

**BVMed-Hygieneforum 2017  
Prävention von Krankenhausinfektionen**

# **Mechanismen und Übertragung von Antibiotikaresistenzen**

— **Hortense Slevogt**

Host Septomics, Jena, Germany  
5. Dezember. 2017

# Verdacht: Tödliche Keime durch indische Pharma-Abwässer

## Tausendfach überhöhte Werte

(Zeit 4.5.2017)



Berlin (dpa) - Große Antibiotika-Fabriken in Indien könnten durch mangelnde Abwasserreinigung mit zur Entstehung multi-resistenter Bakterien beitragen. Das haben Recherchen von NDR, WDR und Süddeutscher Zeitung am indischen Pharmastandort Hyderabad ergeben.

- **“... moxifloxacin, voriconazole, and fluconazole (up to 694.1, 2500, and 236,950 µg/L, respectively) as well as increased concentrations of eight other antibiotics were found in sewers in the Patancheru-Bollaram industrial area.**
- **Corresponding microbiological analyses revealed an extensive presence of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-fermenters (carrying mainly bla OXA-48, bla NDM, and bla KPC) in more than 95% of the samples.”**

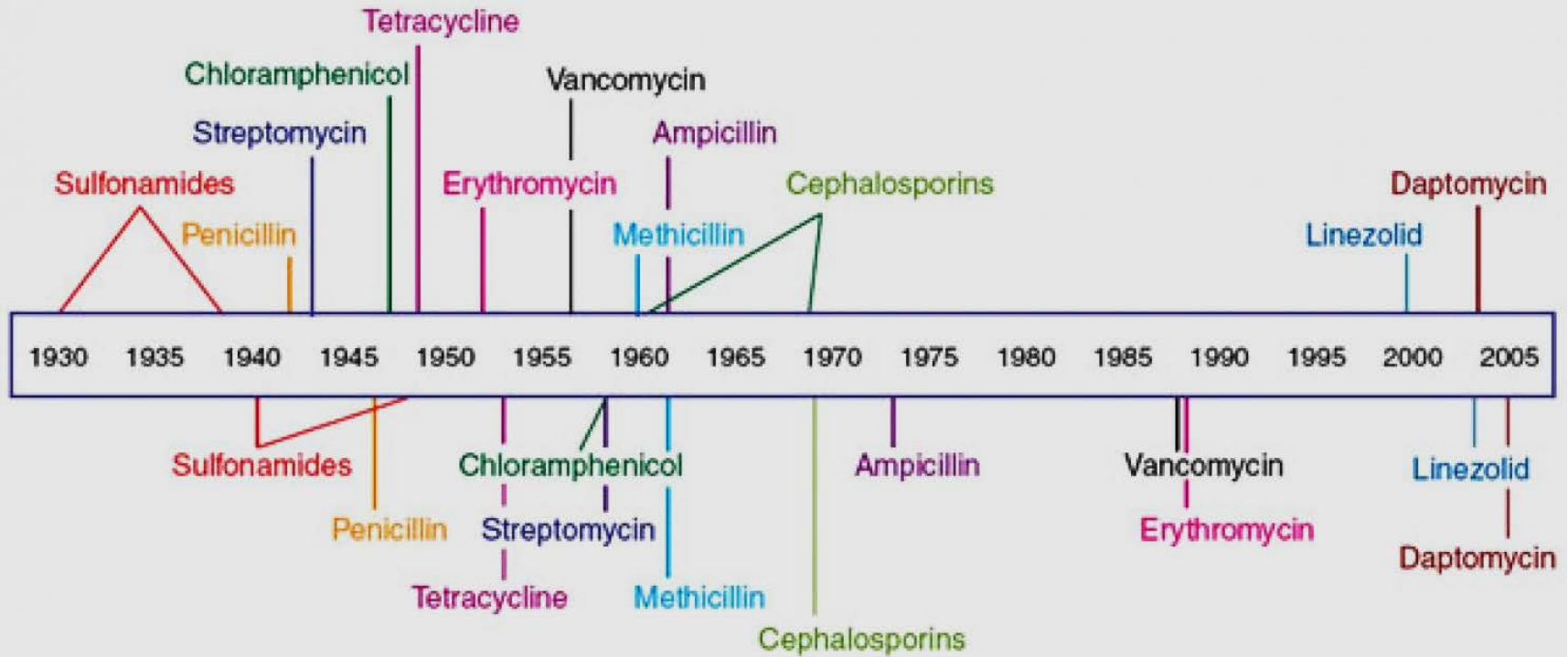
**CDC: Weekly / January 13, 2017 / 66(1);33**

**Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Washoe County, Nevada**

August 25, 2016:

- Notification of a female patient and Washoe County resident at an acute care hospital with **carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) that was resistant to all available antimicrobial drugs.**
- The specific CRE, *Klebsiella pneumoniae*, was isolated from a wound specimen
- The patient was placed in a single room under contact precautions.
- She arrived in the United States in early August 2016 after an extended visit to India.
- She was admitted to the acute care hospital on August 18 with a primary diagnosis of SIRS, likely resulting from an infected right hip seroma.
- **The patient developed septic shock and died in early September.**
- During the 2 years preceding this U.S. hospitalization, the patient had **multiple hospitalizations in India** related to a right femur fracture and subsequent osteomyelitis
- The most recent hospitalization in India had been in June 2016.
- The isolate was sent to CDC, which confirmed the presence of
- **New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM).**

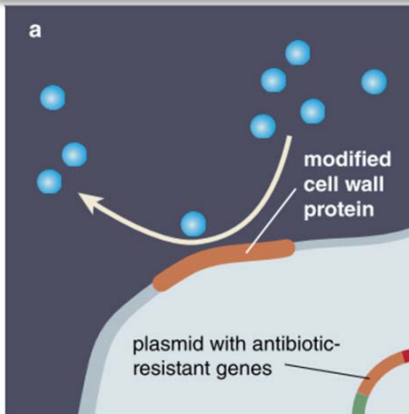
# Einführungszeitpunkt des Antibiotikums



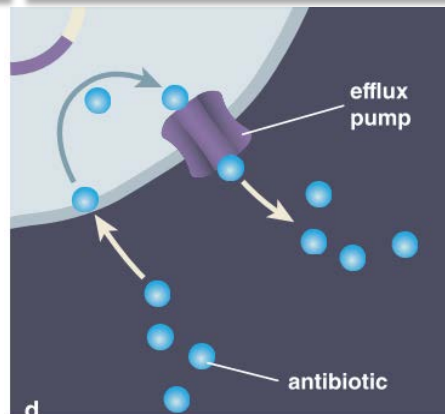
# Zeitpunkt von ersten klinisch relevanten, resistenten Isolaten

# Bakterielle Resistenz-Strategien

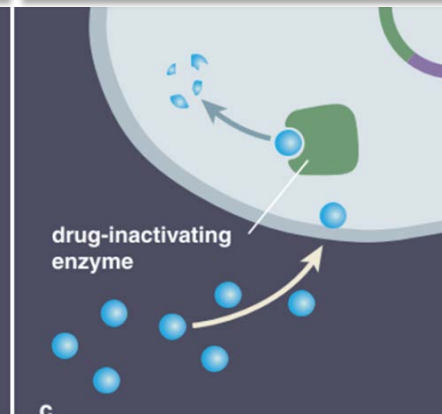
Reduziertes Eindringen in die Zelle



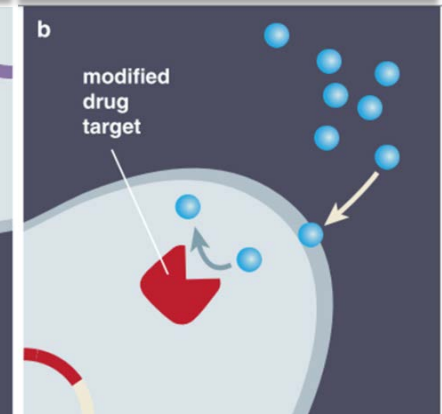
Beschleunigtes Ausschleusen durch Effluxpumpen



Inaktivierung des Antibiotikums



Modifikation von Zielmolekülen des Antibiotikums



# Arten der Resistenz

## Natürliche, intrinsische Resistenz:

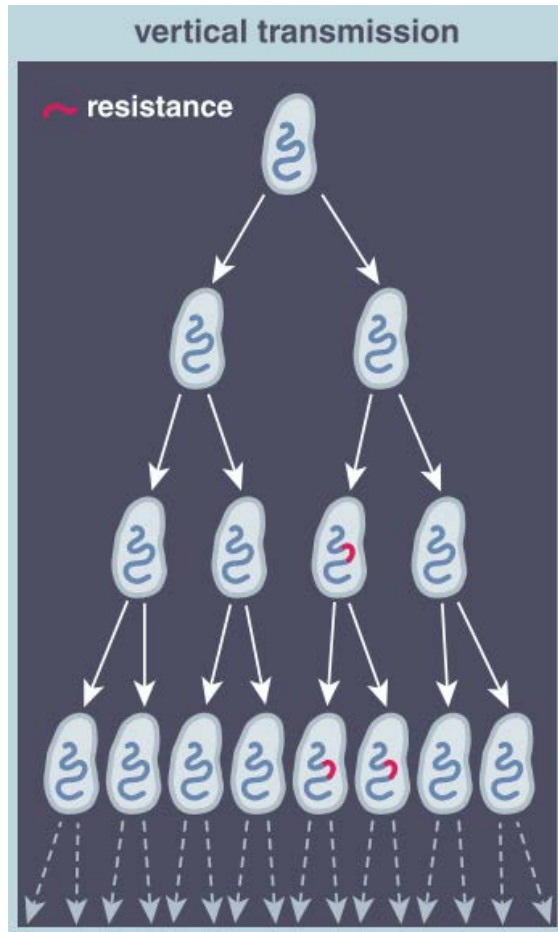
Mikroorganismen sind von Beginn an resistent gegen die Chemotherapeutika

Strukturelle oder funktionelle Eigenschaften von Mikroorganismen, die die Antibiotikawirkung inaktivieren:

- Impermeabilität der Zellwand für das Antibiotikum
- Zielstruktur der Antibiotikawirkung nicht vorhanden
- angeborene Produktion von Enzymen, die das Antibiotikum inaktivieren
- aktive Exporter, die das Antibiotikum aus der Zelle schleusen

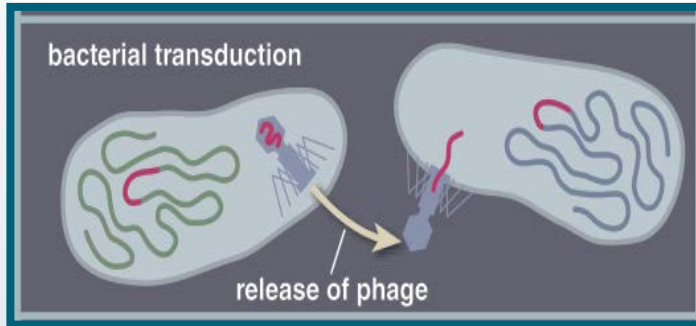
# Erworbene vertikale und horizontale Resistenz (Veränderung des Genoms):

## Vertikal: Mutation im eigenen Genom



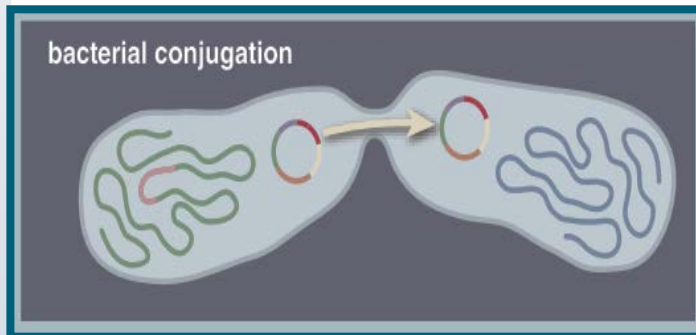
- Mutationen im Genom von Bakterien finden mit einer Rate von  $10^{-4}$  -  $10^{-10}$  pro Zellteilung statt
- in ca. 1:1 Milliarde bildet sich ein wirksames Resistenzgen aus
- Exposition mit Antibiotikum führt zu einem Selektionsvorteil
- die ganze Population kann dann resistent werden
- Single *large-step* Mutation - Starker Anstieg der MIC
- *Multistep* Mutation - gradueller Anstieg

# Horizontaler Gentransfer



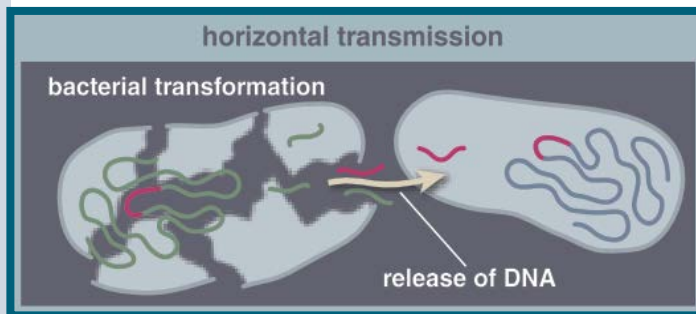
## Transduktion:

- Phagen können durch ihren Vermehrungszyklus Resistenzgene auf nichtresistente Zellen übertragen (z. B. Resistenzgene von Penicillin-resistenten Staphylokokken)



## Konjugation:

- Übertragung von Resistenzplasmiden über Zytoplasma-Brücken
- dieser Vorgang wird von Plasmiden selbst kodiert
- große Effizienz
- vorwiegend bei gramnegativen Bakterien (Enterobacteriaceae)



## Transformation:

Lösliche DNA-Stücke werden aufgenommen (eher unbedeutend)



**MRSA ein Erreger – ein Resistenzmechanismus**

Austausch der genetischen Information zwischen *S. aureus* Stämmen

**ESBL und Carbapenemasen =**

**Oberbegriff für eine Gruppe von ca. 200 Enzymen**

Diese können von ca. 10 verschiedenen Bakterien gebildet werden

Die genetische Information kann zwischen Bakterien ausgetauscht werden

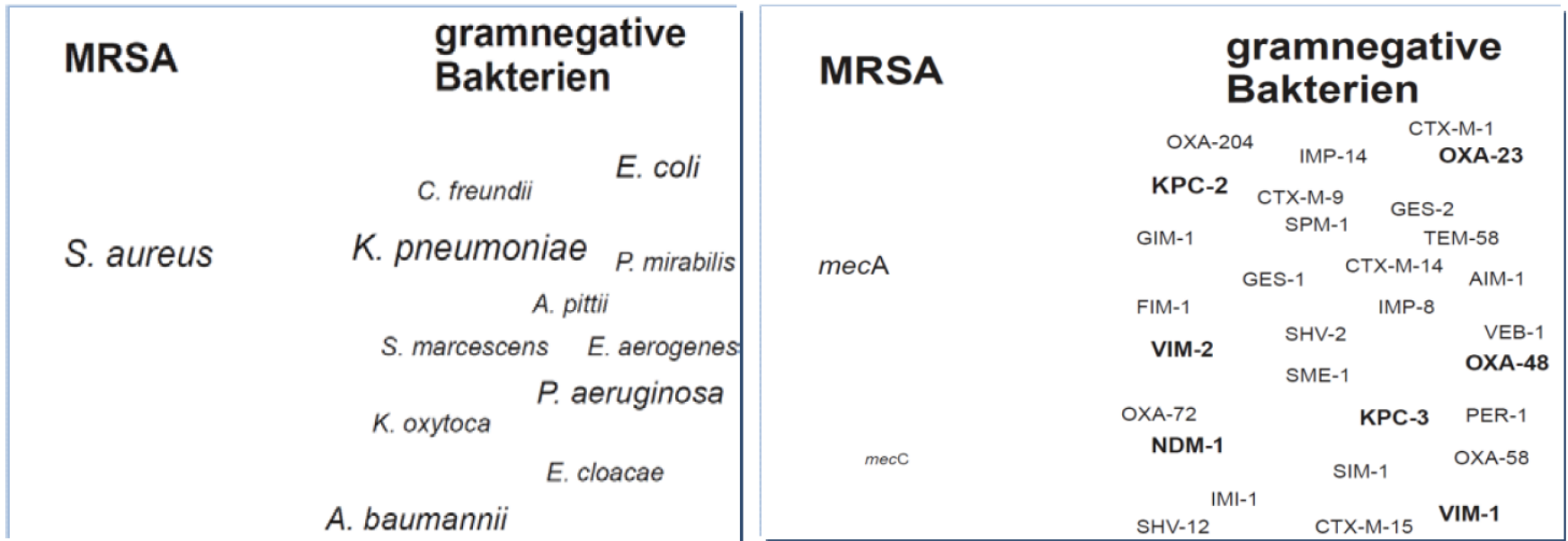
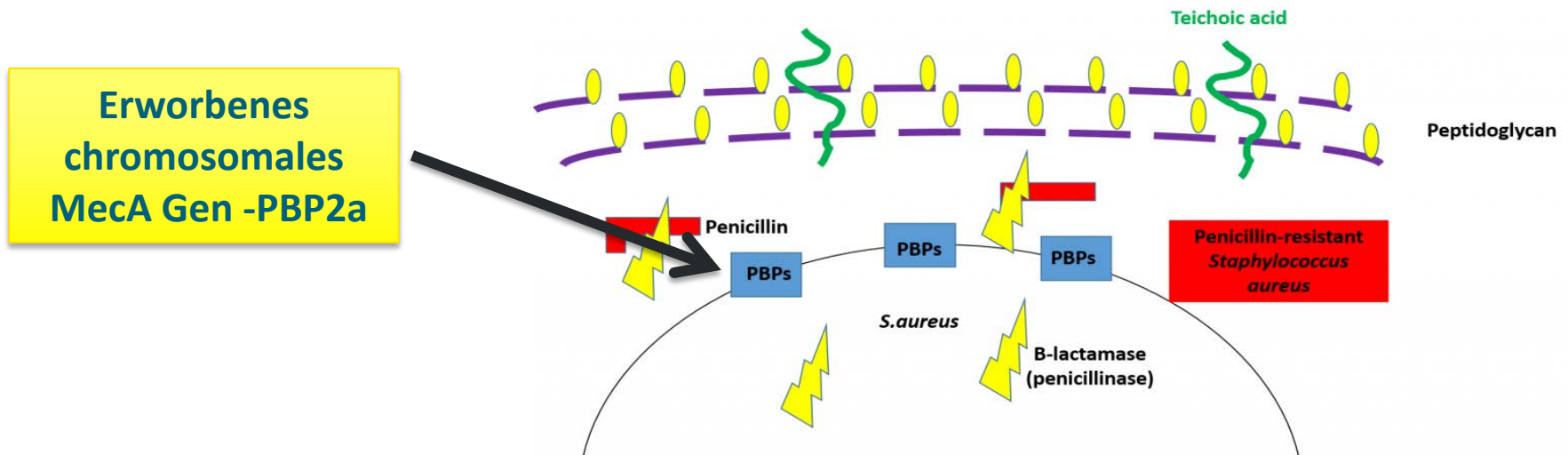


Abbildung M. Kaase, NRZ für gramnegative Krankenhauserreger, Bochum

# MRSA und Penicillin-Bindungsprotein

- $\beta$ -Lactam-Antibiotika binden an das Penicillin-Bindungsprotein (PBP)
- PBP = bakterielle Transpeptidase, die Bausteine der Zellwand verknüpft
- Zielmolekül der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika
- $\beta$ -Lactam-Antibiotika binden irreversibel an die Transpeptidase, welche dadurch dauerhaft inaktiviert wird
- keine neuen Verknüpfungen und somit Erliegen der Zellwandsynthese



- Resistenzgen MecA kodiert für ein modifiziertes PBP (PBP2a, syn. PBP2') mit einer deutlich verringerten Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika

# Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamasen (ESBL)

Antibiotikaresistenz-Eigenschaft gramnegativer Infektionserreger

Zwei mögliche Arten der Entstehung:

- Punktmutation einer gewöhnlichen  $\beta$ -Lactamase
- HGT von Umweltkeimen zwischen verschiedenen Bakterienspezies

Erweitertes Spektrum der beta-Laktamasen

- Penicilline
- Cephalosporine 1.-3. Generation
- Monobactame

Inhibierbar durch  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren

Häufigste Typen

TEM

SHV

CTX-M (Übertragen von Umweltbakterien - Kluvera spez.)

Häufigste Bakterienspezies: *E. coli* und *Klebsiella*

## Carbapenem-resistente Enterobacteriaceae (CRE)

### Carbapenemase-produzierende CRE (CP-CRE)

Resistenzmechanismus: Enzyme, die von Bakterien produziert werden, die Carbapeneme direkt inaktivieren

Carbapenemasen mit globaler Bedeutung sind:

- *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasen (**KPC**)
- New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-type 1 (**NDM-1**)
- Verona integron encoded metallo- $\beta$ -lactamase (**VIM**)
- Imipenemase metallo- $\beta$ -lactamase (**IMP**)
- Oxacillinase-48 (**OXA-48**)

CR-CRE sind primär verantwortlich für den weltweiten Verbreitung der CRE

Sie sind oft lokalisiert auf Plasmiden

# Mögliche Übertragungswege im Krankenhaus:

## **De novo Mutation in den körpereigenen Mikrobiota**

- Antibiotikagabe verstärkt die Genomische Plastizität und die Mutationsrate
- **Aber:** Carbamapenase entstehen i.d.R. nicht durch **de novo** Synthese

## **Anreicherung resistenten Bakterien durch Antibiotikagabe**

## **Horizontaler Gentransfer auf die körpereigenen Mikrobiota**

- Anreicherung von mobilen genetischen Elementen mit unterschiedlichen ARG
- Austausch zwischen verschiedenen Spezies möglich
- Mikrobiota als Resistenzgenreservoir

## **Übertragung resistenter Bakterien**

## Woher kommen Antibiotikaresistenzgene (ARG) ?

### Unkritischer Einsatz von Antibiotika

Zu hoher Verbrauch

Zu häufige Verschreibung

### In den Entwicklungsländern:

Oft: Selbstmedikation

Medikamente sind noch in vielen Ländern frei verkäuflich

Tabletten werden oft einzeln verkauft

### Außerhalb des Gesundheitsbereichs:

Einsatz von Antibiotika als Mastverbesserer und als

Infektionsprophylaxe in der Tierzucht

In Aqua-Kulturen (Fischzucht)

# Woher kommen Antibiotikaresistenzgene (ARG) ??

## Die Umgebung als Reservoir für ARG

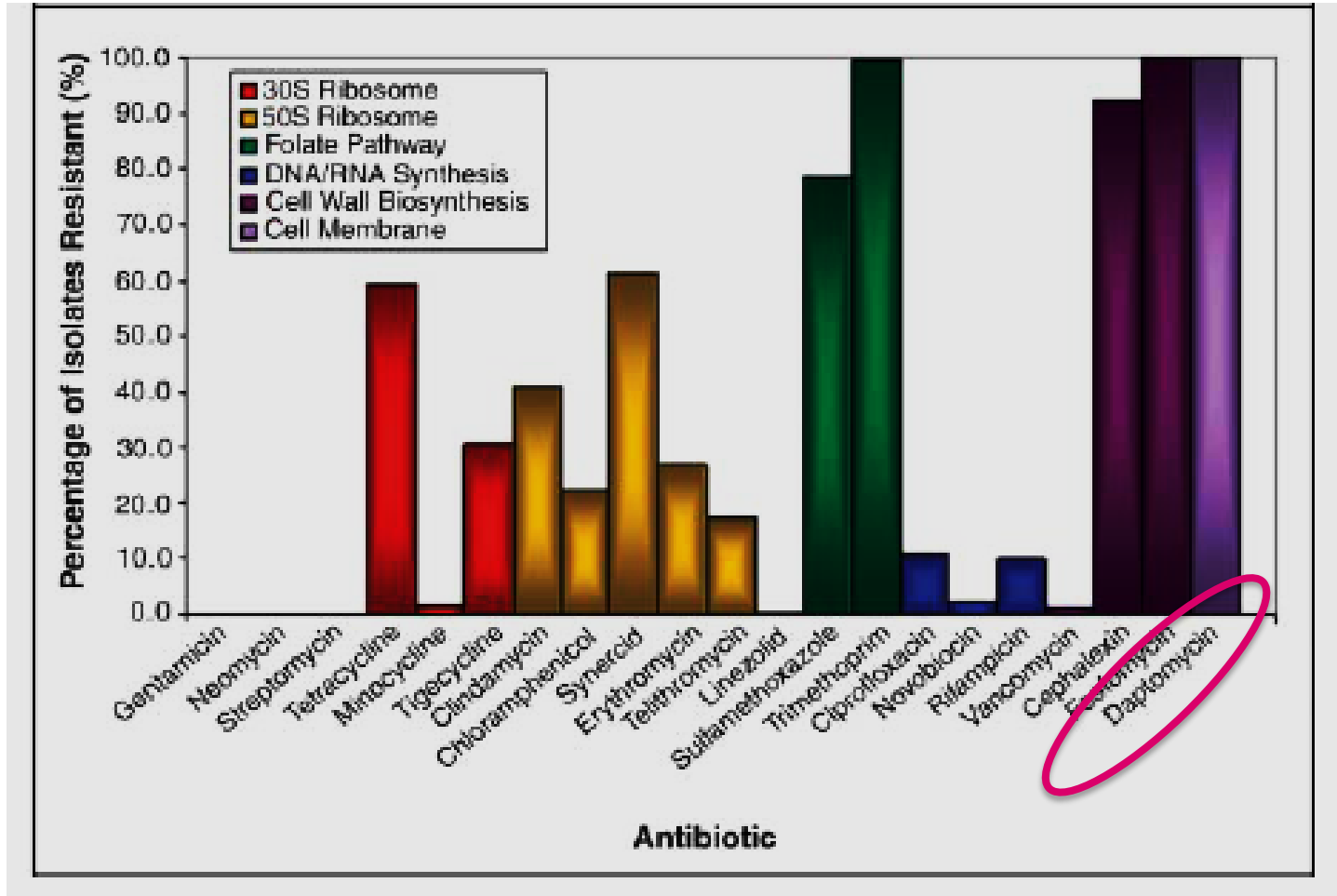


- Weltweit:  $5 \times 10^{30}$  Bakterien
- die große Mehrheit ist nicht human-pathogen
- ARG sind in jeder Bakterienpopulation vorhanden
- Mikroorganismen können Antibiotika synthetisieren, die für andere Bakterien toxisch sind
- parallel: Entwicklung von Strategien, diesen Antibiotika zu entgehen
- Bakterien der Umgebung, deren Ursprung sich auf Milliarden von Jahren zurückdatieren lassen, tragen Antibiotikaresistenzgene gegen Substanzen, die heute in der Medizin eingesetzt werden

## Competition - Communication

# „Sampling the Antibiotic Resistome“

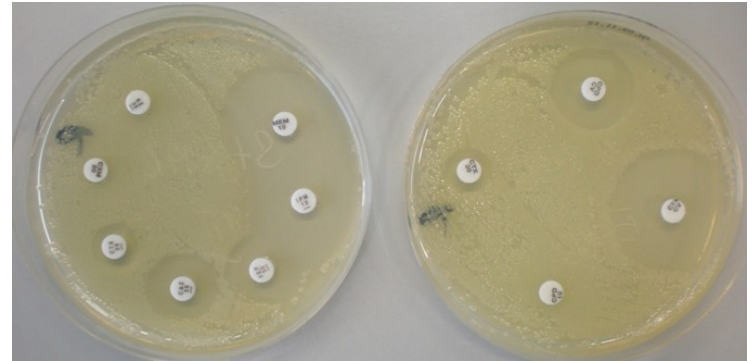
Antibiotikaresistente Umweltbakterien





# Exkursion: Nachweis von Antibiotikaresistenzen I

## Kultur-basierter Nachweis



- Voraussetzung: Bakterien müssen kultivierbar sein
- nur bestimmte Bakterien können untersucht werden
- Isolation erfolgt auf Agarplatten mit Zusätzen von Selektionsmedien
- die Resistenz wird als MIK bestimmt
- Analyse der Resistenzmechanismen

# Exkursion: Nachweis von Antibiotikaresistenzen II

## Gen-basierte Analyse

### Sequence-based Metagenomics

- Nachweis von nicht-kultivierbaren Bakterien
- Keine Identifikation der Bakterien Populations-abhängig als Resistom

DNA Extraktion aus Proben

Detektion der Gene mittels PCR

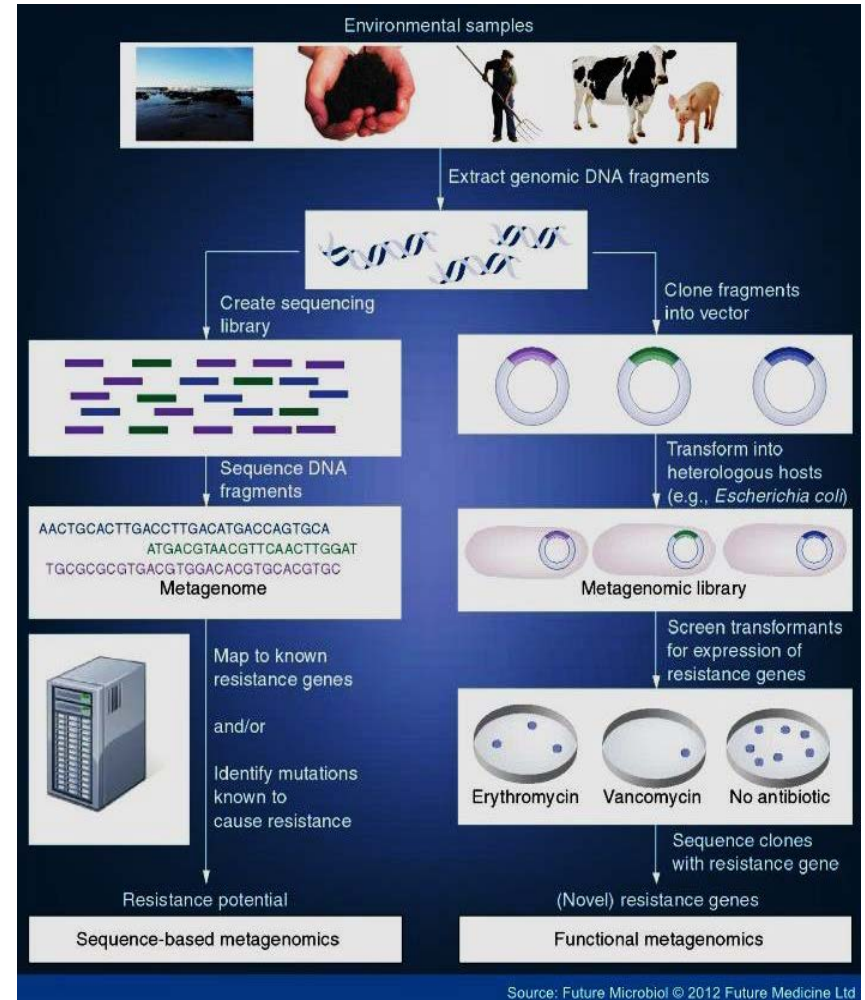
Vorherige Informationen über ARG

Sequenzen notwendig

Vergleich anhand von Datenbanken

### Functional Metagenomics

- Klonieren der DNA in *E. coli*
- Selektionsmedium
- Sequenzierung

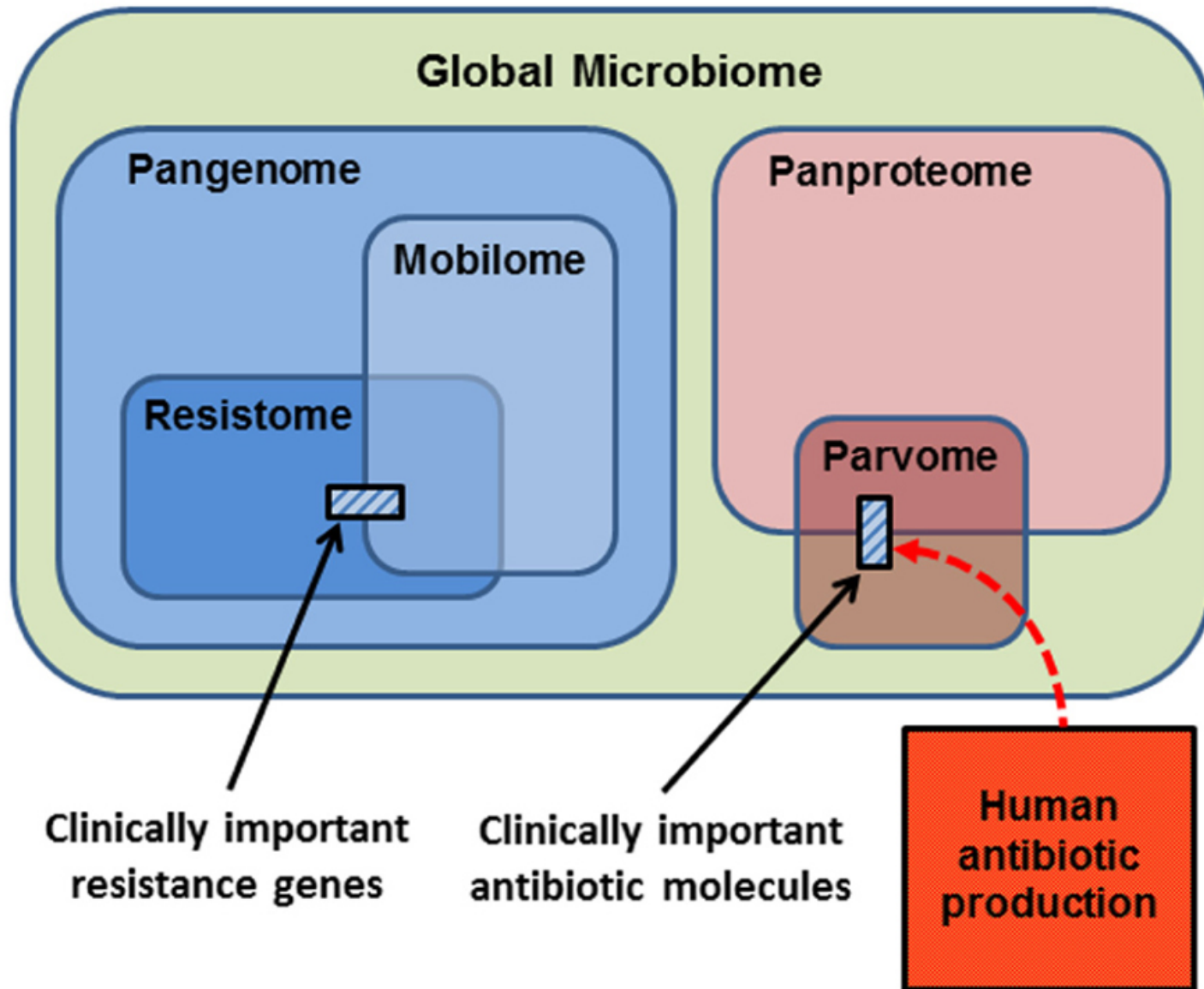


## Das Resistom

- Gesamtheit aller nachweisbaren Gene einer Bakterienpopulation, die für einen funktionell wirksamen Phänotyp einer Antibiotikaresistenz kodieren
- Datenbanken umfassen bisher über 30.000 beschriebene Resistenzgene
- jede bakterielle Population verfügt über Resistenzgene

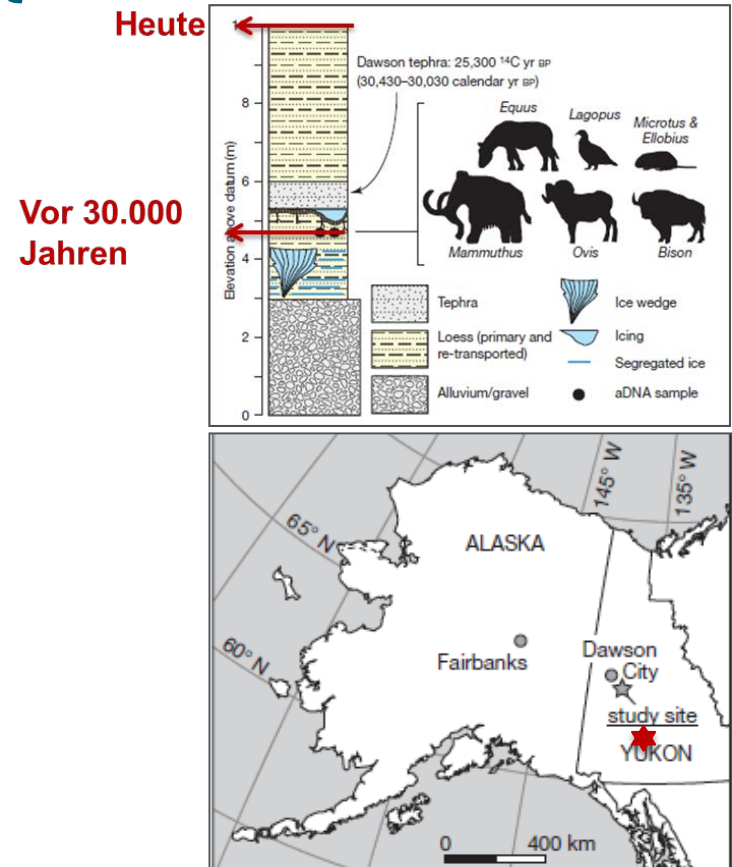
## Mobile genetische Elemente

- transportieren DNA zwischen verschiedenen Genomen:
  - Plasmide
  - Transposons
  - Integrons
- Diversität der prokaryotischen Genome
- ihre Gesamtheit pro Bakterienpopulation wird als **Mobilom** bezeichnet



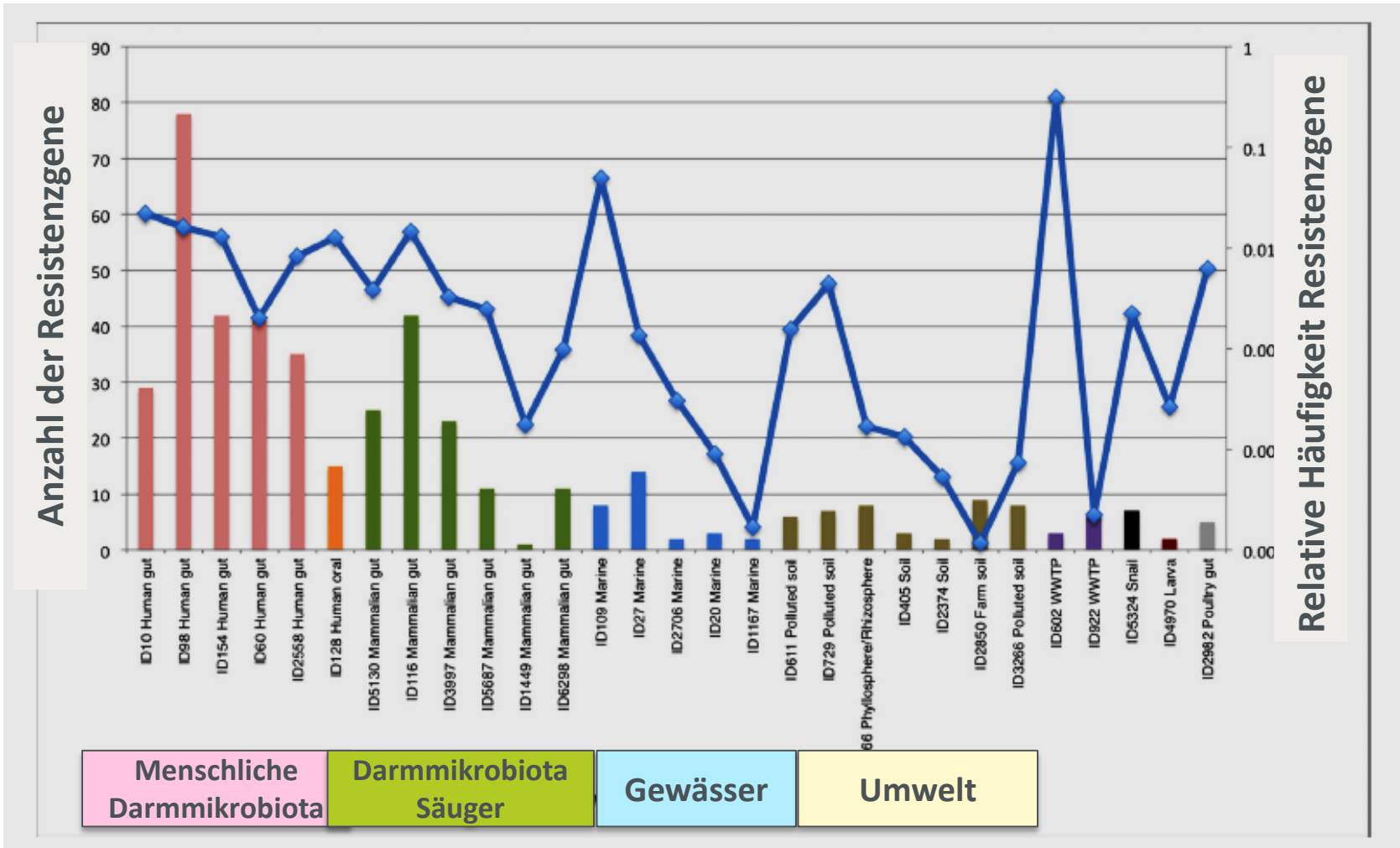
# „Antibiotic resistance is ancient“

- Metagenomische Analyse
- DNA aus 30.000 Jahre alten Permafrost Sedimenten
- Nachweis von Resistenzgenen
  - Betalaktam Antibiotika
  - Tetrazykline
  - Glykopeptid Antibiotika
- Nachweis eines Vancomycin Resistenz Elementes **VanA**, welches den heutigen ARG der Klinik ähnelt



“These results show conclusively that antibiotic resistance is a natural phenomenon that predates the modern selective pressure of clinical antibiotic use.”

# Antibiotic resistance genes across a wide variety of metagenomes



# Mikrobiota als virtuelles Organ des Menschen

Anzahl der menschlichen Zellen: 30 Billionen

Anzahl der uns besiedelnden Mikroben: 30 Billionen

Verhältnis: **1:1**

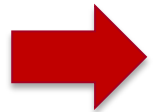
Mehr als 2.000 verschiedene Spezies

Und 7.000 Stämme

Unser Darm ist das am dichtesten besiedelte mikrobielle Ökosystem unseres Planeten!

Anteil an der humanen Körpermasse:

1 - 3 % (0,7 – 2,1 kg / 70 kg)



**Wir sind als Mensch ein besonderes Biotop für an uns adaptierte Mikroorganismen**

## Ein isolierter Amazonasstamm der Yanomami Indianer in Venezuela besitzt bereits Antibiotikaresistenzen im oralen und Darmmikrobiom



### Funktionell wirksame ARG gegen:

- Piperacillin
- Piperacillin-tazobactam
- Aztreonam
- Chloramphenicol
- Tetracycline

**Conclusion: “These results suggest that (...) functional AR genes appear to be a feature of the human microbiome even in the absence of exposure to commercial antibiotics.”**



# Auswirkungen von Antibiotika in der Umwelt

Einbringung von Antibiotika-bzw. resistenten Keimen mit humanen Fäkalien, Tierkot, Gülle, etc.

Mobilisierung von ARG in Bodenbakterien

Entstehung neuer ARG durch Mutationen

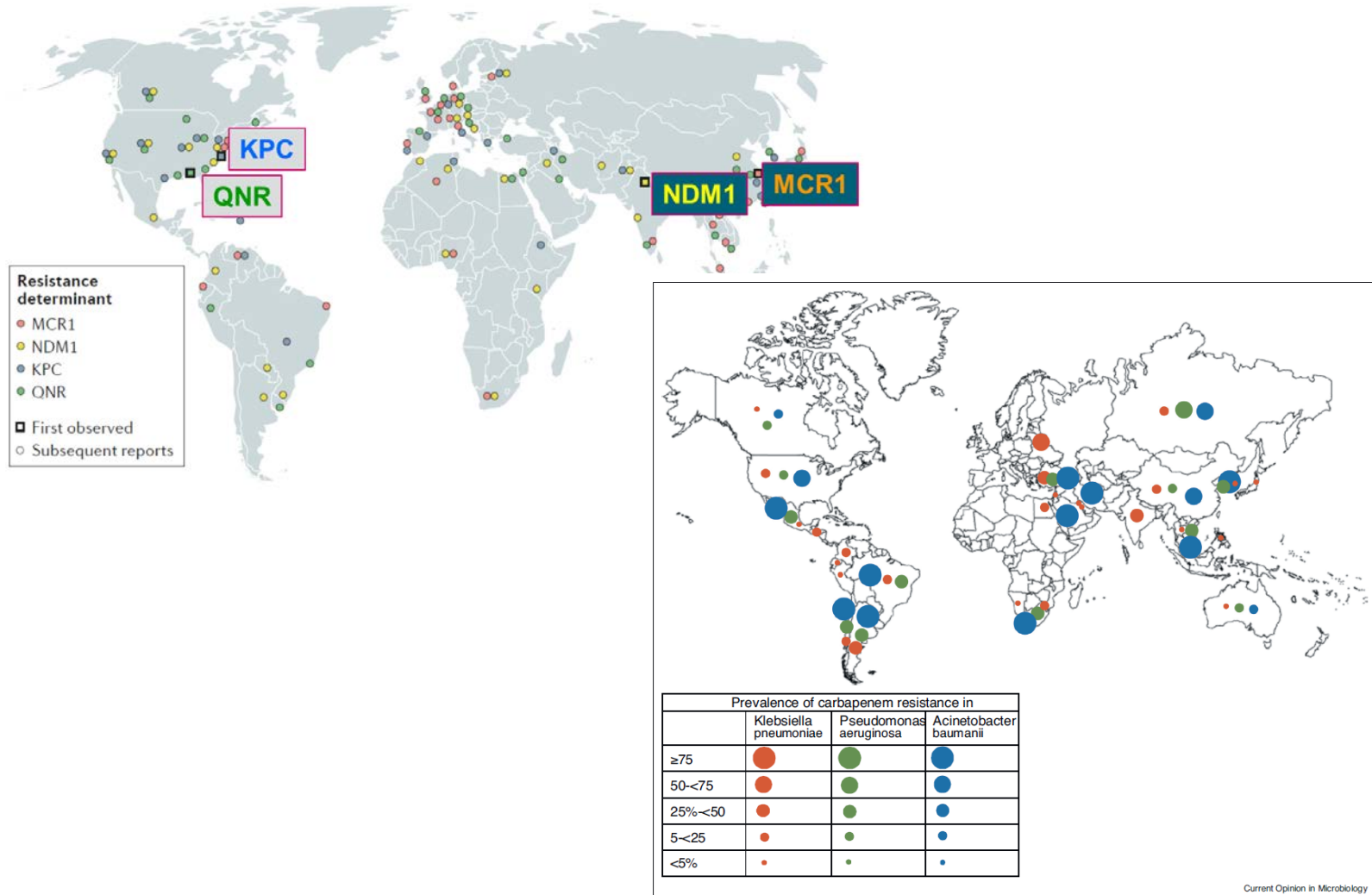
Selektion von ARG-tragenden Bakterien

Gentransfer von ARG auf Umweltbakterien

Überleben

Anreicherung von ARG in Umweltkeimen  
Veränderungen des Mikrobioms/ Resistoms

# Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen



Resistance rates of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens globally, see Figure 1.

15.11.2017

## Antibiotika-Resistenzen bedrohen den medizinischen Fortschritt“

Ergebnis einer Onlinebefragung von 375 Experten bestätigt das Risiko durch den zu hohen Einsatz von Antibiotika.

Studienleiter Markus Lehmkuhl vom Institut für Germanistik des KIT

### Maßnahmen

Anteil der Experten, die eine Maßnahme für sinnvoll bis sehr sinnvoll erachten



Reduzierung von Antibiotika in der Humanmedizin



Reduzierung von Antibiotika in der Nutztierhaltung



Entwicklung von neuen Antibiotika



Verbesserung der Hygiene in Krankenhäusern



Entwicklung von Impfstoffen

Danke für die Aufmerksamkeit

