



Epidemiologisches Bulletin

13. Juli 2007/Nr. 28

AKTUELLE DATEN UND INFORMATIONEN ZU INFEKTIONSKRANKHEITEN UND PUBLIC HEALTH

ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien

Im Rahmen eines über das Bundesministerium für Gesundheit (BMG) geförderten Projektes wurden die molekularen Grundlagen der zunehmenden Resistenz von Enterobakterien gegen moderne β -Laktam-Antibiotika an 163 (nosokomiale Erkrankungen verursachenden) Enterobacteriaceae untersucht.

ESBL und Antibiotikaresistenz

Enterobakterien (Enterobacteriaceae) sind häufige Verursacher von Hospitalinfektionen. *Escherichia (E.) coli* und *Klebsiella (K.) pneumoniae*, als wichtige Vertreter der Enterobacteriaceae, verursachen z. B. nosokomiale Harn- und Atemwegsinfektionen bis hin zu Sepsis und Pneumonie. Moderne β -Laktam-Antibiotika, wie Cephalosporine der 3. und 4. Generation und Antibiotika aus der Gruppe der Fluorochinolone, werden zunehmend häufiger verwendet.

Verschiedene Resistenzmechanismen der Enterobakterien, wie die Expression verschiedener β -Laktamasen, sind seit langem bekannt. β -Laktamasen sind bakterielle Enzyme, die – in den periplasmatischen Raum freigesetzt – eindringende β -Laktam-Antibiotika hydrolysieren. Verschiedene Punktmutationen in den β -Laktamase-Genen führten zum Auftreten der **Extended-Spectrum-Beta-Lactamases** (ESBL), die in der Lage sind, die meisten β -Laktam-Antibiotika, wie die in der Therapie häufig eingesetzten Cephalosporine der Gruppe 3, zu hydrolysieren (Abb. 1, S. 248).

Man unterscheidet mehrere ESBL-Gruppen, u. a. die TEM-, SHV- sowie CTX-M-Enzyme. Die ESBL-Gene sind zumeist in ein Integron eingebettet. Mit Hilfe von mobilen Strukturen, wie Insertionssequenzen (IS-Elemente) oder Transposons, können diese Gene dann mobilisiert und über konjugative Plasmide übertragen werden. Ein Plasmid kann mehrere Transposons mit Genen, die Resistenz gegenüber Antibiotika verschiedener Antibiotika-Klassen vermitteln, enthalten. Dies wird als sog. *Multi drug resistance region* bezeichnet. Durch die gekoppelte Übertragung dieser Mehrfachresistenz-Transposons auf andere Spezies entstehen multiresistente Erreger (multidrug resistance, MDR), die schwer therapierbare oder auch chronische Infektionen zur Folge haben können. **Auffällig ist die Kopplung von β -Laktam- und Fluorochinolon-Resistenz**, bedingt durch den intensiven Einsatz dieser Antibiotika in der Therapie. In den letzten Jahren wurden multiresistente Enterobakterien auch im ambulanten Bereich bei harmlosen bis mittelschweren Harnwegsinfektionen beobachtet. Die Resistenzdeterminanten dieser „Community-ESBL“ sind zumeist CTX-M-Gene, welche ein sehr breites Resistenzspektrum vermitteln. Die Selektion dieser CTX-M-Typen ist vor allem im ambulanten Bereich sehr leicht möglich, da die genaue Antibiotika-Einnahme hier nicht kontrolliert werden kann.

Es besteht die Gefahr, dass Bakterien mit diesen CTX-M-Genen auf Resistenzplasmiden aus dem ambulanten Bereich in die Klinik eingebracht werden. Von dort ist die Übertragung der Plasmide in andere enterobakterielle Spezies („Plasmid-Hospitalismus“) sowie auch eine erneute ambulante oder nosokomiale Weiterverbreitung möglich.

Diese Woche 28/2007

Antibiotikaresistenz:

Zur Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien

Kopflausbefall:

Überarbeitung der Empfehlungen zu Präventiv- und Bekämpfungsmaßnahmen im RKI-Ratgeber für Ärzte „Kopflausbefall“

Schutzimpfungen:

Schutzimpfungsrichtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses beschlossen

Aviäre Influenza:

- ▶ Hinweise zum Transport von Probenmaterial
- ▶ Zur aktuellen Situation

Meldepflichtige

Infektionskrankheiten:

Aktuelle Statistik

25. Woche 2007

(Stand: 11. Juli 2007)



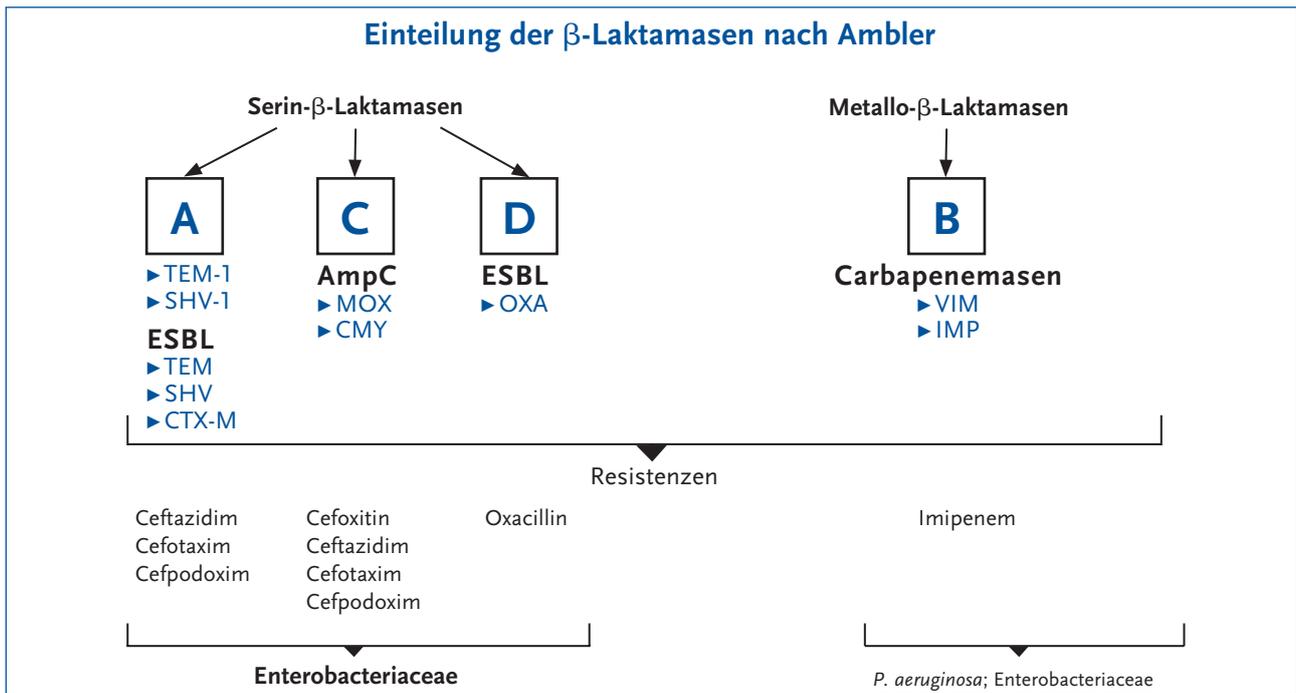


Abb. 1: Das Ambler-Schema wurde 1980 als Klassifizierungssystem für β-Laktamasen entwickelt (s. Literaturstelle 5, S. 250). Die in Enterobakterien häufig vorkommenden ESBL und AmpC-β-Laktamasen gehören zu den Serin-β-Laktamasen. Diese Enzyme besitzen einen Serylrest im katalytischen Zentrum, der die Spaltung des β-Laktam-Ringes der Antibiotika bewirkt. Die breite Anwendung von Aminopenicillinen und Cephalosporinen der 1. bzw. 2. Generation hatte bereits Mitte der 1960er Jahre die Verbreitung der TEM-1- und SHV-1-β-Laktamasen zur Folge. Der ab 1978 beginnende Einsatz von Cephalosporinen der 3. und 4. Generation führte Ende der 1980er Jahre zur Entstehung der TEM- und SHV-ESBL. Seit den 1990er Jahren gewinnen CTX-M-ESBL sowie AmpC-β-Laktamasen zunehmend an Bedeutung. Inzwischen sind ca. 150 TEM-, 88 SHV-, 65 CTX-M-Typen sowie eine Vielzahl von AmpC-Subtypen beschrieben.

AmpC-β-Laktamasen und Antibiotikaresistenz

Die Resistenz gegen neuere Cephalosporine wird bei Enterobacteriaceae neben den ESBL vor allem durch die AmpC-β-Laktamasen verursacht. Die AmpC-Familie zeichnet sich durch große genetische Diversität aus. Viele Enterobakterien besitzen von Natur aus chromosomal lokalisierte ampC-Gene. Jedem AmpC-Cluster liegt ein chromosomales „Ursprungs“-AmpC-Enzym zugrunde, von dem sich die Plasmid-kodierten AmpC-β-Laktamasen ableiten. Alle AmpC-β-Laktamasen vermitteln Resistenz gegenüber allen β-Laktam-Antibiotika, außer Cefepim, Carbapenemen und Cepiprom. β-Laktamase-Inhibitoren haben, im Gegensatz zu einer (diagnostisch genutzten) Wirkung auf ESBL, einen geringen oder gar keinen Effekt auf diese Enzyme. Phänotypisch zeigt sich die ampC-Expression durch die Cefoxitin-Resistenz („AmpC-Indikatorresistenz“). Die Induktion der ampC-Expression durch Cefoxitin beruht auf einem komplexen Regulationsmechanismus, der jedoch durch einzelne Mutationen in der daran beteiligten AmpD-bzw. AmpR-Komponente außer Kraft gesetzt werden kann. Dies hat dann die konstitutive, dereprimierte Expression des AmpC-Enzyms und damit die Resistenz gegen nahezu alle Cephalosporine zur Folge. Im *E. coli*-Wildtyp dagegen wird die chromosomal kodierte AmpC-β-Laktamase durch einen schwachen Promoter konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert. Erst bestimmte Mutationen im Promoter führen zu einer ampC-Überexpression und somit zur Cefoxitin- bzw. 3. Generation Cephalosporin-Resistenz. Verschiedene chromosomale ampC-Gene können mobilisiert und durch horizontalen Gentransfer in andere Spezies, wie *E. coli* und *Klebsiella* spp., übertragen werden.

ESBL und AmpC-Diagnostik

Ein für die phänotypische Identifikation genutztes Merkmal der ESBL ist ihre Hemmbarkeit durch β-Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure oder Sulbactam (Tab. 1). Die phänotypische Resistenzbestimmung für drei 3. Generation Cephalosporine – Cefotaxim, Ceftazidim und Cefpodoxim – jeweils mit und ohne β-Laktamase-Inhibitor wird im Mikrobouillonverdünnungstest durchgeführt. Ein Isolat gilt phänotypisch als ESBL-Bildner, wenn es resistent gegenüber Cefpodoxim sowie Cefotaxim und/oder Ceftazidim ist und eine Hemmung durch Sulbactam oder Clavulansäure ($MHK_{\text{Cephalosporin}}/MHK_{\text{Cephalosporin+Inhibitor}} \geq 8$) nachgewiesen wurde. Bestimmte *Klebsiella*-(*K.*-)*oxytoca*-Isolate, die sog. **K1-Hyperproduzenten**, zeigen ein ähnliches Resistenzspektrum wie ESBL-Bildner. Diese in *K. oxytoca* chromosomal kodierte K1-β-Laktamase ist allerdings Inhibitorresistent.

Enzyme	Antibiotika					Hemmbarkeit durch
	AP	CPD	CTX	CAZ	FOX	SUL oder CLV
TEM ESBL	R	R	V	R	S	+
SHV ESBL	R	R	V	R	S	+
CTX-M-ESBL	R	R	R	V	S	+
K1 (<i>K. oxytoca</i>)	R	R	V	S	S	-
AmpC	R	R	R	R	R	-

Tab. 1: Substratspektrum verschiedener β-Laktamasen
 R = Resistent, V = Variabel, S = Sensitiv, AP = Aminopenicilline, CTX = Cefotaxim, CAZ = Ceftazidim, CPD = Cefpodoxim, FOX = Cefoxitin, SUL = Sulbactam, CLV = Clavulansäure

Die phänotypische Identifikation von **AmpC- β -Laktamase-Bildnern** ist durch die von ihnen vermittelte Cefoxitin-Resistenz möglich. Die zusätzliche, nicht oder nur gering durch Inhibitoren hemmbare 3. Generation Cephalosporin-Resistenz ist für dereprimierte AmpC- β -Laktamasen, Plasmid-vermittelte AmpC- β -Laktamasen oder überexprimierte chromosomal-kodierte *E. coli*-AmpC- β -Laktamasen charakteristisch.

Erst **molekulare Analysen ermöglichen die genaue Differenzierung verschiedener ESBL oder AmpC- β -Laktamasen**. Die relevanten ESBL-Resistenzgene (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) werden mittels ESBL-Multiplex-PCR amplifiziert und sequenziert. Für eine schnelle Identifikation der drei größten Gruppen der CTX-M-Familie wurden mehrere Multiplex-PCR-Primer entwickelt. Die Übertragbarkeit dieser Resistenzdeterminanten wurde in Konjugationsexperimenten geprüft. Eine AmpC-Multiplex-PCR ermöglichte die Amplifikation von *ampC*-Genen der sechs größten AmpC-Cluster. Die Sequenzierung der *ampC*-Promoterregion Cefoxitin-resistenter *E. coli* erlaubte weitere Rückschlüsse auf die Expression. Zur Ermittlung genetischer Verwandtschaft wurden Cefoxitin-resistente *E. coli*-Isolate mittels Makrorestriktionsanalyse (Pulsfeld-Gelelektrophorese, PFGE) untersucht und die Zugehörigkeit zu den phylogenetischen Gruppen durch PCR bestimmt.

ESBL und AmpC- β -Laktamasen in Deutschland

In den letzten Jahren hat die Zahl der Berichte über die Verbreitung von ESBL und AmpC- β -Laktamasen in enterobakteriellen Isolaten stetig zugenommen. Internationale Studien, wie die EARSS-Studie (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) und die ESAC-Studie (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*), deuten auf einen Zusammenhang zwischen Antibiotika-Verbrauch und Anstieg der Cephalosporin-Resistenz hin. In Deutschland sind derzeit ca. 5% der klinischen *E. coli*-Isolate Cephalosporin-resistent, mit steigender Tendenz. Über Vorkommen und Verbreitung der unterschiedlichen Resistenzdeterminanten bei Enterobacteriaceae aus Hospitalinfektionen in Deutschland ist jedoch nur wenig bekannt.

Untersuchte Isolate: Zur Untersuchung der molekularen Ursachen der Cephalosporin-Resistenz in Enterobakterien wurde eine Stammsammlung von 163 klinischen Isolaten mit bundesweitem Einzugsgebiet angelegt. Die Isolate gehörten den Spezies *E. coli* (n=91), *K. pneumoniae* (n=37), *K. oxytoca* (n=22), *E. cloacae* (n=8), *E. aerogenes* (n=2), *C. freundii* (n=2) und *P. stuartii* (n=1) an. Sie stammten aus 72 verschiedenen Kliniken, überwiegend aus dem südwestlichen Teil des Landes. Insgesamt 112 Isolate wurden aus einer kumulativen Stammsammlung eines Laboratoriums in Limbach, Heidelberg, für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Der größte Teil der Stämme waren Blutkultur-Isolate (71%) sowie Urinkultur-Isolate (21%). Die übrigen Stämme wurden aus Sputum, Trachealsekret, Wundinfektionsproben sowie Stuhlproben isoliert. Vier Isolate wurden aus ambulanten Einrichtungen (unkomplizierte Harnwegsinfektionen) eingesandt. Zusätzlich erfolgten Angaben zum

Alter der Patienten. Danach waren 79% der Patienten älter als 65 Jahre und 8% jünger als 10 Jahre. Weitere Patientendaten wurden verschlüsselt übermittelt.

Verteilung der Resistenzmuster: Ein Großteil der untersuchten Isolate war nicht nur gegenüber β -Laktam-Antibiotika resistent. Bei 72% der phänotypischen ESBL-Isolate wurde im Mikrobouillonverdünnungstest, parallel zur Cephalosporin-Resistenz, auch eine Resistenz gegenüber Fluorochinolonen detektiert. Außerdem zeigten 39 Stämme weitere Resistenzen gegenüber Antibiotika verschiedener anderer Antibiotika-Klassen (Multiresistenz). Die Mehrheit (67%) dieser multiresistenten Isolate gehörte der Spezies *E. coli* (n=26) an; daneben wurden acht *K. pneumoniae*, zwei *K. oxytoca*, zwei *Enterobacter (E.) cloacae* sowie ein *Providencia (P.) stuartii* als multiresistent identifiziert.

Auftreten und Verbreitung von ESBL: In den untersuchten Isolaten wurden ESBL-Gene in den Spezies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *E. cloacae* nachgewiesen. Es konnten vier TEM-ESBL, fünf verschiedene SHV-ESBL und sieben CTX-M-Typen identifiziert werden (Tab. 2). In 49 Isolaten wurde ein β -Laktamase-(*bla*-)Gen nachgewiesen (*bla*_{TEM}, n=22; *bla*_{SHV}, n=13; *bla*_{CTX-M}, n=14). Weitere 63 Isolate enthielten jeweils zwei *bla*-Gene (*bla*_{TEM} + *bla*_{SHV}, n=24; *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M}, n=29; *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M}, n=10). Außerdem konnten in einem *K. pneumoniae*-Isolat durch Sequenzierung *bla*_{TEM-17}, *bla*_{SHV-28} sowie *bla*_{CTX-M-2} nachgewiesen werden. Die sehr häufige Variante TEM-1 trat zu meist in Kombination mit einer SHV- bzw. CTX-M-ESBL auf. Insgesamt waren die Typen CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-9 und CTX-M-15 die häufigsten ESBL. Elf Isolate besaßen einen noch nicht beschriebenen SHV-Typ (SHV-76), zwei Isolate eine neue CTX-M-Variante (CTX-M-58), die Ceftazidim-Resistenz vermittelt.

<i>bla</i> _{TEM} n=88	<i>bla</i> _{SHV} n=51	<i>bla</i> _{CTX-M} n=56
TEM-1 n=69	SHV-1 n=11	CTX-M-1 n=11
TEM-12 n=1	SHV-2 n=1	CTX-M-2 n=4
TEM-29 n=1	SHV-2a n=1	CTX-M-3 n=11
TEM-30 n=3	SHV-5 n=8	CTX-M-9 n=11
TEM-52 n=14	SHV-11 n=4	CTX-M-10 n=1
	SHV-12 n=9	CTX-M-14 n=5
	SHV-28 n=3	CTX-M-15 n=11
	SHV-31 n=1	CTX-M-58 n=2
	SHV-33 n=1	
	SHV-36 n=1	
	SHV-76 n=11	

Tab. 2: β -Laktamase-Gene (*bla*-Gene) der Ambler-Klasse A, identifiziert in 163 Enterobacteriaceae-Isolaten. Die Varianten TEM-1, SHV-1, SHV-11, SHV-28, SHV-33, SHV-36, SHV-76 vermitteln Aminopenicillin-Resistenz, jedoch keine 3. Generation Cephalosporin-Resistenz und gehören deshalb nicht zu den ESBL.

In verschiedenen Konjugationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass neben den Plasmid-vermittelten ESBL weitere Resistenzgene übertragen werden können. Dieser

horizontale Gentransfer über konjugative Plasmide ermöglicht die schnelle Verbreitung von Resistenzdeterminanten zwischen den verschiedenen enterobakteriellen Spezies und hat die Entstehung multiresistenter Erreger zur Folge.

Auftreten und Verbreitung von AmpC- β -Laktamasen: In der Untersuchung zeigten 29 *E. coli*-Isolate eine Resistenz gegenüber Cefoxitin ($\text{MHK}_{\text{Cefoxitin}} \geq 32 \text{ mg/l}$). Bei zwei Isolaten war dies auf erworbene AmpC- β -Laktamasen (CMY-Enzyme) zurückzuführen. Bei den übrigen 27 Isolaten konnten Mutationen im Promoter des chromosomalen *ampC*-Gens nachgewiesen werden, die eine *ampC*-Überexpression verursachten und die Cephalosporin-Resistenz zur Folge hatten. Verschiedene Basenpaarsubstitutionen im *ampC*-Promoter führten entweder zur Entstehung eines neuen Promoters oder der ursprüngliche, schwache Promoter wurde effizienter.

Die Makrorestriktionsanalyse (PFGE) der Cefoxitin-resistenten *E. coli*-Isolate ergab für neun der 27 Isolate sehr ähnliche Bandenmuster. Da diese Isolate (unterschiedlicher regionaler Herkunft) eine identische Promoter-Struktur besitzen, ist eine klonale Verbreitung sehr wahrscheinlich. Allerdings zeigten elf weitere Isolate mit den gleichen Promoter-Mutationen sehr verschiedene Makrorestriktionsmuster, was auf eine konvergente Evolution dieser Mutanten schließen lässt.

Schlussfolgerungen

Der Hauptmechanismus für die Cephalosporin-Resistenz in Enterobakterien ist die Expression verschiedener β -Laktamasen. Die größte Bedeutung fällt hierbei den ESBL zu, die auf evolutionär breiter Basis entstanden sind und

sich rasch ausbreiten können. Die Verbreitung der ESBL erfolgt meist durch horizontalen Gentransfer über konjugative Plasmide, wobei die ESBL-Gene zumeist in *multi-drug resistance coding regions* eingebettet sind. Die Übertragung dieser Multiresistenz-Plasmide impliziert somit ein wesentlich größeres Potenzial zur Resistenzausbreitung und Stabilisierung einer Resistenz, bedingt durch den Selektionsdruck verschiedenster Antibiotika.

Neben den ESBL sind die AmpC- β -Laktamasen eine ebenfalls häufige Ursache für die Cephalosporin-Resistenz in Enterobakterien. Der horizontale Gentransfer Plasmidkodierter AmpC- β -Laktamasen trägt zur Spezies-übergreifenden Verbreitung der Resistenz bei. Allerdings kommt den chromosomal kodierten AmpC- β -Laktamasen mit Veränderungen im Expressionsprofil die größere Bedeutung zu. Die Makrorestriktionsanalyse der *E. coli*-Isolate mit verändertem *ampC*-Promoter weist auf eine klonale Ausbreitung hin, wobei hier allerdings auch eine evolutionäre Konvergenz der resistenten Mutanten auftritt.

Ausgewählte Literatur zu diesem Thema:

1. Wiegand I: Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Laktam-Resistenz durch Beta-Laktamasen. *Chemother J* 2003; 12: 151–167
2. Paterson DL: Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 2006; 34: 20–28
3. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Rios MJ, Hernandez JR, Pascual A: Bacteremia due to extended-spectrum beta-Lactamase producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1407–1414
4. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA: Plasmid-determined AmpC-type beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1–11
5. Ambler RP: The structure of beta-Lactamases. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321–331

Bericht aus dem Fachgebiet Nosokomiale Infektionen des RKI.

Ansprechpartnerin ist Dr. Yvonne Pfeifer (E-Mail: PfeiferY@rki.de).