

**Abschlußbericht zu den Arbeiten im Rahmen des Max-Buchner-Forschungsstipendiums
Kennziffer 2777 „Antibiotika-multiresistente opportunistische Pathogene in Wasser- und
Bodenproben – das Beispiel *Stenotrophomonas maltophilia*.“**

Antragsteller: Prof. Dr. Josef Winter

Stipendiat: Dr. Stephan Bathe

Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers

Universität Karlsruhe (TH)

Am Fasanengarten Geb. 50.31, 76131 Karlsruhe

Projektlaufzeit: 01.07.2008-30.06.2009

Kurzfassung

Stenotrophomonas maltophilia ist ein humanes opportunistisch pathogenes Bakterium, dessen Verbreitung und genetische Diversität in der Umwelt hier genauer untersucht wurde. Eine Reihe von genetisch unterschiedlichen Isolaten konnten aus Abwasserumgebungen und Gewässersedimenten gewonnen werden. Die beiden größten der hier identifizierten genetischen Gruppen scheinen auf das Auftreten in der Umwelt im Gegensatz zu klinischen Umgebungen beschränkt zu sein. Alle untersuchten Isolate wiesen multiple Antibiotikaresistenzen auf.

Einleitung

Stenotrophomonas maltophilia ist ein γ -Proteobakterium, das in der Umwelt ubiquitär verbreitet ist. Der Organismus weist eine große Zahl von Antibiotika-Multiresistenzen auf und tritt als opportunistisches Pathogen mit zunehmender Häufigkeit auf. Insbesondere nosokomiale Infektionen werden zunehmend häufiger durch diesen Organismus verursacht, der nach *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. an dritthäufigster Stelle bei den gram-negativen nicht-Glucose-fermentierenden Krankenhauserregern steht (Jones et al. 2003). Epidemiologische Studien dieser Art wurden bisher überwiegend an klinischen Isolaten durchgeführt. Die Erkenntnis aus den meisten dieser Untersuchungen ist, daß die überwiegende Zahl von klinischen Isolaten keine klonalen Komplexe bilden (Senol 2004). Dies deutet auf eine Infektion mit individuellen Stämmen aus Umweltquellen hin, aber nicht auf eine größere Bedeutung der Übertragung zwischen Patienten. Im Gegensatz zu den epidemiologisch gut untersuchten klinischen Isolaten ist jedoch wenig über die genetische Diversität von *S. maltophilia* Stämmen in der Umwelt bekannt, ebensowenig wie über die hier auftretenden Antibiotikaresistenzen. In einer neueren Arbeit von Kaiser et al. (2009) wird die generelle Populationsstruktur einer Mischung von klinischen sowie Umweltisolaten von *S. maltophilia* durch Multilokus-Sequenzanalyse untersucht. Diese Analyse der evolutiven Beziehungen zwischen Stämmen zeigt hier das Auftreten von 15 genetischen Gruppen, die z. T. auch schon vorher von Hauben et al. (1999) beschrieben worden sind.

Diese beiden Studien beziehen neben klinischen Stämmen auch Umweltisolate in ihre Untersuchungen mit ein. Eine weitere Untersuchung hatte das konkrete Ziel, klinische sowie Umweltstämme in ihren genetischen und physiologischen Eigenschaften zu vergleichen (Berg et al. 1999). Hier wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen, was teilweise an der möglicherweise zu geringen Zahl von Stämmen (je 25 klinische und Umweltstämme) gelegen haben könnte. Allerdings kann angenommen werden, daß eine große Zahl von Umweltstämmen auch prinzipiell in der Lage sein sollte, Infektionen beim Menschen zu erzeugen.

Ziel der in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten war die Etablierung einer Stammkollektion von *S. maltophilia* aus verschiedenen Umweltproben, um einen Überblick über Habitatverbreitung und die genetische Diversität der auftretenden Stämme zu gewinnen. Weiterhin wurde ein Screening der im Organismus auftretenden Antibiotikaresistenzen durchgeführt.

Probenherkunft

Die folgenden Proben wurden untersucht:

- Abwässer und Belebtschlämme der folgenden kommunalen Kläranlagen:
 - Karlsruhe-Neureut
 - Hagenbach bei Karlsruhe
 - Rheinstetten bei Karlsruhe
 - Garching bei München
 - Grüneck bei München
- Altrhein-Gewässersedimente in der Gegend von Neuburg in der Pfalz
- Grasboden im Siedlungsbereich von Karlsruhe
- Waldboden des Karlsruher Stadtwaldes (Hardtwald)

Weiterhin wurden Isolate aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der Universität Rostock, Wasser-Isolate der Stammsammlung des Klinikums Karlsruhe sowie die beiden Isolate R551-3 sowie SKA14, für die Genomsequenzen verfügbar sind, mit in die Analyse einbezogen.

Isolierung und Identifizierung von *S. maltophilia*

Die Isolierung von *S. maltophilia* Stämmen wurde mit der Methode von Bollet et al. (1995) (Flüssiganreicherung in Methionin-haltiger Nährbouillon mit nachfolgender Selektion Imipenem-resistenter Kolonien auf Festmedien) durchgeführt. Die so erhaltenen Kolonien wurden dann mittels einer Spezies-spezifischen PCR-Reaktion auf ihre Identität als *S. maltophilia* überprüft. Isolate konnten aus allen untersuchten Abwässern und Belebtschlämmen sowie den Gewässersedimenten aus Neuburg gewonnen werden. Gras- und Waldboden erwiesen sich als negativ.

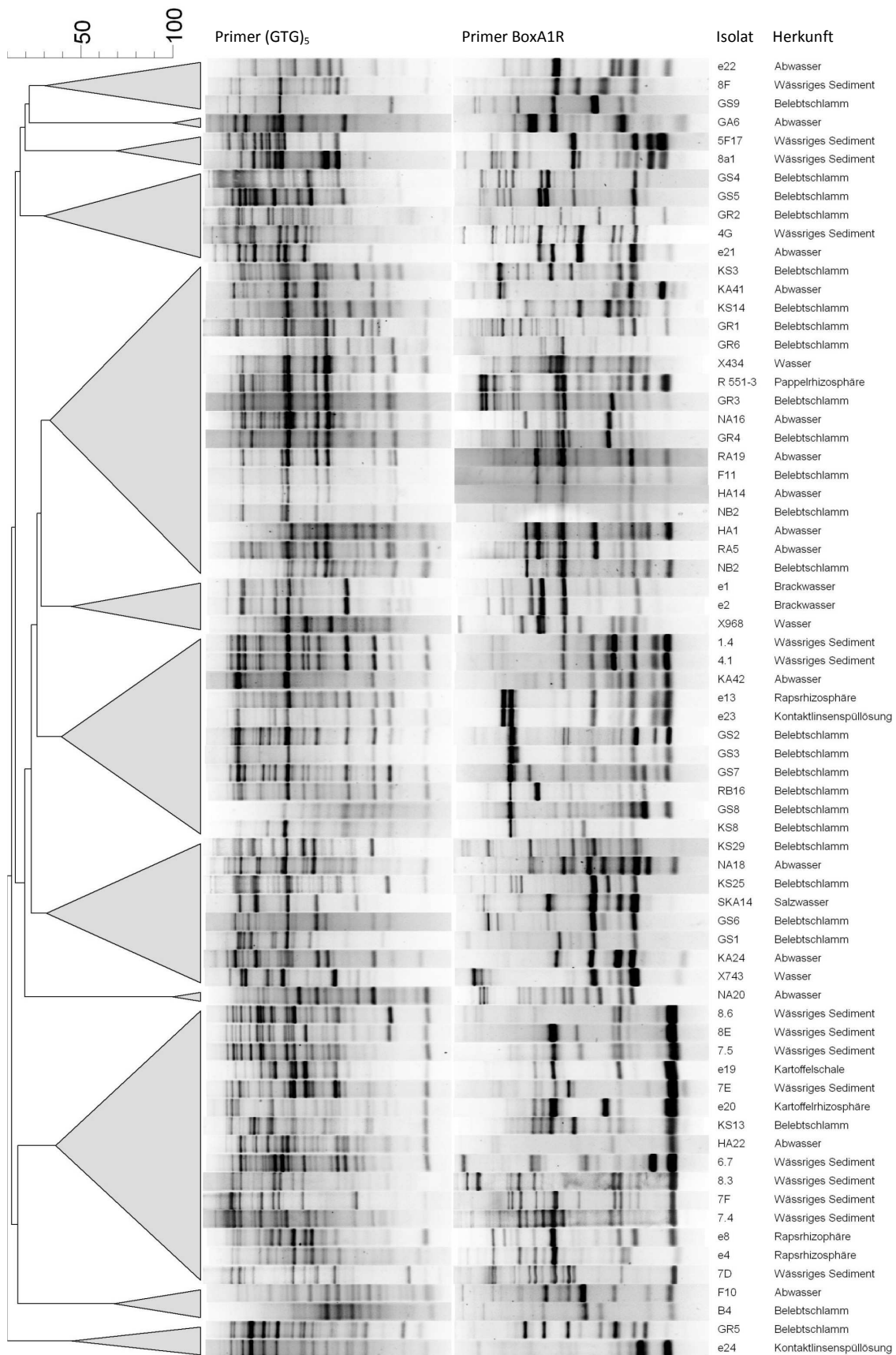


Abb. 1: Untersuchung der genetischen Diversität von *S. maltophilia* Umweltsisolaten mittels rep-PCR und nachfolgender Bildanalyse der Bandenprofile mit BioNumerics.

Untersuchung der genetischen Diversitäten der Isolate

Genetische Diversitäten der Isolate wurden mittels rep-PCR mit den Primern BoxA1R und (GTG)₅ untersucht (Versalovic et al. 1994). Die Bandenprofile erwiesen sich als extrem heterogen, was auf eine hohe genetische Variabilität hindeutet. Die Profile wurden mit dem Bildanalyseprogramm BioNumerics ausgewertet und entsprechend ihrer Ähnlichkeit gruppiert (s. Abb. 1). Nach Eliminierung von Klonen derselben Probe ergaben sich insgesamt 70 unterschiedliche Profile. Bereits mit einem vergleichsweise geringen Schwellenwert von 30% Profilähnlichkeit ergeben sich in dieser Analyse 7 verschiedene genetische Gruppen mit ≥ 3 Isolaten.

Antibiotikaresistenzanalysen

Mittels Plattendiffusionstests wurde eine Reihe von Isolaten (zwischen 27 und 57 Stämme je Substanz) auf Resistenzen bzgl. 15 verschiedene Antibiotika getestet. Hierbei wurde ein Isolat nur dann als resistent angesehen, wenn kein Hemmhof um die Antibiotika-Disk erkennbar war. Isolate mit sichtbaren Hemmhöfen, innerhalb derer ein reduziertes Bakterienwachstum beobachtet werden konnte, wurden als intermediär betrachtet. Numerisch wurde eine Resistenz mit 1, ein intermediäres Verhalten mit 0.5 und eine Sensitivität mit 0 ausgewertet.

Die folgenden Antibiotika wurden getestet:

Penicillin G	P	10 IE
Ampicillin	AM	10 µg
Kanamycin	K	30 µg
Gentamycin	GM	10 µg
Neomycin	N	30 µg
Ciprofloxacin	CIP	5 µg
Norfloxacin	NOR	10 µg
Ofloxacin	OFX	5 µg
Erythromycin	E	15 µg
Vancomycin	VA	30 µg
Tetracyclin	TE	30 µg
Chloramphenicol	C	30 µg
Triple-Sulfa	SSS	je 83 µg
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	SXT	23.75/12.5
Novobiocin	NB	10 µg

Die Analysen bestätigten zunächst die Antibiotika-Multiresistenz von *S. maltophilia*: von 27 Stämmen wurden im Mittel 8 ± 1.1 Resistenzen pro Isolat (Minimum 5, Maximum 10) beobachtet. Bei den Sulfonamiden trat eine sehr hohe Zahl an intermediären Stämmen auf. Die Verteilung der Resistenzen über die Einzelsubstanzen ist in Abb. 2 gezeigt.

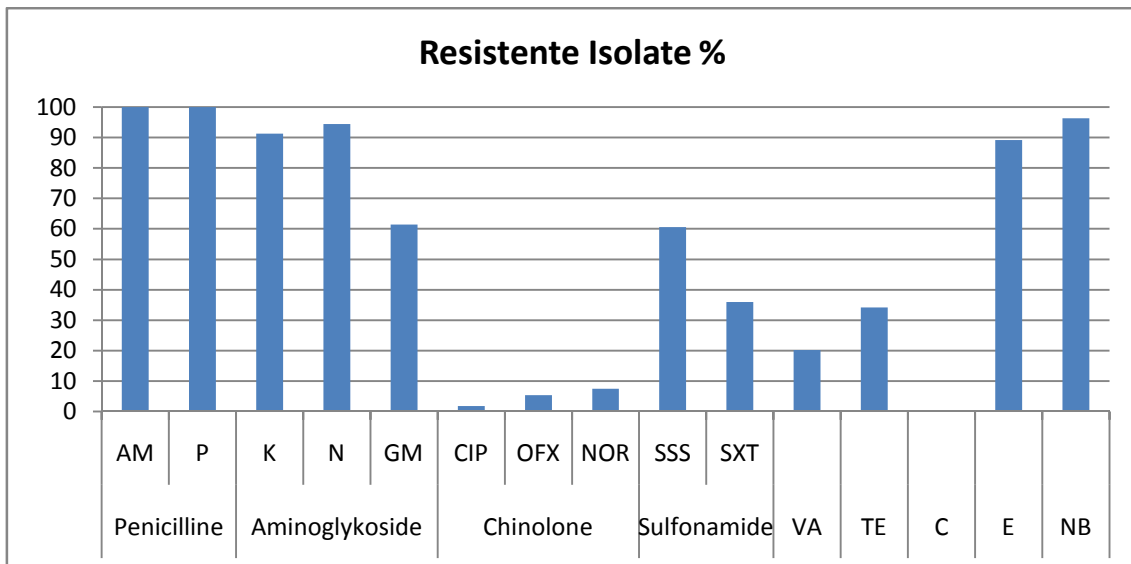


Abb. 2: Prozentuale Verteilung der Antibiotikaresistenzen über die untersuchten Isolate.

Diskussion

Die hier durchgeführten Analysen bestätigen eine hohe genetische Diversität von *Stenotrophomonas maltophilia* auch in Umweltstämmen. Untersuchungen von Hauben et al. (1999) etablieren 10 unterschiedliche Genogruppen von *Stenotrophomonas*, dies wird durch Kaiser et al. (2009) noch erweitert.

Von den beiden Gruppen mit den meisten Isolaten in unserer Analyse enthält die eine den Stamm R551-3, der von Kaiser et al. der Genogruppe 5 zugeordnet worden ist. Diese Gruppe enthält in beiden Studien von Hauben und Kaiser ausschließlich Umweltisolate und keine klinischen Stämme, so daß hier eine spezielle ökologische Einnischung angenommen werden kann. Falls die in unserer Untersuchung gefundene Gruppe mit der Genogruppe 5 übereinstimmt, spricht die hohe Zahl an Isolaten sowie die weite Verbreitung in unterschiedlichen Belebtschlämmen und Abwässern hier ebenfalls für eine Präferenz von Umweltlebensräumen.

Weiterhin kann hier erwähnt werden, daß die Isolate e4, e8, e19 und e20 in einer Studie von Minkwitz und Berg (2001) Stämmen mit einer speziellen Signatur des 16S rRNA Gens zugeordnet wurden, die auch bisher ebenfalls nur in der Umwelt und nicht in klinischen Umgebungen detektiert wurden. In unserer Untersuchung sind genetisch ähnliche Stämme dem zweitgrößten hier gefundenem Cluster zuzuordnen, wobei diese allerdings überwiegend aus Rhizosphärenumgebungen und Gewässersedimenten isoliert wurden. Auch dies spricht wieder für die Besetzung einer speziellen ökologischen Nische durch diese Stämme.

Die Antibiotikaresistenz-Untersuchungen bestätigen *S. maltophilia* als intrinsisch multiresistenten Organismus und zeigen durchgängig hohe Resistenzen im Falle von Penicillinen, den Aminoglykosien Kanamycin und Neomycin, sowie bei Erythromycin und Novobiocin. Im Gegensatz hierzu sind die meisten Stämme sensitiv gegenüber Chinolonantibiotika sowie Chloramphenicol. Innerhalb der Art variabel scheinen Resistenzen

gegen Gentamycin, Tetracyclin, Vancomycin, sowie gegen Sulfonamide. Allerdings deutet bei diesen die hohe Zahl an intermediären Phänotypen darauf hin, daß die im Plattendiffusionstest eingesetzten Disks nicht den richtigen Konzentrationsbereich für die Tests abdeckten.

Zusammenfassend kann hier bemerkt werden, daß *Stenotrophomonas maltophilia* in der Umwelt eine weite Verbreitung und hohe genetische Variabilität aufweist. Insbesondere aus Abwasserumgebungen als Schnittstellen der anthropogenen und natürlichen Wasserkreisläufe läßt sich diese Art problemlos isolieren und dürfte in Kläranlagen ubiquitär verbreitet sein. Aus Wald- und Grasboden konnten keine Isolate gewonnen werden, allerdings aus Gewässersedimenten. Rhizosphärenumgebungen wurden hier nicht detailliert untersucht, allerdings wurde das Auftreten von *S. maltophilia* in pflanzlichen Wurzelumgebungen bereits beschrieben (Berg et al. 2005). Genetische Clusterbildungen in dieser und anderen Untersuchungen deuten auf eine präferentielle ökologische Nischenbildung von einigen Genogruppen hin. Das pathogene Potenzial der unterschiedlichen Genogruppen sowie die Fähigkeit zur Ausbildung und zum Austausch von Antibiotikaresistenzen sollte detaillierter untersucht werden.

Referenzen

- Berg G, Eberl L, Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7: 1673-85.
- Berg G, Roskot N, Smalla K. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 37: 3594-600.
- Bollet C, Davin-Regli A, De Micco P. 1995. A simple method for selective isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 61: 1653-1654.
- Hauben L, Vauterin L, Moore ER, Hoste B, Swings J. 1999. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1749-60.
- Jones RN, Sader HS, Beach ML. 2003. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents* 22: 551-6.
- Kaiser S, Biehler K, Jonas D. 2009. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J Bacteriol* 191: 2934-43.
- Minkwitz A, Berg G. 2001. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 39: 139-45.
- Senol E. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect* 57: 1-7.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 5: 25-40.