Regulators sind, wurden durch Fettdruck markiert: *Relevanz postuliert auf der Basis der Lokalisierung und Art des Aminosäurenaustausches. **Relevanz an anderer Stelle experimentell nachgewiesen. ***Wiederholte Sequenzierungsversuche ergaben für bp318-bp592 nicht differenzierbare Mehrfachsignale. [5]Zusätzlich getestete Varianten der Stämme VI und VII zeigten Unterschiede in der Mutationsfrequenz und/ oder bei chromosomalen Modifikationen; BAL: Bronchoalveolare Lavage, BLO: Blutkultur, SPU: Sputum, TRS: Trachealsekret, URM: Mittelstrahlurin, WUP: Wundeiter, ANA: Anästhesiologie, CF: cystische Fibrose; HGC: Herz- und Gefäßchirugie; INF: Infektionsstation; ID: Interdisziplinäre Intensivstation; MED: Innere Medizin; NEC: Neurochirugie; NEU: Neurologie; a: ambulant-; i: intensiv-; n: normal-Station; +: Das Testergebnis war positiv. -: das Testergebnis war negativ oder keine Modifikation oder kein Resistenzgen wurde gefunden. Varianten der Stämme sind nur gelistet, wenn abweichende Ergebnisse oder Resistenzmechanismen gefunden wurden.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Abb. 4. Struktur der Klasse-1-Integrons, die ausschließlich bei Stämmen von nicht-CF-Patienten nachgewiesen wurden (1, 3 und 4).

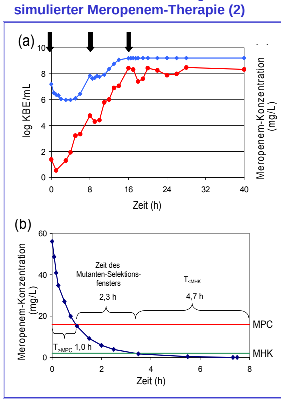
Stamm	Klasse-1-Integron-Struktur
XVI	5'-CS - *aac(6')-Ib'* - 3'-CS
XVII	5'-CS - *aadB* *aadA1* - 3'-CS
XVIII	5'-CS - *aacA8* *bla*$_{OXA-2}$ *aacA7* - 3'-CS
XIX	5'-CS - *aac(6')-Ib* *bla*$_{PSE-1}$ *aadA2* - 3'-CS
XX	5'-CS - *aac(6')-Ib'* * ** *** *aadA2* - 3'-CS
B63230	5'-CS - *aac(6')-Ib'* *bla*$_{VIM-2}$ *aac(6')-Ib'* *cmlA* *aadA2* - 3'-CS
	5'-CS - *aac(6')-Ib* *bla*$_{PSE-1}$ *aadA2* - 3'-CS

Aminoglykosid-Resistenz vermittelndes Gen
β-Laktam-Resistenz vermittelndes Gen
Chloramphenicol-Resistenz vermittelndes Gen

*Sequenzanalysen (BLASTX Programm) ergaben 79% Aminosäurensequenz-Identität mit QacE (NP_044260), **Sequenzanalysen (BLASTX Programm) ergaben 45% Aminosäurensequenz-Identität mit dem hypothetischen Protein MED121_04115 aus *Marinomonas* sp. MED121 (ZP_01077982), *** Sequenzanalysen (BLASTX Programm) ergaben 57% Aminosäurensequenz-Identität mit der RecA/RadA Rekombinase von *Yersinia bercovieri* (ZP_00823172).

- Die Untersuchung der Resistenzmechanismen zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Stammkollektiven von CF- und nicht-CF-Patienten auf (1): Ausschließlich bei Stämmen von nicht-CF-Patienten trugen zahlreiche erworbene Resistenzgene zur Multiresistenz bei. Diese waren auf Klasse-1-Integrons lokalisiert (Abb. 4). Auch Mehrfachmodifikationen in den Zielstrukturen der Chinolone, welche hohe Resistenz-Niveaus gegenüber dieser Antibiotika-Gruppe vermitteln, wurden ausschließlich bei Stämmen von nicht-CF-Patienten detektiert.

Abb. 5. Resistenzentwicklung bei einem Mutatorstamm unter simulierter Meropenem-Therapie (2)



(a) Absterbekinetik für den Mutatorstamm XXI unter der simulierten Behandlung mit Meropenem (Dosierung: 3x 1g). Keimzahl der Gesamt-population (blau) und der Mutante (rot) während der Behandlung. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der drei applizierten Dosen.

(b) Konzentrations-Zeit-Kurve von Meropenem nach einer 1g Dosis. MPC: Mutanten-Präventions-konzentration (MHK der Einschritt-Mutante des Mutatorstamms XXI). MHK: Minimale Hemmkonzentration gegenüber dem Mutatorstamm XXI.

- Die Untersuchungen zur Entwicklung von mutationsvermittelter Resistenz unter der Therapie zeigten auf, dass die Standarddosierungen von Meropenem und Ceftazidime eine Selektion von Mutanten weder bei Wildtyp- noch bei Mutatorstämmen verhindern können (2). Für den therapeutischen Erfolg inklusive der Vermeidung von Resistenzentwicklung wären Konzentrationsprofile günstiger, bei denen die Antibiotika-Konzentrationen länger oberhalb der MHK von Einschritt-Mutanten (Mutanten-Präventionskonzentration (MPC)) bleiben. Bei *P. aeruginosa*-Stämmen von CF-Patienten ist der Mutatorphänotyp sehr häufig und Resistenz wird vorwiegend über chromosomale Mutationen erworben. Hier ist die Akkumulation von weiteren Mutationen unter wiederkehrenden Therapiezyklen besonders problematisch.

Literatur

1. Henrichfreise, B., I. Wiegand, W. Pfister, B. Wiedemann. 2007. Resistance Mechanisms of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from Germany and Correlation with Hypermutation. Antimicrob. Agents Chemother. 51:4062-4070.
2. Henrichfreise, B., I. Wiegand, I. Luhmer-Becker, B. Wiedemann. 2007. Development of Resistance in Wildtype and Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Strains Exposed to Clinical Pharmacokinetic Profiles of Meropenem and Ceftazidime Simulated In Vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 51:3642-3649.
3. Henrichfreise, B., I. Wiegand, J. Wagner, B. Wiedemann. 2006. VIM-Metallo-β-Laktamase erstmalig in Deutschland bei *Pseudomonas aeruginosa* detektiert: Ein Fallbericht. Chemother. J. 15:17-19.
4. Henrichfreise, B., I. Wiegand, K. Sherwood, B. Wiedemann. 2005. Detection of VIM-2 Metallo-β-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. Antimicrob. Agents Chemother. 49:1668-1669.

Danksagung

Reinhard Marre, Heike von Baum, Sebastian Suerbaum, Stefan Ziesing und Jutta Wagner gilt Dank für das Zusenden klinischer *P. aeruginosa*-Stämme. Frau Christine Fuhst und Frau Antina Barger danken wir für Ihre wertvolle Beratung zur Durchführung von *in-vitro* Modellen. Das Projekt wurde durch Astra Zeneca finanziell unterstützt. B. Henrichfreise erhielt ein Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes und dankt allen Mitgliedern der Abteilung Pharmazeutische Mikrobiologie für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre, große Hilfsbereitschaft und Kollegialität.