

Hochschule Rhein-Waal

Fakultät Life Sciences

Studiengang Bio Science and Health

Bachelorarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades des
Bachelor of Science

**„Molekularbiologische Untersuchungen von *Vibrio*
spp. auf das Vorhandensein von mobilen *mcr*-Genen
und deren Klassifizierung“**

vorgelegt von

Gül Özkök

Matrikelnummer: 25432

Kleve, 29.04.2022

Erstprüfer: Herr Prof. Dr. Dirk Bockmühl

Zweitprüfer: Frau Maria Kluge

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Heike Kaspar für die Möglichkeit, die Bachelorarbeit am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in der Abteilung 5 im Referat 505 Antibiotikaresistenzmonitoring zu erstellen. Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Referate 505 und 503 für die herzliche Aufnahme und angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich herzlich bei Maria Kluge und Dr. Stefan Fiedler, die stets ein offenes Ohr für mich hatten. Vielen Dank für die ausgezeichnete Unterstützung und die erstklassige Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Im Besonderen bedanke ich mich bei meinem Professor Herr Dr. Dirk Bockmühl für die einwandfreie Betreuung, die Hilfestellungen und die Unterstützung bei Herausforderungen.

Zu guter Letzt, ein herzliches Dankeschön an meine Eltern und meinen Bruder für eine ausnahmslose Unterstützung während meines Studiums.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abbildungsverzeichnis	III
III. Tabellenverzeichnis	IV
V. Abkürzungsverzeichnis	V
VI. Zusammenfassung	VII
1. Einleitung	1
1.1 Allgemein	1
1.2 Epidemiologie der Vibrionen	2
1.3 Vibrio Subspezies	4
1.4 Genomaufbau und Phylogenie	6
1.5 Antibiotikaresistenz	7
1.6 Colistin und Colistin-Resistenz	9
1.7 Zielstellung	13
2. Material	14
2.1 Bakterienstämme	14
2.2 Chemikalien und Lösungen	16
2.3 Geräte	17
2.4 Verbrauchsmaterialien	18
2.5 Reaktionskits	18
2.6 Enzyme	19
2.8 Computerprogramme	19
3. Methoden	20
3.1 Mikrobiologischer Methodenteil	20
3.1.1 Stammhaltung	20
3.1.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	20
3.1.3 Speziesbestimmung mittels MALDI-TOF MS	21
3.2 Molekularbiologischer Methodenteil	21
3.2.1 DNA-Extraktion	21
3.2.2 Library Preparation	22
3.2.3 Quantifizierung mittels Qubit und LabChip	23
3.2.4 MiSeq <i>short read</i> Sequenzierung	24
3.2.5 Bioinformatische Auswertung	24
4. Ergebnisse	28
4.1 Probenauswahl und Vorselektion	28

4.1.2 Speziesidentifikation mittels MALDI-TOF MS	28
4.1.2 Ermittlung der Colistin-Resistenz mittels MHK.....	28
4.1.3 Methode der DNA-Extraktion.....	30
4.1.4 Bioinformatische Qualitätskontrolle.....	33
4.2 Speziesbestimmung – Bioinformatische Auswertung	34
4.2.1 Speziesbestimmung durch MALDI-TOF MS	34
4.2.2 Speziesbestimmung durch TYGS.....	37
4.2.3 Speziesbestimmung durch 16S rRNA Phylogenie.....	39
4.3 Identifikation von Resistenzgenen	41
4.3.1 Allgemeine Resistenzgene.....	41
4.3.2 Identifikation von <i>mcr-4</i>	42
4.3.3 bekannte Resistenzgene	43
4.3.4 neue mögliche Resistenzgene	44
5. Diskussion	48
5.2.1 Vergleich der Verfahren zur Speziesidentifikation.....	49
5.2.2 Verteilung der Antibiotikaresistenzgene.....	52
5.2.3 Verteilung der Colistin-Resistenzgene	54
5.2.4 Entwicklung und Verbreitung der Colistin-Resistenzen.....	56
5.2.5 <i>mcr-4</i> Gen.....	56
5.2.6 <i>mcr-4</i> Plasmid.....	57
5.2.7 neue Resistenzgene	57
5.2.8 Ausblick.....	58
7. Literaturverzeichnis.....	60
8. Anhang	68
9. Eidstaatliche Erklärung.....	70

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Anomalie der durchschnittlichen Oberflächentemperaturen in verschiedenen europäischen Meeren von 1870 bis 2020.....	2
Abbildung 2 Zeitleiste der Markteinführung von Antibiotika und die Entstehung einer Antibiotikaresistenz.....	9
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Wirkung Colistins.	11
Abbildung 4 Identifikationen von <i>mcr</i> -Genen.....	12
Abbildung 5 MHK-Werte der <i>GERM</i> -Vet-Isolate für Colistin.....	29
Abbildung 6 MHK-Werte der Zierfisch-Isolate für Colistin.....	30
Abbildung 7 DNA-Konzentrationen aller <i>GERM</i> -Vet-Isolate nach der DNA-Extraktion.	32
Abbildung 8 DNA-Konzentrationen aller Zierfisch-Isolate nach der DNA-Extraktion... ..	33
Abbildung 9 Ergebnisse der MALDI-TOF MS für <i>GERM</i> -Vet- und Zierfisch-Isolate.	37
Abbildung 10 Ergebnisse TYGS für <i>GERM</i> -Vet- und Zierfisch-Isolate.....	38
Abbildung 11 16S rRNA-Stammbaum mit allen Isolaten und den ausgewählten Referenzgenen.	40
Abbildung 12 Ergebnisse von Bakcharak für die ermittelten Resistenzgene ohne Colistin-Resistenzgene.....	41
Abbildung 13 <i>mcr-4</i> Plasmid.....	42
Abbildung 14 Identifikation von möglichen neuen Resistenzgenen.....	45
Abbildung 15 Stammbaum aller <i>mcr</i> -Genen, <i>pmrC</i> , <i>eptA</i> und den neuen möglichen Resistenzgenen.	46
Abbildung 16 Vergleich der Speziesidentifikation.	50
Abbildung 17 16S rRNA-Stammbaum mit bekannten Colistin-Resistenzgenen.	54

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Bakterienisolate.	14
Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien.	16
Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Geräte.	17
Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	18
Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Reaktionskits.....	18
Tabelle 6 Übersicht der verwendeten Enzyme.	19
Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Computerprogramme.	19
Tabelle 8 Übersicht Parameter und Grenzwerte zur Qualitätskontrolle.	26
Tabelle 9 MALDI-TOF-Ergebnisse.	35
Tabelle 10 ermittelte Konzentrationen / Ratio 260/280 bzw. Ratio 260/230.....	68
Tabelle 11 Colistin-Resistenzgene mit den jeweiligen Isolaten.	69

V. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
AE Puffer	Tris/HCl-Puffer
AMR	antimikrobielle Resistenz
Bp	Basenpaar
Ca ²⁺	Calcium
CM	zytoplasmatische Membran
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GC	Guanin Cytosin
HGT	Horizontaler Gentransfer
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L-Ara4N	4-Amino-4-desoxy-L-arabinose
LPS	Lipopolysaccharide
<i>M. pluranimalium</i>	<i>Moraxella pluranimalium</i>
MBp	Megabasenpaare
<i>mcr</i> -Gene	mobile Colistin-Resistenzgene
Mg ²⁺	Magnesium
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLSA	Multi-Locus-Sequenzanalyse
PEtN	Phosphoethanolamin
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SAM	Sequence Alignment/Map
spp.	Subspezies
SST	Meeresoberflächentemperatur
t	Tonnen

TCS	Two-component regulatory system
USA	United States of America
V.	<i>Vibrio</i>
WHO	World Health Organization

VI. Zusammenfassung

Vibrio spp. sind gramnegative Bakterien, die überwiegend in aquatischen und marinen Lebensräumen vorkommen. Sie umfassen >139 Spezies, von denen 12 Spezies als humanpathogen gelten. Diese unterschiedlichen pathogenen Spezies verursachen verschiedene Erkrankungen und sind vom Tier auf den Menschen übertragbar. Durch den Einsatz von Antibiotika steigt die Anzahl resistenter Bakterien rasant an. Im Jahr 2015 wurde erstmals ein Colistin-Resistenz-vermittelndes *mcr-1* Gen in einem *E. coli* identifiziert. Seither wurden rückblickend viele Isolate ermittelt, die *mcr*-Gene tragen (*mcr-1* bis *mcr-10*). Seit 2016 gilt Colistin als „*Critically Important Antimicrobial*“ und dient als „*Last Resort Antibiotica*“, daher ist die Bewertung von *mcr*-Genen sehr bedeutsam.

Ziel dieser Untersuchung war es, 67 *Vibrio*-Isolate auf das Vorhandensein von *mcr*-Genen zu untersuchen. Zu Beginn erfolgte eine Speziesidentifikation der Isolate mit Hilfe der MALDI-TOF MS und eine MHK-Analyse, um die MHK-Werte gegenüber Colistin zu ermitteln. Anschließend wurden die Isolate für die MiSeq-Sequenzierung vorbereitet. Dazu zählten die Verfahren der DNA-Extraktion und der Library Preparation, wobei in mehreren Schritten die Konzentrationen der DNA mittels Qubit und die DNA-Längen mit dem LabChip gemessen wurden. Nach der Sequenzierung folgte die bioinformatische Auswertung, durch die unter anderem die Sequenzauswertung, die Speziesidentifikation und die Auswertung von Resistenzgenen erfolgte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein *Vibrio*-Isolat mit einem *mcr*-Gen identifiziert werden; dieses trug zusätzlich die Resistenzgene *almG*, *eptA*, *lpxN* und *gspIEF*. Es handelt sich um ein *mcr-4* Gen in einem Plasmid, welches bisher nicht beschrieben ist. Das Plasmid trägt katalytische Domänen von Mobilitäts-Genen, die weder durch die NCBI-Datenbank noch durch andere Tools detektiert werden konnten. Folglich kann keine Risikoabschätzung bezüglich der Transferabilität des Plasmids erfolgen. Zusätzlich zu diesem Ergebnis konnten putative neue chromosomale Resistenzgene ermittelt werden, die eine hohe Ähnlichkeit zu den bisher bekannten *mcr*-Genen aufweisen. Eine weiterführende Analyse hinsichtlich des unbekanntes Plasmids und der möglichen neuen Resistenzgene erfolgt.

1. Einleitung

1.1 Allgemein

Vibrio sind Bakterien der Familie Vibrionaceae und umfassen eine genetische und metabolische Gruppe heterotropher Meeresbakterien (Takemura et al. 2014). In der Familie *Vibrionaceae* sind über 212 Arten beschrieben worden, die in über acht Gattungen unterteilt werden. Dazu gehören *Aliivibrio*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listionella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* und *Vibrio* (Dikow 2011). Die Gattung *Vibrio* umfasst mehr als 139 Arten, von denen einige Arten, insbesondere *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* im Bereich der Aquakultur pathogen bedeutsam sind und aufgrund ihres zoonotischen Potentials humanpathogen relevant sind (Baker-Austin 2018; CLSI 2020).

Vibrio spp. sind fermentative, fakultativ anaerobe, gramnegative Bakterien. Sie sind gerade oder gekrümmte Stäbchenbakterien mit einer Breite von 0,5 bis 0,8 µm und einer Länge von 1,5 µm bis 3,0 µm. Sie verfügen über polare, überwiegend monotriche Geißeln (Möller et al. 2021). Je nach Art variieren *Vibrio* spp. hinsichtlich ihrer Temperaturanforderungen, meist liegt der Wachstumbereich bei 4 °C bis 40 °C (Farmer et al. 2015). Besonders zeichnen sich *Vibrio* spp. durch ihre Beweglichkeit und ihre halophile- und alkaliphile Toleranz aus. Bakterien der Gattung *Vibrio* sind mesophil und bevorzugen gemäßigte Klimazonen, insbesondere in Salz- und Brackwasser. Der natürliche Lebensraum von *Vibrio* spp. liegt in aquatischen Umgebungen, sie sind in Flussmündungen, marinen Küstengewässern und Aquakulturmgebungen weit verbreitet (Baker-Austin 2018). Meeresorganismen, die häufig von *Vibrio* spp. befallen werden, sind z.B. Korallen, Fische, Weichtiere, Seegras, Schwämme, Garnelen, Tintenfische und Zooplankton (Takemura et al. 2014).

Der erste dokumentierte Krankheitsausbruch beim Menschen mit *Vibrio cholera* ereignete sich im Jahr 1817 in Indien. In den 1850er Jahren folgten dann Ausbrüche in europäischen Länder bis hin zum Nahen Osten und Nordamerika. John Snow, ein bekannter Anästhesist, entwickelte im Jahr 1854 die Theorie, dass Cholera durch kontaminierte Nahrung oder auch durch kontaminiertes Wasser übertragen werden könnte. Allerdings konnte er seine Theorie nicht beweisen. Schließlich entdeckte im selben Jahr Filippo Pacini, ein bekannter Anatom, den Erreger der Cholera. Er

untersuchte die Fäkalien und die Darmschleimhaut von infizierten Patienten und identifizierte Elemente, die er als Vibrationen bezeichnete. Pacini beschrieb die Krankheit einhergehend mit massivem Flüssigkeits- und Elektrolytverlust, erzeugt durch die lokale Einwirkung des Erregers auf die Darmschleimhaut (Carboni 2021). *Vibrio* spp. sind auch bedeutende marine Erreger, die bei vielen Fischarten eine hohe Morbidität und Mortalität verursachen. Infizierte Fische können an Nekrosen von Haut und Gliedmaßen leiden, weiterhin kommt es u.a. zu Fehlbildungen des Körpers, verzögertem Wachstum und Erblindung (Ina-Salwany et al. 2019). Einige *Vibrio* spp. können aufgrund ihres großen zoonotischen Potentials bei Menschen schwerwiegende bis tödliche Krankheitsverläufe verursachen. Menschen, die durch *Vibrio* spp. erkranken, können an gastrointestinalen Symptomen, Hautinfektionen bis hin zu einer primären Sepsis leiden (West 1989; Baker-Austin 2018).

1.2 Epidemiologie der Vibrionen

In den letzten Jahren ist eine starke Zunahme der Infektionen mit pathogenen *Vibrio* spp. weltweit zu verzeichnen. Ausgangspunkt für die steigenden Inzidenzen können ansteigende Oberflächentemperaturen in den marinen Lebensräumen, eine Häufung von Extremtemperaturereignissen und Änderungen in den Salzgehalten der Meeres- und Flussmündungsumgebungen sein (Baker-Austin et al. 2013).

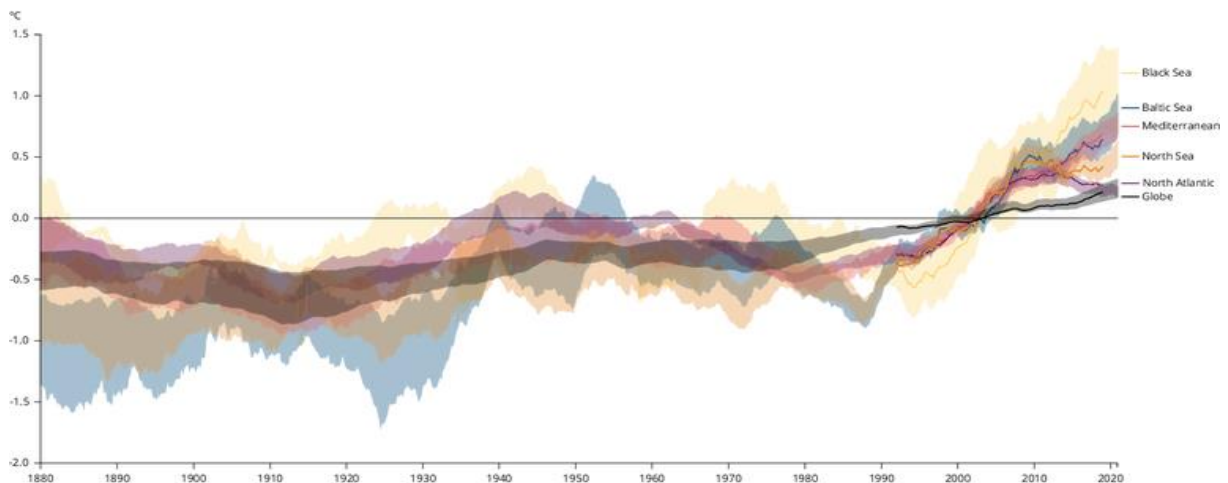


Abbildung 1 Anomalie der durchschnittlichen Oberflächentemperaturen in verschiedenen europäischen Meeren von 1870 bis 2020. (European Environment Agency 2022)

Der Anstieg der Meeresoberflächentemperatur (*sea surface temperature*; SST) zählt zu den Auswirkungen des Klimawandels. Diese Veränderung beeinflusst das Leben und die Verbreitung von Meeresorganismen und wirkt sich ebenfalls auf das Wachstum verschiedener Bakterien aus. Die SST stieg zwischen 1982 und 2018 im

Nordatlantik um 0,3 °C pro Jahrzehnt und im Schwarzen Meer um etwa 0,6 °C pro Jahrzehnt. Seit Ende der 1970er Jahre stiegen die Temperaturen aller fünf europäischen Meere, insbesondere im Bereich der Nordsee- und Ostseeküste (European Environment Agency 2022).

In den letzten Jahren haben höhere SST's zu einem starken Anstieg von *Vibrio*-Infektionen entlang der Ostsee- und Nordseeküste geführt. Im Sommer 2014 wurden in Schweden und in Finnland 89 Humaninfektionen gemeldet. In vielen Studien wurde bereits beschrieben, dass die Ökologie von *Vibrio* spp. individuell und sehr komplex ist und durch biotische und abiotische Umweltfaktoren, wie beispielsweise der Wassertemperatur und der Salinität, beeinflusst wird (Brehm et al. 2021).

Im Jahr 2012 wurden in Zusammenarbeit mit den lokalen Gesundheitsbehörden, dem Niedersächsischen Landesgesundheitsamt und dem Landesinstitut für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern zwei unabhängige Überwachungsstudien an der Ostsee- und Nordseeküste durchgeführt. Ziel der beiden Studien war es, die jahreszeitlichen Schwankungen von *Vibrio* spp. in Abhängigkeit von Umweltparametern zu untersuchen, um Auslöser für die Vermehrung von *Vibrio* spp. zu ermitteln. *Vibrio alginolyticus* war die am häufigsten vorkommende *Vibrio*-Spezies in den Nordseeproben, gefolgt von *Vibrio parahaemolyticus*. Die Spezies *Vibrio vulnificus* war erst ab einer Wassertemperatur von 20 °C nachweisbar. Weniger präsent an den Nordseeküsten war *Vibrio cholerae*. In den Ostseeproben waren, im Vergleich zu den Nordseeproben, *Vibrio alginolyticus* und *Vibrio parahaemolyticus* eher in geringerem Maße vorhanden. *Vibrio cholerae* war die am häufigsten vorkommende *Vibrio* spp. an den Ostseeküsten, gefolgt von *Vibrio vulnificus*. *Vibrio cholerae* wurde häufiger in Proben aus dem Darß-Zingster Bodden nachgewiesen und *Vibrio vulnificus* am Greifswalder Bodden (Brennholt et al. 2014).

Eine Aussage über weltweite Fallzahlen humanpathogener *Vibrio* spp.-Vorkommen gestaltet sich schwierig, da Einschränkungen in bestehenden Überwachungssystemen, unzureichende oder nicht vorhandene Meldungen von Infektionen und Unterschiede in den internationalen Meldeverfahren bestehen. Im Zeitraum von 2002 bis 2019 wurden dem RKI (Robert-Koch-Institut) in Deutschland jährlich 0 bis 20 Vibriose-Fälle übermittelt. Seit 2020 ist Vibriose in Deutschland meldepflichtig, wobei im Jahr 2020 13 Infektionen gemeldet wurden (Robert-Koch-

Institut 2020). Bekannt ist, dass bestimmte *Vibrio* spp. in einigen Regionen häufiger vorkommen als in anderen Regionen. Das Vorkommen von *V. cholerae* in Industrieländern ist seltener als in Entwicklungsländern und stellt dort teilweise eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität dar. Betroffen sind Länder in Asien, Afrika und Lateinamerika. Ursachen hierfür sind z.B. mangelhafte sanitäre Einrichtungen und ein beschränkter Zugang zu sauberem Trinkwasser. In den Industrieländern sind andere *V. spp.* vorherrschend, aufgrund von steigenden SSTs nimmt auch hier die Anzahl an Vibriose-Ausbrüchen zu. In den USA sind Infektionen mit *Vibrio* spp. seit 2007 in allen Bundesstaaten meldepflichtig. Die jährliche Vibriose-Inzidenz hat von 1996 bis 2010 stark zugenommen. Von 7700 Fällen waren *V. parahaemolyticus* (44,9 %), *V. vulnificus* (18,8 %) und *V. alginolyticus* (11,5 %), die am häufigsten gemeldeten Spezies in den USA (Newton et al. 2012).

1.3 *Vibrio* Subspezies

Mehr als 139 verschiedene *Vibrio*-Spezies sind bekannt, von denen 12 als humanpathogen gelten. Einige Spezies verfügen über ein hohes zoonotisches Potential, sodass sie sowohl beim Tier als auch beim Mensch verschiedene Erkrankungen verursachen können und vom Tier auf den Menschen übertragbar sind (Baker-Austin 2018).

Laut (Venkateswaran et al. 1998) zählen *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela*), *V. salmonicida*, *V. carchariae*, *V. pectenocida* und *V. scopthalmi* zu den fischpathogenen Erregern einer Vibriose. Im Laufe der Jahre wurden dem Spektrum weitere hinzugezählt, darunter *V. harveyi*, *V. marinus*, *V. furnissii*, *V. mimicus*, *V. pelagius*, *V. splendidus* und *V. tapetis* (Jun und Woo 2003).

V. anguillarum ist das am häufigsten vorkommende fischpathogene Bakterium und ist für die meisten Fischverluste weltweit verantwortlich (Jun und Woo 2003). Diese Spezies wurde bei mehr als 40 Fischarten identifiziert, sowohl bei Wildfängen als auch bei Zuchtfischen. Die Spezies *V. alginolyticus* verursacht bei den meisten Fischarten schwere Erkrankungen mit massiver Mortalität. Allerdings variieren die virulenten Eigenschaften von *V. alginolyticus* von Art zu Art, auch innerhalb der Fischarten kann die Erkrankung unterschiedlich ausgeprägt sein. Einem Bericht zufolge sind *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii*,

V. anguillarum und *V. campbellii* die am häufigsten vorkommenden Arten, die gezüchtete Wasserorganismen infizieren können (Amalina et al. 2019).

Infizierte Fische können je nach Erreger unterschiedlich schwer erkranken. Meist weisen die erkrankten Fische einer Fischart jedoch ähnliche klinische Symptome auf. So zeigen sich bei einer frühen Vibriose-Infektion eher unspezifische Anzeichen, wie eine dunklere Körperfärbung, Glotzaugen, Appetitlosigkeit und ungewöhnliches Schwimmverhalten nah an der Wasseroberfläche. Fische mit fortgeschrittenem Infektionsgeschehen weisen Hautgeschwüre, Blutungen am Körper und gangränöse Körperteile (Flossenfäule) auf (Jun und Woo 2003).

Auch humanpathogene Infektionen haben im Laufe der Jahre zugenommen. Ein Anstieg der gemeldeten Vibrio-Infektionen findet sich in Nordeuropa (Baker-Austin et al. 2016), im Atlantik (Semenza et al. 2017), im Pazifischen Nordwesten (Watts et al. 2019) und Südostchina (Li et al. 2014) wieder. Laut einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2021 (Trinanes und Martinez-Urtaza 2021) konnten ca. eine halbe Millionen Fälle weltweit im Jahr 2020 registriert werden. Dazu gehören Infektionen v.a. mit *V. campbellii*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus*. Die Spezies *V. cholerae* gilt weltweit als der am häufigsten auslösende Erreger einer humanen Vibrio-Infektion, gefolgt von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus*. Diese drei Spezies sind weltweit die Hauptursache für lebensmittelbedingte Vibrio-Infektionen beim Menschen. Die Infektionen treten beim Verzehr von kontaminiertem rohen und ungekochten Schalentieren und Fischen auf. In einigen Fällen kam es auch zum Nachweis des Erregers in kontaminiertem Trinkwasser (*V. cholerae*) (Elhadi 2013).

Je nach Erreger können sich die Krankheitsverläufe sehr unterscheiden. *V. cholerae* und auch *V. parahaemolyticus* verursachen akute gastrointestinale Symptome, die lebensbedrohlich sein können. Die Spezies *V. vulnificus* kann schwere und sogar tödliche Infektionen auslösen. Sie ist symptomatisch von den zuvor erwähnten Spezies abzugrenzen, da infizierte Personen an Hautinfektionen und primärer Sepsis erkranken können. Die Spezies *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* und *V. alginolyticus* verfügen ebenfalls über ein humanpathogenes Potenzial, jedoch verursachen diese Spezies weniger schwere Krankheitsverläufe (Baker-Austin 2018).

1.4 Genomaufbau und Phylogenie

Vibrio gehören der 16S rRNA-Sequenzanalyse nach zu den γ -Proteobakterien. Sie verfügen über zwei ringgeschlossene Chromosomen ($\approx 3,3$ Mb und $\approx 1,9$ Mb) mit einer genetischen Diversität, die durch Rekombination und horizontalen Gentransfer (HGT) bestimmt ist. *Vibrio* spp. haben eine Genomgröße von 4,03-6,17 Megabasenpaaren (Mbp) und besitzen 3700-5900 Gene. Bestimmte Gene kodieren für essentielle Zellfunktionen, wie z.B. DNA-Replikation, Transkription, Translation und Zellwandbiosynthese. Weiterhin ist bekannt, dass die Pathogenitätsfaktoren, wie z.B. Toxin codierende Gene, Oberflächenantigene und Adhäsine sich auf dem großen Chromosom befinden. Im Vergleich zu dem großen Chromosom enthält das kleine Chromosom einen höheren Anteil an hypothetischen Genen mit bisher unbekannt Funktionen. Der GC-Gehalt (Anzahl an Cytosin- und Guaninbasen) der unterschiedlichen *Vibrio* spp. schwankt zwischen 44 % und 51 %. Dieser Gehalt gibt Auskunft über die Artenidentität (Tagomori et al. 2002; Thompson et al. 2005).

Die über 139 beschriebenen Spezies der Gattung *Vibrio* werden in sog. Kladen eingeteilt. Diese Kladen sind Anordnungen von sehr eng verwandten *Vibrio*-Spezies, die sehr große Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer genetischen und phänotypischen Signatur aufweisen. Insgesamt gibt es 20 Kladen, darunter zählen die *Mediterranei*, *Porteresiae*, *Pectenocida*, *Phosphoreum*, *Profundum*, *Rosenbergii*, *Rumoiensis*, *Damselae*, *Tapetis*, *Proteolyticus*, *Cholerae*, *Fischeri*, *Gazogenes*, *Haliotocoli*, *Harveyi*, *Vulnificus*, *Orientalis*, *Scophthalmi*, *Splendidus* und *Salinivibrio-Grimontia-Enterovibrio* (Ke et al. 2017).

Insbesondere die human- und fischpathogenen Kladen sind bedeutsam, dazu zählen die *Cholerae*-Klade, die *Vulnificus*-Klade und die *Harveyi*-Klade. Die *Cholerae*-Klade umfasst die Arten *V. cincinnatiensis*, *V. cholerae*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. parilis* und *V. metoecus*. Für die *Vulnificus*-Klade ist bekannt, dass die Arten sehr eng miteinander verwandt sind, was darauf hindeuten kann, dass die genetische Vielfalt innerhalb der Spezies sehr begrenzt ist. Diese Klade umfasst *V. vulnificus* und *V. navarrensis* (Boyd et al. 2015; Islam et al. 2022).

Zur *Harveyi*-Klade zählen *V. harveyi* und seine eng verwandten Arten (*V. campbellii*, *V. owensii*, *V. jasicida*, *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. communies*, *V. mytili*, *V. natriegiens*, *V. parahaemolyticus* und *V. rotiferianus*), die eine Übereinstimmung

von 86,7 % bis 96,0 % in einer 8-Gen-Multilocus-Sequenz-Analyse aufweisen. In der Vergangenheit kam es häufig zu Fehlklassifizierungen von *V. campbellii* und *V. harveyi*. Beide Spezies haben eine DNA-Sequenzidentität von 61 % bis 74 % und in ihrer 16S rDNA-Sequenzen eine Übereinstimmung von 97 %. *Vibrio* spp. sind in der Klade mit polyphasischer Taxonomie schwer zu klassifizieren; die Verwendung von genomischen Daten ist hierbei erforderlich (Sawabe et al. 2013). Die polyphasische Taxonomie ist die Charakterisierung und Bewertung einer Spezies aus einer 16S rRNA-Sequenzanalyse anhand von phäno- und genotypischen Merkmalen (Raina et al. 2019).

1.5 Antibiotikaresistenz

Die antimikrobielle Resistenz (AMR) ist ein sowohl klinisches als auch sozioökonomisches Problem in der öffentlichen Gesundheit und stellt eine wachsende Bedrohung in der Human- und Veterinärmedizin dar. Weltweit sind antibiotikaresistente Infektionen für eine jährliche Mortalität von mindestens 700.000 Menschen verantwortlich. Der Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin ist für die Entwicklung und Verbreitung verschiedener erworbener bakterieller Resistenzmechanismen verantwortlich (Tagliabue und Rappuoli 2018). In Deutschland werden jährlich 600 t bis 700 t Antibiotika in der Humanmedizin eingesetzt (Umweltbundesamt 2018). In der Veterinärmedizin lag die Menge der abgegebenen Antibiotika im Jahr 2011 bei 1706 t, seitdem ist die Abgabe um 59 % gesunken. Allerdings ist der Wert im Jahr 2020 wieder leicht angestiegen, 701 t Antibiotika wurden an pharmazeutische Unternehmen und an Tierärzte abgegeben (BVL 2021).

In der Humanmedizin werden am häufigsten die β -Lactame eingesetzt, insbesondere die Wirkstoffgruppen der Penicilline, Aminopenicilline und Cephalosporine (ECDC 2016-2018). Die WHO hat eine dreistufige Klassifikation über die Wichtigkeit aller Antibiotika verabschiedet. Die „*Important Antimicrobials*“ (z.B. Aminocyclitol), die für die Allgemeinheit verfügbar sind, gefolgt von den „*Highly Important Antimicrobials*“ (z.B. (Fluor-)Chinolone), die nur für spezifische und begrenzte medizinische Maßnahmen empfohlen werden und schließlich die „*Critically Important Antimicrobials*“ (z.B. Polypeptid-Antibiotika), die nur zum Einsatz kommen, wenn die zwei anderen Alternativen nicht wirksam sind (WHO 2016). „*Critically Important Antimicrobials*“ sind besonders kritisch zu betrachten, da einige auch in der

Veterinärmedizin angewendet werden. Durch die zunehmende Nutzung dieser Antibiotika kann die Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten von Resistenzen steigen und stellt für die Human- und für die Veterinärmedizin ein bedeutendes Gesundheitsrisiko dar (Laxminarayan et al. 2013).

Laut (Schar et al. 2020) wird der globale Verbrauch von Antibiotika in der Aquakultur für das Jahr 2017 auf 10.259 t geschätzt. Die jährliche Nachfrage der globalen Aquakultur ist seit 2001 um 5,8 % gestiegen. Durch die steigende Besatzdichten und das zunehmende Auftreten von Krankheitserregern innerhalb der Aquakultur werden Antibiotika immer häufiger eingesetzt, das wiederum wirkt sich auf die AMR von aquatischen Bakterienpopulationen aus. Einige der in der Aquakultur eingesetzten Wirkstoffe (z.B. (Fluor-)Chinolone) wurden von der WHO als „*Highly Important Antimicrobials*“ klassifiziert (Schar et al. 2020).

Bakterien verfügen über eine umfassende genetische Plastizität, wodurch sie auf Antibiotikamoleküle reagieren können. Bei einer erwarteten Resistenz besitzen Bakterien eine natürliche Unempfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotika, da sie über spezielle Eigenschaften verfügen, z.B. die Bildung von β -Lactamasen. Besonders problematisch sind extrinsische Resistenzen, bei denen Bakterien zuvor empfindlich gegenüber Antibiotika waren, jedoch durch genetische Veränderungen Resistenzeigenschaften erwerben konnten. Resistenzen können durch genetische Veränderungen im Genom (Mutationen) entstehen oder durch den horizontalen Transfer von Resistenzgenen erworben werden. Der horizontale Gentransfer (HGT) ist die Übertragung genetischen Materials zwischen zwei Organismen, über sog. mobile genetische Elemente wie Plasmide, Transposons oder Bakteriophagen. Zu den bekannten Resistenzmechanismen zählen die antibiotische Modifikation, der Abbau des Antibiotikums durch Enzyme, Antibiotika-Effluxpumpen, Zielmodifikation und Bypass-Mechanismen (Peterson und Kaur 2018; Normark und Normark 2002; Davies und Davies 2010).

Die Selektion von resistenten Bakterien ist auf den Gebrauch von Antibiotika zurückzuführen. Daher steigt jährlich die Zahl resistenter Bakterien rapide an. Seit die ersten antibakteriellen Wirkstoffe in den 1930er Jahre eingeführt wurden, wurden zahlreiche weitere Wirkstoffklassen entdeckt (Davies und Davies 2010). Im Laufe der Jahre kam es zu einer Verbreitung von Mikroorganismen mit Resistenzen gegenüber den eingesetzten Antibiotika. Die Zeitspanne zwischen dem Inverkehrbringen eines

Wirkstoffs und der aufkommenden Resistenz ist von Wirkstoff zu Wirkstoff unterschiedlich. Beispielsweise wurden Resistenzen gegenüber Penicillin 10 Jahre nach Markteinführung festgestellt, gegenüber Methicillin trat dies bereits nach weniger als 5 Jahren ein (Clatworthy et al. 2007).

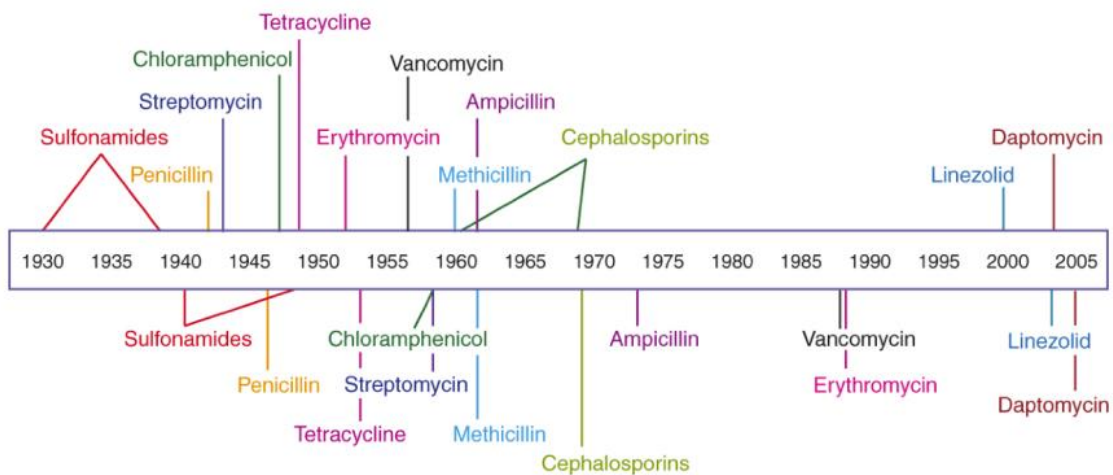


Abbildung 2 Zeitleiste der Markteinführung von Antibiotika und die Entstehung einer Antibiotikaresistenz.

Oberhalb der Leiste sind die Daten über die Einführung des jeweiligen Wirkstoffs aufgeführt und unterhalb der Leiste die Entstehung einer Resistenz gegen die jeweiligen Wirkstoffe. (Clatworthy et al. 2007)

Je nach Bakterium und eingesetztem Wirkstoff variieren die Resistenzraten unterschiedlich stark. Die epidemiologischen Grenzwerte hinsichtlich der MHK-Verteilungen für alle Wirkstoffe, in Abhängigkeit der jeweiligen Spezies, die in der Human- und Veterinärmedizin Anwendung finden, werden durch epidemiologische Cut-Off-Werte (ECOFF) für Wildtyp-Organismen (ohne phänotypische Resistenzmechanismen) und Nicht-Wildtyp-Organismen (erworbene Resistenz) vom Europäischen Komitee für Antibiotikaresistenztestung (EUCAST) bestimmt. Der Grenzwert für bspw. das Bakterium *E. coli* gegenüber Colistin liegt bei 2 µg/mL; für *Vibrio* spp. wurde kein Grenzwert bestimmt (BfR 2021; EUCAST 2022; Sjölund et al. 2009).

1.6 Colistin und Colistin-Resistenz

Colistin (auch Polymyxin E) zählt zur Wirkstoffklasse der Polymyxine. Colistin ist bakterizid und wirkt gegen die meisten gramnegativen Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae* durch Erhöhung der Zellmembranpermeabilität und Zerstörung der bakteriellen Zellmembran. Die Polymyxine A-E wurden seit 1947 aus verschiedenen Stämmen des *Bacillus polymyxa* isoliert. Die meisten erwiesen sich als zu toxisch für den therapeutischen Ansatz, sodass eine Weiterentwicklung einzig

für Polymyxin B und Colistin (Polymyxin E) stattfand. Anfang der 1950er Jahre wurde Colistin in Japan, gefolgt von Europa und den USA, in Form von Colistinmethat-Natrium eingesetzt. In den 1980er Jahren wurde der Einsatz des Antibiotikums in einigen Teilen der Welt gestoppt, da von erhöhten Fällen von Nephrotoxizität berichtet wurde. Daraufhin wurde beschlossen, die Behandlung mit Colistinmethat-Natrium auf Lungeninfektionen, die durch resistente gramnegative Bakterien hervorgerufen werden, zu beschränken. Durch das vermehrte Auftreten von AMR wurde das Antibiotikum wieder als therapeutische Alternative in Betracht gezogen (Hamel et al. 2021; Falagas und Kasiakou 2005). Die WHO hat Colistin als „*Critically Important Antimicrobial*“ klassifiziert und es dient als „*Last Resort Antibiotica*“ (WHO 2016).

Colistin ist eine Mischung aus zwei zyklischen Polypeptiden, Colistin A und B. Das Antibiotikum verfügt im Molekül über eine Aminosäurekomponente, welche D-Leucin, L-Threonin und L- α - γ -Diaminobuttersäure beinhaltet. Die L- α - γ -Diaminobuttersäure ist mit dem Fettsäurerest 6-Methyloctansäure bzw. 6-Methylheptansäure verknüpft, die in Colistin A bzw. in Colistin B vorkommen. Weiterhin besteht Colistin aus hydrophoben Regionen, die über N-terminale verfügen und hydrophilen Regionen, die drei oder vier kationische Aminosäuren besitzen. Diese bilden amphiphile Oberflächen, die detergenzähnliche Wechselwirkungen mit bakteriellen Membranen eingehen und eine antimikrobielle Wirkung entwickeln. Die Moleküle der anionischen Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterienmembranen interagieren mit den kationischen Polypeptiden. Colistin wirkt mit dem Endotoxin Lipid A von LPS, welches negativ geladen ist und durch zwei Kationen (Magnesium (Mg^{2+}) und Calcium (Ca^{2+})) stabilisiert wird (1). Die beiden Elemente werden von Colistin verdrängt, dadurch kommt es zu einer Permeabilität der äußeren Zellmembran und Colistin erreicht die innere Membran (2,3). Es kommt zur Störung der Integrität der zytosplasmatischen Membran, somit zum Austritt von intrazellulären Inhalten und schließlich zum Zelltod (4,5) (Falagas und Kasiakou 2005; Hamel et al. 2021; Mutasim Elimam et al. 2015; Bialvaei und Samadi Kafil 2015).

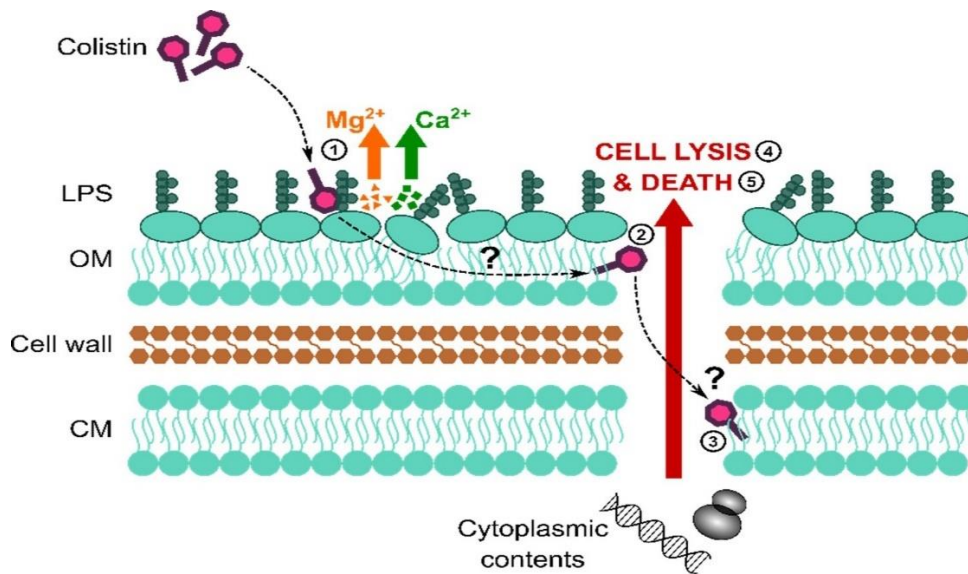


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Wirkung Colistins.

Das Polypeptid wirkt auf LPS sowohl in der äußeren als auch in der cytoplasmatischen Membran (CM), was zur Zerstörung der Zellhülle und zum Zelltod führt. (Sabnis et al. 2021)

Colistin wird in der Humanmedizin bei Infektionen, die durch gramnegative Bakterien wie z.B. *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* verursacht werden, eingesetzt. Besonders bei Magen-Darm-Infektionen bei Menschen und auch Tieren findet das „Critically Important Antimicrobial“ eine vermehrte Anwendung.

Eine Colistin-Resistenz kann von gramnegativen Bakterien durch chromosomale Mutationen oder Anpassungsmechanismen, die mit der Modifikation des Lipid A zusammenhängen, entwickelt werden. Die Resistenz ist auf eine verringerte Bindung an die äußere Membran aufgrund einer Lipopolysaccharid-Umgestaltung zurückzuführen. Diese wird durch Veränderungen der Zweikomponenten-Regulationssysteme (PhoPQ und PmrAB = TCS) verursacht und führt zu einem weniger anionischen Lipid A. Meist werden die Resistenzen durch die Addition der Phosphatgruppen 4-Amino-4-desoxy-L-arabinose (L-Ara4N) und Phosphoethanolamin (PEtN) erreicht, dadurch können negative Ladungen verändert werden und es kommt zu einer Verringerung der Affinität von LPS. Durch unterschiedliche Mutationen ist eine Steigerung der Transkription von PmrAB und PhoPC möglich. Das verursacht die Veränderung der LPS und eine Verringerung seiner negativen Ladung. Weitere Mechanismen sind die Überexpression von Efflux-Pumpen-Systemen und die Überproduktion von Kapselpolysacchariden (Hamel et al. 2021; Bialvaei und Samadi Kafil 2015). Bisher wurde ein plasmidaler

Resistenzmechanismus als übertragbarer Mechanismus identifiziert, welches als sog. *mcr*-Gen bezeichnet wird.

Verschiedene Gene und Operons, die zur Codierung von Enzymen dienen, sind an der Modifikation von LPS beteiligt. Dazu gehören die *pmrC*- und *pmr*-Gene, das *pmrHFIJKLM*-Operon, die TCSs, das *mgrB*-Gen und die *mcr*-Gene. Im Jahr 2015 wurde erstmals ein mobiles Colistin-Resistenzgen (*mcr*-Gen) identifiziert, welches bei vielen gramnegativen Bakterien eine Colistin-Resistenz hervorruft. *mcr*-Gene sind plasmid-vermittelte Resistenzgene, welche bei Bakterien aus Tieren und Menschen identifiziert wurden (Liu et al. 2016). Das Auftreten von *mcr*-Genen wurde in unterschiedlichen Ländern nachgewiesen und stellt für die öffentliche Gesundheit eine ernsthafte Bedrohung dar. Im Laufe der Jahre wurden weitere *mcr*-Gene (*mcr*-1 bis *mcr*-10) in *Enterobacteriaceae* entdeckt (Sabnis et al. 2021). Plasmide, die das *mcr*-Gen tragen, können auch andere Gene tragen, die zu einer AMR beitragen. Das *mcr*-Gen wurde z.B. in gramnegativen Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* identifiziert, die über Carbapenemase-Gene verfügen, wie *bla*_{NDM5}, *bla*_{NDM9}, *bla*_{OXA48}, *bla*_{KPC2} und *bla*_{VIM1} (Aghapour et al. 2019).

Gene	Year	Country	Bacteria	Sample origin
MCR-1	2016	China	<i>E. coli</i>	Animal, Human, Food
MCR-2	2016	Belgium	<i>E. coli</i>	Animal
MCR-3	2017	China	<i>E. coli</i>	Animal
MCR-4	2017	Italy, Spain and Belgium	<i>E. coli, Salmonella</i>	Animal
MCR-5	2017	Germany	<i>Salmonella</i>	Animal, Food
MCR-6	2017	UK	<i>M. pluranimalium</i>	Animal
MCR-7.1	2018	China	<i>K. pneumoniae</i>	Animal
MCR-8	2018	China	<i>K. pneumoniae</i>	Animal
MCR-9	2019	USA	<i>S. Typhimurium</i>	Human

Abbildung 4 Identifikationen von *mcr*-Genen

Abbildung zzgl. des Jahres, des jeweiligen Landes, der Spezies und des Isolats (Mensch, Tier oder Nahrungsmittel). (ND= nicht definiert), (*E. coli*=*Escherichia coli*, *M. pluranimalium*=*Moraxella pluranimalium*, *K. pneumoniae*=*Klebsiella pneumoniae*, *S. Typhimurium*=*Salmonella typhimurium*) (Gharaibeh und Shatnawi 2019)

Weltweit sind *mcr*-Gene in unterschiedlichen Bakterienisolaten, wie *E. coli*, *M. pluranimalium*, *K. pneumoniae* und *S. typhimurium*, vertreten und finden sich ubiquitär in Mensch, Tier und in Nahrungsmitteln (Gharaibeh und Shatnawi 2019).

1.7 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist, das Vorhandensein von *mcr*-Genen in *Vibrio*-Isolaten durch phäno- und genotypische Charakterisierungen zu ermitteln. Die Untersuchungen wurden in zwei Bereiche aufgeteilt, die mikrobiologische und die molekularbiologische Ebene. Die Bakterienisolate wurden im Rahmen des nationalen Resistenzmonitorings tierpathogener Bakterien (GERM-Vet) in den Jahren 2007 bis 2010 aus Nutz- und Zierfischen sowie aus Zierfischen einer Studie der Jahre 2015/16 isoliert. Die GERM-Vet- und Zierfisch-Isolate stammen von unterschiedlichen Fischarten aus verschiedenen Regionen innerhalb Deutschlands.

Die Bedeutung und Identifizierung von den *mcr*-Genen ist sehr wichtig für die öffentliche Gesundheit, da die Zahl resistenter Bakterienstämme rapide zunimmt. Colistin zählt zu den „*Critically Important Antimicrobials*“ und verliert aufgrund von neu auftretender Resistenzen langsam an Wirksamkeit. Um die therapeutische Wirksamkeit sowohl im human- als auch im veterinärmedizinischen Sektor weiterhin gewährleisten zu können, ist das Monitoring von *mcr*-Genen sehr bedeutsam.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Bakterienisolate

Spezies	BVL-Nr.	Stamm-ID	Herkunft	Fischart
GERM-Vet-Isolate				
<i>V. spp.</i>	1912	FB 14/07	Uetze	Wolfsbarsch
<i>V. spp.</i>	1921	FB 25-0/07	Hannover	Zierfisch
<i>V. spp.</i>	2281	B2683/Fi 29	Bad Frankenhausen	Nutzfisch
<i>V. fluvialis</i>	2676	95978-2	Berlin	Fisch
<i>V. vulnificus</i>	2677	95978-3	Berlin	Fisch
<i>V. spp.</i>	2939	FB 154-2/07	Hamburg	Makrele
<i>V. spp.</i>	2940	FB 156-2/07	Glandorf	Koi
<i>V. spp.</i>	2970	FB 154-1/07	Hamburg	Makrele
<i>V. spp.</i>	2977	FB 129-2/07	Hannover	Zierfisch
<i>V. alginolyticus</i>	3118	01.03.2728	Gießen	Forelle
<i>V. alginolyticus</i>	3177	91901/3	Berlin	Fisch
<i>V. vulnificus</i>	3178	91900/1	Berlin	Fisch
<i>V. spp.</i>	3316	P875-1	Sparrieshoop	Koi
<i>V. spp.</i>	3858	4092	Frankfurt	Kugelfisch
<i>V. spp.</i>	3955	FB 319-3/07	Glandorf	Koi
<i>V. parahaemolyticus</i>	81354	FB 68-1/08	Hannover	Skalar
<i>V. spp.</i>	80452	FB 7-1/08	Hannover	Zierfisch
<i>V. vulnificus</i>	81355	FB 101-1/08	Hamburg	Rochen
<i>V. vulnificus</i>	82817	92829-1	Berlin	Fisch
<i>V. cholerae</i>	92042	T209 92127-4	Berlin	Koi
<i>V. parahaemolyticus</i>	92255	T209 92246-4	Berlin	Zierfisch
<i>V. spp.</i>	92194	FB 97-1/09	Wadersloh	Koi
<i>V. vulnificus</i>	92260	T209-92333-6	Berlin	Füsilier
<i>V. spp.</i>	102906	3553	Frankfurt	Zierfisch
<i>V. alginolyticus</i>	113497	3798	Unbekannt	Steinfisch
<i>V. spp.</i>	F240	3798	Unbekannt	Fisch
Zierfisch-Isolate				
<i>V. vulnificus</i>	P-15-039	1	Deutschland	Doktorfisch
<i>V. spp.</i>	P-15-040	2	Deutschland	Zwergkaiserfisch
<i>V. vulnificus</i>	P-15-112	49	Deutschland	Gitterdoktorfisch
<i>V. vulnificus</i>	P-15-113	50	Deutschland	Gitterdoktorfisch

V. spp.	P-15-137 I	74	Deutschland	Kugelfisch
V. spp.	P-15-147 II	84	Deutschland	Fuchsgesicht
V. spp.	P-15-148 II	85	Deutschland	Doktorfisch
V. spp.	P-15-154 III	92	Deutschland	Harnischwels
V. spp	P-15-159 I	87	Deutschland	Zwerglippfisch
V. spp	P-15-216 III	128	Deutschland	Antennenwels
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-223	135	Deutschland	Kardinalbarsch
<i>V. harveyi</i>	P-15-277 II	140	Deutschland	Schwalbenschwanz
V. spp.	P-15-281 II	144	Deutschland	Fransenlipper
V. spp.	P-15-326 b	189	Deutschland	Prachtschwertgrun del
<i>V. fluviialis</i>	P-15-327 c	190	Deutschland	Lippfisch
V. spp.	P-15-328 c	191	Deutschland	Fahnenbarsch
V. spp.	P-15-330 c	193	Deutschland	Schwalbenschwanz
V. spp	P-15-331 b	194	Deutschland	Riffbarsch
V. spp.	P-15-332 c	195	Deutschland	Riffbarsch
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-335 c	198	Deutschland	Schwalbenschwanz
<i>V. vulnificus</i>	P-15-339 c	202	Deutschland	Schwalbenschwanz
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-339 d	202	Deutschland	Schwalbenschwanz
<i>V. vulnificus</i>	P-15-341 b	204	Deutschland	Schwalbenschwanz
<i>V. vulnificus</i>	P-15-342 a	205	Deutschland	Kaiserfisch
V. spp.	P-15-343 b	206	Deutschland	Riffbarsch
<i>V. vulnificus</i>	P-15-344 b	207	Deutschland	Schwalbenschwanz
V. spp.	P-15-344 c	207	Deutschland	Schwalbenschwanz
<i>V. vulnificus</i>	P-15-345 b	208	Deutschland	Schwalbenschwanz
V. spp.	P-15-346 a	209	Deutschland	Schwalbenschwanz
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-347 b	210	Deutschland	Fahnenbarsch
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-348 d	211	Deutschland	Zwerglippfisch
<i>V. harveyi</i>	P-15-374 a	237	Deutschland	Fahnenbarsch
<i>V. harveyi</i>	P-15-375 a	238	Deutschland	Schwalbenschwanz
V. spp.	P-15-376 a	239	Deutschland	Doktorfisch
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-386 a	249	Deutschland	gelber Seebader
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-409 III	272	Deutschland	Schwalbenschwanz
V. spp.	P-15-412 II	275	Deutschland	Lippfisch
V. spp.	P-15-478 II	325	Deutschland	Kugelfisch
<i>V. alginolyticus</i>	P-15-154	473	Deutschland	Drückerfisch

2.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien.

Chemikalien/Lösungen	Hersteller
0,9 % Natriumchlorid-Lösung (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Brain Heart Infusion (BHI) Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Columbia-Agar mit 5 % Schafblut	BioMerieux, Nürtingen, Deutschland
Ethanol absolut (EtOH)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
HCCA Matrix (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Kationen-supplementierte Müller-Hinton II-Bouillon	MCS Diagnostics, Swalmen, Niederlande
Nuklease-freies Wasser, DEPC-behandelt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasser	Milli-Q-Anlage
Standardlösungsmittel (475 μ l HPLC Wasser + 25 μ l TFA + 500 μ l ACN)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris-HCl 1mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.3 Geräte

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller
Autoinokulator, Sensititre AIM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Densitometer	BioMerieux, Nürtingen, Deutschland
Inkubator 1000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
LabChip® GX Touch HT	PerkinElmer, Waltham, USA
MALDI Biotyper® System	Bruker, Berlin, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MiSeq Benchtop Sequencer	Illumina, San Diego, USA
Mixing Block MB-102	BLoer, Hangzhou, China
Qubit™ 4 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank HeraSafe 2030i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterimax smart	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Vizion Ableseeinheit	TREK Diagnostic Systems, East Grinstead, UK
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Applikationsstäbchen	Neolab, Heiderlberg, Deutschland
DNA Extended Range LabChip HiSense	PerkinElmer, Waltham, USA
Einmal-Impfösen	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland
Kryoröhrchen	
Mikrotiterplatten	MCS Diagnostics, Swalmen, Niederlande
Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Platte	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Reaktionsstreifen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,3 ml / 1,5 ml / 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Targetplatte	Bruker, Berlin, Deutschland
Variable Kolbenhubpipetten (1 µl bis 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.5 Reaktionskits

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Reaktionskits.

Kit-Systeme	Hersteller
DNA High Sensitivity Reagent Kit	Perkin Elmer, Waltham, USA
DNeasy® Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland
IDT® for Illumina Nextera DNA Unique Dual Indexes	Illumina, San Diego, USA
Illumina DNA Prep	Illumina, San Diego, USA
Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.6 Enzyme

Tabelle 6 Übersicht der verwendeten Enzyme.

Enzyme	Hersteller
Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase A	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.8 Computerprogramme

Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Computerprogramme.

Anwendung	Programme	Hersteller
Auswertung der MHK	<i>SWIN</i>	Thermo Scientific, Version
Auswertung der Taxonomie	<i>TYGS</i>	Leibniz-Institut DSMZ, Version 326
Verwaltung phylogenetischer Bäume	<i>I-TOL</i>	I-TOL, Version 6.5.2
Auswertung von Resistenzgenen	<i>BakCharak</i>	Bundesinstitut für Risikobewertung, Version
Sequenzauswertung	<i>Aquamis</i>	Bundesinstitut für Risikobewertung, Version
MALDI-Auswertung	<i>Biotyper</i>	Bruker
Sequenzanalyse	<i>Geneious</i>	Biomatters, Inc., Version 2021.2.2

3. Methoden

3.1 Mikrobiologischer Methodenteil

3.1.1 Stammhaltung

Die 67 *Vibrio*-Isolate wurden standardmäßig auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen und bei 28 °C für 24-28 h inkubiert. Die kurzfristige Aufbewahrung der *Vibrio*-Stämme auf den Blutagarplatten erfolgte bei 4 °C. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C in Kryoröhrchen.

3.1.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) erlaubt eine Einschätzung der Empfindlichkeitslage einer Bakterienpopulation. Hierbei wird der MHK_{90} -Wert als die Wirkstoffkonzentration definiert, bei der 90 % der getesteten Bakterienpopulation absterben bzw. in ihrem Wachstum gehemmt werden. Das Verfahren der MHK wird bei der Bestimmung mikrobieller Antibiotika-Resistenzen angewandt (Andrews 2001). Im Zuge dieser Arbeit wurde die Empfindlichkeit der ausgewählten Bakterienisolate gegenüber 24 verschiedenen antibakteriellen Wirkstoffen mit der Bouillon-Mikrodilutionsmethode überprüft (s. Anhang).

Die Reaktivierung der *Vibrio*-Isolate erfolgte bei 28 °C für 24-28 h. Für die MHK-Bestimmung wurden ausschließlich Reinkulturen verwendet. Einzelne Bakterienkolonien des jeweiligen Isolats wurden in 5 ml NaCl-Lösung (0,9 %) bis zur Einstellung eines McFarland-Werts (Trübungswert) bei 0,5 resuspendiert. Das resultierende Inokulum wurde mit einem Anteil von 55 µl in Müller-Hinton-Bouillon (11 ml) supplementiert. Mit dieser Suspension erfolgte die Beschickung der Mikrotiterplatten mithilfe des Sensititre Autoinokulators (50 µl Bakteriensuspension / Kavität). Die Mikrotiterplatten wurden mit einer Folie verschlossen und anschließend bei 28 °C für 24-28 h inkubiert. Die Auswertung der MHK-Werte erfolgte mit Hilfe des Sensititre Vizion-Systems und dem Programm „SWIN“ in semiquantitativer Form. Bei jeder MHK-Bestimmung wurden Qualitätssicherungen wie das Mitführen von Kontrollstämmen (DSM 1103; *E.coli*), Reinheitsausstriche, Keimzahlbestimmungen, Wachstums- und Negativkontrollen durchgeführt.

3.1.3 Speziesbestimmung mittels MALDI-TOF MS

Die Matrix-assisted laser desorption time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) ist ein Verfahren zur Identifikation von Mikroorganismen. Durch einen kurzen Laserpuls wird der Analyt ionisiert und beschleunigt. Die Ionen werden daraufhin im Verhältnis ihrer Masse zur Ladung separiert und massenspektrometrisch gemessen (Creative Proteomics).

Das jeweilige Material einer Einzelkolonie der vorbereiteten Bakterienkultur wurde mithilfe eines Applikationsstäbchens entnommen und als dünner Film auf einen Targetspot aufgetragen und anschließend mit HCCA-Matrix (1 µl) beschichtet. Die Analyse erfolgte mit dem Bruker Biotyper. Die Matrix dient der Absorption der vom Laser hinzugeführten Energie und der Übertragung dieser auf den Analyten. Dabei wird der Analyt in einzelne geladene Ionen zerlegt. Nach dem Abgleich der Spektren mit der hinterlegten Datenbank wird eine Ergebnisliste mit vier entsprechenden Klassifizierungen erzeugt. Die Klassifizierungen umfassen einen festgelegten Bestimmungsbereich, der die Ergebnisse in verschiedene Kategorien (N=4) einordnet. Für die 1. Kategorie liegt der Score bei 2,300 bis 3,000 und eine hochwahrscheinliche Speziesidentifikation ist gegeben. Die zweite Kategorisierung liegt bei einem Score von 2,000 bis 2,299 und sagt aus, dass eine sichere Genusidentifikation bzw. wahrscheinliche Speziesidentifikation vorliegt. Die dritte Kategorie umfasst einen Score von 1,700 bis 1,999 Score und gibt eine wahrscheinliche Genusidentifikation an. Die letzte Kategorie schließt Scorewerte von 0,000 bis 1,699 ein, hier ist keine zuverlässige Identifikation gegeben.

3.2 Molekularbiologischer Methodenteil

3.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der verwendeten Bakterienstämme wurde mittels dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt (HB-2061-003). Die Isolierung der DNA erfolgte in zwei Protokollen mit 24 bzw. 22 Isolaten. Eine Einzelkolonie der vorbereiteten Reinkultur wurde mittels einer Einmal-Impföse entnommen und in BHI-Medium überführt. Das Wachstum im BHI-Medium erfolgte bei 28 °C für 24-28 h bei 150 rpm auf dem Brutschüttler. Anschließend wurde 1 ml in Übernachtskultur (McFarland 2-4, $\approx 1 \times 10^9$ Zellen/ml) bei 5.000 g für 10 min pelletiert und in ATL Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von Proteinase K

und Inkubation bei 56 °C über 1h erfolgte die Zellyse. Die Proben wurden anschließend durch Zugabe von 60 µl AE Puffer eluiert. Zur Bestimmung der ODratio im Biophotometer wurde 1 µl der extrahierten DNA entnommen. 2 µl DNA wurden für die Quantifizierung im Qubit verwendet. (3.2.3). Vor der weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Library Preparation

Die Library Preparation der extrahierten DNA wurden mittels Illumina DNA Prep Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt (1000000002694v14). Alle Volumina wurden im Prozess im Vergleich zu den Angaben im Herstellerprotokoll halbiert. Im ersten Schritt erfolgte die Tagmentierung der genomischen DNA. Dabei wurde 2-15 µl DNA (konzentrationsabhängig) in eine 96-Well-PCR-Platte überführt und mit 10 mM Tris-HCl auf auf 6.6 ng/µl verdünnt. Für die Library Preparation wurden 100 ng input DNA verwendet.

Im ersten Prozessschritt wurde eine Fragmentierung der genomischen DNA durchgeführt. Diese erfolgte mittels an magnetische Beads hybridisierte Transposasen. Neben der Fragmentierung auf 200 – 1000 bp Länge wurde hier die zeitgleiche Ligation von Adaptersequenzen an den Fragmentenden (5´und 3´) vorgenommen.

Im zweiten Schritt erfolgte die Reinigung nach der Tagmentierung, durch Trennung der magnetischen Beads auf einem Magnetständer in einer 96-Well-Rundbodenplatte. Nach Reinigung mittels eines Waschpuffers folgte die Elution der DNA Fragmente von den magnetischen Beads mithilfe eines Polymerase-Puffer-Index-Gemischs im dritten Schritt. Hierbei wurde die DNA in einem *limited cycle* Protokoll amplifiziert. Der Mastermix aus Polymerase und Nuklease-freiem Wasser wurde zum Bead-Pellet hinzugegeben. Die Proben wurden dann in eine 96-Well-PCR-Platte überführt und die Indexadapter (spezifische Barcodes) hinzugefügt. Anschließend wurde die 96-Well-PCR-Platte in einen Thermocycler gelegt und das PCR-Programm nach Herstellerangaben und 7 Zyklen durchgeführt.

Im vierten Schritt wurde die amplifizierte Library ein weiteres Mal gereinigt. Hierzu wurden die magnetischen Beads vorher separiert und der Überstand in eine neue Rundbodenplatte überführt. Zeitgleich zur Reinigung der DNA-Fragmente erfolgte eine doppelte Größenselektion mittels magnetischen Beads um eine optimale

Fragmentgröße zwischen 300 – 800 bp zu erhalten. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 16 µl Elutionspuffer.

Im letzten Schritt wurde die Qualität und Quantität der preparierten Library ermittelt. Zuerst wurde die Konzentration mit jeweils 1 µl Library mittels Qubit gemessen. Danach wurden die Längen der DNA-Fragmente mittels LabChip ermittelt (3.2.3). Ziel war es, eine mittlere DNA-Länge von ca. 600 bp zu erhalten.

3.2.3 Quantifizierung mittels Qubit und LabChip

Für die Messung der DNA-Konzentration wurde das Qubit-4-Fluorometer angewandt. Bei der Qubit-Messung wurden zwei unterschiedliche Kits verwendet. Einmal das Qubit 1X dsDNA Highsense (HS) Assay Kit und das Qubit dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit. Beide Kits unterschieden sich hinsichtlich ihres Messbereiches der DNA-Konzentration. Das 1X HS Assay Kit wird bei einem Bestimmungsbereich von 0,01 bis 100 ng und das BR Assay Kit von 0,5 bis 1000 ng verwendet. Die Proben werden bei der fluorometrischen Messung mit einem speziellen Farbstoff (Fluorophor) gemischt. Der Farbstoff bindet spezifisch an die DNA, nach einer Anregung bei ≈ 470 nm erfolgt die Emission bei 510-580 nm, somit können Kontaminanten im Vergleich zur photometrischen Messungen besser erkannt und die reale DNA Konzentration genauer bestimmt werden (Thermo Fisher Scientific). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll.

Für die Bestimmung der Größe und dem Molekulargewicht der DNA wurde der LabChipGX Touch (Perkin Elmer) verwendet. Es wurde mit dem DNA Extended Range LabChip mit dem zugehörigen DNA HiSens Reagent Kit gearbeitet. Die denaturierten, auf 2,5 ng/µl verdünnten Proben wurden in eine 96-Well-PCR-Platte überführt und dann in den LabChip gelegt. Auch der mikrofluidische Chip, der über eine Sipper-Kapillare verfügt, wurde in den LabChip eingebracht. Die Sipper-Kapillare ist in der Lage, Druck oder Spannung auf die einzelnen Vertiefungen auszuüben. Über ein angelegtes Vakuum wird die Flüssigkeitsprobe über den Sipper in den Chip überführt. Dann wird die Probe mit den Farbstoff und der Marker gemischt. Die markierte Probe gelangt in einen mit Gel gefüllten Kanal, in dem ein elektrisches Feld erzeugt wird, es wird eine elektrophoretische Größentrennung vorgenommen. Die Laserdetektion der fluoreszenz-markierten DNA erfolgt, wenn die getrennten Proteine den Detektor passieren. Dabei wird die Fluoreszenzstärke in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Die Elektropherogramme können mithilfe eines

zusätzlich vermessenen Größenstandards nach Menge und Fragmentgröße ausgewertet werden. Die Durchführung erfolgte exakt nach Herstellerprotokoll (PerkinElmer und Inc. 2012).

3.2.4 MiSeq *short read* Sequenzierung

Die Illumina-Sequenzierung basiert auf der Sequencing-by-Synthesis (SBS) Methode und reversiblen Farbstoffterminatoren, die die Identifizierung einzelner Basen ermöglichen. Diese *Next-Generation-Sequencing*-Methode (NGS) kann für die Sequenzierung des gesamten Genoms, die Sequenzierung gezielter Regionen, die Transkriptomanalyse, die Entdeckung kleiner RNAs und für die genomweite Protein-Nukleinsäure-Interaktionsanalyse verwendet werden. Der MiSeq ist das erste DNA-Sequenzierungsgerät, welches die Clusterbildung, Amplifikation, Sequenzierung und Datenanalyse in einem Gerät vereint. Der Ablauf der MiSeq-Sequenzierung beginnt mit dem Verdünnen und Poolen fertiger Librarys. Hierbei ist wichtig, dass die adaptertragenden DNA-Fragmente eine mittlere Länge von 500-600 bp besitzen. Alle Proben wurden äquimolar gepoolt, denaturiert und final auf 16 pM verdünnt. Dieser Pool wird mit der Sequenzierchemie und der Flow-Cell direkt in das Sequenziergerät eingebracht.

Als erster Schritt in der Sequenzierung im Gerät erfolgt die Cluster-Generierung. Der Library-Pool wird auf die Flowcell geladen und die Fragmente hybridisieren innerhalb einer Kapillare. Jedes DNA-Fragment wird durch Brückenamplifikation (DNA-Synthese) zu einem klonalen Cluster amplifiziert. Dann findet die eigentliche Sequenzierung statt, hierbei wird die 4-Kanal-SBS-Technologie angewandt. Es werden 4 basenspezifische Fluoreszenzfarbstoffe und eine Blockierungsgruppe mit markierten dNTPs zugesetzt. Nach jedem Zyklus (Nukleotideinbau) wird die Fluoreszenzintensität gemessen. Hierbei erfolgt die Stimulation mittels Laser, das resultierende Fluoreszenzsignal wird mit optischen Geräten aufgezeichnet (University of Rhode Island; DNA-Diagnostik Hamburg).

3.2.5 Bioinformatische Auswertung

Nach dem Sequenzierungslauf erfolgte die bioinformatische Auswertung der gewonnenen Daten. Im ersten Schritt erfolgte dabei die Qualitätskontrolle und das Prüfen auf Kontaminationen. Im weiteren Verlauf der Analyse wurden die Spezies mit verschiedenen Programmen bestimmt und eine allgemeine Analyse der

Resistenzgene durchgeführt. Im Abschluss erfolgte eine detaillierte Suche nach bekannten Polymyxin-Resistenzgenen.

Aquamis

Mithilfe der Aquamis pipeline erfolgte die initiale Qualitätskontrolle der *short-read*-Rohdaten sowie ein *de novo* Assembly. Diese Pipeline verknüpft unterschiedliche bioinformatische Tools wie z.B. trimmomatic, bwa, samtools, fastp, spades und Kraken (Deneke et al. 2021). Der Ablauf ist wie folgt:

- trimmomatic um Sequenzabschnitte mit niedrigem Q-score abzuschneiden
- fastp um technische Sequenzen aus den Sequenzdaten zu filtern
- spades um ein *de novo* Assembly zur Genomrekonstruktion durchzuführen
- bwa und samtools um die Genomcoverage zu ermitteln
- Kraken um eine Kontaminationsanalyse der einzelne Reads und der *de novo* assemblierten Contigs durchzuführen
- Confinder um Intra-Spezies-Kontamination zu ermitteln

Die erhaltenen Ergebnisse wurden dabei grafisch und tabellarisch zusammengefasst. Proben, die festgelegte Parameter unter- oder überschritten, wurden markiert. Folgende Parameter wurden dabei geprüft (Auswahl): Gesamtlänge des *de novo* assemblierten Genoms, Anzahl der Contigs, Anteil bp >Q30, Tiefe der Genomabdeckung, Anteil der Reads zu einem Genus, Anteil der Contigs zu einem Genus. Die Parameter für die jeweilige Spezies sind dabei innerhalb der Pipeline hinterlegt, jedoch nicht für alle untersuchten Spezies vorhanden (**Tabelle 8**). Die Steuerung der Pipeline erfolgte auf Kommandozeilenebene unter einer Linux Benutzerumgebung.

Tabelle 8 Übersicht Parameter und Grenzwerte zur Qualitätskontrolle

Taxon	Parameter	Interval Source	PASS	WARNING	FAIL
all spp.	assembly_coverageDepth	All_Taxons	$x > 40$	$30 > x \leq 40$	$30 \leq x$
all spp.	contig_hit1_genus_fraction	All_Taxons	$x > 0.95$		$0.95 \leq x$
all spp.	contig_hit1_species_fraction	All_Taxons	$x > 0.95$		$0.95 \leq x$
all spp.	NumContamSNVs	All_Taxons	$2 \leq x$	$2 > x \leq 3$	$x > 3$
all spp.	q30_rate_after	All_Taxons	$x > 0.8$	$0.7 > x \leq 0.8$	$0.7 \leq x$
all spp.	read_hit1_genus_fraction	All_Taxons	$x > 0.95$		$0.95 \leq x$
all spp.	read_hit1_species_fraction	All_Taxons	$x > 0.95$		$0.95 \leq x$
Vibrio	# contigs (≥ 0 bp)	NCBI_Pathogen_Genus_MinMax	$234 \leq x$	$x > 234$	
Vibrio	GC (%)	NCBI_GenomeReport_Genus_MinMax	$43.7 > x \leq 47.7$	$43.7 \leq x, x > 47.7$	
Vibrio	N50	NCBI_Pathogen_Genus_MinMax	$x > 65947$	$65947 \leq x$	
Vibrio	Total length	NCBI_Pathogen_Genus_MinMax	$3996000 > x \leq 5650000$	$3766000 > x \leq 3996000, 5650000 > x \leq 6247000$	$3766000 \leq x, x > 6247000$

Bakcharak

In der weiteren Sequenzanalyse erfolgte die Auswertung der aus Aquamis erhaltenen *de novo* Assemblys mit der Pipeline Bakcharak. Diese Pipeline dient der weiteren Typisierung der Bakterien im Hinblick auf MLST, Resistenz- und Virulenzgene sowie Marker für Plasmide. Hierzu verwendet die Pipeline Programme wie ABRicate, NCBI-AMRFinderPlus, Platon, MLST und die dazugehörigen Datenbanken wie pubMLST oder NCBI-AMRFinder (Uelze et al. 2021).

Die ausgewerteten Daten wurden, analog zu Aquamis, grafisch und tabellarisch dargestellt.

TYGS

Mit Hilfe des Type (Strain) Genome Servers (TYGS) wurde die Identifikation der Spezies vorgenommen. TYGS stellt eine ständig wachsende Datenbank mit taxonomischen Informationen zu Verfügung, welche Berechnungen und Abgleiche von Arten- und Unterarten ermöglicht (Meier-Kolthoff und Göker 2019). Auch wurden der GC-Gehalt und die dDDH (d0)-, dDDH (d4)- und die dDDH (d6)-Werte berechnet. Diese Berechnungen geben Auskunft über die Übereinstimmung zwischen den Spezies auf Genom- und Nukleotidebene. Ergebnisse von TYGS wurden tabellarisch und als Stammbaum im Newick Format ausgegeben. Diese Stammbäume konnten anschließend über das Onlinetool I-TOL hochgeladen werden, um phylogenetische Bäume zu erstellen, zu bearbeiten und mit weiteren Metadaten zu kombinieren.

16S rRNA-Phylogenie

Zur Erstellung eines gemeinsamen Stammbaumes wurden die vollständigen 16S rRNA-Abschnitte miteinander verglichen. Die folgenden Berechnungsschritte erfolgten über die Sequenzanalyse-Software Geneious. Die Extraktion der 16S rRNA-Sequenzabschnitte erfolgte aus den *de novo* Assemblys. Da nicht alle 16S rRNA Abschnitte im *de novo* Assembly gefunden wurden, erfolgte die Rekonstruktion für diese Isolate mittels *mapping* auf das 16S rRNA-Gen aus dem Referenzgenom für *Vibrio cholerae* (Acc.Nr. NZ_CP043554.1).

Alle erhaltenen 16S rRNA-Sequenzen wurden zusammen mit Referenzsequenzen aus weiteren *Vibrio* spp. mittels MAFFT (Multiple Alignment Fast Fourier Transformation) aligniert (default Parameter). Anschließend erfolgte die spaltenweise Löschung von Positionen mit *gaps*. Die Berechnung der Phylogenie für das 16S rRNA-Gen erfolgte mittels *neighbor-joining-method* mit einem zugrundeliegenden HKY85-Evolutionsmodell. Zur einfachen Konfidenzberechnung wurde ein *bootstrapping* mit 10.000 Replikaten durchgeführt. Kladen mit *bootstrap*-Werten ≥ 70 % wurden als phylogenetisch sichere Klade angesehen.

Die finale Darstellung der Stammbäume erfolgte mit I-TOL.

Mapping mit Geneious

Eine Vielzahl der bekannten Colistin-Resistenzgene sind zwar in der Literatur beschrieben aber nicht vollständig in den verwendeten Datenbanken für Resistenzbewertungen hinterlegt. Für diese Gene wurden gezielte Rohdaten-Mappings auf Referenzsequenzen verwendet. Zusätzlich wurden die Rohdaten auf alle bekannten *mcr*-Gene gescreent um falsch-negative Ergebnisse aus der Bakcharak-Pipeline auszuschließen.

Das Mapping erfolgte hierbei mittels Geneious nach den default Parametern für *medium-low sensitivity* und mit 5 Iterationen. Die erhaltenen BAM-Dateien (Compressed binary Version of a SAM file) wurden daraufhin auf die Genabdeckung und Mappingtiefe (*Coverage*) geprüft. Nur Gene mit einer ≥ 98 % Abdeckung und 30-fach-*Coverage* wurden als positiv bestätigt. Aus dem BAM-Dateien konnten Consensussequenzen der jeweiligen Gene erstellt werden, die für nachfolgende Analysen verwendet werden konnten.

4. Ergebnisse

4.1 Probenauswahl und Vorselektion

Die 67 *Vibrio*-Isolate (2.1) setzen sich aus 28 GERM-Vet- und 39 Zierfisch-Isolaten zusammen, die in verschiedenen Laboren innerhalb Deutschlands aus unterschiedlichen Fischarten isoliert wurden. Alle Proben wurden als *Vibrio* spp. dokumentiert. Die 28 GERM-Vet-Isolate wurden in den Jahren 2007 bis 2010, die 39 Zierfisch-Isolate in den Jahren 2015 bis 2016 isoliert.

In den unterschiedlichen Untersuchungsabschnitten wurden einige Isolate vom weiteren Verlauf ausgeschlossen (Erläuterungen im weiteren Text).

4.1.2 Speziesidentifikation mittels MALDI-TOF MS

Das erste Verfahren zur Speziesbestimmung stellte die Identifikation mittels MALDI-TOF MS dar. Über MALDI-TOF MS wurde ein Abgleich mit den hinterlegten Datenbanken durchgeführt und eine Ergebnisliste mit den jeweiligen Klassifizierungen erzeugt (3.1.3).

22 GERM-Vet-Isolate wurden als *Vibrio* spp. identifiziert. Die übrigen sechs Isolate wurden als *Photobacterium damsela* (1912), *Aeromonas sobria* (3118), *Lactobacillus* spp. (3116), *Aeromonas popoffii* (81354, F242) und *Aeromonas hydrophila* (F245) bestimmt und in den weiteren Verfahren nicht berücksichtigt. Die 39 Zierfisch-Isolate wurden bereits im Vorfeld als *Vibrio* spp. identifiziert und entsprechend vorselektiert.

4.1.2 Ermittlung der Colistin-Resistenz mittels MHK

Für die Ermittlung einer phänotypischen Colistin-Resistenz wurde das Verfahren der MHK angewandt (3.1.2). Dabei wurden die Resistenzen gegenüber 24 Wirkstoffen, mit einer Vielzahl an Wirkstoffen, die in der Veterinärmedizin häufig eingesetzt werden (bspw. Enrofloxacin, Florfenicol, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol) bestimmt. Da *mcr*-Gene für eine Colistin-Resistenz codieren, wurden in dieser Arbeit ausschließlich die MHK-Werte für Colistin berücksichtigt. Alle Isolate, die hier einen Wert von ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ aufwiesen, wurden im weiteren Verfahren berücksichtigt.

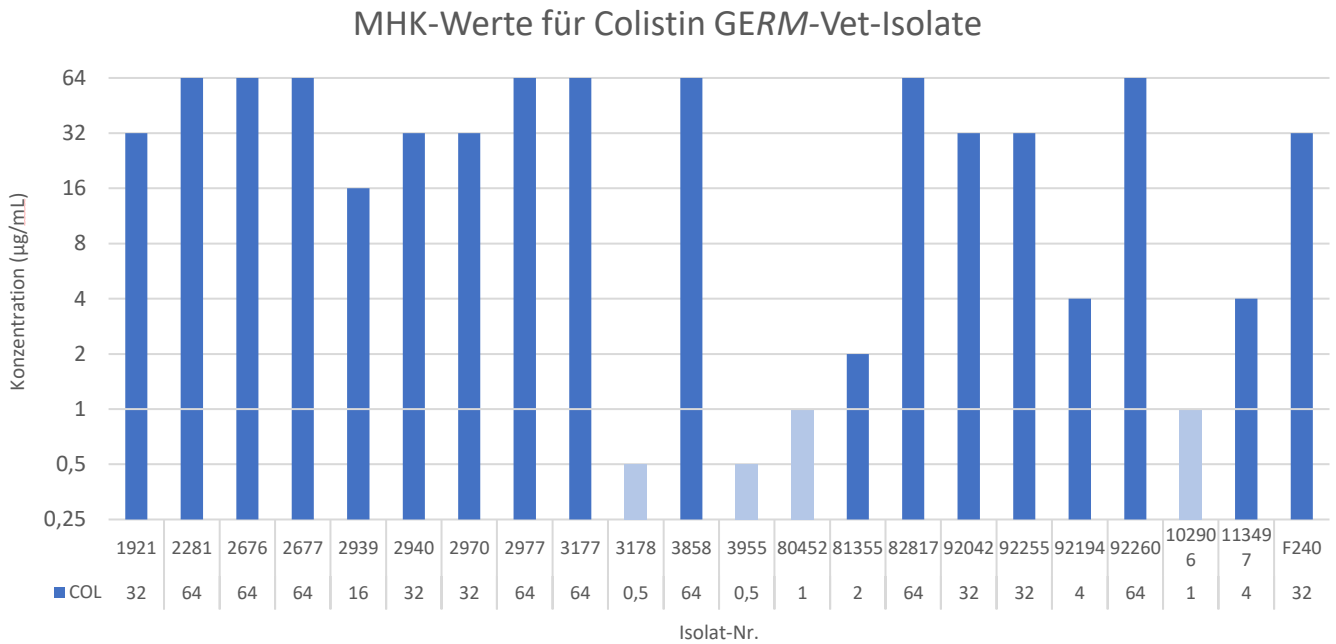


Abbildung 5 MHK-Werte der GERM-Vet-Isolate für Colistin.

Die farblichen Kennzeichnungen veranschaulichen entweder MHK-Werte $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (dunkelblau) oder $< 2 \mu\text{g/ml}$ (hellblau).

Für die GERM-Vet-Isolate konnten überwiegend hohe MHK-Werte gegenüber Colistin ermittelt werden. Lediglich vier von 22 Isolaten wiesen einen MHK-Wert von unter $2 \mu\text{g/ml}$ auf. Diese waren *Vibrio* spp. (3178 und 3955) und *Vibrio anguillarum* (80452 und 102906) (**Abbildung 5**). Somit wurden 17 GERM-Vet-Isolate in die weiteren Untersuchungen übernommen.

MHK-Werte für Colistin Zierfisch-Isolate

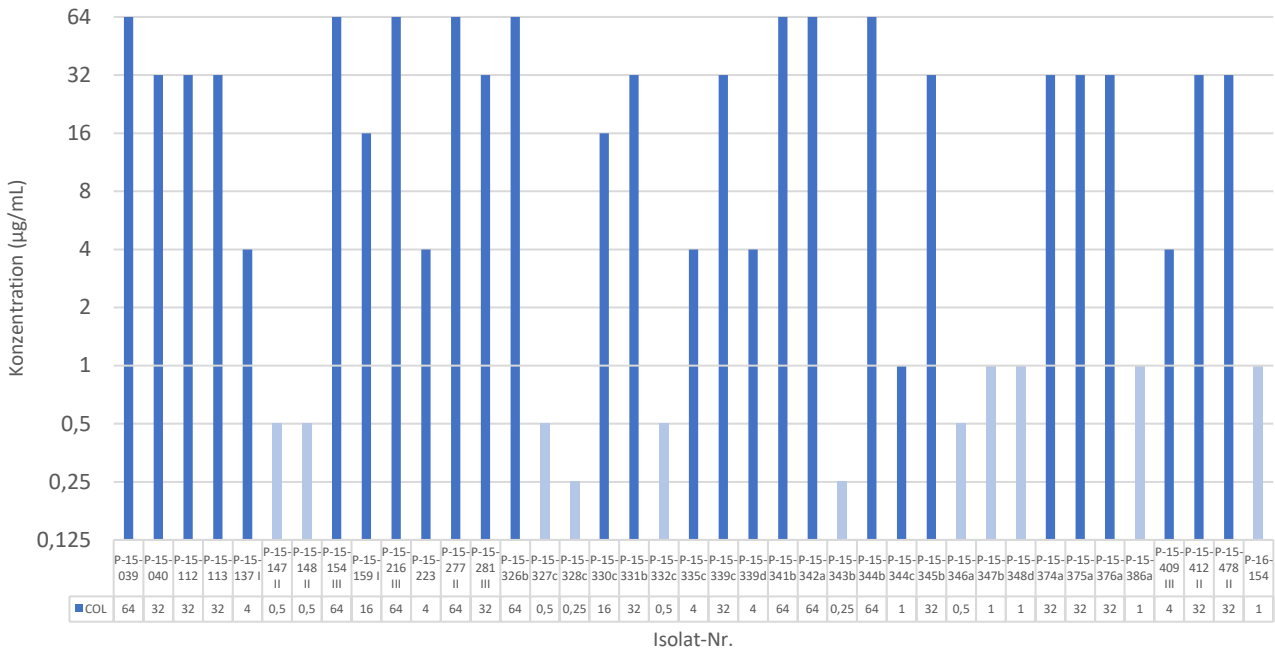


Abbildung 6 MHK-Werte der Zierfisch-Isolate für Colistin.

Die farblichen Kennzeichnungen veranschaulichen entweder MHK-Werte $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ (dunkelblau) oder von $< 2 \mu\text{g/ml}$ (hellblau).

Die MHK-Werte der Zierfisch-Isolate wurden bereits im Vorfeld bestimmt. Auch die Zierfisch-Isolate hatten überwiegend hohe MHK-Werte gegenüber Colistin. Vom Ausschluss waren 12 von 39 *Vibrio*-Isolaten mit MHK-Werten von unter $2 \mu\text{g/ml}$ gegenüber Colistin betroffen (**Abbildung 6**). Bei den Zierfisch-Isolaten wurden somit 27 Isolate in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen.

4.1.3 Methode der DNA-Extraktion

Für die weiteren Verfahren war es wichtig, die DNA aus den rekultivierten Bakterienisolaten zu gewinnen und eine bestimmte Ausbeute der gereinigten DNA zu erhalten. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit und die Quantifizierung der DNA mit dem Biophotometer und dem Qubit. Die quantifizierte DNA wurde gemessen, um die durchschnittliche Konzentration der DNA zu ermitteln und um die Reinheit zu bestimmen. Über ein Biophotometer wurde die Konzentration und die Reinheit der DNA photometrisch ermittelt. Für eine genauere Messung der durchschnittlichen Konzentration wurde zusätzlich die fluorometrische Messung mittels Qubit angewandt (3.2.3).

Für das Absorptionsverhältnis 260/280 konnten überwiegend ähnliche Ergebnisse in einem Bestimmungsbereich von 1,7 bis 2 ermittelt werden. Die für die GERM-Vet-Isolate ermittelten Werte lagen im Bereich des optimalen Wertes von 1,8. Dies zeigte, dass keine verunreinigte RNA enthalten war. Allerdings ist auch eine DNA-Probe zu erkennen, die weit über den vorgegebenen Wert liegt. Das könnte auf eine eventuelle Kontamination hinweisen. Die Werte für das Absorptionverhältnis 260/230 schwankten stark und lagen im Mittel bei $1,47 \pm 0,52$. Die optimale Ratio von 1,8 konnte nur für wenige Isolate erzielt werden. Dies ist ein Hinweis auf eine Kontamination mit Guanidin-HCl welches im Lysepuffer enthalten ist. Für 1921, 2677, 2939 und 82817 konnte ein Wert über 1,8 erzielt werden.

Bei den Zierfisch-Isolaten konnte für das Absorptionsverhältnis 260/280 ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung der Werte ermittelt werden. Die DNA-Extrakte zeigten im Mittel Ratios von $1,87 \pm 0,23$. Das Absorptionsverhältnis 260/230 schwankte auch hier, ähnlich wie bei den GERM-Vet-Isolaten. Nur vier Isolate (P-15-154 III, P-15-277 II, P-15-331b und P-15-345b) konnten einen Wert von über 1,8 erzielen. Die Ratios lagen im Mittel bei $1,21 \pm 0,58$.

Die Qubit-Messung wurde mit dem dsDNA BR Assay Kit durchgeführt. Für die Sequenzierung war das Ziel mindestens eine DNA-Konzentration von über 3 ng/µl zu erhalten.

Folgende Ergebnisse der GERM-Vet-Isolate konnten mithilfe des Qubits für die DNA-Konzentration ermittelt werden:

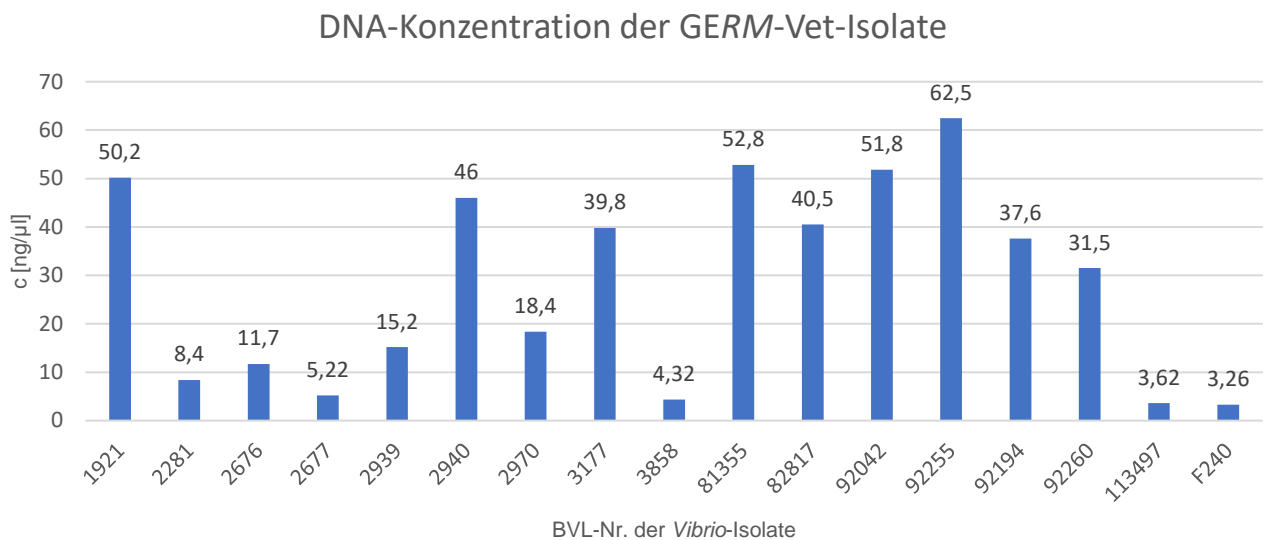


Abbildung 7 DNA-Konzentrationen aller GERM-Vet-Isolate nach der DNA-Extraktion.

Alle GERM-Vet-Isolate konnten einen Wert über 3 ng/µl vorweisen. Überwiegend konnten mittlere bis hohe Werte für die Konzentrationen ermittelt werden. Niedrige Konzentrationen, die einen Wert unter 10 ng/µl hatten, wiesen die Isolate 2281, 2677, 3858, 113497 und F240 auf. Deutlich höhere Werte, die über 30 ng/µl DNA-Konzentrationen verfügten, waren für die Isolate 1921, 2940, 3177, 81355, 82817, 92042, 92255, 92194 und 92260 zu verzeichnen (**Abbildung 7**). Im Mittel lag die DNA Konzentration bei 31,7 ng/µl ± 19,7 ng/µl.

Folgende DNA-Konzentrationen konnten für die Zierfisch-Isolate erreicht werden:

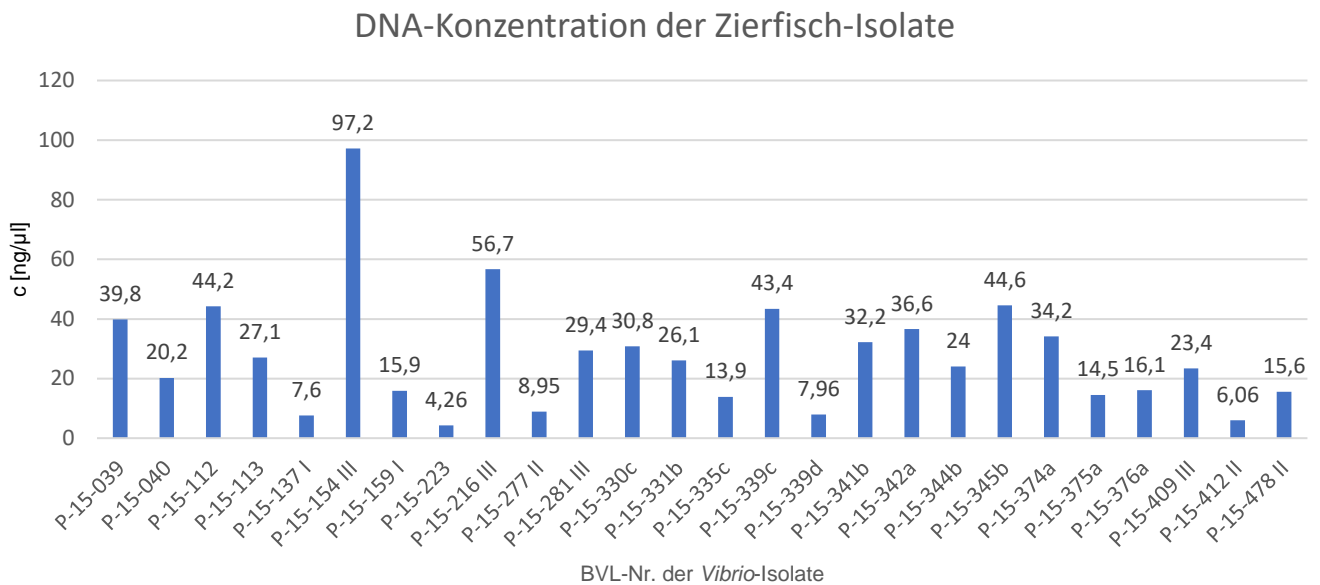


Abbildung 8 DNA-Konzentrationen aller Zierfisch-Isolate nach der DNA-Extraktion.

Auch die DNA-Konzentrationen aller Zierfisch-Isolate ergaben Werte von über 3 ng/µl. Ähnlich wie bei den GERM-Vet-Isolaten waren die Werte zwischen den Isolaten für die Konzentrationen sehr unterschiedlich. Werte unter 10 ng/µl wurden nur bei fünf Isolaten dokumentiert. Bei elf Isolaten wurden Werte zwischen 10 ng/µl bis 30 ng/µl verzeichnet. Zehn Isolate wiesen Werte von über 30 ng/µl DNA-Konzentration auf (**Abbildung 8**).

Während der DNA-Extraktion konnte bei einem Isolat (2977) keine DNA nachgewiesen und auch keine Werte für die Absorptionsverhältnisse ermittelt werden. Nach wiederholter DNA-Extraktion, gleichem Ergebnis und dem Verdacht auf ein grampositives Isolat wurde dieses entsprechend aussortiert.

4.1.4 Bioinformatische Qualitätskontrolle

Nach der Sequenzierung und vor der bioinformatischen Auswertung wurde eine Qualitätsbewertung (QC) mithilfe von Aquamis durchgeführt (3.2.5). Der Anteil an sequenzierten Nucleotiden pro Probe mit einer Fehlerquote von ≥ 30 (Q30: ein Fehler pro 1000 Nucleotide) betrug im Mittel für alle sequenzierten Isolate 82,8 %. In der Regel zeigten die Rohdaten im 3' Bereich der Sequenzen höhere Fehlerraten. Der Anteil an Basen mit ≥ 20 (Q20: ein Fehler pro 100 Nucleotide) lag bei 91 %. Diese zeigten die Notwendigkeit die Rohdaten zu trimmen. Die Coverage

(Sequenzabdeckung pro Base) für alle sequenzierten Isolate war zwischen 15 bis 75 Reads zu verzeichnen.

Zwei Isolate (F240 und P-15-216 III) haben die QC nicht bestanden. Ein Isolat hatte eine zu niedrige Coverage (F240: 15,2 Coverage), dieses wurde wiederholt und konnte für die kommenden Auswertungen berücksichtigt werden. Das andere Isolat (P-15-216 III) hatte zusätzlich zu der niedrigen Coverage eine zu hohe Anzahl an Contigs (1.296 Contigs) und wurde entsprechend aussortiert. Die hohe Contigzahl deutete stark auf eine Kontamination während der DNA-Extraktion oder Library Preparation hin, das Isolat konnte aus Zeitgründen nicht wiederholt werden.

Im Schnitt hatten die sequenzierten Isolate eine Contiganzahl von 100 bis 200.

4.2 Speziesbestimmung – Bioinformatische Auswertung

Die Speziesidentifikation ist sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin sehr bedeutend. Durch die Identifikation der verschiedenen Spezies ist eine geeignete Behandlung bzw. die Anwendung eines geeigneten Antibiotikums bei auftretenden Infektionen möglich.

In dieser Arbeit wurden für die Speziesbestimmung drei verschiedene Methoden ausgewählt. Die Bestimmung der Spezies von fischpathogenen *Vibrio* spp. ist bisher wenig beschrieben und eine optimale Methode im BVL noch nicht etabliert. Der Vergleich hatte zum Ziel, die Validität der unterschiedlichen Methoden zu prüfen. Diese drei Methoden sind die Speziesbestimmungen über MALDI-TOF MS, TYGS und die 16S rRNA.

4.2.1 Speziesbestimmung durch MALDI-TOF MS

Eine erste Speziesbestimmung fand mittels MALDI-TOF MS statt, es wurde ein Abgleich mit den hinterlegten Datenbanken durchgeführt und eine Ergebnisliste mit den jeweiligen Klassifizierungen, wie in 3.1.3 erläutert, erzeugt.

Folgende Ergebnisse konnten für die Speziesidentifikation der GERM-Vet- und Zierfisch-Isolate für den MALDI-TOF MS ermittelt werden:

Tabelle 9 MALDI-TOF-Ergebnisse

BVL-Nr.	Spezies	Score
GERM-Vet-Isolate		
1921	V. spp.	1,563
2281	V. spp.	1,753
2676	V. navarrensis	2,184
2677	V. vulnificus	2.399
2939	V. sp. (V. harveyi u. V. parahaemolyticus)	2.286 u. 2.035
2940	V. spp.	1,404
2970	V. harevyi	2.230
2977	V. spp.	1,592
3177	V. harveyi	2.159
3178	V. spp.	1.777
3858	V. sp. (V. harveyi u. V. parahaemolyticus)	2.143 u. 2.035
3955	V. spp.	1,256
80452	V. anguillarum	2.194
81355	V. sp. (V. harveyi u. V. parahaemolyticus)	2.250 u. 2.184
82817	V. vulnificus	2.429
92042	V. spp.	1,306
92255	V. spp.	1,582
92194	V. spp.	1,469
92260	V. vulnificus	2.432
102906	V. anguillarum	2.351
113497	V. alginolyticus	2.041
F240	V. spp.	2.184
Zierfisch-Isolate		
P-15-039	V. vulnificus	2,161
P-15-040	V. harveyi	2,277
P-15-112	V. vulnificus	2,321
P-15-113	V. vulnificus	2,15
P-15-137 I	V. spp.	1,962
P-15-147 II	V. spp.	1,888/1,73
P-15-148 II	V. spp.	1,887/1,781

P-15-154 III	V. spp.	1,8
P-15-159 I	V. spp.	1,953
P-15-216 III	V. spp.	1,853
P-15-223	<i>V. alginolyticus</i>	2,21
P-15-277 II	<i>V. harveyi</i>	2,152
P-15-281 II	V. spp.	1,723
P-15-326 b	V. spp.	1,804
P-15-327 c	<i>V. fluvialis</i>	2,09
P-15-328 c	V. spp.	1,979/ 1,862
P-15-330 c	V. spp.	1,722
P-15-331 b	<i>V. harveyi</i>	2,179
P-15-332 c	V. spp.	1,951/1,818
P-15-335 c	<i>V. alginolyticus</i>	2,188
P-15-339 c	<i>V. vulnificus</i>	2,261
P-15-339 d	<i>V. alginolyticus</i>	2,135
P-15-341 b	<i>V. vulnificus</i>	2,166
P-15-342 a	<i>V. vulnificus</i>	2,046
P-15-343 b	V. spp.	1,854/1,81
P-15-344 b	<i>V. vulnificus</i>	2,105
P-15-344 c	<i>V. alginolyticus</i>	2,077
P-15-345 b	<i>V. vulnificus</i>	2,225
P-15-346 a	V. sp.	2,084/1,764
P-15-347 b	<i>V. alginolyticus</i>	2,214
P-15-348 d	<i>V. alginolyticus</i>	2,233
P-15-374 a	<i>V. harveyi</i>	2,262
P-15-375 a	<i>V. harveyi</i>	2,225
P-15-376 a	V. spp.	1,766
P-15-386 a	<i>V. alginolyticus</i>	2,172
P-15-409 III	<i>V. alginolyticus</i>	2,014
P-15-412 II	V. spp.	1,793
P-15-478 II	V. spp.	1,912
P-15-154	<i>V. alginolyticus</i>	2,326

(rot => keine zuverlässige Identifikation. gelb => wahrscheinliche Genusidentifikation. grün => sichere Genus- bzw. wahrscheinliche Speziesidentifikation.)

Eine wahrscheinliche Speziesidentifikation ergab sich für 13 von 22 der GERM-Vet- und 24 von 39 der Zierfisch-Isolate. Zwei der GERM-Vet-Isolate und 15 der Zierfisch-Isolate konnten mit wahrscheinlicher Genusidentifikation dokumentiert werden.

Schließlich konnte ausschließlich bei den GERM-Vet-Isolaten für sieben Isolate keine zuverlässige Identifikation erfolgen (**Tabelle 9**).

Für die GERM-Vet-Isolate wurden ein Isolat als *V. navarrensis*, zwei als *V. anguillarum*, zwei weitere für *V. alginolyticus*, drei Isolate als *V. vulnificus* und vier als *V. harveyi* identifiziert. Bei den Zierfisch-Isolaten wurden ein *V. navarrensis*, ein *V. furnissii/V. fluvialis*, fünf *V. harveyi*, acht *V. vulnificus* und neun *V. alginolyticus* identifiziert. Sowohl für GERM-Vet- (10) als auch für Zierfisch-Isolate (15) konnte für eine große Anzahl an Isolaten keine sichere Genusbestimmung erfolgen (**Abbildung 9**).

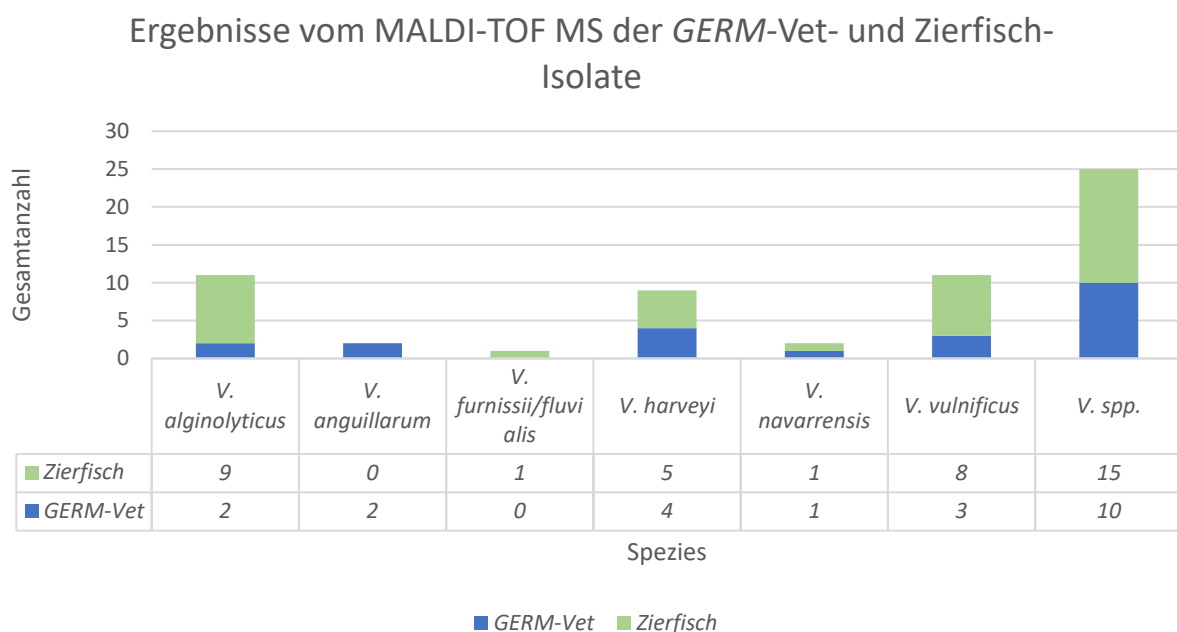


Abbildung 9 Ergebnisse der MALDI-TOF MS für GERM-Vet- und Zierfisch-Isolate.

Um zu ermitteln, ob die Zierfisch- und GERM-Vet-Isolate in Abhängigkeit der Spezies miteinander vergleichbar sind, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Durch die ermittelten Werte konnte nachgewiesen werden, dass sie nicht signifikant unterschiedlich zueinander sind. Folgende Werte konnten beim Chi-Quadrat-Test ermittelt werden: *V. alginolyticus* (p-Wert = 0,161), *V. anguillarum* (p-Wert = 0,099), *V. furnissii/fluvialis* (p-Wert = 0,409), *V. harveyi* (p-Wert = 0,844), *V. navarrensis* (p-Wert = 0,798), *V. vulnificus* (p-Wert = 0,405), unbekannte (p-Wert = 0,941).

4.2.2 Speziesbestimmung durch TYGS

Die zweite Speziesidentifikation wurde mittels TYGS durchgeführt. TYGS vergleicht das gesamte Chromosom eines Isolats mit mehreren Referenzsequenzen, welche

sich in einer stetig wachsenden Datenbank mit taxonomischen Informationen wiederfinden (3.2.5). Weiterhin wurden mit TYGS der GC-Gehalt, die dDDH (d0)-, dDDH (d4)- und dDDH (d6)-Werte berechnet, welche Auskunft über die Übereinstimmung zwischen den Spezies auf Genom- und Nukleotidebene geben.

Folgende Speziesidentifikationen wurden für die GERM-Vet- und die Zierfisch-Isolate mithilfe von TYGS ermittelt:

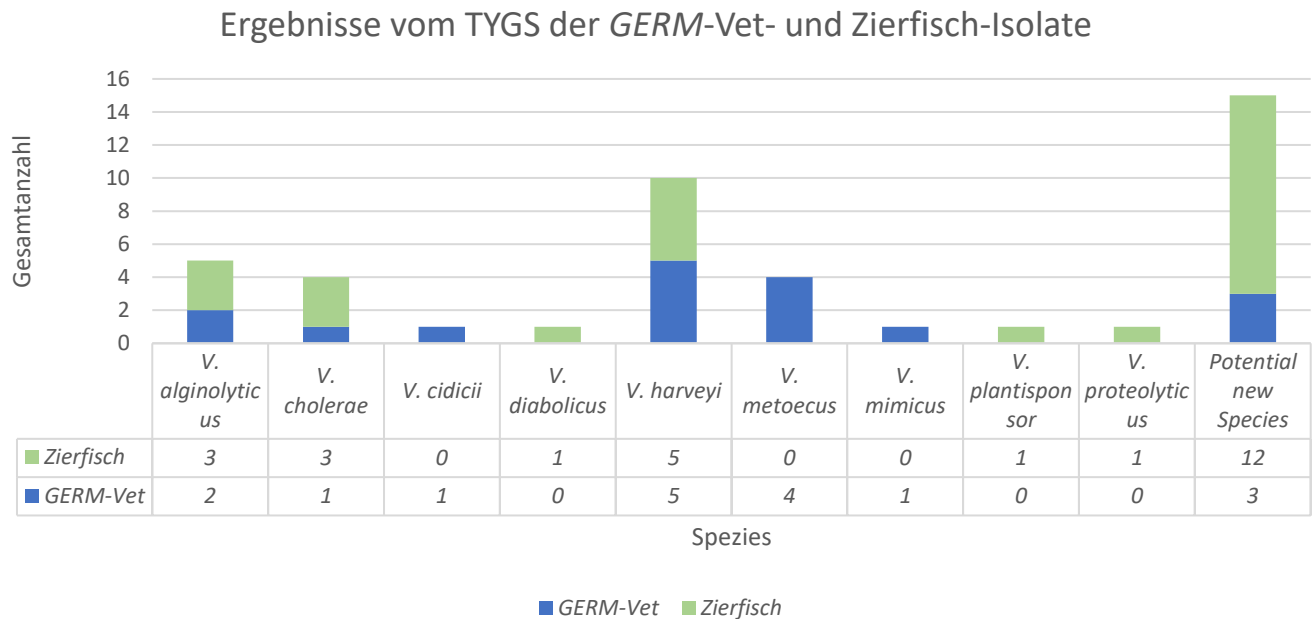


Abbildung 10 Ergebnisse TYGS für GERM-Vet- und Zierfisch-Isolate.

Mithilfe des TYGS konnten Spezies identifiziert werden, die beim MALDI-TOF MS nicht ermittelt werden konnten. Diese sind *V. cidicii*, *V. diabolicus*, *V. proteolyticus*, *V. cholerae*, *V. metoecus*, *V. mimicus* und *V. plantisponsor*. Bestätigte Spezies, die bereits im MALDI-TOF MS identifiziert wurden, sind *V. alginolyticus* und *V. harveyi*. Weiterhin konnten 16 *potential new species* ermittelt werden (**Abbildung 10**).

Auch für die TYGS-Ergebnisse der GERM-Vet- und der Zierfisch-Isolate wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sie nicht signifikant unterschiedlich zueinander sind. Folgende Confidenz konnte beim Chi-Quadrat-Test ermittelt werden: *V. alginolyticus* (p-Wert = 0,936), *V. cholerae* (p-Wert = 0,511), *V. cidicii* (p-Wert = 0,245), *V. diabolicus* (p-Wert = 0,400), *V. harveyi* (p-Wert = 0,639), *V. metoecus* (p-Wert = 0,025), *V. mimicus* (p-Wert = 0,245), *V. plantisponsor* (p-Wert = 0,400), *V. proteolyticus* (p-Wert = 0,400), potential new species (p-Wert = 0,129).

Bei TYGS wurden die Isolate mit mehreren Referenzgenomen, aber auch mit den untersuchten Isolaten abgeglichen. Für zwei Isolate (P-15-339c u. P-15-112) konnte beim GC-Gehalt-Unterschied ein Wert von 0 % und bei den dDDH (d0)-, dDDH (d4)- und dDDH (d6)-Werten jeweils ein Wert von 100 % ermittelt werden. Bei zwei weiteren Isolaten (92042 u. 92255) konnte beim GC-Gehalt-Unterschied ein Wert von 0,01 % und bei den dDDH-Berechnungen eine Identität von 100 % erreicht werden.

4.2.3 Speziesbestimmung durch 16S rRNA Phylogenie

Die 16S rRNA-Sequenzanalyse vergleicht auf genetischer Ebene das komplette 16S rRNA-Gen mit selbst ausgewählten einzelnen Referenzsequenzen aus öffentlichen Datenbanken (NCBI). 16S rRNA-Gene verfügen über konservierte und variable Regionen, in denen die konservierte Region die phylogenetische Verwandtschaft und die variable Region die Unterschiede zwischen den Arten bestimmt.

Folgende Ergebnisse konnten durch den 16S rRNA-Stammbaum ermittelt werden:

Tree scale: 0.01

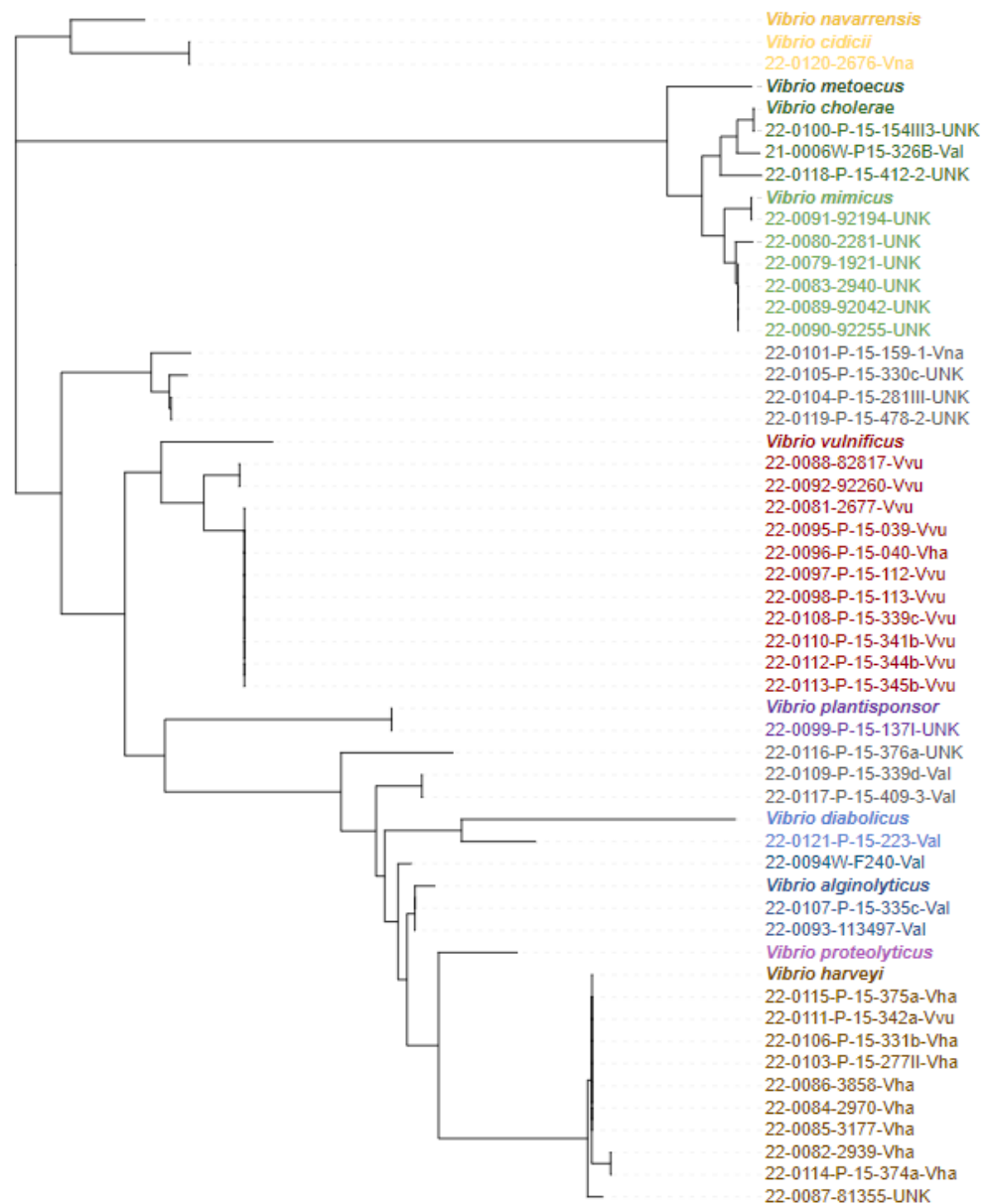


Abbildung 11 16S rRNA-Stammbaum mit allen Isolaten und den ausgewählten Referenzgenen.

Der 16S rRNA-Stammbaum ist ein neighbor-joining Stammbaum. Die Farbcodierung entspricht der Referenz innerhalb der Klade. (Scalebar = Anzahl d. Substitutionen/1000 Nukl.)

Für die Referenzsequenzen wurden Referenzgene folgender Spezies verwendet: *V. navarrensis*, *V. cidicii*, *V. metoecus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. plantisponsor*, *V. diabolicus*, *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus* und *V. harveyi*. Die Bezeichnungen der Isolate setzen sich aus BVL-Nummer, der sCount-Nummer und der Abkürzung der im MALDI-TOF MS ermittelten Spezies zusammen. Die farblichen

Kennzeichnung folgen dem Prinzip, die verschiedenen Isolate den Referenzen zuzuordnen. Bis auf acht Isolate (P-15-159 I, P-15-330c, P-15-281 III, P-15-478 II, P-15-376a, P-15-339d u. P-15-409 III, F240) konnten alle Isolate den Referenzgenen zugeordnet werden (**Abbildung 11**).

4.3 Identifikation von Resistenzgenen

4.3.1 Allgemeine Resistenzgene

Der Nachweis von allgemeinen Resistenzgenen erfolgte mit der Pipeline Bakcharak. Durch Bakcharak konnten insgesamt 18 verschiedene Resistenzgene für die sequenzierten Isolate ermittelt werden. Im Median trugen die sequenzierten Isolate zwei Resistenzgene. Das Isolat P-15-478-2 stach dabei mit elf unterschiedlichen Resistenzgenen heraus. Sieben Isolate trugen keine in der Bakcharak-Datenbank hinterlegten Resistenzgene. Die am häufigsten ermittelten Resistenzgene waren *tet(34)*, *tet(35)*, *blaVHH* und *almG*.

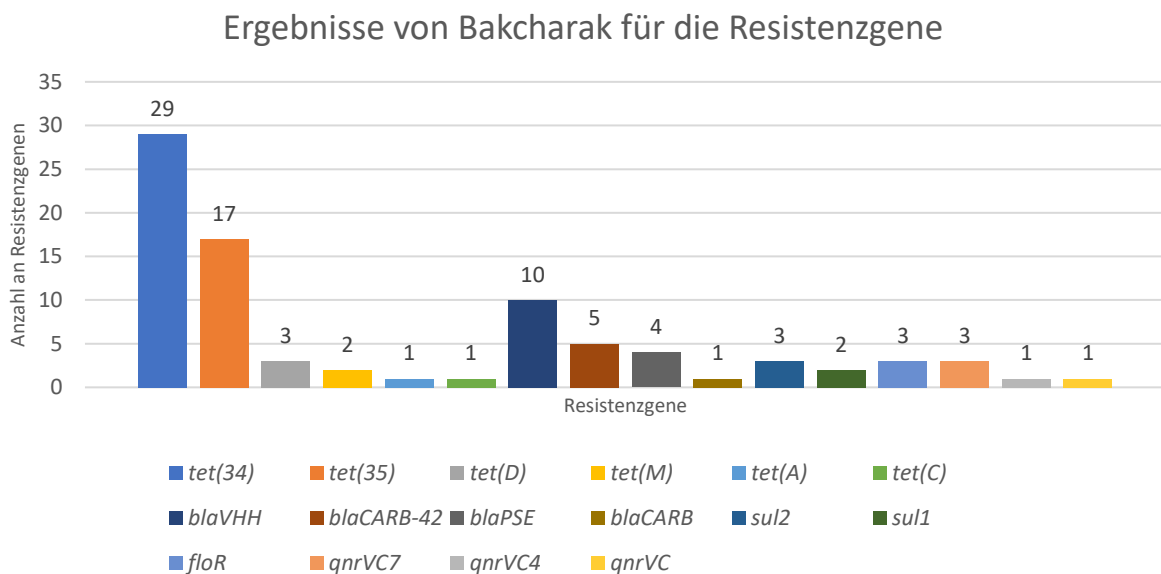


Abbildung 12 Ergebnisse von Bakcharak für die ermittelten Resistenzgene ohne Colistin-Resistenzgene.

Für die Wirkstoffklasse der Tetracykline konnten überwiegend Resistenzgene für *tet(34)* und *tet(35)* ermittelt werden, aber auch in geringer Anzahl *tet(C)*, *tet(A)*, *tet(M)* und *tet(D)*. Für Ampicillin wurde häufig das Resistenzgen *blaVHH* ermittelt, aber auch *blaCARB*, *blaCARB-42* und *blaPSE*. Weiterhin konnten für die Wirkstoffklasse der Sulfonamide die Resistenzgene *sul2* und *sul1*, für Florfenicol das Resistenzgen *floR* und für die Wirkstoffklasse der (Fluor-)Chinolone die Resistenzgene *qnrVC7*, *qnrVC4*, und *qnrVC* ermittelt werden (**Abbildung 12**).

Außerdem konnten 10 Isolate mit dem Resistenzgen *almG* und ein Isolat mit *mcr-4* identifiziert werden. Wesentliche Resistenzgene wurden nochmal mit der Software Geneious gemappt, um mögliche falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Dafür wurden folgende Resistenzgene ausgewählt: *almG*, *blaVHH*, *blaPSE* und alle bekannten *mcr*-Gene. Die Ergebnisse zwischen Bakcharak und Geneious waren vergleichbar, mit Ausnahme jeweils eines nicht identifizierten *blaVHH*- und *blaPSE*-Gens.

4.3.2 Identifikation von *mcr-4*

Alle Isolate wurden hinsichtlich der *mcr*-Gene (*mcr-1* bis *mcr-10*) nochmals mit Geneious gemappt. In einem Isolat (21-0006-P-15-326b) wurde ein *mcr-4* Gen identifiziert. Aus der NGS-Sequenzierung konnte ein putatives Plasmid rekonstruiert werden.

Lipid A phosphoethanolamintransferase (EC 2.7.8.43) > colistin resistance *mcr-4*

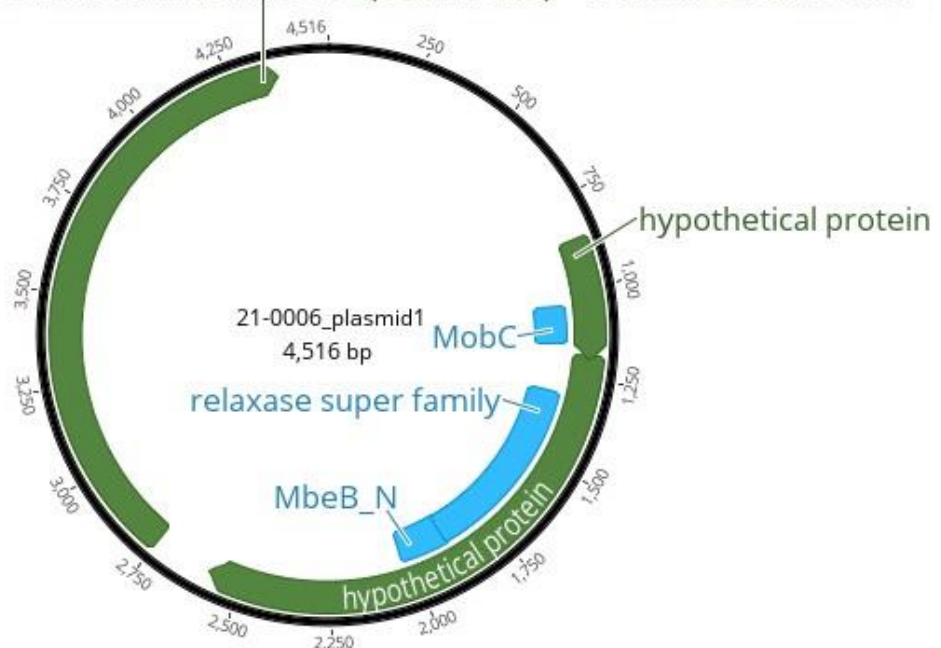


Abbildung 13 *mcr-4* Plasmid

Die Farbcodierung entspricht den ermittelten und hypothetischen Genen (grün), unter anderem die Lipid A phosphoethanolamintransferase; ebenfalls dargestellt die hypothetischen Domänen (blau), unter anderem MobC.

Das *mcr*-Gen ist, mit einer Größe von 1.626 bp, in einem Plasmid mit einer Größe von 4.516 bp kodiert. Mithilfe der NCBI conserved domains search konnten katalytisch aktive Domänen und auch deren mögliche Funktionen ermittelt werden. Diese Domänen weisen darauf hin, dass die hypothetischen Gene über Funktionen der Mobilisation und Relaxase verfügen. Im Plasmid wurden folgende Proteine mit

den entsprechenden E-Werten ermittelt: Relaxase super family (4.26e-12) MbeD bzw. MobD super family (2.10e-10), mbeB (9.22e-13), MobC (3.37e-06) und schließlich die Lipid A phosphoethanolamintransferase (2.04e-173) (**Abbildung 13**). Die Erwartungswerte (E-Werte) sind Parameter, die die Anzahl der Treffer beschreiben, die in einer Datenbank einer bestimmten Größe „zufällig“ zu erwarten sind.

Das Isolat (22-0006-P-15-326b) hat die QC erfolgreich bestanden, es wurden in Summe Contigs mit einer Gesamtlänge von 4.063.337 bp ermittelt und die Coverage betrug 71,9. Für dieses Isolat wurden zwei Resistenzgenen identifiziert, die gegenüber demselben Wirkstoff eine Resistenz vermitteln. Das Resistenzgen *almG* forciert wie *mcr-4* eine Colistin-Resistenz. Das identifizierte *mcr-4*-Gen hat eine Identität von 85,99 % zu *mcr-4.1* und 86,05 % zu *mcr-4.6*.

Weiterhin konnte das Isolat sowohl mittels TYGS als auch über 16S rRNA als *V. cholerae* identifiziert werden. Die Speziesidentifikation mittels MALDI-TOF MS ergab einen Score(-Wert) von unter 1,6 mit einer Zuordnung auf Genusebene.

4.3.3 bekannte Resistenzgene

Über Geneious erfolgte ein Mapping auf die bei der Spezies *Vibrio* bekannten Resistenzgene, welche zum Großteil nicht in der Datenbank von Bakcharak enthalten waren. Folgende bekannte Resistenzgene wurden nach Literaturrecherche ausgewählt: *almG*, *trkA*, *lpxN*, *gsplEF* und *eptA*.

Das Resistenzgen *almG* wurde sowohl in Bakcharak als auch in Geneious in acht Isolaten identifiziert. *almG* ist ein Mitglied des AlmEFG-Operons, welches verantwortlich für die Polymyxin-Resistenz bei *Vibrio cholerae* ist. Das *almG* Gen ist eine Glycyltransferase, die eng mit der Lipid-A-Acyltransferase verwandt ist. Der Resistenzmechanismus bei *almG* ist durch die Aminoacylierung von LPS geprägt, die die negative Ladung der Zellmembran von gramnegativen Bakterien verringert.

Das Resistenzgen *trkA* wurde ausschließlich über Geneious gemappt. *trkA* wurde in 16 Isolaten nachgewiesen. Es ist ein zytoplasmatisches Protein, das an die zytoplasmatische Membran gebunden ist und als Efflux-Pumpe zum K⁺-Transport dient. *trkA* verursacht eine Hyperpolarisation der Zellmembran, ein Ungleichgewicht in der pH-Homöostase und einen hohen K⁺-Bedarf. Dies führt ebenfalls zur einer verringerten negativen Ladung der Zellmembran.

Die Identifikation des Resistenzgens *lpxN* erfolgte in 6 Isolaten. *lpxN* zählt zum *Acinetobacter-mutantes-lpx*-Gen, welches an der Biosynthese von Lipid A in gramnegativen Bakterien beteiligt ist. Mutationen dieses Gens können eine Resistenz gegen antimikrobielle Peptide, die auf die äußere Membran abzielen, verursachen.

Die Resistenzgene *gsp*EF wurden in 14 Isolaten nachgewiesen. *gsp*I, *gsp*E und *gsp*F sind, wie auch *lpxN*, mit dem Typ-II-Sekretionssystem, der LPS-Biosynthese und Modifikation verbunden und forcieren ebenfalls eine Polymyxin-Resistenz.

Zum Abschluss erfolgte noch ein Mapping mit dem Referenzgen *eptA*, welches in vier Isolaten identifiziert werden konnte. *eptA* ist ein bekanntes Colistin-Resistenzgen und stellt ein Homologon zu den mobilen Resistenzgenen (*mcr*) dar. Das Gen vermittelt die Modifikation von Lipid A durch die Zugabe von 4-Amino-4-desoxy-L-arabinose und Phosphoethanolamin, was zu einer weniger negativ geladenen Zellmembran führt.

4.3.4 neue mögliche Resistenzgene

Bei der detaillierten Untersuchung der Colistin-Resistenz konnte für 18 Isolate kein schlüssiger Resistenzmechanismus ermittelt werden. Weder fanden sich in der Literatur beschriebene chromosomale Resistenzgene, noch konnten mobile Resistenzgene detektiert werden. Der Colistin-MHK-Wert lag für diese Isolate zwischen 4 und 64 µg/ml. Auffällig war, dass alle Isolate der Spezies *V. harveyi* und *V. alginolyticus* betroffen waren.

Weitere Analysen für alle *mcr*-Klassifizierungen in den sequenzierten Isolaten wurden über eine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Analyse mittels Geneious durchgeführt. Dazu wurde eine lokale Datenbank mit allen bekannten *mcr*-Genen erstellt und alle Contigs überprüft.

Es konnten bei vielen Isolaten Teiltreffer auf jeweils einen chromosomalen Contig ermittelt werden. Anschließend erfolgte zur Identifizierung der ermittelten Hits eine RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology)-Annotation dieser Contigs. An dieser Position wurde bei vielen Isolaten eine putative Lipid A phosphoethanolamine transferase entdeckt.

Identifikation von möglichen neuen Resistenzgenen

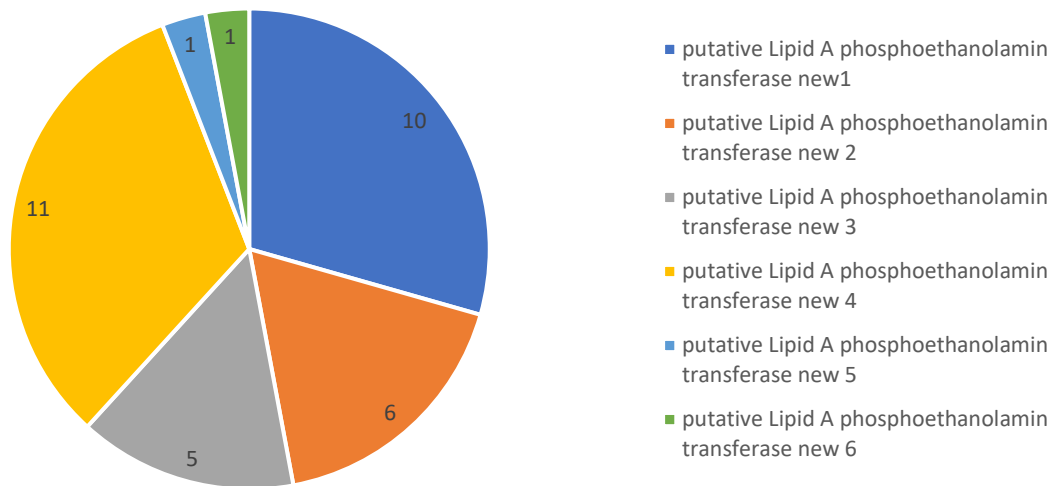


Abbildung 14 Identifikation von möglichen neuen Resistenzgenen

Es konnten für 34 Isolate mögliche neue Resistenzgene identifiziert werden, bei zehn Isolaten wurde die putative Lipid A phosphoethanolamintransferase new 1 entdeckt. Diese zehn Isolate wiesen bei allen Speziesidentifikationen die Spezies *V. harveyi* auf. Für neun Isolate konnten hier MHK-Werte $>2 \mu\text{g/ml}$ gegenüber Colistin ermittelt werden, ein Isolat wies einen MHK-Wert von $2 \mu\text{g/ml}$ auf. Dieses Isolat trägt auf dem putativen Protein ein vorzeitiges Stop-Codon. Die Position des Stop-Codons war 226 bei einer Proteingesamtlänge von 550 Aminosäuren. Das zweite Resistenzgen wurde bei sechs Isolaten der Spezies *V. alginolyticus* und *V. diabolicus* gefunden. Die putative Lipid A phosphoethanolamin transferase new 3 konnte bei den Isolaten der Spezies, die als unbekannte Isolate mitgeführt wurden, ermittelt werden (N=5). Es wurde eine weitere, vierte putative Lipid A phosphoethanolamin transferase bei allen *V. vulnificus*-Isolaten (N=11) entdeckt, die zusätzlich die Effluxpumpe TrkA trugen. Schließlich folgte dann noch eine fünfte und sechste Variante der putativen Lipid A phosphoethanolamin transferase bei jeweils einem *V. plantisponsor* und einem *V. proteolyticus* (**Abbildung 14**).

Zusätzlich wurde mittels Geneious ein phylogenetischer Baum erstellt, um zu veranschaulichen, in welcher Verwandtschaft diese Gene mit den bekannten *mcr*-Genen und dem *eptA*-Gen stehen. Der folgende phylogenetische Baum ist ein neighbor-joining Stammbaum nach dem hky-Berechnungsmodell.

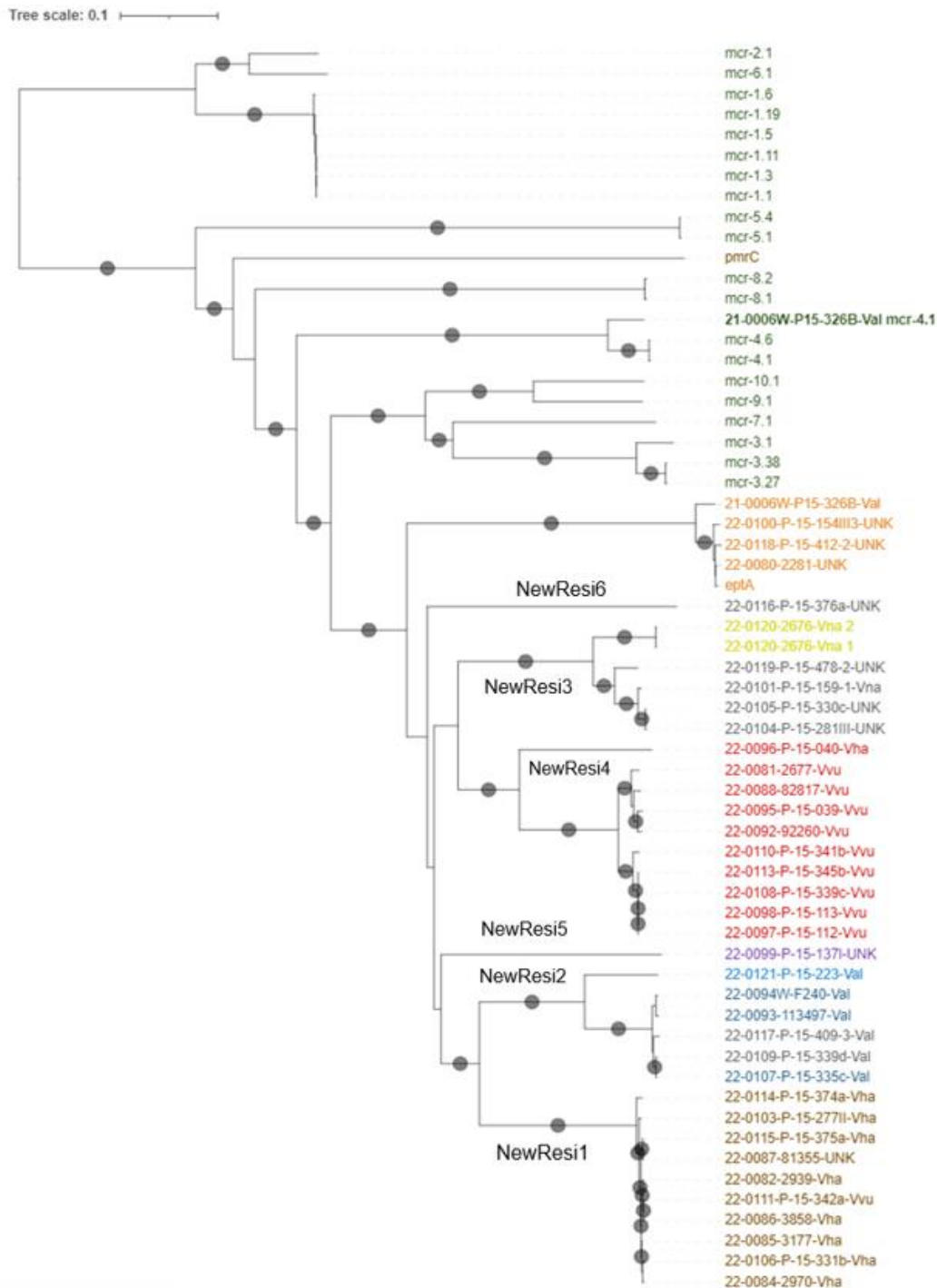


Abbildung 15 Stammbaum aller *mcr*-Genen, *pmrC*, *eptA* und den neuen möglichen Resistenzgenen

Der neighbor-joining Stammbaum ist nach dem hky-Berechnungsmodell erstellt worden. Die Farbcodierung entspricht in Abhängigkeit von der Spezies den jeweiligen neuen möglichen Resistenzgenen. Die grauen Kreise repräsentieren die Bootstraps-Werte, die mit einer Konfidenz >70 % angeben, wie wahrscheinlich es ist, dass diese Proben miteinander in phylogenetischer Verwandtschaft stehen. Die Bezeichnung NewResi (1-6) stellt die möglichen neuen Resistenzgene dar.

Der Stammbaum wurde mit einem *mcr*-Homolog, dem sog. *pmrC*, welches aus dem Bakterium *Salmonella* stammt, dargestellt. Die ermittelten Gene clustern speziesspezifisch im Stammbaum. Innerhalb dieser Cluster haben diese eine sehr hohe Identität (>98 %). Zu erkennen sind auch distinkte Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies von bis zu 48 %. Die neu entdeckten Resistenzgene sind genetisch den Resistenzgenen *eptA* und *mcr* ähnlich. *eptA*, ebenfalls eine Lipid A phosphoethanolamin transferase, genauso wie *mcr-1* bis *mcr-10*, ist ein bekanntes chromosomal kodierendes *Vibrio*-Resistenzgen aus *V. cholerae*. In genetischer Hinsicht sind die putativen Resistenzgene *eptA* ähnlicher, als den bekannten *mcr*-Genen (**Abbildung 15**).

Für alle untersuchten Isolate konnten bekannte und neue Colistin-Resistenzgene ermittelt werden, die womöglich auch für die hohen MHK-Werte gegenüber Colistin verantwortlich sind.

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Betrachtung von fischpathogenen *Vibrio* spp.

Die Betrachtung fischpathogener *Vibrio* spp. beschränkt sich auf im Zuge dieser Arbeit ermittelte Spezies, über MALDI-TOF MS waren diese: *V. alginolyticus* (11), *V. anguillarum* (2), *V. harveyi* (9), *V. fluvialis* (1), *V. navarrensis* (2), und *V. vulnificus* (11). Die Speziesidentifikation im TYGS ergab folgende Spezies: *V. alginolyticus* (5), *V. cholerae* (4), *V. cidicii* (1), *V. diabolicus* (1), *V. harveyi* (10), *V. metoecus* (4), *V. mimicus* (1), *V. plantisponsor* (1) und *V. proteolyticus* (1). Im 16S rRNA-Stammbaum finden sich die Spezies *V. alginolyticus* (3), *V. cholerae* (3), *V. cidicii* (1), *V. diabolicus* (1), *V. harveyi* (10), *V. mimicus* (6), *V. plantisponsor* (1) und *V. vulnificus* (11) wieder.

Die in dieser Untersuchung ermittelten Spezies stimmen mit solchen überein, die in anderen Studien beschrieben sind. Übereinstimmungen finden sich beispielsweise oftmals in der Häufigkeit der Funde von *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* und *V. anguillarum* (Sadat et al. 2021; Blanch et al. 2009; Amalina et al. 2019).

In anderen Studien konnten auch fischpathogene Bakterien wie *V. carchariae* und *V. campbellii* ermittelt werden, die in dieser Untersuchung nicht identifiziert wurden (Lee et al. 2002; Sadat et al. 2021; Amalina et al. 2019; Mohamad et al. 2019).

5.2 Vergleich der Studien

Wie in 1.3 beschrieben ist *V. anguillarum* das weltweit am weitesten verbreitete Fischpathogen und ist für eine hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate verantwortlich (Jun und Woo 2003). In unserer Untersuchung zählte *V. anguillarum* zu einer der am seltensten vorkommenden Spezies. Diese wurde mittels MALDI-TOF MS nur zweimal identifiziert, sowohl über TYGS als auch über die Bestimmung mittels 16S rRNA konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Auch zählt *V. alginolyticus* zu den am häufigsten vorkommenden Spezies in unterschiedlichen Fischarten (Brennholt et al. 2014). In diesem Fall konnte das in dieser Untersuchung ebenfalls beobachtet werden. Beim MALDI-TOF MS konnten elf, beim TYGS fünf und beim 16S rRNA drei *V. alginolyticus* identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten außerdem *V. vulnificus*, *V. harveyi* und *V. cholerae* häufig nachgewiesen werden. Das könnte evtl. daran liegen, dass die Spezies *V. vulnificus* und auch *V. cholerae* in Europa weit verbreitet sind, insbesondere an der Nord- und Ostseeküste, wie in 1.2 beschrieben. Dabei konnten in zwei Überwachungsstudien an der Nord- und Ostseeküste häufig *V. vulnificus* und auch *V. cholerae* identifiziert werden (Brennholt et al. 2014). Die Spezies *V. harveyi* findet sich insbesondere in Gewässern in Asien, Südeuropa und auch in Südamerika wieder (Zhang et al. 2020).

5.2.1 Vergleich der Verfahren zur Speziesidentifikation

In der folgenden Abbildung ist der Vergleich zwischen den Verfahren mit den ermittelten Spezies veranschaulicht.

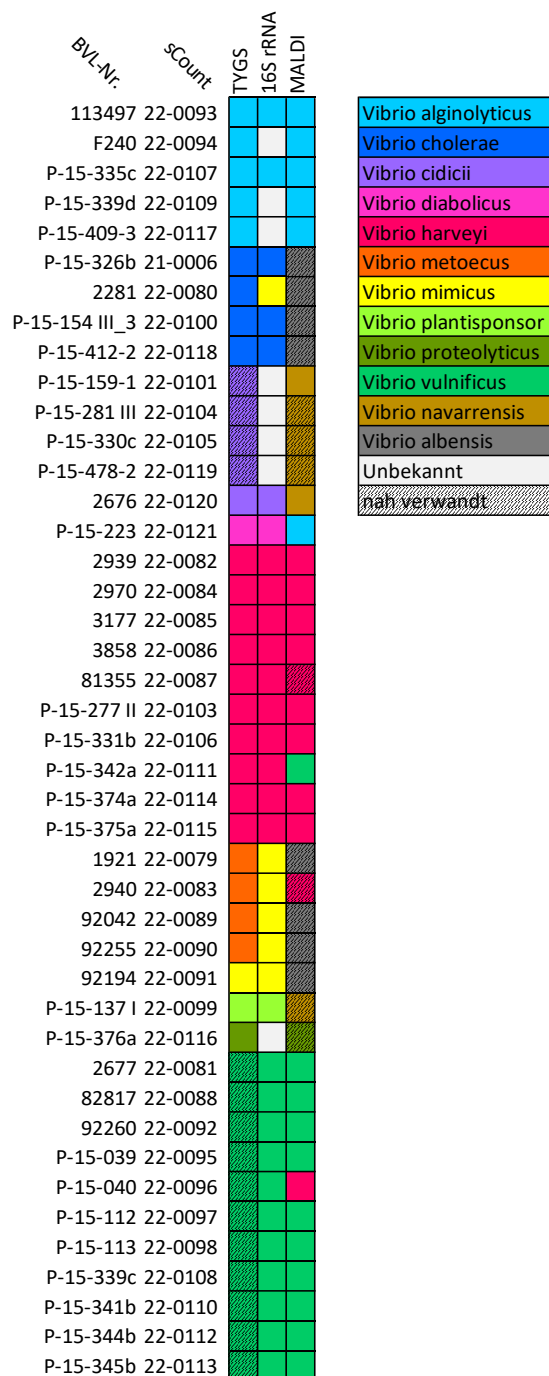


Abbildung 16 Vergleich der Speziesidentifikation.

Dargestellt ist der Unterschied zwischen TYGS, 16S rRNA-Stammbaum und MALDI-TOF MS mit den untersuchten Isolaten (BVL-Nr. u. sCount-Nr.). Farbskalierung zu den jeweiligen Spezies (s. Legende), schraffierte Kästchen: Ergebnisse mit geringer statistischer Belastbarkeit.

Zu erkennen sind drei Spezies, die gut mit allen drei Methoden differenziert werden konnten: *V. harveyi*, *V. vulnificus* und *V. alginolyticus*. Sowohl beim MALDI-TOF MS, über TYGS und im 16S rRNA-Stammbaum konnten diese drei Spezies für die meisten Isolate in Übereinstimmung identifiziert werden. Die Isolate, die nicht übereinstimmend in den Verfahren identifiziert werden konnten (1921, 2281, 2940, 92042, 92255, 92194) gehören alle der *Cholerae*-Klade an. In einer anderen Studie

wurden ebenfalls mittels 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode und einer BLAST-Analyse Ähnlichkeiten zwischen *V. cholerae* und *V. mimicus* untersucht. Es wurde dort nachgewiesen, dass Ähnlichkeiten von bis zu 90 % zwischen den Spezies vorhanden sein können (Samira Kiani et al. 2016). Die hohe genetische Ähnlichkeit zwischen den Spezies *V. cholerae*, *V. mimicus* und *V. metoecus* führte in unseren Ergebnissen zwischen den ausgewählten Methoden zu diskrepanten Ergebnissen.

Zu erkennen sind ebenfalls Isolate, die zwar in den TYGS- und 16S rRNA-Ergebnissen, aber nicht mit dem MALDI-TOF MS-Ergebnissen übereinstimmten. Die unterschiedlichen Ergebnisse im Hinblick auf die verschiedenen Spezies sind auf die unterschiedlichen Datenbanken der jeweiligen Verfahren zurückzuführen. Die bessere Identifikation von *V. harveyi* und *V. vulnificus* liegt ebenfalls an den hinterlegten Datenbanken. Diese beiden Spezies, wie in 5.1 beschrieben, zählen zu denen, die am häufigsten auftreten, daher ist insbesondere die MALDI-TOF MS Datenbank größer. Hingegen sind die Spezies *V. mimicus* und *V. metoecus* eher weniger bekannt bzw. erforscht und daher ist es schwer möglich diese mit anderen gleichartigen Isolaten abzugleichen (Strejcek et al. 2018).

Unsere Ergebnisse zeigten eine Übereinstimmung von 46,57 % zwischen dem MALDI-TOF MS und der 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode. Weiterhin stimmen 30,23 % der MALDI-TOF MS- und TYGS-Ergebnisse miteinander überein. Bei der 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode und TYGS konnte eine Übereinstimmung von 41,86 % erzielt werden.

In anderen Studien wurden für fischpathogene Bakterien die Methoden MALDI-TOF MS, TYGS und auch die 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode angewandt (Piamsomboon et al. 2020; Dieckmann et al. 2010; Moussa et al. 2021; Colston et al. 2014).

In einer Studie wurden der MALDI-TOF MS und die 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode miteinander verglichen. Auf Artenebene wurden von 72 Isolaten nur 42,67 % Übereinstimmungen zwischen den zwei Verfahren ermittelt. In dieser Studie wurden verschiedene Bakterien, die verantwortlich sind für Infektionskrankheiten von Zuchtfischen, darunter zählen *Streptococcus* spp. und *Aeromonas* spp., untersucht (Piamsomboon et al. 2020). Ein Vergleich mit TYGS, der 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode und auch dem MALDI-TOF MS konnte nicht gefunden werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung speziell für *Vibrio* spp. kann gesagt werden, dass die Methode MALDI-TOF MS zur Speziesidentifizierung gut anwendbar ist, wenn hinreichend Referenzeinträge in der Datenbank geführt sind, wie bspw. für *V. vulnificus*, *V. harveyi* und *V. alginolyticus*. Bei weniger frequenten Spezies stößt diese Methode an ihre Grenzen.

Bei der 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode konnte nicht für jede Spezies eine zugehörige Referenzsequenz gefunden werden, daher können die Ergebnisse bspw. bei *V. alginolyticus*, *V. navarrensis* bzw. *V. cidicii* und *V. proteolyticus* variieren. Die 16S rRNA-Gensequenzierungsmethode ist nicht zuverlässig für eine Unterscheidung auf Artenebene, da die 16S rRNA-Gene zum Teil eine hohe Sequenzidentität aufweisen (Strejcek et al. 2018; Peker et al. 2019).

Die TYGS-Ergebnisse wären deutlich besser gewesen, wenn die Spezies *V. vulnificus* nicht als potenziell neue Spezies klassifiziert worden wäre. Dann hätte sich die Übereinstimmungszahl zwischen den zwei anderen Verfahren deutlich verbessert. Die Datenbank von TYGS wird wöchentlich aktualisiert und evtl. konnten in dieser Arbeit Subspezies von *V. vulnificus* ermittelt werden. Es ist fraglich, ob bei diesen Isolaten eine neue *Vibrio* spp. vorlag. Wahrscheinlicher ist, dass bisher keine repräsentativen Vertreter fischpathogener Isolate in der TYGS Datenbank hinterlegt sind (Meier-Kolthoff und Göker 2019). Alle ermittelten Isolate waren sehr nah verwandt und bildeten eine eigene phylogentische Klade, sodass ein Zufallsbefund ausgeschlossen werden kann.

5.2.2 Verteilung der Antibiotikaresistenzgene

Durch den Chi-Quadrat-Test konnte ermittelt werden, dass die GERM-Vet- und Zierfisch-Isolate hinsichtlich der auftretenden Spezies miteinander verglichen werden konnten. Da sich auch unter den GERM-Vet-Isolaten zehn Zierfisch-Isolate befanden, wurde geprüft, ob sich die Werte zu den eigentlichen Zierfisch-Isolaten aus 2015/16 unterschieden oder Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Resistenzgene auftraten.

Zwei der entsprechenden GERM-Vet-Isolate sind identisch. Wie in 4.2.2 beschrieben, konnte für zwei Isolate (92042 u. 92255) eine Identität von 100 % ermittelt werden, die beiden Isolate wurden im gleichen Labor, im selben Jahr (2009), jedoch in unterschiedlichen Monaten (Juni u. Juli) isoliert. Die zwei Isolate verfügen

auch über die gleichen Resistenzgene und weisen sehr ähnliche MHK-Werte auf, sodass sich vermuten lässt, dass die Isolate gleicher Quelle zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt wurden. In die vergleichende Wertung gelangten also neun Isolate der Zierfische der *GERM-Vet*-Isolate. Diese umfassten die Spezies *V. harveyi*, *V. metecous* bzw. *V. mimicus* und *V. vulnificus*. Bei den Zierfisch-Isolaten waren hauptsächlich die Spezies *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, und *V. vulnificus* vertreten.

Die Zierfischisolate unter den *GERM-Vet*-Isolaten unterscheiden sich in den Resistenzgenen. Gemeinsamkeiten bestehen zwischen zwei Isolaten (1921 u. 92255) für drei Resistenzgene: *almG*, *blaPSE* und *gsplEF*. Zwischen drei weiteren Isolaten (2939, 2970 u. 3858) für die Resistenzgene *blaVHH*, *tet(35)* und *tet(34)*. Im Unterschied zu den Zierfisch-Isolaten traten die Resistenzgene *almG*, *blaVHH*, *tet(34)* und *tet(35)* auf. Allerdings finden sich auch viele Resistenzgene in den Zierfischisolaten der *GERM-Vet*-Isolate nicht wieder. Unter anderem traten ausschließlich bei den Zierfisch-Isolaten die Resistenzgene *blaCARB-42* (P-15-335c, P-15-409 III, P-15-223), *tet(D)* (P-15-154 III), *tet(M)* (P-15-154 III) und *sul2* (P-15-339c) auf.

Wie in 4.3.1 beschrieben, ist das in der Gesamtheit der Isolate vorherrschende Resistenzgen *tet(34)*, gefolgt von *tet(35)*. Allerdings konnten insbesondere für die Isolate, die die Resistenzgene *tet(34)* und *tet(35)* tragen, Werte von unter 0,5 µg/mL gegenüber Tetrazyklin ermittelt werden, was dafür spricht, dass die Resistenz nicht phänotypisch ausgeprägt ist. An der Washington University, welche auf die Nomenklatur von Tetrazyklinen spezialisiert ist, wurde überprüft, welche Informationen über diese *tet*-Gene zur Verfügung stehen. In einer Publikation wird veranschaulicht, dass die Effluxpumpe für *tet(35)* nicht verwandt mit anderen *tet*-Effluxpumpen ist (Washington University und Marilyn C. Roberts 2021). Eine Studie berichtet von einer Tetrazyklinresistenz bei *tet(34)*- und *tet(35)*-tragenden Isolaten, betont jedoch, dass diese *tet*-Gene weiterhin untersucht werden müssen, da deren grundlegende Funktion noch immer fraglich ist (Roberts 2005).

5.2.3 Verteilung der Colistin-Resistenzgene

In 4.3.3 wurden die in den untersuchten Isolaten gefundenen Resistenzgene gegenüber Colistin beschrieben.

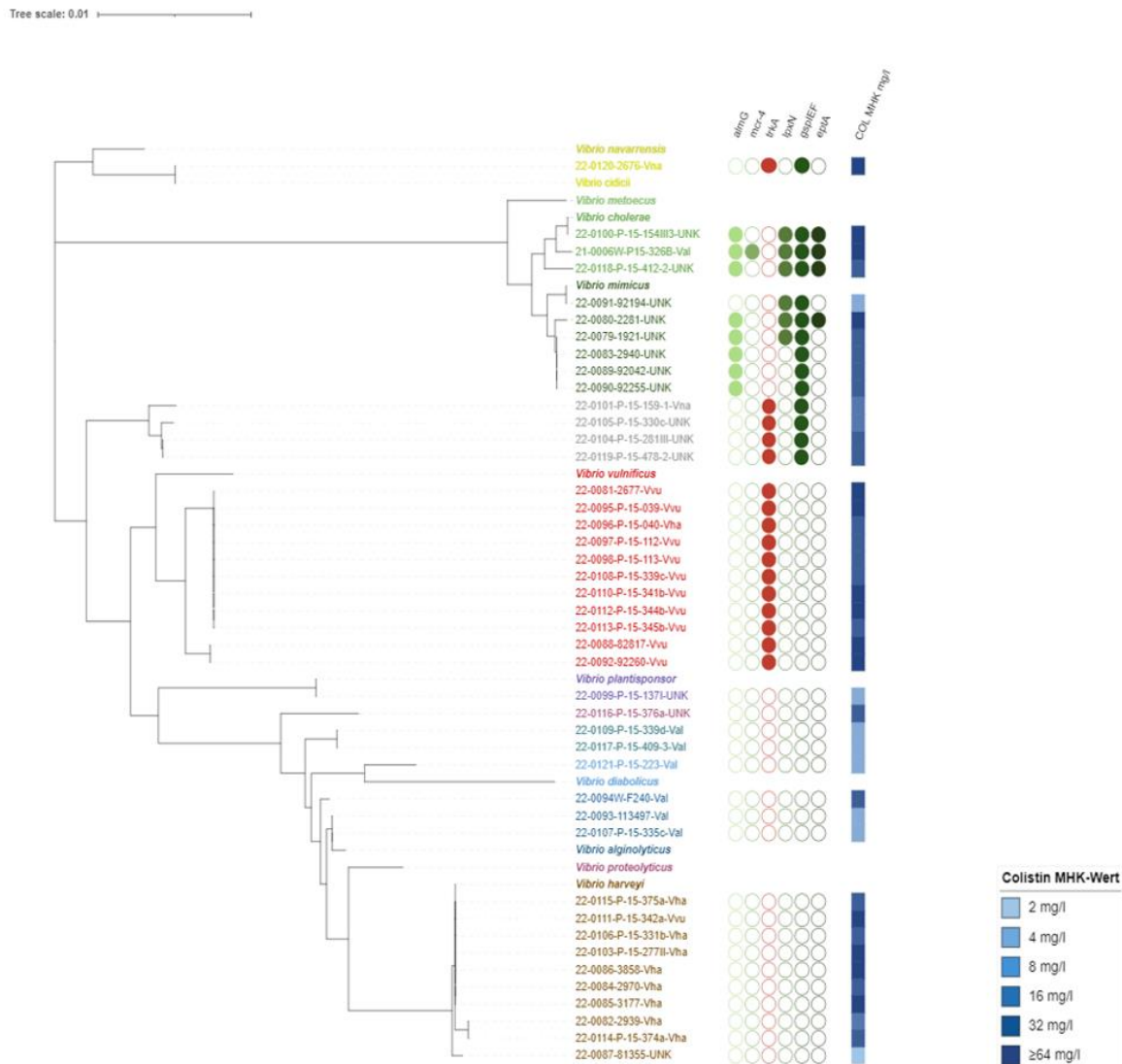


Abbildung 17 16S rRNA-Stammbaum mit bekannten Colistin-Resistenzgenen.

16S rRNA-Stammbaum mit den ausgewählten Referenzsequenzen, den bekannten Colistin-Resistenzgenen mit farblicher Zuordnung und den MHK-Werten gegenüber Colistin. (s. Legende) (Scalebar = Anzahl d. Substitutionen/1000 Nukl.)

almG wurde in fünf GERM-Vet- und drei Zierfisch-Isolaten identifiziert. Mehrere Studien zeigen, dass die *almG*-Gene ausschließlich in *V. cholerae*-Isolaten vorzufinden sind (Henderson et al. 2017; Henderson et al. 2014; Hankins et al. 2012; Destoumieux-Garzón et al. 2014). In dieser Untersuchung erstreckt sich das Vorkommen auf *V. cholerae* (37,50 %), und *V. mimicus* (62,50 %). Beide Spezies zählen zu der *Cholerae*-Klade und daher können zwischen den Spezies sehr große Ähnlichkeiten in genetischer und phänotypischer Hinsicht vorliegen (Thompson et al.

2005). Es wurden keine Studien hinsichtlich anderer *V. spp.* mit *almG* gefunden. Die MHK-Werte der *almG*-tragenden Isolate bezüglich Colistin wiesen Werte von über 32 µg/mL auf.

Das Resistenzgen *eptA* wurde in einem GERM-Vet- und drei Zierfisch-Isolaten ermittelt, bei diesen Isolaten wurden ebenfalls *almG*-Gene gefunden. Möglich ist eine gleichzeitige Expression von *eptA*- und *almG*-Gen, die eine Colistin-Resistenz fördert (Valdez et al. 2022). Wie auch *almG*, wurden auch die *eptA*-Gene ausschließlich in *V. cholerae*- und *V. mimicus*-Isolaten identifiziert. In anderen Studien konnte das *eptA*-Gen in *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. fischeri* gefunden werden (Herrera et al. 2017; Tan et al. 2021; Schwartzman et al. 2019). Für die *eptA*-tragenden Isolate wurden gegenüber Colistin ebenfalls MHK-Werte von über 32 µg/mL ermittelt.

Das Gen *trkA* wurde bei den GERM-Vet-Isolaten viermal und bei den Zierfisch-Isolaten 12-mal identifiziert. *trkA* unterscheidet sich in seiner Wirkweise zu den zuvor aufgeführten Resistenzgenen *almG* und *eptA*: Das Resistenzgen ist ein K⁺-Aufnahmeregulator der Efflux-Pumpe, die für die Resistenz gegenüber Colistin verantwortlich ist (Valdez et al. 2022). In anderen Studien wurden die *trkA*-Gene häufig bei *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* und *V. cholerae* ermittelt (Chen et al. 2004; Hwang et al. 2010). Im Rahmen dieser Untersuchung begrenzt sich der Befund auf *V. vulnificus*, *V. cidicii* und die unbekanntenen Isolate, die nicht über die Genusebene hinaus identifiziert werden konnten. Die MHK-Werte gegenüber Colistin für die *trkA*-tragenden Isolate wiesen Werte von über 16 µg/mL auf.

Gemeinsamkeiten fanden sich in den Resistenzmechanismen zweier ebenfalls detektierter Resistenzgene: *lpxN* und *gsplEF*. Beide Mechanismen beeinflussen die LPS-Biosynthese und -Modifikation und tragen so zur Colistin-Resistenz bei. In einer Studie wurde berichtet, dass die Gene in *V. cholerae*-Isolaten identifiziert wurden (Mlynarcik und Kolar 2019; El-Sayed Ahmed et al. 2020). Dies bestätigte sich auch in den untersuchten Isolaten, alle identifizierten *V. cholerae* trugen sowohl das *lpxN*- als auch das *gsplEF*-Operon. Zusätzlich dazu trugen sie *eptA* und *almG*, die gleichfalls eine Colistin-Resistenz forcieren (Abbildung 18). Die MHK-Werte gegenüber Colistin wurden für diese vier Isolate bei über 32 µg/mL detektiert. Die MHK-Werte bei den *lpxN*- und auch bei den *gsplEF*-tragenden Isolaten lagen zwischen 4 µg/mL und 64 µg/mL.

5.2.4 Entwicklung und Verbreitung der Colistin-Resistenzen

Wie in 1.6 beschrieben, gibt es unterschiedliche Resistenzmechanismen. Es können chromosomal kodierte Colistin-Resistenzen (*lpxN* und *gspIIEF*), Effluxpumpensystemen (*trkA*) und auch Plasmid-vermittelte Resistenzen (*mcr*-Gene) für die Ausprägung von Colistin-Resistenzen verantwortlich sein.

Seit der Entdeckung des ersten *mcr*-Gens konnten rückblickend viele Isolate ermittelt werden, die verschiedene *mcr*-Gene tragen (Gogry et al. 2021). Von 1980 bis 2005 konnten *mcr*-Resistenzgene aus Geflügel und Mastkälbern global isoliert werden. Weiterhin konnte das Vorhandensein von *mcr*-Genen in verschiedenen *Enterobacteriaceae* weltweit in über 30 Ländern bei Nutztieren, Wildtieren, Lebensmitteln, Menschen, Wildvögeln und auch Vektorinsekten festgestellt werden. In einer Studie stellte sich heraus, dass bei den 457 untersuchten Proben die meisten *mcr-1* Isolate in China, gefolgt von Vietnam und Deutschland, ermittelt wurden (Wang et al. 2018). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls bestätigt, dass die Prävalenz von Colistin-Resistenzen in Asien höher ist, als in Europa oder Amerika. Allerdings zählt China auch zu einem der größten Verbraucher von antimikrobiellen Mitteln in der Veterinärmedizin (Hayer et al. 2022). Besonders an den *mcr*-Genen ist, dass sie plasmidal vorliegen. Vor ihrer Entdeckung wurde angenommen, dass eine Colistin-Resistenz ausschließlich chromosomal vorläge.

5.2.5 *mcr-4* Gen

Wie in 4.3.2 beschrieben konnte ein Isolat (P-15-326b) mit einem *mcr-4* Gen und zusätzlich mit *almG*, *eptA*, *lpxN* und *gspIIEF* identifiziert werden. Das Isolat wies einen MHK-Wert von 64 µg/mL gegenüber Colistin auf. Wie zuvor beschrieben, ist es möglich, dass diese Resistenzgene zu einer Erhöhung der Colistin-Resistenz beitragen können. In einer Studie wurde beschrieben, dass das *mcr-1* Gen zu einer 4- bis 8-fachen Erhöhung der MHK-Werte gegenüber Colistin in *E. coli*-Isolaten führen kann (Hayer et al. 2022; Gogry et al. 2021).

Allerdings kommt die Frage auf, aus welchem Grund das Isolat ein *mcr-4* Gen trug, obwohl das Bakterium auch ein chromosomal codiertes *eptA*-Resistenzgen mit der gleichen Funktion hat. Interessanterweise trug das *eptA*-Gen im Isolat P-15-326b im 5'-Bereich viele Mutationen, was insbesondere im C-terminalen Bereich zu vielen Aminosäuresubstitutionen führt. Die Vermutung liegt nahe, dass das chromosomale

Gen dadurch nicht mehr funktional war oder eine verringerte Aktivität besaß. Nur dadurch lohnte es sich für das Isolat das aufgenommene *mcr-4* Gen zu behalten. Kombinationen von Resistenzmechanismen können zu einer Verringerung der Arzneimittelempfindlichkeit führen, aber auch die relative Fitness des Isolats beeinflussen (Machuca et al. 2014).

5.2.6 *mcr-4* Plasmid

In dieser Untersuchung wurde ein *mcr-4* tragendes Plasmid im Isolat P-15-326b entdeckt, bei dem es weder in der NCBI-Datenbank noch über andere Tools möglich war, andere funktionelle Gene des Plasmids zu detektieren. Es wurden keine bekannten Funktionseinheiten, wie z.B. die für ein Plasmid typische Relaxase oder Mobilisationproteine gefunden. Durch weitere Analysen konnten ausschließlich katalytische Domänen dieser Proteine gefunden werden, sodass die Funktionalität des Plasmids nicht abschließend bestätigt werden konnte. Weiterhin trug das Plasmid nur das *mcr-4* Gen, und keine anderen Gene, die für eine eventuelle Co-Selektion verantwortlich sein könnten, sodass das Vorhandensein des Plasmids vermutlich allein auf das mobile Colistin-Resistenzgen zurückzuführen war. Plasmide können auch andere Resistenzgene z.B. gegenüber anderen Antibiotika und Schwermetallen besitzen oder auch Träger von Virulenzgenen sein. Dadurch könnte das Bakterium über zusätzliche Vorteile verfügen, bspw. um das Plasmid zu teilen (Baker-Austin et al. 2006). Dies ist hier nicht der Fall.

Die Frage, ob das Plasmid sich transferieren lässt, um sich zu verbreiten und somit auch häufiger auftreten könnte, kann nicht abschließend beantwortet werden. Da das Plasmid über putative katalytische Domänen verfügt, kann vermutet werden, dass es sich um ein transferables Plasmid handeln könnte. Im Vergleich zu anderen Studien kann festgestellt werden, dass sich seit dem Jahr 1980 *mcr*-Gene sehr verbreitet haben. Die weitere Verbreitung kann eine ernsthafte Bedrohung für die Behandlung von Erkrankungen darstellen (Wang et al. 2018; Hayer et al. 2022).

5.2.7 neue Resistenzgene

Es wurden mögliche neue chromosomale Resistenzfaktoren für eine Vielzahl der Isolate ermittelt, die noch keine bekannten Colistin-Resistenzgene trugen. Wie in 4.3.4 veranschaulicht, konnte ermittelt werden, dass diese putativen Resistenzgene eine relativ hohe Identität zueinander und auch zu den bisher bekannten *mcr*-Genen aufwiesen. Insbesondere die hohe Ähnlichkeit zum chromosomal-kodierten *eptA*-Gen

deutet auf einen allgemeinen Resistenzmechanismus durch *eptA*-Gene in der Gattung *Vibrio* hin. Durch die Verwandtschaft zwischen *eptA*- und auch den *mcr*-Genen und deren gleichen Resistenzmechanismus liegt nahe, dass auch die neuen möglichen Resistenzgene durch die Modifikation des LPS eine Colistin-Resistenz vermitteln. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die neuen putativen Colistin-Resistenzgene speziesspezifisch clustern. Bspw. konnte ausschließlich für *V. harveyi* ein mögliches neues Resistenzgen identifiziert werden (NewResi1), welches innerhalb der Klade eine sehr hohe Identität >98 % besaß. Alle betroffenen Isolate wiesen gegenüber Colistin MHK-Werte von über 16 µg/mL auf, mit Ausnahme eines Isolates, mit einem MHK-Wert von 2 µg/mL. Dieses Isolat (83155) trug ein vorzeitiges Stop-Codon und es lässt sich vermuten, dass aufgrund dessen ein deutlich niedrigerer MHK-Wert festgestellt wurde. Das Stop-Codon befindet sich an Position 226, daher kommt es zu einem verkürzten und nicht-funktionellen Protein.

Es liegen deutliche Hinweise auf neue, noch nicht bekannte, erwartete Resistenzfaktoren vor. Diese putativen Proteine besitzen eine ähnliche Struktur wie die bekannten Colistin-Resistenzgene *mcr* und *eptA* und für einige Isolate (41 %) konnten keine weiteren bekannten Colistin-Resistenzmechanismen festgestellt werden, die den erhöhten Colistin-MHK-Wert erklären könnten. Nichtsdestotrotz muss die Funktion des Proteins und der zugrundeliegende Resistenzmechanismus abschließend geklärt werden.

5.2.8 Ausblick

Nach hinreichender Literaturrecherche konnte festgestellt werden, dass das in dieser Studie detektierte Plasmid ein bisher unbekanntes Plasmid ist, welches noch nicht beschrieben wurde. Umso wichtiger erscheint eine detaillierte Analyse über das Plasmid, da sich keine Aussage über die Transferabilität treffen lässt. Aus den wenigen Daten, die zur Verfügung stehen, kann weder eine Risikoabschätzung erfolgen, noch festgestellt werden, ob das Plasmid auf andere Spezies übertragbar wäre.

Um festzustellen, ob das untersuchte *mcr-4* tragende Plasmid ein Risiko zu einer weiteren Verbreitung von mobilen Colistin-Resistenzgenen in *Vibrio* spp. birgt, ist es notwendig weitere Analysen durchzuführen. Diese können sein: Konjugation oder Klonierung des Plasmides in Colistin-sensible Isolate, Genexpressionsanalysen und

Ganzgenomsequenzierung, Vergleich mit den COG-Klassifizierungen und abschließende MHK-Wert-Bestimmungen.

Der Nachweis des Resistenzmechanismus bei den möglichen neuen Resistenzgenen kann mittels molekularbiologischer Methoden erfolgen. Es sollte eine Funktionsbestätigung durchgeführt werden, ob diese Gene überhaupt eine phänotypische Colistin-Resistenz vermitteln, oder den MHK-Wert gegenüber Colistin beeinflussen können. Eine weitere Möglichkeit wäre, einen konstitutiv exprimierenden Vektor herzustellen, diesen in *E. coli* zu transformieren und abschließend die Wirkung auf den Colistin-MHK-Wert prüfen.

Einen zusätzlichen Aspekt stellen die *tet(35)*- und die *tet(34)*-Gene dar; Isolate mit diesen Resistenzgenen zeigten gegenüber Tetracyclin MHK-Werte von unter 0,5 µg/mL. Es ist vorstellbar, dass diese Resistenzgene in *Vibrio* spp evtl. keine Tetrazyklinresistenz vermittelt, sondern eine andere Funktion besitzen.

7. Literaturverzeichnis

- Aghapour, Zahra; Gholizadeh, Pourya; Ganbarov, Khudaverdi; Bialvaei, Abed Zahedi; Mahmood, Suhad Saad; Tanomand, Asghar et al. (2019): Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. In: *Infection and drug resistance* 12, S. 965–975. DOI: 10.2147/IDR.S199844.
- Amalina, Nor Zulkipli; Santha, Silvaraj; Zulperi, Dzarifah; Amal, Mohammad Noor Azmai; Yusof, Mohd Termizi; Zamri-Saad, Mohd; Ina-Salwany, Md Yasin (2019): Prevalence, antimicrobial susceptibility and plasmid profiling of *Vibrio* spp. isolated from cultured groupers in Peninsular Malaysia. In: *BMC microbiology* 19 (1), S. 251. DOI: 10.1186/s12866-019-1624-2.
- Andrews, J. M. (2001): Determination of minimum inhibitory concentrations. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 48 Suppl 1, S. 5–16. DOI: 10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- Baker-Austin, Craig (2018): *Vibrio* spp. infections. In: *Nature reviews / Disease Primers. Disease Primers* 4 (1), S. 1–19. DOI: 10.1038/s41572-018-0005-8.
- Baker-Austin, Craig; Trinanes, Joaquin A.; Salmenlinna, Saara; Löfdahl, Margareta; Siitonen, Anja; Taylor, Nick G. H.; Martinez-Urtaza, Jaime (2016): Heat Wave-Associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014. In: *Emerging Infectious Diseases* 22 (7), S. 1216–1220. DOI: 10.3201/eid2207.151996.
- Baker-Austin, Craig; Trinanes, Joaquin A.; Taylor, Nick G. H.; Hartnell, Rachel; Siitonen, Anja; Martinez-Urtaza, Jaime (2013): Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. In: *Nature Clim Change* 3 (1), S. 73–77. DOI: 10.1038/nclimate1628.
- Baker-Austin, Craig; Wright, Meredith S.; Stepanauskas, Ramunas; McArthur, J. V. (2006): Co-selection of antibiotic and metal resistance. In: *Trends in microbiology* 14 (4), S. 176–182. DOI: 10.1016/j.tim.2006.02.006.
- BfR (2021): Fragen und Antworten zum Antibiotikum Colistin und zur übertragbaren Colistin-Resistenz von Bakterien - Fragen und Antworten des BfR vom 03. August 2021.
- Bialvaei, Abed Zahedi; Samadi Kafil, Hossein (2015): Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. In: *Current Medical Research and Opinion* 31 (4), S. 707–721. DOI: 10.1185/03007995.2015.1018989.
- Blanch, A. R.; Hispano, C.; Bultó, P.; Ballesté, E.; González-López, J. J.; Vilanova, X. (2009): Comparison of *Vibrio* spp. populations found in seawater, in exhibition aquaria, in fish intestine and in fish feed. In: *Journal of applied microbiology* 106 (1), S. 57–65. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03974.x.
- Boyd, E. Fidelma; Carpenter, Megan R.; Chowdhury, Nityananda; Cohen, Analuisa L.; Haines-Menges, Brandy L.; Kalburge, Sai S. et al. (2015): Post-Genomic Analysis of Members of the Family Vibrionaceae. In: *Microbiology spectrum* 3 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.VE-0009-2014.

Brehm, Thomas Theo; Berneking, Laura; Sena Martins, Meike; Dupke, Susann; Jacob, Daniela; Drechsel, Oliver et al. (2021): Heatwave-associated *Vibrio* infections in Germany, 2018 and 2019. In: *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 26 (41). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.41.2002041.

Brennholt; Simone Böer; Ernst-August Heinemeyer; Katrin Luden; Gerhard Hauk; Oliver Duty et al. (2014): Klimabedingte Änderungen der Gewässerhygiene und Auswirkungen auf das Baggergutmanagement in den Küstengewässern : Schlussbericht KLIWAS-Projekt 3.04.

BVL (2021): BVL - Pressemitteilungen - Abgabemengen von Antibiotika in der Tiermedizin leicht gestiegen. Online verfügbar unter https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/05_tierarzneimittel/2021/2021_10_12_PI_Abgabemengen_Antibiotika_Tiermedizin.html, zuletzt geprüft am 25.02.2022.

Carboni, Gian Piero (2021): The enigma of Pacini's *Vibrio cholerae* discovery. In: *Journal of medical microbiology* 70 (11). DOI: 10.1099/jmm.0.001450.

Chen, Yu-Chung; Chuang, Yin-Ching; Chang, Chun-Chin; Jeang, Chii-Ling; Chang, Ming-Chung (2004): A K⁺ uptake protein, TrkA, is required for serum, protamine, and polymyxin B resistance in *Vibrio vulnificus*. In: *Infection and Immunity* 72 (2), S. 629–636. DOI: 10.1128/IAI.72.2.629-636.2004.

Clatworthy, Anne E.; Pierson, Emily; Hung, Deborah T. (2007): Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. In: *Nature Chemical Biology* 3 (9), S. 541–548. DOI: 10.1038/nchembio.2007.24.

CLSI (2020): VET04: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals, 3rd Edition.

Colston, Sophie M.; Fullmer, Matthew S.; Beka, Lidia; Lamy, Brigitte; Gogarten, J. Peter; Graf, Joerg (2014): Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. In: *mBio* 5 (6), e02136. DOI: 10.1128/mBio.02136-14.

Creative Proteomics: MALDI-TOF Mass Spectrometry Creative Proteomics. Online verfügbar unter <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>, zuletzt geprüft am 09.03.2021.

Davies, Julian; Davies, Dorothy (2010): Origins and evolution of antibiotic resistance. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (3), S. 417–433. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

Deneke, Carlus; Brendebach, Holger; Uelze, Laura; Borowiak, Maria; Malorny, Burkhard; Tausch, Simon H. (2021): Species-Specific Quality Control, Assembly and Contamination Detection in Microbial Isolate Sequences with AQUAMIS. In: *Genes* 12 (5). DOI: 10.3390/genes12050644.

Destoumieux-Garzón, Delphine; Duperthuy, Marylise; Vanhove, Audrey Sophie; Schmitt, Paulina; Wai, Sun Nyunt (2014): Resistance to Antimicrobial Peptides in *Vibrios*. In: *Antibiotics* 3 (4), S. 540–563. DOI: 10.3390/antibiotics3040540.

Dieckmann, R.; Strauch, E.; Alter, T. (2010): Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. In: *Journal of applied microbiology* 109 (1), S. 199–211. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04647.x.

Dikow, Rebecca B. (2011): Systematic relationships within the Vibrionaceae (Bacteria: Gammaproteobacteria): steps toward a phylogenetic taxonomy. In: *Cladistics : the international journal of the Willi Hennig Society* 27 (1), S. 9–28. DOI: 10.1111/j.1096-0031.2010.00312.x.

DNA-Diagnostik Hamburg: Next Generation Sequencing (NGS). Online verfügbar unter <https://www.dna-diagnostik.hamburg/next-generation-sequencing-ngs/>, zuletzt geprüft am 12.03.2022.

ECDC (2016-2018): JIACRA-III-Antimicrobial-Consumption-and-Resistance-in-Bacteria-from-Humans-and-Animals. Online verfügbar unter <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/third-joint-interagency-antimicrobial-consumption-and-resistance-analysis-report>, zuletzt geprüft am 25.02.2022.

Elhadi, Nasreldin (2013): Occurrence of Potentially Human Pathogenic *Vibrio* Species in the Coastal Water of the Eastern Province of Saudi Arabia. In: *Research J. of Microbiology* 8 (1), S. 1–12. DOI: 10.3923/jm.2013.1.12.

El-Sayed Ahmed, Mohamed Abd El-Gawad; Zhong, Lan-Lan; Shen, Cong; Yang, Yongqiang; Doi, Yohei; Tian, Guo-Bao (2020): Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). In: *Emerging microbes & infections* 9 (1), S. 868–885. DOI: 10.1080/22221751.2020.1754133.

EUCAST (2022): New and revised ECOFFs.

European Environment Agency (2022): European sea surface temperature. Online verfügbar unter <https://www.eea.europa.eu/ims/european-sea-surface-temperature#footnote-NY5J2ES3>, zuletzt geprüft am 25.02.2022.

Falagas, Matthew E.; Kasiakou, Sofia K. (2005): Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. In: *Clinical Infectious Diseases* 40 (9), S. 1333–1341. DOI: 10.1086/429323.

Farmer, J. J.; Michael Janda, J.; Brenner, Frances W.; Cameron, Daniel N.; Birkhead, Karen M. (2015): *Vibrio*. In: Martha E. Trujillo, Svetlana Dedysh, Paul DeVos, Brian Hedlund, Peter Kämpfer, Fred A. Rainey und William B. Whitman (Hg.): *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: Wiley, S. 1–79.

Gharaibeh, Mohammad H.; Shatnawi, Shoroq Q. (2019): An overview of colistin resistance, mobilized colistin resistance genes dissemination, global responses, and the alternatives to colistin: A review. In: *Veterinary world* 12 (11), S. 1735–1746. DOI: 10.14202/vetworld.2019.1735-1746.

Gogry, Firdoos Ahmad; Siddiqui, Mohammad Tahir; Sultan, Insha; Haq, Qazi Mohd Rizwanul (2021): Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. In: *Frontiers in medicine* 8, S. 677720. DOI: 10.3389/fmed.2021.677720.

Hamel, Mouna; Rolain, Jean-Marc; Baron, Sophie Alexandra (2021): The History of Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria: Progress and Challenges. In: *Microorganisms* 9 (2). DOI: 10.3390/microorganisms9020442.

- Hankins, Jessica V.; Madsen, James A.; Giles, David K.; Brodbelt, Jennifer S.; Trent, M. Stephen (2012): Amino acid addition to *Vibrio cholerae* LPS establishes a link between surface remodeling in gram-positive and gram-negative bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (22), S. 8722–8727. DOI: 10.1073/pnas.1201313109.
- Hayer, Shivdeep Singh; Casanova-Higes, Alejandro; Paladino, Eliana; Elnekave, Ehud; Nault, Andre; Johnson, Timothy et al. (2022): Global Distribution of Fluoroquinolone and Colistin Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin - A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Frontiers in microbiology* 13, S. 834793. DOI: 10.3389/fmicb.2022.834793.
- Henderson, Jeremy C.; Fage, Christopher D.; Cannon, Joe R.; Brodbelt, Jennifer S.; Keatinge-Clay, Adrian T.; Trent, M. Stephen (2014): Antimicrobial peptide resistance of *Vibrio cholerae* results from an LPS modification pathway related to nonribosomal peptide synthetases. In: *ACS chemical biology* 9 (10), S. 2382–2392. DOI: 10.1021/cb500438x.
- Henderson, Jeremy C.; Herrera, Carmen M.; Trent, M. Stephen (2017): AlmG, responsible for polymyxin resistance in pandemic *Vibrio cholerae*, is a glycytransferase distantly related to lipid A late acyltransferases. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (51), S. 21205–21215. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000131.
- Herrera, Carmen M.; Henderson, Jeremy C.; Crofts, Alexander A.; Trent, M. Stephen (2017): Novel coordination of lipopolysaccharide modifications in *Vibrio cholerae* promotes CAMP resistance. In: *Molecular microbiology* 106 (4), S. 582–596. DOI: 10.1111/mmi.13835.
- Hwang, Byeong Hee; Lee, Jae Won; Cha, Hyung Joon (2010): Polymerase chain reaction-based detection of total and specific *Vibrio* species. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 162 (4), S. 1187–1194. DOI: 10.1007/s12010-009-8853-z.
- Ina-Salwany, M. Y.; Al-Saari, Nurhidayu; Mohamad, Aslah; Mursidi, Fathin-Amirah; Mohd-Aris, Aslizah; Amal, M. N. A. et al. (2019): Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. In: *Journal of aquatic animal health* 31 (1), S. 3–22. DOI: 10.1002/aah.10045.
- Islam, Mohammad Tarequl; Liang, Kevin; Orata, Fabini D.; Im, Monica S.; Alam, Munirul; Lee, Christine C.; Boucher, Yann F. (2022): *Vibrio tarrae* sp. nov., a novel member of the Cholerae clade isolated from across the United States.
- Jun, Li; Woo, Norman Y. S. (2003): Pathogenicity of vibrios in fish: An overview. In: *Ocean Univ. China* 2 (2), S. 117–128. DOI: 10.1007/s11802-003-0039-7.
- Ke, Huei-Mien; Prachumwat, Anuphap; Yu, Chun-Ping; Yang, Yi-Ting; Promsri, Sutitcha; Liu, Kuan-Fu et al. (2017): Comparative genomics of *Vibrio campbellii* strains and core species of the *Vibrio Harveyi* clade. In: *Scientific reports* 7, S. 41394. DOI: 10.1038/srep41394.
- Laxminarayan, Ramanan; Duse, Adriano; Wattal, Chand; Zaidi, Anita K. M.; Wertheim, Heiman F. L.; Sumpradit, Nithima et al. (2013): Antibiotic resistance-the need for global solutions. In: *The Lancet. Infectious diseases* 13 (12), S. 1057–1098. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

- Lee, K. K.; Liu, P. C.; Chuang, W. H. (2002): Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. In: *Marine biotechnology (New York, N.Y.)* 4 (3), S. 267–277. DOI: 10.1007/s10126-002-0018-9.
- Li, Yinghui; Xie, Xu; Shi, Xiaolu; Lin, Yiman; Qiu, Yaqu; Mou, Jin et al. (2014): *Vibrio parahaemolyticus*, Southern Coastal Region of China, 2007-2012. In: *Emerging Infectious Diseases* 20 (4), S. 685–688. DOI: 10.3201/eid2004.130744.
- Liu, Yi-Yun; Wang, Yang; Walsh, Timothy R.; Yi, Ling-Xian; Zhang, Rong; Spencer, James et al. (2016): Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. In: *The Lancet Infectious Diseases* 16 (2), S. 161–168. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Machuca, Jesús; Briales, Alejandra; Labrador, Gema; Díaz-de-Alba, Paula; López-Rojas, Rafael; Docobo-Pérez, Fernando et al. (2014): Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69 (12), S. 3203–3215. DOI: 10.1093/jac/dku308.
- Meier-Kolthoff, Jan P.; Göker, Markus (2019): TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. In: *Nature communications* 10 (1), S. 2182. DOI: 10.1038/s41467-019-10210-3.
- Mlynarcik, Patrik; Kolar, Milan (2019): Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. In: *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 163 (1), S. 28–38. DOI: 10.5507/bp.2018.070.
- Mohamad, Nurliyana; Amal, Mohammad Noor Azmai; Saad, Mohd Zamri; Yasin, Ina Salwany Md; Zulkipli, Nor Amalina; Mustafa, Muskhazli; Nasruddin, Nurul Shaqinah (2019): Virulence-associated genes and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* spp. isolated from cultured marine fishes in Malaysia. In: *BMC Veterinary Research* 15 (1), S. 176. DOI: 10.1186/s12917-019-1907-8.
- Möller, Lars; Kreikemeyer, Bernd; Gerdt, Gunnar; Jost, Günter; Labrenz, Matthias (2021): Fish as a winter reservoir for *Vibrio* spp. in the southern Baltic Sea coast. In: *Journal of Marine Systems* 221, S. 103574. DOI: 10.1016/j.jmarsys.2021.103574.
- Moussa, M.; Cauvin, E.; Le Piouffle, A.; Lucas, O.; Bidault, A.; Paillard, C. et al. (2021): A MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. potentially pathogenic to marine mollusks. In: *Applied microbiology and biotechnology* 105 (6), S. 2527–2539. DOI: 10.1007/s00253-021-11141-0.
- Mutasim Elimam, Mohammed; Wagiealla Shantier, Shaza; Ahmed Gadkariem, Elrasheed; Awadalla Mohamed, Magdi (2015): Derivative Spectrophotometric Methods for the Analysis and Stability Studies of Colistin Sulphate. In: *Journal of Chemistry* 2015, S. 1–5. DOI: 10.1155/2015/624316.
- Newton, Anna; Kendall, Magdalena; Vugia, Duc J.; Henao, Olga L.; Mahon, Barbara E. (2012): Increasing Rates of Vibriosis in the United States, 1996–2010: Review of Surveillance Data From 2 Systems. In: *Clinical Infectious Diseases* 54 (suppl_5), S391-S395. DOI: 10.1093/cid/cis243.

Normark, B. Henriques; Normark, S. (2002): Evolution and spread of antibiotic resistance. In: *Journal of internal medicine* 252 (2), S. 91–106. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x.

Peker, Nilay; Garcia-Croes, Sharron; Dijkhuizen, Brigitte; Wiersma, Henry H.; van Zanten, Evert; Wisselink, Guido et al. (2019): A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S-23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification. In: *Frontiers in microbiology* 10, S. 620. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00620.

PerkinElmer; Inc. (2012): LabChip GX/GXII Automated Electrophoresis Systems - Revolutionizing RNA, DNA and Protein Analysis.

Peterson, Elizabeth; Kaur, Parjit (2018): Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 2928. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02928.

Piamsomboon, Patharapol; Jaresitthikunchai, Janthima; Hung, Tran Quang; Roytrakul, Sittiruk; Wongtavatchai, Janenuj (2020): Identification of bacterial pathogens in cultured fish with a custom peptide database constructed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). In: *BMC Veterinary Research* 16 (1), S. 52. DOI: 10.1186/s12917-020-2274-1.

Raina, Vishakha; Nayak, Tanmaya; Ray, Lopamudra; Kumari, Khushbu; Suar, Mrutyunjay (2019): A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. In: Surajit Das und HIRAK Ranjan Dash (Hg.): *Microbial diversity in the genomic era*. London: Academic Press, S. 137–152.

Robert-Koch-Institut (2020): *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020*.

Roberts, Marilyn C. (2005): Update on acquired tetracycline resistance genes. In: *FEMS microbiology letters* 245 (2), S. 195–203. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.034.

Sabnis, Akshay; Hagart, Katheryn Lh; Klöckner, Anna; Becce, Michele; Evans, Lindsay E.; Furniss, R. Christopher D. et al. (2021): Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.65836.

Sadat, A.; El-Sherbiny, H.; Zakaria, A.; Ramadan, H.; Awad, A. (2021): Prevalence, antibiogram and virulence characterization of *Vibrio* isolates from fish and shellfish in Egypt: a possible zoonotic hazard to humans. In: *Journal of applied microbiology* 131 (1), S. 485–498. DOI: 10.1111/jam.14929.

Samira Kiani; Nafiseh Sadat Naghavi; Alireza Nazari (2016): Detection of *Vibrio* Species Isolated from Ornamental Guppy Fish in Kashan, Isfahan, Iran Fish culturing Pounds.

Sawabe, Tomoo; Ogura, Yoshitoshi; Matsumura, Yuta; Feng, Gao; Amin, Akm Rohul; Mino, Sayaka et al. (2013): Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonus* sp. nov. In: *Frontiers in microbiology* 4, S. 414. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00414.

- Schar, Daniel; Klein, Eili Y.; Laxminarayan, Ramanan; Gilbert, Marius; van Boeckel, Thomas P. (2020): Global trends in antimicrobial use in aquaculture. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 21878. DOI: 10.1038/s41598-020-78849-3.
- Schwartzman, Julia A.; Lynch, Jonathan B.; Flores Ramos, Stephany; Zhou, Lawrence; Apicella, Michael A.; Yew, Joanne Y.; Ruby, Edward G. (2019): Acidic pH promotes lipopolysaccharide modification and alters colonization in a bacteria-animal mutualism. In: *Molecular microbiology* 112 (4), S. 1326–1338. DOI: 10.1111/mmi.14365.
- Semenza, Jan C.; Trinanes, Joaquin; Lohr, Wolfgang; Sudre, Bertrand; Löfdahl, Margareta; Martinez-Urtaza, Jaime et al. (2017): Environmental Suitability of Vibrio Infections in a Warming Climate: An Early Warning System. In: *Environmental health perspectives* 125 (10), S. 107004. DOI: 10.1289/EHP2198.
- Sjölund, M.; Bengtsson, S.; Bonnedahl, J.; Hernandez, J.; Olsen, B.; Kahlmeter, G. (2009): Antimicrobial susceptibility in Escherichia coli of human and avian origin--a comparison of wild-type distributions. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 (5), S. 461–465. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02705.x.
- Strejcek, Michal; Smrhova, Tereza; Junkova, Petra; Uhlik, Ondrej (2018): Whole-Cell MALDI-TOF MS Versus 16S rRNA Gene Analysis for Identification and Dereplication of Recurrent Bacterial Isolates. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 1294. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01294.
- Tagliabue, Aldo; Rappuoli, Rino (2018): Changing Priorities in Vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1068. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01068.
- Tagomori, Kenichi; Iida, Tetsuya; Honda, Takeshi (2002): Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. In: *Journal of Bacteriology* 184 (16), S. 4351–4358. DOI: 10.1128/JB.184.16.4351-4358.2002.
- Takemura, Alison F.; Chien, Diana M.; Polz, Martin F. (2014): Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 38. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00038.
- Tan, Xin; Qiao, Jun; Zhou, Qing; Huang, Danyang; Li, Hedan; Wang, Jianli; Wang, Xiaoyuan (2021): Identification of a phosphoethanolamine transferase for lipid A modification in Vibrio parahaemolyticus. In: *Food Control* 125, S. 108033. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108033.
- Thermo Fisher Scientific: Qubit Fluorometric Quantitation. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>, zuletzt geprüft am 10.03.2022.
- Thompson, F. L.; Gevers, D.; Thompson, C. C.; Dawyndt, P.; Naser, S.; Hoste, B. et al. (2005): Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9), S. 5107–5115. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005.

Uelze, Laura; Becker, Natalie; Borowiak, Maria; Busch, Ulrich; Dangel, Alexandra; Deneke, Carlus et al. (2021): Toward an Integrated Genome-Based Surveillance of *Salmonella enterica* in Germany. In: *Frontiers in microbiology* 12, S. 626941. DOI: 10.3389/fmicb.2021.626941.

Umweltbundesamt (2018): Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt.

University of Rhode Island: MIC MiSeq – Rhode Island IDeA Network of Biomedical Research Excellence. Online verfügbar unter <https://web.uri.edu/rinbre/mic/mic-services-and-resources/mic-sequencing-services/mic-miseq/>, zuletzt geprüft am 12.03.2022.

Valdez, Christian; Costa, Cátia; Simões, Marco; Carvalho, Carla C. C. R. de; Baptista, Teresa; Campos, Maria J. (2022): Detection of *mcr-1* Gene in Undefined *Vibrio* Species Isolated from Clams. In: *Microorganisms* 10 (2). DOI: 10.3390/microorganisms10020394.

Venkateswaran, K.; Dohmoto, N.; Harayama, S. (1998): Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. In: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2), S. 681–687. DOI: 10.1128/AEM.64.2.681-687.1998.

Wang, Ruobing; van Dorp, Lucy; Shaw, Liam P.; Bradley, Phelim; Wang, Qi; Wang, Xiaojuan et al. (2018): The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. In: *Nature communications* 9 (1), S. 1179. DOI: 10.1038/s41467-018-03205-z.

Washington University; Marilyn C. Roberts (2021): Mechanism of resistance for characterized *tet* and *otr* genes. In: *Washington University*.

Watts, Nick; Amann, Markus; Arnell, Nigel; Ayeb-Karlsson, Sonja; Belesova, Kristine; Boykoff, Maxwell et al. (2019): The 2019 report of The Lancet Countdown on health and climate change: ensuring that the health of a child born today is not defined by a changing climate. In: *The Lancet* 394 (10211), S. 1836–1878. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32596-6.

West, P. A. (1989): The human pathogenic vibrios--a public health update with environmental perspectives. In: *Epidemiology and Infection* 103 (1), S. 1–34. DOI: 10.1017/s0950268800030326.

WHO (2016): Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use.

Zhang, Xiao-Hua; He, Xinxin; Austin, Brian (2020): *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. In: *Marine Life Science & Technology*, S. 1–15. DOI: 10.1007/s42995-020-00037-z.

8. Anhang

Tabelle 10 ermittelte Konzentrationen / Ratio 260/280 bzw. Ratio 260/230.

BVL-Nr.	sCount	c [ng/µl]	Ratio 260/280	Ratio 260/230
1921	22-0079	50,2	1,81	1,87
2281	22-0080	8,4	1,99	1,74
2676	22-0081	11,7	2,12	1,27
2677	22-0082	5,22	1,95	2,3
2939	22-0083	15,2	46	0,52
2940	22-0084	46	1,77	1,24
2970	22-0085	18,4	1,82	1,25
3177	22-0086	39,8	1,86	3858
3858	22-0087	4,32	2,77	0,51
81355	22-0088	52,8	1,82	2,07
82817	22-0089	40,5	1,83	1,7
92042	22-0090	51,8	1,82	1,6
92255	22-0091	62,5	1,81	1,32
92194	22-0092	37,6	1,83	1,09
92260	22-0093	31,5	1,7	1,1
113497	22-0094	3,62	2,11	0,43
F240	22-0095	3,26	1,84	1,68
P-15-039	22-0096	39,8	1,91	0,66
P-15-040	22-0097	20,2	1,8	1,5
P-15-112	22-0098	44,2	1,78	1,25
P-15-113	22-0099	27,1	1,79	1,11
P-15-137 I	22-0100	7,6	1,82	2,2
P-15-154 III	22-0101	97,2	1,75	0,32
P-15-159 I	22-0102	15,9	1,78	0,9
P-15-216 III	22-0103	56,7	1,95	2,29
P-15-223	22-0104	4,26	2,71	15,44
P-15-277 II	22-0105	8,95	1,83	1,51
P-15-281 II	22-0106	29,4	1,85	1,82
P-15-330 c	22-0107	30,8	1,83	0,67
P-15-331 b	22-0108	26,1	1,83	1,6
P-15-335 c	22-0109	13,9	1,76	1,21
P-15-339 c	22-0110	43,4	1,83	1,5
P-15-339 d	22-0111	7,96	1,84	1,58
P-15-341 b	22-0112	32,2	1,88	0,51
P-15-342 a	22-0113	36,6	1,83	1,95
P-15-344 b	22-0114	24	1,9	1,44
P-15-345 b	22-0115	44,6	1,89	0,86
P-15-374 a	22-0116	34,2	1,8	0,7
P-15-375 a	22-0117	14,5	1,84	1,09
P-15-376 a	22-0118	16,1	2,93	0,13
P-15-409 III	22-0119	23,4	1,94	1,9
P-15-412 II	22-0120	6,06	1,9	2,1
P-15-478 II	22-0121	15,6	1,98	1,72

Tabelle 11 Colistin-Resistenzgene mit den jeweiligen Isolaten.

Colistin-Resistenzgene	Isolate
<i>almG</i>	1921, 2281, 2940, 92042, 92255, P-15-154 III, P-15-326b, P-15-412 II
<i>mcr-4</i>	P-15-326b
<i>trkA</i>	2676, 2677, 82817, 92260, P-15-039, P-15-040, P-15-112, P-15-113, P-15-159 I, P-15-281 III, P-15-330c, P-15-339c, P-15-341b, P-15-344b, P-15-345b, P-15-478 II
<i>lpxN</i>	1921, 2281, 92194, P-15-154 III, P-15-159 I, P-15-326b, P-15-412 II
<i>gsplEF</i>	1921, 2281, 2676, 2940, 92042, 92255, 92194, P-15-154 III, P-15-159 I, P-15-281 III, P-15-326b, P-15-330c, P-15-412 II, P-15-478 II
<i>eptA</i>	2281, P-15-154 III, P-15-326b, P-15-412 II
<i>NewResi1</i>	2939, 2970, 3177, 3858, 81355, P-15-277 II, P-15-331b, P-15-342a, P-15-374a, P-15-375a
<i>NewResi2</i>	113497, F240, P-15-223, P-15-335c, P-15-339d, P-15-409 III
<i>NewResi3</i>	2676, P-15-159 I, P-15-281 III, P-15-330c, P-15-478 II
<i>NewResi4</i>	2677, 82817, 92260, P-15-039, P-15-040, P-15-112, P-15-113, P-15-339c, P-15-341b, P-15-344b, P-15-345b
<i>NewResi5</i>	P-15-137 I
<i>NewResi6</i>	P-15-376a

9. Eidstaatliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, die von mir vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst zu haben. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Arbeiten anderer entnommen sind, habe ich als entnommen kenntlich gemacht. Sämtliche Quellen und Hilfsmittel, die ich für die Arbeit verwendet habe, sind angegeben. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Moers, 29.04.2022
