

Infektiologie und Mikrobiologie
(Schwerpunkt Bakteriologie)

Redaktion: W. Ehret

ESBL, AmpC und Carbapenemase: Vorkommen, Verbreitung und Diagnostik β -Lactamase-bildender Gram-negativer Krankheitserreger

ESBL, AmpC and carbapenemases: emergence, dissemination and diagnostics of β -lactamase-producing Gram-negative pathogens

Yvonne Pfeifer*

Robert Koch Institut, Nosokomiale Infektionen FG13,
Wernigerode, Deutschland

Zusammenfassung

Die Zunahme der β -Lactamresistenz bei Gram-negativen Erregern von Krankenhausinfektionen ist überwiegend auf die Bildung von β -Lactamase zurückzuführen. An neuentwickelte β -Lactame passen sich die Bakterien durch Modifizierung dieser Enzyme oder Erwerb neuer β -Lactamase schnell an. Heute ist eine Vielzahl verschiedener β -Lactamase mit vielfältigen Wirkspektren bekannt, wobei einige in der Lage sind selbst moderne β -Lactame, wie die Carbapeneme, zu hydrolysieren. Die Lokalisation der β -Lactamase-Gene innerhalb mobiler genetischer Elemente ermöglicht die schnelle Weiterverbreitung der Resistenz sowohl innerhalb einer Spezies als auch zwischen den verschiedenen Gram-negativen Spezies. Das wiederum begünstigt die Entstehung multiresistenter Erreger (MRE), deren Resistenzspektrum die Grenzen der therapeutischen Möglichkeiten erreicht. Am Robert Koch Institut in Wernigerode wird im Rahmen des ARS-Projektes (Antibiotikaresistenz Surveillance Deutschland) die β -Lactamase-Bildung Cephalosporin- und Carbapenem-resistenter Enterobacteriaceae und Nonfermenter mittels molekularer Methoden untersucht. Ziel ist die Beschreibung der Häufigkeit und der Verbreitungswege relevanter β -Lactamase sowie die frühzeitige Erkennung und Überwachung neuer Resistenzdeterminanten und multiresistenter nosokomialer Erreger.

Schlüsselwörter: Antibiotikaresistenz; bakteriologische Typisierungstechniken; Carbapenemase; Enterobacteriaceae; Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL); Molekularepidemiologie.

*Korrespondenz: Dr. rer. nat. Yvonne Pfeifer, Robert Koch Institut, Nosokomiale Infektionen FG13, Burgstr. 37, 38855 Wernigerode, Deutschland
Tel.: +49 3943 679337
Fax: +49 3943 679317
E-Mail: pfeifery@rki.de

Abstract

The increasing number of β -lactam resistant Gram-negative pathogens is mainly due to production of β -lactamases. Bacteria adapt to newly developed β -lactams by modification of these enzymes or acquisition of new β -lactamases. At present, a large number of different β -lactamases is known exhibiting a diverse spectrum efficacy. Several enzymes are able to hydrolyse modern β -lactams such as carbapenems. Localisation of β -lactamase genes within various mobile genetic elements enables the transfer of resistance within one species or between different Gram-negative species. This results in emergence of multidrug-resistant pathogens whose spectrum of resistance dramatically limits the therapeutic options. Within the scope of the German ARS study (Antibiotic Resistance Surveillance), the Robert Koch Institute Wernigerode investigates β -lactamase production in cephalosporin- and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and Nonfermenters using molecular methods. The aim of this study is the analysis of prevalence and dissemination of relevant β -lactamases as well as identification and surveillance of new β -lactamases or multidrug-resistant nosocomial pathogens.

Keywords: antimicrobial resistance; bacterial typing; carbapenemase; Enterobacteriaceae; extended-spectrum β -lactamase (ESBL); molecular epidemiology.

β -Lactame, β -Lactamresistenz und β -Lactamase

Seit den 1960er Jahren werden β -Lactam-Antibiotika, wie z.B. Ampicillin, intensiv zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt. Die Entstehung von Resistenzen gegenüber dieser Substanzklasse fordern die pharmazeutische Forschung immer wieder zur Weiterentwicklung der β -Lactame, um einen dauerhaften Therapieerfolg zu gewährleisten. Bekannte Resistenzmechanismen, die insbesondere unter β -Lactam-Therapie auftreten, sind der Verlust von Porinen oder die erhöhte Expression von Efflux-Pumpen. Porine sind Proteine der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien [outer

membrane proteins (OMPs)], durch die der Eintritt verschiedener Substanzen, wie z.B. der Antibiotika, erfolgt. Fehlen bestimmte Porine, verursacht durch vielfältige Veränderungen der Gensequenz, können die β -Lactame nicht mehr zu ihrem Wirkort gelangen [1]. Auch eine Hochregulierung der Efflux-Systeme, welche bereits durch die äußere Membran eingedrungene Antibiotika wieder nach außen transportieren, tragen zur verminderten Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber bestimmten β -Lactamen bei [2].

Die Hauptursache der β -Lactamresistenz ist jedoch die Freisetzung von bakteriellen Enzymen, den β -Lactamasen, in den periplasmatischen Raum. Diese Enzyme verhindern durch hydrolytische Spaltung des β -Lactam-Rings das Vordringen der β -Lactam-Antibiotika an ihre Zielstruktur, die Transpeptidasen (Penicillin-binding proteins, PBPs), welche die Quervernetzung der Peptidoglykan-Polymerketten der bakteriellen Zellwand katalysieren. 1965 wurde die erste β -Lactamase, TEM-1, aus *Escherichia coli* isoliert [3]. TEM-1 ist in der Lage Penicilline und Schmalspektrum-Cephalosporime (Ampicillin, Cephalotin) zu hydrolysieren. Das entsprechende bla_{TEM-1} Gen liegt auf einem zumeist sehr großen konjugativen Plasmid (> 120 bp), häufig zusammen mit weiteren Genen, die Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika-Klassen (Sulfonamide, Aminoglykoside) vermitteln. Durch Co-Selektionsprozesse begünstigt, ist das TEM-1 Plasmid heute in den meisten Gram-negativen Spezies zu finden, und die häufigste Ursache der weitverbreiteten Ampicillinresistenz [4]. Die β -Lactamase SHV-1, mit ähnlichem Resistenzspektrum wie TEM-1, wurde zeitgleich in *Klebsiella pneumoniae* entdeckt. Dieses SHV-1 genannte Enzym findet sich vorwiegend chromosomal-kodiert in *K. pneumoniae*, wo auch sein Ursprung vermutet wird [5]. Allerdings führte die Mobilisierung, ermöglicht durch Einbindung des bla_{SHV} Gens in Insertionsequenzen (IS-Elemente) oder Transposons, zum horizontalen Gentransfer über konjugative Plasmide und somit zur Verbreitung von SHV-1 in andere enterobakterielle Spezies [4].

Die Entwicklung der Cephalosporine der dritten Generation, z.B. Cefotaxim und Ceftazidim, in den 1980er Jahren war ein wichtiger Schritt im Kampf gegen β -Lactamase-bildende Infektionserreger. Die Breitspektrum β -Lactamasen SHV-1 und TEM-1 konnten diese neuen Cephalosporine nicht hydrolysieren. Allerdings dauerte es nur wenige Jahre bis resistente Enterobakterien mit modifizierten Enzymen isoliert wurden. Einzelne Punktmutationen im bla_{TEM} bzw. bla_{SHV} Gen bewirkten die Veränderungen des aktiven Zentrums und führten zu Enzymvarianten, die ein erweitertes Substratspektrum besitzen. Diese sog. Extended-Spectrum Beta-Lactamasen (ESBL) sind in der Lage, auch die Oximino-Cephalosporine wie Ceftazidim, Cefotaxim und Cefpodoxim zu hydrolysieren. Inzwischen sind über 170 TEM-Typen und mehr als 110 SHV-Typen beschrieben, wobei allerdings nicht jede Variante ein erweitertes Substratspektrum zeigt. Die Datenbank der Lahey Clinic Burlington (<http://www.lahey.org/Studies/>) enthält alle bekannten β -Lactamasen und kontrolliert die Nomenklatur neu entdeckter β -Lactamase-Varianten.

Im Kampf gegen die zunehmende Cephalosporinresistenz wurden zunächst β -Lactamase-Inhibitoren, z.B. Clavulansäu-

re, Sulbactam oder Tazobactam, erfolgreich eingesetzt. Diese Substanzen sind in ihrer Struktur den β -Lactam-Antibiotika sehr ähnlich, aber sie haben kaum einen antibiotischen Effekt. Allerdings binden sie irreversibel an die β -Lactamase und blockieren das Enzym. Das zeitgleich mit dem Inhibitor verabreichte β -Lactam kann daraufhin die Transpeptidase hemmen. Durch diese strukturellen Gemeinsamkeiten von β -Lactamen und β -Lactamase-Inhibitoren konnten sich die Bakterien schnell anpassen und Inhibitor-Resistenzen entwickeln. Eine einfache Strategie ist die Überexpression der β -Lactamase, so dass dem Bakterium nach „Verbrauch“ des Inhibitors noch genügend Enzym für die β -Lactam-Hydrolyse zur Verfügung steht [6]. Doch schon einfache Aminosäure-Substitutionen, verursacht durch Punkt-Mutationen (single nucleotide polymorphism, SNP), können im bla_{TEM} oder bla_{SHV} Gen zu Veränderungen der Bindungsstellen des katalytischen Zentrums führen. Folglich wird der Inhibitor nur noch schwach oder gar nicht gebunden. Diese Inhibitor-resistenten β -Lactamasen werden durch Antibiotika selektiert und sorgten in den letzten Jahrzehnten immer wieder für einzelne Ausbrüche in europäischen Kliniken, was den Einsatz von β -Lactam/ β -Lactamase-Inhibitor-Kombinationen in der Therapie riskant macht [7, 8].

1989 wurde ein neues Enzym mit ESBL-Eigenschaften in *E. coli* entdeckt. Aufgrund der hohen hydrolytischen Aktivität gegenüber Cefotaxim wurde diese neue Enzymklasse CTX-M (Cefotaximasen) genannt. Inzwischen sind mehr als 90 CTX-M-Typen beschrieben, die in fünf phylogenetische Gruppen (1, 2, 8, 9, 25) eingeteilt werden [9]. Die am häufigsten in Enterobakterien nachgewiesenen CTX-M-Typen gehören zu den CTX-M-Gruppen 1 und 9. Die Sequenz-Identität zwischen den einzelnen Gruppen liegt nur zwischen 60 bis 80%, da sich die CTX-M-Enzyme von chromosomal-kodierten β -Lactamasen verschiedener *Kluyvera*-Spezies ableiten lassen. Die *Kluyvera* spp. gelten als kommensale, weltweit verbreitete Bakterien, die nur in sehr seltenen Fällen Infektionen verursachen. Die chromosomal-kodierte β -Lactamase aus *Kluyvera ascorbata* (KLUA) wird als Vorläufer der CTX-M-Gene der Gruppe 1 und 2 angesehen; die Enzyme der Gruppe CTX-M-8 und 9 sollen ihren genetischen Ursprung in *Kluyvera georgiana* (KLUG) haben [10, 11]. Die Mobilisation der Gene und der konjugative Plasmid-Transfer bewirkten die schnelle Ausbreitung der CTX-M-ESBL. Heute ist diese Enzymklasse die häufigste Ursache der Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation in Enterobacteriaceae.

In den 1990er Jahren wurden viele weitere β -Lactamasen (AmpC-, OXA- β -Lactamasen) entdeckt; und zum Ende des Jahrtausends, nach Einführung der Carbapeneme, kamen wieder neue Enzymgruppen hinzu. Zur Überschaubarkeit dieser Vielfalt wurden schon frühzeitig mehrere Klassifizierungssysteme erstellt, die die β -Lactamasen nach verschiedenen Parametern differenzieren. Die beiden bekanntesten Systeme sind die Klassifizierung nach AMBLER (1980) und die Klassifizierung von Bush, Jacoby und Medeiros (BJM) [12, 13]. Im BJM-System werden die β -Lactamasen entsprechend ihres Substratspektrums und ihres Verhaltens gegenüber Enzym-Inhibitoren eingeteilt. Das AMBLER-Schema

dagegen basiert auf Aminosäuresequenz-Übereinstimmungen (Abbildung 1). Man unterscheidet die Klassen A, B, C und D, wobei in den Gruppen A, C und D die Serin- β -Lactamasen zusammengefasst sind. Diese β -Lactamasen besitzen einen Serylrest im katalytischen Zentrum, der die Spaltung des β -Lactam-Ringes der Antibiotika bewirkt. Die Gruppe B umfasst alle Metallo- β -Lactamasen, wobei Hydrolyse durch Zinkionen katalysiert wird.

Zur Klasse A gehören die in Enterobakterien nachgewiesenen Breitspektrum- β -Lactamasen TEM und SHV, die davon abgeleiteten TEM- und SHV-ESBL sowie die CTX-M-Enzyme. Aber auch Enzyme mit hydrolytischer Aktivität gegenüber Carbapenemen, wie die 2001 erstmals beschriebene *K. pneumoniae* Carbapenemase (KPC) werden der Klasse A zugeordnet [14].

Die Resistenz gegen neuere Cephalosporine wird bei Enterobacteriaceae neben den ESBL vor allem durch die AmpC- β -Lactamasen (Klasse C) verursacht. AmpC- β -Lactamasen vermitteln Resistenzen gegenüber allen β -Lactamen, außer Cefepim, Cefpirom und Carbapenemen [15]. β -Lactamase-Inhibitoren haben kaum oder keinen Effekt auf diese Enzyme, weshalb sie nicht als ESBL bezeichnet werden. Entsprechend der besonderen Eigenschaft Cephamicine, wie z.B. Cefoxitin zu hydrolysieren, werden sie jedoch häufig Cephamicinasen genannt. Viele Enterobakterien (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Hafnia alvei*, *Aeromonas hydrophila*) besitzen chromosomal-lokalisierte *ampC* Gene. Die *ampC*-Expression ist entweder induzierbar oder durch Veränderungen des Regulationsmechanismus dereprimiert, was eine konstitutive Überexpression zur Folge hat. Von

diesen chromosomalen Vorläuferenzymen abgeleitet, sind die Plasmid-vermittelten AmpC- β -Lactamasen, welche beispielsweise in *E. coli* und *Klebsiella* spp. oder auch *Salmonella* spp. vorkommen. *E. coli* besitzt auch eine Spezies-eigene, chromosomal-kodierte AmpC- β -Lactamase, die im *E. coli*-Wildtyp durch einen schwachen Promoter konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert wird [16]. Verschiedene Mutationen im *ampC*-Promoter können dagegen zur Überexpression und damit zur Cephalosporinresistenz (Cefoxitin, Cetotaxim, Cefotaxim) führen [17].

Die β -Lactamasen der Klasse D werden als OXA- β -Lactamasen bezeichnet, ursprünglich wegen der hohen hydrolytischen Aktivität gegenüber Oxacillin und Cloxacillin [13]. Aufgrund großer Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind auch die Eigenschaften der mehr als 160 bisher identifizierten OXA-Typen sehr verschieden. Neben einfachen Breitspektrum- β -Lactamasen mit einem TEM-1-ähnlichen Substratspektrum können einige OXA- β -Lactamasen auch Cephalosporine der Gruppe 3 hydrolysieren und sind durch Inhibitoren hemmbar (OXA-ESBL). Der in Enterobakterien beschriebene Typ OXA-48 vermittelt Resistenz gegenüber Penicillinen (Ampicillin) und Carbapenemen (Imipenem), kann jedoch keine dritte Generation Cephalosporine hydrolysieren [18]. Eine weitere Gruppe bilden die vorwiegend in *Acinetobacter baumannii* vorkommenden OXA-Carbapenemasen, die Resistenz gegenüber allen β -Lactamen vermitteln und somit diese Substanzklasse zur Behandlung ausschließen [19].

Die in Nonfermentern Ende der 1990er-Jahre beschriebenen Metallo- β -Lactamasen bilden eine eigenständige Klasse

	β -Lactamase-Klasse	β -Lactamasen	Beispiele	Relevante Spezies	Resistenzen ¹
Serin- β -Lactamasen	A	Breitspektrum- β -Lactamasen	TEM-1, TEM-2 SHV-1, SHV-11	Enterobacteriaceae und Nonfermenter ²	Ampicillin, Cephalotin
		ESBL TEM	TEM-3, TEM-52		Penicilline, 3. Gen. Cephalosporine
		ESBL SHV	SHV-5, SHV-12		
		ESBL CTX-M	CTX-M-1, CTX-M-15		
		Carbapenemasen	KPC		
	C	Cephamicinasen chromosomal-kodiert	AmpC	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.	Cephamicine (Cefoxitin), 3. Gen. Cephalosporine
		Cephamicinasen Plasmid-kodierte AmpC	CMY, DHA, FOX, ACC		Cephamicine (Cefoxitin), 3. Gen. Cephalosporine
	D	Breitspektrum- β -Lactamasen	OXA-1, OXA-9	Enterobacteriaceae	Oxacillin, Ampicillin, Cephalotin
		ESBL OXA	OXA-2, OXA-10		3. Gen. Cephalosporine
		Carbapenemasen OXA Carbapenemasen OXA	OXA-48 OXA-23, -24, -58	Enterobacteriaceae <i>A. baumannii</i>	Ampicillin, Imipenem alle β -Lactame ³
Metallo- β -Lactamasen	B	Metallo- β -Lactamasen	VIM IMP	Enterobacteriaceae und Nonfermenter	alle β -Lactame ³

Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der Einteilung der β -Lactamasen nach AMBLER.

¹Angegeben sind charakteristische Resistenzen, die z.T. für die Diagnostik genutzt werden; ²die Breitspektrum- β -Lactamasen TEM-1 findet man auch bei Nonfermentern (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*) häufig; ³breites Hydrolysespektrum inklusive der Carbapeneme.

(Klasse B). Die Enzyme VIM und IMP sind mit jeweils mehr als 20 Enzymvarianten die häufigsten Metallo- β -Lactamasen. Sie sind durch die Transferierbarkeit über Plasmide inzwischen auch in vielen enterobakteriellen Spezies (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) verbreitet. Metallo- β -Lactamasen können ebenfalls sämtliche β -Lactame inklusive der Carbapeneme hydrolysieren. Sie sind aber im Gegensatz zu anderen Carbapenemasen durch Chelatbildner hemmbar, was als diagnostischer Marker genutzt wird [19].

Resistenz-Surveillance

In den 1990er Jahren entstanden in Europa die ersten Surveillance-Systeme, welche sich die Erfassung von häufigen Resistenzen Gram-positiver und Gram-negativer nosokomialer Erreger zur Aufgabe machten. Mit der rasanten Ausbreitung der ESBL in Enterobacteriaceae in dieser Zeit begannen die verschiedenen Netzwerke die Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation kontinuierlich zu überwachen, und durch die Einführung von Bestätigungstests den phänotypischen ESBL-Anteil in *E. coli* und *K. pneumoniae* zu ermitteln [20]. Mit Auftreten der ersten Carbapenemasen wird seit einigen Jahren auch die Carbapenemresistenz für Nonfermenter und bestimmte Enterobakterien erfasst. Die Surveillance erfolgt dabei entweder in sehr spezifischen Bereichen oder es existieren regionale und überregionale Netzwerke. Während das SARI-Projekt (www.antibiotika-sari.de) die Surveillance der Antibiotikaausbreitung und bakteriellen Resistenzen auf deutschen Intensivstationen beinhaltet, konzentriert sich das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) auf die Erfassung von Surveillance-Daten in bestimmten Risikobereichen im Krankenhaus (ITS-KISS, DEVICE-KISS, NEO-KISS, CDAD-KISS, MRSA-KISS, ONKO-KISS, OP-KISS, AMBU-KISS und Hand-KISS), (www.nrz-hygiene.de). Die Arbeitsgruppe „Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz“ der Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (www.p-e-g.org) erhebt seit 1998 alle drei Jahre Daten zu Antibiotikaresistenz und Antibiotikaverbrauch in der Human- und Veterinärmedizin, woran 30 Laboratorien in Deutschland beteiligt sind.

Am europäischen Netzwerk EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System; www.rivm.nl/earss/) sind mehr als 30 Länder an der jährlichen laborgestützten Datenerhebung (invasive, klinische Proben) beteiligt. Das Robert Koch Institut (RKI) koordiniert das 2007 initiierte ARS-Projekt (Antibiotika-Resistenz-Surveillance Deutschland), welches über eine gemeinsame elektronische Schnittstelle aus den jeweiligen Laborsystemen kontinuierlich Resistenzdaten aus derzeit 13 Laboratorien (240 Krankenhäuser) und rund 3800 Arztpraxen liefert. ARS bietet somit die Möglichkeit der Erfassung der gesamtdeutschen Resistenzsituation als Voraussetzung für die Erkennung von bedrohlichen Resistenzrends und für die Erarbeitung von Strategien zur Begrenzung der weiteren Ausbreitung resistenter Erreger.

Trotz sehr unterschiedlicher Stichproben, zeitlicher Datenerhebung, Materialauswahl, Methoden der Erreger-

identifizierung, Resistenztestung sowie Resistenz-Bewertungskriterien zeigen alle Surveillance-Systeme einen einheitlichen, ansteigenden Trend bezüglich der dritten Generation Cephalosporinresistenz bei Enterobakterien in den letzten zehn Jahren. Durch die Bestimmung des Anteils der *E. coli* mit ESBL-Phänotyp ergibt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen ESBL-Rate und Cefotaximresistenz sowie dem häufigen Einsatz von Cephalosporinen der Gruppe 3 in der antimikrobiellen Therapie (Abbildungen 2, 3). Lag der Anteil Cefotaxim-resistenter *E. coli* im Jahr 2000 noch bei unter 1%, bestimmen die verschiedenen Surveillance-Systeme heute Resistenzraten zwischen 5% und 12%. Ebenso hat die Carbapenemresistenz Gram-negativer Infektionserreger zugenommen, wobei insbesondere in südeuropäischen Ländern sehr hohe Resistenzraten ermittelt wurden (Abbildung 4). Diese dramatische Entwicklung sollte nicht nur weiter beobachtet werden, sondern auch Anlass geben, geeignete Präventionsmaßnahmen zu entwickeln, wie es im DART-Konzept (Deutschen Antibiotika Resistenz Strategie) des Bundesministeriums für Gesundheit für Deutschland angestrebt wird.

Diagnostik

Die sichere Diagnostik bestimmter β -Lactamasen ist Voraussetzung für die weiteren therapeutischen Empfehlungen sowie die Ausführung geeigneter Hygienemaßnahmen zur Vermeidung einer weiteren Verbreitung des resistenten Erregers und des entsprechenden Resistenzplasmides. Die auf rein phänotypischen Methoden basierte Diagnostik ist nicht immer einfach, insbesondere dann, wenn der Phänotyp durch das Vorhandensein mehrerer β -Lactamasen modifiziert wird. Die meisten medizinischen Laboratorien verfügen jedoch nicht über die Ausstattung für molekularbiologische Untersuchungen. Daher werden β -Lactamase-PCR und Sequenzierung sowie die molekulare Erregertypisierung überwiegend in Referenzlaboratorien durchgeführt. Moderne Automaten-systeme, erweitert durch interne Bestätigungstests und Interpretation der Daten durch eine spezielle Software, liefern heute allerdings schon sehr zuverlässige Ergebnisse bezüglich der phänotypischen β -Lactamase-Bestimmung [4, 21]. Dennoch werden zusätzlich manuelle Bestätigungstests empfohlen. Nachfolgend sind die am häufigsten verwendeten Methoden zur phänotypischen β -Lactamase-Bestätigung kurz dargestellt. Beratungen zu Fragen der β -Lactamase-Diagnostik werden vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum (Dr. Kaase, Prof. Dr. Gatermann) angeboten. Zur Abklärung auf das Vorhandensein von ESBL, AmpC oder Carbapenemasen können auch Isolate an das NRZ gesendet werden.

ESBL

Zur ESBL-Identifikation wird generell ein zweistufiges Testverfahren, bestehend aus einem Vorscreening zur Bestimmung des ESBL-typischen Substratspektrums und der anschließenden Bestätigungstests mittels geeigneter ESBL-Inhibitoren, eingesetzt [22]. Für eine korrekte Interpretation

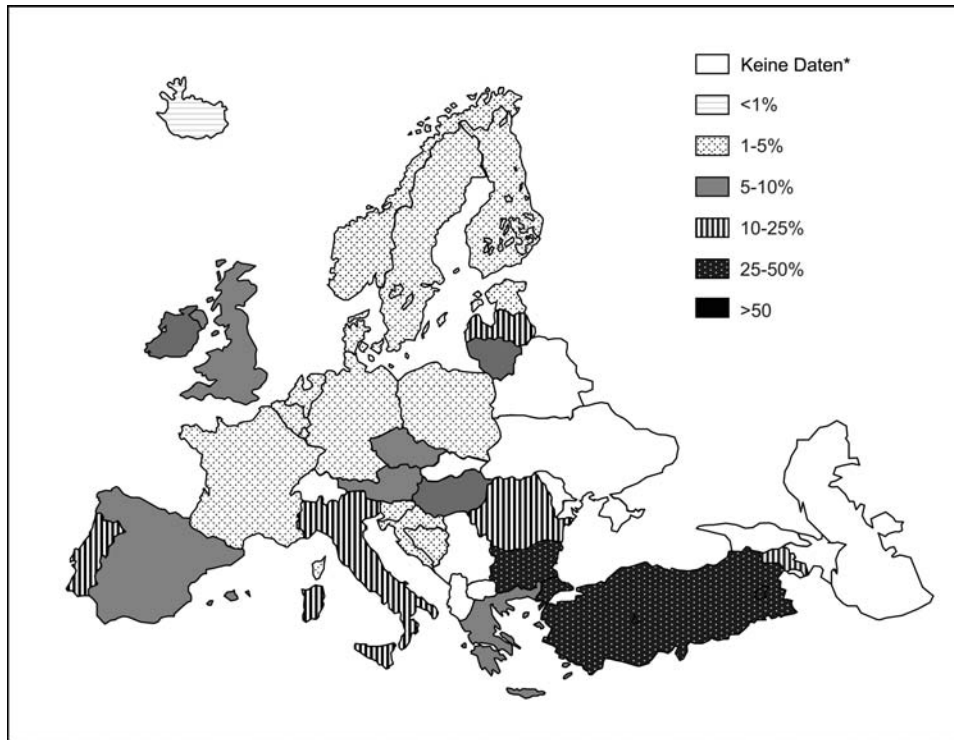


Abbildung 2 Anteil invasiver *Escherichia coli* Isolate mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation 2008. (<http://www.rivm.nl/earss/> on 31th March 2010). *Keine Daten übermittelt oder Daten von weniger als 10 Isolaten.

der Ergebnisse ist die Identifizierung des Erregers bis auf die Speziesebene wichtig. Das Screening beinhaltet die Empfindlichkeitsprüfung gegenüber verschiedenen dritten Generation Cephalosporinen (Ceftazidim, Cefotaxim, Cefpodoxim, Cefuroxim) sowie Aztreonam und einem Cephامycin (Cefoxitin, Cefotetan). Die jeweiligen Antibiotikatestblättchen (Mast[®], Biomerieux[®]) werden im Agardiffusionstest entsprechend der CLSI-Standards (Clinical Laboratory Standard Institute) durchgeführt und ausgewertet. Für die Isolation

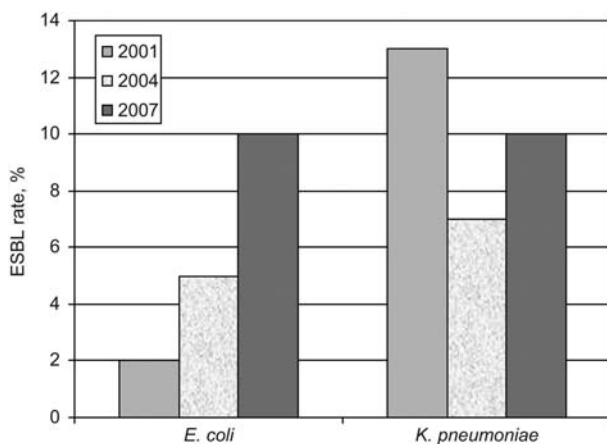


Abbildung 3 Anteil nosokomialer *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* Isolate mit ESBL-Phänotyp 2001–2007. GERMAP Resistenzatlas 2008 (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.; www.peg.org).

von ESBL-bildenden Erregern im Rahmen eines ESBL-Besiedlungs-Screenings aus Urin oder Stuhlproben werden chromogene Medien (Mast[®], Biomerieux[®]) angeboten. Durch den Zusatz von Cefpodoxim im Medium werden ESBL-, AmpC- und Carbapenemase-Bildner vorselektiert. Resistenz gegenüber mindestens einem Cephalosporin der dritten Generation und Empfindlichkeit gegenüber Cephamycinen weist auf einen potentiellen ESBL-Bildner hin, was einen nachfolgenden Bestätigungstest mit einem ESBL-Inhibitor erforderlich macht. Dieser kann mittels Etest (Ceftazidim/Ceftazidin + Clavulansäure; Cefotaxim/Cefotaxim + Clavulansäure) oder verschiedener Doppeldisk-(DD)-Diffusionstests erfolgen [22]. Im DD-Synergietest werden die Hemmhofdurchmesser von dem Cephalosporin der dritten Generation allein und in Kombination mit dem Inhibitor gemessen. Die Differenz der Hemmhofdurchmesser von ≥ 5 mm oder eine Hemmung ≥ 3 Verdünnungsstufen ist für die ESBL-Bildung charakteristisch. Im DD-Annäherungstest werden Blättchen mit verschiedenen Cephalosporinen der dritten Generation (Ceftazidim, Cefotaxim, Cefepim, Cefpodoxim) um ein Amoxicillin/Clavulansäure-Blättchen gelegt. Die Verformung der Hemmhöfe weist auf ESBL-Bildung hin. Die internen ESBL-Tests der Automatenysteme beruhen ebenfalls auf Tests von Cephalosporin/Inhibitor Kombinationen, wobei die Sensitivität und Spezifität Erreger-abhängig ist. Falsch-positive Ergebnisse sind bei *K. oxytoca* möglich, da die Überexpression der Spezies-eigenen K1- β -Lactamase zur Ausbildung eines ESBL-ähnlichen Phänotyps führen kann. Hierbei ist deshalb auf weitere Resistenzen zu achten. Diese K1-Hyperproduzenten sind neben

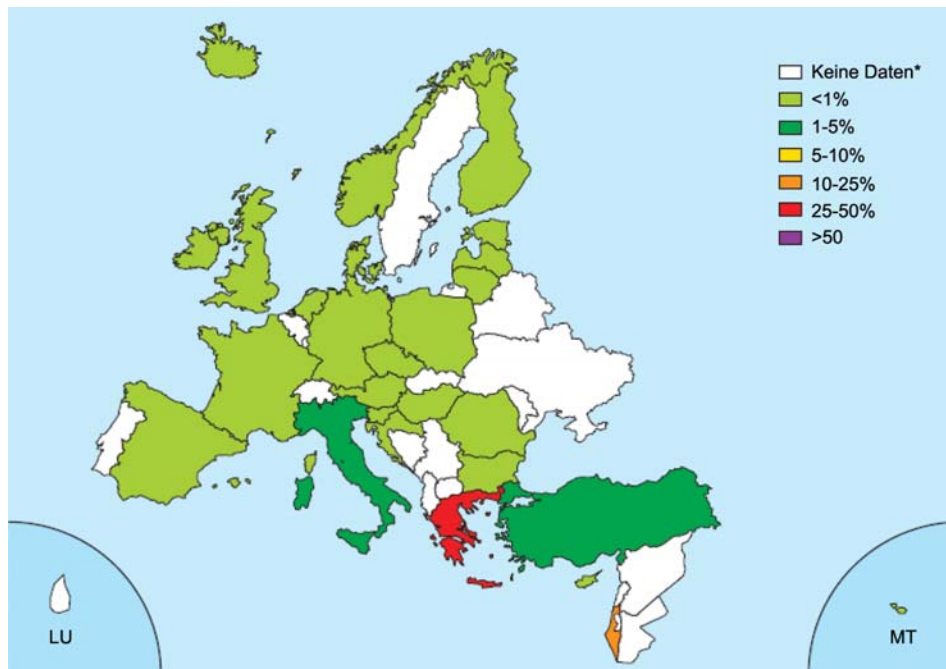


Abbildung 4 Anteil invasiver *Klebsiella pneumoniae* Isolate mit Resistenz gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation 2008. (<http://www.rivm.nl/earss/> on 31th March 2010). *Keine Daten übermittelt oder Daten von weniger als 10 Isolaten.

Cefotaxim und Cefpodoxim zusätzlich resistent gegenüber Cefuroxim, Aztreonam, Piperacillin/Tazobactam; bleiben allerdings Ceftazidim-empfindlich [23]. Zu falsch-negativen Ergebnissen kommt es bei gleichzeitigem Vorkommen von ESBL und einiger geringfügig hemmbarer OXA- β -Lactamasen [13] oder bei AmpC- β -Lactamase-bildenden Enterobakterien (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) [4]. Hierbei wird die ESBL-Aktivität im Bestätigungstest durch die ebenfalls vorhandene, nicht hemmbare AmpC- β -Lactamase maskiert. MAST[®] bietet momentan ein Testblättchen-Set aus ESBL- und AmpC-Inhibitor-Kombinationen an, um diese „versteckten“ ESBL sichtbar zu machen. Eine 100%ig sichere ESBL-Identifikation ermöglicht keines der Systeme, obgleich die neu eingeführten EUCAST-Richtlinien (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) genauere Grenzwerte für alle relevanten Gram-negativen Spezies liefern. Zu beachten ist, dass alle manuellen Bestätigungstests unbedingt eine exakte Durchführung und Interpretation durch geschultes Personal erfordern.

AmpC- β -Lactamasen

Der phänotypische Nachweis von AmpC- β -Lactamasen erfolgt methodisch ähnlich dem Vorgehen bei ESBL; jedoch werden hierfür Cephamicine (Cefotetan, Cefoxitin) und zur Bestätigung Cephamicin/AmpC-Inhibitor-Kombinationen eingesetzt. Das sind z. B. Borsäure, Borsäurederivate [24] oder Cloxacillin. Etest-Streifen oder Blättchen mit Cefoxitin + Cloxacillin oder Cefotetan + Cloxacillin sind einfacher anzuwenden als die Borsäure-Tests, da diese immer frisch zugegeben werden muss, um die Wirksamkeit zu

gewährleisten. Obwohl das Übertragungsrisiko von Plasmid-vermittelten AmpC- β -Lactamasen aus *E. coli* oder *Klebsiella* spp. ähnlich hoch ist wie bei den ESBL, erfolgt ein phänotypischer Test im Labor selten und AmpC-spezifische Hygienrichtlinien sind im Krankenhaus zumeist nicht vorhanden.

Carbapenemasen

Es existieren verschiedene Methoden zum generellen Nachweis von Carbapenemasen sowie Methoden zur Identifikation spezifischer Carbapenemasen [25]. Einfach durchführbar ist der modifizierte Hodge-Test, wobei eine Suspension eines Carbapenem-sensitiven Referenzstammes auf Mueller-Hinton-Agar ausplattiert und ausgehend von einem in der Mitte platzierten Carbapenem-Antibiotika-Blättchen (Ertapenem, Meropenem oder Imipenem) der zu testende Stamm strichförmig geimpft wird. Deformationen des Hemmhofes und Hineinwachsen des Referenzstammes in den Hemmhof weisen auf die Bildung einer Carbapenemase hin. Allerdings sind auch falsch-positive Ergebnisse beschrieben [26]. Metallo- β -Lactamasen sind durch verschiedene Chelatbildner, z.B. EDTA und MPA, hemmbar. Daher werden diese als Inhibitoren im Bestätigungstest (E-test, DD-Tests) in Kombination mit Carbapenemen eingesetzt [27, 28]. Falsch-negative Ergebnisse sind durch die teilweise sehr unterschiedliche Metallo- β -Lactamase-Expression in den einzelnen Isolaten möglich. Zum phänotypischen Nachweis der KPC-Carbapenemase setzt man derzeit, ähnlich wie bei der AmpC-Identifikation, Borsäurederivate ein [29]. Hierbei erfolgt jedoch die Kombination der Borsäurederivate mit Carbapenemen. Da auch AmpC-bildende Spezies durch wei-

tere Resistenzmechanismen (Porinverlust) Carbapenem-resistent vermitteln können, sind falsch-positive Ergebnisse zu erwarten. Ein einfacher PCR-Nachweis ist daher empfehlenswert.

Molekulare Epidemiologie

Die Anwendung molekularer Methoden für eine genaue Charakterisierung resistenter Erreger über den Phänotyp hinaus ermöglicht es, genaue Aussagen über Vorkommen und Verbreitung einzelner Resistenzdeterminanten zu machen. Die im Rahmen des ARS-Projektes am Robert Koch Institut Wernigerode durchgeführten genetischen Untersuchungen zur Cephalosporin- und Carbapenemresistenz bei Gram-negativen nosokomialen Pathogenen geben Einblick in die derzeitige Resistenzsituation sowie neue Resistenzentwicklungen und deren molekulare Hintergründe.

ESBL

Die steigende Zahl der Veröffentlichungen zum Thema ESBL zeigt ihre Bedeutung als häufigste Ursache der Cephalosporinresistenz in Enterobacteriaceae [30]. In Deutschland beschreiben einzelne molekulargenetisch-basierte Studien sehr detailliert die lokale Resistenzsituation und die Verbreitung von überwiegend CTX-M ESBL in *E. coli* über einzelne konjugative Plasmide [31].

Für die Bestimmung der Häufigkeit und geografischen Verteilung von ESBL in Deutschland wurde 2008 eine repräsentative Stichprobe von phänotypisch ESBL-positiven Isolaten der häufig vorkommenden nosokomialen Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* und *Proteus mirabilis*, eingesandt von den an ARS beteiligten Laboratorien und Krankenhäusern, untersucht. Die in 152 *E. coli* Isolaten (150 Kliniken) und 65 *Klebsiella* spp. Isolaten (56 Kliniken) identifizierten ESBL-Typen zeigen eine eindeutige Dominanz der CTX-M-Enzyme. Insbesondere CTX-M-15, eine ESBL-Variante mit breitem Hydrolysespektrum stellt mehr als zwei Drittel (bei *E. coli* sogar mehr als 90%) aller identifizierten ESBL dar [32].

Zur Analyse der Übertragungsmöglichkeiten von ESBL-Genen zwischen verschiedenen enterobakteriellen Spezies wurden in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik Tübingen (Dr. med. Michaela Fritz, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene) die Isolate von mehreren Patienten untersucht, bei denen zeitgleich eine Besiedlung mit einem *E. coli* und einem *K. pneumoniae* Stamm nachgewiesen wurde. Mittels PCR und Sequenzierung wurden verschiedene ESBL-Gene (*bla*_{SHV-2}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}) identifiziert, wobei in den *E. coli* und *K. pneumoniae* Isolaten jedes Patienten jeweils die gleichen ESBL-Typen nachgewiesen wurden. Im Konjugationsexperiment konnten diese ESBL-Gene in einem sensitiven *E. coli* Rezipienten übertragen werden. Die Isolation der Plasmide von den klinischen Isolaten sowie den zugehörigen Transkonjuganten ergab, dass Plasmide gleicher Größe in beiden Spezies vorhanden sind und unabhängig voneinander übertragen werden können (Abbildung 5). Der

Austausch dieser Resistenzplasmide zwischen verschiedenen Spezies im Patienten zeigt die Geschwindigkeit, mit der sich ESBL-Determinanten innerhalb kurzer Zeit verbreiten. Es genügt die Übertragung einer der beiden ESBL-bildenden Spezies, um die Infektkette fortzusetzen.

Die am RKI durchgeführte Charakterisierung von ESBL-Plasmiden aus nosokomialen *E. coli* zeigte eine weitere erfolgreiche Verbreitungsstrategie der CTX-M-Enzyme. Das häufigste ESBL-Gen *bla*_{CTX-M-15} (n=12) wurde in unterschiedlichen konjugativen Plasmiden (50–200 kb Größe) der Inkompatibilitätsgruppen IncFII und I1 lokalisiert. Die Sequenzanalyse der genetischen Umgebung der *bla*_{CTX-M} Gene im Plasmid ergab eine Assoziation mit verschiedenen mobilen genetischen Elementen, wie *ISEcp1*, *IS26* und *IS903-D*. Diese sehr ähnliche *bla*_{CTX-M} Umgebung in Plasmiden verschiedener Inc-Gruppen (Abbildung 6) weist auf den Austausch der mobilen genetischen „Resistenz-Elemente“ zwischen den unterschiedlichen Plasmiden hin, was die enorme Zunahme des CTX-M-Anteils in Enterobacteriaceae in den letzten zehn Jahren erklärt [33].

Über den genauen Ursprung und die Verbreitungswege von ESBL außerhalb der Krankenhäuser in Deutschland ist nur sehr wenig bekannt. Als ein Reservoir für ESBL-Gene werden u.a. *Salmonella enterica* verschiedenster Serovare vermutet. Analysen von Ceftiofur-resistenten *S. enterica* Iso-

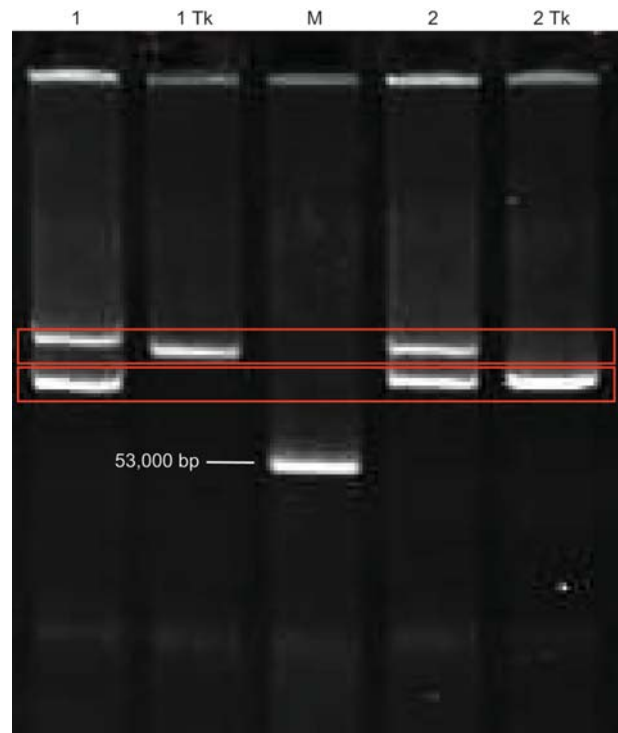


Abbildung 5 Plasmidisolation aus klinischen Isolaten eines Patienten (Mehrfach-Besiedlung) und den nach Konjugation erhaltenen *E. coli* J53 Azi^r Transkonjuganten.

M, Plasmidstandard V517 *E. coli*; 1, *E. coli* (TEM-1 + CTX-M-1); 1 Tk, Transkonjugant *E. coli* J53 Azi^r (TEM-1); 2, *K. pneumoniae* (TEM-1 + CTX-M-1); 2 Tk, Transkonjugant *E. coli* J53 Azi^r (CTX-M-1).

laten aus Lebensmitteln und Viehbeständen zeigten die Präsenz von verschiedenen ESBL-Typen, die auch in humanen nosokomialen *E. coli* und *Klebsiella* spp. vorkommen [34]. Bei weiteren Untersuchungen in Zusammenarbeit mit dem am Robert Koch Institut angesiedelten Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für gastrointestinale Infektionserreger wurden von 2004 bis 2009 in 40 humanen *S. enterica* verschiedener Serovare ESBL-Typen identifiziert, wobei ebenfalls die CTX-M-Enzyme die dominante ESBL-Variante sind [35, 36]. Die genaue Charakterisierung der Plasmide sowie die Analyse der genetischen Umgebung der CTX-M-Gene sind jedoch notwendig, um die Frage zu beantworten, inwieweit tatsächlich ein Transfer von ESBL-Plasmiden zwischen Enterobakterien humanen und tierischen Ursprungs stattfindet.

AmpC- β -Lactamasen

Im Gegensatz zu den ESBL treten AmpC- β -Lactamasen sehr viel seltener auf, obwohl viele Gram-negative Spezies die entsprechenden Gene besitzen. Am häufigsten wird die Überexpression der chromosomal-kodierten AmpC- β -Lactamase in *Enterobacter* spp. oder *Citrobacter* spp. diagnostiziert, wobei das Risiko hierbei in der Übertragung des resistenten Stammes auf andere Patienten liegt. Bei Untersuchungen am Robert Koch Institut konnten aber auch Plasmid-vermittelte AmpC- β -Lactamasen in einigen *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Proteus mirabilis* Isolaten identifiziert werden. Dabei handelte es sich um die von *Citrobacter freundii* abgeleitete AmpC- β -Lactamase-Typ CMY sowie die DHA AmpC- β -Lactamase (ursprünglich aus *Morganella morganii*). Der konjugative Transfer über Plasmide ermöglicht, wie bei den ESBL, die Übertragung der Resistenz in andere Spezies. Interessant war, dass die *K. pneumoniae* Isolate erhöhte MHK-Werte gegenüber Carbapenemen zeigten, wobei der Verlust von Poringenen als Ursache ermittelt wurde [37]. Trotz des noch seltenen Vorkommens ist die Diagnostik Plasmid-vermittelter AmpC- β -Lactamasen wichtig und die nachfolgenden Präventionsmaßnahmen sollten an die jeweilig in der Klinik geltenden Richtlinien für ESBL angepasst werden.

Carbapenemasen

Die Zunahme ESBL-bildender Enterobakterien führte in den letzten Jahren zum intensiveren Einsatz von Carbapenemen. Diese Strategie ist bislang noch erfolgreich. Dennoch steigt die Anzahl der Carbapenem-unempfindlichen multiresistenten Erreger (MRE) in Deutschland. Ursache dieser Resistenz ist der Erwerb verschiedener Carbapenem-hydrolysierende β -Lactamase Gene durch horizontalen Gentransfer über Plasmide. In Carbapenem-resistenten Isolaten, eingesandt aus Kliniken in ganz Deutschland, konnten viele dieser Resistenzdeterminanten identifiziert werden.

Eine Frühwarnung der Fachöffentlichkeit wurde bereits wirksam, z.B. im Fall des ersten Ausbruchs multiresistenter KPC-bildender *Klebsiellen* in Deutschland [38]. Seit ihrer Entdeckung 2001 (USA) breiten sich diese KPC-Stämme besorgniserregend schnell aus. Bis 2007 wurden sie in China, Israel, Frankreich, Italien, Griechenland und Großbritannien nachgewiesen. Der Indexpatient des Ausbruchs 2008 in Süddeutschland stammte aus Griechenland und hatte den multiresistenten *K. pneumoniae* Stamm vermutlich mitgebracht. Die Einführung eines umfangreichen Screening-Programmes und hygienetechnischer Folgemaßnahmen hatte schließlich Erfolg und es traten keine weiteren Erkrankungen mehr auf [39]. Allerdings wurden 2009 weitere Einzelisolate aus anderen Kliniken Deutschlands sowie ein weiterer Ausbruch gemeldet. In einigen Fällen konnte die Herkunft der Erreger ebenfalls ins Ausland zurückverfolgt werden. Vergleichende, molekulare Untersuchungen der KPC-bildenden *K. pneumoniae* aus Deutschland zeigten das Vorhandensein der KPC-2 bzw. KPC-3 Carbapenemase in den relativ nahe verwandten Isolaten (Abbildung 7). Da das KPC-Enzym auch in einem *E. coli* Isolat einer Patientin (Besiedlung mit KPC-bildender *K. pneumoniae* und *E. coli*) identifiziert wurde, ist die Übertragung des KPC-Resistenzplasmids sehr wahrscheinlich.

Von 2007 bis 2009 wurden mehrere kleinere Ausbrüche mit Beteiligung Metallo- β -Lactamase-bildende *Klebsiella* spp. untersucht, wobei hier jedoch die Verbindungen zu Auslandsaufenthalten fehlten und die Infektionen weniger schwerwiegend waren [38, 40]. Allerdings konnte gezeigt

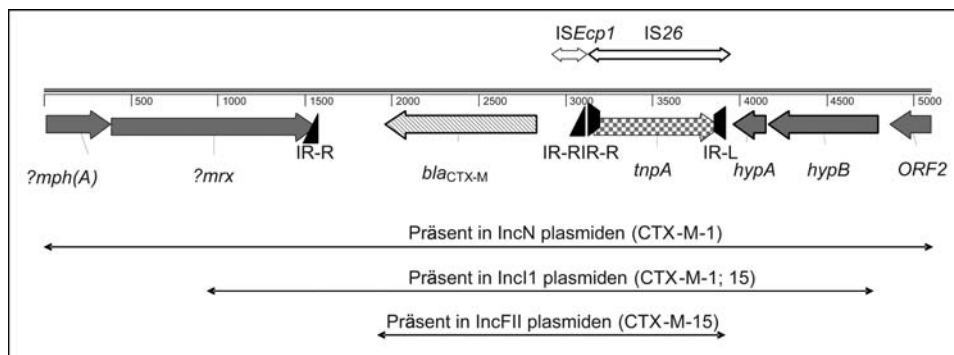


Abbildung 6 Vereinfachte grafische Darstellung der Unterschiede der genetischen Umgebung des bla_{CTX-M} Genes in Plasmiden verschiedener Inkompatibilitätsgruppen.

Untersucht wurden nosokomiale *E. coli* Isolate mittels Long(Walking)-PCR und Sequenzierung [33].

werden, dass die konjugative Übertragung eines einzigen Resistenzplasmids dieser Isolate, das verschiedene β -Lactamase Gene und weitere Resistenzgene enthält, zu einem multiresistenten Phänotyp führt.

Außerdem konnte am RKI in Einzelisolaten (2008–2010) verschiedener Spezies (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *C. freundii*, *E. cloacae*) die relativ seltene OXA-Carbapenemase OXA-48 nachgewiesen werden, welche bisher vorwiegend bei *K. pneumoniae* Ausbrüchen aus der Türkei beschrieben wurde. Viele dieser Isolate sind durch gleichzeitige ESBL-Bildung multiresistent, wodurch die therapeutischen Optionen erheblich limitiert sind [41].

In multiresistenten *A. baumannii* Isolaten wurden ebenfalls verschiedene OXA-Carbapenemasen (OXA-23, -24, -58, -72) identifiziert, deren Gene zumeist auf Plasmiden lokalisiert, auch in sensitive Rezipienten übertragen werden konnten. Eine Typisierung von Einzelisolaten und Isolaten aus verschiedenen Ausbrüchen in Deutschland mittels Multiplex-PCR zeigte, dass die Mehrheit der *A. baumannii*-Isolate einer der drei europäischen klonalen Linien zugeordnet werden kann [42]. Nicht typisierbare Isolate stammten zumeist von Patienten, die aus dem arabischen Raum kamen.

Dass ein Großteil aller am RKI untersuchten Carbapenem-resistenten Isolate aufgrund des breiten Resistenzspektrums nur noch mit Colistin behandelbar ist, zeigt deutlich das Gefahrenpotenzial für den Patienten im Falle einer Infektion mit diesen Erregern.

Netzwerk Antibiotikaresistenz

Für die Verbesserung der Resistenz-Surveillance in Deutschland und die schnellere Erarbeitung von effektiven Strategien zur Kontrolle und Prävention von Antibiotikaresistenzen wird im Rahmen der DART-Initiative (Deutsche Antibiotikaresistenz-Strategie) des Bundesministeriums für Gesundheit die Bildung eines überregionalen Netzwerkes aus

Referenzzentren, Konsiliarlaboratorien und weiteren Institutionen mit Expertise in der Antibiotikaresistenz-Analyse angestrebt.

Dafür ist in einer Kooperation vom Robert Koch Institut (RKI) und dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Gram-negative Infektionserreger (Dr. Martin Kaase, Prof. Dr. Gatermann) eine nationale Studie zur molekularen Epidemiologie von Carbapenem-resistenten nosokomialen Enterobacteriaceae geplant. Das Ziel ist es, die genetischen Determinanten für die Carbapenemresistenz mittels molekularer Methoden zu identifizieren, sowie deren Häufigkeit und Verbreitungswege zu bestimmen. Mit Hilfe der am ARS-Projekt (Antibiotikaresistenz Surveillance Deutschland) beteiligten Labore und Krankenhäuser kann eine repräsentative Stichprobe Carbapenem-resistenter Enterobacteriaceae gesammelt werden. Daher werden diese Einrichtungen um die Einsendung von nosokomialen Gram-negativen Isolaten gebeten, die die folgenden Kriterien erfüllen:

- verminderte Ertapenem-Empfindlichkeit:
Agardiffusion (Ertapenem 10 μ g): ≤ 21 mm oder MHK: ≥ 4 mg/L
- verminderte Meropenem-Empfindlichkeit:
Agardiffusion (Meropenem 10 μ g): ≤ 21 mm oder MHK: ≥ 1 mg/L
- verminderte Imipenem-Empfindlichkeit:
MHK: ≥ 1 mg/L.

Auch alle nicht an ARS beteiligten medizinischen Einrichtungen sind aufgerufen, auf Carbapenem-resistente Gram-negative Enterobacteriaceae und Nonfermenter zu achten und Kontakt mit dem RKI oder dem NRZ für Gram-negative Infektionserreger aufzunehmen. Da im Falle des Auftretens von ESBL-Bildnern zumeist nur noch die Carbapeneme als letzte Möglichkeit zur Therapie eingesetzt werden, ist eine Überwachung der Resistenzentwicklung gegenüber dieser Antibiotika-Gruppe dringend erforderlich.

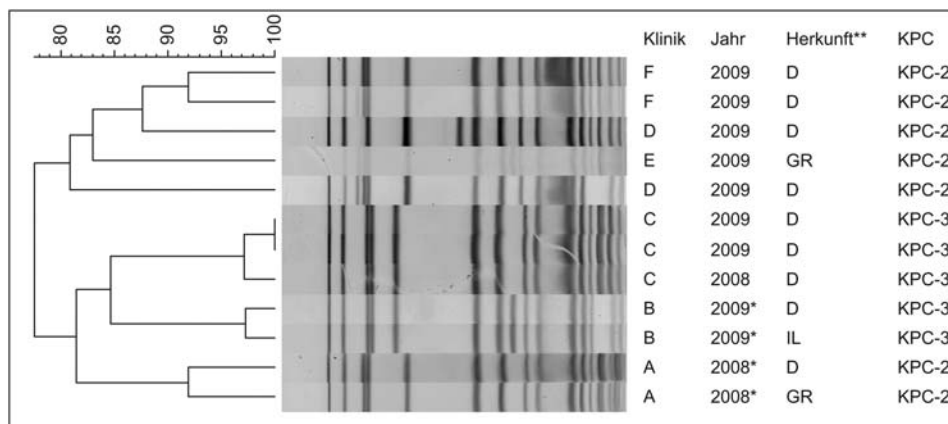


Abbildung 7 Dendrogramm erstellt aus XbaI-Makrorestriktionsanalyse (PFGE) von multiresistenten KPC-bildenden *K. pneumoniae* aus Deutschland 2008–2009.

*Ausbruchs isolate; **Patient mit entsprechender Nationalität oder vorherigem Aufenthalt im jeweiligen Land; IL, Israel; GR, Griechenland; Dice (Tol 1.0%–1.0%) (H > 0.0% S > 0.0%) [0.0%–100.0%].

Danksagung

Die Abteilung Nosokomiale Infektionen des Robert Koch Institutes Wernigerode bedankt sich ausdrücklich bei allen kooperierenden Laboratorien für die Einsendung von Stämmen für die molekulare Diagnostik und für ihr freiwilliges Engagement bei der ARS-Surveillance-Studie. Das ARS-Projekt wird vom Bundesministerium für Gesundheit finanziell gefördert.

Literatur

- Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Álvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1669–73.
- Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microb Infect* 2004;10:12–26.
- Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 1965;208: 239–41.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657–86.
- Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2856–61.
- French GL, Shannon KP, Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microb* 1996; 34:358–63.
- Thomas VL, Golemi-Kotra D, Kim C, Vakulenko SB, Mobashery S, Shoichet BK. 2005. Structural consequences of the inhibitor-resistant Ser130Gly substitution in TEM beta-lactamase. *Biochemistry* 2005;44:9330–8.
- Wang X, Minasov G, Shoichet BK. The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *J Biol Chem* 2002; 277:32149–56.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1–14.
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata* probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M-types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3045–9.
- Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:4038–40.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289:321–31.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211–33.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1151–61. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:809.
- Wiegand I. Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch Beta-Lactamasen. *Chemother J* 2003;12:151–67.
- Jaurin B, Grundström T, Edlund T, Normark S. The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 1981;290:221–5.
- Mulvey MR, Bryce E, Boyd DA, Ofner-Agostini M, Land AM, Simor AE, et al. Molecular characterisation of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:358–65.
- Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15–22.
- Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006;14:413–20.
- Noll I, Heckenbach K, Kleinkauf N, Eckmanns T. Zur Surveillance der Antibiotikaresistenz in Deutschland. *Epidemiol Bull* 2007;44:405–9.
- Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol* 2007;45:1167–74.
- Ditzen A. ESBL-Bildner: Einteilung, Signifikanz, Diagnostik und Therapie. *Hyg Med* 2010;35:8–16.
- Potz N, Colman A, Warner M, Reynolds R, Livermore DM. False-positive extended-spectrum beta-lactamase tests for *Klebsiella oxytoca* strains hyperproducing K1 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:545–7.
- Tan TY, Ng SY, Teo L, Koh Y, Teok CH. Detection of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *J Clin Pathol* 2008;61:642–4.
- Kaase M. Carbapenemase-detektion im mikrobiologischen Labor. *Hyg Med* 2010;35:32–6.
- Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2007;45:2723–5.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41:4623–9.
- Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2008;46:2028–37.
- Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2009;47:362–7.
- Cornaglia G, Garau J, Livermore DM. ESBLs forever. *Introduction. Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):1–2.
- Mshana SE, Imirzalioglu C, Hossain H, Hain T, Domann E, Chakraborty T. Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC Infect Dis* 2009;9:97.
- Pfeifer Y, Cullik A, Eckmanns T, Noll I, Witte W. Poster: “ESBL in nosocomial Enterobacteriaceae from Germany – a one-year study” zur 62. Jahrestagung der Deutschen Gesell-

- schaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und VAAM, Göttingen, 28.–31.09.2010. Biospektrum. Poster KMP13.
33. Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W. A novel IS26 structure is surrounding blaCTX-M genes in different plasmids of German clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2010;59:580–7.
 34. Rodríguez I, Barownick W, Helmuth R, Mendoza MC, Rodicio MR, Schroeter A, et al. Extended-spectrum {beta}-lactamases and AmpC {beta}-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003–07. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:301–9.
 35. Pfeifer Y, Prager R, Frick JS, Rabsch W. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* of different serovars in Germany 2004–2009. *IJMM* 2009;299S1 (Supplement 46):Poster PRP11.
 36. Pfeifer Y, Matten J, Rabsch W. *Salmonella enterica* serovar Typhi with CTX-M β -lactamase, Germany [letter]. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1533–5.
 37. Pfeifer Y, Witte W. Resistenzentwicklung erreicht die Grenzen der therapeutischen Möglichkeiten: Multiresistente *Klebsiella pneumoniae* mit ESBL, AmpC- und Metallo-Beta-Lactamasen. *Epidemiol Bull* 2008;14:110–3.
 38. Wendt C. *Klebsiella pneumoniae*-Carbapenemase in Deutschland. *Epidemiol Bull* 2008;22:173–4.
 39. Wendt C. Nachweis von *Klebsiella pneumoniae*-Carbapenemase in einem deutschen Universitätsklinikum. *Hyg Med* 2010;35:21–5.
 40. Pfeifer Y, Ziegler R, Lenhardt D, Just HM, Loderstädt U, Sobottka I, et al. Poster: “Metallo-Beta-Lactamases and Carbapenem Resistance in Gram-negative Pathogens” zur 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen. 20.–23.09.2009. *IJMM*. Poster PRP09.
 41. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Cho SH, Frangenberg HR, et al. Poster: “Emergence of OXA-48-producing Enterobacteriaceae in Germany” zur 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und VAAM, Göttingen, 28.–31.03.2010. *Biospektrum*. Poster KMP01.
 42. Pfeifer Y, Cho SH, Higgins PG, Fahr AM, Wichelhaus TA, Hunfeld KP, et al. Poster: “Molecular characterisation and outbreak analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from German hospitals” zur 20th ECCMID European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 10–13, 2010, Vienna. Poster P797.