

KURZBERICHT

Thema	Auftreten und Verbreitung von Beta-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum bei Enterobacteriaceae aus Hospitalinfektionen in Deutschland
Schlüsselbegriffe	ESBL, Enterobacteriaceae, Beta-Laktamasen, Antibiotikaresistenz
Ressort, Institut	Bundesministerium für Gesundheit (BMG)
Auftragnehmer(in)	Robert Koch-Institut, Fachgebiet 13 Nosokomiale Infektionen
Projektleitung	Dr. Wolfgang Witte
Autor(en)	Dr. Yvonne Pfeifer
Beginn	15.02.2004
Ende	31.12.2006

Vorhabensbeschreibung, Arbeitsziele

Resistente Enterobakterien sind die häufigsten Verursacher von Krankenhausinfektionen, wie zum Beispiel nosokomiale Harn- und Atemwegsinfektionen bis hin zu Sepsis und Pneumonie. Verschiedene Mechanismen der Resistenz gegen Antibiotika, wie die Bildung verschiedener Beta-Laktamasen, sind seit langem bekannt. Bakterien sind durch die Produktion von Beta-Laktamasen weniger empfindlich oder sogar resistent gegen Beta-Laktam Antibiotika. Dies erschwert die Therapie von Infektionen durch diese Bakterien mit Antibiotika. Es sind vor allem Beta-Laktamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (Extended-Spectrum Beta-Laktamasen (ESBL) sowie Plasmid-vermittelte AmpC-Beta-Laktamasen (AmpC)), die in der Lage sind, die in der Therapie häufig eingesetzten Antibiotika der Gruppe Cephalosporine der 3. und 4. Generation zu spalten und damit zu inaktivieren. Allerdings ist bisher nicht bekannt, welche Beta-Laktamasen bei nosokomialen Enterobakterien in Deutschland vorhanden sind und wie sie sich ausbreiten. Im Rahmen dieses Projektes sollten deshalb folgende Fragen bearbeitet werden:

Welche Methoden sind für eine schnelle Beta-Laktamase Diagnostik (ESBL und AmpC) geeignet?

Untersucht wurde, welche Methoden für einen phänotypischen ESBL- bzw. AmpC-Nachweis (Erkennung anhand ihrer typischen Erscheinungsform, beispielsweise Resistenz-eigenschaften) in Frage kommen und ob diese für die Routinediagnostik im Krankenhaus geeignet sind. Zur Bestätigung der phänotypischen Tests kamen moderne molekulare Methoden, wie die Microarray-Technologie zur Schnell Diagnostik von ESBL zum Einsatz. Die Gen-Identifikation soll durch Etablierung von Multiplex-PCR-Verfahren vereinfacht werden.

Welche Mechanismen der Cephalosporinresistenz in Enterobakterien treten gegenwärtig in Deutschland auf und auf welchem Weg erfolgt die Verbreitung?

Die Ursachen der zunehmenden Resistenz gegen moderne Beta-Laktame wurden an einer ausgewählten Sammlung resistenter, nosokomialer Enterobakterien untersucht. Außerdem wurde die Verteilung einzelner Beta-Laktamase-Typen (ESBL- oder AmpC) in den verschiedenen Spezies sowie der Grad der Verschiedenheit der Beta-Laktamasen aufgeklärt.

Durchführung, Methodik

Zur Identifizierung der durch ESBL antibiotikaresistenten Bakterien wurde ein Test (Mikrobouillonverdünnungstest mit Cephalosporinen Ceftazidim, Cefotaxim und Cefpodoxim jeweils mit und ohne Beta-Laktamase-Hemmer Sulbactam/Clavulansäure) entwickelt, der Aufschluss darüber gibt, ob die untersuchten Bakterien gegenüber den eingesetzten Antibiotika empfindlich oder resistent sind. Die Ergebnisse der Resistenzbestimmung wurden mit kommerziellen Testmethoden (E-Test, Disk-Diffusions-Test, Automaten-Analyse in der Klinik) verglichen.

Mittels Genanalyse wurde der ESBL-Typ, welcher die Antibiotikaresistenz auslöst, bestimmt. Für den Nachweis von Plasmid-kodierten AmpC Genen (Resistenzgene außerhalb der "Hauptgene" des

Bakteriums) sowie Veränderungen der Aktivität von Resistenzgenen im Bakterium, wurden weitere Genanalysemethoden entwickelt. [1,2].

Zur Untersuchung von Ursache und Verbreitung der Resistenz gegen Antibiotika der Gruppe Cephalosporine in Enterobakterien wurde eine Stammsammlung von 163 Bakterien-Isolaten (*E. coli*, 55,8 %; *K. pneumoniae*, 22,7 %; *K. oxytoca*, 13,5 %) angelegt.

Im Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart wurden zwei molekularbiologische Tests zur Schnelldiagnostik einzelner ESBL-Typen entwickelt [3]. Mit der Analyse klinischer Bakterien-Isolate der Stammsammlung wurde überprüft, ob die Ergebnisse der neu entwickelten Tests und der Gen-Sequenzierung miteinander korrelieren und wie robust die neue Diagnostiktechnik ist.

Zur Untersuchung der Verbreitung der Antibiotika-Resistenzgene kamen verschiedene Methoden (XbaI-Makrorestriktionsanalyse, Konjugationsexperimente und Plasmid-Transformation) zum Einsatz.

Gender Mainstreaming

Für die im Rahmen des Projektes untersuchten Fragestellungen zur Diagnostik von Resistenzen gegenüber Beta-Lactamase Antibiotika sowie den Mechanismen und der Verbreitung der Cephalosporinresistenz in Deutschland sind geschlechtsspezifische Aspekte nicht relevant.

Ergebnisse, Schlussfolgerungen, Fortführung

Der erstellte ESBL-Mikrobouillonverdünnungstest zum Nachweis der Antibiotikaresistenzen zeigte sehr gute Übereinstimmung im Vergleich mit kommerziellen Testsystemen.

Die Untersuchung der 163 Enterobakterien-Isolate ergab das Vorhandensein vieler verschiedener ESBL-Typen. Fortlaufend entstehen neue Antibiotikaresistenzen. In *E. coli* wurde neben durch Plasmide ("zusätzliche", leichtübertragbare Geneinheiten im Bakterium) vermittelten AmpC-Beta-Laktamasen eine hohe Häufigkeit der chromosomalen AmpC-Beta-Laktamase festgestellt.

Es wurden verschiedene Resistenzgene identifiziert, die auch in verschiedenen Kombinationen bei den unterschiedlichen Bakterienarten auftraten. Ein *K. pneumoniae* Isolat enthielt sogar drei verschiedene Resistenzgene. In Abstimmung mit der Lahey Clinic in Burlington, die neue Beta-Laktamase Sequenzen in einer Datenbank verwaltet [4], wurden zwei neu identifizierte Varianten der Resistenzgene in der GenBank Datenbank [5] hinterlegt.

Die neu entwickelten molekularbiologischen Tests zur Schnelldiagnostik einzelner ESBL-Typen erwiesen sich als zuverlässige, jedoch kostenintensive Methode.

Umsetzung der Ergebnisse durch das BMG

Der erfolgreiche Kampf gegen Infektionen mit mehrfach-resistenten Erregern erfordert eine Risikobewertung, wofür vor allem eine sichere Diagnostik der auftretenden Resistenzdeterminanten nötig ist, sowie die genaue Kenntnis über deren Ursprung und Verbreitungswege.

Die Kombination der Antibiotika Ceftazidim, Cefpodoxim, Cefotaxim und dem ESBL-Inhibitor Clavulansäure/Sulbactam als Methode der ESBL und AmpC Diagnostik machen eine Erkennung von ESBL-Bildnern sicherer. Die Reaktion auf die Veröffentlichung der Ergebnisse im Epidemiologischen Bulletin 28/2007 („ESBL und AmpC: Beta-Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien“) zeigte, dass die Zuverlässigkeit des ESBL-Nachweises durch Anwendung dieses kombinierten Tests bzw. dessen Integration in die Automatenysteme erhöht wurde.

Durch die in dieser Arbeit erstellten Transformations- und Konjugationssysteme können außerdem resistenzvermittelnde Eigenschaften und deren Übertragung überprüft werden. In der Routinediagnostik werden diese Analysen kapazitätsbedingt nur in sehr wenigen Laboren angewendet, weshalb die Anfragen zur Untersuchung insbesondere von potentiellen Ausbruchs-Isolaten in der Laufzeit dieses Projektes stark angestiegen sind.

Die Zusammenarbeit mit engagierten Medizinern schafft die Voraussetzung für den Aufbau eines Frühwarnsystems zum Erkennen von „Resistenz-Trends“. Dies wurde bereits wirksam im Fall des Auftretens von klonalen, multiresistenten *K. pneumoniae* mit Beteiligung von ESBL, AmpC- sowie Metallo-Beta-Laktamasen in zwei Kliniken [Epidemiologisches Bulletin 14/2008].

Die im diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse über Diagnostik und Epidemiologie von Beta-Laktamasen sind die Basis für die umfassende Resistenz-Überwachung bei Enterobakterien in Deutschland, die im Rahmen des Antibiotika-Resistenz-Surveillance-Projektes am RKI fortgesetzt wird. Dies ermöglicht eine genauere Risikobewertung und die Erarbeitung von Strategien zur Prävention und Kontrolle von Antibiotikaresistenzen.

verwendete Literatur

- [1] Pérez-Pérez F. J., and N. D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-Laktamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2153-2162
- [2] Siu, Po Liang Lu.2003.High Level expression of AmpC β -Laktamasen Due to Insertion of Nucleotides between -10 and -35 Promoter sequences in *Escherichia coli* Clinical Isolates: Cases not Responsive to Extended-spectrum Cephalosporin Treatment. *AAC.* 47: 2138-2144
- [3] Grimm V. and T. Bachmann.2004.Use of DNA Microarrays for Rapid Genotyping of TEM Beta-Laktamasen That Confer Resistance. *JCM.* 42: 3766-3774
- [4] Lahey Clinic Database
<http://www.lahey.org/Studies/?D=http://www.lahey.org/studies/webt.htm&C=404>
- [5] NCBI – National Center for Biotechnology information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>