

Die Vielfalt der antimikrobiellen Resistenzgene von in Deutschland
isolierten Stämmen der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. dent.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Sebastian Martin Michael Rong

18.02.1987, Greifswald

angefertigt an: Universität Leipzig;

Universitätsklinikum Leipzig AöR

Institut für Medizinische Mikrobiologie und

Virologie

Betreuerin: PD Dr. habil. Catalina Suzana Stingu

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einführung	1
1.1 Antibiotische Therapie und antibakterielle Resistenz	2
1.2 Resistenzlage und Resistenzmechanismen bei <i>Bacteroides</i> und <i>Parabacteroides</i> Spezies	6
2 Publikation „Die Vielfalt der antimikrobiellen Resistenzgene von in Deutschland isolierten Stämmen der Gattungen <i>Bacteroides</i> und <i>Parabacteroides</i>“	8
3 Zusammenfassung der Arbeit	16
4 Schlussfolgerung	24
5 Literaturverzeichnis	25
6 Darstellung des eigenen Beitrags	30
7 Selbstständigkeitserklärung	31

Abkürzungsverzeichnis

DNA	deoxyribonucleid acid / Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alia / und andere
IS	insertion sequence / Insertionssequenz
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry
MATE	multidrug and toxic compound extrusion
MBK	minimale bakterizide Konzentration
mg/l	Milligramm pro Liter
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
MHK	minimale Hemmkonzentration
M.I.C.E.	minimum inhibitory concentration evaluator
min	Minute
MLSKO	Makrolide, Lincosamide, Streptogramine, Ketolide und Oxazolidinone
MRSA	Methicillin-resistenter / Multiresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Anzahl
NDM	Neu-Delhi Metallo-β-Laktamase
p	probabilitas / Wahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction
R	resistant / resistent
RNA	ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RND	resistance-nodulation-division
s	Sekunde
S	susceptible / sensibel
spp.	Spezies
VIM	Verona-Integron Metallo-β-Laktamase

1 Einführung

Der Dickdarm ist der Teil des menschlichen Körpers mit der größten Bakterienpopulation, pro Gramm findet man eine Zahl von etwa 10^{11} Mikroorganismen vor¹. Die Bakterien der Gattung *Bacteroides* sind dabei mit einem Anteil von ca. 25 % die vorherrschende Spezies². Sie werden der Familie der *Bacteroidaceae* zugeordnet und sind obligat anaerobe, gramnegative, pleomorphe, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien. Die Gattung *Bacteroides* unterteilt sich wiederum in verschiedene Arten, allerdings gab es in den vergangenen Jahrzehnten große Veränderungen in der Systematik und Zuordnung¹. Derzeit gehören über 20 Vertreter zum *Bacteroides*- bzw. *Parabacteroides*-Genus³. Die Gattung *Parabacteroides* wurde im Jahr 2006 als neues Genus definiert, weil die Vertreter *B. distasonis*, *B. merdae* und *B. goldsteinii* als *P. distasonis*, *P. merdae* und *P. goldsteinii* neu klassifiziert wurden⁴. *Bacteroides fragilis*, der am häufigsten vorkommende Vertreter in klinischen Proben, weist dabei die höchste Virulenz auf¹. Somit nimmt *B. fragilis* innerhalb dieser Gruppe als Hauptverursacher für verschiedene Erkrankungen eine zentrale Stellung ein, obwohl diese Art nur 0,5 % der menschlichen bakteriellen Darmflora ausmacht⁵. Die *Bacteroides* spp. sind bereits zehn Tage nach der Geburt im menschlichen Körper vorzufinden⁶. Demzufolge sind sie für den Menschen als Kommensalen anzusehen, d.h. es findet eine Interaktion zwischen Individuen verschiedener Arten statt, wobei ein Partner profitiert und die Interaktion für den anderen Partner einen neutralen Effekt hat. Aufgrund der nachgewiesenen positiven Funktionen der *Bacteroides* spp. im menschlichen Darm ist sogar eher von Mutualismus zu sprechen, dabei profitieren beide Partner von der Interaktion⁷. So kann v.a. *B. thetaiotaomicron* anderen, für die Darmflora wichtigen Bakteriengattungen, Nährstoffe bereitstellen, indem es die Fähigkeit besitzt, komplexe Polysaccharidverbindungen aufzutrennen⁸. Der Besitz einer großen Anzahl Abbauenzyme in Form von Glykosylhydrolasen, vor allem bei *B. thetaiotaomicron*, bekräftigt die wichtige Rolle bei der Unterstützung des Kohlenhydratmetabolismus des Menschen⁹. Auch im Bereich der Immunabwehr erfüllen die *Bacteroides* spp. Aufgaben, so kann *B. fragilis* ein Polysaccharid bilden, welches T-Zellen aktiviert¹⁰. Des Weiteren wird angenommen, dass potenziell pathogene Erreger, z.B. *Clostridium difficile*, von den *Bacteroides* spp. daran gehindert werden, den Darm zu besiedeln¹¹.

Eine Pathogenität entsteht dann, wenn die *Bacteroides* spp. den Gastrointestinaltrakt, also das Milieu, in dem sie als wichtige Interaktionspartner fungieren, verlassen und in eigentlich sterile Bereiche des Körpers vordringen. Ursachen können Perforationen des Darms oder bauchchirurgische Eingriffe sein, welche gefährliche Erkrankungen nach sich ziehen können. Eine „Freund und Feind“-Beschreibung ist für die von

B. fragilis produzierten Polysaccharide zutreffend, im Darm sind diese für die Entwicklung des Immunsystems wichtig, im pathogenen Zustand wiederum an der Ausbildung von Abszessen beteiligt. Die Virulenzfaktoren bei allen *Bacteroides* spp. sind die Anheftung am Gewebe, die Zerstörung des Gewebes und der Schutz vor der Immunantwort des Wirts. Die Produktion von Entero- bzw. Endotoxinen und Lipopolysacchariden spielt eine wesentliche Rolle, vor allem die Gruppe der Enterotoxin-produzierenden *B. fragilis*-Stämme (ETBF), welche eine Zink-Metalloprotease bilden, haben aufgrund der Pathogenität große klinische Bedeutung¹. Im Erwachsenenbereich treten zum größten Teil Mischinfektionen auf, *B. fragilis* ist am stärksten an diesen anaeroben Infektionen beteiligt. Die Mortalitätsrate liegt bei 19 %, bleibt die Infektion unbehandelt, kann die Mortalitätsrate auf 60 % steigen¹². Die intraabdominelle Sepsis ist die am häufigsten von *Bacteroides* spp. verursachte Infektion. Zu Beginn liegt dabei eine Mischinfektion vor, bei der nach weiterem Fortschreiten durch Sauerstoffreduktion die *Bacteroides* spp. dominieren. Des Weiteren sind die perforierte Appendizitis und im gynäkologischen Bereich die Bartholinitis zu erwähnen¹. Eine Endo- oder Perikarditis hängt normalerweise nicht mit der Anwesenheit von pathogenen Stämmen der Gattung *Bacteroides* zusammen. Sind diese jedoch an der Infektion beteiligt, können schwerwiegende Konsequenzen für den Patienten die Folge sein, mitunter kann die Mortalitätsrate auf 43 % steigen¹³. Bei der Bakteriämie ist ebenfalls ein hoher Anteil von *Bacteroides* spp., v.a. *B. fragilis*, zu beobachten¹⁴. Im pädiatrischen Bereich sind Enterotoxin-produzierende *B. fragilis*-Stämme für Durchfallerkrankungen bei ein- bis fünfjährigen Kindern verantwortlich¹⁵.

1.1 Antibiotische Therapie und antibakterielle Resistenz

Das Ziel der antibakteriellen Therapie ist es, für den Menschen schädliche und Krankheiten verursachende Bakterien zu bekämpfen. Dabei unterscheidet man Substanzen, die entweder eine bakteriostatische, also das Bakterium in seiner Vermehrung hemmende Wirkung aufweisen, oder bakterizide Substanzen, welche die Bakterien irreversibel abtöten. Zusammengefasst spricht man bei antibakteriell wirkenden Substanzen heutzutage von Antiinfektiva, Antibiotika im klassischen Sinne sind Substanzen, welche als Stoffwechselprodukte von Pilzen (z.B. Penicillin) oder Bakterien (z.B. Streptomycin) entdeckt wurden, während antimikrobiell wirksame Chemotherapeutika synthetisch hergestellte Substanzen sind. Diese Begriffstrennung ist mittlerweile obsolet, da die einst nur natürlich vorkommenden Antibiotika in ihrer chemischen Struktur entschlüsselt wurden und eine synthetische Herstellung möglich ist¹⁶. Als Mitbegründer der modernen antimikrobiellen Therapie gelten Paul Ehrlich, Sir Alexander Fleming und Gerhard Domagk. Paul Ehrlich entwickelte im Jahr 1910 das Salvarsan, welches den Syphiliserreger *Treponema pallidum*

bekämpfen konnte ¹⁷. Einige Jahre später, im Jahr 1928, entdeckte Sir Alexander Fleming in einer verunreinigten Petrischale das Penicillin, welches einen weiteren Grundstein für die moderne Antibiotikatherapie legte ¹⁸. Der Bakteriologe Gerhard Domagk, welcher im Dienst von Bayer stand, entwickelte im Jahr 1934 aufbauend auf den Erkenntnissen von Alexander Fleming die Gruppe der Sulfonamide, welche als die ersten effektiven Breitbandantibiotika galten ^{19, 20}. Bei einer schnell voranschreitenden medizinischen Entwicklung wurden im Laufe der Jahrzehnte viele neue antibakteriell wirkende Substanzen entwickelt, sodass Medizinern heutzutage eine Vielzahl von Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung steht. Die Vielfalt der auf dem Markt vorhandenen Antibiotika beruht nicht nur auf der Tatsache, dass ständig eine Verbesserung der Wirksamkeit der Substanzen angestrebt wurde, sondern auch aufgrund der Fähigkeit der Bakterien, einem gegen sie eingesetzten antibakteriellen Wirkstoff gegenüber standhaft zu bleiben bzw. diesen unwirksam zu machen. Man spricht von Resistenz, die Erreger werden unempfindlich gegenüber bestimmten Antibiotika. Resistenzen können natürlich vorkommen oder erworben werden, außerdem sind Bakterien in der Lage, sich Resistenzen gegenseitig zu übertragen. Weltweit konnte in den letzten Jahrzehnten eine dramatische Zunahme von Resistenzen beobachtet werden ¹⁶. Die Entstehung von Bakterien, welche gegenüber mehreren antimikrobiellen Substanzen verschiedener Klassen unempfindlich geworden sind, ließ den Begriff Multiresistenz aufkommen. Mittlerweile ist eine derart dramatische Zunahme von Multiresistenz zu beobachten, dass neue Definitionen Anwendung finden. So wurden zusätzlich zu MDR (engl. multidrug resistant) die Termini XDR (engl. extensively drug resistant) und als Steigerung PDR (engl. pandrug resistant) hinzugefügt ²¹.

Bakterien besitzen verschiedene Resistenzmechanismen, die Informationen dafür sind auf Resistenzgenen in der bakteriellen DNA gespeichert. Die Gesamtheit der Gene, welche für Resistenzmechanismen kodieren, wird als Resistom bezeichnet ²². Eine Übersicht über die bakteriellen Resistenzmechanismen ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 1: Resistenzmechanismen bei Bakterien ²²⁻²⁶.

Resistenzmechanismus	Erläuterung	Beispiele
Penetrationsresistenz	Antibiotikum kann nicht durch äußere Membran bei gramnegativen Bakterien hindurchgelangen, Modifizierung von Porinen möglich; kann primär oder erworben sein	Verminderung der Porin-Expression bei <i>Enterobacteriaceae</i>
Efflux	Antibiotikum wird aktiv über einen Transporter aus der Bakterienzelle herausgeschleust; hohe Gefahr der Multiresistenz, da verschiedene Antibiotika herausgepumpt werden können	Effluxtransporter der MATE-Familie bei <i>Bacteroides</i> spp.
Veränderung der bakteriellen Zielstruktur	Veränderungen der Zielstrukturen für Antibiotikum durch Mutationen, sodass keine Wirkung möglich ist Schutz der Zielstrukturen ohne Mutation	Modifikation der penicillinbindenden Proteine (Mutation im <i>mecA</i> -Gen bei MRSA) Methylaseenzyme (<i>erm</i> -Gene bei <i>Bacteroides</i> spp.) Ribosomaler Schutzmechanismus vor Tetracyclin (<i>tetQ</i> -Gen bei <i>Bacteroides</i> spp.)
Inaktivierung durch bakterielle Enzyme	Inaktivierung des Antibiotikums durch Hydrolyse Inaktivierung des Antibiotikums durch Veränderung chemischer Gruppen	β-Laktamasen (weit verbreitet), Carba-penemasen (KPC, VIM, NDM) Nitroreduktasen (<i>nim</i> -Gene bei <i>Bacteroides</i> spp.)

Um festzustellen, ob ein Bakterium empfindlich oder resistent gegenüber einer antibakteriellen Substanz ist, bedarf es eines Messwertes. Dabei hat sich in der Mikrobiologie die Verwendung der minimalen Hemmkonzentration durchgesetzt, also die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die das Wachstum eines gegebenen Bakteriums hemmt ²⁷. Demgegenüber steht die minimale bakterizide Konzentration, deren Anwendung jedoch auf bakterizid wirkende Antibiotika begrenzt ist. Die MHK wird standardmäßig in mg/l bzw. µg/ml angegeben ²⁸. Der Grenzwert (engl. breakpoint) definiert demnach, ab welchem Wert ein Mikroorganismus gegenüber dem Antibiotikum als resistent gilt.

Beispiel: MHK/Grenzwert für das Carbapenem Imipenem bei gramnegativen Anaerobiern gemäß EUCAST 2020 ²⁸.

S (sensibel) ≤ 2 mg/l; ist die MHK für Imipenem kleiner gleich 2 mg/l, ist der Mikroorganismus empfindlich gegenüber dem Antibiotikum.

R (resistent) >4 mg/l; ist die MHK für Imipenem größer als 4 mg/l, ist der Mikroorganismus resistent gegen das Antibiotikum.

Beträgt die MHK 2,001 - 4 mg/l, so ist das Bakterium zwar noch empfindlich gegenüber dem Antibiotikum, aber laut EUCAST liegt eine erhöhte Exposition vor (früher Kategorie „intermediär“).

In Deutschland wurden MHK-Werte lange Zeit vom Deutschen Institut für Normung (DIN) festgelegt. Da es in Europa große Abweichungen gab, was zu erheblichen Missständen führte, wurde von der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) die Arbeitsgruppe EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ins Leben gerufen, welche die Grenzwerte im europäischen Raum angleichen sollte. Es besteht allerdings weiterhin das Problem, Resistenzen im weltweiten Vergleich einheitlich darzustellen, da in den USA Grenzwerte vom CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) verwendet werden. Diese Werte wurden zeitweise auch in Deutschland genutzt, was zu Problemen bei der Vergleichbarkeit im klinischen Alltag führte. Für das Antibiotikum Cefotaxim beispielsweise weicht bei den *Enterobacteriaceae* der Grenzwert zwischen EUCAST und CLSI um das 16-fache voneinander ab ²⁹. Bezüglich bestimmter Bakterien ist das Fehlen von Grenzwerten für einige Antibiotika bei EUCAST ein Problem, während bei CLSI Grenzwerte vorliegen ^{28, 30}. In den USA ist zusätzlich zu den Grenzwerten vom CLSI die Benutzung der Grenzwerte der FDA (US Food and Drug Administration) akzeptiert ³⁰. Als Goldstandard der Resistenztestung für anaerobe Bakterien gilt die Agardilutionsmethode in Form des Reihenverdünnungstestes für feste Nährmedien. Für fakultativ anaerobe und aerobe Bakterien hat sich die Methode der Mikrobouillondilution als Goldstandard etabliert. Letztere Methode ist weniger aufwändig als die Agardilutionsmethode, welche Erfahrung und Geduld voraussetzt ³¹. Aufgrund der einfacheren Handhabung hat sich im Laufe der Jahre die Methode der Gradientendiffusion für verschiedene Bakterienarten durchgesetzt ³². Dieses Verfahren beruht auf der Methode der Agardiffusion, jedoch wird ebenfalls die MHK bestimmt. Dabei werden Etest- (Epsilometertest) oder M.I.C.E.-Streifen auf festen Nährmedien platziert. Bereits nach 24 Stunden können die MHK-Werte abgelesen werden. Dieses Verfahren bietet viele Vorteile, denn es ist kostengünstig, einfach handhabbar und mehrere Antibiotika können im selben Zeitraum getestet werden ³¹.

1.2 Resistenzlage und Resistenzmechanismen bei *Bacteroides* und *Parabacteroides* Spezies

Unter den Anaerobiern weisen die Vertreter der Gattung *Bacteroides* die meisten Resistenzmechanismen und auch die höchsten Resistenzraten auf. Sowohl in der physiologischen Darmflora als auch bei anaeroben Infektionen sind sie die dominierende Bakteriengattung. In diesem Zusammenhang ist die Gattung *Bacteroides* unter den Anaerobiern die am meisten Erforschte auf dem Gebiet der Resistenzmechanismen.

Erste resistente Stämme gegenüber Penicillinen und Tetracyclin wurden in den späten 1960er- bzw. frühen 1970er Jahren entdeckt. Dies war besorgniserregend, da Tetracyclin als erstes Breitbandantibiotikum bei von *Bacteroides* spp. verursachten Infektionen eingesetzt wurde³³. Die Zunahme von antibakterieller Resistenz ist bedingt durch die Tatsache, dass Resistenzgene, welche die Information für den jeweiligen Resistenzmechanismus tragen, nicht nur in der bakteriellen chromosomalen DNA vorliegen, sondern sich auch auf mobilen DNA-Elementen wie Plasmiden oder Transposons befinden können. Bakterien können damit über den Mechanismus der Konjugation, Transduktion und Transformation Erb- und somit auch Resistenzinformationen austauschen, auch zwischen Vertretern verschiedener Gattungen³⁴. Es ist bewiesen, dass *Bacteroides* spp. im menschlichen Darm mit zahlreichen anderen Bakteriengenera Resistenzgene austauschen, man spricht von einem horizontalen Gentransfer³⁵.

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz wurden in den vergangenen Jahrzehnten weltweit zahlreiche Studien über die Entwicklung der Resistenzlage bezüglich *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. veröffentlicht. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Bereich der β -Laktam-Antibiotika die Resistenz gegen Penicilline und Cephalosporine stark anstieg^{36 - 38}. Dafür sind hauptsächlich das *cepA*- und das *cfxA*-Gen verantwortlich, welche β -Laktamasen der Ambler-Klasse A produzieren. Bezüglich des *cfxA*-Gens konnte ein Zusammenhang mit der Resistenz gegen das Cephalosporin Cefoxitin festgestellt werden^{39,40}. Die Carbapeneme gelten als gut wirksame Antiinfektiva bei von *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. verursachten Infektionen, jedoch konnten resistente Stämme entdeckt werden^{37, 41}. Die Präsenz des *cfiA*-Gens, welches für eine Metallo- β -Laktamase der Ambler-Klasse B kodiert, führt zur Entstehung von Resistenzen gegen Carbapeneme⁴².

Die Gruppe der sogenannten MLSKO-Antibiotika beinhaltet Makrolide, Lincosamide, Streptogramine, Ketolide und die Oxazolidinone²⁵. Ein bekannter Vertreter im klinischen Alltag ist das Lincosamid Clindamycin. In den letzten Dekaden wurde eine besorgniserregende Zunahme der Resistenzen bei *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. gegen Clindamycin festgestellt^{37, 43}. Gegenüber den Antibiotika aus der MLSKO-Gruppe ist eine Vielzahl von Resistenzmechanismen seitens der Bakterien bekannt²⁵. Bei der Gattung *Bacteroides* spielen

die *erm*-Gene (engl. erythromycin resistance methylase) eine Rolle, vor allem das *ermF*-, *ermG*- und *ermB*-Gen. Diese Gene produzieren Methylasen, welche Methylgruppen an die bakterielle RNA anknüpfen und somit die Wirkung der Antibiotika unterbinden ⁴⁴.

Moxifloxacin gilt als effektiver Vertreter aus der Gruppe der Fluorchinolone bei anaeroben Infektionen, aber außerhalb der *B. fragilis*-Gruppe konnte bei den anderen *Bacteroides* spp. eine hohe Resistenzrate festgestellt werden ⁴³. Gut untersucht sind Gene, die für Effluxpumpen kodieren, z.B. das *bexA*-Gen aus der MATE-Familie, welches erstmals in *B. thetaiotaomicron* entdeckt wurde ²³. Ein größerer Einfluss hinsichtlich Fluorchinolone-Resistenz wird dem Mechanismus der Mutationen im bakteriellen *gyrA*-Gen zugeschrieben ⁴⁵.

Für Tetracyclin konnte, wie bereits oben genannt, schon in den 1970er Jahren eine starke Zunahme der Resistenz seitens der *Bacteroides* spp. beobachtet werden ³³. Aus diesem Grund wurden Derivate entwickelt, zum einen die Glycylcycline mit dem Vertreter Tigecyclin, zum anderen die Fluorocycline mit dem Vertreter Eravacyclin. Es konnten gute Ergebnisse erzielt werden, einige resistente Stämme wurden jedoch beobachtet ^{37, 43, 46}. Bei *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. wird das *tetQ*-Gen hauptsächlich für Resistenzen gegen Tetracycline verantwortlich gemacht, es kodiert für ein ribosomales Schutzprotein ⁴⁷.

Metronidazol, ein Vertreter der Gruppe der Nitroimidazole, gilt bis heute als Meilenstein bei der Therapie anaerober Infektionen. Trotz des Auftretens einzelner resistenter Stämme wird dem Antibiotikum eine gute Wirkung zugeschrieben ^{37, 43, 48}. Das *nim*-Gen in *Bacteroides* spp. kodiert für ein Nitroreduktase-Enzym, welches für Resistenzen gegenüber Metronidazol verantwortlich gemacht wird. Heutzutage sind 11 Isoformen bekannt (*nimA-K*), wobei die Isoform *nimA* die höchste Prävalenz in *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. aufweist ^{48, 49}.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass für jede Gruppe von Antibiotika verschiedene Resistenzmechanismen in *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. bekannt sind ¹. Weltweit konnte das Auftreten multiresistenter *Bacteroides*-Stämme beobachtet werden ⁵⁰. Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist die Studienanzahl über Resistenzmechanismen von *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. in Deutschland gering. Vor dem Hintergrund der Dynamik auf diesem Gebiet, sowohl in Zunahme resistenter Bakterienstämme als auch in der Einführung neuer Antibiotika auf dem Markt, könnte diese Arbeit ein aktuelles Bild über das Vorkommen von Resistenzgenen und deren Häufigkeit sowie die Wirkung von etablierten und neu eingeführten Antibiotika geben. Das Ziel dieser Studie war es, in Deutschland isolierte, phänotypisch resistente Stämme der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides* hinsichtlich des Auftretens der Resistenzgene zu untersuchen.

2 Publikation

Diversity of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains isolated in Germany

Sebastian Martin Michael Rong, Arne Christian Rodloff, Catalina Suzana Stingu

Rong SMM, Rodloff AC, Stingu CS. Diversity of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains isolated in Germany. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021 Mar;24:328-334. doi: 10.1016/j.jgar.2021.01.007. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33508481.



Diversity of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains isolated in Germany



Sebastian Martin Michael Rong*, Arne Christian Rodloff, Catalina-Suzana Stingu

Institute for Medical Microbiology and Epidemiology of Infectious Diseases, University Hospital of Leipzig, Liebigstraße 21, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2020
Received in revised form 28 December 2020
Accepted 15 January 2021
Available online 27 January 2021

Keywords:

Bacteroides
Multidrug resistance
Antibiotic resistance genes
Etest

ABSTRACT

Objectives: *Bacteroides* spp. are normal constituents of the human intestinal microflora, but they are also able to cause severe diseases. The aim of this study was to determine the diversity of antibiotic resistance genes found in phenotypically resistant *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains.

Methods: A total of 71 phenotypically resistant *Bacteroides* spp. from human clinical specimens were screened for the antibiotic resistance genes *cfiA*, *tetQ*, *tetM*, *tet36*, *cepA*, *cfxA*, *nim*, *ermG*, *ermF*, *bexA*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* and *bla_{GES}*. The presence of these genes was compared with phenotypic resistance to ampicillin/sulbactam, cefoxitin, ceftolozane/tazobactam, piperacillin/tazobactam, imipenem, meropenem, meropenem/vaborbactam, clindamycin, moxifloxacin, tigecycline, eravacycline and metronidazole.

Results: *tetQ* was the most frequently detected gene, followed by *cfiA*, *ermF*, *cfxA*, *ermG*, *cepA*, *nim* and *bexA*. None of the strains were positive for *tetM*, *tet36*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* or *bla_{GES}*. Resistance to the tested β -lactams was mainly linked to the presence of the *cfiA* gene. Clindamycin resistance correlated with the presence of the genes *ermG* and *ermF*. The *bexA* gene was found in six strains, but only two of them were resistant to moxifloxacin. Tigecycline and eravacycline showed good activities despite the frequent occurrence of *tetQ*. The *nim* gene was detected in six isolates, five of which were resistant to metronidazole.

Conclusion: The findings of our study support the general belief that antimicrobial resistance within *Bacteroides* should be taken into consideration. This underlines the necessity of reliable routine antimicrobial susceptibility test methods for anaerobic bacteria and the implementation of antimicrobial surveillance programmes worldwide.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Antimicrobial Chemotherapy. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Bacteroides spp., belonging to the family Bacteroidaceae, are the most frequently isolated bacteria in the human gastrointestinal tract. *Bacteroides fragilis* is known as the most virulent species within this group, being responsible for intra-abdominal, gynaecological and skin and soft-tissue infections and bacteraemia. Enterotoxigenic *B. fragilis* strains can cause diarrhoeal diseases [1].

In recent years, many studies have reported increased resistance to several antibiotics. Within the β -lactam group of antibiotics, *Bacteroides* spp. show increasing resistance rates to penicillins and cephalosporins. Among the non-*B. fragilis* group, even high resistance rates to clindamycin and moxifloxacin have

been observed [2–4]. Regarding the penicillin/inhibitor combinations ampicillin/sulbactam and piperacillin/sulbactam, there has been a moderate increase in resistance over the decades [5,6]. A continuous increase in cefoxitin resistance has been observed during the last years, with *Parabacteroides distasonis* in particular showing high resistance rates [3]. Resistance to penicillins and cephalosporins is associated with the presence of the Ambler class A β -lactamase genes *cepA* and *cfxA*, while the presence of the *cfxA* gene is associated with resistance to cefoxitin [7,8].

The carbapenems are the most potent agents within the group of β -lactam antibiotics [9]. Multicentre studies have shown low resistance rates for *Bacteroides* spp., but strains with reduced susceptibility and even resistant strains have been observed [3,4,6]. The *cfiA* gene in *B. fragilis* encodes a powerful Ambler class B metallo- β -lactamase that can hydrolyse nearly all β -lactam antibiotics, except monobactams [9,10].

A steady increase in resistance to clindamycin was observed during the last years, with high resistance rates observed worldwide

* Corresponding author.

E-mail address: SebastianMartinMichael.Rong@medizin.uni-leipzig.de (S.M.M. Rong).

[3,6]. Many different resistance mechanisms against clindamycin and the group of MLSKO (macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide and oxazolidinone) antibiotics have been found, with an important role played by genes encoding rRNA methylases [11]. Within the *Bacteroides* spp., the *ermF*, *ermG* and *ermB* genes were identified as being responsible for clindamycin resistance [12].

Moxifloxacin, as the most active fluoroquinolone against anaerobic bacteria, has already shown high resistance rates (up to 40.3% in non-*B. fragilis* group) [6]. Resistance can be associated with the presence of genes coding for efflux pumps, although it is assumed that point mutations in the *gyrA* gene play the most important role in fluoroquinolone resistance [13–15].

Recently, due to its intensive use, increasing resistance to tetracycline has been observed [16]. The relatively new tetracycline derivative tigecycline has shown good activity against anaerobes, with only low resistance rates [3,6]. The novel fluoroquinolone eravacycline recently emerged as the most potent tetracycline showing an overall minimum inhibitory concentration (MIC) of ≤ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against anaerobic clinical isolates [6]. Nevertheless, three *Bacteroides ovatus* strains with elevated MICs were recently detected [17]. Within the *Bacteroides* spp., tetracycline resistance is mainly linked to the presence of the *tetQ* gene [18].

Metronidazole is considered to be a cornerstone in the treatment of anaerobic infections and resistance rates are low [3,6,19]. The *nim* gene encoding a nitroreductase has been observed as one possible resistance mechanism against nitroimidazoles [20]. Nowadays, 11 isoforms of the *nim* gene are known (*nimA–K*), with *nimA* being the most prevalent gene in *Bacteroides* spp. [19,21].

Multiresistant *Bacteroides* strains have already been reported worldwide [22]. The recent report of reduced susceptibility to carbapenems and metronidazole is of interest, especially when no anaerobic susceptibility testing is routinely available. Several multidrug-resistant *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains have also been isolated in Germany. Although many studies regarding resistance mechanisms in *Bacteroides* spp. have been published worldwide, little information is given about the occurrence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides* spp. in our country. The aim of this study was to determine the diversity of antibiotic resistance genes found in phenotypically resistant *Bacteroides* and *Parabacteroides* human clinical strains from Germany.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

A total of 71 phenotypically resistant *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains (Table 1) isolated from human clinical specimens in 1996–2018 were used in this study. The isolates were stored in skim milk at -80 °C and were cultivated on Columbia agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK) with 5% sheep blood, 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ hemin and 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ vitamin K1 in an anaerobic chamber (Whitley MG 1000

anaerobic workstation; Meintrup Laborgeräte GmbH, Löhden-Holte, Germany) at 37 °C. All of the strains were previously identified using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) (VITEK MS; bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Germany).

2.2. Antimicrobial susceptibility testing

For each strain, the MIC for 12 antibiotics, namely ampicillin/sulbactam, cefoxitin, ceftolozane/tazobactam, piperacillin/tazobactam, imipenem, meropenem, meropenem/vaborbactam, clindamycin, moxifloxacin, tigecycline, eravacycline and metronidazole, was determined by Etest (BestBion, Cologne, Germany). *Bacteroides fragilis* strain ATCC 25285 was used as a control strain. Briefly, Columbia agar was confluent inoculated with a 1 McFarland standard bacterial suspension. After applying the Etest strips, the plates were incubated in the anaerobic workstation at 37 °C. MICs were determined after 48 h and were interpreted in accordance with European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [23,24].

2.3. Antibiotic resistance genes

All isolates were tested for 15 antibiotic resistance genes, namely *cfiA*, *tetQ*, *tetM*, *tet36*, *cepA*, *cfxA*, *nim*, *ermG*, *ermF*, *bexA*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* and *bla_{GES}*. DNA was extracted using a MagNA Pure 96 Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. For the genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}* and *bla_{GES}*, we used a LightCycler[®] 480 II Real-Time PCR System (Roche). We used LightMix[®] Modular VIM Carbapenemase, LightMix[®] Modular NDM Carbapenemase, LightMix[®] Modular OXA-48 Carbapenemase, LightMix[®] KPC Carbapenemase and LightMix[®] Modular GES Carbapenemase (Roche), with every mix including a reagent mix and a positive control. PCR was run with the following conditions: 95 °C for 5 min; 45 cycles of 95 °C for 5 s, 60 °C for 15 s and 72 °C for 15 s; and cooling at 40 °C for 30 s. Detection of the resistance genes was done by expression of fluorescent dye through respective TaqMan probes (component of every LightMix, known wavelength for respective gene). For the genes *cfiA*, *tetQ*, *tetM*, *tet36*, *cepA*, *cfxA*, *nim*, *ermG*, *ermF* and *bexA*, we performed the PCR as described in Kato et al. and Yamazoe et al. [25,26]. A total volume of 50 μL of reaction mixture contained 32.5 μL of DNase/RNase-free water, 10 μM Tris HCl, 50 μM KCl, 2.5 μM MgCl₂, 0.25 μM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.5 μM of each primer (TIB Molbiol, Berlin, Germany), 1.25 U of Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1 μL of bacterial DNA. An overview of the PCR conditions and primers used is shown in Table 2. PCR was performed using a TGradient96 and Tpersonal thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). PCR products were analysed in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualised under ultraviolet light. A positive and negative control was used in each run. For negative controls we used 1 μL of DNase/RNase-free water in each reaction mixture. As positive controls we used the strains *Clostridioides difficile* 630 (*tetM*), *Escherichia coli* DH5 α pGW140.1 (*tet36*) and *Bacteroides uniformis* 14291 (*bexA*); for the other genes we used strains from our own collection [18]. To verify the results, these probes were sequenced. Amplified products were purified using an MSB[®] Spin PCRapace system (Stratag Molecular, Berlin, Germany) and DyeEx Spin Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). A total volume of 10 μL of reaction mixture contained 3 μL of DNase/RNase-free water, 4 μL of BigDye[®] v.3.1 (Thermo Fisher Scientific), 1 μM of forward/reverse primer and 2 μL of cleaned PCR product. PCR was run using a thermocycler (95 °C for 2 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s, annealing

Table 1
Selected *Bacteroides* and *Parabacteroides* spp. strains.

Species	n
<i>B. fragilis</i>	40
<i>B. thetaiotaomicron</i>	11
<i>B. ovatus</i>	7
<i>B. vulgatus</i>	7
<i>P. distasonis</i>	4
<i>B. caccae</i>	1
<i>B. ovatus/xylanisolvens</i>	1

Table 2
Target genes and PCR parameters for the PCR methods of Kato et al. and Yamazoe et al. [25,26].

Gene	Primers (5' → 3')	Conditions	Product size (bp)	Reference
<i>cfiA</i>	CCCAACTCTCGGACAAAGTG AGTGAATCGGTGAATCCATG	94 °C for 45 s, 54 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	340	[25]
<i>tetQ</i>	TTGGCAAGACATACGAATCC CACCGGCTGATTATTGG	94 °C for 45 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	869	[36]
<i>tetM</i>	ATCCTTTCTGGGCTTCCATT TCCGTCACATTCCAACCATA	94 °C for 45 s, 59 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	171	[18]
<i>tet36</i>	TTTCTGGCAGAGGTAGAACG TTAATTCCTTGCCITCAACG	94 °C for 45 s, 57 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	249	[18]
<i>cepA</i>	TTTCTGCTATGTCTGCT ATCTTTCACGAAGACGGC	94 °C for 45 s, 58 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	779	[18]
<i>cfxA</i>	TGACTGGCCCTGAATAATCT ACAAAAGATAGCGCAAATCC	94 °C for 45 s, 57 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	300	[18]
<i>nim</i>	ATGTTTCAGAGAATGCGGCGTAAGCG GCTTCCTTGCCCTGTCATGTGCTC	94 °C for 45 s, 60 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	458	[36]
<i>ermG</i>	ATAGGTGCAGGAAAGGTCA TGGATTGTGGCTAGGAAATGT	94 °C for 45 s, 59 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	176	[18]
<i>ermF</i>	CGGGTCAGCACTTTACTAATTG GGACCTACTCATAGACAAG	94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	446	[27]
<i>bexA</i>	TAGTGGTGTGCTGCGATTCTG TCAGCGTCTTGCTGTGCTC	94 °C for 45 s, 60 °C for 45 s, 72 °C for 45 s, 35×	194	[18]

at temperature given for respective primer for 15 s and 60 °C for 4 min). The amplified products were sequenced with an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the results were compared with known acid amino sequences using NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). A *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The pattern of phenotypic resistance and the presence of antibiotic resistance genes is summarised in Table 3. The β -lactamase genes *cepA* and *cfxA* were detected in 7 and 15 strains, respectively. While all *cepA*-positive isolates were *B. fragilis* strains, the *cfxA* gene was also observed in other *Bacteroides* spp. Two *B. fragilis* isolates harboured both genes. A total of 40 strains were resistant to cefoxitin, of which 2 and 9 harboured the *cepA* and *cfxA* gene, respectively.

No breakpoint for ceftolozane/tazobactam is provided by EUCAST/CLSI. A total of 66 isolates had an MIC > 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, consequently ceftolozane/tazobactam showed reduced activity against most of the *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains (MIC₅₀ $\geq 256 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Table 4). Moreover, 40 strains were resistant to ampicillin/sulbactam and 32 strains were resistant to piperacillin/tazobactam, most of which ($n = 27$) were from the *B. fragilis* group. The metallo- β -lactamase gene *cfiA* was detected in 40 strains, most frequently *B. fragilis* spp. ($n = 34$).

Resistance against the tested carbapenems (imipenem and meropenem) was mainly found in the *B. fragilis* group, with only one *Bacteroides thetaiotaomicron* strain being resistant to imipenem. In total, 30 strains were resistant to imipenem, 29 of which strains carried the *cfiA* gene, while 11 *cfiA*-positive isolates were susceptible to this antimicrobial agent. Moreover, 27 isolates were resistant to meropenem, all of which were *cfiA*-positive and belonged to the *B. fragilis* spp. Susceptible but *cfiA*-positive strains were also observed in non-*B. fragilis* strains. One *B. fragilis* isolate harboured *cepA*, *cfxA* and *cfiA* genes. No breakpoint for meropenem/vaborbactam is provided by EUCAST/CLSI, but this agent was highly active against our tested strains (MIC₅₀ = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). All isolates were negative for the carbapenemase genes *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC} and *bla*_{GES}.

A total of 48 isolates were resistant to clindamycin. The rRNA methylase-encoding genes *ermG* and *ermF* were found in 10 and 24 strains, respectively. Except for three *ermF*-positive strains, all *ermG/ermF*-positive isolates showed an MIC $\geq 256 \mu\text{g}/\text{mL}$. Interestingly, these two genes never occurred together.

Six strains (five *B. thetaiotaomicron* and one *B. fragilis*) harboured the efflux pump gene *bexA*. Moreover, 27 strains were resistant to moxifloxacin. While two *bexA*-positive strains were resistant, the other four strains that carried the gene were susceptible to moxifloxacin.

No breakpoints for the tetracycline derivatives tigecycline and eravacycline are provided by EUCAST/CLSI. Both antimicrobials were highly active against the tested strains (MIC₅₀ = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.064 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). While 11 isolates had an MIC > 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to tigecycline, none of the strains had an MIC > 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to eravacycline. Furthermore, 62 isolates tested positive for *tetQ*, which confers ribosomal protection. This gene was the most prevalent in all *Bacteroides* and *Parabacteroides* species. None of the isolates were positive for *tetM* and *tet36*.

Nine strains in this study were resistant to metronidazole, five of which carried the nitroreductase-encoding gene *nimA*. One *nimA*-positive strain was susceptible to metronidazole. No other *nim* genes were investigated in our study.

4. Discussion

In this study, we analysed 71 phenotypically multidrug-resistant *Bacteroides* spp. strains isolated in Germany regarding their diversity of 15 antibiotic resistance genes. Many studies regarding resistance mechanisms in *Bacteroides* spp. have been performed worldwide, but data on the spread of resistance genes in Germany are limited. We tested four penicillins/cephalosporins by Etest; all antimicrobials showed reduced activity against the strains in our study (Table 4). The *cepA* gene, in other studies usually detected in *B. fragilis* [18,21,27], was found in our study in only seven isolates, of which two were resistant to ampicillin/sulbactam, two to cefoxitin and another two to piperacillin/tazobactam. Similar to the findings of Eitel et al. [18], the presence of *cepA* did not correlate with resistance to the tested penicillins and cephalosporins (all $P > 0.05$) (Table 5). The *cfxA* gene is often detected in non-*B. fragilis* strains [18,27], which correlates with our findings where only 4 *B. fragilis* isolates were *cfxA*-positive while 11

Table 3
Pattern of multiresistance and occurrence of antibiotic resistance genes (ARGs) within the different *Bacteroides* and *Parabacteroides* spp.

Species	n	Pattern of multiresistance ^a	ARGs ^b							
			cepA	cfxA	cfiA	tetQ	ermG	ermF	nim	bexA
<i>B. fragilis</i>	3	SAM/FOX/TZP/IPM/MEM/CLI/MOX/MTR	0	0	3	3	0	0	1	0
	1	SAM/FOX/TZP/IPM/MEM/MOX/MTR	0	0	1	1	0	0	1	0
	2	SAM/TZP/IPM/MEM/CLI/MOX	0	1	2	1	0	1	0	0
	8	SAM/FOX/TZP/IPM/MEM/CLI	0	1	8	8	0	6	0	0
	4	SAM/FOX/TZP/IPM/MEM/MOX	1	1	4	3	0	0	0	1
	2	SAM/TZP/IPM/MEM/CLI	0	0	2	2	0	2	0	0
	4	SAM/FOX/TZP/IPM/MEM	0	0	4	2	0	0	0	0
	1	SAM/FOX/IPM/MEM/CLI	0	0	1	1	0	1	0	0
	2	SAM/FOX/TZP/IPM/CLI	0	0	1	2	0	2	0	0
	1	SAM/IPM/MEM/CLI	0	0	1	1	0	0	0	0
	1	SAM/FOX/IPM/MEM	0	0	1	1	0	0	0	0
	1	SAM/TZP/CLI/MTR	1	0	1	1	1	0	0	0
	1	FOX/CLI/MOX/MTR	1	1	0	1	0	1	1	0
	1	FOX/CLI/MTR	0	0	1	1	1	0	0	0
	1	SAM/CLI	0	0	1	1	0	1	0	0
	1	CLI/MTR	1	0	0	1	1	0	0	0
	1	CLI	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	MOX	1	0	1	1	0	0	0	0
	4	None	2	0	2	4	0	0	0	0
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	1	SAM/TZP/IPM/CLI/MOX	0	0	1	1	1	0	1
1		FOX/TZP/CLI/MOX	0	1	0	1	1	0	0	0
1		FOX/TZP/CLI	0	0	0	1	0	1	0	1
1		FOX/CLI/MOX	0	0	0	1	0	0	0	0
1		CLI/MOX	0	0	0	1	1	0	0	0
3		FOX/CLI	0	0	0	2	1	0	0	1
2		CLI	0	0	0	2	0	0	0	2
<i>B. vulgatus</i>	1	MOX	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	SAM/CLI	0	0	0	1	0	1	0	0
	1	CLI/MOX	0	0	0	1	1	0	0	0
	1	FOX/MOX	0	1	1	1	0	0	0	0
	2	SAM	0	1	0	1	0	1	0	0
	1	FOX	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>B. ovatus</i>	1	None	0	1	0	1	0	0	0	0
	1	SAM/TZP/MOX/MTR	0	1	1	1	0	0	1	0
	1	SAM/FOX/CLI/MOX	0	0	0	1	0	1	0	0
	0	FOX/CLI/MOX/MTR	0	1	1	1	0	1	1	0
	1	SAM/TZP/CLI	0	1	0	1	0	1	0	0
	1	FOX/CLI	0	1	0	1	0	1	0	0
	1	CLI	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>P. distasonis</i>	1	None	0	0	1	1	0	1	0	0
	1	SAM/CLI/MOX	0	0	0	1	0	1	0	0
	1	SAM/FOX/CLI	0	0	0	1	0	1	0	0
	1	CLI/MOX	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>B. caccae</i>	1	FOX/CLI	0	1	1	1	1	0	0	0
	1	CLI/MOX	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>B. ovatus/xylanisolvans</i>	1	FOX/CLI/MOX	0	0	0	0	1	0	0	0

SAM, ampicillin/sulbactam; FOX, ceftoxitin; TZP, piperacillin/tazobactam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CLI, clindamycin; MOX, moxifloxacin; MTR, metronidazole.
^a No European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)/Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints for ceftolozane/tazobactam, meropenem/vaborbactam, tigecycline or eravacycline, therefore not considered in the statistical evaluation.

^b Multiplex PCR genes *tetM* and *tet36* all negative, therefore not listed in the table.

non-*B. fragilis* isolates carried this gene. Again, no correlation could be shown between the presence of *cfxA* and resistance to ceftoxitin or other tested cephalosporin/penicillins (all $P > 0.05$). Other mechanisms, e.g. penicillin-binding proteins and efflux pumps, could lead to penicillin/cephalosporin resistance, therefore the presence of these two resistance genes may only play a minor role [28]. Furthermore, the possibility of genetic regulation by insertion sequence (IS) elements should be considered [18]. In contrast to the penicillins/cephalosporins, all of the tested carbapenems in our study were highly active against the examined strains (Table 4). The *cfiA* gene was the most frequently detected gene within the group of β -lactamase-encoding genes, which is in contrast to the findings of other studies where the *cepA* gene had a higher prevalence [18,21,27]. This could be due to our choice of strains, only selecting strains already known to be resistant to different antibiotics, but this finding may also indicate that the selective pressure of excessive carbapenem use increases the prevalence of the *cfiA* gene. Of the 34 *cfiA*-positive *B. fragilis* strains, 28 were

resistant to imipenem and 27 were resistant to meropenem, which shows a good correlation between phenotypic resistance and the presence of *cfiA*. Of the 40 *cfiA*-positive isolates, 6 were non-*B. fragilis* strains (3 *B. ovatus*, 1 *Bacteroides vulgatus*, 1 *B. thetaiotaomicron* and 1 *P. distasonis*). Some studies found the *cfiA* gene only in *B. fragilis* strains [18,21], while others reported the presence of the *cfiA* gene also in non-*B. fragilis* spp. [29,30]. Our six *cfiA*-positive non-*B. fragilis* strains were all susceptible to the tested carbapenems, except for one *B. thetaiotaomicron* strain that was resistant to imipenem. It is assumed that presence of the *cfiA* gene and production of its powerful metallo- β -lactamase in *B. fragilis* plays a major role in resistance to carbapenems. A further concern is the possible conversion of meropenem-susceptible strains to resistant during therapy. The presence of one resistant *cfiA*-negative strain confirms the role of other resistance mechanisms such as porin mutations and genetic regulation by IS elements, respectively [18,30]. Clindamycin showed reduced activity against our tested strains ($MIC_{50} = 16 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90} \geq 256 \mu\text{g/mL}$). We detected 24

Table 4
In vitro activity of the tested antimicrobials.

Antimicrobial agent	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	Resistant breakpoint ($\mu\text{g/mL}$)	No. of resistant isolates	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
SAM ^a	0.25 to ≥ 256	>8	40	32	≥ 256
FOX ^b	4 to ≥ 256	≥ 64	40	64	≥ 256
CT ^c	2 to ≥ 256	–	–	≥ 256	≥ 256
TZP ^a	0.25 to ≥ 256	>16	32	16	≥ 256
IPM ^a	0.125 to ≥ 32	>4	30	2	≥ 32
MEM ^a	0.064 to ≥ 32	>8	27	2	≥ 32
MV ^c	0.064 to ≥ 256	–	–	1	≥ 256
CLI ^a	0.032 to ≥ 256	>4	48	16	≥ 256
MOX ^b	0.25 to ≥ 32	≥ 8	27	2	≥ 32
TGC ^c	0.125–8	–	–	1	4
ERV ^c	0.008–0.25	–	–	0.064	0.25
MTR ^a	0.25 to ≥ 256	>4	9	1	8

MIC, minimum inhibitory concentration; SAM, ampicillin/sulbactam; FOX, cefoxitin; CT, ceftolozane/tazobactam; TZP, piperacillin/tazobactam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; MV, meropenem/vaborbactam; CLI, clindamycin; MOX, moxifloxacin; TGC, tigecycline; ERV, eravacycline; MTR, metronidazole.

^a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints [23].

^b Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) breakpoints [24].

^c No EUCAST/CLSI breakpoints provided.

Table 5
Association between phenotypic resistance and prevalence of antibiotic resistance genes (ARGs).

Antimicrobial agent ^a	ARG ^b	No. (%) of resistant strains with gene	No. (%) of susceptible strains with gene	Association between resistance and presence of gene (<i>P</i> -value) ^c
SAM	<i>cepA</i>	2 (2.8)	5 (7.0)	0.124
	<i>cfxA</i>	6 (8.5)	9 (12.7)	0.127
	<i>cfiA</i>	32 (45.1)	8 (11.3)	0.000005
FOX	<i>cepA</i>	2 (2.8)	5 (7.0)	0.124
	<i>cfxA</i>	9 (12.7)	6 (8.5)	0.491
	<i>cfiA</i>	27 (38.0)	13 (18.3)	0.028
TZP	<i>cepA</i>	2 (2.8)	5 (7.0)	0.305
	<i>cfxA</i>	6 (8.5)	9 (12.7)	0.442
	<i>cfiA</i>	28 (39.4)	12 (16.9)	0.000001
IPM	<i>cfiA</i>	29 (40.8)	11 (15.5)	<0.000001
MEM	<i>cfiA</i>	27 (38.0)	13 (18.3)	<0.000001
CLI	<i>ermG</i>	10 (14.1)	0	0.014
	<i>ermF</i>	22 (31.0)	2 (2.8)	0.001
MOX	<i>bexA</i>	2 (2.8)	4 (5.6)	0.587
MTR	<i>nim</i>	5 (7.0)	1 (1.4)	0.000055

SAM, ampicillin/sulbactam; FOX, cefoxitin; TZP, piperacillin/tazobactam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CLI, clindamycin; MOX, moxifloxacin; MTR, metronidazole.

^a No European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)/Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints for ceftolozane/tazobactam, meropenem/vaborbactam, tigecycline or eravacycline, therefore not considered in the statistical evaluation.

^b Multiplex PCR genes all negative, therefore not considered in the statistical evaluation.

^c *P*-value calculated by Fisher's exact test in IBM SPSS Statistics v.21.0; *P* \leq 0.05 was considered statistically significant.

ermF and 10 *ermG* genes in all *Bacteroides* spp. Almost all of the *ermF/ermG*-positive strains had the highest MIC (>256 $\mu\text{g/mL}$) to clindamycin (17 *B. fragilis*, 4 *B. thetaiotaomicron*, 4 *B. ovatus*, 3 *P. distasonis*, 2 *B. vulgatus*, 1 *B. ovatus/xylanisolvans*). According to Eitel et al., *ermF* is the most frequent methylase-encoding gene in *Bacteroides* spp., followed by *ermG* [18]. That is why we decided not to search for *ermB*, as other studies confirmed the low prevalence of this gene [18,27]. None of the strains in our work harboured both genes together, in contrast to a previous study where one multiresistant *B. ovatus* isolate harboured *ermF* and *ermG* [22]. The fact that many other strains were resistant to clindamycin but negative for the tested genes confirms the role of other resistance mechanisms (*n* = 16; 8 *B. fragilis*, 5 *B. thetaiotaomicron*, 1 *B. ovatus*, 1 *Bacteroides caccae* and 1 *P. distasonis*) [11]. Moxifloxacin showed good activity in our study (MIC₅₀ = 2 $\mu\text{g/mL}$). We searched for the *bexA* gene, which encodes a MATE family efflux transporter, first observed in *B. thetaiotaomicron* [13]. Six *bexA*-positive isolates were detected, only two of which were resistant to moxifloxacin. Our results confirm that the presence of this gene does not always correlate with resistance to moxifloxacin (*P* > 0.05). Besides the presence of *bexA*, another efflux system was found in *Bacteroides* spp., namely the tripartite BmeABC system belonging to the RND family [14]. A greater role in quinolone resistance has been

attributed to point mutations in the *gyrA* gene, replacing the amino acid serine at hotspots 82 and 86 mainly with phenylalanine or leucine, which can explain the phenotypic resistance in our negative strains [15]. Regarding tetracycline resistance genes, we searched for the genes *tetQ*, *tetM* and *tet36*. A total of 62 strains were positive for *tetQ*, while no *tetM* and *tet36* genes were detected. Tigecycline and eravacycline showed good activities against the strains in our study (MIC₅₀ = 1 $\mu\text{g/mL}$ and 0.064 $\mu\text{g/mL}$, respectively). These results confirm the findings of Eitel et al. [18]. Because of the low MICs of tigecycline and eravacycline in the presence of *tetQ*, it is assumed that these two antimicrobials evade the ribosomal protection mechanism in *Bacteroides* spp. Intensive use of tetracycline fuelled the spread of *tetQ*, which is located on conjugative transposons [31,32]. The *tetM* gene has the widest host range among Gram-positive and Gram-negative genera [33]. *tetM*, which is distantly related to *tetQ*, has not been found among *Bacteroides* spp. even though it is located on conjugative transposons. It is assumed that barriers prevent the transfer of certain mobile elements or that lack of selective pressure are reasons for its absence within the *B. fragilis* group [34]. *tet36* has not yet been found in human clinical *Bacteroides* spp. isolates but was observed in swine manure pits [35]. Besides ribosomal protection, tetracycline resistance can also be caused by efflux pumps and

inactivating enzymes [33]. In a study by Sarkar et al., genes encoding efflux pumps against tetracyclines have been detected in enterotoxigenic *B. fragilis* strains; moreover, an association between reduced susceptibility to tigecycline and the presence of the genes *tetX* and *tetX1* encoding FAD- and NADPH-requiring oxidoreductases was shown [16,36]. In our study, we detected six *nimA*-positive strains, while nine strains were resistant to metronidazole (MIC₅₀ = 1 µg/mL). The association between the prevalence of the *nim* gene and phenotypic resistance correlated well ($P < 0.05$) (Table 5). One may assume that other isoforms of the *nim* genes are responsible for the phenotypic resistance of the *nimA*-negative strains. There are only a few studies that detected the presence of *nim* in the *Bacteroides* spp. group [18,27]. It is known that expression of the *nim* gene is regulated by IS elements and that silent *nim* genes can become activated when exposed to metronidazole for a long time [37]. This may be the case for our *B. thetaiotaomicron* strain that is *nim*-positive but remained susceptible in vitro. Nevertheless, resistance to nitroimidazoles can be caused by other mechanisms, e.g. overexpression of the RecA protein, efflux pumps or deficiency of the ferrous iron transporter [38]. The findings of our study support the general belief that antimicrobial resistance among *Bacteroides* spp. should be taken into consideration. This underlines the necessity of reliable routine antimicrobial susceptibility testing methods for anaerobic bacteria and the implementation of antimicrobial surveillance programmes all over the world.

Funding

The authors acknowledge support from Leipzig University for Open Access Publishing.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

Not required.

Acknowledgments

The authors wish to thank Annett Hennig-Rolle for technical support. The authors also thank Dr Jozsef Soki for sending control strains, and Birgit Oelzner for sequencing our own positive controls.

References

- Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:593–621, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00008-07>.
- Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Ruthazer R, Golan Y, Goldstein EJC, et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1649–55, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01435-06>.
- Nagy E, Urbán E, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:371–9, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03256.x>.
- Rodloff AC, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline and comparators against a European collection of anaerobes collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2010–2016. *Anaerobe* 2018;51:78–88, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.009>.
- Hastey CJ, Boyd H, Schuetz AN, Anderson K, Citron DM, Dzink-Fox J, et al. Changes in the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from 2007–2009 to 2010–2012 based on the CLSI methodology. *Anaerobe* 2016;42:27–30, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.07.003>.
- Snydman DR, McDermott LA, Jacobus NV, Kerstein K, Grossman TH, Sutcliffe JA. Evaluation of the in vitro activity of eravacycline against a broad spectrum of recent clinical anaerobic isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02206-17> e02206-17.
- Rogers MB, Parker AC, Smith CJ. Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2391–400, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/aac.37.11.2391>.
- Parker AC, Smith CJ. Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A β-lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1028–36, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/aac.37.5.1028>.
- Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin Infect Dis* 2004;39:92–7, doi:<http://dx.doi.org/10.1086/421558>.
- Thompson JS, Malamy MH. Sequencing the gene for an imipenem–cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* β-lactamase II. *J Bacteriol* 1990;172:2584–93, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/jb.172.5.2584-2593.1990>.
- Roberts MC. Update on macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2008;282:147–59, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x>.
- Löfmark S, Jernberg C, Jansson JK, Edlund C. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. And resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1160–7, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl420>.
- Miyamae S, Ueda O, Yoshimura F, Hwang J, Tanaka Y, Nikaido H. A MATE family multidrug efflux transporter pumps out fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3341–6, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.12.3341-3346.2001>.
- Ueda O, Wexler HM, Hirai K, Shibata Y, Yoshimura F, Fujimura S. Sixteen homologs of the Mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2807–15, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.7.2807-2815.2005>.
- Pumbwe L, Wareham DW, Aduse-Opoku J, Brazier JS, Wexler HM. Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:183–9, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01620.x>.
- Bartha NA, Sóki J, Urbán E, Nagy E. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:522–5, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.07.010>.
- Goldstein EJC, Citron DM, Tyrrell KL. In vitro activity of eravacycline and comparator antimicrobials against 143 recent strains of *Bacteroides* and *Parabacteroides* species. *Anaerobe* 2018;52:122–4, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.06.016>.
- Eitel Z, Sóki J, Urbán E, Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe* 2013;21:43–9, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.001>.
- Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1253–6, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.3.1253-1256.2005>.
- Haggoud A, Reyssat G, Azeddoug H, Sebald M. Nucleotide sequence analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and of a new insertion sequence upstream of the two genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1047–51, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/aac.38.5.1047>.
- Veloo ACM, Baas WH, Haan FJ, Coco J, Rossen JW. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* spp. And *Prevotella* spp. Dutch clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2019;25, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.017> 1156.e9–13.
- Sárvári KP, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Meleg SZ, et al. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;13:65–9, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.020>.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020. <http://www.eucast.org>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. Wayne, PA: CLSI; 2019 CLSI supplement M100.
- Yamazoe K, Kato N, Kato H, Tanaka K, Katagiri Y, Watanabe K. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2808–10.
- Kato N, Kato H, Watanabe K, Ueno K. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. *Clin Infect Dis* 1996;23(Suppl. (1)):S83–6, doi:http://dx.doi.org/10.1093/clinids/23.supplement_1.s83.
- Tran CM, Tanaka K, Watanabe K. PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. *J Infect Chemother* 2013;19:279–90, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-012-0532-2>.
- Sóki J, Gonzalez SM, Urbán E, Nagy E, Ayala JA. Molecular analysis of the effector mechanisms of cefoxitin resistance among *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2492–500, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr339>.
- Nakano V, do Nascimento e Silva A, Castillo Merino VR, Wexler HM, Avila-Campos MJ. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroides* strains. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66:543–7, doi:<http://dx.doi.org/10.1590/s1807-59322011000400004>.

- [30] Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS, Miranda KR, Guimarães PLS, Santos-Filho J, et al. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe* 2010;16:190–4, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.02.003>.
- [31] Nikolich MP, Shoemaker NB, Salyers AA. A *Bacteroides* tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1005–12, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/aac.36.5.1005>.
- [32] Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 2004;12:412–6, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.07.004>.
- [33] Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2005;245:195–203, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>.
- [34] Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:561–8, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.2.561-568.2001>.
- [35] Whittle G, Whitehead TR, Hamburger N, Shoemaker NB, Cotta MA, Salyers AA. Identification of a new ribosomal protection type of tetracycline resistance gene, *tet(36)*, from swine manure pits. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4151–8, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.7.4151-4158.2003>.
- [36] Sarkar A, Pazhani GP, Dharanidharan R, Ghosh A, Ramamurthy T. Detection of integron-associated gene cassettes and other antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe* 2015;33:18–24, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.01.008>.
- [37] Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. Carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:109–16, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh296>.
- [38] Ghotaslou R, Bannazadeh Baghi H, Alizadeh N, Yekani M, Arbab S, Memar MY. Mechanisms of *Bacteroides fragilis* resistance to metronidazole. *Infect Genet Evol* 2018;64:156–63, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.020>.

3 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. dent.

Die Vielfalt der antimikrobiellen Resistenzgene von in Deutschland isolierten Stämmen der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides*

eingereicht von Sebastian Martin Michael Rong

angefertigt an Universität Leipzig;
Universitätsklinikum Leipzig AöR

Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Virologie

betreut von PD Dr. habil. Catalina Suzana Stingu

Einreichung 05 / 2021

Das Ziel der Studie war es, in Deutschland isolierte, phänotypisch resistente Stämme der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides* hinsichtlich des Auftretens von Resistenzgenen zu untersuchen. Für die Studie wurden insgesamt 71 Stämme ausgewählt, welche bereits als resistent gegenüber einem oder mehreren Antibiotika bekannt waren. Alle Stämme wurden innerhalb der Jahre 1996 - 2018 in Deutschland isoliert. Am Institut für Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Leipzig wurden diese Stämme routinemäßig hinsichtlich ihrer Art mittels MALDI-TOF-MS (VITEK MS, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) ermittelt. Eine Übersicht ist in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 2: Isolierte Bakterienarten dieser Studie.

Bakterienart	Anzahl der Stämme
<i>B. fragilis</i>	40
<i>B. thetaiotaomicron</i>	11
<i>B. ovatus</i>	7
<i>B. vulgatus</i>	7
<i>P. distasonis</i>	4
<i>B. caccae</i>	1
<i>B. ovatus/xylanisolvens</i> ^a	1

^a MALDI-TOF kann technisch nicht genau festlegen, ob es sich allein um *B. xylanisolvens* handelt, deswegen gemeinsame Aufführung als *B. ovatus/xylanisolvens* ⁵¹.

Die Isolate wurden in einer anaeroben Arbeitsstation bei 37 °C auf Columbia-Agar-Platten kultiviert. Nach 48 Stunden erfolgte die Resistenzbestimmung mittels Etest. Insgesamt wurden in unserer Studie zwölf Antibiotika getestet, es handelte sich um Ampicillin-Sulbactam, Cefoxitin, Ceftolozan-Tazobactam, Piperacillin-Tazobactam, Imipenem, Meropenem, Meropenem-Vaborbactam, Clindamycin, Moxifloxacin, Tigecyclin, Eravacyclin und Metronidazol. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Werte in Form der minimalen Hemmkonzentration in der Einheit µg/ml abgelesen. Die Auswertung von Ampicillin-Sulbactam, Piperacillin-Tazobactam, Imipenem, Meropenem, Clindamycin und Metronidazol erfolgte mittels der Referenzwerte von EUCAST, im Falle der Antibiotika Cefoxitin und Moxifloxacin wurden Referenzwerte des CLSI verwendet ^{28, 30}. Für die Antibiotika Ceftolozan-Tazobactam, Meropenem-Vaborbactam, Tigecyclin und Eravacyclin liegen sowohl bei EUCAST als auch bei CLSI keine Grenzwerte vor. Um die Antibiotika trotzdem in ihrer Wirkung einschätzen zu können, wurde zusätzlich die MHK₅₀ bzw. MHK₉₀, also die minimale Hemmkonzentration, bei der 50 bzw. 90 % der Stämme in ihrem Wachstum gehemmt werden, verwendet. Die 71 Stämme in dieser Studie wurden auf das Vorkommen von 15 Resistenzgenen getestet. Die Gene *blaVIM*, *blaNDM*, *blaOxa-48*, *blaKPC* und *blaGES* wurden mittels der Methode der Real-Time-PCR (LightCycler 480 II Real-Time PCR System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gesucht. Wir benutzten LightMix Modular VIM Carbapenemase, LightMix Modular NDM Carbapenemase, LightMix Modular Oxa-48 Carbapenemase, LightMix Modular KPC Carbapenemase und LightMix Modular GES Carbapenemase (Roche). Die PCR wurde zu den folgenden Bedingungen durchgeführt: 95 °C / 5 min, 45 Zyklen bei 95 °C / 5 s, 60 °C / 15 s, 72 °C / 15 s, Abkühlung 40 °C / 30 s. Die Detektion der Resistenzgene erfolgte durch die für jedes Gen spezifischen TaqMan-Sonden mittels Fluoreszenzfarbstoff. Das Vorhandensein der Gene *cfiA*, *tetQ*, *tetM*, *tet36*, *cepA*, *cfxA*, *nimA*, *ermG*, *ermF* und *bexA* wurde mittels der PCR-Methode nach Kato et al. und Yamazoe et al. bestimmt ^{52, 53}. Die PCR-Konditionen richteten sich nach den Angaben des Herstellers der Primer (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland). Die PCR wurde mittels der

Thermocycler TGradient96 und TPersonal (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in 1,5-prozentigem Agarosegel aufgetrennt, anschließend mit Ethidiumbromid versetzt und unter UV-Licht visualisiert. Um einen Zusammenhang zwischen phänotypischer Resistenz der Stämme und Auftreten der Resistenzgene festzustellen, wurde der exakte Test nach Fisher mittels des Statistikprogramms SPSS verwendet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

Die β -Laktamase-produzierenden Gene *cepA* und *cfxA* wurden in sieben bzw. 15 Stämmen aus unserer Studie detektiert. Während alle *cepA*-Gene ausschließlich bei *B. fragilis* gefunden wurden, konnte das *cfxA*-Gen auch bei anderen *Bacteroides*-Arten nachgewiesen werden. Zwei *B. fragilis*-Stämme trugen sowohl das *cepA*- als auch das *cfxA*-Gen. Innerhalb der Gruppe der Penicilline/Cephalosporin konnte eine hohe Resistenzrate festgestellt werden, 40 Stämme waren resistent gegen Cefoxitin. Gegen Ampicillin-Sulbactam und Piperacillin-Tazobactam waren 40 bzw. 32 unserer getesteten Stämme resistent. Für Ceftolozan-Tazobactam ermittelten wir eine MHK_{50} von $>256 \mu\text{g/ml}$, was für eine Unwirksamkeit dieses Antibiotikums gegen *Bacteroides*-Arten spricht. Von den sieben *cepA*-positiven Stämmen waren jeweils zwei Stämme resistent gegen Ampicillin-Sulbactam, Cefoxitin, und Piperacillin-Tazobactam (alle p-Werte $>0,05$). Bezüglich des *cfxA*-Gens konnte zwischen dem Auftreten des Gens und der phänotypischen Resistenz gegen Cefoxitin, Ampicillin-Sulbactam und Piperacillin-Tazobactam ebenfalls kein Zusammenhang festgestellt werden (alle p-Werte $>0,05$). Unsere Ergebnisse sind kongruent zu der Studie von Eitel et al., in welcher kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Gene *cepA/cfxA* und phänotypischer Resistenz gegen Penicilline/Cephalosporine festgestellt werden konnte⁵⁴. Das Vorhandensein dieser Gene spielt bei *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. hinsichtlich der Resistenzentstehung möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle⁵⁵. Andere Resistenzmechanismen, z.B. Modifikationen bei den penicillinbindenden Proteinen (PBP) oder das Auftreten von Effluxtransportern könnten eher zu Resistenzen gegen Penicilline/Cephalosporine führen⁵⁴.

Das *cfiA*-Gen kodiert für eine starke Metallo- β -Laktamase, welche im Stande ist, nahezu alle β -Laktam-Antibiotika, außer Monobactame, zu hydrolisieren⁴¹. Es wurde in unserer Studie in 40 Stämmen detektiert, darunter waren 34 *B. fragilis*-Stämme. Von den phänotypisch resistenten Stämmen waren bis auf ein *B. thetaiotaomicron*-Stamm alle innerhalb der *B. fragilis*-Gruppe anzutreffen. Dreißig Stämme waren resistent gegen Imipenem, 29 dieser Stämme waren *cfiA*-positiv und bis auf den einen *B. thetaiotaomicron*-Stamm gehörten alle *cfiA*-positiven Stämme der *B. fragilis*-Gruppe an. Gegen Meropenem waren 27 Stämme resistent, alle Stämme waren *cfiA*-positiv und gehörten zur *B. fragilis*-Gruppe. Für Meropenem-Vaborbactam steht kein Grenzwert zur Verfügung, aber mit einer MHK_{50} von $1 \mu\text{g/ml}$ kann diesem Antibiotikum eine gute Wirkung bescheinigt werden. Die Gene *blaVIM*, *blaNDM*, *blaOxa-48*, *blaKPC* und *blaGES* wurden in keinem der 71 untersuchten

Stämme gefunden. Es ist festzustellen, dass sich die phänotypische Resistenz gegen die getesteten Carbapeneme und das Auftreten des *cfiA*-Gens zum großen Teil auf Vertreter der *B. fragilis*-Gruppe konzentrieren. Das Vorkommen eines Stammes, der resistent, aber *cfiA*-negativ war, sowie Stämme, die *cfiA*-positiv, aber empfindlich gegenüber den getesteten Carbapenemen waren, bestätigt zum einen die mögliche Rolle anderer Resistenzmechanismen wie z.B. Porinmutationen und zum anderen die Regulierung von Genen durch sogenannte IS-Elemente⁵⁴.

Bei der Betrachtung und Gegenüberstellung aller drei Gene (*cepA/cfxA/cfiA*) mit den getesteten β -Laktam-Antibiotika ist zu erkennen, dass das *cfiA*-Gen nicht nur für Resistenzen gegen Carbapeneme, sondern wie erwartet auch gegen die Penicilline und Cefoxitin verantwortlich ist. Das Auftreten des *cfiA*-Gens im Zusammenhang mit phänotypischer Resistenz gegen Ampicillin-Sulbactam, Cefoxitin und Piperacillin-Tazobactam ist statistisch signifikant (alle p-Werte $\leq 0,05$). Somit ist davon auszugehen, dass antimikrobielle Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika bei *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. überwiegend von der Präsenz des *cfiA*-Gens und der Produktion seiner Metallo- β -Laktamase ausgeht. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Eitel et al., Tran et al. und Veloo et al., in denen überwiegend das *cepA*-Gen in *Bacteroides* spp. detektiert wurde, tritt in unserer Studie das *cfiA*-Gen am häufigsten auf, was aber daran liegen könnte, dass wir für unsere Studie bereits als resistent eingestufte Stämme auswählten^{49, 54, 56}.

Mit Clindamycin testeten wir in dieser Studie einen Vertreter der MLSKO-Antibiotika. Insgesamt waren 48 Stämme resistent gegen Clindamycin. Die Gene *ermG* und *ermF*, welche für Methylase-Enzyme kodieren, wurden in zehn bzw. 24 Stämmen detektiert. Interessanterweise traten die beiden Gene in keinem der Stämme gleichzeitig auf, im Gegensatz zu der Studie von Sarvari et al., in welcher ein multiresistenter *B. ovatus*-Stamm sowohl *ermG*-, als auch *ermF*-positiv war⁵⁰. Bis auf drei *ermF*-positive Stämme wiesen alle *ermG*-/*ermF*-positiven Stämme eine MHK von $>256 \mu\text{g/ml}$ auf, somit konnte ein Zusammenhang zwischen phänotypischer Resistenz gegen Clindamycin und Prävalenz von *ermG*/*ermF* nachgewiesen werden (beide p-Werte $\leq 0,05$). Das Auftreten von resistenten, aber *ermG*-/*ermF*-negativen Isolaten bestärkt die Tatsache, dass auch andere Mechanismen bei der Entstehung von Resistenzen gegen MLSKO-Antibiotika eine Rolle spielen²⁵. Das *ermB*-Gen, welches ebenfalls in *Bacteroides* spp. nachgewiesen werden konnte, wurde in dieser Studie nicht untersucht, da es in vorausgegangenen Arbeiten nur sehr selten bzw. nicht detektiert wurde^{44, 54, 56}.

Gegen Moxifloxacin waren 27 Stämme aus unserer Studie resistent. Wir konnten das *bexA*-Gen in sechs Stämmen detektieren, dazu zählten fünf *B. thetaiotaomicron*-Stämme und ein *B. fragilis*-Stamm. Von den sechs *bexA*-positiven Stämmen waren nur zwei Stämme resistent gegen Moxifloxacin, somit ist kein Zusammenhang zwischen phänotypischer

Resistenz und Auftreten des *bexA*-Gens feststellbar (p-Wert >0,05). Neben *bexA* gibt es mit dem *bmeABC*-System aus der RND-Familie ein weiteres Effluxtransporter-System bei *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp.⁵⁷. Es wird angenommen, dass Resistenzen gegen Fluorchinolone eher von Punktmutationen im *gyrA*-Gen ausgehen, wo die Aminosäure Serin an den „Hotspots“, und zwar Position 82 und 86, vor allem durch Phenylalanin oder Leucin ausgetauscht wird, so dass die Fluorchinolone nicht mehr am Zielort angreifen können⁴⁵.

In dieser Studie wurden mit Tigecyclin und Eravacyclin zwei Abkömmlinge von Tetracyclin untersucht. Da sowohl EUCAST als auch CLSI keine Grenzwerte für diese Antibiotika bereitstellen, sind keine genauen Aussagen über das Auftreten von Resistenzen möglich. Die MHK₅₀ betrug 1 µg/ml für Tigecyclin und 0,064 µg/ml für Eravacyclin, somit ist bei beiden Tetracyclin-Derivaten eine gute Wirkung gegen die getesteten *Bacteroides*- und *Parabacteroides*-Stämme zu bescheinigen. Insgesamt wurde in 62 Stämmen das *tetQ*-Gen detektiert, es war demzufolge das Gen mit der höchsten Prävalenz in unserer Studie. In keinem der 71 Stämme wurden die Gene *tetM* und *tet36* gefunden. Aufgrund der guten antimikrobiellen Aktivität von Tigecyclin und Eravacyclin, trotz der Anwesenheit von *tetQ* in der Mehrzahl der Stämme, ist davon auszugehen, dass diese beiden Antibiotika den ribosomalen Schutzmechanismus, welcher u.a. von *tetQ*, *tetM* und *tet36* kodiert wird, umgehen. Aufgrund der intensiven Nutzung von Tetracyclin bei anaeroben Infektionen sowie der möglichen Lage des *tetQ*-Gens auf mobilen DNA-Elementen wie Transposons konnte sich dieses Gen über den horizontalen Gentransfer verbreiten^{47, 58}. Im Gegensatz dazu wurde das Gen *tetM*, welches *tetQ* genotypisch ähnlich ist, trotz seiner großen Verbreitung innerhalb grampositiver und gramnegativer Bakterien nicht in *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. entdeckt, obwohl es ebenso auf Transposons lokalisiert sein kann²⁴. Es wird angenommen, dass Barrieren gewisse mobile DNA-Elemente daran hindern, auf andere Bakteriengenera überzugehen³⁵. Das *tet36*-Gen wurde bisher nicht in menschlichen klinischen Proben gefunden, konnte jedoch in *Bacteroides*-Stämmen, welche aus Schweinegülle isoliert wurden, entdeckt werden⁵⁹. Neben dem ribosomalen Schutzmechanismus ist gegen Tetracycline weiterhin eine Resistenzentstehung durch Effluxpumpen und inaktivierende Enzyme möglich²⁴. In der Studie von Sarkar et al. konnten mit *tetA*, *tetB* und *tetD* Gene in Enterotoxin-produzierenden *B. fragilis*-Stämmen (ETBF) detektiert werden, welche für Effluxtransporter kodieren⁶⁰. Des Weiteren wurden Stämme mit verringerter Empfindlichkeit gegenüber Tigecyclin beobachtet, welche von der Anwesenheit der Oxidoreduktase-Enzyme kodierenden Gene *tetX* und *tetX1* verursacht wird⁶¹.

Von den 71 Stämmen unserer Studie waren neun Stämme resistent gegen Metronidazol, in fünf dieser Stämme wurde das *nimA*-Gen detektiert. Bei Gegenüberstellung konnte ein Zusammenhang von phänotypischer Resistenz und Prävalenz des Gens festgestellt werden (p-Wert ≤0,05). Das Auftreten von einem *nimA*-positiven, sensiblen Stamm

spricht für die mögliche Regulation des Gens durch IS-Elemente, so können „ruhende“ *nim*-Gene nach Langzeittherapie mit Metronidazol aktiviert werden ⁶². Weiterhin traten vier resistente, jedoch *nim*-negative Stämme auf, was für mögliche andere Resistenzmechanismen spricht, wie z.B. die Überexpression des *RecA*-Reparaturproteins oder Effluxpumpen ⁶³. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass andere Isoformen des *nim*-Gens eine Resistenz verursachen, welche mit unseren verwendeten Primern für *nimA* nicht detektiert werden konnten. Das *nim*-Gen wurde bisher selten in *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. gefunden ^{54, 56}.

Die Ergebnisse unserer Arbeit konnten bestätigen, dass in *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. eine Vielzahl von Genen vorkommt, welche bereits bekannte Resistenzmechanismen verursachen. Das Auftreten des *cfiA*-Gens ist dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit als Hauptverursacher für Resistenzen gegen β -Laktam-Antibiotika anzusehen. Das *tetQ*-Gen war das am meisten detektierte Gen in unserer Studie, die getesteten Tetracyclin-Derivate Tigecyclin und Eravacyclin zeigten jedoch eine gute Wirkung, umgehen also möglicherweise den von *tetQ* verursachten ribosomalen Schutzmechanismus. Auch die Gene *ermG*, *ermF* und *nimA* haben wahrscheinlich einen großen Einfluss auf Resistenz gegen Clindamycin bzw. Metronidazol. Die Gene *blaVIM*, *blaNDM*, *blaOxa-48*, *blaKPC* und *blaGES*, welche bei den Carbapenem-resistenten *Enterobacteriaceae* (CRE) z.B. *Klebsiella pneumoniae*, oder bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* für eine besorgniserregende Zunahme der Resistenzen gegen Carbapeneme verantwortlich sind, wurden in unseren Stämmen nicht gefunden ⁶⁴. Es ist anzunehmen, dass diese Gene in *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. noch keine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegen Carbapeneme spielen. Das Testen der relativ neu eingesetzten Antibiotika Ceftolozan-Tazobactam, Meropenem-Vaborbactam und Eravacyclin betrachten wir als wichtig, um feststellen zu können, ob die Gabe dieser Antibiotika bei von *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. verursachten anaeroben Infektionen indiziert ist. Es ist obligat, weltweit routinemäßige Resistenztestungen zu etablieren, um Entwicklungen und Veränderungen gegen Antibiotika schnell erfassen zu können, sodass dementsprechend mit einer Anpassung der antibiotischen Therapie reagiert werden kann.

Der Aussagekraft dieser Studie sind Grenzen gesetzt, da wir bei den verschiedenen Antibiotikagruppen nur eine Auswahl an Resistenzgenen untersuchten. So ist z.B. für die Resistenz gegen Moxifloxacin und dem Auftreten des *bexA*-Gens bei geringer Prävalenz kein konkreter Zusammenhang feststellbar und diesbezüglich keine Aussage möglich. Durch Testen mehrerer Antibiotika aus verschiedenen Gruppen und dementsprechend Untersuchen vieler verschiedener Resistenzgene mit unterschiedlichen Resistenzmechanismen sollte ein breites Bild abgegeben werden – ein spezieller Blick auf die Resistenzentstehung bezüglich der einzelnen Antibiotikagruppen fehlt. Diese Lücke wird durch Arbeiten wie z.B. von Soki et

al. geschlossen, welche sich nur eine Antibiotikagruppe vornehmen und spezieller in die Materie eindringen können, dementsprechend auch tiefgründigere molekularbiologische Untersuchungen durchführen können⁵⁵. Eine weitere Limitation besteht darin, dass die genaue Resistenzlage gegenüber den Antibiotika nicht genau abgebildet werden kann, da wir für unsere Studie gezielt bereits als phänotypisch resistent bekannte Stämme auswählten. Um diesbezüglich genauere Aussagen treffen zu können, sind Arbeiten wie z.B. die großen multizentrischen Studien von Snyderman et al., Nagy et al. und Rodloff et al. sinnvoll, welche sich speziell auf Resistenztestung konzentrieren, dementsprechend eine höhere Fallzahl an Stämmen aufweisen und alle isolierten *Bacteroides*- und *Parabacteroides*-Stämme in die Resistenztestung mit einbeziehen³⁶⁻³⁸.

Ein Gewinn dieser Studie ist, dass bei bekannter phänotypischer Resistenz gegen häufig genutzte Antibiotika gezeigt werden konnte, dass gewisse Antibiotika wie z.B. Meropenem-Vaborbactam, Tigecyclin und Eravacyclin eine gute Wirkung gegen Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides* zeigen. Metronidazol, der Meilenstein in der Therapie anaerober Infektionen, hat trotz des Einsatzes über Jahrzehnte weiterhin eine gute Wirksamkeit. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Ceftolozan-Tazobactam möglicherweise keine gute Wirkung gegen *Bacteroides* spp. aufweist. Mit Blick auf die hohe klinische Relevanz der Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides* kann unsere Arbeit womöglich einen Teil zur Entscheidungsfindung bei der Auswahl des Antibiotikums im klinischen Alltag beitragen. Ein weiterer Gewinn ist eine aktuelle Darstellung über das Vorkommen der verschiedenen Resistenzgene. Das *cfiA*-Gen spielt eine große Rolle bei der Resistenzentstehung gegen β -Laktam-Antibiotika, weiterhin tragen die *erm*-Gene zur Entstehung von Resistenzen gegen Clindamycin und möglicherweise auch andere MLSKO-Antibiotika bei. Das *nim*-Gen wurde selten detektiert, jedoch konnte ein Zusammenhang mit phänotypischer Resistenz gegen Metronidazol festgestellt werden. Das Nichtvorkommen von *tetM*, *tet36*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaOxa-48*, *blaKPC* und *blaGES* zeigt, dass trotz eines regen horizontalen Gentransfers im menschlichen Darm möglicherweise Barrieren bestehen, welche den Übertritt von Resistenzgenen auf andere Bakterienspezies verhindern.

Tabelle 3: Muster der Multiresistenz.

Art	n	Phänotypische Resistenz ^a	Auftreten der Resistenzgene ^b							
			<i>cepA</i>	<i>cfxA</i>	<i>cfiA</i>	<i>tetQ</i>	<i>ermG</i>	<i>ermF</i>	<i>nimA</i>	<i>bexA</i>
<i>B. fragilis</i>	3	AS,CX,PT,I,M,CD,MX,MZ	0	0	3	3	0	0	1	0
	1	AS,CX,PT,I,M,MX,MZ	0	0	1	1	0	0	1	0
	2	AS,PT,I,M,CD,MX	0	1	2	1	0	1	0	0
	8	AS,CX,PT,I,M,CD	0	1	8	8	0	6	0	0
	4	AS,CX,PT,I,M,MX	1	1	4	3	0	0	0	1
	2	AS,PT,I,M,CD	0	0	2	2	0	2	0	0
	4	AS,CX,PT,I,M	0	0	4	2	0	0	0	0
	1	AS,CX,I,M,CD	0	0	1	1	0	1	0	0
	2	AS,CX,PT,I,CD	0	0	1	2	0	2	0	0
	1	AS,I,M,CD	0	0	1	1	0	0	0	0
	1	AS,CX,I,M	0	0	1	1	0	0	0	0
	1	AS,PT,CD,MZ	1	0	1	1	1	0	0	0
	1	CX,CD,MX,MZ	1	1	0	1	0	1	1	0
	1	CX,CD,MZ	0	0	1	1	1	0	0	0
	1	AS,CD	0	0	1	1	0	1	0	0
	1	CD,MZ	1	0	0	1	1	0	0	0
	1	CD	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	MX	1	0	1	1	0	0	0	0
	4	keine Resistenz	2	0	2	4	0	0	0	0
	<i>B. thetaiota-omicron</i>	1	AS,PT,I,CD,MX	0	0	1	1	1	0	1
1		CX,PT,CD,MX	0	1	0	1	1	0	0	0
1		CX,PT,CD	0	0	0	1	0	1	0	1
1		CX,CD,MX	0	0	0	1	0	0	0	0
1		CD,MX	0	0	0	1	1	0	0	0
3		CX,CD	0	0	0	2	1	0	0	1
2		CD	0	0	0	2	0	0	0	2
1		MX	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. vulgatus</i>	1	AS,CD	0	0	0	1	0	1	0	0
	1	CD,MX	0	0	0	1	1	0	0	0
	1	CX,MX	0	1	1	1	0	0	0	0
	2	AS	0	1	0	1	0	1	0	0
	1	CX	0	1	0	1	0	0	0	0
	1	keine Resistenz	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>B. ovatus</i>	1	AS,PT,MX,MZ	0	1	1	1	0	0	1	0
	1	AS,CX,CD,MX	0	0	0	1	0	1	0	0
	1	CX,CD,MX,MZ	0	1	1	1	0	1	1	0
	1	AS,PT,CD	0	1	0	1	0	1	0	0
	1	CX,CD	0	1	0	1	0	1	0	0
	1	CD	0	0	0	1	0	0	0	0
	1	keine Resistenz	0	0	1	1	0	1	0	0
	<i>P. distasonis</i>	1	AS,CD,MX	0	0	0	1	0	1	0
1		AS,CX,CD	0	0	0	1	0	1	0	0
1		CD,MX	0	1	0	1	0	0	0	0
1		CX,CD	0	1	1	1	1	0	0	0
<i>B. caccae</i>	1	CD,MX	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>B. ovatus/xylanisolvans</i>	1	CX,CD,MX	0	0	0	0	1	0	0	0

AS, Ampicillin-Sulbactam; CX, Cefoxitin; PT, Piperacillin-Tazobactam; I, Imipenem; M, Meropenem; CD, Clindamycin; MX, Moxifloxacin; MZ, Metronidazol.

^a keine Grenzwerte von EUCAST/CLSI verfügbar für Ceftolozan-Tazobactam, Meropenem-Vaborbactam, Tigecyclin und Eravacyclin, nicht berücksichtigt in Tabelle.

^b Gene *blaVIM*, *blaNDM*, *blaOxa-48*, *blaKPC*, *blaGES*, *tetM* und *tet36* nicht detektiert, nicht aufgeführt in Tabelle.

4 Schlussfolgerung

Unsere Studie zeigt, dass die Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides* eine Vielzahl an Resistenzgenen besitzen, welche auch für die Entstehung von Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika verantwortlich sind. Während viele Antibiotika hohe Resistenzraten aufweisen, kann andererseits einigen Antibiotika eine gute Wirkung bescheinigt und damit deren Anwendung empfohlen werden. Die allgemein hohe Resistenzrate innerhalb der *Bacteroides*-Gruppe sollte im klinischen Alltag berücksichtigt werden. Aufgrund des großen Vorkommens und der damit verbundenen hohen klinischen Relevanz der *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. ist weltweit ein regelmäßiges, standardisiertes Testen auf Resistenzen gegen häufig genutzte und neu eingeführte Antibiotika obligat.

5 Literaturverzeichnis

1. Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev 2007;20(4):593–621.
2. Salyers AA. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. Annu Rev Microbiol 1984;38:293–313.
3. Liu C, Song Y, McTeague M, Vu AW, Wexler HM, Finegold SM. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. FEMS Microbiol Lett 2003;222:9–16.
4. Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 2006;56:1599–1605.
5. Polk BF, Kasper DL. *Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates. Ann Intern Med 1977;86:569–571.
6. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology 1984;86:174–193.
7. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science 2005;307:1915–1920.
8. Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, et al. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. Science 2005;307:1955–9.
9. Xu J, Chiang HC, Bjursell MK, Gordon JI. Message from a human gut symbiont: sensitivity is a prerequisite for sharing. Trends Microbiol 2004;12:21–8.
10. Mazmanian SK, Kasper DL. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. Nat Rev Immunol 2006;6:849–58.
11. Hopkins MJ, Macfarlane GT. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. J Med Microbiol 2002;51:448–54.
12. Goldstein EJC. Anaerobic bacteremia. Clin Infect Dis 1996;23(Suppl (1)):S97–101.
13. Brook I. Endocarditis due to anaerobic bacteria. Cardiology 2002;98:1–5.
14. Hung MN, Chen SY, Wang JL, Chang SC, Hsueh PR, Liao CH, et al. Community-acquired anaerobic bacteremia in adults: one-year experience in a medical center. J Microbiol Immunol Infect 2005;38:436–43.
15. San Joaquin V, Griffis JC, Lee C, Sears CL. Association of *Bacteroides fragilis* with childhood diarrhea. Scand J Infect Dis 1995;27:211–5.

16. Kurz U. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie (3. Auflage), Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 2013;2:97–116.
17. Gelpi A, Gilbertson A, Tucker JD. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology. *Sex Transm Infect* 2015;91:68–9.
18. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ* 2001;79:780–90.
19. Otten H. Domagk and the development of the sulphonamides. *J Antimicrob Chemother* 1986;17:689–96.
20. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2019;51:72–80.
21. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
22. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:42–51.
23. Miyamae S, Ueda O, Yoshimura F, Hwang J, Tanaka Y, Nikaido H. A MATE family multidrug efflux transporter pumps out fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001;45:3341–6.
24. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2005;245:195–203.
25. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2008;282:147–59.
26. Ghotaslou R, Bannazadeh Baghi H, Alizadeh N, Yekani M, Arbabi S, Memar MY. Mechanisms of *Bacteroides fragilis* resistance to metronidazole. *Infect Genet Evol* 2018;64:156–63.
27. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl (1)):S5–16.
28. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC's and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
29. Rodloff AC, Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. Sensibel, intermediär und resistent – Wirkintensität von Antibiotika. *Dtsch Arztebl* 2008;105:657–62.
30. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
31. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 2014;59:698–705.

32. Goldstein EJC, Citron DM, Goldman PJ, Goldman RJ. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. *Anaerobe* 2008;14:68–72.
33. Rasmussen BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clin Infect Dis* 1993;16(Suppl (4)):S390–400.
34. Salyers AA, Shoemaker NB. Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. *Clin Infect Dis* 1996;23(Suppl. (1)):S36–43.
35. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:561–8.
36. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Ruthazer R, Golan Y, Goldstein EJC, et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:1649–55.
37. Nagy E, Urbán E, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:371–9.
38. Rodloff AC, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline and comparators against a European collection of anaerobes collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2010-2016. *Anaerobe* 2018;51:78–88.
39. Rogers MB, Parker AC, Smith CJ. Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993;37:2391–400.
40. Parker AC, Smith CJ. Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta-lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993;37:1028–36.
41. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin Infect Dis* 2004;39:92–7.
42. Thompson JS, Malamy MH. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* beta-lactamase II. *J Bacteriol* 1990;172:2584–93.
43. Snyderman DR, McDermott LA, Jacobus NV, Kerstein K, Grossman TH, Sutcliffe JA. Evaluation of the in vitro activity of eravacycline against a broad spectrum of recent clinical anaerobic isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e02206–17.
44. Löfmark S, Jernberg C, Jansson JK, Edlund C. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1160–7.

45. Pumbwe L, Wareham DW, Aduse-Opoku J, Brazier JS, Wexler HM. Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. Clin Microbiol Infect 2007;13:183–9.
46. Goldstein EJC, Citron DM, Tyrrell KL. In vitro activity of eravacycline and comparator antimicrobials against 143 recent strains of *Bacteroides* and *Parabacteroides* species. Anaerobe 2018;52:122–4.
47. Nikolich MP, Shoemaker NB, Salyers AA. A *Bacteroides* tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1005–12.
48. Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1253–6.
49. Veloo ACM, Baas WH, Haan FJ, Coco J, Rossen JW. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* spp. and *Prevotella* spp. Dutch clinical isolates. Clin Microbiol Infect 2019;25:1156.e9–13.
50. Sárvári KP, Sóni J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Meleg S, et al. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples. J Glob Antimicrob Resist 2018;13:65–9.
51. Pedersen RM, Marmolin ES, Justesen US. Species differentiation of *Bacteroides dorei* from *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides ovatus* from *Bacteroides xylanisolvens* – back to basics. Anaerobe 2013;24:1–3.
52. Kato N, Kato H, Watanabe K, Ueno K. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. Clin Infect Dis 1996;23(Suppl. (1)):S83–6.
53. Yamazoe K, Kato N, Kato H, Tanaka K, Katagiri Y, Watanabe K. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2808–10.
54. Eitel Z, Sóni J, Urbán E, Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. Anaerobe 2013;21:43–9.
55. Sóni J, Gonzalez SM, Urbán E, Nagy E, Ayala JA. Molecular analysis of the effector mechanisms of ceftiofur resistance among *Bacteroides* strains. J Antimicrob Chemother 2011;66:2492–500.
56. Tran CM, Tanaka K, Watanabe K. PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. J Infect Chemother 2013;19:279–90.

57. Ueda O, Wexler HM, Hirai K, Shibata Y, Yoshimura F, Fujimura S. Sixteen homologs of the Mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2807–15.
58. Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 2004;12:412–6.
59. Whittle G, Whitehead TR, Hamburger N, Shoemaker NB, Cotta MA, Salyers AA. Identification of a new ribosomal protection type of tetracycline resistance gene, *tet*(36), from swine manure pits. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4151–8.
60. Sarkar A, Pazhani GP, Dharanidharan R, Ghosh A, Ramamurthy T. Detection of integron-associated gene cassettes and other antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe* 2015;33:18–24.
61. Bartha NA, Sóki J, Urbán E, Nagy E. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:522–5.
62. Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. Carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:109–16.
63. Ghotaslou R, Bannazadeh Baghi H, Alizadeh N, Yekani M, Arbabi S, Memar MY. Mechanisms of *Bacteroides fragilis* resistance to metronidazole. *Infect Genet Evol* 2018;64:156–63.
64. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The "Old" and the "New" antibiotics for MDR gram-negative pathogens: for whom, when, and how. *Front Public Health* 2019;7:151.

6 Darstellung des eigenen Beitrags

Ich habe die folgenden Anteile für die Erstellung der Publikationspromotion „Die Vielfalt der antimikrobiellen Resistenzgene von in Deutschland isolierten Stämmen der Gattungen *Bacteroides* und *Parabacteroides*“ selbstständig erarbeitet:

Literaturrecherche und -auswertung, Durchführung der Resistenztestung und der molekularbiologischen Versuche am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Datenerhebung und -aufbereitung, statistische Datenauswertung in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. habil. Catalina Suzana Stingu, deskriptive Datenauswertung, Erstentwurf und Bearbeitung des Manuskripts.

.....

Datum

.....

Sebastian Martin Michael Rong

.....

Datum

.....

PD Dr. habil. Catalina Suzana Stingu

7 Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Leipzig, den 16.05.2021

Sebastian Martin Michael Rong