

Bakterien mit Bildung von „Extended-Spectrum“-Beta-Laktamasen:
Mikrobiologischer Nachweis, Antibiotika-Sensibilität
und klinische Bedeutung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

David Heinerich Furmaniak
aus Bonn

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Günter Marklein

2. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Anna Maria Eis-Hübinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 26. März 2010

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. A. Hörauf

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Einleitung	7
3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	11
4. Theoretische Grundlagen	12
4.1. Antibiotika-Resistenz durch β -Laktamasen.....	12
4.2. Abgrenzung der ESBL.....	13
4.3. Klinisch wichtige ESBL-bildende Bakterienspezies.....	16
4.4. Klinische Bedeutung der ESBL-Bildner.....	16
4.5. Verbreitung und Besonderheiten ESBL-produzierender Enterobacteriaceae.....	17
4.6. Risiko inadäquater empirischer Antibiose durch ESBL-Bildung.....	20
4.7. Auswirkung der ESBL-Bildung auf die Therapiedauer von Infektionen.....	21
4.8. Auswirkung der ESBL-Bildung auf die Letalität der Patienten.....	21
4.9. Gesundheitsökonomische Auswirkungen der ESBL-Bildung.....	22
4.10. Notwendigkeit schneller Detektion der ESBL-Bildung.....	23
4.11. Methoden zur Detektion von ESBL.....	24
4.11.1. Phänotypische Methoden zur Detektion der ESBL-Bildung.....	25
4.11.1.1. Screening-Verfahren.....	25
4.11.1.2. Phänotypische Bestätigungstests.....	28
4.11.2. Genotypische Methoden zur Detektion von ESBL.....	41
4.12. Therapie von Infektionen durch ESBL-bildende Bakterien.....	43
5. Material und Methoden	47
5.1. Untersuchte Bakterienkulturen.....	47
5.2. Speziesidentifizierung und Nachweis der ESBL-Bildung.....	48
5.3. Verwendete Testverfahren.....	49
5.4. Testauswertung.....	52
6. Ergebnisse	53
6.1. Micronaut-S-MHK.....	53
6.2. Micronaut-S-ESBL.....	62
6.2.1. Micronaut-S-ESBL als Schnelltest.....	65
6.2.2. Negativ-Kontrolle anhand von 167 Isolaten aus der Routine-Diagnostik.....	68

7. Vergleichende Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse.....	70
7.1. Micronaut-S-MHK.....	70
7.1.1. Carbapeneme.....	71
7.1.2. Gentamicin.....	79
7.1.3. Amikacin.....	84
7.1.4. Colistin.....	87
7.1.5. Temocillin.....	88
7.1.6. Tigecyclin.....	92
7.2. Micronaut-S-ESBL.....	102
7.3. Micronaut-S-ESBL als Schnelltest.....	103
8. Zusammenfassung.....	105
9. Anhang: Erläuterungen zu Begriffen der Statistik und Epidemiologie.....	106
10. Literaturverzeichnis.....	106
11. Danksagung.....	127

1. Abkürzungsverzeichnis

AMK:	Amikacin
ATCC:	American Type Culture Collection
AATF:	Antimicrobial Availability Task Force
BJM:	Bush, Jacoby, Medeiros-Klassifikation
BSAC:	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
CA-SFM:	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute (früher NCCLS)
C/V:	Cefpodoxim/Clavulansäure
COL:	Colistin
CPP:	Cefpodoxim-Proxetil
CTX:	Active on cefotaxime
CTX-M:	Active on cefotaxime, first isolated at Munich
DIN:	Deutsches Institut für Normung
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dHPLC:	denaturierende high-performance liquid chromatography
EARSS:	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ERT:	Ertapenem
ESBL:	“Extended- spectrum”- β -lactamasen
GEN:	Gentamicin
HPA:	Health Protection Agency (Großbritannien)
IDSA:	Infectious Diseases Society of America
IMP:	Imipenem
I:	Intermediär: intermediäre Sensibilität gegenüber einem Antibiotikum.
IRT:	Inhibitor resistant TEM β -lactamase
MER:	Meropenem
MHK:	Minimale Hemmkonzentration
MYSTIC:	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
MRSA:	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR:	Polymerase-Ketten-Reaktion
R:	Resistent

S:	Sensibel
SHV:	Sulfhydryl reagent variable
spp.	species pluralis
TEM:	Temoneira
TMO:	Temocillin
TGC:	Tigecyclin
GC:	Growth control/Wachstumskontrolle
CMT:	Complex mutant derived from TEM-1
CMY:	Active on cephamycins
VRE:	Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus faecium</i>

2. Einleitung

Weltweit wird eine besorgniserregende Zunahme von Infektionen mit multiresistenten Bakterien beobachtet. Einige Spezies haben nahezu Panresistenz gegen alle verfügbaren Antibiotika erreicht. Ausbrüche nicht behandelbarer Infektionen sind zu befürchten (Spellberg et al. 2008) und eine Verbesserung der Situation durch Einführung neuer Antibiotika ist nicht zu erwarten (Talbot et al. 2006). Infektionskrankheiten stellen weltweit die zweithäufigste Todesursache dar, wobei die Malaria und die Tuberkulose einen großen Anteil haben (World Health Organisation, 2004). In den Industrieländern ist durch die hoch entwickelte medizinische Infrastruktur ein anderes Erregerspektrum in den Vordergrund getreten. Es handelt sich hier vor allem um opportunistische bakterielle Erreger. Die Antimicrobial Availability Task Force (AATF) der Infectious Diseases Society of America (IDSA) hat 2006 eine Liste von Infektionserregern erstellt, die durch ihre Multiresistenz ein besonderes Problem darstellen können und für die keine oder nur sehr wenige neue antimikrobielle Wirkstoffe in Phase-2-Studien oder Phase-3-Studien geprüft werden.

Es handelt sich um folgende Erreger:

- Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA),
- Vancomycin-resistenter *Enterococcus faecium* (VRE),
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Acinetobacter baumannii*,
- *Aspergillus* species,
- "extended spectrum" β -lactamase-produzierende *Enterobacteriaceae*.

Diese Erreger sind in den USA klinisch bedeutsam und stellen an vielen Orten eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar (Talbot, 2006). Nicht auf dieser Liste erwähnt sind *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium tuberculosis*. Auch diese beiden häufigen respiratorischen Krankheitserreger zeigen weltweit zunehmend Multiresistenz (Spellberg et al. 2008).

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* stellen eine Herausforderung für die Krankenhaushygiene dar, treten aber auch zunehmend bei nicht hospitalisierten Patienten auf. MRSA sind die in der breiten Öffentlichkeit am meisten beachteten multiresistenten Erreger, für die auch die pharmazeutische Industrie mehr Substanzen in der Pipeline hat als für jeden anderen der hier genannten multiresistenten Erreger (Talbot, 2006).

Enterokokken sind in Deutschland die dritthäufigsten Erreger bakterieller nosokomialer Infektionen (Robert Koch Institut, 2008). Zur Behandlung von Infektionen durch VRE stehen mit

Quinupristin-Dalfopristin (in Deutschland nicht mehr im Handel), Linezolid, Tigecyclin und Daptomycin zwar mehr Optionen zur Verfügung als bei anderen multiresistenten Erregern, dennoch werden VRE als Problemkeime eingestuft, für deren Behandlung neue Substanzen entwickelt werden müssen.

Pseudomonas aeruginosa und *Acinetobacter baumannii* gehören zu den sog. Nonfermentern, die die Glukose nicht fermentativ abbauen können, und beide sind opportunistische Krankheitserreger. Bei Patienten mit Cystischer Fibrose verursachen sie chronische Atemwegsinfektionen, bei denen sich im Verlauf der Behandlung häufig Resistenz gegen alle bekannten Antibiotika entwickeln kann. *P.aeruginosa* ist in der Lage, eine grosse Zahl von Resistenzmechanismen synergistisch zu nutzen. Am häufigsten ist die Expression von β -Laktamasen, einschliesslich ESBL, AmpC und Carbapenemasen.

P. aeruginosa verfügt über ein sehr effektives Effluxsystem (MexAB-OprM), mit dem die meisten Antibiotika aus der Zelle gepumpt werden. Porinverlust kann die Resistenz zusätzlich verstärken. Da sogar Carbapeneme häufig nicht mehr wirksam sind, bleibt Colistin oft das einzige wirksame Antibiotikum. Keine gegen *P. aeruginosa* wirksame Substanz mit neuem Wirkungsmechanismus wird in Phase- zwei oder Phase-drei-Studien untersucht (Talbot, 2006).

Acinetobacter species sind in der Umwelt weit verbreitet und wurden früher als wenig virulent betrachtet, während heute eine zunehmende Inzidenz von nosokomialen Pneumonien und Septikämien durch *A. baumannii* beobachtet wird. *A. baumannii* kann Ausbrüche auf Intensivstationen verursachen, ist aber auch als Verursacher von Wundinfektionen und Osteomyelitiden bei Soldaten im Irak und in Afghanistan aufgetreten (Davis et al. 2005). Die Therapie von *Acinetobacter*-Infektionen wird durch zunehmende Multiresistenz erschwert. Folgende Resistenzmechanismen sind bekannt:

- Aminoglycosid modifizierende Enzyme
- ESBL
- Carbapenemasen
- Veränderungen von Proteinen der äusseren Membran
- Veränderungen der Penicillinbindeproteine. Das Resistenzmaß und die Resistenzraten gegenüber den meisten Antibiotika sind so hoch, dass auf Colistin zurückgegriffen werden muss, das lange Zeit wegen seiner Nephrotoxizität kaum verwendet wurde. Die einzige neue Substanz mit Aktivität gegen *A. baumannii* ist Tigecyclin. Es befinden sich für *A. baumannii* -Infektionen keine anderen Antibiotika in der Entwicklung (Talbot, 2006).

Escherichia coli und *Klebsiella* spp. sind die häufigsten Infektionserreger unter allen aeroben gramnegativen Bakterien. Während *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* zu Beginn der antibiotischen Ära weitgehend Ampicillin-sensibel waren, sind heute ESBL, die Resistenz gegen fast alle Penicilline und Cephalosporine verleihen, weltweit verbreitet. ESBL-bildende *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* verfügen meist über weitere Resistenzmechanismen, so dass sie auch gegen fast alle anderen Antibiotikaklassen resistent sind. Gegen diese Bakterien sind die Carbapeneme weiterhin gut wirksam, jedoch ist wiederholt über Carbapenemasen bei *Klebsiella* spp. berichtet worden (Peirano, 2009). Carbapenemresistenz durch die Kombination von ESBL-Expression und Verlust von Porinen ist häufig nachgewiesen worden (Martinez-Martinez, 2008). Vermehrtes Auftreten von Carbapenemresistenzen ist zu erwarten (Burak et al. 2006). Tigecyclin ist in vitro aktiv gegen ESBL produzierende *E. coli* und *Klebsiella* spp.. Am 25. Juli 2008 wurde in der Europäischen Union Doripenem als viertes Carbapenem zugelassen. Ein Antibiotikum mit neuem Wirkungsmechanismus ist jedoch nicht in Sicht.

Wie ist das Missverhältnis zwischen Resistenzlage und Antibiotikaentwicklung entstanden?

Ob klinisch adäquat oder nicht, der Einsatz von Antibiotika führt zur Selektion resistenter Organismen. Das Ausmaß der Selektion hängt von den Eigenschaften des jeweiligen Antibiotikums und der Häufigkeit des Einsatzes ab (Levy und Marshall, 2004). Antibiotikaresistenz ist jedoch nicht erst im Zusammenhang mit dem medizinischen Einsatz von Antibiotika entstanden. Beispielsweise wurden β -Laktamasen im Laufe der mikrobiellen Phylogenese schon gebildet, lange bevor der Mensch sie entdeckt hat (Spellberg et al. 2008). Bereits zu Beginn der antibiotischen Ära traten Resistenzprobleme auf. Sulfonamid-resistente *Streptococcus pyogenes*-Stämme wurden schon in den 1930er Jahren beobachtet. Erworbene Penicillinresistenz trat bei *Staphylococcus aureus* bereits in den 1940er Jahren auf (Levy und Marshall, 2004). In den folgenden Jahrzehnten konnte der Resistenzentwicklung durch Einführung neuer Antibiotikaklassen begegnet werden. Bei ihrer Einführung zu Beginn der 1980er Jahre waren zum Beispiel die Cephalosporine der sog. dritten Generation noch aktiv gegen die meisten β -Laktamase bildenden Bakterien (Paterson und Bonomo, 2005). Heute ist der Nutzen der Cephalosporine durch die ungebremste Weiterentwicklung der Resistenzmechanismen, wie ESBL, bedroht. Die Entwicklung neuer Antibiotikaklassen hingegen hält mit der Resistenzentwicklung nicht schritt.

Wie ist die Stagnation der Antibiotikaentwicklung zu erklären? Die Entwicklung zahlreicher neuer antiretroviraler Medikamente zur Behandlung der HIV-Infektion zeigt, dass die

pharmazeutische Industrie in der Lage ist, neue Antiinfektiva zu entwickeln. Antibiotika werden im Gegensatz zu Medikamenten zur Behandlung chronischer Krankheiten nur über kurze Zeit eingesetzt. Außerdem wird der Einsatz neuer Antibiotika beschränkt, um ihre Effektivität zu erhalten. Dies führt zu einem geringeren „return on investment“ (Spellberg et al. 2008). Die Resistenzentwicklung kann nur verlangsamt werden, wenn Resistenzmechanismen wie ESBL in der Routine-Diagnostik frühzeitig erkannt und bei der Auswahl des Antibiotikums berücksichtigt werden.

3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Daten über die Antibiotikaempfindlichkeit ESBL-bildender Bakterien aus dem Bonner Raum zu gewinnen. Dazu wurden 274 von Patienten unseres diagnostischen Einzugsbereichs isolierte *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, n=159, *K. pneumoniae*, n=88 und *K. oxytoca*, n=27) mit dem Bouillon-Mikrodilutionsverfahren auf ihre Sensibilität gegenüber Imipenem, Meropenem, Ertapenem sowie Temocillin, Colistin, Tigecyclin, Amikacin und Gentamicin untersucht. Alle Isolate waren bereits zuvor im Rahmen der klinisch-bakteriologischen Routine-Diagnostik mit Hilfe von Etest[®]-ESBL (AB Biodisk, Solna, Schweden) phänotypisch als ESBL-positiv identifiziert worden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Validität des Micronaut-S-ESBL- Testsystems anhand unseres definierten Stammkollektivs zu überprüfen.

Dazu wurden die oben erwähnten Stämme mit dem vom Test-Hersteller empfohlenen Standard-Inokulum und 18-24 stündiger Bebrütung mit dem Micronaut-S-ESBL geprüft.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich der Micronaut-S-ESBL Test zur sicheren Detektion der ESBL-Bildung innerhalb eines Arbeitstages eignet. Um dies zu überprüfen, wurden die 274 Isolate, unter Einsatz eines im Vergleich mit dem Standard-Inokulum fünffach höher konzentrierten Inokulums nach einer Inkubationszeit von nur 6 Stunden analysiert.

4. Theoretische Grundlagen

4.1. Antibiotika-Resistenz durch β -Laktamasen

Die Inaktivierung von β -Laktamantibiotika durch β -Laktamasen stellt eine der klinisch häufigsten und bedeutsamsten Resistenzmechanismen dar.

Die β -Laktamasen sind eine heterogene Gruppe von Enzymen; die für β -Laktamasen kodierenden Gene können sowohl auf dem bakteriellen Chromosom als auch auf Plasmiden lokalisiert sein. Die meisten β -Laktamasen tragen einen Serinrest im Aktivenzentrum. Bei einigen β -Laktamasen erfolgt die hydrolytische Spaltung des β -Laktamrings mit Hilfe eines Zinkions. Viele Bakterienspezies besitzen β -Laktamasegene als Teil ihres ursprünglichen Wildtypgenoms. Klinisch von besonderer Bedeutung sind jedoch über mobile genetische Elemente erworbene β -Laktamasen (Wiegand, 2003).

Einteilung und Nomenklatur der β -Laktamasen

Zwei Klassifizierungssysteme sind zur Einteilung der β -Laktamasen gebräuchlich.

- Das molekulare Klassifizierungssystem nach Ambler von 1980 beruht auf Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz. Die β -Laktamasen werden nach Ambler in vier Gruppen von A bis D eingeteilt. Bei den β -Laktamasen der Gruppen A, C und D handelt es sich um Serinhydrolasen. Die Gruppe B beinhaltet Metalloenzyme (Ambler, 1980).

- Die Klassifizierung von Bush, Jacoby und Medeiros von 1995 richtet sich nach dem Substratprofil und der Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamaseinhibitoren (Bush et al. 1995).

Die Nomenklatur der einzelnen β -Laktamasen und β -Laktamasefamilien ist historisch gewachsen und folgt keiner einheitlichen Regel. So wurden beispielsweise Enzyme nach dem Patienten benannt, bei dem sie entdeckt wurden, andere nach dem Ort ihrer Entdeckung oder nach biochemischen Eigenschaften. Beispielsweise ist die Bezeichnung TEM abgeleitet vom Namen des Patienten Temoneira. SHV hingegen steht für Sulfhydryl reagent variable. Der Name der dritten wichtigen Gruppe von ESBL, den CTX-M Enzymen, bedeutet Cefotaximase, die in München zum ersten Mal isoliert wurde. Diese Namen werden durch angehängte Zahlen vervollständigt, um die einzelnen Mitglieder einer β -Laktamasefamilie zu bezeichnen (Jacoby, 2006).

4.2. Abgrenzung der ESBL

Über die exakte Definition der ESBL besteht kein Konsens.

Eine weit verbreitete Arbeitsdefinition der ESBL besagt, dass es sich um β -Laktamasen handelt, die Bakterien Resistenz gegenüber den Penicillinen, den Cephalosporinen der ersten, zweiten und dritten Generation sowie gegenüber Aztreonam, nicht jedoch gegenüber den Carbapenemen und Cephamyocinen (Cefoxitin, Cefotetan, Cefmetazol) verleihen und durch Clavulansäure zumindest in vitro gehemmt werden (Paterson und Bonomo, 2005).

Jedoch wird der Begriff ESBL in Literatur auch für β -Laktamasen gebraucht, die nicht alle Kriterien dieser Definition erfüllen, zum Beispiel werden die OXA-ESBL nicht durch Clavulansäure gehemmt. Uneinigkeit besteht auch über die Frage, ob der Begriff ESBL nur für erworbene β -Laktamasen verwendet werden soll, die auf mobilen genetischen Elementen (Plasmiden und Chromosomale inserts/Transposons) kodiert sind, oder auch auf chromosomale beim Wildtyp einer Bakterienspezies vorhandene β -Laktamasen, die ein den ESBL entsprechendes Substrat und Inhibitorspektrum besitzen. Es ist vorgeschlagen worden, den Begriff ESBL weit zu fassen, jedoch grundsätzlich durch Angabe der ESBL-Familie, wie beispielsweise TEM-ESBL, SHV-ESBL oder CTX-M-ESBL zu präzisieren (Livermore, 2008).

In der klinisch mikrobiologischen Routine-Diagnostik erfolgt jedoch nur die Feststellung, dass ein für ESBL, im Sinne der oben genannten Arbeitsdefinition, typischer Resistenzphänotyp vorliegt. Um festzustellen, welche ESBL-Klasse im Einzelfall vorliegt, wären zusätzliche Untersuchungen notwendig. Diese wären mit zusätzlichem Zeit-, Personal- und Kostenaufwand verbunden. Im Oktober 2008 wurde von Giske et al. (2009) ein neues Schema zur Einteilung der ESBL vorgeschlagen. Die Autoren heben hervor, dass es die vorhandenen Systeme zur Klassifikation von β -Laktamasen nicht ersetzen soll. Es soll die Kommunikation zwischen den verschiedenen an der Behandlung von Infektionen beteiligten Akteuren erleichtern sowie der Entwicklung der β -Laktamasen in den letzten zwanzig Jahren Rechnung tragen. Das neue Schema soll sich nur auf erworbene β -Laktamasen beziehen. Es soll für klinisch wichtige erworbene β -Laktamasen mit Aktivität gegen Breitspektrum- Cephalosporine **und/oder** Carbapeneme gelten. Es werden drei Hauptgruppen, ESBL-A, ESBL-M (M steht für miscellaneous) und ESBL-CARBA, gebildet, die sich in Subgruppen unterteilen lassen.

ESBL-A: Diese Kategorie fasst die Enzyme der funktionellen Gruppe 2be nach Bush, Jacoby und Medeiros, die nach Ambler zur molekularen Klasse A gehören, zusammen.

ESBL-M: soll die plasmid kodierten AmpC- β -Laktamasen und die OXA-ESBL bezeichnen.

Es werden zwei Subgruppen vorgeschlagen: ESBL-M-C für plasmid- kodierte AmpC- β -Laktamasen und ESBL-M-D für OXA-ESBL. Hierbei wird bei der Zuordnung der Buchstaben Bezug auf die Ambler- Klassifikation genommen.

ESBL-CARBA: bezeichnet β -Laktamasen, die mindestens eine Imipenemase-Aktivität ($k_{cat}/V_{max} > 1(\mu\text{M}^{-1} \text{S}^{-1})$) aufweisen und gegen Breitspektrum-Cephalosporine aktiv sind.

In Anlehnung an die molekulare Klassifikation nach Ambler werden drei Subgruppen, ESBL-CARBA-A, ESBL-CARBA-B und ESBL-CARBA-D, gebildet. Die Subgruppe ESBL-CARBA-A enthält Carbapenemase, die zur Ambler Klasse A gehören, die beiden anderen Subgruppen dementsprechend β -Laktamasen der Ambler Klassen B und D.

Giske et al. 2008 schlagen das folgende Klassifikationsschema vor (Tabelle 1).

Erworbene β -Laktamasen mit hydrolytischer Aktivität gegen Breitspektrum-Cephalosporine und/oder Carbapeneme:			
β -Laktamase-klassen	ESBL-A	ESBL-M	ESBL-CARBA
	ESBL-A mit hoher Prävalenz CTX-M TEM-ESBL SHV-ESBL VEB PER	ESBL-M-C (Plasmid kodierte AmpC) CMY FOX MIR MOX DHA LAT BIL ACT ACC	ESBL-CARBA-A KPC GES-2, -4, -5, -6, -8 NMC SME IMI-1, -2
	ESBL-A mit niedriger Prävalenz GES-1, -3, -7, -9 SFO-1 BES-1 BEL-1 TLA IBC CMT ^a	ESBL-M-D (OXA-ESBL) OXA-10-group OXA-13-group OXA-2-group OXA-18 OXA-45	ESBL-CARBA-B (Metallo- β -Laktamase) IMP VIM SPM-1 GIM-1 SIM-1 AIM-1 ESBL-CARBA-D (OXACarbapenemases) OXA-23-group OXA-24-group OXA-48 ^b OXA-58-group
Operationale Definition	Resistenz des Bakterienstamms gegen Breitspektrum-Cephalosporine und niedrigere MHK für das jeweilige Cephalosporin in Kombination mit Clavulansäure	Resistenz des Bakterienstamms gegen Breitspektrum-Cephalosporine und phänotypische Detektion von ESBL-M-C oder genotypische Detektion ESBL-M-D	Resistenz des Bakterienstamms gegen Breitspektrum-Cephalosporine und mindestens ein Carbapenem, sowie ESBL-CARBA detektiert mit genotypischen oder phänotypischen Methoden

Tabelle 1: Klassifikation der ESBL nach Giske et al. 2008

^a nicht durch Clavulansäure hemmbar. ^b OXA-48 bildende Isolate können in- vitro- Cephalosporin-sensibel erscheinen

4.3. Klinisch wichtige ESBL-bildende Bakterienspezies

Viele ESBL-bildende Erreger gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und produzieren hauptsächlich TEM, SHV und CTX-M ESBL. In der Literatur sind Infektionen durch ESBL-produzierende *Klebsiella pneumoniae* und *E. coli* vielfach beschrieben. Auch bei *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp. und anderen *Enterobacteriaceae* kommen ESBL vor. Ausserhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* sind ESBL seltener, kommen jedoch auch bei Nonfermentern vor, beispielsweise OXA ESBL bei *Pseudomonas aeruginosa* sowie verschiedene ESBL bei *Acinetobacter baumannii* (Pfaller und Segreti, 2006).

4.4. Klinische Bedeutung der ESBL-Bildner

TEM und SHV ESBL-bildende *Klebsiella pneumoniae* sind bedeutende Erreger nosokomialer Infektionen (Paterson et al. 2004). CTX-M ESBL-bildende *E. coli* haben in den letzten Jahren Bedeutung als Erreger ambulant erworbener Harnwegsinfektionen erlangt (Livermore et al. 2007; Rodriguez-Bano et al. 2006). Verzögertes Erkennen und hierdurch verspätete adäquate Therapie von Infektionen durch ESBL-bildende Bakterien ist mit erhöhter Letalität in Zusammenhang gebracht worden (Paterson et al. 2001; Paterson et al. 2004a). Für Infektionen mit ESBL-bildenden Bakterien sind in einigen Studien längerer Krankenhausaufenthalt sowie höhere Behandlungskosten, verglichen mit Infektionen durch entsprechende ESBL-negative Erreger nachgewiesen worden (Lautenbach et al. 2001). Einige ESBL-produzierende Bakterienstämme, insbesondere *Klebsiella pneumoniae* verursachen nosokomiale Ausbrüche, bei denen sie sich im Krankenhaus von Patient zu Patient, aber auch von Ort zu Ort verbreiten (Bush 2008). Viele ESBL-produzierende Bakterien sind multiresistent. Zusätzlich zur Resistenz gegenüber den meisten β -Laktamantibiotika sind sie unempfindlich gegenüber Antibiotika verschiedener Klassen, insbesondere gegenüber Fluorchinolonen, Aminoglykosiden und Cotrimoxazol (Paterson 2006). ESBL-kodierende Gene sind häufig Bestandteile von mobilen genetischen Elementen, Plasmiden oder Genkassetten auf Integronen, auf denen auch Resistenzgene für andere Antibiotikaklassen vorhanden sind (Theuretzbacher 2004). Um in der klinischen Situation auf die zunehmende Verbreitung von ESBL reagieren zu können, müssen ESBL-bildende Erreger zuverlässig und schnell erkannt werden.

Die Detektion wird dadurch erschwert, dass keine eindeutige Beziehung zwischen der klinischen Resistenz von ESBL-produzierenden Bakterien und ihren MHK-Werten für

Oxyiminocephalosporine besteht. Einige ESBL-Typen, z.B. TEM-3 und SHV-2, führen zu MHK-Werten für alle Breitspektrum-Cephalosporine und Aztreonam, die Resistenz klar erkennen lassen.

Andere hingegen, z.B. TEM-10 und TEM-26, führen zu deutlicher in-vitro-Resistenz gegenüber Ceftazidim (MHK ≥ 128 mg/l), jedoch zu niedrigen MHK-Werten für Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefpirom, und Ceftizoxim (MHK von 0,5 bis 4 mg/l).

Daher ist In-Vitro-Sensibilität nicht immer ein zuverlässiger Indikator für klinischen Erfolg und weiterhin wird ESBL-Bildung durch Routine-Antibiogramme häufig nicht erkannt (Livermore und Brown 2001; Livermore 1995).

Dieses Phänomen wurde als „versteckte Resistenz“ bezeichnet (Moland et al. 1998).

Aufgrund dieser unbefriedigenden Situation wurden die klinischen Breakpoints für Cephalosporine bei *Enterobacteriaceae*, sowohl von EUCAST als auch CLSI vor kurzem überarbeitet, wobei die neuen CLSI Empfehlungen Anfang 2008 noch nicht in Kraft getreten waren.

Bei Verwendung dieser neuen niedrigen Breakpoints sollen auch ESBL-produzierende Bakterienstämme, die nach den alten Breakpoints als sensibel eingestuft worden wären, als resistent erkannt werden. Zusätzlich zu den klinischen Breakpoints veröffentlicht EUCAST epidemiologische cut-off Werte, die sich auf die Antibiotikasensibilität von Wildtypbakterien beziehen.

Mit Hilfe der neuen Breakpoints in Verbindung mit den epidemiologischen cut-off Werten können Sensibilitätsbestimmung und ESBL-Screening gleichzeitig durchgeführt werden. Für *E. coli* und *K. pneumoniae* sollen als Testsubstanzen Cefotaxim und Ceftazidim verwendet werden. Die Ergebnisse können anhand der Breakpoints und cut-off Werte interpretiert werden. Die Breakpoints ermöglichen die Einordnung als klinisch sensibel oder resistent. Die epidemiologischen cut-off Werte lassen erkennen, ob der Verdacht auf ESBL-Bildung besteht (Kahlmeter 2008).

4.5. Verbreitung und Besonderheiten ESBL- produzierender Enterobacteriaceae

In Deutschland sind bei *Enterobacteriaceae* bisher nur ESBL der Klassen TEM, SHV und CTX-M verbreitet. In den letzten Jahren sind europaweit zunehmend ambulant erworbene Infektionen durch CTX-M-bildende *E.coli* beobachtet worden (Canton et al. 2008). OXA-ESBL sind bei *K.*

pneumoniae in der Türkei von klinischer Bedeutung (Carrer et al. 2008). Im europäischen Arm der MYSTIC- Studie, mit deren Hilfe in regelmäßigen Zeitabständen Resistenzentwicklungen gegen Carbapeneme und andere breit wirksame Substanzen weltweit vergleichend neben anderen Bereichen der Medizin in ca. 80 intensivmedizinischen Einrichtungen einschließlich unseres Klinikums überwacht werden, konnten im Jahr 2007 4,9% der *E. coli*-, 7,2% der *Klebsiella* spp.-, und 1,6% der *P. mirabilis*-Isolate als ESBL-bildend identifiziert werden (Turner 2009). In der Surveillance-Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft aus dem Jahr 2004 wurden 5,1% von *E. coli*, 7,3% von *K. pneumoniae*, 12,4% von *K. oxytoca* und 1,9% von *P. mirabilis* als ESBL-bildend identifiziert. Der jeweilige Genotyp wurde nicht ermittelt (Kresken et al. 2006). Laut EARSS hat von 2000 bis 2006 bei *E. coli* und *K. pneumoniae* der Anteil der Isolate mit Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation europaweit signifikant zugenommen. Es wird angenommen, dass diese Entwicklung hauptsächlich auf der zunehmenden Prävalenz von ESBL beruht (Coque et al. 2008).

Alle diese Angaben beziehen sich auf ESBL-Bildner, die bei manifest Erkrankten isoliert wurden. Jedoch sind ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* sowohl im Krankenhaus als auch in der Allgemeinbevölkerung bei klinisch unauffälligen Personen als Kommensalen vorhanden.

Da die häufigsten ESBL-Bildner, *E. coli* und *K. pneumoniae*, opportunistisch pathogen sind, führt Kolonisierung durch sie oft nicht zu klinischen Erscheinungen. Der Gastrointestinaltrakt ist der typische Ort der Besiedlung. Auch wenn ESBL-Bildner aus Sputum, Urin oder von der Haut isoliert werden, liegt nicht notwendigerweise eine behandlungswürdige Infektion vor (Paterson 2006). Kolonisierung von Patienten durch ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* im Rahmen von Ausbrüchen in Krankenhäusern ist weltweit vielfach beschrieben worden (Burak et al. 2006; Laurent et al. 2008). Bei Ausbrüchen in Krankenhäusern wurden bis zu 72% der Patienten als kolonisiert oder infiziert beschrieben (Pena et al. 1998). Unabhängig von Ausbrüchen wurde im Jahr 2003 in einem spanischen Krankenhaus bei 11,8% der stationären Patienten Ausscheidung von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* gefunden (Valverde et al. 2004). Auch über zuvor nicht hospitalisierte gesunde Ausscheider von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* ist berichtet worden. Bei gesunden Kindern in Peru und Bolivien stellte man im Jahr 2005 eine Prävalenz von 1,7% Ausscheidern von ESBL-bildenden *E. coli* fest (Pallecchi et al. 2007). Aus dem Stuhl von 3,7 % von 108 gesunden, nicht hospitalisierten Freiwilligen in Spanien, wurden im Jahr 2003 ESBL-bildende *E. coli*-Stämme isoliert (Valverde et al. 2004).

In etlichen Studien sind Infektionen durch ESBL-bildende *E. coli* und *K. pneumoniae* mit Infektionen durch nicht ESBL-bildende Organismen derselben Spezies hinsichtlich ihrer klinischen Verläufe und Therapieergebnisse verglichen worden. Variablen, deren Abhängigkeit von der ESBL-Bildung der Erreger untersucht wurde, sind:

- Letalität,
- Dauer der Behandlung der Infektion,
- Kosten der Behandlung,
- Wahrscheinlichkeit inadäquater empirischer Antibiose beziehungsweise Verzögerung effektiver Antibiotikatherapie.

Bisher ist nur eine Metaanalyse zum Effekt der ESBL-Bildung auf Letalität und Verzögerung der effektiven Antibiotikatherapie publiziert worden (Schwaber und Carmeli, 2007).

Nicht alle Studien zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen ESBL-Bildung und schlechterem "outcome". In der Metaanalyse von Schwaber und Carmeli zeigten etwa die Hälfte der eingeschlossenen Studien kein signifikant erhöhtes relatives Risiko für Letalität aufgrund von ESBL-bildenden Bakterien. Es wird angenommen, dass die Patientenzahlen in vielen Studien zu gering sind, um ausreichende statistische Power zu erreichen, was bewirkt, dass statistisch signifikante Unterschiede nicht gezeigt werden können.

Den Effekt der ESBL-Bildung auf Outcome-Variablen zu erkennen, wird ausserdem durch Confounding (Erläuterung des Begriffs siehe Seite 106) erschwert. Zum Beispiel hat die Schwere der Grunderkrankung sowohl Einfluss auf das Risiko, eine Infektion mit einem ESBL-bildenden Bakterium zu erleiden, als auch auf die Letalität. Eine Möglichkeit, Confounding bei der Analyse der Daten zu kontrollieren, bieten multivariable statistische Methoden (Erläuterung des Begriffs siehe Seite 106) (Rodriguez-Bano und Pascual, 2008).

Zwei Dinge könnten dazu führen, dass Infektionen durch ESBL-Bildner besonders ungünstig verlaufen: erhöhte Virulenz ESBL-bildender Stämme sowie späterer Beginn einer wirksamen Antibiotikatherapie.

Wie virulent ESBL-bildende *E. coli* und *K. pneumoniae* im Vergleich mit ESBL-negativen Bakterien derselben Spezies sind, ist nicht geklärt. In einer Untersuchung an Nematoden erschienen CTX-M ESBL-bildende *E. coli* aus Südfrankreich weniger virulent als nicht ESBL-bildende *E. coli*. Auch molekulargenetisch wurden in dieser Studie bei den ESBL-positiven Organismen weniger Virulenzdeterminanten als bei den ESBL-negativen nachgewiesen (Lavigne et al. 2006). Bei einer Untersuchung an 114 CTX-M ESBL-bildenden *E. coli* aus Großbritannien

stellte sich hingegen die Mehrheit der Isolate als zu virulenten phylogenetischen Gruppen, hauptsächlich Gruppe B2, gehörig heraus (Karisik et al. 2008). Ein in Europa und Nordafrika verbreiteter CTX-M-15 bildender *E. coli* Klon erwies sich in einem Mausmodell als hoch virulent (Clermont et al. 2008).

Für *K. pneumoniae* liegen Hinweise vor, dass ESBL-bildende Stämme häufiger über bestimmte Virulenzfaktoren und Resistenzdeterminaten verfügen als ESBL-negative *K. pneumoniae*. Neue Virulenzfaktoren sind in diesem Zusammenhang nicht beschrieben worden, jedoch verstärkte simultane Expression mehrerer Virulenzfaktoren. Es ist nicht bekannt, ob dies von klinischer Bedeutung ist (Sahly et al. 2008; Sahly et al., 2004a, 2004b).

4.6. Risiko inadäquater empirischer Antibiose durch ESBL-Bildung

Angesichts der Multiresistenz ESBL-bildender *E. coli*- und *K. pneumoniae*-Stämme ist zu erwarten, dass die empirisch eingesetzten Antibiotika oft nicht gegen sie wirksam sind. Die dementsprechende Verzögerung einer wirksamen Antibiose könnte ein entscheidender Faktor für den ungünstigeren Verlauf von Infektionen durch ESBL-Bildner sein.

In einer Studie von Lautenbach et al. (2001) war die Zeit bis zum Beginn der wirksamen Antibiotikatherapie etwa sechsfach länger, wenn die Erreger über ESBL verfügten (72 gegenüber 11 Stunden).

Die bisher einzige Metaanalyse, die Infektionen durch ESBL-Bildner mit Infektionen durch nicht-ESBL-bildende Erreger vergleicht, schliesst 16 Studien aus den Jahren 1996 - 2003 ein. Die untersuchten Erreger waren hauptsächlich *E. coli* und *K. pneumoniae*. Als abhängige Variablen wurden Letalität und Verzögerung des Beginns einer wirksamen Antibiotikatherapie untersucht. Zehn der Studien lieferten Vergleichsdaten zur Verzögerung der wirksamen Therapie. Es wurde durch die Metaanalyse ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen ESBL-Bildung der Erreger und Verzögerung der wirksamen Therapie festgestellt (pooled crude RR 5,56, 95% CI 2,94–10,51, P 0,001) (Schwaber und Carmeli, 2007).

In einer 2007 veröffentlichten Fallkontrollstudie von Kola et al. (2007) erhielten nur 27,8% von mit ESBL-bildenden *E. coli* oder ESBL-bildenden *K. pneumoniae* infizierten Patienten eine adäquate empirische Antibiotikatherapie, während 79,6% der mit ESBL-negativen *E. coli* oder *K. pneumoniae* infizierten Patienten eine adäquate empirische Antibiose erhielten.

Bei schweren Infektionen mit Sepsis ist es wahrscheinlich, dass ein verzögerter Beginn der wirksamen Antibiotikatherapie zu einem ungünstigeren Verlauf führt. Bei leichteren Infektionen

wie Harnwegsinfektionen ohne Sepsis ist es schwieriger, die Bedeutung der verzögerten wirksamen Therapie festzustellen.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen inadäquater initialer Antibiotikatherapie und Letalität konnte für Infektionen durch ESBL-bildende *E. coli* und *K. pneumoniae* mit Ausnahme von Harnwegsinfektionen in einer retrospektiven Kohortenstudie mit 187 Patienten festgestellt werden (Hyle et al. 2005).

4.7. Auswirkung der ESBL-Bildung auf die Therapiedauer von Infektionen

Wenn Infektionskrankheiten durch ESBL-bildende Erreger häufig initial inadäquat behandelt werden, ist es naheliegend, dass ESBL-Bildung zu einem protrahierten Krankheitsverlauf führt.

In einer Kohortenstudie von Schwaber et al. (2006) mit 99 Fall- und 99 Kontrollpatienten ergab sich eine mittlere Krankenhausaufenthaltsdauer nach Bakteriämie von 11 Tagen für Patienten mit ESBL-bildenden Erregern, gegenüber 5 Tagen für die Kontrollpatienten. In der bisher einzigen Metaanalyse zum „Outcome“ von Infektionen durch ESBL-Bildner wurde die Dauer des Krankenhausaufenthalts nicht berücksichtigt (Schwaber und Carmeli 2007). In der oben erwähnten Fallkontrollstudie von Kola et al. (2007) wurde für Fallpatienten mit Atemwegsinfektion oder Bakteriämie/Sepsis ein längerer Krankenhausaufenthalt festgestellt. 50% der Fallpatienten wurden länger als 15 Tage auf der Intensivstation beziehungsweise länger als 18 Tage im Krankenhaus behandelt. Dies war nur für 6,67% der Kontrollpatienten der Fall. Zwischen Fallpatienten mit Harnwegs- oder Wundinfektionen und den Kontrollpatienten gab es im Bezug auf diese Variable keinen signifikanten Unterschied.

Melzer und Petersen (2007) fanden in ihrer Kohortenstudie an Patienten mit *E. coli*-Bakteriämie keinen signifikanten Unterschied in der Dauer des Krankenhausaufenthalts.

Lee et al. (2006) verglichen zwei Kohorten von je 21 Patienten. In dieser Studie, in der nur Patienten mit Infektionen anderer anatomischer Lokalisation als den Harnwegen eingeschlossen wurden, ergab sich ein im Durchschnitt 9,7 Tage längerer Krankenhausaufenthalt für Patienten mit einer Infektion durch ESBL-bildende Erreger.

4.8. Auswirkung der ESBL-Bildung auf die Letalität der Patienten

In der Metaanalyse von Schwaber und Carmeli (2007) ergab sich eine signifikant höhere Letalität bei Bakteriämie aufgrund von Infektionen durch ESBL-Bildner (pooled RR 1,85, 95% CI 1,39–2,47, P 0,001).

Kola et al. (2007) konnten keinen signifikanten Unterschied in der Letalität zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe finden, weder in der Subgruppe der Patienten mit bakteriämischen Infektionen noch bei Patienten mit leichteren Infektionen.

In einer nach der Metaanalyse veröffentlichten Kohortenstudie an Patienten mit *E. coli* Bakteriämie fanden Melzer und Petersen (2007) eine signifikant höhere Letalität für Infektionen mit ESBL-bildenden *E. coli*-Stämmen.

4.9. Gesundheitsökonomische Auswirkungen der ESBL-Bildung

Infektionen mit ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* führen zu längeren Krankenhausaufenthalten als Infektionen mit Erregern derselben Spezies ohne ESBL-Bildung. Längere Hospitalisierung führt zwangsläufig zu höheren Gesamtkosten. Es ist naheliegend, dass auch die Ausgaben für Antibiotika durch ESBL in die Höhe getrieben werden, da auf teurere Substanzen wie die Carbapeneme zurückgegriffen werden muss und sich die Gesamtdauer der Antibiotikatherapie verlängert. Nosokomiale Ausbrüche ESBL-bildender Erreger erfordern besonders strenge hygienische Maßnahmen, die zusätzlichen Arbeitsaufwand und damit Kosten verursachen. Nur in wenigen Veröffentlichungen werden diese Kosten konkret beziffert. In der Fallkontrollstudie von Kola et al. (2007) aus dem Universitätsklinikum Hannover ergaben sich für Fallpatienten mit Atemwegsinfektion oder Bakteriämie/Sepsis signifikant höhere Kosten für die definitive Antibiotikatherapie, 325 Euro pro Fallpatient gegenüber 58,90 Euro pro Kontrollpatient. Dieses Ergebnis konnte durch multivariate statistische Analyse bestätigt werden. Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Studie auch längerer Krankenhausaufenthalt für die letztere Gruppe von Patienten festgestellt. Eine Berechnung der daraus entstandenen zusätzlichen Kosten wurde jedoch nicht mitgeteilt.

Lee et al. (2006) beziffern Kosten, die ESBL-bildende Erreger zusätzlich entstehen lassen, und geben den Anteil der Kosten für Antibiotika an den Gesamtkosten an. Patienten mit Harnwegsinfektion wurden nicht eingeschlossen; die meisten Patienten litten an Atemwegsinfektionen. Die Autoren betonen, dass bei der Zuordnung der infizierten Patienten mit ESBL-positiven oder ESBL-negativen Erregern das initial erhaltene Antibiotikum als ein Kriterium berücksichtigt wurde.

Insgesamt ergaben sich pro Fallpatient im Durchschnitt um 16 451 US Dollar höhere Kosten, wobei diese hauptsächlich auf den längeren Krankenhausaufenthalt der Fallpatienten (sog. Hotel-

Kosten) zurückgeführt werden. Bei den Fallpatienten machten die Kosten für Antibiotika nur 1,96% der Gesamtkosten aus.

Die Studie zum ökonomischen Einfluss von ESBL mit der grössten Patientenzahl wurde von Schwaber et al. (2006) veröffentlicht. 99 Patienten mit Bakteriämie durch ESBL-bildende *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. wurden mit 99 Bakteriämiepatienten mit ESBL-negativen Erregern der jeweils selben Spezies verglichen. Dabei handelte es sich zu 23% um *E. coli*, zu 63% um *Klebsiella* spp. und zu 14% um *Proteus* spp.. Die Autoren bezeichnen die Patienten als „cases“ und „controls“, weisen aber daraufhin, dass es sich nicht um eine Fallkontrollstudie, sondern eine retrospektive Kohorten-Studie handelt. Um Unterschiede zwischen den Kohorten als Störgrößen auszuschalten, wurde eine multivariate statistische Analyse durchgeführt. In der Gruppe der mit ESBL-Bildnern infizierten Patienten ergaben sich in der multivariaten Analyse im Durchschnitt um den Faktor 1,57 höhere Kosten pro Patient. Kosten für Antibiotika wurden nicht gesondert angegeben. In der von Lautenbach et al. (2001) veröffentlichten Fallkontrollstudie wurden 33 Fallpatienten mit 66 Kontrollpatienten verglichen. 25 Fallpatienten waren mit ESBL-bildenden *K. pneumoniae*, die verbleibenden 8 mit *E. coli* infiziert. 51,5% der Fallpatienten litten an Harnwegsinfektionen. Es wurde eine multivariate statistische Analyse durchgeführt, um die Schwere der Erkrankung, ausgedrückt als APACHE II score, und die Dauer der Hospitalisation vor Beginn der Infektion als Störgrößen zu berücksichtigen. Dabei ergaben sich um den Faktor 1,71 höhere Gesamtkosten für Patienten mit Infektionen durch ESBL-bildende Erreger. Über die Zusammensetzung der Kosten wurden keine Angaben gemacht.

In der von Stone et al. (2003) veröffentlichten Studie wurden die Kosten für die erfolgreiche Bekämpfung eines Ausbruchs ESBL-bildender *K. pneumoniae* auf einer Neugeborenenintensivstation mit 45 Betten auf 341 751 US Dollar beziffert. Dieser Betrag setzt sich zusammen aus 146 331 Dollar für zusätzliche Personalkosten und 56 716 Dollar für Aufwendungen des mikrobiologischen Labors. Ausserdem wurden etwa 110 000 Dollar entgangene Einnahmen errechnet. Ausgaben für Antibiotika machten weniger als ein Prozent der durch den Ausbruch verursachten Kosten aus.

4.10. Notwendigkeit schneller Detektion der ESBL-Bildung

Um eine adäquate Antibiotikatherapie zu ermöglichen und um Ausbrüche durch hygienische Maßnahmen verhindern zu können, müssen ESBL-bildende Erreger möglichst schnell erkannt werden. Wie bereits erwähnt, sind die MHK-Breakpoints für Breitspektrum-Cephalosporine und

andere Antibiotika durch EUCAST und CLSI vor kurzem überarbeitet und neu festgelegt worden. Bei Verwendung der zuvor gültigen Breakpoints kam es vor, dass ESBL-bildende Bakterienstämme in-vitro sensibel gegenüber Breitspektrum-Cephalosporinen erschienen und dadurch nicht erkannt wurden. Therapieversagen und letale Verläufe, beim Einsatz von Cephalosporinen zur Behandlung von Infektionen mit ESBL-Bildnern, die in-vitro sensibel erschienen, sind dokumentiert (Paterson et al. 2001; Paterson et al. 2004b). Dies machte es notwendig, Screening-Tests auf ESBL durchzuführen. Mit Hilfe der neuen deutlich niedrigeren MHK-Breakpoints sollen fast alle ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* als resistent gegenüber Breitspektrum-Cephalosporinen erkannt werden (Kahlmeter 2008). Durch die Überarbeitung der Breakpoints sind die Voraussetzungen zur Erkennung von Resistenzen wesentlich verbessert worden. Jedoch ist es nach wie vor unerlässlich, Resistenzen genauer zu charakterisieren. *Enterobacteriaceae* mit verdächtigem Resistenzmuster müssen nach wie vor auf ESBL-Bildung untersucht werden. Dafür gibt es mehrere Gründe. ESBL-bildende Stämme müssen aus epidemiologischen und krankenhaushygienischen Gründen erkannt werden, beispielsweise um Ausbrüche verhindern zu können. Weiterhin hat die Anwesenheit von ESBL nach wie vor entscheidenden Einfluss auf die Auswahl und Wirksamkeit der Antibiotikatherapie.

4.11. Methoden zur Detektion von ESBL

Die Methoden zur Detektion von ESBL-produzierenden Bakterienstämmen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

- **Phänotypische** Methoden, die die Resistenz ESBL-bildender Bakterien gegenüber Oxyiminocephalosporinen und die Hemmbarkeit von ESBL durch Clavulansäure nutzen, und
- **genotypische** Methoden, die mit Hilfe molekularer Techniken die für ESBL kodierenden Gene nachweisen.

In der klinischen Mikrobiologie werden hauptsächlich die phänotypischen Methoden eingesetzt. In der Routinediagnostik spielen molekulare Techniken noch keine Rolle, da bisher nur die phänotypischen Methoden ausreichend einfach durchzuführen und kostengünstig sind.

Allerdings erlauben nur die genotypischen Verfahren einzelne ESBL-Typen zu unterscheiden.

Ausserdem eignen sich die molekularbiologischen Verfahren zum Nachweis der „low-level resistance“ und spielen heute besonders für die Untersuchung epidemiologischer Fragestellungen eine Rolle (Pitout und Laupland 2008).

4.11.1. Phänotypische Methoden zur Detektion der ESBL-Bildung

Die grundlegende Strategie zur Erkennung von ESBL- produzierenden Bakterienstämmen besteht aus zwei Schritten.

- Screening mit Indikator-Cephalosporinen.

- Bei Resistenz gegenüber den Indikator-Cephalosporinen werden phänotypische Bestätigungstests eingesetzt, die auf dem Synergismus von Cephalosporinen und Clavulansäure beruhen.

Das US-amerikanische Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und die Health Protection Agency (HPA) in Großbritannien haben Richtlinien für die Detektion von ESBL bei *E. coli* und *Klebsiella* spp. sowie *Proteus* spp. veröffentlicht (Health Protection Agency 2008).

4.11.1.1. Screening-Verfahren

Die phänotypischen Screening-Verfahren beruhen auf der Resistenz ESBL-bildender Organismen gegenüber Oxyimino-Cephalosporinen. Ergänzend kann die Sensibilität gegenüber Cefoxitin untersucht werden. Dies ermöglicht die Abgrenzung gegenüber anderen Resistenzmechanismen, insbesondere AmpC- β -Laktamasen. Die Screening-Verfahren können in Form von Agardiffusionstests, Bouillondilutionsverfahren oder auf mit Cephalosporinen angereicherten Agarnährböden durchgeführt werden. In automatisierten Systemen wie Vitek[®] oder Phoenix[®] stehen entsprechende Test-Panels zur Verfügung. Das ESBL-Screening soll möglichst alle ESBL-Bildner erfassen, andererseits sollte die Spezifität nicht zu gering sein. Die Sensitivität und Spezifität des Screenings sind davon abhängig, welche Indikator-Cephalosporine verwendet werden und davon, welche ESBL-Typen in der untersuchten Population vorkommen (Bradford 2001). In den CLSI-Richtlinien wird die Verwendung mehrerer Indikator-Cephalosporine empfohlen, um optimale Sensitivität zu erreichen. Jain und Mondal (2008) überprüften die jeweilige Sensitivität und Spezifität des Screenings mit Cefpodoxim, Cefotaxim, Ceftazidim und Aztreonam, als einzelnen Substanzen im Agardiffusionstest und im Agardilutionstest, an 100 *Klebsiella* spp. Isolaten. Als Referenz-Methode führten sie den Agardiffusionstest mit Ceftazidim- und Ceftazidim/Clavulansäure-Blättchen durch. Cefpodoxim erwies sich mit 93% Sensitivität und 85,7% Spezifität im Agardiffusionstest als effizienteste Substanz für das Screening mit nur einem Cephalosporin.

Hope et al. (2007) untersuchten 1195 Isolate, die in 16 Laboratorien in England mit verschiedenen Screening-Verfahren als mögliche ESBL-Bildner erfasst worden waren. Von 372 Isolaten, bei denen das Screening ausschliesslich mit Cefpodoxim durchgeführt worden war, erwiesen sich 256 (69%), als ESBL-negativ. Unter 496 Isolaten, die gegenüber Ceftazidim und Cefotaxim resistent waren, erwiesen sich nur 26 (5%) als ESBL-negativ.

Zur Durchführung des Screenings stellen sich dementsprechend zwei Fragen:

- Welches oder welche Cephalosporine sollen zum Screening verwendet werden?
- Welche MHK-Breakpoints sollen bei Bouillondilutionsverfahren verwendet werden bzw. welche Hemmhofdurchmesser bei Agardiffusionstest?

Das ideale Indikator-Cephalosporin wird von allen ESBL hydrolysiert, so dass alle ESBL-Bildner gegenüber diesem Indikator resistent sind. Gegenüber Cefpodoxim sind alle häufigen ESBL-bildenden Bakterien resistent. Cefpodoxim ist dementsprechend für das Screening geeignet (Thomson und Sanders 1997).

Ebenso können Cefotaxim und Ceftazidim gemeinsam eingesetzt werden. TEM- und SHV-ESBL führen zuverlässig zu Resistenz gegenüber Ceftazidim. Nur ein Teil dieser Enzyme ist in der Lage, Cefotaxim zu hydrolysieren. Das Gegenteil gilt für CTX-M ESBL. Sie führen zuverlässig zu Resistenz gegenüber Cefotaxim, nur ein Teil von ihnen verursacht Resistenz gegenüber Ceftazidim.

ESBL-Typ	Resistenz gegenüber	Resistenz nur bestimmter Varianten gegenüber
TEM und SHV ESBL	Ceftazidim	Cefotaxim
CTX-M ESBL	Cefotaxim	Ceftazidim
Alle ESBL	Cefpodoxim	

Tabelle 2: Charakterisierung von ESBL anhand des Resistenzmusters

Von der Health Protection Agency (HPA) in Großbritannien werden folgende Breakpoints und Hemmhofdurchmesser für das ESBL-Screening empfohlen (Tabelle 3):

Antibiotikum und Beschickungsdosis der Testblättchen	Hemmhofdurchmesser (mm)		MHK (mg/l)	
	R, <	S, >	R, >	S, <
Cefotaxim 30 µg	29	30	1	1
Ceftazidim 30 µg <i>E. coli</i> & <i>Klebsiella</i> spp.	21	22	2	2
Ceftazidim 30 µg andere Spezies	27	28	2	2
Cefpodoxim 10 µg	19	20	1	1

Tabelle 3: Von der HPA in National Standard Method QSOP 51 empfohlene Grenzwerte

Die von EUCAST empfohlenen klinischen MHK-Grenzwerte entsprechen diesen Screening-Grenzwerten bezüglich der Sensibilität gegenüber Cefotaxim. Für Ceftazidim liegt der klinische EUCAST MHK-Grenzwert für Sensibilität mit 1 mg/l unter dem HPA Screening-Grenzwert.

Cephalosporine	EUCAST klinische MHK-Grenzwerte in mg/l (S≤/R>)
Cefotaxim	1/2
Ceftazidim	1/8

Tabelle 4: Neue MHK-Grenzwerte des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2006

CLSI empfiehlt für das ESBL-Screening bei *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *E. coli* einen Cefpodoxim-Grenzwert für Bouillondilutionstests von ≥ 8 mg/l, um höhere Spezifität zu erreichen (Paterson und Bonomo 2005), für Ceftazidim und Cefotaxim und Ceftazidim 2 mg/l.

ESBL-Screening mit Selektivnährböden

chromID[®] ESBL

BioMérieux bietet für das ESBL-Screening einen chromogenen, mit Cefpodoxim angereicherten Agarnährboden (chromID ESBL) an. Dieser soll es ermöglichen, aus klinischem Untersuchungsmaterial ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* innerhalb von 24 Stunden zu isolieren. Ausserdem soll durch die chromogenen Eigenschaften eine grobe Speziesidentifikation stattfinden (Réglier-Poupet et al. 2008). In einer Studie von Färber et. al. (2008) ergab sich für die

Identifikation von ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* mit chromID ESBL eine Sensitivität von 95,8%; die Spezifität lag jedoch bei nur 10,5%. Da das Screening mit chromID ESBL allein auf dem Cefpodoxim-Gehalt des Nährbodens beruht, können AmpC- β -Laktamasen nicht abgegrenzt werden.

CIVA Agar

Ein ähnlicher Ansatz wird mit sogenanntem CIVA Agar (Ceftazidim (2 mg/l), Inositol, Vancomycin, Amphotericin B) verfolgt (Padmini und Raju 2008). Da bei dieser Screening-Methode allein Ceftazidim als Indikator-Cephalosporin dient, wird die wichtige Gruppe der CTX-M-ESBL nicht ausreichend berücksichtigt.

Chromogene Cephalosporine

Einen anderen Ansatz für ein besonders schnelles ESBL-Screening bieten chromogene Cephalosporine, die durch ESBL, nicht jedoch durch andere β -Laktamasen hydrolysiert werden. Der Cica- β Test I (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) beruht auf diesem Prinzip. In einer Studie von Colodner et al. erreichte dieser Test 95,5 % Sensitivität und 98,1% Spezifität für die Detektion von ESBL-Bildnern. Als Referenzmethode wurde die Combination disc method mit Ceftazidim und Cefotaxim verwendet. Als Vorteil dieses Tests wird genannt, dass das Ergebnis spätestens nach 15 Minuten vorliegt (Colodner 2006).

4.11.1.2. Phänotypische Bestätigungstests

Die phänotypischen Bestätigungstests beruhen auf der synergistischen Wirkung von β -Laktamantibiotika, die durch ESBL hydrolysiert werden, und Clavulansäure. Eine Ausnahme bildet der sogenannte dreidimensionale Test, da hier kein β -Laktamaseinhibitor zum Einsatz kommt.

Dieses Test-Prinzip stösst an seine Grenzen, wenn zusätzlich zu ESBL nicht durch Clavulansäure hemmbare β -Laktamasen, wie AmpC, OXA oder Metallo- β -Laktamasen exprimiert werden (Drieux et al. 2008; Robberts et al. 2009). Während AmpC- Enzyme durch Maskierung des Synergismus zu falsch negativen Ergebnissen führen können, sind falsch positive Ergebnisse im Zusammenhang mit starker Expression von SHV-1 oder TEM-1 und Verlust von Porinen der äußeren Membran beschrieben worden (Paterson und Bonomo 2005). Ebenso kann starke Expression der K1- β -Laktamase von *K. oxytoca* zu falsch positiven Ergebnissen führen (Pötz et al. 2004; Stürenburg et al. 2004a) In Frankreich sind in den letzten Jahren Inhibitor-resistente TEM-ESBL, genannt CMT-ESBL (complex mutants of TEM), beschrieben worden. Diese

Enzyme vereinigen das hydrolytische Spektrum der TEM-ESBL mit mehreren von den IRT-Enzymen bekannten Mutationen, die zu Clavulansäure-Resistenz führen. Die Clavulansäure-Resistenz bestimmter CMT-ESBL, z.B. TEM-125, ist so ausgeprägt, dass sie in den üblichen phänotypischen Tests nicht erkannt werden (Robin et al. 2006).

Folgende phänotypische Bestätigungstests sind in der Literatur beschrieben:

Verfahren, die auf dem Prinzip des Agardiffusionstests beruhen:

- Double-disc synergy test, auch Double disc diffusion test oder auch Disc approximation method genannt, arbeitet mit Cephalosporin-Blättchen und Amoxicillin/Clavulansäure-Blättchen. Diese Methode wurde von Jarlier et al. (1988) beschrieben.
- Combination disc method, auch inhibitor potentiated disc diffusion test genannt, arbeitet mit Cephalosporin-Blättchen jeweils mit und ohne Clavulansäure
- Etest[®] ESBL
- Disc replacement method
- mit Clavulansäure angereicherter Agar
- dreidimensionale Tests
- Disk-on-Disk Test (MacKenzie et al. 2002)

Automatisierte Verfahren:

- Vitek[®] 2, bioMérieux
- Phoenix[®], Becton Dickinson
- Microscan[®] WalkAway-96, Dade Behring

Double-disc synergy test (Double disk diffusion test)

In den 1980er Jahren wurde als erster phänotypischer Bestätigungstest der Double-disc synergy Test entwickelt (Jarlier et al. 1988). Es handelt sich dabei um einen Agardiffusionstest. Üblicherweise werden Cefotaxim- und Ceftazidim-haltige Blättchen 20 - 30 mm entfernt von einem Amoxicillin-Clavulansäure-haltigen Blättchen plziert. ESBL Bildung wird angenommen, wenn zumindest einer der Cephalosporin-Hemmhöfe durch die Clavulansäure vergrößert wird, typischerweise in sogenannter Champagnerkorkenform oder Schlüssellochform. Diese Methode ist kostengünstig. Jedoch ist der optimale Abstand zwischen den Blättchen nicht für alle Stämme gleich. Dies kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Wenn aufgrund von geringer

Cephalosporinsensibilität der Verdacht auf ESBL-Bildung besteht, jedoch keine synergistische Wirkung mit Clavulansäure zu erkennen ist, muss der Test mit geringerem Abstand ,z.B. 20 mm zwischen den Blättchen wiederholt werden (Drieux et al. 2008).

Der Double-disc synergy test ist in mehreren Untersuchungen anhand genotypischer Referenzmethoden evaluiert worden. Dabei ergaben sich für die Sensitivität Werte von 79% bis 97%, für die Spezifität Werte 94% bis 100% (Paterson und Bonomo 2005). Wiegand et al. (2007) evaluierten diese Methode unter Einsatz von Ceftazidim, Cefpodoxim und Cefpirom. Es ergaben sich 94,1% Sensitivität, 81,4% Spezifität, sowie ein positiver prädikativer Wert von 87,9% und ein negativer prädikativer Wert von 90,6%.

Combination disc method

Auch bei dieser Methode handelt es sich um einen Agardiffusionstest. Die Hemmhofdurchmesser um Cephalosporin-Testblättchen werden mit den Hemmhofdurchmessern um Blättchen, die dasselbe Cephalosporin und Clavulansäure enthalten, verglichen (Abbildung 1). Bei dieser Methode besteht die Abstandsproblematik des Double-disc synergy tests nicht. Zur Interpretation werden je nach Hersteller unterschiedliche Kriterien verwendet:

- Vergrößerung des Hemmhofdurchmessers um 5 mm oder mehr durch Clavulansäure bei Oxoid.
- Vergrößerung des Hemmhofdurchmessers um 50 % oder mehr bei MAST und Becton Dickinson.

Auch diese Methode ist kostengünstig. Durchführung und Interpretation sind einfach. In einer Untersuchung von Linscott und Brown (2005) erreichte diese Methode 96% Sensitivität und 100% Spezifität. Auch in anderen Untersuchungen erwies sich die Combination disc method als zuverlässig (Carter et al. 2000; M'Zali et al. 2000). In der Studie von Wiegand et al. (2007) erreichte die Methode 92,9% Sensitivität und 96,6% Spezifität, gemessen an molekularen Referenz -Untersuchungen. Donaldson et al. (2008) testeten 137 *E. coli* Isolate aus britischen Pflegeheimen. Dabei erreichte die Combination disc method 98,5% Sensitivität. Von allen 137 Isolaten vermuteten die Autoren, dass sie CTX-M bilden. Bei 73 Isolaten wurde dies genotypisch bestätigt. Bei den übrigen 64 Isolaten gründet sich die Vermutung auf stärkere Resistenz gegenüber Cefotaxim als gegenüber Ceftazidim (Donaldson et al. 2008).

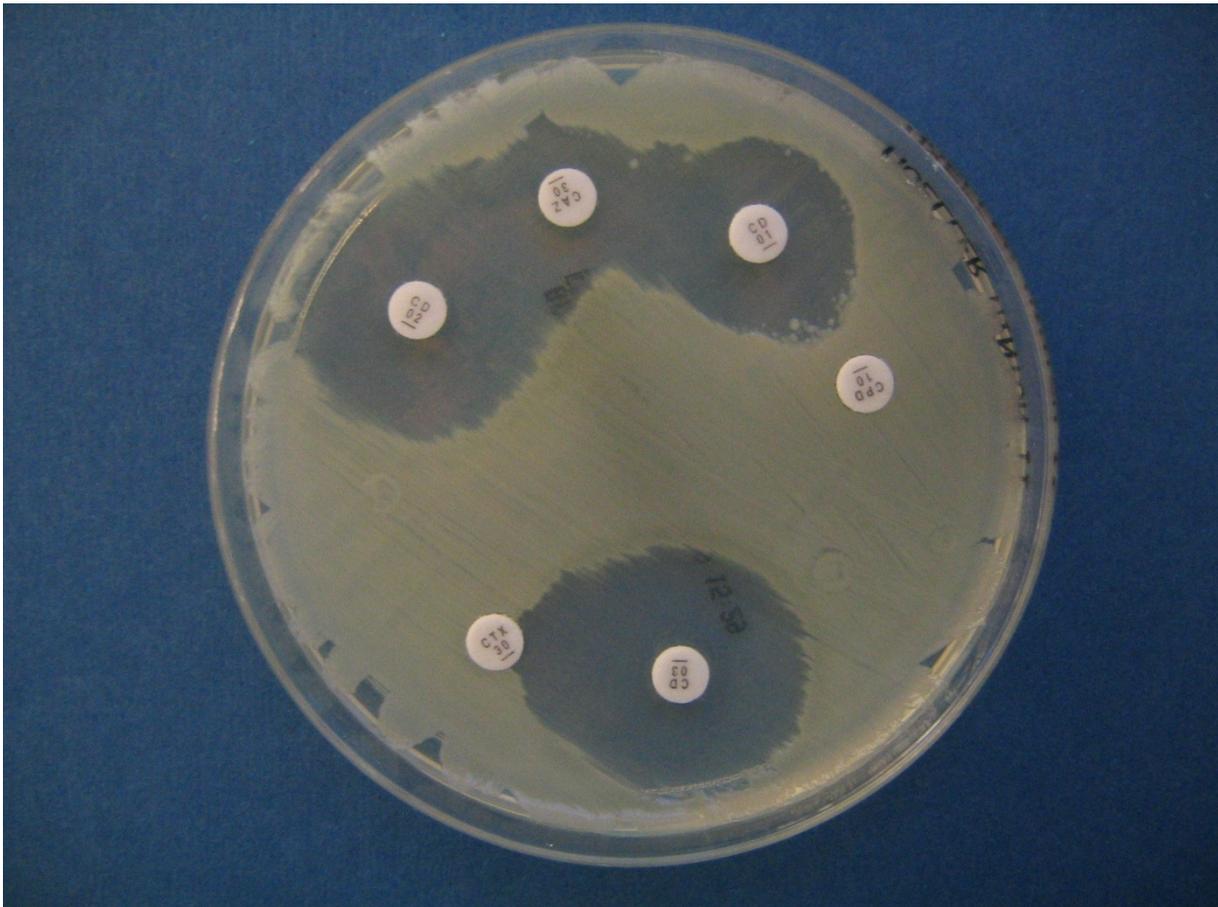


Abbildung 1: Combination disc method. Antibiotika-Testblättchen mit und ohne Clavulansäure (von rechts oben gegen den Uhrzeigersinn): CPO = Cefpodoxim, CD1 = Cefpodoxim+Clavulansäure; CAZ = Ceftazidim, CD2 = Ceftazidim+Clavulansäure; CTX=Cefotaxim, CD3 = Cefotaxim+Clavulansäure. Man erkennt, daß das Bakterienwachstum nur in den Arealen der Agarplatte gehemmt ist, die durch Diffusion von einem Cephalosporin und Clavulansäure in ausreichender Konzentration erreicht werden.

Etest® ESBL

Es handelt sich um Kunststoffstreifen, die von der Mitte bis zu einem Ende einen Cephalosporin-Gradienten enthalten, die andere Hälfte enthält einen Cephalosporin-Gradienten und zusätzlich Clavulansäure in konstanter Konzentration (Abbildung 2). Etest-ESBL-Streifen sind mit Ceftazidim, Cefotaxim und Cefepim erhältlich. Die Streifen werden auf inokulierte Agarplatten plaziert. Nach Übernachtbebrütung können zwei MHK-Werte anhand ellipsenförmiger Hemmhöfe abgelesen werden. Der Etest zeigt ESBL-Bildung an, wenn der MHK-Wert mit Clavulansäure um drei Titerstufen bzw. Faktor ≥ 8 niedriger ist als ohne Clavulansäure. Nicht in allen Fällen lassen sich zwei MHK-Werte anhand elliptischer Hemmhöfe ablesen. In der Nähe

des Mittelpunktes des Teststreifens können sogenannte Phantomzonen oder Deformierungen des Hemmhofs auf der ausschliesslich cephalosporin-haltigen Seite entstehen. Dieses Phänomen beruht auf der Diffusion von Clavulansäure und der Tatsache, dass der Cephalosporin-Gradient auf der ausschliesslich cephalosporin-haltigen Seite des Streifens mit einer höheren Konzentration beginnt. Wenn die MHK-Werte eines Isolates ausserhalb der MHK-Werte des Etest-Streifens liegen, ist keine Interpretation möglich. Einzelkolonien von Mutanten innerhalb der Hemmhöfe können zu Interpretationsschwierigkeiten führen.

Ein Vorteil der Methode ist, dass meist MHK-Werte abgelesen werden können. Die Interpretation des Etests erfordert jedoch spezielle Kenntnisse. Leverstein-van Hall et al. (2002) berichten, dass Labortechniker und Experten häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen beim Ablesen des Etests gelangten. In verschiedenen Studien wurden Werte für die Sensitivität des Etests von 87-100% ermittelt, für die Spezifität 95-100% (Paterson und Bonomo 2005; Stürenburg et. al 2004b) Wiegand et al. (2007) ermittelten an 144 *Enterobacteriaceae*, unter Verwendung molekularer Untersuchungen als Referenz-Methode, 94,1% Sensitivität, 84,7% Spezifität, sowie einen positiven prädikativen Wert von 89,9% und einen negativen prädikativen Wert von 90,9%.

Der Etest ist erheblich teurer als die auf Cephalosporin-Blättchen beruhenden Verfahren.

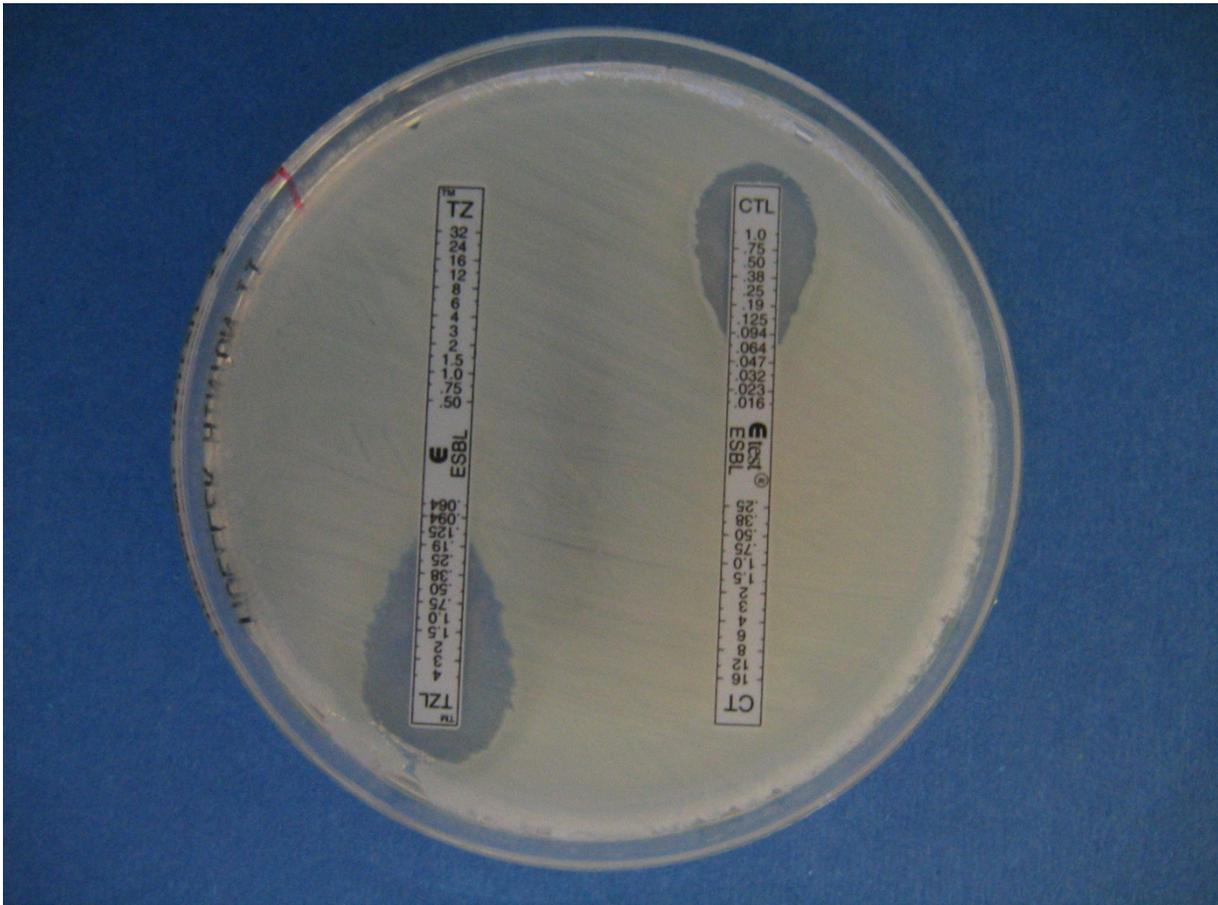


Abbildung 2: Zwei Etest-Streifen mit Cefotaxim (CT) / Cefotaxim+Clavulansäure (CTL) rechts im Bild und Ceftazidim (TZ) / Ceftazidim+Clavulansäure (TZL) links im Bild. Man erkennt jeweils ausschließlich am Clavulansäure imprägnierten Ende einen Hemmhof. Der ESBL-Nachweis ist jeweils positiv.

Disc replacement method

Bei dieser Methode werden Amoxicillin/Clavulansäure-Blättchen auf einer beimpften Agarplatte platziert. Die Agarplatte wird eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschliessend werden die Amoxicillin/Clavulansäure-Blättchen entfernt und genau dort, wo sie lagen, Cephalosporin-Blättchen platziert. In mindestens 30 mm Entfernung werden entsprechende Cephalosporin-Blättchen platziert. Nach Bebrütung werden die Hemmhofdurchmesser der jeweiligen Cephalosporine verglichen. Diese Methode erfordert einen zusätzlichen Arbeitsschritt und hat keine Vorteile verglichen mit den zuvor beschriebenen Methoden (Paterson und Bonomo 2005).

Mit Clavulansäure angereicherter Agar

Cephalosporin-Testblättchen werden auf mit 4 mg/l Clavulansäure angereicherten Mueller-Hinton-Agar plaziert. Zum Vergleich wird eine gewöhnliche Mueller-Hinton-Agarplatte mit entsprechenden Cephalosporin-Testblättchen beschickt. Um mindestens ≥ 10 mm grössere Hemmhofdurchmesser auf dem Clavulansäure-haltigen-Medium zeigen ESBL-Bildung an. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Clavulansäure-haltige Platten frisch sein müssen, da Clavulansäure in Agar keine lange Halbwertszeit hat (Ho et al. 1998).

Dreidimensionale Tests

1992 beschrieben Thomson und Sanders eine Methode, bei der kein β -Laktamaseinhibitor verwendet wird. Der Test zeichnet sich dadurch aus, dass zwei unterschiedlich hohe Inokula verwendet werden. Durchführung und Interpretation der dreidimensionalen Tests sind aufwendig, daher hat die Methode sich nicht durchsetzen können. Es handelt sich um einen Agardiffusionstest, bei dem ein kreisförmiger Schlitz in den Agar geschnitten wird. Die Agarplatte wird wie üblich beimpft. Der Schlitz wird mit einem höheren Inokulum desselben Isolates gefüllt. 3 mm ausserhalb des Schlitzes werden Antibiotika-Blättchen plaziert. Bei der Diffusion durch den Schlitz werden die Antibiotika einer höheren Bakterien-Konzentration ausgesetzt als auf der Agaroberfläche. β -Laktamantibiotika werden dabei durch ESBL verstärkt inaktiviert. Dies führt dazu, dass der Hemmhof sich nicht über den Schlitz hinaus fortsetzt. Dieses Verfahren wird als direkter Dreidimensionaler Test bezeichnet.

Ergänzend kann ein sogenannter indirekter dreidimensionaler Test durchgeführt werden. Dieser unterscheidet sich nur dadurch, dass die Agaroberfläche mit einem Antibiotika-empfindlichen Teststamm, üblicherweise *E. coli* ATCC 25922, beimpft wird (Thomsom und Sanders 1992).

Disk-on-disk Test

MacKenzie et al. (2002) verglichen die Hemmhofdurchmesser von Cephalosporin-Testblättchen mit den Hemmhofdurchmessern von Cephalosporin-Testblättchen, auf die Amoxicillin/Clavulansäure-Testblättchen gelegt worden waren.

Quicolor[®] ES Agar

(Salubris Inc., Massachusetts, USA; www.salubrisinc.com)

Eine Möglichkeit, den Etest ESBL und die Combination disc method schneller ablesbar zu machen, steht mit Quicolor ES Agar zur Verfügung. Es handelt sich um Agarplatten, die innerhalb von 4 bis 6 Stunden durch metabolische Aktivität von *Enterobacteriaceae* die Farbe

von Rot nach Gelb wechseln, so dass sich rote Hemmhöfe ergeben. Diese Hemmhöfe sind mindestens 8 Stunden stabil. Nach Übernachtbebrütung können Hemmhöfe wie auf Mueller-Hinton- Agar abgelesen werden. S. Ercis et al. (2007) fanden vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse des Etests bei Übernachtbebrütung auf Mueller-Hinton-Agar und 4-6 stündiger Bebrütung auf Quicolor Agar.

Automatisierte Analysesysteme

Auch die automatisierten Analysesysteme, Vitek, Phoenix und Microscan, nutzen die synergistische Wirkung von Clavulansäure und Oxyimino-Cephalosporinen. Allerdings müssen entsprechende ESBL-spezifische Karten bzw. Panels verwendet werden, da nur sie Cephalosporine in Kombination mit Clavulansäure enthalten. Werden keine ESBL-spezifischen Karten verwendet, ist nur ein ESBL-Screening bzw. eine präsumptive Identifikation von ESBL auf der Grundlage von Cephalosporin-MHK-Werten möglich.

Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

Etliche Studien haben die Fähigkeit des Vitek Systems, ESBL-Bildung zu erkennen, überprüft. In einigen Studien wurden nicht-ESBL-spezifische Vitek-Karten, die keinen phänotypischen Bestätigungstest beinhalten, untersucht.

In einer Multizenterstudie von Livermore et al. 2002 wurden mit Hilfe der Vitek-Karte AST N-010 126 (92%) von 137 ESBL-bildenden Isolaten erkannt (Livermore et al. 2002). Diese Karte enthält Cefpodoxim, jedoch keine Kombination eines Cephalosporins mit Clavulansäure. Dieselbe Vitek-Karte erreichte in der Studie von Leverstein-van Hall et al. (2002) nur 74% Sensitivität und 85% Spezifität. In dieser Studie wurden insgesamt 74 Stämme untersucht, davon 34 *E. coli*, 26 *K. pneumoniae*, und 14 *K. oxytoca*.

Wiegand et al. (2007) ermittelten für Vitek 2 bei Verwendung nicht speziell für die Detektion von ESBL vorgesehener Karten (ID-GNB und AST-N020) eine Sensitivität von 85,9% und eine Spezifität von 78,0% sowie einen positiven prädikativen Wert von 84,9% und einen negativen prädikativen Wert von 79,3%. Die verwendeten Karten enthielten unter anderem Cefoxitin, Cefotaxim, Ceftazidim, und Cefepim, jedoch keine Kombination eines Cephalosporins mit Clavulansäure.

Nyberg et al. (2008) evaluierten die nicht-ESBL-spezifische Vitek-Karte AST-NO29 anhand von 123 *E. coli* und *Klebsiella* spp., die genotypisch charakterisiert worden waren. Es ergaben sich 96,2% Sensitivität und 66,2% Spezifität.

Donaldson et al. 2008 evaluierten eine neue ebenfalls nicht-ESBL-spezifische Vitek Karte AST N-054 anhand von 137 *E.coli* Isolaten. 73 dieser Isolate waren Angehörige des Stammes A, der CTX-M-15 schwach exprimiert. Von diesen 73 wurden 35 nicht erkannt.

Insgesamt wurden 93 (67,9%) von 137 ESBL-Bildnern als solche erkannt. Die Autoren vermuteten, dass die geringe Sensitivität dadurch zustande kommt, dass diese Vitek-Karte weder Cefpodoxim noch eine Cephalosporin/Clavulansäure Kombination enthält (Donaldson et al. 2008).

Spanu et al. (2006) evaluierten die ESBL-spezifische Vitek-Karte AST-N045 anhand von 1129 *Enterobacteriaceae*-Isolaten verschiedener Spezies. Als Referenz-Methode verwendeten sie PCR-Amplifikation und Sequenzierung von *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaOXY*, *blaPER* sowie AmpC-Genen. Die untersuchte Vitek-Karte enthält Cefepim 1 mg/l, Cefotaxim 0,5 mg/l, und Ceftazidim 0,5 mg/l jeweils einzeln und in Kombination mit Clavulansäure. Es ergaben sich eine Sensitivität von 98,1% und eine Spezifität von 99,7%.

Robin et al. 2008 ermittelten 90,5% Sensitivität und 100% Spezifität für die Vitek-Karte AST-N041, die dieselben Cephalosporine und Cephalosporin/Clavulansäure-Kombinationen wie die AST-N045 Karte enthält. Sie verwendeten 94 ESBL-positive und 71 ESBL-negative *Enterobacteriaceae*. Unter den ESBL-negativen befanden sich auch Isolate, die AmpC oder OXY- Enzyme überexprimierten (Robin et al. 2008).

Thompson et al. (2007) evaluierten die ESBL-spezifische Vitek-Karte AST-GN13 anhand von 76 ESBL-positiven und 26 ESBL-negativen *E. coli*, *K. pneumoniae*, und *K. oxytoca*. Die Isolate wurden so ausgewählt, dass mindestens 38 verschiedene ESBL-Typen vertreten waren.

Unter den ESBL-negativen Isolaten befanden sich einige, die zuvor in phänotypischen Bestätigungstest zu falsch negativen oder falsch positiven Resultaten geführt hatten. Mit der Vitek-Karte AST-GN13 wurden 89% Sensitivität und 85% Spezifität erzielt.

Färber et al. (2008) überprüften drei Vitek-Karten, AST-N062, AST-N041 und die nicht-ESBL-spezifische Karte AST-N020 anhand von 114 Isolaten, darunter 72 *E. coli*, 21 *K. pneumoniae*, 11 *E. cloacae*, 4 *K. oxytoca*, sowie jeweils ein Isolat 6 weiterer Enterobakteriazeen-Spezies. Als Referenz-Methode wählten sie den Etest. Fragwürdige Ergebnisse wurden durch PCR überprüft. Die beiden ESBL-spezifischen Karten, die Ceftazidim, Cefotaxim und Cefepim jeweils mit und ohne Clavulansäure enthalten, erreichten bemerkenswert geringe Spezifität von jeweils nur 50% bei Sensitivitäten von 84,2% bzw. 80,6%. Färber et al. (2008) erklären die Abweichung der Ergebnisse von denen anderer Studien mit dem Einsatz unterschiedlicher Referenzmethoden und

der Tatsache, dass einige andere Studien ausschliesslich *E. coli* und *Klebsiella* spp. untersuchten. In einer früheren Studie (Sorlozano et al. 2005), in der ausschliesslich 399 *E. coli* -Isolate untersucht worden waren, erreichte die nicht-ESBL-spezifische Vitek-Karte AST-N020 100% Sensitivität und 99,3% Spezifität, während diese Karte in der Studie von Färber et al. (2008) nur 78,8% Sensitivität und 55,6% Spezifität erreichen konnte.

ESBL- spezifische Karten (mit Cephalosporin/Clavulansäure-Kombination)				Nicht ESBL- spezifische Karten (ohne Cephalosporin/Clavulansäure-Kombination)			
Autoren	Vitek-Karte	Sensitivität	Spezifität	Autoren	Vitek-Karte	Sensitivität	Spezifität
Spanu et al. 2006	AST-N045	98,1%	99,7%	Donaldson et al. 2008	AST-N054	67,9%	Keine Angabe
Robin et al. 2008	AST-N041	90,5%	100%	Livermore et al. 2002	AST-N010	92%	Keine Angabe
Färber et al. 2008	AST-N041	84,2%	50,0%	Leverstein-van Hall et al. 2002	AST-N010	74%	85%
Färber et al. 2008	AST-N062	80,6%	50,0%	Wiegand et al. 2007	AST-N020	85,9%	78%
Thompson et al. 2007	AST-GN13	89%	85%	Färber et al. 2008	AST-N020	78,8%	55,6%
				Sorlozano et al. 2005	AST-N020	100%	99,3%
				Nyberg et al. 2008	AST-N029	96,2%	66,2%

Tabelle 5: Sensitivität und Spezifität verschiedener Vitek-Karten in Studien zur ESBL-Detektion

Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD)

In der Studie von Färber et al. 2008 wurde neben dem Vitek-System auch das Phoenix-System mit den Panels NMIC/ID-50 und NMIC/ID-70 evaluiert. Beide Panels enthalten als ESBL-Bestätigungstest Cefpodoxim, Ceftazidim, Ceftazidim/Clavulansäure, Cefotaxim/Clavulansäure, und Ceftriaxon/Clavulansäure, ausserdem Cefepim. Das NMIC/ID-70 Panel enthält zusätzlich Cefoxitin. Des weiteren unterscheiden sich die beiden Panels darin, welche MHK-Werte im Messbereich liegen. Für alle untersuchten Stämme erreichte NMIC/ID-50 77,1% Sensitivität und 61,5% Spezifität, NMIC/ID-70 erreichte 84,2% Sensitivität und 75,0% Spezifität. Damit wies Phoenix mit NMIC/ID-70 deutlich höhere Spezifität auf als die in derselben Studie untersuchten Vitek-Karten (Färber et al. 2008). Wiegand et al. (2007) evaluierten das Phoenix-System

ebenfalls unter Einsatz eines Panels, das Cefpodoxim und Ceftazidim sowie Ceftazidim/Clavulansäure, Cefotaxim/Clavulansäure, Ceftriaxon/Clavulansäure enthält (Phoenix GN Combo Panel 448541). Anhand von 144 *Enterobacteriaceae*-Isolaten, die auch molekular charakterisiert wurden, ermittelten Wiegand et al. (2007) 98,8% Sensitivität und 52,2% Spezifität. Die geringe Spezifität erklären die Autoren mit der Unfähigkeit des Phoenix-Systems, zwischen ESBL-bildenden *K. oxytoca* und K1- β -Laktamase überexprimierenden *K. oxytoca* zu unterscheiden sowie mit unzureichender Differenzierung zwischen AmpC und ESBL. Für die 14 untersuchten *K. oxytoca*-Isolate erreichte Phoenix zwar 100% Sensitivität, jedoch betrug die Spezifität der ESBL-Detektion 0%. Für die 28 untersuchten *Enterobacter*-, *Citrobacter*-, und *Serratia* spp.-Isolate ergab sich eine Spezifität von 33,3% bei 90,0% Sensitivität. ESBL-negative Isolate, die AmpC- β -Laktamasen produzierten, konnten nicht zuverlässig erkannt werden.

Die Problematik der Differenzierung von ESBL und K1- β -Laktamasen bei *K. oxytoca* wurde zuvor von Stürenburg et al. 2003 beschrieben. Sie evaluierten das Phoenix-System mit dem NMIC/ID-6 Combo Panel anhand 34 ESBL-positiver *E. coli* und *Klebsiella* spp., sowie anhand 8 ESBL-negativer.

K. oxytoca, die die K1- β -Laktamase exprimierten. Das hier verwendete Phoenix-Panel enthält anders als das von Wiegand et al. verwendete Panel keine Cephalosporin/Clavulansäure-Kombination. Mit diesem Panel wurden 7 der 8 *K. oxytoca* Isolate fälschlich als ESBL-Bildner identifiziert. Als mögliche Erklärung wird von den Autoren angeführt, dass der ESBL-Test-Algorithmus durch Wachstum in Gegenwart von 1 mg/l Cefpodoxim ausgelöst wird. Die K1 exprimierenden Isolate wiesen jedoch MHK-Werte von ≥ 2 mg/l für Cefpodoxim auf. Die Autoren vermuten, dass das Problem nicht auftreten würde, wenn im ESBL-Test-Algorithmus Ceftazidim an die Stelle von Cefpodoxim treten würde (Stürenburg et al. 2003).

Thomson et al. (2007) ermittelten für das Phoenix Panel NMIC/ID-108 96% Sensitivität und 81% Spezifität. Unter den insgesamt 102 in dieser Studie untersuchten *E. coli* und *Klebsiella* spp. Stämmen befanden sich 26 ESBL-negative, die verschiedene andere β -Laktamasen exprimierten (TEM-1, TEM-2, SHV-1, LEN-1, K1, OXA-3, OXA-4, OXA-5, OXA-6, KPC-2 sowie fünf AmpC- β -Laktamasen). Unter diesen Stämmen befanden sich auch einige mit Porinmutationen. Zwei K1 hyperproduzierende *K. oxytoca*-Isolate wurden fälschlich als ESBL-positiv bezeichnet. Wieviele K1-bildende *K. oxytoca* insgesamt untersucht wurden, geben die Autoren nicht an. Die Autoren heben hervor, dass Phoenix bei Isolaten, die mehrere

β -Laktamasen produzierten, bessere Ergebnisse erzielte als Vitek. Beispielsweise erkannte Phoenix ESBL-Bildung bei einem *K. pneumoniae*-Isolat, das noch drei weitere β -Laktamasen, darunter auch AmpC, exprimierte.

In einer koreanischen Studie (Park et al. 2007) wurde das Phoenix Panel NMIC/ID 107 anhand von 72 ESBL-positiven und 77 ESBL-negativen Isolaten von *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii* und *Serratia marcescens* evaluiert. Nur 15 der 72 ESBL-Bildner wurden als solche erkannt (20,8% Sensitivität). Hingegen wurden 76 von 77 ESBL-negativen Isolaten als ESBL-negativ ausgewiesen (98,7% Spezifität). Da nur 14 der 72 ESBL-positiven Isolate Piperacillin-Tazobactam-sensibel waren, vermuten die Autoren, dass die meisten ESBL-Bildner auch AmpC stark exprimierten. Die ESBL wurden auch molekularbiologisch charakterisiert, molekulare Untersuchungen auf AmpC wurden jedoch nicht durchgeführt. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen einer Studie von Sanguinetti et al. 2003. In dieser Studie wurden insgesamt 510 Enterobakteriazeen-Stämme mit dem Phoenix-ESBL-Bestätigungstest untersucht, darunter befanden sich neben 88 *E. coli* und 158 *K. pneumoniae* auch 44 *E. aerogenes*, 23 *E. cloacae*, 6 *S. marcescens* und 21 *C. freundii*, auch unter Einschluss dieser Stämme ergaben sich 100% Sensitivität und 98,9% Spezifität. PCR und Sequenzierung von ESBL und AmpC -Genen wurden als Referenz-Methode durchgeführt (Sanguinetti et al. 2003). Menozzi et al. (2006) evaluierten den Phoenix ESBL-Bestätigungstest anhand von insgesamt 203 *E. coli*-, *K. pneumoniae*-, und *K. oxytoca*- Stämmen, darunter 147 klinische Isolate aus Heidelberg und Parma. Zusätzlich wurden 56 Stammkulturen mit ausgewählten β -Laktamasen untersucht. Als Referenz-Methode diente der Bouillonmikrodilutionstest. Das Phoenix-System erreichte 98,0% Sensitivität und 98,7% Spezifität.

ESBL- spezifische Karten (mit Cephalosporin/Clavulansäure-Kombination)				Nicht ESBL- spezifische Karten (ohne Cephalosporin/Clavulansäure-Kombination)			
Autoren	Phoenix-Panel	Sensitivität	Spezifität	Autoren	Phoenix-Panel	Sensitivität	Spezifität
Thompson et al. 2007	NMIC/ID-108	96%	81%	Stürenburg et al. 2003	NMIC/ID-6	100%	Keine Angabe
Färber et al. 2008	NMIC/ID-50	77,1%	61,5%				
Färber et al. 2008	NMIC/ID-70	84,2%	75,0%				
Wiegand et al. 2007	Phoenix GN Combo Panel 448541	98,8%	52,2%				
Park et al. 2007	NMIC/ID 107	20,8%	98,7%				

Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität verschiedener Phoenix- Panels in Studien zur ESBL-Detektion

MicroScan (Dade Behring)

Das MicroScan WalkAway-96 System ermöglicht die automatisierte Durchführung und Interpretation von Bouillonmikrodilutionstests.

Stürenburg et al. 2004 untersuchten die Fähigkeit des MicroScan-ESBL-plus panels, Resistenzmechanismen wie AmpC- und K1- Überexpression von ESBL zu unterscheiden anhand von 57 ESBL-positiven und 30 ESBL-negativen Isolaten verschiedener Spezies. Das MicroScan-ESBL-plus panel enthielt Ceftazidim und Cefotaxim jeweils allein und mit Clavulansäure, ausserdem Cefepim, Cefotetan, Cefoxitin sowie 6 weitere β -Laktame.

Insgesamt ergaben sich 88% Sensitivität und 76,7% Spezifität. Als Referenzverfahren wurden PCR und Sequenzierung von ESBL-Genen und AmpC-Genen durchgeführt. Andere Resistenzmechanismen wurden nicht molekular, sondern aufgrund des Antibiogramms identifiziert. Falsch negative Ergebnisse entstanden für *Enterobacter* spp., aufgrund simultaner Expression von AmpC und ESBL. Falsch positive Ergebnisse traten bei drei *E. coli*-Stämmen mit plasmid-kodierten AmpC und bei zwei K1-hyperproduzierenden *K. oxytoca* sowie bei *Acinetobacter* species auf (Stürenburg et al. 2004a).

Wiegand et al. (2007) evaluierten das MicroScan-System mit einem nicht spezifisch zur ESBL-Detektion konfigurierten Panel, das Cefpodoxim (4 mg/l) und Ceftazidim (1 mg/l) sowie Ceftriaxon, Cefotaxim und Aztreonam enthält. Das automatisierte ESBL-Screening mit dem

MicroScan-System ist auf *E. coli*, *K. pneumoniae*, und *K. oxytoca* beschränkt, da die Software sich an CLSI-Richtlinien orientiert. Für die insgesamt 104 untersuchten *E. coli*-, *K. oxytoca*- und *K. pneumoniae*- Stämme ergab sich insgesamt eine Sensitivität von 98,6% und eine Spezifität von 51,5%. Für die 14 *K. oxytoca*-Isolate allein betrug die Sensitivität 100%, die Spezifität jedoch nur 11,1%. Das MicroScan-System war wie auch das Phoenix-System nicht in der Lage, zuverlässig zwischen K1 -Hyperproduktion und ESBL zu differenzieren.

4.11.2. Genotypische Methoden zur Detektion von ESBL

Genotypische Verfahren ermöglichen die Differenzierung verschiedener ESBL-Klassen und einzelner Subtypen. Da sie nicht auf bakterielles Wachstum angewiesen sind, sind sie schneller durchführbar als phänotypische Tests und werden im Gegensatz zu phänotypischen Tests nicht durch das Vorliegen mehrerer Resistenzmechanismen gestört. Trotz dieser potentiellen Vorteile hat sich jedoch bisher noch kein genotypisches Verfahren als für die mikrobiologische Routinediagnostik geeignet erwiesen.

PCR- Amplifikation und Sequenzierung von ESBL-Genen gelten als Goldstandard für die genotypische Identifikation aller ESBL. Kosten und Arbeitsaufwand dieses Verfahrens erscheinen allerdings für die Routine-Diagnostik zu hoch. Verschiedene andere molekulare Verfahren ohne Sequenzierungsschritt sind beschrieben worden. Auch diese Verfahren beinhalten als ersten Schritt meist eine PCR. Zu diesen Verfahren gehören PCR mit anschließendem Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP, Arlet et al. 1995), PCR mit Einzelstrang-Polymorphismus (M'Zali et al. 1996), Real-time PCR (Randegger und Hachler 2001) und Restriction site insertion PCR (Chanawong et al. 2001), ausserdem DNA Microarrays (Grimm et al. 2004; Lee et al. 2002) und Ligase- Kettenreaktion (LCR, Kim und Lee 2000). Die große Zahl von ESBL-Subtypen begrenzt den Nutzen dieser Verfahren, die ohnehin jeweils nur einen kleinen Teil der klinisch relevanten ESBL-Typen abdecken. So beschränkt sich beispielsweise der von Grimm et al. 2004 beschriebene DNA Microarray auf TEM Varianten.

Insbesondere ESBL der TEM und der SHV Klassen genotypisch von ihren weit verbreiteten Vorläufern TEM1, TEM2 und SHV1 zu unterscheiden, ist ohne Sequenzierung schwierig, da sich die ESBL von ihren in der Evolution entstandenen Vorläufern zum Teil nur durch Punktmutationen unterscheiden (Pitout und Laupland 2008).

Ein auf Pyrosequenzierung beruhendes Verfahren, das es ermöglicht, einzelne TEM und SHV-ESBL-Varianten innerhalb von drei Stunden, genotypisch zu identifizieren, ist vor kurzem

beschrieben worden (Jones et al. 2009). Mit Hilfe des single nucleotide polymorphism (SNP) protocol werden kurze für die Ausbildung eines ESBL-Phänotyps entscheidende Abschnitte der *bla*TEM und *bla*SHV- Gene untersucht. Dies ermöglicht die Abgrenzung von Nicht-ESBL-Varianten der *bla*TEM und *bla*SHV Gene. Die Autoren betonen, dass sich die Methode zur Untersuchung von Isolaten mit multiplen Allelen der *bla*TEM und *bla*SHV Gene eignet. Dieses Verfahren soll es ermöglichen, 86 von 160 bekannten TEM- Varianten und 49 von 115 bekannten SHV Varianten zu erkennen.

Da die Vorläufer der CTX-M ESBL, chromosomale β -Laktamasen von *Kluyvera* spp., klinisch kaum eine Rolle spielen, kann der Nachweis CTX-M spezifischer DNA-Sequenzen meist als ausreichender Nachweis für das Vorhandensein von Enzymen aus der Klasse der CTX-M- ESBL angesehen werden. Dementsprechend sind mehrere Verfahren beschrieben worden, die sich auf die Detektion von *bla*CTX-M- Genen beschränken. Woodford et al. (2006) beschreiben eine Multiplex-PCR, die es ermöglicht CTX-M-Gene zu detektieren und einer der fünf phylogenetischen CTX-M-Gruppen zuzuordnen.

Ensor et al. (2007) beschreiben einen Reverse-line hybridization assay, mit dessen Hilfe nicht nur eine Zuordnung zu phylogenetischen Gruppen, sondern die Identifikation einzelner CTX-M Subtypen möglich ist. Das Verfahren eignet sich nach den Angaben der Autoren für epidemiologische Zwecke. Eine Rolle in der klinischen Diagnostik sehen sie nicht.

Xu et al. (2007) beschreiben die Anwendung der denaturierenden high-performance liquid chromatography (dHPLC) als Möglichkeit zur Detektion einzelner CTX-M Genotypen.

Bei dieser Methode erfolgt zuerst eine PCR- Amplifikation der gesuchten Sequenzen. Die PCR-Produkte werden dann mit Referenz DNA-Amplifikaten hybridisiert. Die so entstandene Heteroduplex-DNA wird durch die dHPLC analysiert, mit der die *bla*CTX-M -Allele einer der fünf phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden können.

Naas et al. (2007) entwickelten eine andere Methode zur genotypischen Detektion von CTX-M-ESBL. Auch bei dieser Methode erfolgt im ersten Schritt eine PCR-Amplifikation mit *bla*CTX-M-spezifischen Primeren. Durch anschließende Pyrosequenzierung von 29 Basenpaaren werden die fünf phylogenetischen CTX-M-Gruppen unterschieden. Diese fünf Gruppen werden dabei in weitere Subgruppen unterteilt. Da bis zu 96 Isolate in weniger als drei Stunden untersucht werden können, betrachten die Autoren die Methode als für die Routine-Diagnostik nützlich.

Birkett et al. (2007) beschreiben eine neue multiplex PCR Methode, die durch Einsatz CTX-M-Gruppen spezifischer TaqMan-Sonden die Identifikation der CTX-M-Gruppen CTX-M-1, CTX-M-2 und CTX-M-9 ohne DNA-Sequenzierung ermöglicht.

Pitout et al. (2007) beschreiben eine duplex PCR, die sich zur gruppenspezifischen Detektion von *bla*CTX-M- β -Laktamase-Genen in Routinelaboratorien eignet.

Keines der genannten Verfahren wird bisher vermarktet.

Ein System, das zur molekularen Detektion aller klinisch relevanten ESBL dienen soll, wird von BAG Health Care angeboten, nämlich das *hyplex*[®] ESBL-ID Multiplex-PCR-ELISA-System. Das System besteht aus einer multiplex PCR, für die markierte Primer verwendet werden, und Hybridisierungsmodulen. Die PCR-Produkte werden mit Oligonukleotidsonden hybridisiert, die auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert sind. Da die gebundenen PCR-Produkte markiert sind, können sie nach dem ELISA-Prinzip detektiert werden.

Laut Hersteller können damit alle Varianten der Gene *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M (mit Ausnahme von CTX-M-8) und die ESBL-Phänotyp relevanten Varianten von *bla*OXA in einer einzigen Reaktion aus Patientenmaterial nachgewiesen werden. Proben, die ein positives Signal mit der CTX-M-spezifischen Sonde zeigen, sind laut Hersteller als eindeutig ESBL-positiv zu bewerten. Proben, die mit dem Testsystem negativ getestet werden, sollen keine *Enterobacteriaceae* mit dem genetischen Potential zur Ausbildung eines ESBL-Phänotyps enthalten. Eine Schwäche des Systems ist, dass alle *bla*TEM und *bla*SHV Gene detektiert werden, ohne die ESBL-Varianten dieser Gene von den älteren TEM-1,-2 und SHV-1 β -Laktamasen zu differenzieren.

Al Naiemi et al. (2008) evaluierten *hyplex*[®] ESBL-ID an 149 Stammkulturen der *Enterobacteriaceae* und ermittelten 98% Sensitivität und 57% Spezifität. Die geringe Spezifität erklären die Autoren mit dem hohen Anteil TEM-1 produzierender *E. coli* unter den untersuchten Isolaten.

4.12. Therapie von Infektionen durch ESBL-bildende Bakterien

Die Carbapeneme gelten nach wie vor als Mittel der Wahl zur Therapie von Infektionen mit ESBL-positiven Bakterien, da sie gegenüber allen β -Laktamasen gramnegativer Bakterien, ausser den Carbapenemasen, stabil sind. Auch in den vorhandenen klinischen Therapiestudien wurden mit Carbapenemen jeweils die günstigsten Verläufe beobachtet (Rodriguez-Bano und Pascual 2008). Allerdings werden Alternativen zu den Carbapenemen benötigt, da diese relativ teuer sind

und nicht per os verabreicht werden können und vor allem, weil vermehrtes Auftreten von Carbapenem-Resistenzen zu befürchten ist. Carbapenem-Resistenz durch die Kombination von Porinverlust und ESBL ist bereits in Deutschland aufgetreten (Burak et al. 2006). Carbapenemasen könnten sich rasch ausbreiten, da z.B. das *blaKPC*-Gen plasmid-kodiert bei verschiedenen Bakterienspezies innerhalb der *Enterobacteriaceae* auftritt (Marschall et al. 2009).

Vier Carbapeneme stehen derzeit zur Verfügung: Imipenem, Meropenem, Ertapenem und Doripenem. Ertapenem unterscheidet sich von den anderen Carbapenemen in einigen Eigenschaften. Da es eine längere Halbwertszeit besitzt, genügt eine Ertapenem-Infusion pro Tag. Allerdings ist Ertapenem nicht aktiv gegen *P. aeruginosa* und *Acinetobacter* spp.. Dies ermöglicht die Therapie von ESBL-Infektionen, ohne Selektionsdruck auf Nonfermenter auszuüben.

Ein Nachteil des Ertapenems ist, dass es von der Resistenz durch Porinverlust und β -Laktamase-Expression stärker betroffen ist als Imipenem und Meropenem (Jacoby et al. 2004; Martinez-Martinez 2008; Lartigue et al. 2007).

Cephalosporine sind für die empirische Therapie von Infektionen durch ESBL-bildende Bakterien nicht geeignet, da die MHK-Werte, auch für Cefepim, häufig so hoch sind, dass eindeutig Resistenz vorliegt (Rodriguez-Bano und Pascual 2008). Nicht vollkommen eindeutig ist die Situation, wenn ESBL-Bildner für bestimmte Cephalosporine niedrige MHK-Werte ($\leq 1\text{mg/l}$) aufweisen. Pharmakodynamische Studien an Tiermodellen weisen daraufhin, dass auch ESBL-Infektionen erfolgreich mit Cephalosporinen behandelt werden können, wenn die Konzentration des Antibiotikums 50% der Zeit zwischen zwei Applikationsintervallen über der MHK gehalten werden kann (Andes und Craig 2005; MacGowan 2008). Problematisch ist diesbezüglich, dass bei Infektionen mit hoher Bakterienkonzentration am Infektionsort möglicherweise der Inokulum-Effekt dazu führt, dass die MHK am Infektionsort höher ist als unter diagnostischen Standardbedingungen (Thomson und Moland 2001).

Obwohl ESBL durch β -Laktamaseinhibitoren inaktiviert werden, ist Resistenz gegenüber den gebräuchlichen β -Laktam/ β -Laktamaseinhibitor-Kombinationen unter ESBL-positiven Bakterien weit verbreitet (Sader et al. 2007). Manche Autoren befürworten den Einsatz von Piperacillin/Tazobactam gegen ESBL-bildende *E. coli* und *Klebsiella* spp., wenn diese als sensibel getestet wurden, auch bei schweren Infektionen (Peterson 2008).

Auch gegen Fluorchinolone sind ESBL- bildende Bakterien sehr häufig resistent, insbesondere ambulant erworbene CTX-M-bildende *E. coli*. Vorhergehende Behandlung mit Fluorchinolonen ist in mehreren Studien als Risikofaktor für Infektionen mit ESBL-bildenden *E. coli* identifiziert worden (Rodriguez-Bano und Pascual 2008).

Aminoglycosid-Resistenzdeterminanten sind häufig auf denselben Plasmiden kodiert wie ESBL (Giamarellou 2005). Die Resistenz ist jedoch nicht für alle Aminoglycoside gleich häufig, und ausserdem scheint es regionale Unterschiede in der Verbreitung der Aminoglycosid-Resistenz zu geben. In der Studie von Paterson et al. 2004 waren 70,8% der *K. pneumoniae* Stämme unempfindlich gegenüber Gentamicin (Paterson et al. 2004a). In einer spanischen Studie zeigten 67% der *K. pneumoniae* - und 34% der *E. coli* -Isolate Resistenz gegen Gentamicin, jedoch waren über 90% dieser Isolate Amikacin-sensibel (Hernandez et al. 2005). In einer taiwanesischen Studie erwiesen sich hingegen 43,4% von 235 *K. pneumoniae*- Stämmen als Amikacin- resistent (Ma et al. 2009).

In Regionen, in denen Amikacin-Resistenz selten ist, könnte Amikacin in Kombination mit β -Laktamen bei der Behandlung weniger schwerer Infektionen eine Rolle spielen.

Temocillin, ein Schmalspektrum-Penicillin ohne Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, *P.aeruginosa* und Anaerobier, wurde 1984 in Deutschland eingeführt. Da es sich gegenüber anderen β -Laktamen nicht durchsetzen konnte, wurde es in Deutschland jedoch wieder vom Markt genommen, während es in Belgien weiter eingesetzt wird. Temocillin ist stabil gegenüber allen ESBL mit hoher Prävalenz und gegenüber AmpC- β -Laktamasen. Es weist vermutlich günstige ökologische Eigenschaften auf. Klinische Studien zum Einsatz von Temocillin bei Infektionen durch ESBL-bildende *E. coli* und *Klebsiella* spp. fehlen jedoch. Auf der Grundlage pharmakologischer Modelle wurde vor kurzem ein MHK-Grenzwert von 8 mg/l für systemische Infektionen und 32 mg/l für unkomplizierte Harnwegsinfektionen vorgeschlagen (Andrews 2008). Aufgrund seiner Stabilität in Lösung eignet sich Temocillin für Langzeitinfusionen. Ausserdem können möglicherweise höhere Dosierungen als die bisher zugelassenen 4 g pro Tag eingesetzt werden. Dies könnte eine Erhöhung des MHK-Grenzwerts ermöglichen (Livermore und Tulkens 2009).

Colistin (Polymyxin E), ein seit den 1950er Jahren bekanntes zyklisches Polypeptidantibiotikum, das wegen seiner Neuro- und Nephrotoxizität nur noch als Lokalantibiotikum eingesetzt wurde, kommt als Reserveantibiotikum im Einsatz gegen Carbapenem-resistente ESBL-Bildner in Betracht (Endimiani und Paterson 2007; Giamarellou 2006). Tigecyclin stellt eine weitere

Alternative zur Behandlung systemischer Infektionen durch ESBL-positive Erreger dar (Livermore 2005). Die In-vitro-Sensibilität ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* ist mehrfach nachgewiesen worden (Morosini et al. 2006; Slover et al. 2007). Klinische Studien zur Behandlung von Infektionen durch ESBL-Bildner mit Tigecyclin wurden bisher noch nicht vorgelegt (Rodriguez-Bano und Pascual 2008). Tigecyclin erreicht hohe Konzentration in Geweben, jedoch nur geringe Serumkonzentrationen von 0,4 bis 0,6 mg/l (Rodvold et al. 2006), wobei der EUCAST- Breakpoint bei 1 mg/l liegt. Dies spricht gegen den Einsatz von Tigecyclin bei intravaskulären Infektionen (Curcio 2008a).

Außerdem erscheint Tigecyclin zur Behandlung von Harnwegsinfektionen ungeeignet, da es nur geringe Urinkonzentrationen erreicht (Curcio 2008b). Aufgrund der nur bakteriostatischen Wirkung und der Ähnlichkeit zu Minocyclin ist eine rasche Resistenzentwicklung gegen Tigecyclin zu befürchten (Reid 2007).

Cephamicine sind in vitro wirksam gegenüber ESBL-Bildnern. Sie sind jedoch, im Gegensatz zu den Carbapenemen und Temocillin, nicht stabil gegenüber AmpC- β -Laktamasen. Über Selektion von Cephamicin-resistenten *K. pneumoniae* während der Therapie mit Cefotetan sowie während der Therapie mit Flomoxef ist berichtet worden. In beiden Fällen kam es unter der Therapie zu Porinverlust und zum Erwerb plasmid-kodierter AmpC- β -Laktamasen; dies führte zu Cephamicin- und Carbapenem- Resistenz (Lee et al. 2007; Bradford et al. 1997).

Fosfomycin wird von einigen Autoren für die Behandlung von unkomplizierten Harnwegsinfektionen durch ESBL-bildende *E. coli* empfohlen (Rodriguez-Bano und Pascual 2008). In einer spanischen Untersuchung (de Cueto et al. 2006) zeigte Fosfomycin auch gegenüber ESBL-bildenden *K. pneumoniae* hohe In-Vitro-Aktivität.

5. Material und Methoden

5.1. Untersuchte Bakterienkulturen

Untersucht wurden 274 ESBL-positive Stammkulturen, die im Zeitraum von Juni 2004 bis November 2006 isoliert wurden. Hierbei handelte es sich um 159 *E. coli*-, 88 *K. pneumoniae* -und 27 *K. oxytoca*-Stämme. Die meisten Isolate stammen von Patienten aus dem Universitätsklinikum Bonn, die übrigen aus dem Evangelischen Waldkrankenhaus in Bonn-Bad Godesberg, dem Johanniter-Krankenhaus und dem St.Marienhospital in Bonn. Die unterschiedlichen Stämme wurden vorwiegend aus Proben von Urin, Wunden, Sekreten, Blutkulturen und Punktaten gewonnen (Distelmaier 2008). Diese Stämme werden nachfolgend als ESBL-Stammsammlung bezeichnet.

Als Negativkontrollen wurden 167 Bakterienstämme aus der Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie der Universität Bonn mit Micronaut-S-ESBL untersucht. 154 dieser Stämme waren durch die Routinediagnostik als ESBL-negativ identifiziert worden. Es handelte sich fast ausschliesslich um gramnegative Bakterien, die im Winter 2006 zufällig ausgewählt worden waren. Die Spezies-Verteilung zeigt Tabelle 7.

Spezies:	Anzahl Stämme:
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17
<i>Citrobacter freundii</i>	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	27
<i>Escherichia coli</i>	58
<i>Hafnia alvei</i>	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
<i>Morganella morganii</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5
Summe:	167

Tabelle 7: Spezies der unausgewählten Isolate aus der Routine-Diagnostik, die als Negativkontrollen für den ESBL-Nachweis mit Micronaut-S-ESBL verwendet wurden.

5.2. Speziesidentifizierung und Nachweis der ESBL-Bildung

Die Speziesidentifizierung und die Untersuchung auf ESBL-Bildung der in dieser Arbeit verwendeten Isolate wurden in den Varia-Laboratorien des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie der Universität Bonn unter der Leitung von Privatdozent Dr. Marklein durchgeführt.

Das zur bakteriologischen und mykologischen Untersuchung aus den verschiedenen Klinikbereichen eingesandte menschliche Untersuchungsmaterial wurde mit den laborüblichen Standardverfahren untersucht. Zur An- und Weiterzüchtung der Bakterienkulturen dienten handelsübliche Fertigplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) sowie Trockenmedien zur Herstellung der jeweiligen Kultursubstrate (Becton Dickinson, Heidelberg; Oxoid, Wesel). Bei Nachweis von *Enterobacteriaceae*, z.B. auf MacConkey-Agar, wurde ein semiquantitativer Agardiffusionstest nach DIN 58940 auf Mueller-Hinton-Agar-Fertigplatten (Becton Dickinson,

Heidelberg) zur Ermittlung der Antibiotikasensibilität unter Einsatz handelsüblicher Antibiotika-Testscheiben (Oxoid, Wesel) angelegt. Bei der Auswertung dieser Testansätze ergab sich der Verdacht auf ESBL-Bildung, wenn in diesem Test eine Resistenz oder intermediäre Sensibilität gegenüber Ceftazidim und/oder Cefotaxim auftrat (Cephalosporine der sog. 3. Generation), bei gleichzeitiger Sensibilität gegenüber Cefoxitin und Resistenz gegenüber Cefpodoxim. Hierbei bestand Resistenz im Falle von Cefotaxim bei Hemmhofdurchmessern von ≤ 27 mm und für Ceftazidim von ≤ 22 mm. Bei einem solchen Verdacht erfolgte der ESBL-Bestätigungstest durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) auf Mueller-Hinton-Agar im Etest (AB Biodisk, Solna, Schweden). Hierbei wurden Cefotaxim und Ceftazidim jeweils mit und ohne Clavulansäure geprüft. Die Auswertung des Tests erfolgte nach Inkubation bei 35° C über 18 - 24 Stunden. Die ESBL-Bildung galt als nachgewiesen, wenn in Anwesenheit von Clavulansäure der MHK-Wert um einen Faktor ≥ 8 (entsprechend ≥ 3 Titerstufen innerhalb der geometrischen Konzentrationsverdünnungsreihe) gesenkt wurde.

5.3. Verwendete Testverfahren

Die 274 ESBL-positiven Bakterienstämme wurden mit zwei Testverfahren untersucht, um zum einen ihre minimalen Hemmkonzentrationen gegenüber einer Auswahl klinisch wichtiger Antibiotika und Chemotherapeutika zu ermitteln und um zum anderen in einem einfachen Testverfahren dessen Eignung zur schnellen und sicheren Erfassung der ESBL-Bildung zu prüfen. Hersteller beider Testverfahren ist Merlin Diagnostika GmbH, Kleinstrasse 14, 53332 Bornheim-Hersel.

1. Micronaut-S-MHK (Merlin Bornheim Referenznr. ES-233-100) zur Antibiotikaempfindlichkeitsbestimmung. Die nach DIN 58940 zur Qualitätssicherung festgelegten und laborüblichen Referenzstämme *Escherichia coli* ATCC 25922 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 wurden einmal wöchentlich zur Qualitätskontrolle bei der Durchführung der Micronaut-S-MHK-Bestimmung mitgeführt.

2. Micronaut-S-ESBL (Merlin Bornheim Referenznr. ES-232-800) zum phänotypischen Nachweis der ESBL-Produktion. Der Micronaut-S-ESBL (Abbildung 3) wurde in zwei Varianten durchgeführt.

-Variante (a) : Übernacht-Inkubation. In dieser Variante wurde das vom Hersteller empfohlene Standard-Inokulum bei einer Bebrütungszeit von 18-24 Stunden verwendet.

-Variante (b) : Schnelltest. In dieser Variante wurde ein im Vergleich mit dem Standard-Inokulum fünffach höher konzentriertes Inokulum verwendet und das Ergebnis bereits nach 6 h Inkubation bei 36°C abgelesen.

(Bei der Untersuchung mit Micronaut-S-ESBL fehlen die Ergebnisse von drei Isolaten, nämlich je einem Stamm von *E. coli*, *K. pneumoniae* und *K. oxytoca*).

Bei beiden Testverfahren, Micronaut-S-ESBL und Micronaut-S-MHK, handelt es sich um Bouillon-Mikrodilutionstests nach DIN 58940. Bei Bouillondilutionstests wird grundsätzlich anhand der Trübung der Kulturflüssigkeit bestimmt, bis zu welcher Konzentration des Antibiotikums noch Wachstum des eingepflichten Bakterienstamms feststellbar ist. Bei den Micronaut Mikrodilutionstests wird die bereits mit dem jeweiligen Bakterienstamm beimpfte Bouillon in die Kavitäten einer Kunststoffplatte pipettiert, und zwar 100 µl Volumen jeweils.

In den Kavitäten befindet sich der zu prüfende Wirkstoff in getrockneter Form, der durch Zugabe der Bakteriensuspension rehydriert wird. Für den Micronaut-S-ESBL sowie für den Micronaut-S-MHK werden Kunststoffplatten mit 8 mal 12 Kavitäten verwendet. Jeweils 12 Kavitäten sind in einer Zeile angeordnet, wobei die erste Kavität jeder Zeile kein Antibiotikum enthält, sie dient zur Wachstumskontrolle. Beim Micronaut-S-MHK befindet sich in der zweiten bis zwölften Kavität einer Zeile jeweils ein Antibiotikum, wobei die Wirkstoffkonzentration sich von einer Kavität zur nächsten jeweils verdoppelt. Durch Zugabe von 100 µl Bakteriensuspension pro Kavität ergibt sich eine geometrische Verdünnungsreihe mit um den Faktor zwei ansteigender Konzentration des Antibiotikums. Beim Micronaut-S-ESBL befindet sich in der zweiten bis sechsten Kavität eine Menge an Clavulansäure, die bei Zugabe von 100 µl Bakteriensuspension eine konstante Konzentration von 4 mg/l Clavulansäure ergibt. Ausserdem befindet sich in diesen Kavitäten Cefpodoxim-Proxetil in um den Faktor zwei ansteigender Konzentration, so dass sich nach Zugabe der Kulturflüssigkeit eine ansteigende Konzentration, beginnend mit 0,25 mg/l Cefpodoxim-Proxetil in der zweiten Kavität und endend in der sechsten Kavität mit 4 mg/l Cefpodoxim-Proxetil, ergibt. In der siebten bis zwölften Kavität befindet sich ausschliesslich Cefpodoxim-Proxetil in einer Menge, die so ansteigt, dass sich eine geometrische Verdünnungsreihe von 1 mg/l bis 32 mg/l ansteigend um den Faktor zwei ergibt. Alle Kavitäten enthalten den Redoxindikator Resazurin, der bei bakteriellem Wachstum einen Farbumschlag von Blau nach Rosa bewirkt.

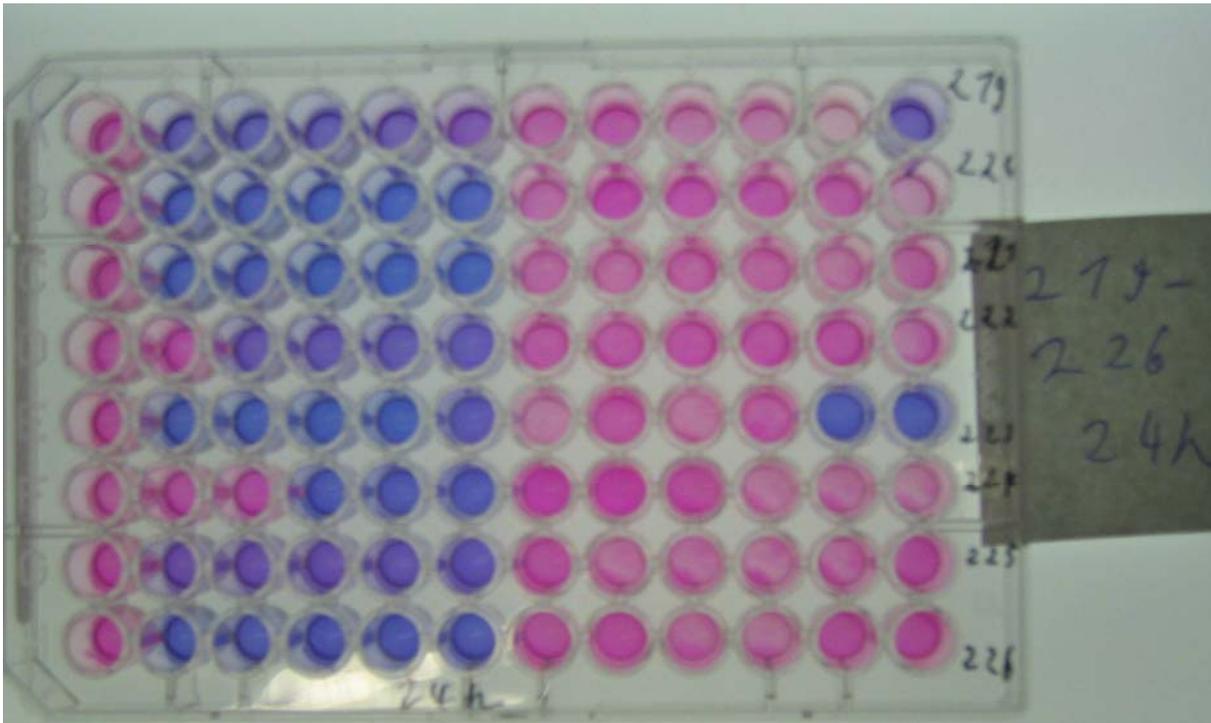


Abbildung 3: Micronaut-S-ESBL mit 8 ESBL-positiven Isolaten nach 24 Stunden Bebrütung. Farbumschlag von Blau nach Rosa zeigt Bakterienwachstum an. Die erste Kavität jeder Zeile (links im Bild) enthält nur Nährmedium, die zweite bis sechste Cefpodoxim in geometrischer Verdünnungsreihe von 0,25 mg/l bis 4 mg/l und Clavulansäure konstant 4 mg/l, die siebte bis zwölfte Kavität enthält Cefpodoxim in geometrischer Verdünnungsreihe von 1 mg/l bis 32 mg/l.

Testdurchführung:

Micronaut-S-MHK:

Mehrere einzeln liegende Kolonien einer 18-24 Stunden alten Reinkultur auf Blutagar (ohne Zusatz) wurden in ein Röhrchen mit 5 ml NaCl 0,9% pH 5,5-6,5 mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers verbracht. So wurde eine Suspension mit McFarland Standard von 0,5 hergestellt. 50 µl dieser Bakteriensuspension wurden in 11 ml Mueller-Hinton II Bouillon pipettiert und homogenisiert. Jeweils 100 µl davon wurden in die Kavitäten der Mikrotitrationsplatten pipettiert. Die Mikrotitrationsplatten wurden mit unperforierter Abklebefolie verschlossen und 18-24 Stunden bei 35-36,5° C bebrütet.

Micronaut-S-ESBL:

Durchführung von Variante (a) Übernacht-Inkubation entsprechend Micronaut-S-MHK.

Bei Variante (b) Schnelltest wurden 250 µl der Bakteriensuspension mit McFarland 0,5 in 11 ml Mueller-Hinton II Boullion pipettiert. So ergab sich ein im Vergleich mit dem Standard-Inokulum fünffach höher konzentriertes Inokulum.

5.4. Testauswertung

Die Micronaut-S-MHK-Platten wurden mit Hilfe eines Vergrößerungsspiegels visuell abgelesen, die Micronaut-S-ESBL-Platten wurden visuell anhand des Farbumschlags abgelesen.

Ein Bakterienstamm wird als ESBL-positiv eingeordnet, wenn in Abwesenheit von Clavulansäure der MHK-Wert um ≥ 3 Titerstufen höher liegt, als in Anwesenheit von Clavulansäure. Die Cefpodoxim-Proxetil-Konzentration verdoppelt sich pro aufsteigender Titerstufe, die Konzentration der Clavulansäure ist konstant 4 mg/l.

(Eine Veränderung des MHK-Werts um 3 Titerstufen entspricht einer Veränderung des MHK-Werts um einen Faktor von 8. Steigt beispielsweise die Konzentration von 2 mg/l um drei Titerstufen auf 16 mg/l, so hat sich die Konzentration auf den achtfachen Wert erhöht).

Bei Variante (a) Übernacht-Inkubation erfolgte die Ablesung nach 18-24 stündiger Bebrütung. Bei Variante (b) Schnelltest wurde das Resultat nach 6 Stunden Bebrütung protokolliert.

	CPP 1	CPP 2	CPP 4	CPP 8	CPP 16	CPP 32	CPP >32
C/V 0,25/4	+2	ESBL+ +3	ESBL + +4	ESBL+ +5	ESBL + +6	ESBL + +7	ESBL+ >7
C/V 0,5/4	+1	+2	ESBL+ +3	ESBL+ +4	ESBL+ +5	ESBL+ +6	ESBL+ >6
C/V 1/4	0	+1	+2	ESBL+ +3	ESBL+ +4	ESBL+ +5	ESBL+ >5
C/V 2/4	-1	0	+1	+2	ESBL+ +3	ESBL+ +4	ESBL+ >4
C/V 4/4	-2	-1	0	+1	+2	ESBL+ +3	ESBL+ >3
C/V >4/4	-3	-2	-1	0	+1	+2	ND

Abbildung 4: Ableseschema Micronaut-S -ESBL:

CPP: Cefpodoxim-Proxetil. C/V: Cefpodoxim/Clavulansäure. Angaben der Konzentration in mg/l. ND: nicht detektierbar. Die Zahlen von -3 bis >7 geben die Zahl der Titerstufen an, um die der MHK-Wert in Abwesenheit von Clavulansäure relativ höher liegt, als in Anwesenheit von Clavulansäure. Beispielsweise bedeutet +2 eine Zunahme des MHK-Werts um zwei Titerstufen in Abwesenheit von Clavulansäure. Die CPP-Konzentration verdoppelt sich pro aufsteigender Titerstufe. Die Konzentration der Clavulansäure ist konstant 4 mg/l.

6. Ergebnisse

6.1. Micronaut-S-MHK

Für die 159 untersuchten *E. coli*-Stämme ergaben sich die in Tabelle 8 und Abbildung 5 zusammengestellten MHK-Werte. In Abbildung 6 sind die MHK-Werte für die drei untersuchten Carbapeneme zur besseren Übersicht gesondert dargestellt.

Antibiotika-Konzentration (mg/l)	Gehemmte ESBL-positive <i>E. coli</i> Stämme (%-kumulativ)							
	IMP	ERT	MER	TMO	AMK	GEN	TGC	COL
≤0,06	7,5	87,4	98,1			0,6	74,8	4,4
0,12	62,8	96,8	100			0,6	94,3	43,3
0,25	91,8	99,4				3,7	98,7	94,3
0,5	99,4	100				41,5	98,7	98,1
1						52,8	99,4	
2	100			4,4	30,2	55,3	100	99,3
4				32,7	94,9	56,6		
8				83	99,4	62,9		
16				95,5	100	81,7		
32				98,7		93,7		
64				100		98,1		100
128						100		

Tabelle 8: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum- β -Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *E. coli* (n=159). IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem; TMO: Temocillin; AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin; TGC: Tigecyclin; COL: Colistin.

gehemmte Stämme (%-kumulativ)

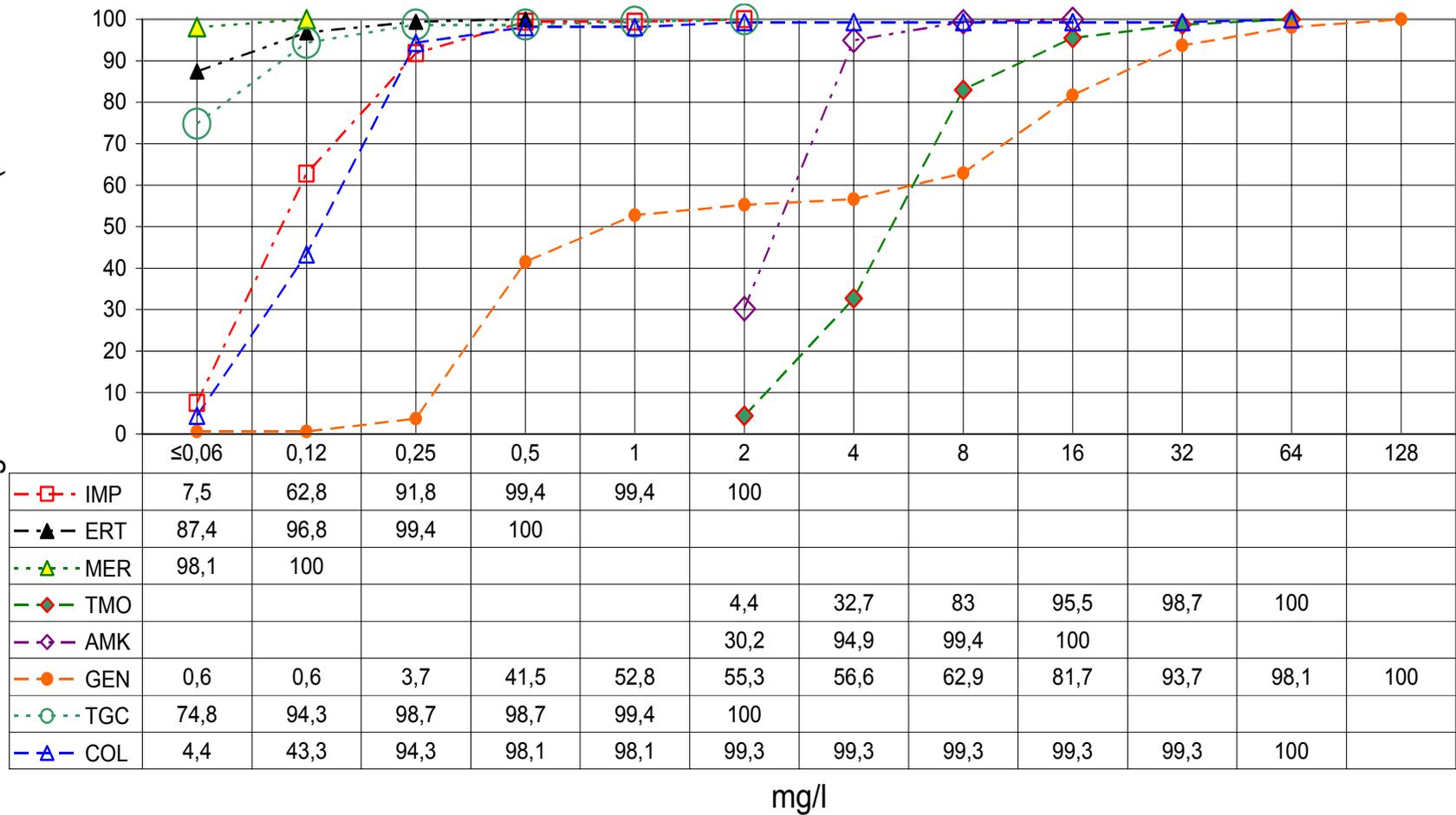


Abbildung 5: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum-Beta-Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *E. coli* (n=159). Die Abbildung zeigt kumulativ den relativen Anteil der getesteten Bakterienstämme der genannten Spezies, die bei einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Antibiotikums kein Wachstum mehr zeigen, also gehemmt sind. IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem; TMO: Temocillin; AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin; TGC: Tigecyclin; COL: Colistin.

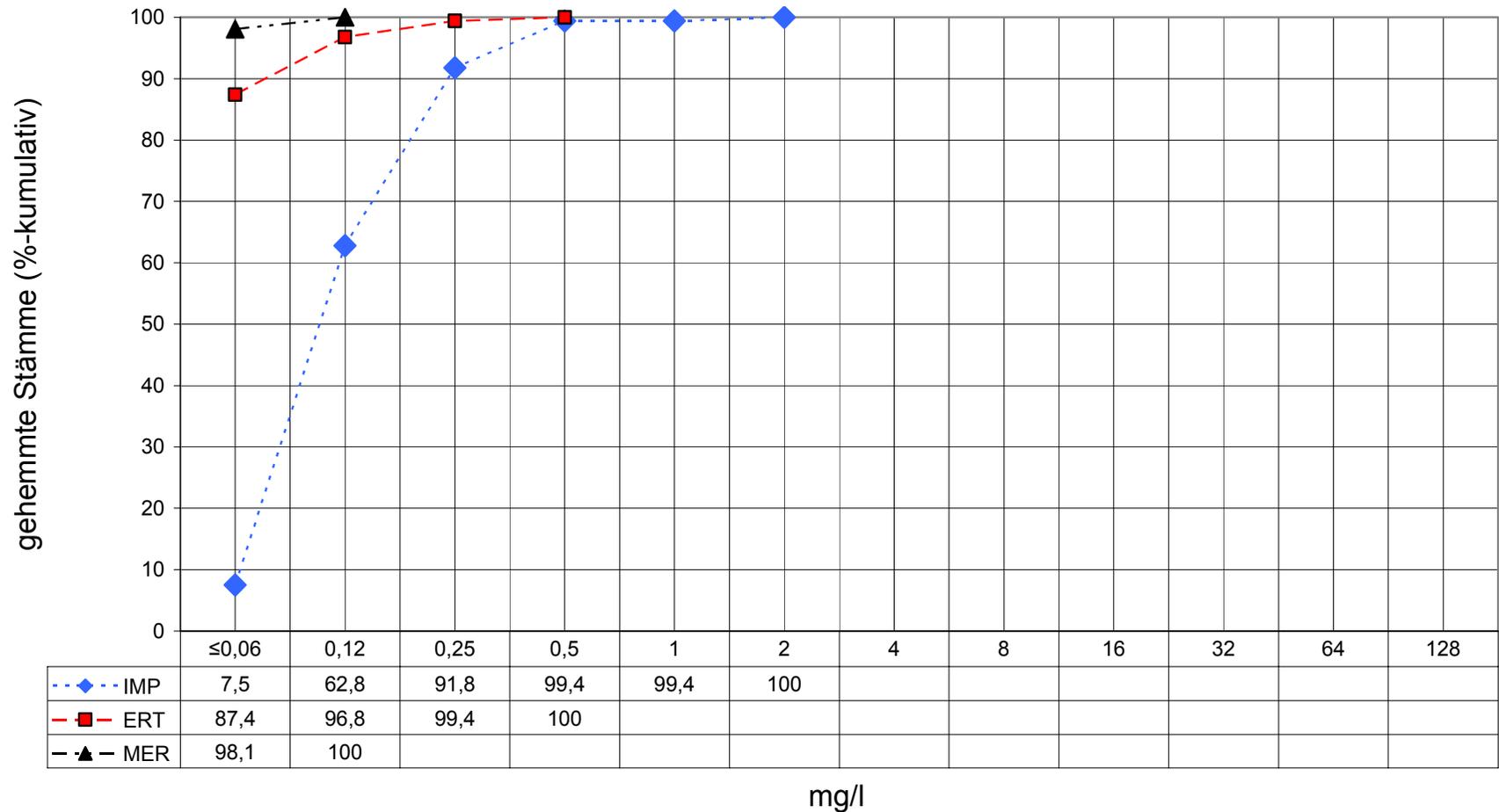


Abbildung 6: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum-Beta-Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *E. coli* (n=159). Die Abbildung zeigt kumulativ den relativen Anteil der getesteten Bakterienstämme der genannten Spezies, die bei einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Antibiotikums kein Wachstum mehr zeigen, also gehemmt sind. IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem;

Für die 88 untersuchten *K. pneumoniae*-Stämme ergaben sich die in Tabelle 9 und Abbildung 7 zusammengestellten MHK- Werte. In Abbildung 8 sind die MHK-Werte für die drei untersuchten Carbapeneme zur besseren Übersicht gesondert dargestellt.

Antibiotika-Konzentration (mg/l)	Gehemmte ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> Stämme (%-kumulativ)							
	IMP	ERT	MER	TMO	AMK	GEN	TGC	COL
≤0,06	9	51,1	77,3				11,4	3,4
0,12	65,9	79,5	86,4				34	21,6
0,25	88,6	93,1	93,2			2,3	84	64,7
0,5	98,8	98,8	96,6			10,2	98,9	72,7
1			98,9	2,3	1,1	15,9	100	79,5
2	100	100		9	40,9	21,6		82,9
4			100	26,1	69,3	23,8		89,7
8				77,3	85,2	26,1		97,7
16				85,2	94,3	37,5		100
32				97,7	96,6	73,9		
64					98,8	89,9		
128				98,9		98,9		
>128				100	100	100		

Tabelle 9 : Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum-β-Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *Klebsiella pneumoniae* (n = 88). IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem; TMO: Temocillin; AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin; TGC: Tigecyclin; COL: Colistin

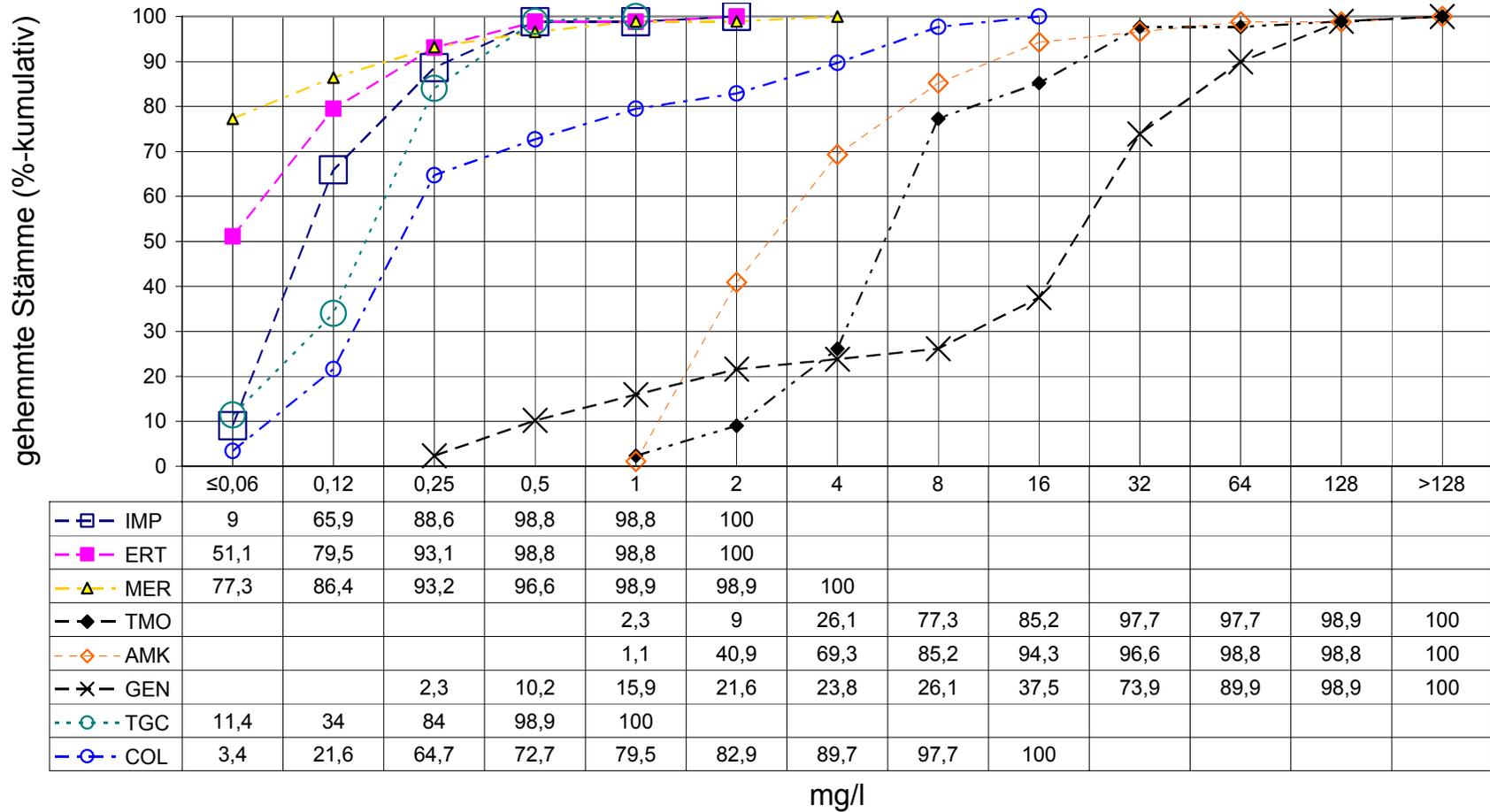


Abbildung 7: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum-Beta-Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *Klebsiella pneumoniae* (n = 88). Die Abbildung zeigt kumulativ den relativen Anteil der getesteten Bakterienstämme der genannten Spezies, die bei einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Antibiotikums kein Wachstum mehr zeigen, also gehemmt sind. IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem; TMO: Temocillin; AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin; TGC: Tigecyclin; COL: Colistin.

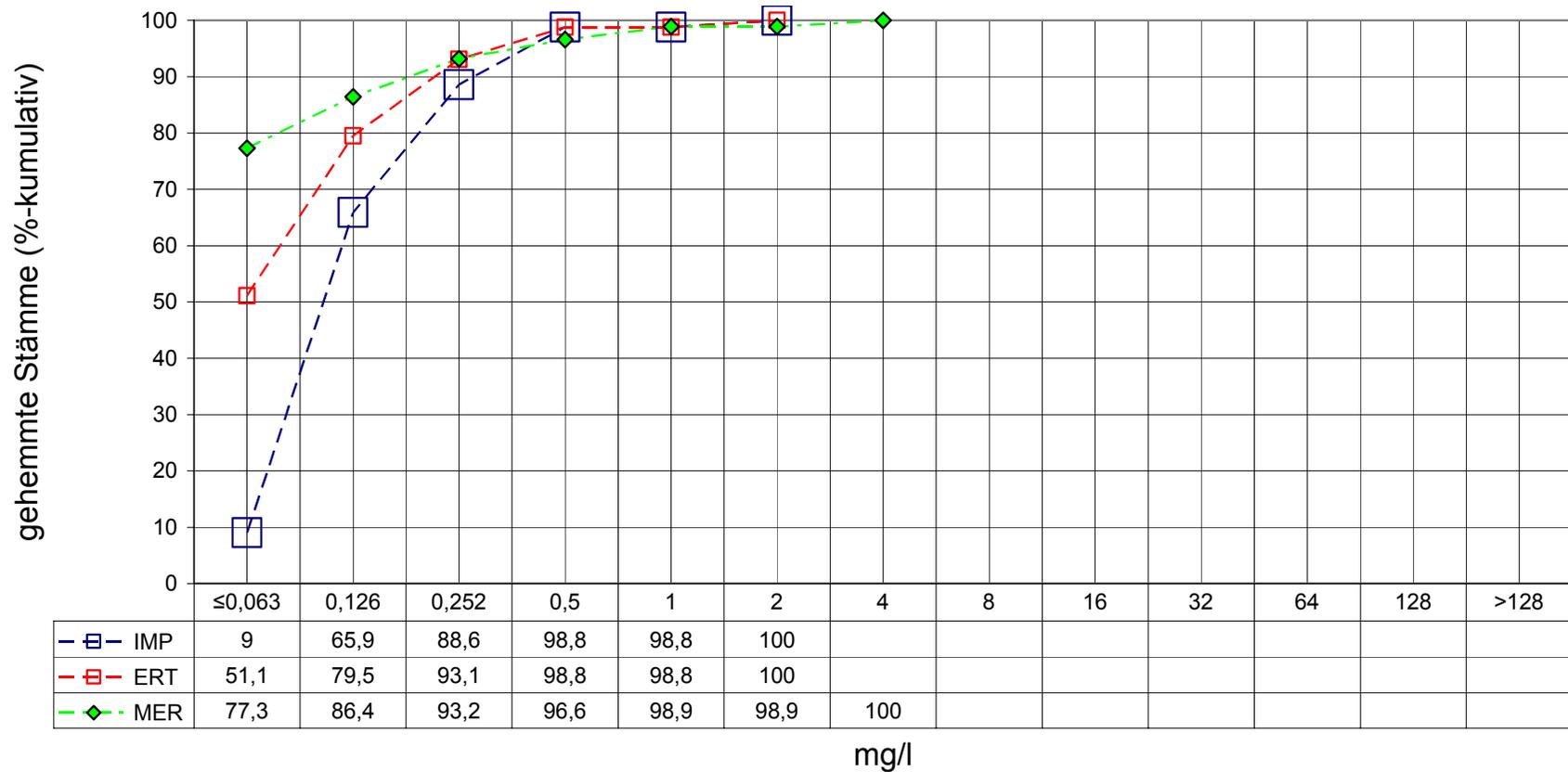


Abbildung 8: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum-Beta-Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *Klebsiella pneumoniae* (n = 88). Die Abbildung zeigt kumulativ den relativen Anteil der getesteten Bakterienstämme der genannten Spezies, die bei einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Antibiotikums kein Wachstum mehr zeigen, also gehemmt sind. IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem;

Für die 27 untersuchten *K. oxytoca* Stämme ergaben sich die in Tabelle 10 und Abbildung 9 zusammengestellten MHK- Werte. In Abbildung 10 sind die MHK- Werte für die drei untersuchten Carbapeneme zur besseren Übersicht gesondert dargestellt.

Antibiotika-Konzentration mg/l	Gehemmte ESBL-positive <i>K. oxytoca</i> Stämme (% kumulativ)							
	IMP	ERT	MER	TMO	AMK	GEN	TGC	COL
≤0,06		85	85				18,5	48,1
0,12	40,7	100	100				33,3	85,2
0,25	66,7					7,4	66,6	92,6
0,5	92,6					44,4	85,2	96,3
1	100					51,8	100	
2				3,7	40,7	74		
4				37	85,2	92,3		
8				88	96,3			
16				92,6	100	96,3		
32				100		100		
64								100
128								

Tabelle 10: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum- β -Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *Klebsiella oxytoca* (n = 27). IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem; TMO: Temocillin; AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin; TGC: Tigecyclin; COL: Colistin

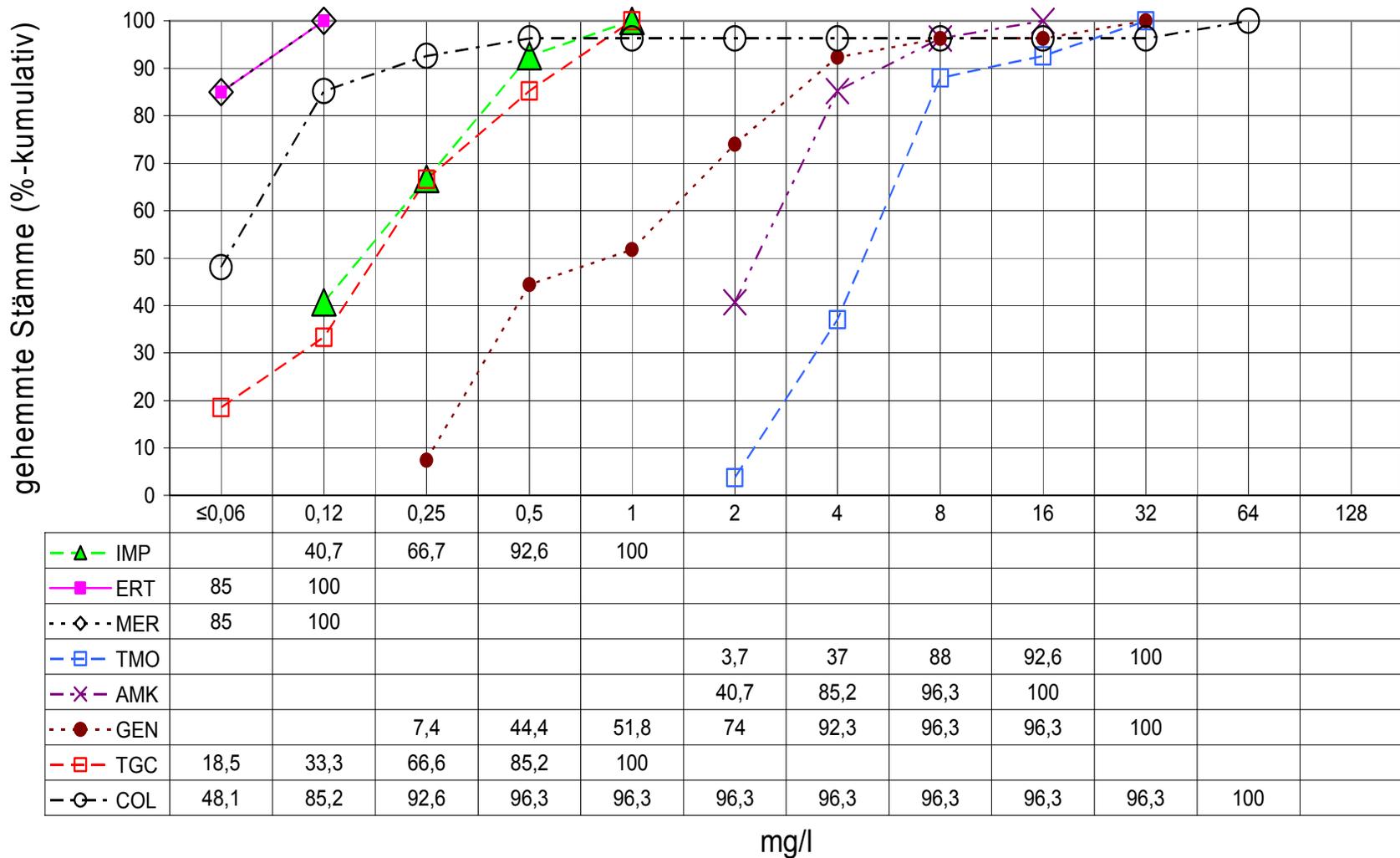


Abbildung 9: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum-Beta-Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *Klebsiella oxytoca* (n = 27). Die Abbildung zeigt kumulativ den relativen Anteil der getesteten Bakterienstämme der genannten Spezies, die bei einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Antibiotikums kein Wachstum mehr zeigen, also gehemmt sind. IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem; TMO: Temocillin; AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin; TGC: Tigecyclin; COL: Colistin

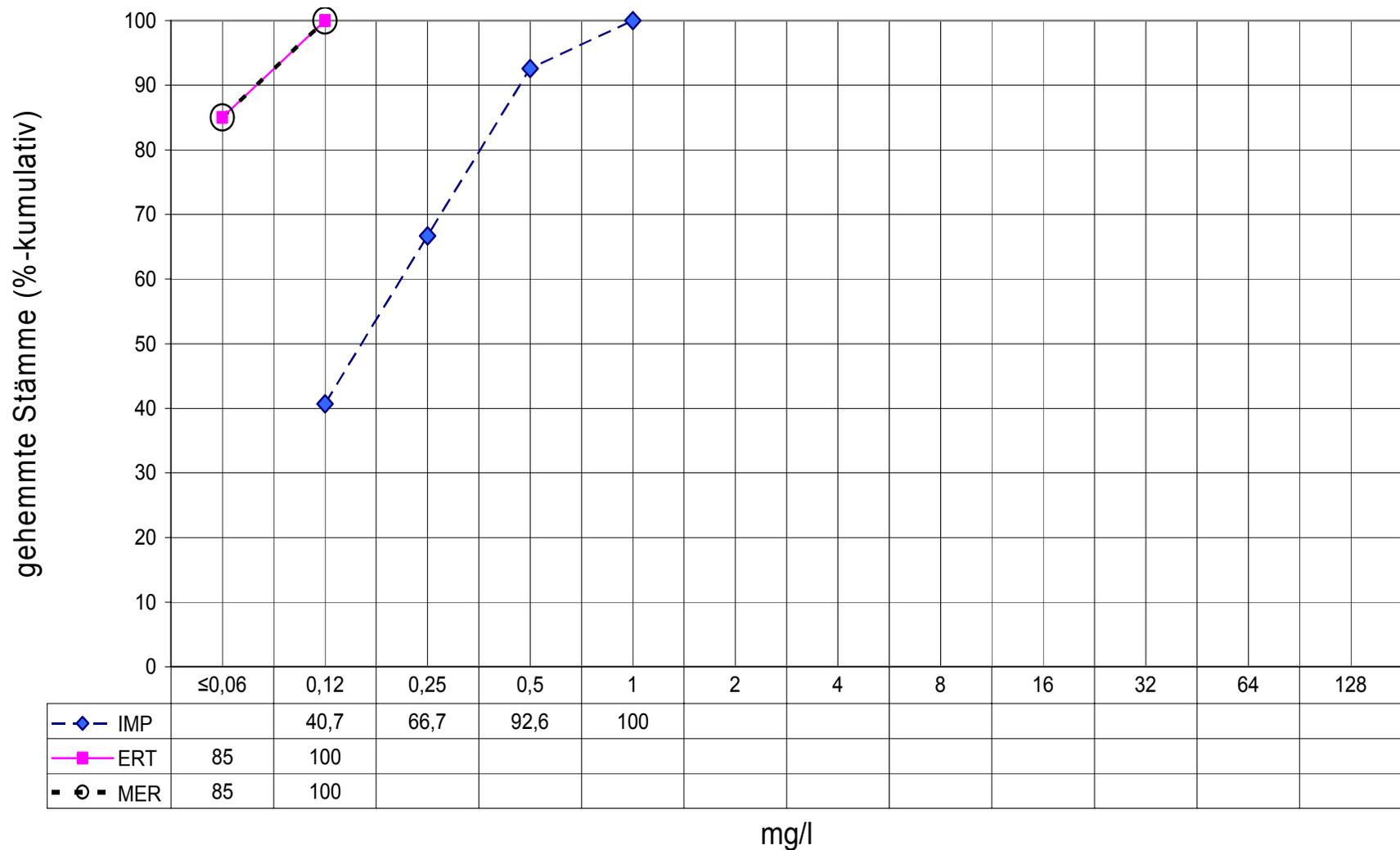


Abbildung 10: Antibiotika-Sensibilität bei Bakterien mit Extended-Spectrum-Beta-Laktamase-Bildung ermittelt durch Bouillon-Mikrodilutionstest nach DIN 58940 bei ESBL-positiven *Klebsiella oxytoca* (n = 27). Die Abbildung zeigt kumulativ den relativen Anteil der getesteten Bakterienstämme der genannten Spezies, die bei einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Antibiotikums kein Wachstum mehr zeigen, also gehemmt sind. IMP: Imipenem; ERT: Ertapenem; MER: Meropenem

6.2. Micronaut-S-ESBL

Variante (a) Übernacht-Inkubation:

<i>E. coli</i> (n=158)		<i>K. pneumoniae</i> (n=87)		<i>K. oxytoca</i> (n=26)	
Absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
157	99,3%	86	98,8%	24	92,3%

Tabelle 11: Anteil der Bakterienstämme, die von Micronaut-S-ESBL Variante (a) Übernacht-Inkubation als ESBL-positiv erkannt wurden

157 von 158 (99,3%) *E. coli* Stämmen, die zuvor durch den Etest als phänotypisch ESBL-positiv charakterisiert worden waren, erschienen auch im Micronaut-S-ESBL als phänotypisch ESBL-positiv. Abbildung 11 zeigt die Verteilung der MHK-Reduktion durch Clavulansäure in Titerstufen-Differenz. Für einen Stamm ergab sich eine Titerstufen-Differenz von Null, da dieser in allen Kavitäten gewachsen war.

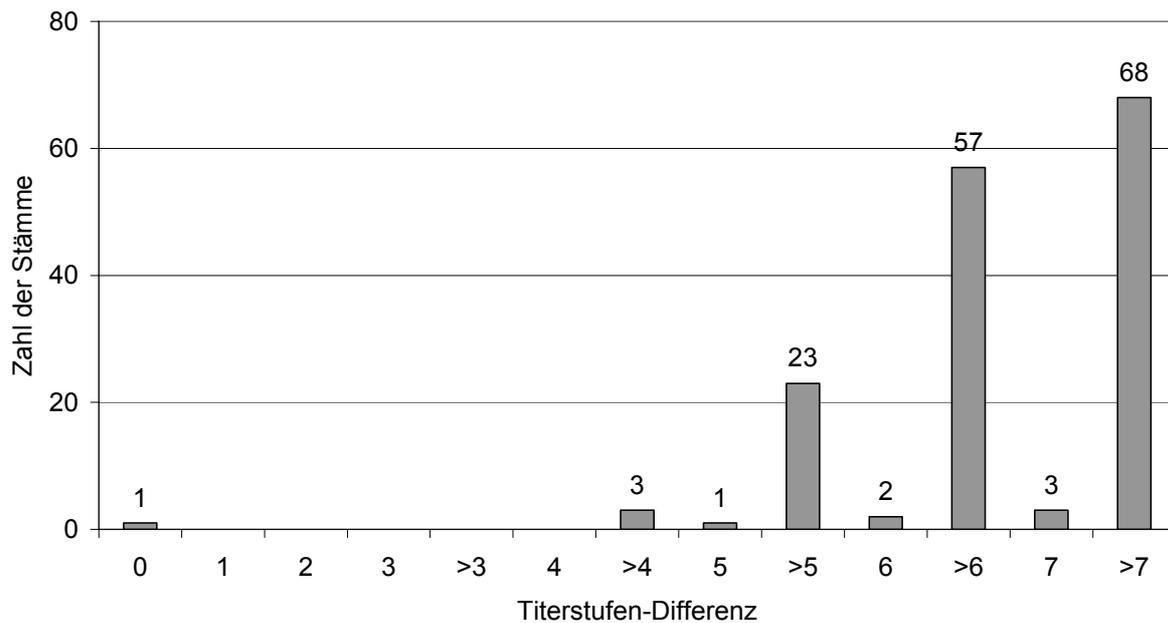


Abbildung 11: MHK-Reduktion durch Clavulansäure bei ESBL-positiven *Escherichia coli* (n= 158), Übernacht-Inkubation. Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der Bakterienstämme, bei denen die auf der Abszisse aufgetragene MHK-Titerstufen-Differenz bei konstanter Clavulansäurekonzentration beobachtet wurde.

86 von 87 (98,8%) *K. pneumoniae* -Stämmen, die zuvor durch den Etest als phänotypisch ESBL-positiv charakterisiert worden waren, erschienen auch im Micronaut-S-ESBL Variante (a) Übernacht-Inkubation als phänotypisch ESBL-positiv. Abbildung 12 zeigt die Verteilung der MHK-Reduktion durch Clavulansäure in Titerstufen-Differenz. Ein Stamm zeigte nur in der Wachstumskontrollkavität einen Farbumschlag. Damit ergab sich für diesen Stamm eine Titerstufendifferenz von Null.

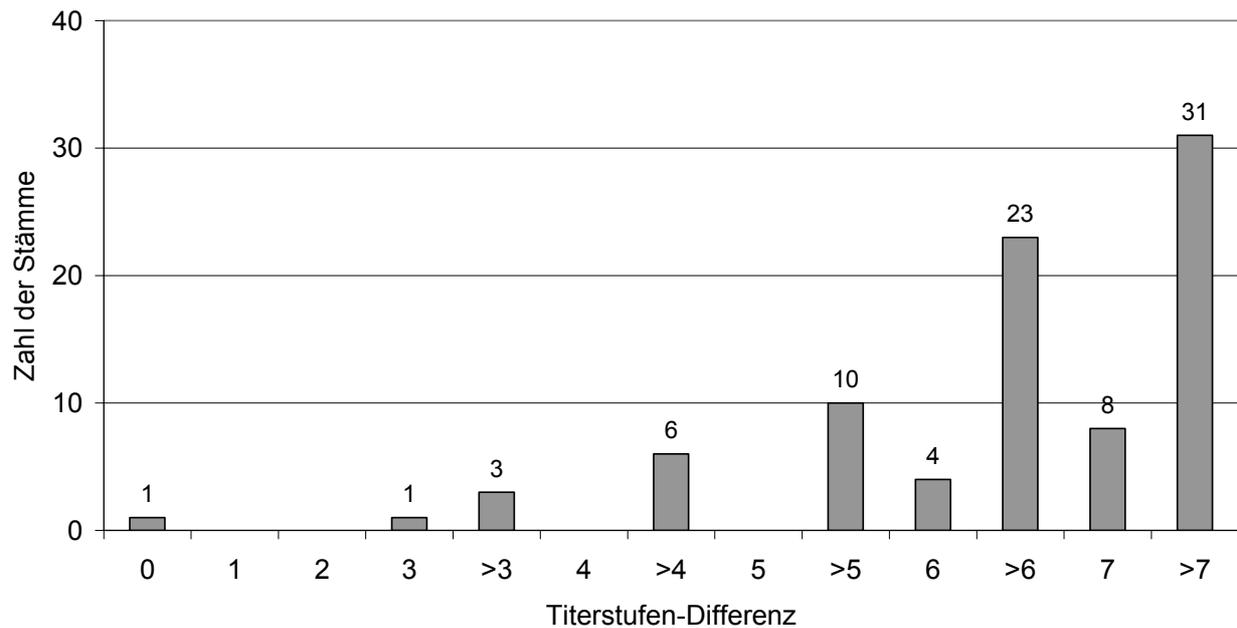


Abbildung 12: MHK-Reduktion durch Clavulansäure bei ESBL-positiven *Klebsiella pneumoniae* (n= 87) Übernacht-Inkubation. Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der Bakterienstämme, bei denen die auf der Abszisse aufgetragene MHK-Titerstufendifferenz bei konstanter Clavulansäurekonzentration beobachtet wurde.

24 von 26 (92,3%) *K. oxytoca* Stämmen, die zuvor durch den Etest als phänotypisch ESBL-positiv charakterisiert worden waren, erschienen auch im Micronaut-S-ESBL Variante (a) Übernacht-Inkubation phänotypisch ESBL-positiv. Abbildung 13 zeigt die Verteilung der MHK-Reduktion durch Clavulansäure in Titerstufen-Differenz. Für zwei Stämme ergab sich eine Titerstufen-Differenz von Null, wobei einer dieser beiden Stämme ausschließlich Wachstum in der Wachstumskontrollkavität zeigte und der zweite in allen Kavitäten wuchs.

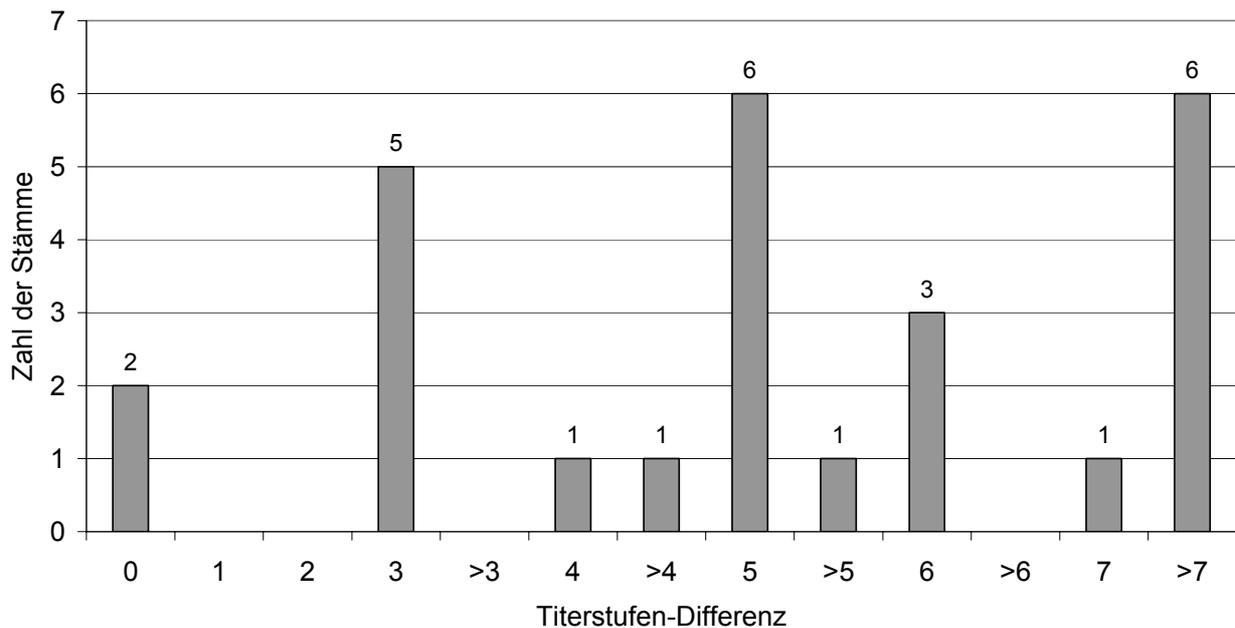


Abbildung 13: MHK-Reduktion durch Clavulansäure bei ESBL-positiven *Klebsiella oxytoca* (n= 26) Übernacht-Inkubation. Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der Bakterienstämme, bei denen die auf der Abszisse aufgetragene MHK-Titerstufendifferenz bei konstanter Clavulansäurekonzentration beobachtet wurde.

6.2.1. Micronaut-S-ESBL als Schnelltest

Variante (b) Schnelltest:

<i>E. coli</i> (n=158)		<i>K. pneumoniae</i> (n=87)		<i>K. oxytoca</i> (n=26)	
absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
104	65,8%	46	52,8%	12	46,1%

Tabelle 12: Anteil der Bakterienstämme, die von Micronaut-S-ESBL Variante (b) Schnelltest als ESBL-positiv erkannt wurden

104 von 158 (65,8%) *E. coli* Stämmen, die zuvor durch den Etest als phänotypisch ESBL-positiv charakterisiert worden waren, erschienen auch im Micronaut-S-ESBL Variante (b) nach Bebrütung über sechs Stunden als phänotypisch ESBL-positiv. Abbildung 14 zeigt die Verteilung der MHK-Reduktion durch Clavulansäure in Titerstufen-Differenz. Für 54 Stämme ergab sich

eine Titerstufen-Differenz von Null, 51 davon zeigten Farbumschlag in allen Kavitäten, bei zwei Stämmen war das Wachstum so schwach, dass keine Interpretation möglich war, und bei einem Stamm war kein Wachstum erkennbar.

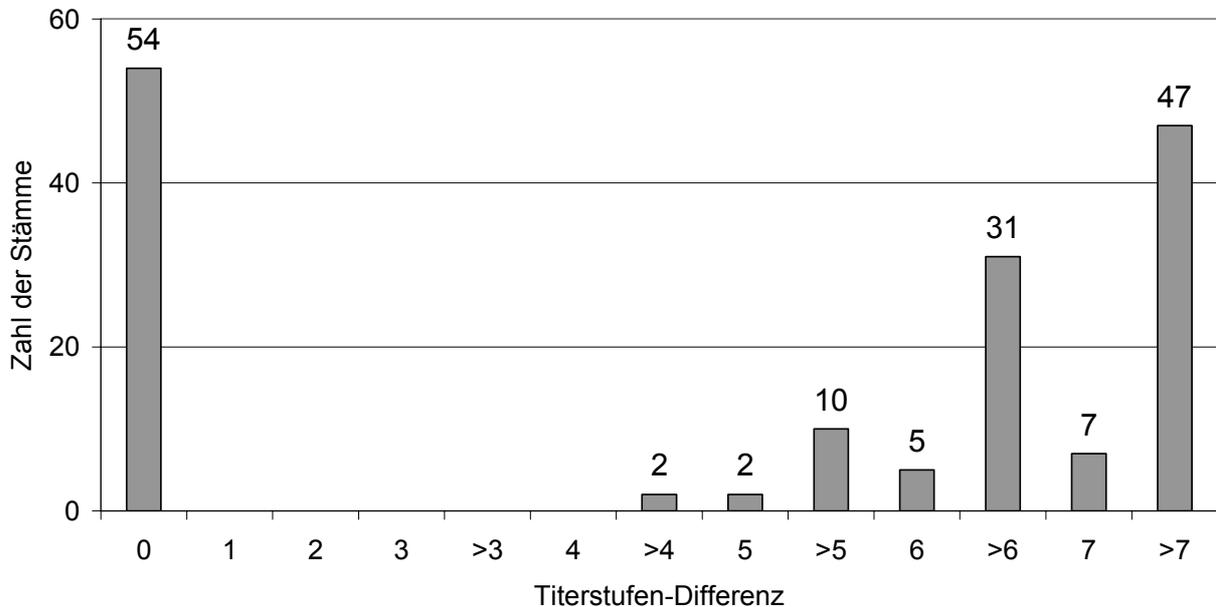


Abbildung 14: MHK-Reduktion durch Clavulansäure bei ESBL-positiven *Escherichia coli* (n= 158) Schnelltest (6 Stunden-Bebrütung) . Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der Bakterienstämme, bei denen die auf der Abszisse aufgetragene MHK-Titerstufendifferenz bei konstanter Clavulansäurekonzentration beobachtet wurde.

46 von 87 (52,8%) *K. pneumoniae* Stämmen, die zuvor durch den Etest als phänotypisch ESBL-positiv charakterisiert worden waren, erschienen auch im Micronaut-S-ESBL Variante (b) nach Bebrütung über sechs Stunden als phänotypisch ESBL-positiv. Abbildung 15 zeigt die Verteilung der MHK-Reduktion durch Clavulansäure in Titerstufen-Differenz. Bei 41 Stämmen ergab sich eine Titerstufen-Differenz von Null, 39 davon zeigten Farbumschlag in allen Kavitäten, zwei Stämme zeigten nur Farbumschlag in der Wachstumskontrolle.

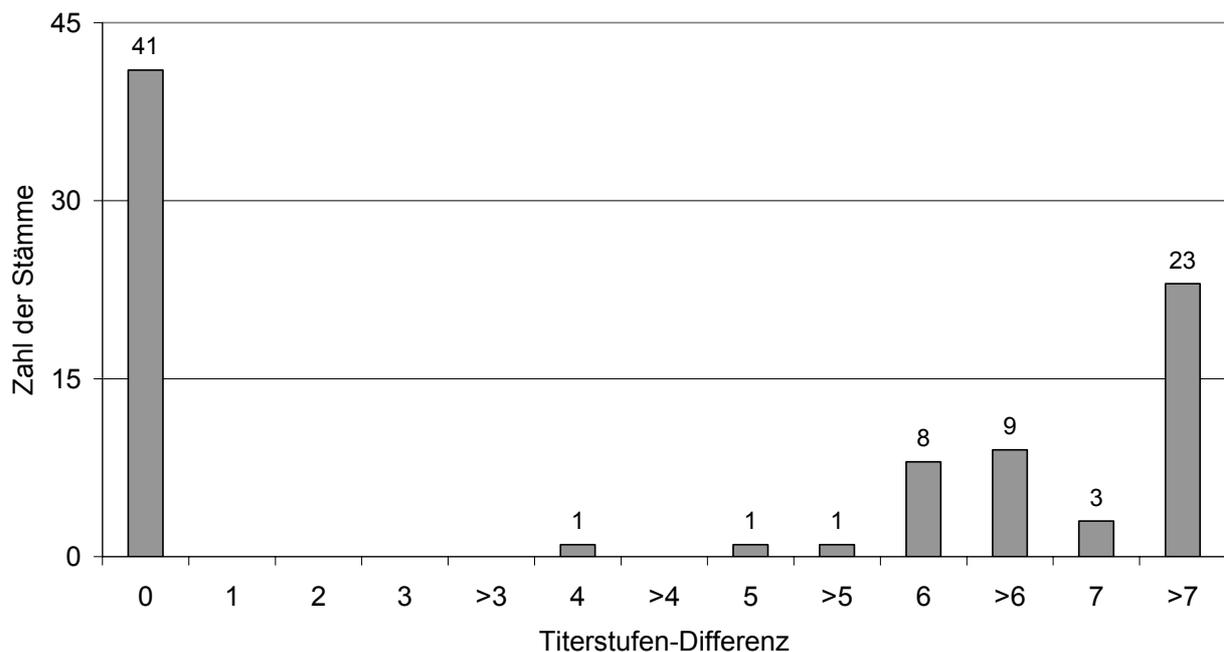


Abbildung 15: MHK-Reduktion durch Clavulansäure bei ESBL-positiven *Klebsiella pneumoniae* (n= 87) Schnelltest (6 Stunden-Bebrütung) . Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der Bakterienstämme, bei denen die auf der Abszisse aufgetragene MHK-Titerstufendifferenz bei konstanter Clavulansäurekonzentration beobachtet wurde.

12 von 26 (46,1%) *K. oxytoca*-Stämmen, die zuvor durch den Etest als phänotypisch ESBL-positiv charakterisiert worden waren, erschienen auch im Micronaut-S-ESBL Variante (b) nach sechsständiger Bebrütung als phänotypisch ESBL-positiv. Abbildung 16 zeigt die Verteilung der MHK-Reduktion durch Clavulansäure in Titerstufen-Differenz. Bei 13 Stämmen ergab sich eine Titerstufen-Differenz von Null, 12 davon zeigten Wachstum in allen Kavitäten, bei einem Stamm zeigte sich kein Wachstum. Ein Stamm wies eine Differenz von nur einer Titerstufe auf.

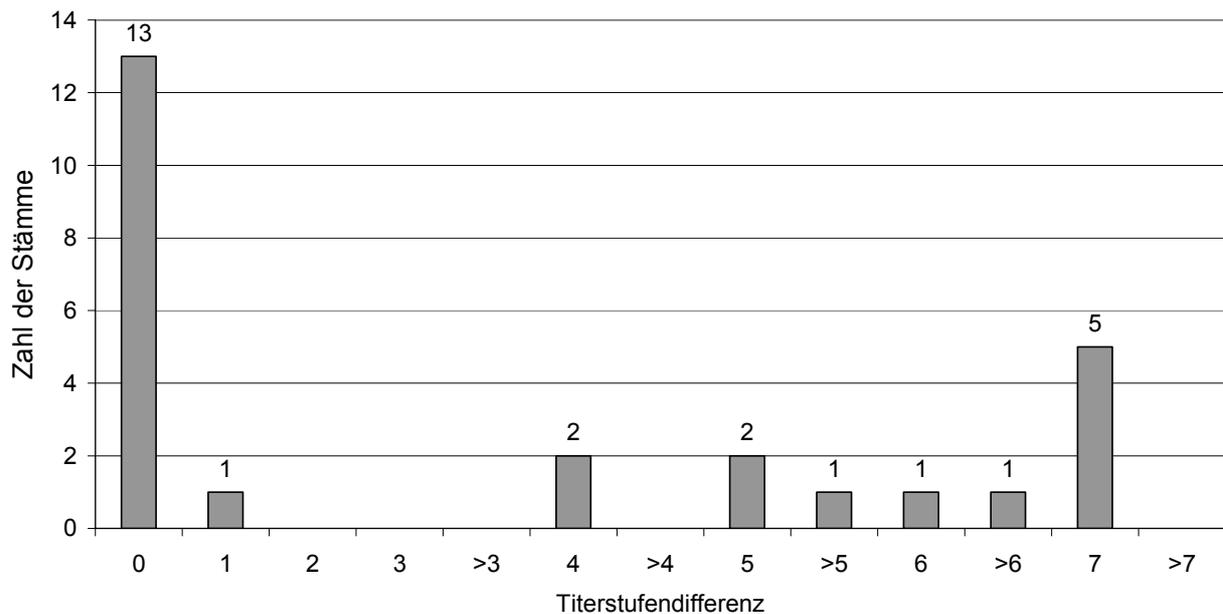


Abbildung 16: MHK-Reduktion durch Clavulansäure bei ESBL-positiven *Klebsiella oxytoca* (n= 26) Schnelltest (6 Stunden-Bebrütung). Die Abbildung zeigt die absoluten Zahlen der Bakterienstämme, bei denen die auf der Abszisse aufgetragene MHK-Titerstufendifferenz bei konstanter Clavulansäurekonzentration beobachtet wurde.

6.2.2. Untersuchung von 167 Isolaten aus der Routine-Diagnostik als Negativ-Kontrollen

Übereinstimmung von Routine-Diagnostik und Micronaut-S-ESBL

Von den 167 untersuchten Isolaten aus der klinischen Routine-Diagnostik erschienen 154 sowohl im Micronaut-S-ESBL als auch in der Routine-Diagnostik als ESBL-negativ. 12 Isolate erschienen im Micronaut-S-ESBL als ESBL-positiv und waren aus der Routine-Diagnostik als ESBL-positiv bekannt.

Ein Isolat, das durch die Routine-Diagnostik nicht als ESBL-positiv erkannt worden war, erschien im Micronaut-S-ESBL als ESBL-positiv. Dieses Isolat wurde nachträglich mit dem Etest-ESBL untersucht und erschien in diesem ebenfalls als ESBL-positiv. Falsch-positive Ergebnisse traten somit nicht auf (Tabelle 13). Die Isolate aus der klinischen Routine-Diagnostik wurden mit Standard-Inokulum und 18-24 stündiger Bebrütung untersucht.

	Übereinstimmender ESBL-Status		Nicht übereinstimmender ESBL-Status	
	ESBL- negativ	ESBL- positiv	Routine- Diagnostik: ESBL-negativ	Routine- Diagnostik: ESBL-positiv
			Micronaut-S- ESBL: ESBL-positiv	Micronaut-S- ESBL: ESBL-negativ
Spezies:	Anzahl Stämme:			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	16	1		
<i>Citrobacter freundii</i>	3			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1			
<i>Enterobacter cloacae</i>	27			
<i>Escherichia coli</i>	53	4	1	
<i>Hafnia alviae</i>	2			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	4		
<i>Morganella morganii</i>	2			
<i>Proteus mirabilis</i>	3			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3			
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	1			
<i>Staphylococcus aureus</i>	1			
<i>Serratia marcescens</i>	3			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5			
Summe:	154	12	1*	0

Tabelle 13: Isolate aus der klinischen Routine-Diagnostik; Vergleich des in der Routine-Diagnostik ermittelten ESBL-Status mit den Ergebnissen des Micronaut-S-ESBL (18-24h Stunden Bebrütung)

* Dieser Stamm erschien auch im nachträglich durchgeführten Etest als ESBL-positiv.

7. Vergleichende Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse

7.1 Micronaut-S-MHK

Mit dem Micronaut-S-MHK wurden MHK-Werte für die beiden etablierten Carbapeneme, Meropenem und Imipenem, sowie für das neuere Ertapenem ermittelt. Ausserdem sollte die Bedeutung fünf weiterer Antibiotika (Amikacin, Gentamicin, Colistin, Temocillin, Tigecyclin) als mögliche Kombinationspartner oder Alternativen zu den Carbapenemen bestimmt werden. Die Tabellen 14 und 15 zeigen die Interpretation der mit Micronaut-S-MHK ermittelten MHK-Werte anhand der von EUCAST vorgeschlagenen MHK-Grenzwerte.

Für Temocillin fehlen bei EUCAST solche MHK-Grenzwerte. Die British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) schlägt als MHK-Grenzwerte für die Therapie systemischer Infektionen durch *Enterobacteriaceae* 8 mg/L und 32 mg/l für die Therapie unkomplizierter Harnwegsinfektionen vor, da Temocillin im Urin hohe Konzentrationen erreicht (Livermore und Tulkens 2009).

Antibiotikum	<i>E.coli</i> (n=159)			<i>K.pneumoniae</i> (n=88)			<i>K.oxytoca</i> (n=27)			MHK- Grenzwerte in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	S%	%I	%R	%S	%I	%R	%S	%I	%R	
Ertapenem	100	0	0	98,8	0	1,2	100	0	0	0,5/1
Imipenem	100	0	0	100	0	0	100	0	0	2/8
Meropenem	100	0	0	98,9	1,1	0	100	0	0	2/8
Gentamicin	55,3	7,6	37,1	21,6	2,2	76,2	74	22,3	3,7	2/4
Amikacin	99,4	0,6	0	85,2	11,4	3,4	96,3	3,7	0	8/16
Tigecyclin	99,4	0,6	0	100	0	0	100	0	0	1/2
Colistin	99,3	0	0,7	82,9	0	17,1	96,3	0	3,7	2/2

Tabelle 14: Interpretation der ermittelten MHK-Werte nach EUCAST-MHK-Grenzwerten für *Enterobacteriaceae*.(<http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>)

S: Sensibel, I:Intermediär, R :Restitent

Antibiotikum	<i>E.coli</i> (n=159)			<i>K.pneumoniae</i> (n=88)			<i>K.oxytoca</i> (n=27)			MHK-Grenzwerte in mg/l (\leq S/R $>$) (BSAC)
	S%	%I	%R	%S	%I	%R	%S	%I	%R	
Temocillin	83	0	17	77,3	0	22,7	88	0	12	8/8 bei systemischen Infektionen
Temocillin	98,7	0	1,3	97,7	0	2,3	100	0	0	32/32 bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen

Tabelle 15: Interpretation der für Temocillin ermittelten MHK-Werte nach den vor kurzem von der British Society for Antimicrobial Chemotherapy vorgeschlagenen MHK-Grenzwerten für *Enterobacteriaceae*.

7.1.1. Carbapeneme

Alle 159 ESBL-positiven *E. coli* Stämme erwiesen sich als sensibel gegenüber den drei untersuchten Carbapenemen. Die MHK_{90} für Meropenem und Imipenem, also die Wirkstoffkonzentration, die 90% des geprüften Stammkollektivs hemmt, lag eine Titerstufe niedriger als bei den ESBL-positiven *E. coli* Stämmen aus den europäischen Zentren der MYSTIC-Studie, in den Jahren 2002, 2003 und 2004 (Goossens und Grabein 2005) (Tabelle 16). In der MYSTIC-Studie werden in regelmäßigen Zeitabständen Resistenzentwicklungen gegen Carbapeneme und andere breit wirksame Substanzen weltweit vergleichend neben anderen Bereichen der Medizin in ca. 80 intensivmedizinischen Einrichtungen einschließlich unseres Klinikums überwacht.

MYSTIC 2002, 2003 und 2004, MHK ₉₀ jeweils gleich ESBL-positive <i>E. coli</i> (n= 270*)		Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=159)
Antibiotikum	MHK ₉₀	MHK ₉₀
Imipenem	0,5	0,25
Meropenem	0,12	≤0,06
Gentamicin	128	32

Tabelle 16: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus dem europäischen Teil der MYSTIC-Studie in den Jahren 2002, 2003 und 2004 –in diesen Jahren war die MHK₉₀ für Imipenem, Meropenem und Gentamicin jeweils gleich- und der eigenen Untersuchung.

*Die Anzahl der ESBL-bildenden Isolate ist bei Goossens und Grabein (2005) nur als prozentualer Anteil der Gesamtzahl der untersuchten Isolate angegeben.

Die MHK₉₀ für Imipenem entsprach mit 0,25 mg/l der MHK₉₀ in der MYSTIC-Studie 2007 für alle dort untersuchten *E. coli*, wobei 4,9% dieser Stämme ESBL-positiv waren (Turner 2009) (Tabelle 17).

MYSTIC 2007 <i>E. coli</i> (n=781), 4,9% davon ESBL-positiv			Eigene Untersuchungsergebnisse ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=159)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Imipenem	0,25	0,25	0,12	0,25
Meropenem	0,016	0,03	≤0,06	≤0,06
Gentamicin	1	4	1	32

Tabelle 17: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für *E. coli* (95,1% ESBL-negativ) aus dem europäischen Teil der MYSTIC-Studie 2007 (Turner 2009) und den ESBL-positiven *E. coli* aus der eigenen Untersuchung

Für Meropenem wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich MHK-Werte ≤0,06 mg/l ermittelt. Die MHK₉₀ für Meropenem bei 159 *E. coli* -Stämmen war entsprechend ebenfalls ≤0,06 mg/l, wobei dieser Wert in der MYSTIC-Studie 2007 für alle *E. coli* – Stämme 0,03 mg/l betrug (Tabelle 19).

Alle 88 untersuchten ESBL-positiven *K. pneumoniae* – Kulturen waren Imipenem-sensibel. Ein *K. pneumoniae*- Stamm zeigte intermediäre Sensibilität gegenüber Meropenem, ein anderer *K. pneumoniae*- Stamm erschien Ertapenem-resistent (MHK: 2 mg/l), wobei Zweifel an diesem Ergebnis bestehen aufgrund diskontinuierlichen Wachstums auf der Mikrotiterplatte.

Unsere MHK₉₀ für Imipenem entsprach mit 0,5 mg/l der MHK₉₀ für ESBL-positive *Klebsiella* spp. aus den europäischen Zentren der MYSTIC-Studie in den Jahren 2002, 2003 und 2004 (Goossens und Grabein 2005). Für Meropenem lag bei unseren *Klebsiellen* die MHK₉₀ eine Titerstufe höher als in den genannten MYSTIC-Studien (Tabelle 18).

MYSTIC 2002, 2003 und 2004, MHK ₉₀ jeweils gleich ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n= 343*)		Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=88)
Antibiotikum	MHK ₉₀	MHK ₉₀
Imipenem	0,5	0,5
Meropenem	0,12	0,25
Gentamicin	128 (nur 2004)	128

Tabelle 18: Vergleich zwischen den MHK-Werten der eigenen Untersuchung und MHK-Werten für ESBL-bildende *Klebsiella* spp. aus dem europäischen Teil der MYSTIC-Studie in den Jahren 2002, 2003 und 2004 (In diesen Jahren war die MHK₉₀ für Imipenem und Meropenem jeweils gleich.) (Goossens und Grabein 2005)

*Die Anzahl der ESBL-bildenden Isolate ist bei Goossens und Grabein (2005) nur als prozentualer Anteil der Gesamtzahl der untersuchten Isolate angegeben.

Im Vergleich mit den zu 92,8% ESBL-negativen *Klebsiella* spp. aus der europäischen MYSTIC-Studie 2007 ergab sich für Meropenem eine um zwei Titerstufen höhere MHK₉₀, während die MHK₉₀ für Imipenem dort und in der vorliegenden Arbeit identisch waren (Tabelle 19).

MYSTIC 2007 <i>Klebsiella</i> spp. (<i>K. pneumoniae</i> (n=477), <i>K. oxytoca</i> (n=221), <i>K. terrigena</i> (n=1)) 7,2% davon ESBL-positiv			Eigene Untersuchungsergebnisse ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=88)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Imipenem	0,25	0,5	0,12	0,5
Meropenem	0,03	0,06	≤0,06	0,25
Gentamicin	0,5	64	32	128

Tabelle 19: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für *Klebsiella* spp. (92,8% ESBL-negativ) aus dem europäischen Teil der MYSTIC-Studie 2007 und den ESBL-positiven *K. pneumoniae* aus der eigenen Untersuchung

Alle 27 *K. oxytoca* Stämme waren sensibel gegenüber den drei untersuchten Carbapenemen, wobei die MHK₉₀ für Meropenem und Imipenem der jeweiligen MHK₉₀ für ESBL-positive *Klebsiella* spp. aus den europäischen Zentren der MYSTIC-Studie in den Jahren 2002, 2003 und 2004 entsprach (Tabelle 20).

MYSTIC 2002, 2003 und 2004, MHK ₉₀ jeweils gleich ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n= 343*)		Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>K. oxytoca</i> (n=27)
Antibiotikum	MHK ₉₀	MHK ₉₀
Imipenem	0,5	0,5
Meropenem	0,12	0,12
Gentamicin	128 (nur 2004)	4

Tabelle 20: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *Klebsiella* spp. aus dem europäischen Teil der MYSTIC-Studie in den Jahren 2002, 2003 und 2004 (In diesen Jahren war die MHK₉₀ für Imipenem und Meropenem jeweils gleich.) und der eigenen Untersuchung

*Die Anzahl der ESBL-bildenden Isolate ist bei Goossens und Grabein (2005) nur als prozentualer Anteil der Gesamtzahl der untersuchten Isolate angegeben.

Im Vergleich mit den zu 92,8% ESBL-negativen *Klebsiella* spp. aus der europäischen MYSTIC-Studie 2007 ergab sich eine um eine Titerstufe höhere MHK₉₀ für Meropenem, während die

MHK₅₀ und MHK₉₀ für Imipenem mit den Werten aus der vorliegenden Arbeit übereinstimmen (Tabelle 21).

MYSTIC 2007 <i>Klebsiella</i> spp. (<i>K. pneumoniae</i> (n=477), <i>K. oxytoca</i> (n=221), <i>K. terrigena</i> (n=1)) 7,2% davon ESBL-positiv			Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>K. oxytoca</i> (n=27)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Imipenem	0,25	0,5	0,25	0,5
Meropenem	0,03	0,06	≤0,06	0,12
Gentamicin	0,5	64	1	4

Tabelle 21: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für *Klebsiella* spp. (92,8% ESBL-negativ) aus dem europäischen Teil der MYSTIC-Studie 2007 (Turner 2009) und den ESBL-positiven *K. oxytoca* aus der eigenen Untersuchung

Die in dieser Arbeit ermittelten MHK₉₀-Werte für Imipenem und Meropenem weichen um maximal eine Titerstufe von den entsprechenden Werten für ESBL-positive Isolate aus der europäischen MYSTIC-Studie in den Jahren 2002 bis 2004 ab. Verglichen mit den hauptsächlich ESBL-negativen Isolaten aus der europäischen MYSTIC-Studie 2007 ergibt sich eine Abweichung von maximal zwei Titerstufen nach oben (Tabelle 19).

Damit bestätigt sich auch *in vitro* die aus klinischen Studien bekannte Wirksamkeit der etablierten Carbapeneme Imipenem und Meropenem.

Unter allen untersuchten Stämmen erwies sich ein einziges *K. pneumoniae*-Isolat als Ertapenem-resistent (MHK: 2 mg/l), wobei, aufgrund von diskontinuierlichem Wachstum auf der Microtiterplatte, Zweifel an diesem Ergebnis bestehen.

In der Studie von Hernandez et al. (2006), in der ESBL-positive *E. coli* und *K. pneumoniae* aus 41 spanischen Krankenhäusern untersucht wurden, ergaben sich für die MHK₉₀ von Ertapenem identische Werte wie in der vorliegenden Arbeit (Tabellen 22 und 23). Die in der genannten Studie untersuchten ESBL-Bildner wurden im Rahmen von zwei Surveillance-Studien (Hernandez et al. 2003; Romero et al. 2005), zwischen 1995 und 2001, in Spanien isoliert.

ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=289) aus einer spanischen Multizenterstudie (Hernandez et al. 2006)			Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=159)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ertapenem	≤0,03	0,12	≤0,06	0,12
Imipenem	0,12	0,25	0,12	0,25
Meropenem	≤0,03	≤0,03	≤0,06	≤0,06

Tabelle 22: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus einer spanischen Multizenter Studie (Hernandez et al. 2006) und der eigenen Untersuchung

ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=174) aus einer spanischen Multizenterstudie (Hernandez et al. 2006)			Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=88)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ertapenem	≤0,03	0,25	≤0,06	0,25
Imipenem	0,12	0,25	0,12	0,5
Meropenem	≤0,03	0,06	≤0,06	0,25

Tabelle 23: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *K. pneumoniae* aus einer spanischen Multizenterstudie (Hernandez et al. 2006) und der eigenen Untersuchung

Tamayo et al. (2007) untersuchten 279 ESBL-positive *E. coli*-Kulturen, die in den Jahren 2005/2006 aus dem Urin ambulanter Patienten in Madrid isoliert worden waren. Die MHK₉₀ für Ertapenem lag mit 0,06 mg/l eine Titerstufe niedriger als in der vorliegenden Arbeit, während sie für Imipenem mit 0,5 mg/l eine Titerstufe höher lag (Tabelle 24).

ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=279) Tamayo et al. (2007)			Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=159)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ertapenem	0,03	0,06	≤0,06	0,12
Imipenem	0,25	0,5	0,12	0,25
Gentamicin	≤0,5	>8	1	32
Amikacin	2	8	4	4

Tabelle 24: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus Urin ambulanter Patienten in Madrid (Tamayo et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

Livermore et al. (2001) untersuchten 181 ESBL-positive *Klebsiella* spp. und fanden die MHK₉₀ für Ertapenem mit 0,06 mg/l um zwei Titerstufen niedriger als in der vorliegenden Arbeit. Die 181 *Klebsiella* spp. waren 1994 isoliert worden. Der Anteil von *K. oxytoca* an den 181 Isolaten wird dort nicht beziffert; in der vorliegenden Arbeit wurden jedenfalls 85% der *K. oxytoca* – Kulturen durch 0,06 mg/l Ertapenem gehemmt.

Jones et al. (2005) untersuchten 29 *E. coli* - und 34 *K. pneumoniae*- Stämme, die eine Vielzahl verschiedener ESBL exprimierten. Für *K. pneumoniae* ergab sich mit 0,25 mg/l dieselbe Ertapenem-MHK₉₀ wie in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 26), bei *E. coli* lag die MHK₉₀ für Ertapenem mit 0,25 mg/l eine Titerstufe höher als in dieser Arbeit (Tabelle 25).

ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=29) Jones et al. (2005)		Eigene Untersuchungsergebnisse ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=159)
Antibiotikum	MHK ₉₀	MHK ₉₀
Ertapenem	0,25	0,12
Imipenem	0,5	0,25
Meropenem	≤0,06	≤0,06

Tabelle 25: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus einer Studie von Jones et al. (2005) und der eigenen Untersuchung

ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=34) Jones et al. (2005)		Eigene Untersuchungsergebnisse ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=88)
Antibiotikum	MHK ₉₀	MHK ₉₀
Ertapenem	0,25	0,25
Imipenem	0,25	0,5
Meropenem	0,12	0,25

Tabelle 26: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *K. pneumoniae* aus einer Studie von Jones et al. (2005) und der eigenen Untersuchung

In einer Surveillance Studie aus Israel wurden 348 ESBL-bildende *E. coli* und 663 ESBL-bildende *Klebsiella* spp. untersucht (Colodner et al. 2007). Die MHK₉₀ für Ertapenem lag sowohl für *E. coli* als auch für *Klebsiella* spp. mit 0,5 mg/l bzw. 1 mg/l zwei Titerstufen höher, als in der vorliegenden Arbeit (Tabellen 27 und 28).

ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=348) aus einer israelischen Multizenterstudie			Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=159)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ertapenem	0,13	0,5	≤0,06	0,12
Imipenem	0,25	0,38	0,12	0,25
Meropenem	0,06	0,12	≤0,06	≤0,06

Tabelle 27: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus einer israelischen Multizenterstudie (Colodner et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n=663) aus einer israelischen multizenter Studie			Eigene Untersuchung ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=88)	
Antibiotikum	MHK ₅₀	MHK ₉₀	MHK ₅₀	MHK ₉₀
Ertapenem	0,19	1	≤0,06	0,25
Imipenem	0,25	0,5	0,12	0,5
Meropenem	0,06	0,25	≤0,06	0,25

Tabelle 28: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *Klebsiella* spp. aus einer israelischen Multizenterstudie (Colodner et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

Die in unserer Studie für Ertapenem ermittelten MHK-Werte stimmen mit den Ergebnissen von Hernandez et al. (2006) und bezüglich *K. pneumoniae* auch mit den Ergebnissen von Jones et al. 2005 überein. Bei den von Hernandez et al. (2006) untersuchten Stämmen handelt es sich, wie bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolaten, um klinische Isolate von überwiegend hospitalisierten Patienten. Verglichen mit den anderen genannten Studien findet sich jeweils maximal ein Unterschied von einer Titerstufe, mit Ausnahme des Untersuchungsberichtes von Livermore et al. (2001), in dem die MHK₉₀ zwei Titerstufen niedriger und der Surveillance Studie aus Israel von Colodner et al. (2007), in der die MHK₉₀ zwei Titerstufen höher lag.

Damit kann in der vorliegenden Arbeit die hohe In-vitro-Aktivität des Ertapenem gegen ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* bestätigt werden.

7.1.2. Gentamicin

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigen die in der Literatur vielfach beschriebene Parallelresistenz ESBL-bildender Bakterien gegenüber Gentamicin.

In den europäischen Zentren der MYSTIC-Studie betrug die MHK₉₀ ESBL-bildender *E. coli* für Gentamicin in den Jahren 1999-2004 128 mg/l oder mehr (Goossens und Grabein 2005); dabei schwankte die Sensibilitätsrate zwischen 33,3% und 66,7%. In der vorliegenden Arbeit lag die MHK₉₀ ebenfalls im resistenten Bereich, mit 32 mg/l aber um zwei Titerstufen niedriger. Nur 55,3% der *E. coli* – Isolate waren Gentamicin-sensibel (Tabelle 29).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>E. coli</i> (n=159)			ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=110*) MYSTIC 2004			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	32	55,3	--	128	66,7	2/4

Tabelle 29: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus MYSTIC Europa 2004 (Goossens und Grabein 2005) und der eigenen Untersuchung

*Die Anzahl der ESBL-bildenden Isolate ist bei Goossens und Grabein (2005) nur als prozentualer Anteil der Gesamtzahl der untersuchten Isolate angegeben.

Die hauptsächlich ESBL-negativen *E. coli* – Stämme in den europäischen Ergebnissen der MYSTIC-Studie von 2007 waren hingegen zu 90,1% gegen Gentamicin sensibel und wiesen eine um drei Titerstufen niedrigere MHK₉₀ als die in der vorliegenden Arbeit untersuchten ESBL-bildenden *E. coli* auf (Tabelle 30).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>E. coli</i> (n=159)			<i>E. coli</i> (n=781) davon 4,9% ESBL-positiv aus MYSTIC 2007			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	32	55,3	1	4	90,1	2/4

Tabelle 30: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für zu 4,9% ESBL-positiv *E. coli* aus MYSTIC Europa 2007 (Turner 2009) und der eigenen Untersuchung

Tamayo et al. (2007) isolierten 279 ESBL-bildende *E. coli* – Stämme aus dem Urin ambulanter Patienten in Madrid. Die Sensibilitätsrate für Gentamicin lag bei 81,3%. MHK-Werte wurden nur bis >8 mg/l bestimmt (Tabelle 31).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>E. coli</i> (n=159)			Tamayo et al. (2007) ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=279) aus Urin ambulanter Patienten in Madrid			MHK- Grenzwerte im mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	32	55,3	$\leq 0,5$	> 8	81,3	2/4
Amikacin	4	4	99,4	2	8	99,3	8/16

Tabelle 31: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus Urin ambulanter Patienten in Madrid (Tamayo et al. 2007) und der eigenen Untersuchung.

In der israelischen Surveillance Studie von Colodner et al. (2007) lagen die Werte für die MHK₅₀ und MHK₉₀ deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 32).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>E. coli</i> (n=159)			ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=348) (Colodner et al. 2007)			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	32	55,3	64	> 256	29	2/4
Amikacin	4	4	99,4	8	32	77,9	8/16

Tabelle 32: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-positive *E. coli* aus einer israelischen Multizenterstudie (Colodner et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

Gentamicin ist bei ESBL-bildenden *E. coli* nicht zuverlässig wirksam. Dies gilt auch für ESBL-bildende *K. pneumoniae* und *K. oxytoca*. Die Gentamicin-Sensibilitätsrate für ESBL-bildende *Klebsiella* spp. schwankte in den europäischen Zentren der MYSTIC-Studie in den Jahren 1997 bis 2004 zwischen 20% und 51,5%. Im selben Zeitraum lag die MHK₉₀ bei 64 mg/l bis > 128 mg/l.

In unseren Untersuchungen betrug die MHK₉₀ für *K. pneumoniae* 128 mg/l, für *K. oxytoca* 4 mg/l (Tabellen 33 und 34).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. pneumoniae</i> (n=88)			ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n=*114) MYSTIC 2004			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	32	128	21,6	--	128	47,5	2/4

Tabelle 33: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *Klebsiella* spp. aus MYSTIC Europa 2004 (Goossens und Grabein 2005) und der eigenen Untersuchung

*Die Anzahl der ESBL-bildenden Isolate ist bei Goossens und Grabein (2005) nur als prozentualer Anteil der Gesamtzahl der untersuchten Isolate angegeben.

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. oxytoca</i> (n=27)			ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n=*114) MYSTIC 2004			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	4	74	--	128	47,5	2/4

Tabelle 34: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *Klebsiella* spp. aus MYSTIC Europa 2004 (Goossens, Grabein 2005) und der eigenen Untersuchung

*Die Anzahl der ESBL-bildenden Isolate ist bei Goossens und Grabein (2005) nur als prozentualer Anteil der Gesamtzahl der untersuchten Isolate angegeben.

Die Ergebnisse der europäischen Zentren der MYSTIC-Studie 2007 (Turner 2009) zeigen auch bei ESBL-negativen *Klebsiella* spp. verbreitete Gentamicin-Resistenz (Tabellen 35 und 36).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. pneumoniae</i> (n=88)			<i>Klebsiella</i> spp. (n=699) davon 7,2% ESBL-positiv aus MYSTIC 2007			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	32	128	21,6	0,5	64	82,2	2/4

Tabelle 35: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für zu 7,2 % ESBL-bildende *Klebsiella* spp. aus MYSTIC Europa 2007 (Turner 2009) und der eigenen Untersuchung

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. oxytoca</i> (n=27)			Klebsiella spp. (n=699) davon 7,2% ESBL-positiv aus MYSTIC 2007			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	4	74	0,5	64	82,2	2/4

Tabelle 36: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für zu 7,2 % ESBL-bildende *Klebsiella* spp. aus MYSTIC Europa 2007 (Turner 2009) und der eigenen Untersuchung

In der israelischen Surveillance-Studie von Colodner et al. (2007) fanden sich auch für *Klebsiella* spp. höhere Gentamicin MHK-Werte, als in der vorliegenden Arbeit (siehe Tabellen 37 und 38).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. pneumoniae</i> (n=88)			ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n=663) Colodner et al. (2007)			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	32	128	21,6	96	>256	14,2	2/4
Amikacin	4	16	85,2	3	32	72,7	8/16

Tabelle 37: Vergleich zwischen Aminoglykosid-MHK-Werten (mg/l) für ESBL-positive *Klebsiella* spp. aus einer israelischen Multizenterstudie (Colodner et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. oxytoca</i> (n=27)			ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n=663) (Colodner et al. 2007)			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	4	74	96	>256	14,2	2/4
Amikacin	4	8	96,3	3	32	72,7	8/16

Tabelle 38: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-positive *Klebsiella* spp. aus einer israelischen Multizenterstudie (Colodner et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

Diese Resistenzraten zeigen, dass Gentamicin sich nicht für die Therapie von Infektionen durch ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* eignet.

7.1.3. Amikacin

Während Gentamicin klar als ungeeignet für die Therapie von Infektionen durch ESBL-Bildner erscheint, wurden in der vorliegenden Arbeit nur drei Amikacin-resistente *K. pneumoniae* Isolate gefunden. Allerdings wiesen zehn *K. pneumoniae* - sowie ein *E. coli*- und ein *K. oxytoca*-Stamm nur intermediäre Amikacin-Sensibilität auf.

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich 99,4% der *E. coli*- Isolate als Amikacin-sensibel. Ein ähnliches Ergebnis fand sich in einer Untersuchung von Tamayo et al. (2007), in der sich 99,3% der 279 ESBL-bildenden *E. coli* aus Urin ambulanter Patienten, als Amikacin-sensibel erwiesen (Tabelle 39).

In einer italienischen Surveillance-Studie von Luzzaro et al. (2006) fand sich unter 188 ESBL-positiven *E. coli* – Kulturen eine Amikacin-Sensibilitätsrate von 92,6%.

Rodriguez-Villalobos et al. (2006) gaben bei 162 ESBL-positiven *E. coli* –Isolaten aus einem belgischen Universitätsklinikum eine Amikacin-Sensibilitätsrate von 86% an (Rodriguez-Villalobos et al. 2006).

In der israelischen ESBL-Surveillance Studie von Colodner et al. (2007), in der 348 ESBL-bildende *E. coli* - Stämme aus verschiedenen Krankenhäusern untersucht wurden, lag die Amikacin-Sensibilitätsrate jedoch bei nur 77,9% und die MHK₉₀ drei Titerstufen höher als in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 40).

In Regionen mit günstiger Resistenzlage kommt Amikacin besonders bei lebensbedrohlichen Infektionen durch ESBL-bildende *E. coli* als Alternative zu den Carbapenemen und besonders in Kombination mit diesen in Frage.

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>E. coli</i> (n=159)			Tamayo et al. (2007) ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=279) aus Urin ambulanter Patienten in Madrid			MHK- Grenzwerte im mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	32	55,3	$\leq 0,5$	> 8	81,3	2/4
Amikacin	4	4	99,4	2	8	99,3	8/16

Tabelle 39: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-bildende *E. coli* aus Urin ambulanter Patienten in Madrid (Tamayo et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>E. coli</i> (n=159)			ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=348) Colodner et al. (2007)			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	32	55,3	64	> 256	29	2/4
Amikacin	4	4	99,4	8	32	77,9	8/16

Tabelle 40: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-positive *E. coli* aus einer israelischen Multizenterstudie (Colodner et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich 85,2 % der *K. pneumoniae* Isolate als Amikacin-sensibel, 11,4% als intermediär sensibel und 3,4% als resistent. In einer italienischen Surveillance-Studie von Luzzaro et al. (2006) fand sich unter 81 ESBL-positiven *K. pneumoniae* eine Amikacin-Sensibilitätsrate von nur 51,9 %.

Die in einer israelischen Surveillance-Studie von Colodner et al. (2007) untersuchten 663 *Klebsiella* spp. waren zu 72,7% Amikacin-sensibel, wobei der Wert der MHK₉₀ mit 32 mg/l um eine Titerstufe höher lag als in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 41).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. pneumoniae</i> (n=88)			ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n=663) Colodner et al. (2007)			MHK-Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	32	128	21,6	96	>256	14,2	2/4
Amikacin	4	16	85,2	3	32	72,7	8/16

Tabelle 41: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-positive *Klebsiella* spp. aus einer israelischen Multizenterstudie (Colodner et al. 2007) und der eigenen Untersuchung

In einer tschechischen Surveillance-Studie von Kolar et al. (2006), in der 117 ESBL-positive *K. pneumoniae*-Isolate aus dem Jahr 2004 untersucht wurden, fand sich eine Amikacin-Sensibilitätsrate von nur 54%. Die MHK₉₀ lag mit 32 mg/l eine Titerstufe höher als in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 42).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. pneumoniae</i> (n=88)			ESBL-positive <i>K. pneumoniae</i> (n=117) (Kolar et al. 2006)			MHK- Grenzwert in mg/l (\leq S/R $>$) (EUCAST)	Tschechische MHK- Grenzwerte mg/l (\leq S/R $>$)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%*		
Gentamicin	32	128	21,6	32	64	32%	2/4	4
Amikacin	4	16	85,2	8	32	54%	8/16	8

Tabelle 42: Vergleich zwischen MHK-Werten (mg/l) für ESBL-positive *K. pneumoniae* aus einer tschechischen Multizenterstudie (Kolar et al. 2006) und der eigenen Untersuchung

*In dieser Studie wurden noch tschechische MHK-Grenzwerte verwendet.

Innerhalb Europas bestehen offensichtlich deutliche regionale Unterschiede in der Häufigkeit der Amikacin-Resistenz bei *K. pneumoniae*. Amikacin ist bei Infektionen durch ESBL-bildende *Klebsiella-pneumoniae* – Stämme nicht zuverlässig wirksam und sollte daher nur unter Berücksichtigung der individuellen MHK-Resultate eingesetzt werden.

Unter den 27 im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten *K. oxytoca* fand sich ein Stamm mit intermediärer Sensibilität, aber kein vollständig resistentes Isolat. Die MHK₉₀ für Amikacin lag mit 8 mg/l eine Titerstufe niedriger als die von *K. pneumoniae* (Tabelle 43).

Antibiotikum	Eigene Untersuchung <i>K. oxytoca</i> (n=27)			Eigene Untersuchung <i>K. pneumoniae</i> (n=88)			MHK-Grenzwert in mg/l (≤S/R>) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	
Gentamicin	1	4	74	32	128	21,6	2/4
Amikacin	4	8	96,3	4	16	85,2	8/16

Tabelle 43: Vergleich der Aminoglycosid-Empfindlichkeit von *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* in der eigenen Untersuchung

Für einen Einsatz in der empirischen Therapie sind Resistenzen gegenüber Amikacin zu häufig. In der Therapie nach Antibiogramm kann Amikacin jedoch helfen Carbapeneme zu sparen.

7.1.4. Colistin

In unserem Bakterienkollektiv fanden sich 15 *K. pneumoniae*-Stämme und jeweils ein *E. coli* und *K. oxytoca* Stamm mit Colistin-Resistenz. In der Literatur werden nur wenige Daten zur Colistin-Sensibilität ESBL-bildender *Enterobacteriaceae* mitgeteilt.

In einer Studie aus Israel von Bishara et al. (2005) mit 241 ESBL-positiven *K. pneumoniae* und 57 ESBL-positiven *E. coli*-Kulturen erwiesen sich alle Isolate als Colistin-sensibel. Es ist allerdings unklar, welchen MHK-Grenzwert die Autoren verwendeten .

Die in einer Studie aus dem Libanon von Hamze et al. (2003) untersuchten ESBL-positiven *K. pneumoniae* (n=46), *E. coli* (n=40) und *K. oxytoca* (n=22) erwiesen sich ebenfalls alle als Colistin-sensibel, wobei die MHK-Grenzwerte der Société Française de Microbiologie von 2001 verwandt wurden.

Antibiotikum	<i>E. coli</i> (n=159)			<i>K. pneumoniae</i> (n=88)			<i>K. oxytoca</i> (n=27)			MHK- Grenzwerte in mg/l (≤S/R>) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	
Colistin	0,25	0,25	99,3	0,25	8	82,9	0,12	0,25	96,3	2/2

Tabelle 44: Eigene Untersuchung: Sensibilität in % und MHK₅₀ und MHK₉₀ in mg/l für Colistin

Antoniadou et al. (2007) isolierten auf einer griechischen Intensivstation in den Jahren 2004 und 2005 18 Colistin-resistente *K. pneumoniae* Stämme (Colistin-MHK zwischen 12 und > 1024 mg/l), von denen 15 zugleich ESBL exprimierten.

11 der 18 Stämme exprimierten ESBL und Metallo-β-Laktamasen. Die meisten Patienten mit Nachweis von Colistin-resistenten *K. pneumoniae* waren über mehrere Wochen mit Colistin behandelt worden.

Poudyal et al. (2008) wiesen bei 15 multiresistenten *K. pneumoniae* Stämmen, die bei MHK-Bestimmung nach CLSI-Standard als Colistin-sensibel erschienen, Colistin-resistente Subpopulationen nach. Bei einigen dieser heteroresistenten Stämme kam es innerhalb von 24 Stunden, sogar bei einer Colistin-Konzentration die dem 64-fachen des initial bestimmten MHK-Werts entsprach, zu erneutem Wachstum. Für Colistin wurde in dieser Studie kein signifikanter postantibiotischer Effekt nachgewiesen. Die Autoren bezeichnen die Monotherapie mit Colistin von Infektionen mit multiresistenten *K. pneumoniae*, insbesondere bei langen Dosierungsintervallen, als problematisch. Angesichts einer Resistenzrate von 17,1% in der vorliegenden Arbeit erscheint Colistin für die Therapie von Infektionen durch ESBL-bildende *K. pneumoniae* als weniger attraktive Option. Die In-vitro-Sensibilität der *E. coli*-Isolate in der vorliegenden Arbeit spricht dafür, dass Colistin eine therapeutische Alternative darstellen könnte. Jedoch fehlen klinische Studien. Ob bei *E. coli* Heteroresistenz wie bei *K. pneumoniae* vorkommt, ist nicht bekannt.

7.1.5. Temocillin

Temocillin wird aufgrund seiner Stabilität gegenüber β-Laktamasen als mögliche therapeutische Alternative in der Behandlung von Infektionen durch ESBL- und AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* betrachtet (Livermore und Tulkens 2009). Zur Temocillin-Empfindlichkeit

dieser Erreger sind jedoch nur wenige Daten vorhanden. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich folgende Werte für MHK_{50} und MHK_{90} und die Sensibilität: (Tabelle 45).

Antibiotikum	<i>E. coli</i> (n=159)			<i>K. pneumoniae</i> (n=88)			<i>K. oxytoca</i> (n=27)			MHK- Grenzwerte in mg/l ($\leq S/R >$) (BSAC)
	MHK_{50}	MHK_{90}	%S	MHK_{50}	MHK_{90}	%S	MHK_{50}	MHK_{90}	%S	
Temocillin	8	16	83	8	32	77,3	8	16	88	8/8 bei systemischen Infektionen
			98,7			97,7			100	32/32 bei un- komplizierten Harnwegs- infektionen

Tabelle 45: Eigene Untersuchung: Sensibilität in % und MHK_{50} und MHK_{90} in mg/l für Temocillin in der eigenen Untersuchung

Livermore et al. (2006) untersuchten insgesamt 846 ESBL- und AmpC-bildende *Enterobacteriaceae* aus Süd-Ost England auf Temocillin-Sensibilität. Unter diesen befanden sich 293 CTX-M bildende *E. coli* sowie 88 *E. coli*, die andere ESBL exprimierten und desweiteren 224 ESBL-bildende *Klebsiella* spp., von denen 199 CTX-M und 25 andere ESBL besaßen. Für die MHK_{50} und MHK_{90} ergaben sich identische Werte wie in der vorliegenden Arbeit (Tabellen 46 und 47). Livermore et al. geben eine Sensibilitätsrate von 88% für alle 846 untersuchten Isolate an; dabei beziehen sie sich auf einen MHK-Grenzwert von ≤ 16 mg/l. Jedoch hat die BSAC vor kurzem einen MHK-Grenzwert von ≤ 8 mg/l für systemische Infektionen festgelegt (Andrews 2008). Anhand dieses MHK-Grenzwertes wären nur 66% der *E. coli* und 54% der *Klebsiella* spp. als Temocillin-sensibel einzustufen. Die Sensibilitätsrate ist damit dann geringer als in der vorliegenden Arbeit (Tabellen 46 und 47).

Antibiotikum	<i>E. coli</i> (n=159) Eigene Untersuchung			ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=381) 293 CTX-M und 88 Non-CTX-M ESBL Livermore et al. (2006)			MHK- Grenzwerte in mg/l (\leq S/R $>$) (BSAC)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	
Temocillin	8	16	83	8	16	66*	8/8

*In der Studie von Livermore et al. 2006 wurde noch ein MHK-Grenzwert von 16 mg/l verwendet; daher sind dort andere Werte für die Sensibilität angegeben

Tabelle 46: Eigene Untersuchung im Vergleich mit Livermore et al. (2006): Activity of temocillin against prevalent ESBL and AmpC-producing Enterobacteriaceae from south-east England.

Antibiotikum	<i>K. pneumoniae</i> (n=88) Eigene Untersuchung			ESBL-positive <i>Klebsiella</i> spp. (n=224) 25 Non-CTX-M ESBL und 199 CTX- M Livermore et al. 2006			MHK- Grenzwerte in mg/l (\leq S/R $>$) (BSAC)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	
Temocillin	8	32	77,3	8	32	54*	8/8

*In der Studie von Livermore et al. (2006) wurde noch ein MHK-Grenzwert von 16 mg/l verwendet,. Daher sind dort andere Werte für die Sensibilität angegeben.

Tabelle 47: Eigene Untersuchung im Vergleich mit Livermore et al. (2006): Activity of temocillin against prevalent ESBL and AmpC-producing Enterobacteriaceae from south-east England.

Rodriguez-Villalobos et al. (2006) untersuchten 162 ESBL-bildende *E. coli* aus einem Universitätskrankenhaus in Brüssel. Bei Interpretation anhand des aktuellen BSAC MHK-Grenzwerts ergibt sich aus den in der Studie angegebenen MHK-Werten eine Sensibilitätsrate von 81%. Dies entspricht der Sensibilität von *E. coli* in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 48).

Antibiotikum	<i>E. coli</i> (n=159) Eigene Untersuchung			ESBL-positive <i>E. coli</i> (n=162) Rodriguez- Villalobos et al. 2006			MHK- Grenzwerte in mg/l (\leq S/R $>$) (BSAC)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	
Temocillin	8	16	83	8	32	81*	8/8

*In der Studie von Rodriguez-Villalobos et al.(2006) wurden noch MHK-Grenzwerte von (\leq S/R $>$ 16/32 mg/l) verwendet; daher sind dort andere Werte für die Sensibilität angegeben.

Tabelle 48: Eigene Untersuchungsergebnisse im Vergleich mit den Daten von Rodriguez-Villalobos et al. 2006

In einer weiteren belgischen Studie von Glupczynski et al. (2007) wurden, neben einer größeren Zahl von ESBL-negativen *Enterobacteriaceae*, 23 ESBL-positive *K. pneumoniae*, 12 ESBL-positive *E. coli* und 4 ESBL-positive *K. oxytoca* auf Temocillin Empfindlichkeit getestet. In dieser Studie wurden für Temocillin MHK-Grenzwerte aus den achtziger Jahren (Fuchs et al. 1985) verwendet: sensibel: MHK \leq 16, resistent: MHK \geq 32.

Von den 12 ESBL-positiven *E. coli* Isolaten wiesen 5 eine MHK von 16 mg/l und eines eine MHK von 64 mg/l auf. Damit wären nach dem aktuellen BSAC Grenzwert von 8 mg/l 50 % der untersuchten ESBL-positiven *E. coli* Temocillin-resistent gewesen.

19 der 23 ESBL-positiven *K. pneumoniae* wiesen eine MHK \geq 16 mg/l auf. Dies entspricht nach dem BSAC Grenzwert 82% Temocillin-Resistenz. Auch die vier ESBL-positiven *K. oxytoca* zeigten eine MHK \geq 16 mg/l auf. Bei Interpretation anhand des BSAC MHK-Grenzwerts für unkomplizierte Harnwegsinfektionen (S \leq 32 mg/l) wären jedoch alle Isolate, bis auf einen *E. coli* Stamm, als Temocillin-sensibel einzustufen.

Insgesamt stimmen die in der vorliegenden Arbeit für Temocillin gefunden Werte mit den Daten aus England und Belgien überein. Bei einem MHK-Grenzwert von 8 mg/l ist ein erheblicher Teil der ESBL-bildenden *Enterobacteriaceae* als resistent zu betrachten. In der Therapie nach Antibiogramm wäre Temocillin jedoch möglicherweise geeignet, den Einsatz von Carbapenemen zu begrenzen.

7.1.6. Tigecyclin

In der vorliegenden Arbeit befanden sich die minimalen Hemmkonzentrationen von Tigecyclin gegenüber allen geprüften Bakterienstämmen mit Ausnahme eines einzigen *E. coli*-Isolates im sensiblen Bereich ≤ 1 mg/l (Tabelle 49).

Antibiotikum	<i>E. coli</i> (n=159)			<i>K. pneumoniae</i> (n=88)			<i>K. oxytoca</i> (n=27)			MHK- Grenzwerte in mg/l (\leq S/R>) (EUCAST)
	MHK ₅₀	MHK ₉₀	S%	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	MHK ₅₀	MHK ₉₀	%S	
Tigecyclin	$\leq 0,06$	0,12	99,4	0,25	0,5	100	0,25	1	100	1/2

Tabelle 49: Tigecyclin-Sensibilität unserer Teststämme (Angaben in % sowie als MHK₅₀ und MHK₉₀ in mg/l).

Die Sensibilitätsrate von *E. coli* betrug in der vorliegenden Arbeit 99,4%. Dies entspricht den Angaben in der Literatur. Kelesidis et al. (2008) ermittelten durch Auswertung von 16 Studien eine Sensibilitätsrate von 99,7% für 737 ESBL-positive *E. coli*-Isolate nach EUCAST-Grenzwerten.

Jedoch steht die lückenlose Tigecyclin-Sensibilität von *K. pneumoniae* im Gegensatz zu den in der Literatur berichteten Sensibilitätsraten. In ihrer Übersichtsarbeit werteten Kelesidis et al. (2008) 14 Studien zur Tigecyclin-Empfindlichkeit ESBL-bildender *Klebsiella* spp. aus. Dabei ergab sich für insgesamt 1284 Isolate eine Sensibilitätsrate von 72,3%, ebenfalls nach EUCAST Kriterien.

Die vollständige Sensibilität von *K. oxytoca* in der vorliegenden Arbeit ist mit den Angaben in der Literatur vereinbar. Im German Tigecycline Evaluation Surveillance Trial (G.T.E.S.T., Kresken et al. 2008) waren 97 von 100 untersuchten *K. oxytoca*-Isolaten Tigecyclin-sensibel. Allerdings waren nur 9 % der dort untersuchten *K. oxytoca* ESBL-positiv.

Die in unserer Untersuchung gefundenen Tigecyclin-MHK-Werte für *K. pneumoniae* und *E. coli* liegen deutlich unter den Messwerten in vergleichbaren Publikationen. In den Tabellen 50, 51 und 52 werden die MHK₅₀ und MHK₉₀-Werte aus der vorliegenden Arbeit entsprechenden Resultaten vergleichbarer Studien gegenüber gestellt. Verglichen mit unseren eigenen Daten

wurden in allen publizierten Untersuchungen mit Tigecyclin um 1 bis 3,5 Titerstufen höhere MHK_{90} -Werte für *E. coli* und *K. pneumoniae* gefunden.

Andererseits entsprechen die in der vorliegenden Arbeit für *K. oxytoca* gefundenen MHK_{50} und MHK_{90} -Werte für Tigecyclin den publizierten Daten anderer Autoren (Tabelle 53). Allerdings konnten nur in drei Veröffentlichungen Tigecyclin-MHK-Werte für *K. oxytoca* gefunden werden. Des Weiteren stehen in der Internet-Datenbank von EUCAST (EUCAST, 2009) MHK-Werte-Verteilungen von Wildtyp-Bakterien zur Verfügung. In den Abbildungen 17, 18 und 19 werden die MHK-Werte-Verteilungen der Wildtyp-Bakterien den MHK-Werte-Verteilungen der ESBL-positiven Bakterien aus unserer Untersuchung gegenübergestellt. Dabei zeigen sich die ESBL-positiven Isolate von *E. coli* und *K. pneumoniae* in unserem Stammkollektiv deutlich empfindlicher gegenüber Tigecyclin als der Wildtyp der jeweiligen Spezies, was nicht plausibel erscheint. Zu erwarten wäre eine im Vergleich zum Wildtyp gleichartige oder erhöhte Resistenz der ESBL-positiven Isolate. Bei den Tigecyclin-Konzentrationen 0,06 mg/l, 0,12 mg/l und 0,25 mg/l scheinen auch die ESBL-positiven *K. oxytoca*-Stämme zu einem höheren Prozentsatz gehemmt zu sein als die Wildtyp-Stämme. Dies ist ebenfalls nicht plausibel und könnte auf einen Fehler beim Zustandekommen der Tigecyclin-Messwerte in unserer Untersuchung hinweisen, der jede der drei untersuchten Spezies betrifft.

In den drei Publikationen (Tabelle 53) mit Angaben zu MHK_{50} und MHK_{90} -Werten für Tigecyclin bei *K. oxytoca*, die maximal eine Titerstufe von den MHK_{50} und MHK_{90} -Werten in unserer Untersuchung abweichen, wurden neben den MHK_{50} und MHK_{90} -Werten keine MHK-Einzeldaten mitgeteilt, so dass ein genauer Vergleich der MHK-Einzelwerte-Verteilungen nicht möglich ist.

Bei der Bestimmung der MHK-Werte mit dem Micronaut-S-MHK wurden die Bakterienstämme nicht als Kollektive der unterschiedlichen Spezies, sondern in der chronologischen Reihenfolge untersucht, in der sie aus dem klinischen Untersuchungsmaterial isoliert worden waren. Die *K. oxytoca* Stämme waren daher innerhalb dieser Reihenfolge gleichmäßig verteilt. Dementsprechend ist anzunehmen, dass die *K. oxytoca*-Stämme unter identischen Bedingungen untersucht wurden wie die Stämme der beiden anderen Spezies.

Eine mögliche Erklärung für die unplausibel niedrigen MHK-Werte wäre ein Fehler bei der Herstellung der Microtiterplatten, wie z.B. systematisch zu große Mengen an Tigecyclin – doch diese Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da alle verwendeten MHK-Platten der selben Charge entstammten und die Qualitätskontrollen seitens des Herstellers problemlos durchlaufen

hatten. Das Alter der verwendeten Mueller-Hinton-Bouillon kann Einfluss auf die Aktivität von Tigecyclin haben. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Tigecyclin wird durch in der Bouillon gelösten Sauerstoff inaktiviert. In weniger als 12 Stunden alter Bouillon ist die Aktivität von Tigecyclin deutlich höher als in gealterter Bouillon, in der sich mehr Sauerstoff gelöst hat (Bradford et al. 2005; Petersen et al. 2005). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Mueller-Hinton-Bouillon war meist älter als 12 Stunden; dies hätte zu verringerter Aktivität des Tigecyclins führen müssen. Die erstaunlich niedrigen MHK-Werte lassen sich also nicht mit dem Alter der Bouillon erklären.

Für den zur Qualitätskontrolle verwendeten Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922 ergab sich bei allen Messungen eine Tigecyclin-MHK $\leq 0,06$ mg/l. Dies bedeutet, dass auch in der Kavität mit der geringsten Tigecyclin-Konzentration kein Wachstum feststellbar war. Da der Messbereich der in unserer Untersuchung verwendeten Microtiterplatten keine niedrigeren MHK-Werte als $\leq 0,06$ mg/l erfasst, kann nicht beurteilt werden, ob die MHK des Referenzstamms innerhalb des für die Qualitätskontrolle vorgeschlagen Referenzbereichs von 0,03 bis 0,25 mg/l (Brown und Traczewski 2007) oder darunter lag. Für den zur Qualitätskontrolle verwendeten *P. aeruginosa* Stamm ATCC 27853 konnte in der Literatur kein Referenzbereich für Bouillon-Mikrodilutionstests mit Tigecyclin gefunden werden. Dies beruht vermutlich darauf, dass Tigecyclin als ungeeignet zur Therapie von Infektionen mit *P. aeruginosa* gilt.

Die MHK-Werte beider Referenzstämme für Imipenem, Meropenem, Amikacin und Gentamicin lagen jeweils, bei allen Messungen, innerhalb des Referenzbereichs.

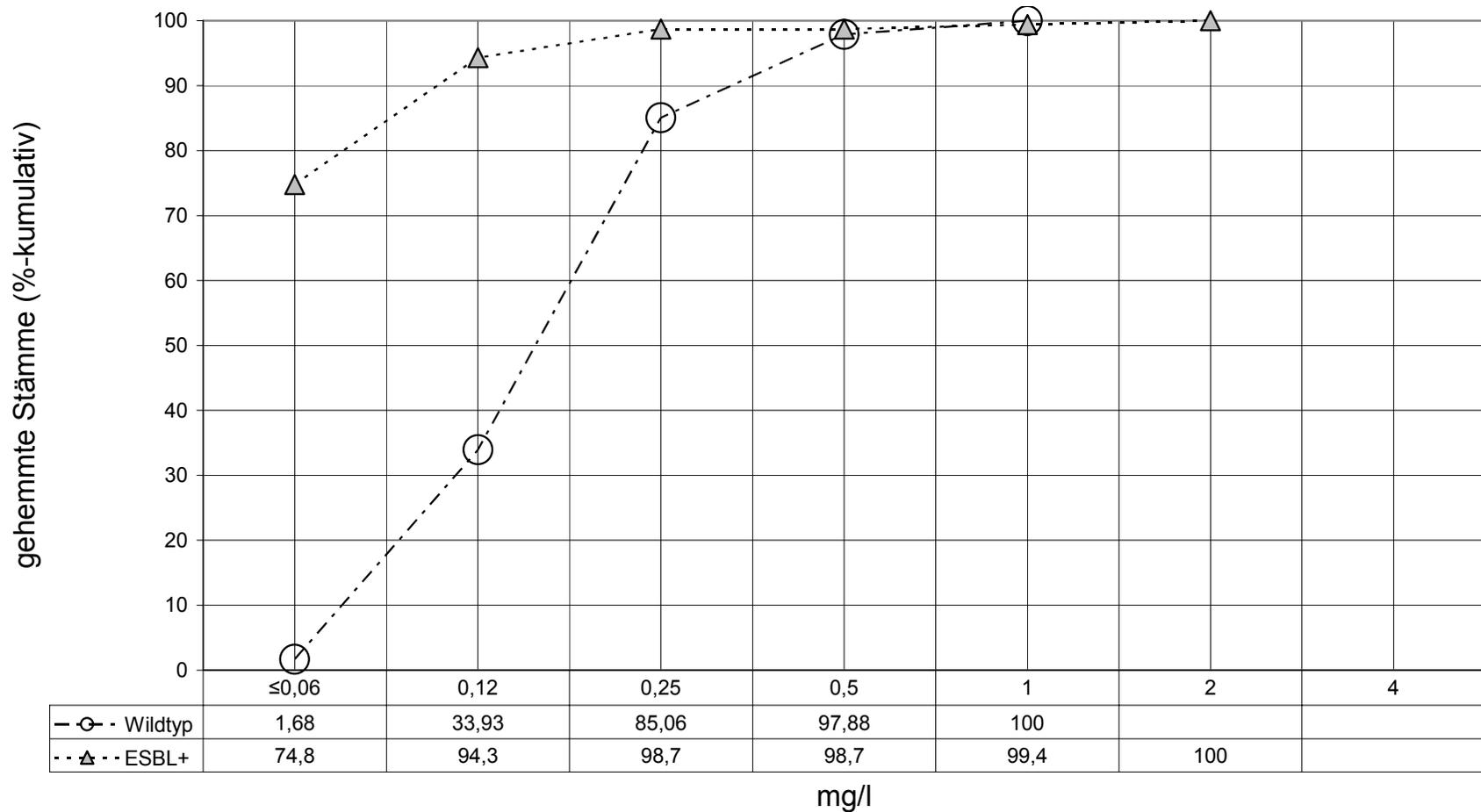


Abbildung 17: Tigecyclin-Sensibilität von ESBL-positiven *Escherichia coli* (n=159) aus der eigenen Untersuchung im Vergleich mit Tigecyclin-Sensibilität von Wildtyp *Escherichia coli* (n=2605) aus EUCAST Internet-Datenbank

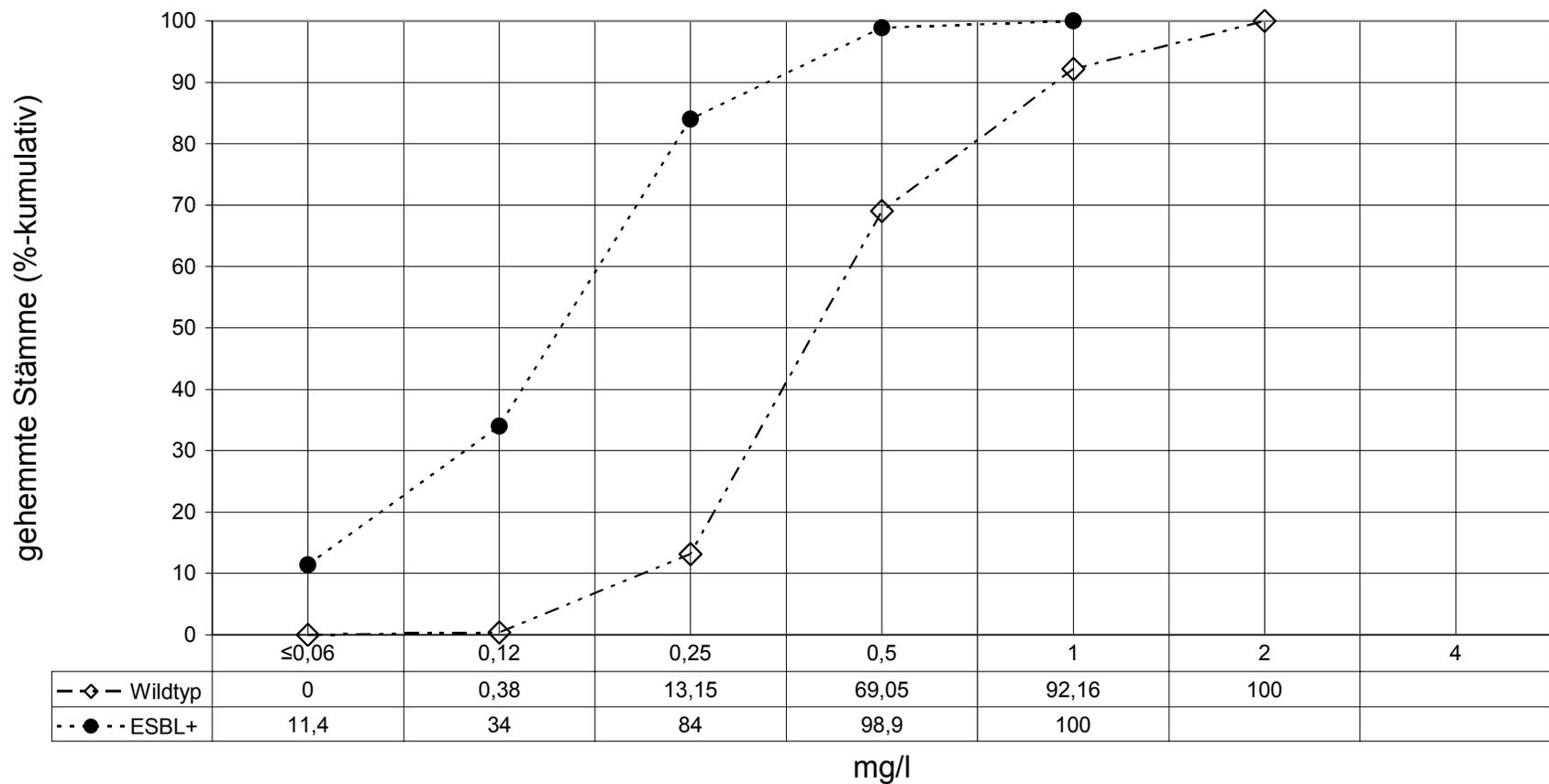


Abbildung 18: Tigecyclin-Sensibilität von ESBL-positiven *Klebsiella pneumoniae* (n=88) aus der eigenen Untersuchung im Vergleich mit Tigecyclin-Sensibilität von Wildtyp *Klebsiella pneumoniae* (n=1034) aus EUCAST Internet-Datenbank

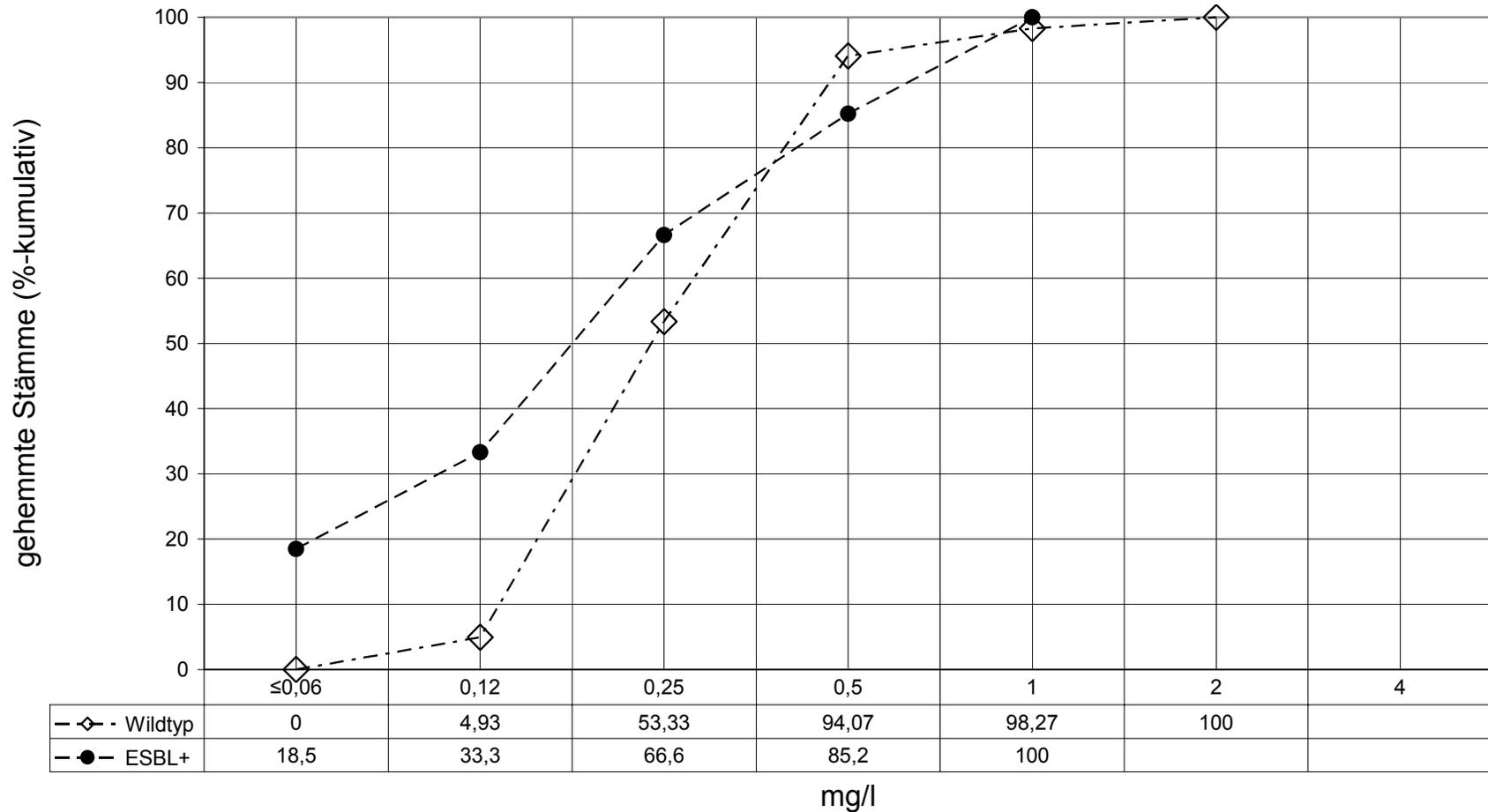


Abbildung 19: Tigecyclin-Sensibilität von ESBL-positiven *Klebsiella oxytoca* (n=27) aus der eigenen Untersuchung im Vergleich mit Wildtyp *Klebsiella oxytoca* (n=405) aus EUCAST Internet-Datenbank

Tigecyclin	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Titerstufendifferenz der MHK ₉₀ zur eigenen Untersuchung
Naesens et al. 2008 (n=26)	1	1,5	3,5
Biedenbach et al. 2001 (n=35)	0,12	0,5	2
Bouchillion et al. 2009 (n=87)	--	0,5	2
Hoban et al. 2005 (n=24)	0,25	0,5	2
Hope et al. 2006 (n=380)	0,25	0,5	2
Lu et al. 2008 (n=275)	0,12	0,5	2
Gales et al. 2008 (n=63)	0,12	0,25	1
Kresken et al. 2008 (n=300) davon 5,3% ESBL-positive	≤0,12	0,25	1
Sader et al. 2005 (n=721) davon 10% ESBL-positive	0,25	0,25	1
Eigene Untersuchung (n=159)	≤0,06	0,12	

Tabelle: 50 Tigecyclin MHK₅₀ und MHK₉₀-Werte in mg/l für ESBL-bildende *E. coli* in 9 Studien. 100% der Isolate sind ESBL-positiv, wenn nichts anderes vermerkt ist.

Tigecyclin	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Titerstufendifferenz der MHK ₉₀ zur eigenen Untersuchung
Kresken et al. 2008 (n=186) davon 4,3% ESBL-positive	0,5	4	3
Bouchillion et al. 2009 (n=112)	--	2	2
Hoban et al. 2005 (n=92)	1	2	2
Lu et al. 2008 (n=322)	0,5	2	2
Waits et al. 2006 (n=126)	1	2	2
Ku et al. 2007 (n=57)	0,38	1,5	1,5
Biedenbach et al. 2001 (n=61)	0,25	1	1
Eigene Untersuchung (n=88)	0,25	0,5	

Tabelle 51: Tigecyclin MHK₅₀ und MHK₉₀-Werte in mg/l für ESBL-bildende *K. pneumoniae* in 7 Studien. 100% der Isolate sind ESBL-positiv, wenn nichts anderes vermerkt ist.

Tigecyclin	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Titerstufendifferenz der MHK ₉₀ verglichen mit der MHK ₉₀ von <i>K.pneumoniae</i> in der eigenen Untersuchung
Naesens et al. 2008 (n=10) 8 <i>K. pneumoniae</i> und 2 <i>K. oxytoca</i>	2	4	3
Hope et al. 2006 (n=224)	1	2	2
Gales 2008 (n=100)	0,5	1	1
Sader et al. 2005 (n=582) davon 31% ESBL-positiv	0,5	1	1
Eigene Untersuchung <i>K. pneumoniae</i> (n=88)	0,25	0,5	

Tabelle 52: Tigecyclin MHK₅₀ und MHK₉₀-Werte in mg/l für ESBL-bildende *Klebsiella* spp. in 4 Studien. 100% der Isolate sind ESBL-positiv, wenn nichts anderes vermerkt ist.

Tigecyclin	MHK ₅₀	MHK ₉₀	Titerstufendifferenz der MHK ₉₀ zur eigenen Untersuchung
<i>K. oxytoca</i> (n=8) 100% ESBL-positiv Lu et al. 2008	0,5	1	0
<i>K. oxytoca</i> (n=100) 9% ESBL-positiv Kresken et al. 2008	0,25	0,5	-1
Waits et al. 2006 <i>K. oxytoca</i> (n=248) darunter keine ESBL-positiven	0,25	1	0
EUCAST 2009 Wildtyp- <i>K. oxytoca</i> (n=405)	0,25	0,5	-1
Eigene Untersuchung (n=27)	0,25	1	

Tabelle 53: Tigecyclin MHK₅₀ und MHK₉₀-Werte in mg/l für *K. oxytoca* in 3 Studien und nach EUCAST 2009.

7.2. Micronaut-S-ESBL

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Validität des Micronaut-S-ESBL-Testsystems anhand eines Stammkollektivs klinischer Bakterienisolate zu prüfen, die mit Hilfe des Etest-ESBL als ESBL-positiv identifiziert worden waren.

Bei Verwendung des vom Hersteller angegebenen Standard-Inokulums und einer Bebrütungsdauer von 18 bis 24 h ergab sich nahezu vollständige Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Testverfahren (Tabelle 54).

<i>E. coli</i> (n=158)		<i>K. pneumoniae</i> (n=87)		<i>K. oxytoca</i> (n=26)	
absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
157	99,3%	86	98,8%	24	92,3%

Tabelle 54: Anteil der Bakterienstämme, die von Micronaut-S-ESBL nach Übernacht-Inkubation übereinstimmend mit Etest-ESBL als ESBL- positiv erkannt wurden

Die Spezifität des Micronaut-S-ESBL wurde anhand von 167 zufällig ausgewählten Bakterienkulturen aus der Routine-Diagnostik, von denen 154 ESBL-negativ waren, überprüft. Falsch-positive Ergebnisse traten nicht auf.

Micronaut-S-ESBL hat sich damit als brauchbare Alternative zum Etest-ESBL erwiesen, wobei ein wesentlicher Vorteil des Micronaut-S-ESBL in den deutlich niedrigeren Kosten pro Test liegen dürfte. Beim Ablesen des Etest-ESBL können in den Hemmhöfen wachsende Einzel-Kolonien sowie durch Diffusion von Clavulansäure bedingte „Phantomzonen“ zu Interpretationsschwierigkeiten führen (Leverstein-van Hall et al. 2002). Diese Probleme können bei Micronaut-S-ESBL nicht auftreten. Jedoch erwies sich die Interpretation der Farbe des Redoxindikators Resazurin in einzelnen Fällen als problematisch; dies wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht systematisch untersucht.

7.3. Micronaut-S-ESBL als Schnelltest

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchungen bestand in der Prüfung der Frage, ob sich der sichere ESBL-Nachweis mit dem Micronaut-S-ESBL bei Verwendung eines fünffach höher konzentrierten Inokulums im Vergleich mit dem Standard-Inokulum auf sechs Stunden beschleunigen lässt.

Ein ESBL-Bestätigungstest, der innerhalb desselben Arbeitstages abgeschlossen werden könnte, würde es ermöglichen, die Antibiotika-Therapie früher umzustellen oder anzupassen und gezielte hygienische Maßnahmen früher einzuleiten.

Bei Verwendung des fünffach höher konzentrierten Standard-Inokulums wurden jedoch nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden nur 65,8% der *E. coli* -, 52,8% der *K. pneumoniae* - und 46,1% der *K. oxytoca*- Isolate als ESBL-positiv erkannt (Tabelle 55). Die falsch-negativen Ergebnisse rührten ganz überwiegend daher, dass sich in jeweils allen mit einem Stamm beimpften Kavitäten starker Farbumschlag zeigte, so dass eine MHK-Reduktion durch Clavulansäure nicht erkennbar war (Beispielhaft zu erkennen in Abbildung 20). Nur bei 3 *E. coli*- und 2 *K. pneumoniae*-Stämmen sowie einem *K. oxytoca* -Stamm war nach sechsständiger Bebrütung noch kein Farbumschlag bzw. nur ein für eine Interpretation zu schwacher Farbumschlag vorhanden.

Bei fünffach erhöhter Konzentration des Inokulums zeigte sich eine inakzeptabel hohe Zahl von falsch-negativen Ergebnissen (Tabelle 55).

<i>E. coli</i> (n=158)		<i>K. pneumoniae</i> (n=87)		<i>K. oxytoca</i> (n=26)	
absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
104	65,8%	46	52,8%	12	46,1%

Tabelle 55: Anteil der ESBL-positiven Bakterienstämme, die von Micronaut-S-ESBL bei sechsständiger Inkubation mit fünffach höher konzentriertem Standard-Inokulum, als ESBL- positiv erkannt wurden

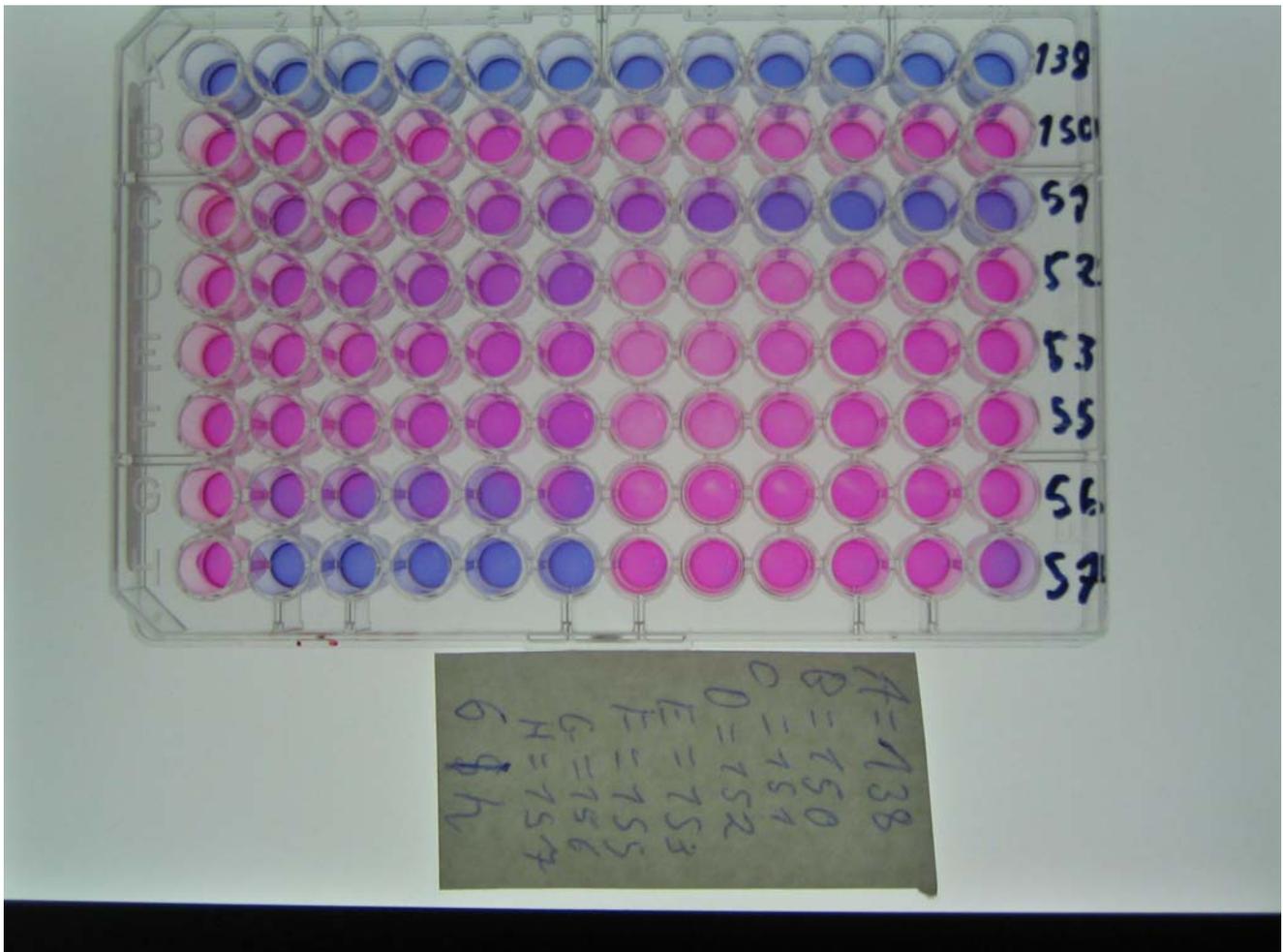


Abbildung 20: Micronaut-S-ESBL: Acht Stämme nach ungefähr 6 Stunden Bebrütung; bei fünffach höher konzentriertem Standard-Inokulum. Farbumschlag von Blau nach Pink zeigt Bakterienwachstum an. In der im Bild obersten Zeile kein Wachstum. In der zweiten bis siebten Zeile Wachstum oder beginnendes Wachstum in allen Kavitäten, somit kein ESBL-Nachweis möglich. In der untersten Zeile beschränkt sich das Wachstum auf diejenigen Kavitäten, die keine Clavulansäure enthalten, somit positiver phänotypischer ESBL-Nachweis.

8. Zusammenfassung

ESBL-bildende *E. coli*- und *Klebsiella*-Stämme bewirken durch ihre Multiresistenz, besonders gegen alle Cephalosporine und Penicilline, zunehmend Therapie- Versagen bei schweren Infektionen. ESBL-bildende Organismen werden nur durch gezielte Tests schnell und sicher erkannt. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch MHK-Bestimmungen aktuelle Daten zur Antibiotika-Empfindlichkeit ESBL-bildender Bakterien aus dem Bonner Raum zu gewinnen und das Micronaut-S-ESBL – Testsystem zu validieren. Dazu diente ein Kollektiv von insgesamt 274 *E. coli* und *Klebsiella*-Isolaten, die im Etest als ESBL-positiv identifiziert worden waren. Micronaut-S-ESBL ist ein Bouillon-Dilutionstest, der den Synergismus von Cefpodoxim und Clavulansäure nutzt. Die 274 ESBL-positiven Stämme wurden im Micronaut-S-ESBL-sowohl mit dem Standard-Test-Inokulum (Inkubation: 24h) als auch mit fünffach höherer Keimeinsaat (Inkubation: 6h) untersucht. Das Standard-Verfahren erkannte die ESBL-Bildung bei 98,5%, das Schnellverfahren in 59,7% der Stämme. 167 ESBL-negative Stämme zeigten kein falsch positives Ergebnis. Micronaut-S-ESBL ist eine kostengünstige Alternative zum Etest-ESBL mit hoher Zuverlässigkeit bei Durchführung nach Standard-Empfehlung. Bei der MHK-Bestimmung erwiesen sich nahezu alle 274 ESBL-Stämme als sensibel gegenüber Imipenem (I), Meropenem(M) und Ertapenem(E) mit MHK₉₀- Daten für *E. coli* von 0,25/<0,06/0,12 (I-M-E), für *K. pneumoniae* von 0,5/0,25/0,25 (I-M-E) und für *K. oxytoca* von 0,5/0,12/0,12 (I-M-E) mg/l. - Zwar war fast die Hälfte aller Stämme Gentamicin-resistent (MHK₅₀/MHK₉₀ bei *E. coli* 1,0/32, bei *K. pneumoniae* 32/128 und bei *K. oxytoca* 1,0/4,0 mg/l), dagegen fast alle *E. coli* und *K. oxytoca* –Isolate Amikacin- sensibel. Unter den *K. pneumoniae*-Kulturen fanden sich hingegen 3,4% Amikacin-resistente und 11,4% intermediär-sensible Stämme. Ähnlich bei Colistin: nahezu lückenlose Wirksamkeit gegen *E. coli* und *K. oxytoca*, aber 17,1% Resistenz bei *K. pneumoniae*. Jeweils etwa 80% der Isolate der drei Spezies waren bei Anwendung des neuen BSAC MHK-Grenzwerts von 8 mg/l Temocillin- sensibel. Die MHK-Werte für Tigecyclin lagen um bis zu 3,5 Titerstufen niedriger als in der Literatur berichtet; dabei erschienen nahezu alle Stämme als Tigecyclin-sensibel nach EUCAST MHK-Grenzwert. Aufgrund dieser grossen Diskrepanzen lassen sich unsere Tigecyclin-Resultate nicht sicher bewerten

In einem ausführlichen Überblick der aktuellen klinischen Literatur wird die zunehmende medizinische und ökonomische Bedeutung der Infektionen durch ESBL-Bildner hinsichtlich Morbidität, Letalität, Epidemiologie, Früherkennung und Therapiemöglichkeiten diskutiert.

9. Anhang: Erläuterungen zu Begriffen der Statistik und Epidemiologie

Confounding: „Confounding tritt auf, wenn zwei Faktoren miteinander assoziiert sind und der Effekt des einen Faktors mit dem des anderen vermischt wird oder durch den Effekt des anderen verzerrt wird.“ (Fletcher et al. 1999)

Multivariable Methoden:

Der Begriff multivariable Methoden ist ein Oberbegriff für mehrere statistische Verfahren zur Prüfung der gleichzeitigen Wirkung mehrerer Variablen. Durch diese Verfahren erhält man einen mathematischen Ausdruck für die zusammengefaßte Wirkung vieler Variablen. (Fletcher et al. 1999)

10. Literaturverzeichnis

1. Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Vandenbroucke-Grauls C, Savelkoul PHM. A practical aid for detection of extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae. Abstract number: P870 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Barcelona, Spain Abstract. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008. <http://www.blackwellpublishing.com/eccmid18/abstract.asp?id=68770> (Zugriffsdatum: 11.12.2008).
2. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289:321-331.
3. Andes D, Craig WA. Treatment of infections with ESBL producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 10–17.
4. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 256–278.
5. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, Kopterides P, Souli M, Armaganidis A, Giamarellou H. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 786-790.

6. Arlet G, Bami G, Décrè D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134: 203–208.
7. Biedenbach DJ, Beach ML, Jones RN. In vitro antimicrobial activity of GAR-936 tested against antibiotic-resistant gram-positive blood stream infection isolates and strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 40:173-177.
8. Birkett CI, Ludlam HA, Woodford N, Brown DF, Brown NM, Roberts MT, Milner N, Curran MD. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 52-55.
9. Bishara J, Livne G, Ashkenazi S, Levy I, Pitlik S, Ofir O, Lev B, Samra Z. Antibacterial susceptibility of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Isr Med Assoc J.* 2005; 7: 298-301.
10. Bradford PA, Petersen PJ, Young M, Jones CH, Tischler M, O'Connell J. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3903- 3909.
11. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. 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.* 1997; 41: 563-569.
12. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:933-951.

13. Brown SD, Traczewski MM. Comparative in vitro antimicrobial activity of tigecycline, a new glycylcycline compound, in freshly prepared medium and quality control. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2173-2179.
14. Burak S, Engelhart S, Exner M, Marklein G, Purr I, Putensen C, Wiegand I, Wiedemann B. Nosokomiale Ausbrüche multiresistenter *Klebsiella-pneumoniae*-Stämme auf Intensivstationen. *Chemother J.* 2006; 4:112-118.
15. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211–1233.
16. Bush K. Extended-spectrum β -lactamases in North America, 1987-2006. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:134-143.
17. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:144-153.
18. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 2950-2954.
19. Carter MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore DM. Detection of extended-spectrum β -lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 4228-4232.
20. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. Discrimination of SHV β -lactamase genes by restriction site insertion-PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2110-2114.

21. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61:1024-1028.
22. Colodner R, Reznik B, Gal V, Yamazaki H, Hanaki H, Kubo R. Evaluation of a novel kit for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25: 49-51.
23. Colodner R, Samra Z, Keller N, Sprecher H, Block C, Peled N, Lazarovitch T, Bardenstein R, Schwartz-Harari O, Carmeli Y; Israel ESBL Group. First national surveillance of susceptibility of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. to antimicrobials in Israel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57: 201-205.
24. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2008; 13: 1-11.
25. Curcio D. Tigecycline for treating bloodstream infections: a critical analysis of the available evidence. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008a; 61: 358-359.
26. Curcio D. Treatment of recurrent urosepsis with tigecycline: a pharmacological perspective. *J Clin Microbiol.* 2008b; 46:1892-1893.
27. Davis KA, Moran KA, McAllister K, Gray PJ. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1218–1224.
28. de Cueto M, Lopez L, Hernandez JR, Morillo C, Pascual A. In vitro activity of fosfomicin against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: comparison of susceptibility testing procedures. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 368–370.
29. Distelmaier, Laura EV: Extended- Spectrum-Beta-Laktamasen: ESBL-bildende Bakterien im Bonner Raum. Inaugural-Dissertation, Bonn, Medizinische Fakultät 2008.

30. Donaldson H, McCalmont M, Livermore DM, Rooney PJ, Ong G, McHenry E, Campbell R, McMullan R. Evaluation of the VITEK 2 AST N-054 test card for the detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* with CTX-M phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62:1015-1017.
31. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 90-103.
32. Endimiani A, Paterson DL. Optimizing therapy for infections caused by enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007; 28: 646-655.
33. Ensor VM, Livermore DM, Hawkey PM. A novel reverse-line hybridization assay for identifying genotypes of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 387-395.
34. Ercis S, Sancak B, Kocagöz T, Kocagöz S, Haşcelik G, Bolmström A. Rapid 4 to 6 hour detection of extended-spectrum β -lactamases in a routine laboratory. *Scand J Infect Dis.* 2007; 39: 781-785.
35. EUCAST-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2009: MIC distributions of wild type microorganisms.
<http://217.70.33.99/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=345&Specium=-1>
(Zugriffsdatum: 10. Mai 2009).
36. Färber J, Moder KA, Layer F, Tammer I, König W, König B. Extended-spectrum β -lactamase detection with different panels for automated susceptibility testing and with a chromogenic medium. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3721-3727.
37. Fletcher RH, Flechter SW, Wagner EH. *Klinische Epidemiologie Grundlagen und Anwendung.* Wiesbaden: Ullstein Medical, 1999.

38. Fuchs PC, Barry AL, Thornsberry C, Jones RN. Interpretive criteria for temocillin disk diffusion susceptibility testing. *Eur J Clin Microbiol.* 1985; 4:30-33.
39. Gales AC, Sader HS, Fritsche TR. Tigecycline activity tested against 11808 bacterial pathogens recently collected from US medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 60: 421-427.
40. Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 1-16.
41. Giamarellou H. Treatment options for multidrug-resistant bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006; 4: 601-618.
42. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 1-4.
43. Glupczynski Y, Huang TD, Berhin C, Claeys G, Delmée M, Ide L, Ieven G, Pierard D, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Vaneldere J. In vitro activity of temocillin against prevalent extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26: 777-783.
44. Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 53: 257-264.
45. Grimm V, Ezaki S, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM β -lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3766–3774.
46. Hamze M, Dabboussi F, Izard D. Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques : étude sur quatre ans (1998-2001) dans le nord du Liban. *Santé.* 2003; 13:107-112.

47. Health Protection Agency, 2008: Laboratory detection and reporting of bacteria with extended spectrum β -lactamases. National Standard Method QSOP 51 Issue 2.2. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp (Zugriffsdatum: 24.02.2009).
48. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2122-2125.
49. Hernandez JR, Pascual A, Canton R, Martinez-Martinez L. Extendedspectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21:77–82.
50. Hernández JR, Velasco C, Romero L, Martínez-Martínez L, Pascual A. Comparative in vitro activity of ertapenem against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 28:457-459.
51. Ho PL, Chow KH, Yuen KY, Ng WS, Chau PY. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 49-54.
52. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, Johnson JL, Dowzicky MJ; Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program) Group. In vitro activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 52: 215-227.
53. Hope R, Potz NA, Warner M, Fagan EJ, Arnold E, Livermore DM. Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 110-113.

54. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern Med.* 2005; 165:1375-1380.
55. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 3203-3206.
56. Jacoby GA. β -lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1123-1129.
57. Jain A, Mondal R. Detection of extended spectrum β -lactamase production in clinical isolates of *Klebsiella* spp.. *Indian J Med Res.* 2008; 127: 344-346.
58. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988; 10: 867-878.
59. Jones CH, Ruzin A, Tuckman M, Visalli MA, Petersen PJ, Bradford PA. Pyrosequencing Using the Single Nucleotide Polymorphism Protocol for Rapid determination of TEM and SHV-type Extended Spectrum β -lactamases in Clinical Isolates and Identification of the Novel β -lactamase genes blaSHV-48, blaSHV-105, and blaTEM-155. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53: 977-986.
60. Jones, R.N., Sader, H.S., Fritsche, T.R. Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various β -lactamase resistance mechanisms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 71-74.
61. Kahlmeter G. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae-EUCAST and CLSI breakpoints. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:169-174.

62. Karisik E, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61:54-58.
63. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 895-904.
64. Kim J, Lee HJ. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV β -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1860–1864.
65. Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. *Medizinische Mikrobiologie.* München, Jena: Urban Fischer Verlag, 2001.
66. Kola A, Maciejewski O, Sohr D, Ziesing S, Gastmeier P. Clinical impact of infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Scand J Infect Dis.* 2007; 39:975-982.
67. Kolar M, Latal T, Cermak P, Bartonikova N, Chmelarova E, Sauer P, Kesselova M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Czech Republic. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 28:49-53.
68. Kresken M, Hafner D, Schmitz F-J, Wichelhaus TA. Resistenz bei häufig isolierten Enterobacteriaceae gegenüber Breitspektrum-Antibiotika. *Chemother J* 2006; 15:179–190.
69. Lartigue MF, Poirel L, Poyart C, Réglie-Poupet H, Nordmann P. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 315-317.
70. Laurent C, Rodriguez-Villalobos H, Rost F, Strale H, Vincent JL, Deplano A, Struelens MJ, Byl B. Intensive care unit outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* controlled by cohorting patients and reinforcing infection control measures. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29:517-524.

71. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 1162-1171.
72. Lavigne JP, Blanc-Potard AB, Bourg G, Moreau J, Chanal C, Bouziges N, O'callaghan D, Sotto A. Virulence genotype and nematode-killing properties of extra-intestinal *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:1199-1206.
73. Lee CH, Chu C, Liu JW, Chen YS, Chiu CJ, Su LH. Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 410-413.
74. Lee SY, Kotapati S, Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: a matched cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27:1226-1232.
75. Lee Y, Lee CS, Kim YJ, Chun S, Park S, Kim YS, Han BD. Development of DNA chip for the simultaneous detection of various β -lactam antibiotic-resistant genes. *Mol Cells*. 2002; 14:192-197.
76. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum β -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3703–3711.
77. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*. 2004; 10: 122-129.
78. Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of four commercially available extended-spectrum β -lactamase phenotypic confirmation tests. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1081–1085.

79. Livermore DM, Brown DF. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 Suppl 1:59-64.
80. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59:165-174.
81. Livermore DM, Hope R, Fagan EJ, Warner M, Woodford N, Potz N. Activity of temocillin against prevalent ESBL and AmpC-producing Enterobacteriaceae from south-east England. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1012-1014.
82. Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW, Warner M. Activity of ertapenem (MK-0826) versus Enterobacteriaceae with potent β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2831-2837.
83. Livermore DM, Struelens M, Amorim J, Baquero F, Bille J, Canton R, Henning S, Gatermann S, Marchese A, Mittermayer H, Nonhoff C, Oakton KJ, Praplan F, Ramos H, Schito GC, Van Eldere J, Verhaegen J, Verhoef J, Visser MR. Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49: 289-300.
84. Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 243-245.
85. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 611-614. 84. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8:557-584.
86. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 3-10.

87. Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1659-1664.
88. Ma L, Lin CJ, Chen JH, Fung CP, Chang FY, Lai YK, Lin JC, Siu LK. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:104-111.
89. MacGowan A. Breakpoints for extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 :166-168.
90. MacKenzie FM, Miller CA, Gould IM. Comparison of screening methods for TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamase detection. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8: 715-724.
91. Marschall J, Tibbetts RJ, Dunne WM Jr, Frye JG, Fraser VJ, Warren DK. Presence of the KPC carbapenemase gene in Enterobacteriaceae causing bacteremia and its correlation with in vitro carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 239-241.
92. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 82-89.
93. Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect.* 2007; 55: 254-259.
94. Menozzi MG, Eigner U, Covan S, Rossi S, Somenzi P, Dettori G, Chezzi C, Fahr AM. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4085-4094.

95. Moland ES, Sanders CC, Thomson KS. Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of β -lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:2575-2579.
96. Morosini MI, García-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, Baquero F, Cantón R. Antibiotic coresistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:2695-2699.
97. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45: 881-885.
98. M'Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother.* 1996; 37: 797-802.
99. Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. Identification of CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 223–230.
100. Nyberg SD, Meurman O, Jalava J, Rantakokko-Jalava K. Evaluation of detection of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates by VITEK 2 AST-N029 compared to the agar dilution and disk diffusion methods. *Scand J Infect Dis.* 2008; 40: 355-362.
101. Padmini SB, Raju BA. Evaluation of CIVA agar for rapid detection of extended spectrum β -lactamases (ESBL) among isolates of Enterobacteriaceae. *Indian J Med Res.* 2008; 127: 195-197.

102. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Kronvall G, Paradisi F, Rossolini GM. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:2720-2725.
103. Park YJ, Yu JK, Lee S, Park JJ, Oh EJ. Evaluation of Phoenix Automated Microbiology System for detecting extended-spectrum β -lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Ann Clin Lab Sci.* 2007; 37: 75-78.
105. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005 ;18: 657-686.
104. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, McCormack JG, Yu VL. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2206-2212.
106. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, Wagener MM, McCormack JG, Yu VL. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis.* 2004a; 39: 31-37.
107. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, Wagener MM, McCormack JG, Yu VL. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med.* 2004b; 140: 26-32.
108. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med.* 2006; 119: 20-28.

109. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 265-268.
110. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 53-58.
111. Petersen PJ, Bradford PA. Effect of medium age and supplementation with the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase on in vitro activities of tigecycline against recent clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3910-3918.
112. Peterson LR. Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: the role of piperacillin-tazobactam. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 181-184.
113. Pfaller MA, Segreti J. Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases. *Clin Infect Dis* 2006; 42:153–163.
114. Pitout JD, Hamilton N, Church DL, Nordmann P, Poirel L. Development and clinical validation of a molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13: 291-297.
115. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8:159-166.
116. Potz NA, Colman M, Warner M, Reynolds R, Livermore DM. False-positive extended-spectrum β -lactamase tests for *Klebsiella oxytoca* strains hyperproducing K1 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53: 545-547.

117. Poudyal A, Howden BP, Bell JM, Gao W, Owen RJ, Turnidge JD, Nation RL, Li J. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:1311-1318.
118. Randegger CC, Hachler H. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1730–1736.
119. Régliez-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N, Poyart C, Nordmann P. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases. *J Med Microbiol.* 2008; 57:310-315.
121. Reid GE, Grim SA, Aldeza CA, Janda WM, Clark NM. Rapid development of *Acinetobacter baumannii* resistance to tigecycline. *Pharmacotherapy.* 2007; 27: 1198-1201.
120. Robberts FJ, Kohner PC, Patel R. Unreliable extended-spectrum β -lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 358-361.
122. Robert Koch Institut. Vancomycin-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern 2006/2007. *Epidemiologisches Bulletin* 2008; 23: 179-189.
123. Robin F, Delmas J, Archambaud M, Schweitzer C, Chanal C, Bonnet R. CMT-type β -lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum β -lactamase detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 2403-2408.
124. Robin F, Delmas J, Schweitzer C, Bonnet R. Evaluation of the Vitek-2 extended-spectrum β -lactamase test against non-duplicate strains of Enterobacteriaceae producing a broad diversity of well-characterised β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:148-154.
125. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Ríos MJ, Hernández JR, Pascual A. Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis.* 2006; 43:1407-1414.

126. Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008; 6: 671-683.
127. Rodriguez-Villalobos H, Malaviolle V, Frankard J, de Mendonça R, Nonhoff C, Struelens MJ. In vitro activity of temocillin against extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 771-774.
128. Rodvold KA, Gotfried MH, Cwik M, Korth-Bradley JM, Dukart G, Ellis-Grosse EJ. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58:1221-1229.
129. Romero L, Lopez L, Rodríguez-Bano J, Hernandez JR, Martinez-Martinez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 625–631.
130. Sader HS, Hsiung A, Fritsche TR, Jones RN. Comparative activities of cefepime and piperacillin/tazobactam tested against a global collection of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with an ESBL-phenotype. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57: 341-344.
131. Sader HS, Jones RN, Dowzicky MJ, Fritsche TR. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 52: 203-208.
132. Sahly H, Aucken H, Benedi VJ, Forestier C, Fussing V, Hansen DS, Ofek I, Podschun R, Sirot D, Sandvang D, Tomás JM, Ullmann U. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004a; 23: 20-26.

133. Sahly H, Aucken H, Benedí VJ, Forestier C, Fussing V, Hansen DS, Ofek I, Podschun R, Sirot D, Tomás JM, Sandvang D, Ullmann U. Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004b; 48:3477-3482.
134. Sahly H, Navon-Venezia S, Roesler L, Hay A, Carmeli Y, Podschun R, Hennequin C, Forestier C, Ofek I. Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52:3029-3034.
135. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B, Nicoletti G, Zanetti S, Fadda G. Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum β -lactamase detection method. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1463-1468.
136. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 913-920.
137. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:1257-1262.
138. Slover CM, Rodvold KA, Danziger LH. Tigecycline: a novel broad-spectrum antimicrobial. *Ann Pharmacother*. 2007; 41: 965-972.
139. Sorlózano A, Gutiérrez J, Piédrola G, Soto MJ. Acceptable performance of VITEK 2 system to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*: a comparative study of phenotypic commercial methods and NCCLS guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 51: 191-193.

140. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, Santangelo R, Cauda R, Fadda G. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL- production in Enterobacteriaceae isolates. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3257-3262.
141. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, Bartlett JG, Edwards J Jr. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 155-164.
142. Stone PW, Gupta A, Loughrey M, Della-Latta P, Cimiotti J, Larson E, Rubenstein D, Saiman L. Attributable costs and length of stay of an extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003; 24:601-606.
144. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004; 10: 122-129.
143. Stürenburg E, Lang M, Horstkotte MA, Laufs R, Mack D. Evaluation of the MicroScan ESBL-plus confirmation panel for detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of oxyimino-cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004a; 54: 870-875.
145. Stürenburg E, Sobottka I, Feucht HH, Mack D, Laufs R. Comparison of BDPhoenix and VITEK2 automated antimicrobial susceptibility test systems for extended-spectrum β -lactamase detection in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 45: 29-34.
146. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL-Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *J Antimicrob Chemother.* 2004b; 54: 134-138.

147. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 42:657–668.
148. Tamayo J, Orden B, Cacho J, Cuadros J, Gomez-Garces JL, Alos JJ. Activity of ertapenem and other antimicrobials against ESBL-producing enterobacteria isolated from urine in patients from Madrid. *Rev Esp Quimioter.* 2007; 20: 334-338.
149. Theuretzbacher U. β -Laktamasen und β -Laktamasen-Inhibitoren. *Chemoth J* 2004; 13:206-217.
150. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum- β -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized β -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2380-2384.
151. Thomson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 3548-3554.
152. Thomson KS, Sanders CC. A simple and reliable method to screen isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* for the production of TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 1997; 3: 549-554.
153. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extendedspectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1877–1882.
154. Turner PJ. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63: 217-222.

155. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:4769-4775.
156. Waites KB, Duffy LB, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among pathogens collected from hospitalized patients in the United States and in vitro activity of tigecycline, a new glycylcycline antimicrobial. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 3479-3484.
157. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Sturenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1167–1174.
158. Wiegand I. Molekulare und biochemische Grundlagen der β -Lactam-Resistenz durch β -Lactamasen. *Chemoth J* 2003; 12: 151-167.
159. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 154–155.
160. Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4793–4799.
161. World Health Organization. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002: World Health Report—2004. Geneva: World Health Organization, 2004.
162. Xu L, Evans J, Ling T, Nye K, Hawkey P. Rapid genotyping of CTX-M extended-spectrum β -lactamases by denaturing high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 1446-1454.

11. Danksagung

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Günter Marklein bedanke ich mich sehr herzlich für das interessante und aktuelle Thema und die gute und kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit und bei Herrn Prof. Dr. Achim Hörauf für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes in dem von ihm geleiteten Institut.

Weiterhin gilt mein Dank den ärztlichen und technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der klinisch-diagnostischen Laboratorien des IMMIP, insbesondere Frau Ursula Klanke.

Ausserdem danke ich Frau Dr. Esther Pfeil und Herrn Dr. Holger Schedletzky (Firma Merlin, Bornheim) für die Bereitstellung des Micronaut[®]-Testmaterials.