

β-Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum

Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention

Zusammenfassung

Als extended spectrum β-Laktamasen (ESBL) wurden ursprünglich plasmidkodierte Enzyme der Ambler-Klassifizierung A und D bezeichnet, die aufgrund von Aminosäureaustauschmutation(en) auch Cephalosporine der 3. und 4. Gruppe hydrolysieren. Die erweiterte Definition schließt β-Laktamasen der Klasse C sowie Carbapenemasen (vorwiegend Metallo-β-Laktamasen der Klasse B) mit ein. ESBL der Gruppe A wurden bei Enterobacteriaceae erstmals 1988 in Frankreich bekannt. Seither gibt es eine fortlaufende Selektion neuer Mutanten (vor allem in den Gruppen TEM und SHV) sowie auch eine horizontale Ausbreitung ESBL tragender Hospitalstämme. Auch AmpC-β-Laktamasen (natürlicherweise bei einer Reihe von Enterobacteriaceae-Species verbreitet) können über Integrons mobilisiert und konstitutiv ausgeprägt eine weitere Verbreitung erfahren und bei *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. sowie *E. coli* auftreten. Kommt dann ein Verlust der Expression eines sog. „outer membrane proteins“ (OMP) hinzu, können derartige Stämme auch resistent gegen Carbapeneme werden. Carbapeneme der Klasse B treten bei *Ps. aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* inzwischen auch in Europa auf. Die geschilderte Entwicklung erfordert das rechtzeitige Erkennen dieser Mutanten in der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik und die Einleitung von krankenhaushygienischen Maßnahmen zur Verhinderung der weiteren Ausbreitung.

Schlüsselwörter

β-Laktamasen · ESBL · AmpC · Carbapenemresistenz

Die Resistenzentwicklung bei Bakterien gegen β-Laktamantibiotika beruht auf verschiedenen Mechanismen:

- Vorliegen von β-Laktamasen als β-Laktamring spaltende Hydrolasen (weit verbreitet, selten bei Streptokokken),
- Vorliegen von Penicillinbindeproteinen (PBP) mit geringer Affinität für β-Laktamantibiotika (veränderte PBP bei *S. pneumoniae*, zusätzliches PBP_{2a} bei Staphylokokken),
- Fehlen des Außenmembranproteins für die Aufnahme von Carbapenemen (*P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*).

Dabei ist die enzymatische Inaktivierung der Antibiotika durch β-Laktamasen der am weitesten verbreitete Resistenzmechanismus. Die Weiterentwicklung von β-Laktamantibiotika und die Einführung in die therapeutische Praxis sind immer ein Wettlauf mit dem Auftreten und der Verbreitung neuer Resistenzen gewesen. Die Acylureidogruppe bewirkt z. B. bei den Penicillinen (Azlocillin, Mezlocillin, Piperacillin) eine verbesserte Penetration in den periplasmatischen Raum Gramnegativer Bakterien und somit ein „Überfordern“ von β-Laktamasen – die Bakterien reagieren mit verstärkter β-Laktamasebildung [1].

Cephalosporine der 3. Gruppe und Cephamycine werden nicht durch herkömmliche, plasmidkodierte β-Laktamasen hydrolysiert. Durch Mutationen in einzelnen Aminosäuren (Aminosäureaustausch) können diese β-Laktamasen aber ihr Substratspektrum erweitern (extended spectrum β-lactamasen, ESBL [1]).

Mit der Einführung von Cephalosporinen der 3. Gruppe wurde man darauf aufmerksam, dass bestimmte *Enterobacteriaceae*-Genera von Natur aus ein chromosomales β-Laktamase-Gen (*ampC*) besitzen, das an sich reprimiert ist. Es gibt unter der Therapie selektierte konstitutive Mutanten; verschiedene Cephalosporine und Imipenem induzieren *ampC* [2]. Der breite Selektionsdruck durch Einsatz von Carbapenemen kann zum Auftreten von *P. aeruginosa* mit Verlust von *ompD*¹ führen; in den letzten Jahren folgte das Auftreten von β-Laktamasen, die auch Carbapeneme hydrolysieren [3].

Das Verfolgen der Resistenzentwicklung lässt weltweit einen Trend zum Anstieg der Häufigkeit des Auftretens von ESBL, von Carbapenemasen und von plasmidkodierten AmpC-β-Laktamasen erkennen. Nachstehend gehen wir auf diese Entwicklungen näher ein. Es werden Schlussfolgerungen für die mikrobiologische Diagnostik und für die Prävention erörtert.

β-Laktamasen sind bei Bakterien evolutionär weit verbreitet (*ampC* bei *Enterobacteriaceae*, chromosomale Gene bei *Bacteroides* spp. und anderen Anaerobien).

© Springer-Verlag 2003

¹ Omp: Outer membrane proteins=Porine. Porine bilden die Poren in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Mutationen des Porinsystems führen zu Resistenzen gegen Antibiotika.

Prof. Dr. W. Witte
Robert Koch-Institut, Bereich Werningerode,
Burgstraße 37, 38855 Werningerode
E-Mail: wittew@rki.de

W. Witte · M. Mielke

β -Lactamases with broad activity spectrum. Principles, epidemiology, and prevention of spread

Abstract

Initially plasmid-encoded enzymes of Ambler classes A and D had been designated as extended spectrum β -lactamases (ESBL) which became able to hydrolyze cephalosporins of the third and fourth group due to amino acid exchange mutation(s). The broader definition also includes β -lactamases of class C as well as carbapenemases (preferentially metalloenzymes of class B). Since the first occurrence of ESBL in France in 1988, there has been an ongoing selection of new mutants (above all in groups TEM and SHV), a horizontal spread of particular ESBL types, and clonal dissemination of hospital strains possessing ESBLs. AmpC- β -lactamases (as *ampC* natural resistance determinant in different enterobacterial species) can be mobilized via integrons and constitutively expressed become widely disseminated (emergence in *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., and in *Escherichia coli*). If such strains additionally do not express an OMP, they can also acquire carbapenem resistance. Meanwhile carbapenemases of class B have also been detected in *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* in European hospitals. The development described has consequences for timely detection in clinical bacteriological routine tests and for proper infection control measures designed to prevent further spread of extended spectrum β -lactamases.

Keywords

β -Lactamases · ESBL · AmpC · Carbapenemases

Originalien und Übersichtsarbeiten

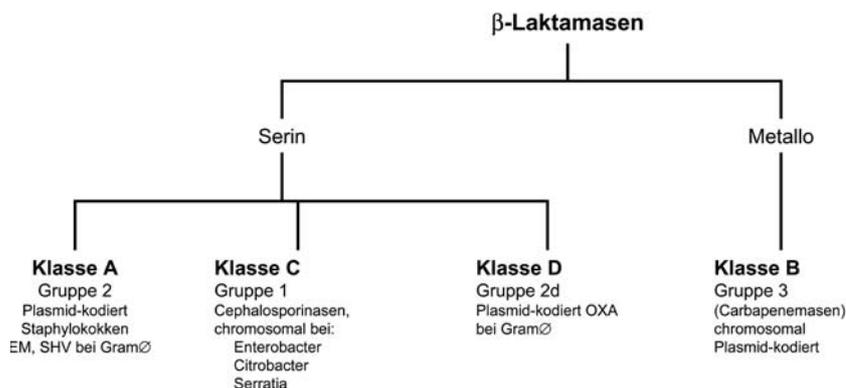


Abb. 1 ▲ Übersichtsschema zur Unterteilung von β -Laktamase. (TEM β -Laktamase vom TEM-Typ, SHV β -Laktamase vom SHV-Typ, OXA β -Laktamase vom OXA-Typ, Gram \emptyset gramnegativ, Metallo Metallo- β -Laktamase, Serin Serin- β -Laktamase)

robieren, bei *Pseudomonas* spp., bei *Bacillus* spp.). Während der therapeutischen Anwendung von β -Laktamantibiotika in den 60er-Jahren wurde eine Vielzahl plasmidkodierter Enzyme bekannt. Daher ist eine Gruppierung von β -Laktamase nach funktionellen Kriterien sinnvoll. Sie beruht auf den von Ambler [4] sowie von Bush, Jacoby und Medeiros [5] vorgeschlagenen Schemata (Abb. 1).

Extended Spectrum- β -Laktamase (ESBL)

ESBL gehören zu den Serin- β -Laktamase. Sie hydrolysieren oxyimino- β -Laktamase mit einer Rate, die wenigstens 10% der Hydrolyserate für Benzylpenicillin entspricht [5]. ESBL besitzen eine gute Aktivität gegen Amino- und Acylureido-penicilline und in unterschiedlichem Maß auch gegen Cephalosporine, die Cephamycine (z. B. Cefoxitin) aber ausgenommen. Sie werden durch sog. site-spezifische β -Laktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam) gehemmt. Die Anzahl an ESBL-Varianten, die seit 1983 identifiziert wurden, nimmt ständig zu. Sie können 9 verschiedenen strukturellen (evolutionären) Familien zugeordnet werden: TEM SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES und OXA [6].

Bei klinischen Isolaten sind ESBL der TEM und SHV-Familien am häufigsten vertreten (Übersicht bei [7]). ESBL vom TEM-Typ sind wahrscheinlich aus den weit verbreiteten, plasmidkodierten TEM-1- und TEM-2-Enzymen entstanden, die Enzyme des SHV-Typs aus SHV-1; die OXA-Enzyme aus OXA-2 und OXA-10 [5, 8, 9]. Einige ESBL haben offenbar ihren Ursprung in Spezies-spezifischen β -

Laktamase wie Homologievergleiche für CTX-M und *Kluyvera ascorbata*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris* und *Serratia fonticola* gezeigt haben [10, 11, 12]. Die ESBL-Familien PER, VEB und TLA zeigen eine Verwandtschaft zu den β -Laktamase *cepA* von *Bacteroides fragilis*, *cblA* von *Bacteroides uniformis* und CME von *Chrysoacterium meningosepticum* [13, 14].

Im Wesentlichen stammen unsere Kenntnisse über die Grundlagen der ESBL-Eigenschaften aus der Sequenzierung der Gene für die TEM- und SHV-Enzyme. Die wichtigen, das Substratspektrum erweiternden Mutationen liegen für TEM in der Position 164, für SHV in der Position 179 und für beide Familien in der Position 238. Sie führen zu einer Erweiterung der β -Laktam-Bindungsstelle [9]. Weitere Aminosäureaustausche, wie z. B. in Pos. 104 und 240 für TEM und SHV erhöhen die Interaktion mit der Oxyimino-Seitenkette von Cefotaxim. Die Mutation in Pos. 237 reduziert hingegen die Interaktion von TEM mit Cefotaxim, erhöht aber die mit Cefotaxim [15]. Phänotypisch drückt sich dies in unterschiedlichen Substratspektren der verschiedenen ESBL-Enzyme für die verschiedenen Cephalosporine der 3. Gruppe aus, wobei Cefotaxim noch von den meisten ESBL-Varianten hydrolysiert wird.

Plasmidkodierte AmpC- β -Laktamase

Diese Enzyme hydrolysieren 7- α -methoxy-Cephalosporine (Cephamycine, wie z. B. Cefoxitin und Cefotaxim). Sie werden nicht oder nur gering durch site-spezifische β -Laktamase-Inhibitoren ge-

hemmt, und sie haben zumeist einen isoelektrischen Punkt im basischen Bereich ($\geq pIE \geq 8$, [16]). AmpC- β -Laktamasen besitzen im Vergleich zu Ampicillin eine etwa 10fach höhere Aktivität (v_{max}) für Cephalotin und eine vergleichsweise niedrige Hydrolyserate für α -methoxy-Cephalosporine und oxyimino-Cephalosporine. Bakterien, die AmpC- β -Laktamase bilden, zeigen aber für diese Antibiotika minimale Hemmkonzentrationen im resistenten Bereich (Tabelle 1).

Bestimmte gramnegative Bakterien besitzen von Natur aus ein chromosomal lokalisiertes *ampC*-Gen: z. B. *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas* spp. und *P. aeruginosa*. Es ist durch den AmpR vermittelten Regulationsmechanismus reprimiert, unter der Therapie mit Cephalosporinen können aber konstitutive Mutanten selektiert werden [2]. Die bekannten plasmidkodierten Enzyme zeigen deutliche Homologien zu AmpC- β -Laktamasen, die durch ein chromosomales *ampC*-Gen kodiert sind. So zeigen z. B. die LAT- und CMY-Typen einen Bezug zu *Citrobacter freundii*, MIR-1 sowie ACT-1 zu *Enterobacter* spp., die FOX-MOX- und bestimmte CMY-Typen zu *Aeromonas* spp. Eine diesbezügliche Übersicht zeigt Tabelle 2.

Das Auftreten von AmpC- β -Laktamasen bei bakteriellen Infektionserregern, die das chromosomale *ampC*-Gen nicht besitzen (wie *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* und *Salmonella* spp.) führte schließlich zur Entdeckung der Übertragung von *ampC*-Genen auf Plasmide [18] von sehr unterschiedlicher Größe (7–180 kb), von denen nur wenige nicht selbst transmissibel waren [19, 20]. Sehr oft tragen diese Plasmide weitere Resistenzgene, die z. B. Resistenzen gegen Aminoglykoside, Chloramphenicol, Tetrazykline, Trimethoprim und Sulfonamide vermitteln. Das Gen für die AmpC- β -Laktamase ACT-1 liegt z. B. gemeinsam mit den *bla*-Genen für TEM-1 und SHV- β -Laktamasen vor [21]. Die für AmpC-Enzyme mit Herkunft aus *C. freundii* vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass *ampC*-Gene über eine Insertionssequenz mobilisiert und dann in ein Plasmid integriert wurden. Verschiedene Mutationen in *ampC* führten später wahrscheinlich zu den verschiedenen CMY- und LAT-Typen [17, 20]. Für das *ampC*-Gen, das die DHA-1- β -Laktamase bei *M. organii* kodiert, wurde die Integration in ein Integron be-

Tabelle 1
Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von β -Laktamantibiotika für *E. coli*-Konjugate mit unterschiedlichen plasmidkodierten AmpC- β -Laktamasen (Übersicht bei [17])

AmpC- β -Antibiotikum	MHK [mg/l]	ACC-1	ACT-1	BIL-1	CMY-1	CMY-2	CMY-3	CMY-4	CMY-5	CMY-8	DHA-1	DHA-2	FOX-1	FOX-2	FOX-3	FOX-4	LAT-1	LAT-2	LAT-3	LAT-4	MIR-1	MOX-1	
Ampicillin ^a		64	2.048																				
Carbenicillin ^b		128	1.024																				
Piperacillin		64	128	64	64																		
Temocillin		4	8	8	8																		
Mecillinam																							
Cephalothin ^c																							
Cefotaxime		8	64	8	16	16	16	64	64	64	64	4	2	16	1	64	128	64	96	4	64	64	>512
Ceftazidime		32	4	>16	4	128	64	8	256	32–64	64	8	8	32	16	>128	>128	>256	128	8	128	16	
Cefoxitin		4	>256		256	256	128	8	>256		128	16	128	256	64	>512	64	256	256	64	≥256	≥256	
Cefotetan		2	16		256	64	32	32			32		32	64		128	128				≥64	>512	
Cefmetazole					128	64		4													≥64	512	
Moxalactam		1	8	2	8	2	0,06				0,5		1	1		32					64	>512	
Aztreonam		1	4	4	16	64	32	64	64		16	2	1	2	1	64	64	64	64	8	128	16	
Cefepime		0,25	≥0,06		0,25	0,5	0,06	0,06		0,125	0,03	0,03		0,13	≥0,06	2				0,5	0,125	1	
Cefpirome		1	2	0,5	2	0,5					0,25	0,25		1							1	1	
Imipenem		0,13	1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5–1	0,25–0,5	≥0,125	0,25	0,25		0,5	0,12	0,5	2				1	0,5	
Meropenem		0,03		0,06	0,06								0,03			0,12						0,125	

^aoder Amoxicillin, ^boder Ticarcillin, ^coder Cefazolin

Tabelle 2

Zuordnung von AmpC-β-Laktamasen zu den einzelnen taxonomischen Gruppen gramnegativer Bakterien

Bakteriengenera und -spezies	AmpC-β-Laktamase
<i>E. cloacae</i>	ACT-1, MIR-1
<i>C. freundii</i>	CMY-2, CMY-3, CMY-4, CMY-5, CMY-6, YMY-7, LAT-1, LAT-3, LAT-4
<i>Aeroromas</i> spp.	FOX-1, FOX-2, FOX-3, FOX-4, FOX-5, MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8, CMY-9
<i>M. morgani</i>	DHA-1, DHA-2
<i>H. alvei</i>	ACC-1

geschrieben, das noch weitere Resistenzgene trägt [22]. Das Auftreten von plasmidkodierten AmpC-β-Laktamasen ist weltweit beobachtet worden. Tabelle 3 zeigt die seit dem erstmaligen Auffinden im Jahr 1988 beschriebenen plasmidkodierten Laktamasen.

AmpC-β-Laktamasen zeigen auch eine geringe Aktivität gegenüber Carbapenemen. In *K. pneumoniae*-Stämmen mit verminderter Durchlässigkeit der Außenmembran (fehlende Expression eines OMP) tragen sie zur Carbapenemresistenz bei [23].

Carbapenemasen

β-Laktamasen, die auch Carbapeneme hydrolysieren, können den verschiedenen Enzymgruppe A (Penicillinasen), D (Oxacillinasen) und B (Metalloenzyme) angehören. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die bisher bekannte Gruppe A-Carbapenemasen.

Oxacillinasen (Gruppe D) mit Carbapenemase-Aktivität sind noch nicht sehr lange bekannt, sie wurden bei *A. baumannii* in verschiedenen Ländern nachgewiesen, OXA-23 in Schottland, OXA-27 in Singapur, OXA-24 und OXA-25 in Spanien sowie OXA-26 in Belgien und OXA-40 in Spanien [25, 26, 27].

Metalloenzyme (Gruppe B) wurden zunächst als natürliche Resistenzen bei einer Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterien bekannt. Hierzu zählen *B. cereus*, *St. maltophilia*, *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Legionella germanii* und *Janthinobacterium lividum*. Die Metalloenzyme werden nicht durch Clavulansäure gehemmt, wohl aber durch Chelatoren für zweiwertige Kationen wie EDTA. Als natürliche Resistenzdeterminanten sind die kodierenden Gene chromosomal lokalisiert, sie wurden bisher

nicht als erworbene (übertragbare) Resistenzen nachgewiesen.

Von besonderer klinisch-epidemiologischer Bedeutung sind die Plasmid- und Integron-kodierten Metalloenzyme der Familien IMP und VIM, die bei klinischen Isolaten von *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. und *Pseudomonas* spp. auftreten [3, 28, 29, 30, 31]. Eine entsprechende Übersicht zeigt Tabelle 5. Diese β-Laktamasen haben ein sehr breites Substratspektrum, nur Aztreonam

wird nicht hydrolysiert. Die Hauptmerkmale bisher bekannter Carbapenemasen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Nachweis von ESBL, AmpC-β-Laktamasen und Carbapenemasen

Der Nachweis von ESBL, AmpC-β-Laktamasen und Carbapenemasen ist schon aufgrund der unterschiedlichen Resistenzphänotypen für ausgewählte β-Laktamantibiotika möglich (Tabelle 7). Unklare Ergebnisse sind dann zu erwarten, wenn ein klinisches Isolat gleichzeitig mehrere verschiedene β-Laktamasen bildet. Dies kann vor allem der Fall sein bei Hospitalstämmen der Gattungen *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Serratia*, die das chromosomale *ampC*-Gen konstitutiv exprimieren und zusätzlich eine ESBL erworben haben. Dann ist für eine weitere Differenzierung der Einsatz molekularer Methoden unerlässlich. Werden bei der phänotypischen Resistenzbestimmung nur Cefotaxim oder Ceftazidim allein ge-

Tabelle 3

Bisher beschriebene plasmidkodierte AmpC-β-Laktamasen

AmpC-β-Laktamase	Jahr	Land	Betroffene Bakterienspezies
MIR-1	1988	USA	<i>K. pneumoniae</i>
CMY-1	1988	Südkorea	<i>K. pneumoniae</i>
BIL-1	1989	Pakistan	<i>E. coli</i>
FOX-1	1989	Argentinien	<i>K. pneumoniae</i>
CMY-2	1990	Griechenland	<i>K. pneumoniae</i>
	1994	Frankreich	<i>K. senftenberg</i>
MOX-1	1991	Japan	<i>K. pneumoniae</i>
DNA-1	1992	Saudi-Arabien	<i>S. enteritidis</i>
	1998	Frankreich	<i>K. pneumoniae</i>
DHA-2	1992	Frankreich	<i>K. pneumoniae</i>
FOX-2	1993	Guatemala	<i>K. pneumoniae</i>
LAT-1	1993	Griechenland	<i>K. pneumoniae</i>
FOX-3	1994	Italien	<i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i>
LAT-2	1994	Griechenland	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i>
ACT-1	1994	USA	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
MOX-2	1995	Griechenland	<i>K. pneumoniae</i>
CMY-4	1996	Tunesien	<i>P. mirabilis</i>
	1998	Indien	<i>K. pneumoniae</i>
	1999	UK	<i>E. coli</i>
ACC-1	1997	Deutschland	<i>K. pneumoniae</i>
	1997–2000	Tunesien	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Salmonella</i> spp.
CMY-3	1998	Frankreich	<i>P. mirabilis</i>
LAT-3	1998	Griechenland	<i>E. coli</i>
LAT-4	1998	Griechenland	<i>E. coli</i>
CMY-8	1998	Taiwan	<i>K. pneumoniae</i>
CMY-5	1999	Schweden	<i>K. oxytoca</i>
FOX-4	2000	Spanien	<i>E. coli</i>

Tabelle 4

Carbapenemase der Ambler-Gruppe A (Übersicht bei [24])

Bakterienspezies	Carbapenemase	Land	Jahr
Chromosomal kodiert (evolutionär vorhanden?)			
<i>E. cloacae</i>	NMC-A	Frankreich	1990
(klinisches Isolat)	IMI-1 (95% homolog zu NMC-A)	USA	1984
<i>S. marcescens</i>	SME-1	England	1987
	SME-2	USA	2000
	SME-3		
Plasmid und Integron kodiert			
<i>P. aeruginosa</i>	GES-2	Südafrika	2001
<i>K. pneumoniae</i>	KPC-1	USA	2002 (auf 50-kb-Plasmid)

prüft, so können infolge der unterschiedlichen Substratspektren ESBL unentdeckt bleiben. Eine höhere Sicherheit bietet die Prüfung von Cefpodoxim, das von den meisten ESBL hydrolysiert wird. Bereits bei minimalen Hemmkonzentrationen von ≥ 2 mg/l für Cefotaxim und Ceftazidim besteht begründeter Verdacht auf ESBL. Für Cefpodoxim wird dieser Wert mit 8 mg/l angegeben [32]. Er wird bestätigt durch Absenkung der MHK-Werte um 3 Stufen durch Clavulansäure (4 mg/l konstant vorgelegt) sowie bei Anwendung des Agardiffusionstests für die oben genannten Cephalosporine durch eine Hemmhofreduktion um 5 mm (NCCLS-Standard, [32]). Dass die eigentlich noch im Bereich der Empfindlichkeit liegenden MHK klinisch relevant sind, wurde in 2 kürzlich veröffentlichten Studien deutlich [33, 34]. Der kombinierte Agardiffusionstest (sog. Jarlier-Test; Amoxicillin/Clavulansäure-Testblättchen benachbart zu einem Blättchen mit den o. g. Cephalosporinen der 3. Gruppe; schematische Darstellung in Abb. 2) bedarf einer genauen Einstellung des Inokulums und des richtigen Abstandes zwischen den Testblättchen von ~ 15 mm).

Wie bereits ausführlicher erörtert, ist phänotypische Resistenz gegen Cefoxitin ein Indikator für die Bildung einer AmpC- β -Laktamase. Kann im Falle der Resistenz gegen Carbapeneme diese durch EDTA aufgehoben (z. B. Zusatz von 75 μ g EDTA zum Testblättchen sowie zum Testmedium für MHK-Bestimmung [35]) oder deutlich reduziert werden, dann handelt es sich wahrscheinlich um eine Metallo- β -Laktamase.

Molekulare Nachweise: Für die Detektion von ESBL sind die PCR-Amplifikation des jeweiligen β -Laktamase-Gens

(z. B. TEM, SHV) und eine nachfolgende Sequenzierung zum Feststellen der relevanten Punktmutationen erforderlich. Dies ist nach wie vor für die Routinediagnostik zu aufwändig. Mit der Einführung der Chip-Technologie mit captureprobes für die einzelnen Allele der β -Laktamase-Gene wird dann aber eine schnelle Detektion bestimmter ESBL-Typen möglich sein. Für die Unterscheidung der 6 häufigsten Familien plasmidkodierter AmpC-Enzyme wurde eine Multiplex-PCR etabliert [36]. Auch das Erkennen von Metallo- β -Laktamasen der Gruppe B ist durch PCR möglich [37].

Epidemiologie

Publikationen über das Auftreten plasmidkodierter Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Gruppe liegen seit 1983 vor [38]. Seit Ende der 1980er-Jahre gibt es Berichte über die epidemische Verbreitung dieser Resistenz bei *Enterobacteriaceae* in Krankenhäusern, z. T. wurden zu dieser Zeit bereits ESBLs identifiziert. Die Berichte stammten vor allem aus Frankreich [39], aus den USA [40] und aus mehreren europäischen Ländern (wie z. B. Griechenland [41], Polen [42] und Ungarn [43]). Abgesehen davon, dass es international nur wenige industrieunabhängige Studien zur Resistenzsituation gibt, wurde in diesen der Aspekt von ESBL- und AmpC-Enzymen nicht immer systematisch verfolgt. Die bisher vorliegenden Daten lassen sich wie folgt interpretieren:

Die Durchschnittswerte für die Häufigkeit von ESBL-Bildnern in größeren geographischen Regionen sind nicht allgemein gültig, da die Inzidenz

zwischen den teilnehmenden Studienzentren ganz erheblich variieren kann (Situation in Frankreich, [44]).

Die Nichtkontinuierliche Überwachungsprogramme können aufgrund der Dynamik der ESBL-Epidemiologie eine nur vorübergehende Situation erfassen [45].

Unter Berücksichtigung dieser Vorbehalte ist aber allgemein davon auszugehen, dass in den vergangenen 7 Jahren die Häufigkeit von *Enterobacteriaceae* mit Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Gruppe deutlich zugenommen hat. Nach den Daten der weltweit in den Jahren 1997–1999 durchgeführten SENTRY-Studie (Erfassung von resistenten *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* und *Salmonella* spp.) treten Isolate mit einem für ESBL charakteristischen Resistenzphänotyp bei *K. pneumoniae* zu 45% in Lateinamerika, zu 25% in der Region des westlichen Pazifik, zu 23% in Europa und zu 8% in den USA auf. Die Erhebung in west- und südeuropäischen Ländern im Jahr 1994, die 35 Intensivtherapiestationen in 10 Ländern einschloss, ergab eine ESBL-Häufigkeit von 22,8% für alle untersuchten Isolate und von 28,6% für *Klebsiella pneumoniae*. In einer Folgeuntersuchung (1997–1998) lag der Wert für *Klebsiella* spp. bei 25,4% [46]. Die in Frankreich landesweit durchgeführte Studie, die 12 Universitätskliniken einschloss, wies 1,5% aller *Enterobacteriaceae* als ESBL-Bildner aus [44]. Bei einer weiteren Studie mit vergleichbarem Design im Jahr 1998 unter Mitwirkung von 14 Universitätskliniken lag dieser Wert bei 3,2% [45]. Die in Mitteleuropa durchgeführten Studien der Paul Ehrlich Gesellschaft ergaben für 1990, 1995 und 1998 für die Cefotaximresistenz bei *E. coli* Werte unter 0,5%, die Studie im Jahr 2001 einen Wert von 1,5% für die Cefotaximresistenz und von 1,8% für die Ceftazidimresistenz. Für 11,6% der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate ist die Bildung von ESBL wahrscheinlich. Die Ergebnisse zur Häufigkeit von Unempfindlichkeit gegen Cefotaxim und Ceftazidim bei *E. coli* aus Blutkulturen in europäischen Krankenhäusern (EARSS-Studie) zeigen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern (Abb. 3). Nach einer im Jahr 1999 in Südkorea durchgeführten Untersuchung, die 28 Krankenhäuser einschloss, waren 18,1% aller *Klebsiella pneumoniae* ESBL-Bildner [47].

Tabelle 5

Auftreten und Verbreitung von Metallo-β-Laktamase der IMP- und VIM-Typen

Metallo-β-Laktamase	Bakterienspezies	Integron	Land	Jahr
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i>	+	Japan	1994
	<i>A. baumannii</i>	n.b.	Japan	2000
	<i>P. aeruginosa</i>	+	Japan	1996
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	n.b.	Japan	1998
	<i>P. putida</i>	n.b.	Japan, Taiwan	1998
	<i>K. pneumoniae</i>	n.b.	Japan, Singapur	1998
IMP-2	<i>A. baumannii</i>	+	Italien	2000
IMP-3	<i>Sh. flexneri</i>	+	Japan	1998
IMP-4	<i>A. baumannii</i>	n.b.	Hongkong	2000
	<i>Citrobacter youngae</i>	+	China	2000
IMP-5	<i>A. baumannii</i>	n.b.	Portugal	
IMP-6	<i>S. marcescens</i>	+	Japan	2001
IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	+	Kanada	1999
	<i>P. aeruginosa</i>	n.b.	Malaysia	2002
IMP-8	<i>K. pneumoniae</i>	n.b.	Taiwan	
IMP-9	<i>P. aeruginosa</i>	n.b.	China	2001
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	+	Italien	1999
	<i>A. baumannii</i>	+	Italien	
	<i>A. xylosoxydans</i>	n.b.	Italien	2001
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	+	Frankreich	2000
		n.b.	Griechenland	2000
		+	Italien	2001
		+	Spanien	2002
		n.b.	Korea	
	<i>A. baumannii</i>	n.b.	Korea	
	<i>E. cloacae</i>	n.b.	Korea	
	<i>S. marcescens</i>	n.b.	Korea	
	<i>P. putida</i>	n.b.	Korea	
	<i>Acinetobacter</i> spp.	n.b.	Italien	
	<i>P. putida</i>	n.b.	Taiwan	2001
<i>P. stutzeri</i>	n.b.	Taiwan	2001	
VIM-3	<i>P. aeruginosa</i>	n.b.	Taiwan	2001

n.b. nicht bestimmt, unbekannt

Die mikrobiologischen Ursachen für das Auftreten und die Verbreitung von ESBL sind komplex, daraus resultiert auch eine entsprechende Dynamik:

• Ebenso wie für grampositive Erreger von Hospitalinfektionen (MRSA, glykopeptidresistente Enterokokken) können bestimmte ESBL bildende Hospitalstämme klonal zwischen Krankenhäusern einer Region verbreitet werden. Dies wurde bereits 1994 für einen SHV-4 bildenden *K. pneumoniae*-Stamm in 14 Krankenhäusern in Frankreich [48] und 1997 dann für einen TEM-24 bildenden *E. aerogenes* beschrieben [49]. Das Auftreten eines bestimmten, das En-

zym CTX-M-3 bildenden *S. typhimurium*-Stammes wurde für Russland, Ungarn und Griechenland berichtet [50].

• Für das Auftreten bestimmter ESBL-Typen (wie z. B. SHV-5) kann eine Koevolution (unabhängig voneinander erfolgte Mutationen und Selektion) nicht ausgeschlossen werden. Über SHV-5 wurde in nahezu allen Ländern berichtet, die etwas gründlicher auf ESBL geachtet hatten. Auf eine Koevolution weisen auch Beobachtungen hin, die 1988 in einem Krankenhaus in Clermond-Ferraud gemacht wurden: Hier traten bei *K. pneumoniae* im gleichen Zeitraum 5 ESBL-Typen auf (TEM-5, TEM-8,

TEM-12, TEM-16 und TEM-24 [51]. In einem New Yorker Krankenhaus wurden 1997 3 ESBL-Typen (TEM-10, TEM-26 und SHV-7) bei *Enterobacteriaceae* gefunden [52]; in einem Krankenhaus in Durban waren es 1996 sogar 13 [53]!

• Dass es bestimmte Hospitalstämme sind, die ESBL erwerben können, lassen Beobachtungen in einem Krankenhaus in Madrid im Zeitraum 1995–1999 vermuten: 2 *K. pneumoniae*-Stämme mit TEM-69 waren im Beobachtungszeitraum neben 28 verschiedenen ESBL bildenden *K. pneumoniae*, die zwischen 1989 und 1999 isoliert wurden, vorherrschend [54].

• Parallel zur klonalen Ausbreitung von ESBL bildenden Hospitalstämmen findet offenbar ein horizontaler Transfer ESBL kodierender Plasmide statt. Ein Plasmidtransfer war wohl verantwortlich für die Verbreitung von TEM-3 bei 10 verschiedenen *Enterobacteriaceae*-Species in 26 französischen Krankenhäusern im Jahr 1989 [55, 56]. Gleiches gilt für die Ausbreitung von CTX-M-3 bei 8 Spezies in 15 polnischen Krankenhäusern im Jahr 2000 [57].

Die Komplexität von Vorgängen der Resistenzausbreitung und der Selektion von β-Laktamase-Mutanten mit ESBL-Eigenschaft wird in Berichten über Untersuchungen an Langzeitpatienten deutlich. Bei einer über 3 Monate durchgeführten Untersuchung wurde bei *E. coli*-Bakterien aus mehreren Sepsisepisodes der Erwerb von SHV-1 festgestellt. Später wurden das Auftreten von SHV-8 infolge einer Punktmutation in *bla* HSV-1 und noch später Veränderungen des Porinmusters beobachtet [57]. Auch erfolgte die Ausbreitung eines bestimmten ESBL kodierenden Plasmides bei Isolatzen aus Mischkulturen der betroffenen Patienten, so z. B. für *bla* TEM-24 zwischen *E. coli*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* und *P. aeruginosa* [58].

Es gibt bisher keine Ergebnisse systematischer Studien, die Anhaltspunkte für die Häufigkeit des Auftretens von übertragbaren AmpC-β-Laktamasen geben können. Von den im Rahmen der im Jahr 2001 durchgeführten Studie der Paul Ehrlich Gesellschaft untersuchten *E. coli* waren 1,5% resistent gegen Cefotaxim und 0,6% gegen Cefotaxim/Cla-

Tabelle 6

Hauptmerkmale von bisher bekannten Carbapenemasen

Klassifizierung nach Ambler	Carbapenemase	Substratspektrum					Hemmung durch		Bakterien-spezies	Genetische Lokalisation
		Amino-penicillin	Ureido-penicillin	Cephalo-sporine Gr. III u. IV	Aztreo-nam	Carba-peneme	Clavulan-säure	EDTA		
A	NmCASme-1-Sme-3 IMI-1	+++	+	-	+	+++	±	-	<i>E. cloacae</i>	Chromosomal
A	KPC-1	+++	+++	-	+++	+++	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmidal
	GES-2	+++	+++	+++	+++	+	+	-	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmidal, Integron
B	IMP1-IMP9	+++	+++	+++	-	+++	-	+	Pseudomonaden, Enterobacteriaceae, <i>Alcaligenes</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.	Chromosomal, plasmidal, Integron
B	VIM-1-VIM-3	+++	+++	+++	-	+++	-	+	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>A. baumannii</i>	Chromosomal, plasmidal, Integron
D	OXA-23-OXA-27	+++	+	+++	-	+	±	-	<i>A. baumannii</i>	Chromosomal, Integron

Angaben zur Aktivität: +++ stark, ++ im mittleren Bereich, + schwach, ± sehr niedrig, - nicht nachweisbar

mulansäure. Die Werte lagen für Ceftazidim bei 1,8% und für Ceftazidium/Clavulansäure bei 0,2%. Inwieweit es sich bei den Isolaten, die auch gegen die Kombination mit Clavulansäure resistent waren, um AmpC-Bildner gehandelt hat, ist nicht bekannt.

Berichte über die Ausbreitung von CMY-2 bei *E. coli* liegen aus Taiwan vor (2000, [59]). Im Jahr 2001 berichteten 2 Krankenhäuser aus Spanien über die Verbreitung von CMY-2 bei *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *P. mirabilis* [60]. Dass plasmidkodierte AmpC-β-Laktamasen (CMY-2) auch unabhängig vom Selektionsdruck in Krankenhäusern auftreten können, zeigt ihr Nachweis bei *E. coli* aus 2 Urinisolaten (Harnwegsinfektionen, Chicago) [61] und bei Isolaten von *Salmonella enterica* aus den USA im Jahr 2002 [62]. Wenn bisher auch selten (0,8%), so wurden CMY-2 bildende *Salmonella*-Stämme aber auch in Kanada gefunden [63]. Der Bericht über das Auffinden von *bla* CMY-Genen bei 21 *Salmonella*- und 54 *E. coli*-Isolaten aus Fleischproben, die 2001 in den USA untersucht wurden, ist deshalb nicht überraschend [64]. In diesem Zusammenhang weisen wir darauf hin, dass Ceftiofur seit 1998 für die Be-

handlung verschiedener Infektionen beim Rind zugelassen ist.

Carbapenemresistenz: Die überregionalen Studien der Paul Ehrlich Gesellschaft in Mitteleuropa in den Jahren 1998 und 2001 lassen einen Anstieg der Imipenemresistenz bei *P. aeruginosa* von 2,7% auf 8,5% erkennen. Ob daran das Auftreten und die Verbreitung von Carbapenemasen beteiligt sind, ist nicht bekannt. Größere, überregionale Studien zu dieser Frage sind bisher selten.

Eine Untersuchung in Japan aus den Jahren 1996–1997 zeigte, dass 4,4% aller untersuchten Isolate von *P. aeruginosa* und 1,3% der *S. marcescens*-Isolate *bla* IMP-1 besitzen. Sporadisch wurde das Gen auch in *Escherichia coli* und *Citrobacter freundii* gefunden, was als Beleg für eine horizontale Ausbreitung gilt ([65], s. auch Tabelle 5). Auch für *bla* IMP-2 ist eine Verbreitung zwischen *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. in Südkorea wahr-

Tabelle 7

Für den Nachweis von ESBL, AmpC-β-Laktamasen und Carbapenemasen im klinischen-bakteriologischen Laboratorium relevante Resistenzphänotypen

β-Laktamase	Resistenzphänotyp					Hemmung durch	
	CAZ	CTX	CPD	FOX	IMP/MEM	Clavulansäure	EDTA
ESBL	(R)	(R)	R	S	S	+	-
AmpC	R	R	R	R	S	-	-
Carbapenemasen:	R	R	R	R	R	-	+
Gruppe B, IMI, IMP							
Gruppe D (OXA 23–27)	R	R	R	-	(R)	±	-
Gruppe A	(R)	(R)	(R)	-	R	+	-

CAZ Ceftazidim, CTX Cefotaxim, CPD Cefpodoxim, FOX Cefoxitim, IMP/MEM mipenem/Meropenmen, R resistent, (R) zumeist resistent, S empfindlich

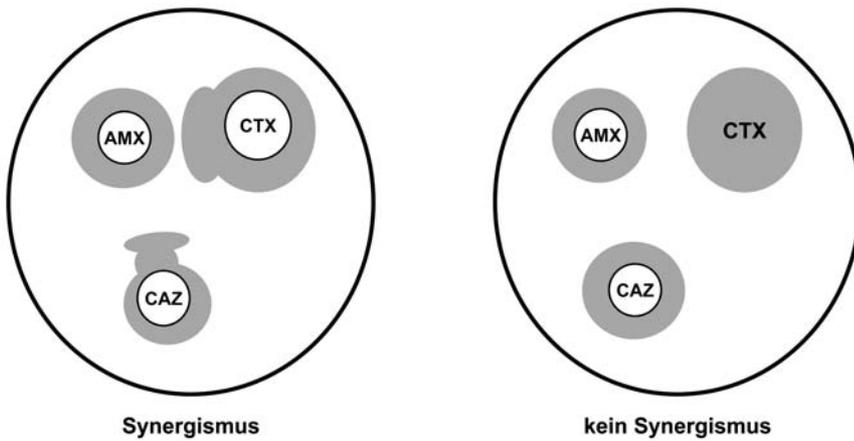


Abb. 2 ▲ Phänotypischer Nachweis von ESBL mittels kombinierten Agardiffusionstests. (AMX Amoxycillin/Clavulansäure-Testblättchen, CTX Cefotaxim-Testblättchen, CAZ Ceftazidim-Testblättchen)

scheinlich (s. Tabelle 5). Über die endemische Ausbreitung von *A. baumannii* mit *blaOXA-40* in einem spanischen Krankenhaus wurde 2002 berichtet [66].

Maßnahmen zur Minimierung der Ausbreitung

Im internationalen Schrifttum sind zahlreiche Ausbrüche nosokomialer Infektionen mit ESBL bildenden *Enterobacteriaceae*, insbesondere *K. pneumoniae*, beschrieben worden (die wichtigsten Mitteilungen [67, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76]). Ein relevantes Risiko geht gegenwärtig von *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*,

Acinetobacter spp. und *Pseudomonas aeruginosa* aus. Unsicherheiten im Umgang mit diesen Befunden bestehen nicht nur hinsichtlich der angemessenen Konsequenzen aus dem Nachweis eines entsprechenden Isolates, sondern auch aufgrund der Probleme bei der Diagnostik/Identifizierung und den sich daraus ableitenden Schwierigkeiten bei der Einschätzung der epidemiologischen Situation. Die hohen methodischen Anforderungen an den korrekten Nachweis dieser Enzyme und die Bestimmung der Lokalisierung der kodierenden Gene im bakteriellen Genom (chromosomal- oder plasmidgebunden) sowie die hohe Rate

falsch negativer Befunde legen gegenwärtig unter praktischen Gesichtspunkten ein infektionspräventives Vorgehen nahe, das sich auf der Basis weit verbreiteter mikrobiologisch-diagnostischer Methoden aus dem Resistenzphänotyp ableitet.

In diesem Zusammenhang kommt der Erfassung und Bewertung von Erregern mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen gemäß § 23 IfSG besondere Bedeutung zu [68]. Es ist sicher unzweifelhaft, dass bei Auftreten nicht nur einzelner Isolate, bei denen der Verdacht auf einen epidemischen Zusammenhang besteht, die Isolierung der betroffenen Patienten in Analogie zum Vorgehen bei MRSA (ohne die Erfordernis zum Tragen eines Mund-Nasen-Schutzes mit Ausnahme von Tätigkeiten, bei denen kontaminierte Aerosole entstehen können) die geeignetste Maßnahme darstellt, die weitere Ausbreitung zügig und wirkungsvoll zu unterbrechen. Schwieriger ist die Entscheidung, ob dies bereits beim Einzelfall durchzuführen ist. In jedem Falle (d. h. bereits beim Einzelfall) sollte der Nachweis eines entsprechenden Isolates Anlass

- ▶ zu einem entsprechenden Hinweis in der Krankenakte und in Verlegungsberichten,
- ▶ zur konsequenten Kittel- und Handschuhpflege (hinsichtlich der Flächen- und Desinfektion) wird auf die ent-

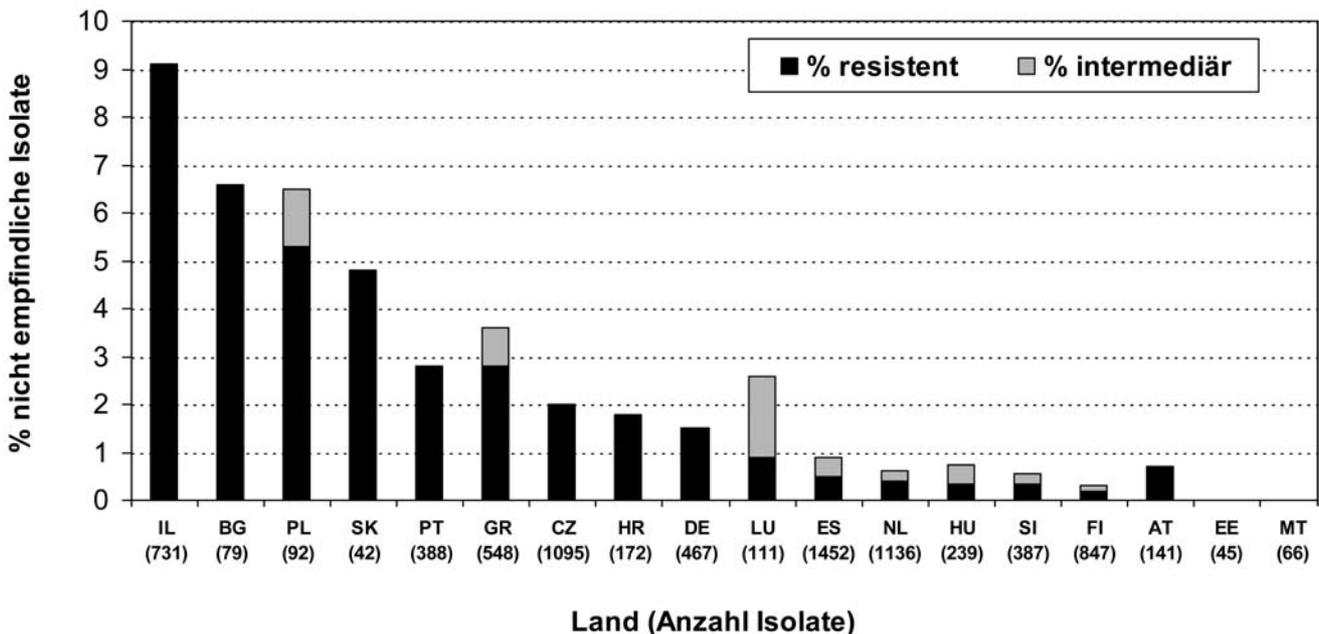


Abb. 3 ▲ Unempfindlichkeit von *E. coli* aus Blutkulturen gegen Ceftazidim. EARSS-Studie 2001 (keine Daten aus Ländern mit weniger als 10 Isolaten)

Tabelle 8

Besondere Aufmerksamkeit erfordern Resistenzmuster

Resistenz gegen:

1.	2.	3.
Ceftazidim oder Cefpodoxim oder Ceftriaxon oder Cefotaxim oder	+ Imipenem/Meropenem (oder andere Carbapeneme) oder	+/- Amikacin/Tobramycin
Cefepim oder Cefoxitin	+ Piperacillin oder	
Oder Aztreonam	+ Fluorochinolone (Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin)	

sprechende Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene verwiesen) und zur patientenbezogenen Anwendung von Pflegeutensilien,

- zu einer sorgfältigen Beobachtung der epidemiologischen Situation durch eine gezielte Surveillance sowie
 - zu einer Überprüfung des Antibiotikaregimes (ggf. Reduzierung des Einsatzes von Cephalosporinen der 3. Generation)
- sein.

Besondere Aufmerksamkeit erfordern bei den o.g. Spezies (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) die folgenden Resistenzmuster (Tabelle 8).

Bei einem Nachweis derartiger Erreger steht in der Regel nur noch ein gut bakterizid wirksames Antibiotikum zur Therapie einer schweren, lebensbedrohlichen Infektion zur Verfügung. In diesen Fällen wird eine Isolierung des betroffenen Patienten im Einzelzimmer empfohlen. Wie bei anderen komplexen Problemen der Hygiene können Fortbildungen in den entsprechenden Risikobereichen (wie z. B. Intensivstationen) ggf. in Zusammenarbeit mit dem betreuenden mikrobiologischen Labor zum sachgerechten Umgang wesentlich beitragen.

Literatur

1. Livermore DM (1995) β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557–584
2. Sanders CC (1987) Chromosomal cephalosporins responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 41:573–593
3. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R et al. (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38:71–78
4. Ambler RP (1980) The structure of β -lactamases. *Philos Trans R. Soc London Series B Biol Sci* 289:321–331
5. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211–1233
6. Jacoby GA (1994) Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 [Suppl 1]: 2–11
7. Gniadkowski M (2001) Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-microorganism. *Clin Microbiol Infect* 7:597–608
8. Jacoby GA, Medeiros AA (1991) More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1697–1704
9. Medeiros AA (1997) Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 24 [Suppl 1]:S19–45
10. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R et al. (1996) Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 40:509–513
11. Oliver A, Pérez-Díaz JC, Coque TM et al. (2001) Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 45:616–620
12. Péduzzi J, Farzaneh S, Reynaud A et al. (1997) Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Serratia fonticola* CVU. *Biochim Biophys Acta* 1341:58–70
13. Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L et al. (1999) Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*bla_{CME}*) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2193–2139
14. Bellais S, Poirel L, Naas T et al. (2000) Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A β -lactamase CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1–9
15. Knox JR (1995) Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:25933–259601
16. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R et al. (1996) Comparative characterization of the cephalosporinase *bla_{CMY-1}* gene and its relationship with other β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1926–1930
17. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA (2002) Plasmid determined AmpC type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1–11
18. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S (1989) Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 17:316–321
19. Tzouveleki LS, Tzelepi E, Mentis AF, Tsakris A (1993) Identification of a novel plasmid-mediated β -lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 31:645–654
20. Wu SW, Dornbusch K, Kronvall G, Norgren M (1999) Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type β -lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephalosporinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1350–1357
21. Bradford PA, Urban C, Mariano N et al. (1997) Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 41:563–569
22. Barnaud G, Arlet G, Danglot C, Philippon A (1997) Cloning and sequencing of the gene encoding the AmpC β -lactamase of *Morganella morganii*. *FEMS Microbiol Lett* 148:15–20
23. Cao VT, Arlet G, Ericsson BM et al. (2000) Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J Antimicrob Chemother* 46:895–900
24. Nordmann PL, Poirel L (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8:321–331
25. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK (2000) Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 44:196–199
26. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM (2001) Characterization of OXA-26, and OXA-27, molecular class β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:583–588
27. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J (2000) OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1556–1561
28. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L et al. (2000) Characterization of the (metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla_{VIM}* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1229–12235
29. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al. (1999) Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1584–1590
30. Mavroidi A, Tsakris A, Tzelepi E et al. (2000) Carbapenem-hydrolyzing VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *J Antimicrob Chemother* 46:1041–1042
31. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC et al. (2001) Metallo- β -lactamases in clinical isolates in Taiwan and identification of VIM-3 novel variant of VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2224–2228
32. NCCLS (2002) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth Informational Supplement. Vol.22, No 1, M100-S12

33. Kim YK, Pai H, Lee HJ et al. (2002) Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1481–1491
34. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A et al. (2001) Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 39:2206–2212
35. Young D, Lee K, Yum JH et al. (2002) Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 40:3798–3801
36. Perez-Perez FJ, Hansen ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162
37. Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T (1998) Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2006–2011
38. Knothe H, Shah P, Krcmery V et al. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11:315–317
39. Sirot D, Sirot J, Labia R et al. (1987) Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 20:323–334
40. Meyer KS, Urban C, Eagan JA et al. (1993) Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med* 119:353–358
41. Vatopoulos AC, Philippon A, Tzouveleki LS et al. (1990) Prevalence of a transferable SHV-5 type beta-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *J Antimicrob Chemother* 26:635–648
42. Gniadkowski M, Schneider I, Jungwirth R et al. (1998) Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three Polish hospitals: identification of three novel TEM- and SHV-5-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 32:514–520
43. Szabó D, Filetőh Z, Szentandrassy J et al. (1999) Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital. *J Clin Microbiol* 37:4167–4169
44. Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ et al. (1992) Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1677–1681
45. De Champs C, Sirot D, Chanal C (2000) Bonnet R, Sirot J, the French Study Group. A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3177–3179
46. Babini GS, Yuan M, Livermore DM (1999) Prevalence of ESBLs and other potent beta-lactamases among *Klebsiella* spp. in European ICUs in 1994 and 1997/98 [Abstract C2–1484]. In: Program and abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA. Washington, DC: American Society for Microbiology, 168
47. Lee K, Chang C, Kim EC et al. (2000) Nationwide spread of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea [Abstract C-1994]. In: Program and abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada. Washington, DC: American Society for Microbiology, 121
48. Arlet G, Rouveau M, Casin I et al. (1994) Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol* 32:2553–2558
49. Bosi C, Davin-Regli A, Bornet C et al. (1994) Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *J Clin Microbiol* 37:2165–2169
50. Tassios PT, Gazouli M, Tzelepi E et al. (1999) Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *J Clin Microbiol* 37:3774–3777
51. Chanal CM, Sirot DL, Petet A et al. (1989) Multiplicity of TEM-derived beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1915–1920
52. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A et al. (1995) SVH-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 39:899–905
53. Essack SY, Hall LCM, Pillay DG et al. (2001) Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 45:88–95
54. Coque MT, Oliver A, Baquero F et al. (2000) A great clonal and plasmid diversity of ESBL *Klebsiella pneumoniae* in a Spanish hospital over a decade [Abstract C-1996]. In: Program and abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada. Washington, DC: American Society for Microbiology, 121
55. Petit A, Gerbaud G, Sirot D et al. (1990) Molecular epidemiology of TEM3 (CTX-1) beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 34:219–224
56. Philippon A, Ben Redjeb S, Fournier G, Gen Hassen A (1989) Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases. *Infection* 17:347–354
57. Baraniak A, Fielt J, Sulikowska A et al. (submitted) A countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland
58. Rasheed JK, Jay C, Metchcock B et al. (1997) Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 41:647–653
59. Marchandin H, Carriere C, Sirot D et al. (1999) TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2069–2073
60. Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM et al. (2001) CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999–December 2000). *J Antimicrob Chemother* 48:383–389
61. Odeh R, Kelkar S, Hujer AM et al. (2002) Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 35:140–145
62. Rankin SC, Aceto H, Cassidy J et al. (2002) Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* Newport isolates from animals in Pennsylvania. *J Clin Microbiol* 40:4679–4684
63. Allen KJ, Poppe C (2002) Occurrence and characterization of resistance to extended spectrum cephalosporins mediated by beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food producing animals in Canada. *Can J Vet Res* 66:137–144
64. Zhao S, White DG, McDermont PF et al. (2001) Identification and expression of cephamycinase *bla*CMY-genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3647–3650
65. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K et al. (1996) Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 40:349–353
66. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Townner KJ et al. (2002) Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in Northern Spain. *J Clin Microbiol* 40:4741–4743
67. Paterson DL (2001) Extended-spectrum beta-lactamases: the European experience. *Curr Opin Infect Dis* 14:697–701
68. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention Erfassung und Bewertung nosokomialer Infektionen. In: Robert Koch-Institut (Hrsg) Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention. Urban & Fischer (ISBN 3-497-98005-X)
69. Lucet JC, Decr D, Fichelle A et al. (1999) Control of a prolonged outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital. *CID* 29:1411–1418
70. Paterson DL, Singh N, Rihs JD et al. (2001) Control of an outbreak of infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a liver transplantation unit. *CID* 33:126–128
71. Rice LB (1999) Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics. *Pharmacotherapy* 19:1205–1285
72. Pena C, Pujol M, Ardanuy C et al. (1998) Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *K. pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42:53–58
73. Coovadia YM, Johnson AP, Bhana RH et al. (1992) Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J Hosp Infect* 22:197–205
74. Ritter E, Bauernfeind A, Becker-Boost E et al. (1992) Outbreak of a nosocomial infection of SHV2-beta-lactamase-containing *Klebsiella pneumoniae* strains in an operative intensive care unit. *Immun Infekt* 20:3–6
75. Hollander R, Ebke M, Barck H, von Pritzbuer E (2001) Asymptomatic carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase by patients in a neurological early rehabilitation unit: management of an outbreak. *J Hosp Infect* 48:207–213
76. Asensio A, Oliver A, Gonzales-Diego P et al. (2000) Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 30:55–60