

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR TYPENVERTEILUNG VON EXTENDED-SPECTRUM β -
LAKTAMASEN BEI KLEBSIELLEN-ISOLATEN AUS
HUMANEN PATIENTENPROBEN IN
SCHLESWIG-HOLSTEIN**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

RIKE WREDE

aus Cuxhaven

Kiel 2009

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. R. Podschun.....

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. H. Sahly.....

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 2010.....

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 14. Januar 2010.....

I Inhaltsverzeichnis

<i>I</i>	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>II</i>	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>II</i>
<i>III</i>	<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>1</i>	<i>Einleitung</i>	<i>1</i>
<i>2</i>	<i>Material und Methoden</i>	<i>6</i>
<i>2.1</i>	<i>Material</i>	<i>6</i>
<i>2.2</i>	<i>Methoden</i>	<i>10</i>
<i>3</i>	<i>Ergebnisse</i>	<i>22</i>
<i>3.1</i>	<i>Häufigkeit des blaSHV- und blaTEM-Nachweises</i>	<i>22</i>
<i>3.2</i>	<i>Zeitliche Entwicklung der Typenverteilung</i>	<i>28</i>
<i>3.3</i>	<i>Untersuchung von Mehrfachisolaten hinsichtlich Klonalität</i>	<i>29</i>
<i>4</i>	<i>Diskussion</i>	<i>30</i>
<i>5</i>	<i>Zusammenfassung</i>	<i>37</i>
<i>6</i>	<i>Literatur</i>	<i>39</i>
<i>7</i>	<i>Danksagung</i>	<i>45</i>
<i>8</i>	<i>Lebenslauf</i>	<i>46</i>

II Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CTX-M	Cefotaxim, München
DEPC	Diäthylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy(nukleinsäure)-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended-Spectrum β-Lactamase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
HCl	Salzsäure
h	Stunde
<i>K.</i>	<i>Klebsiella</i>
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
M	Mol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol

nmol	Nanomol
OXA	Oxacillinase
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunde
SHV	Sulfhydrylvariable
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borate-EDTA-Puffer
TEM	β -Laktamase nach dem Patientennamen Temoniera
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

III Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Ausgangslösung für PCR-Ansatz	11
Tab. 2.2: Spezielle Substanzen für PCR-Ansatz in verschiedenen Tubes	12
Tab. 2.3: Ablauf der PCR	12
Tab. 2.4: Herstellung der Agarosegele	13
Tab. 2.5: Reaktionsansätze für SHV	17
Tab. 2.6: Reaktionsansätze für TEM	18
Tab. 2.7: Ablauf des Cycle-Sequencings	18
Tab. 3.1: Verteilung der SHV- und TEM-Signale	22
Tab. 3.2: Verteilung der SHV- und TEM-Typen	24
Tab. 3.3: Nachweis von <i>bla</i> SHV- und <i>bla</i> TEM-Genen bei ESBL-positiven klinischen Isolaten der Spezies <i>Klebsiella oxytoca</i>	26
Tab. 3.4: Nachweis von <i>bla</i> SHV- und <i>bla</i> TEM-Genen bei ESBL-positiven klinischen Isolaten der Spezies <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
Tab. 3.5: Anzahl der SHV > 1- und/oder TEM > 2- positiven Isolate Typ-spezifisch und chronologisch aufgetragen für den Zeitraum von 1998 bis 2006 sowie insgesamt untersuchte Isolate	28
Tab. 3.6: SHV- und TEM-Nachweis der Mehrfachisolate dreier Patienten	29

1 Einleitung

Klebsiella ist eine Gattung von Bakterien, die nach dem ostpreußischen Mikrobiologen Edwin Klebs (1834-1913) benannt wurde (48). Es handelt sich bei Klebsiellen um Gram-negative, bekapselte und unbewegliche Stäbchenbakterien der Familie *Enterobacteriaceae* (41, 48). Die Bakterien sind von einer Schleimkapsel umgeben. Ihr ubiquitäres Vorkommen wird durch ihre Fähigkeit begünstigt, fakultativ unter anaeroben Bedingungen leben zu können. Einerseits sind sie im Erdreich, auf Pflanzen und im Wasser nachweisbar, andererseits sind sie als Saprophyten auf Schleimhäuten des Atem- und Gastrointestinaltraktes, der Haut und in den Faezes von Menschen und warmblütigen Tieren zu finden (3, 12, 21, 37).

Klebsiellen gehören zu den acht häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen (49, 56). Als fakultativ pathogene Keime können sie Harnwegsinfekte, Wundinfektionen, Pneumonien und Septikämien hervorrufen. Betroffen hiervon sind zumeist immundefiziente Patienten wie onkologische oder transplantierte Patienten, immungeschwächte ältere Menschen oder Patienten mit chronischen Erkrankungen wie z.B. chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) oder Diabetes mellitus. Sie sind mit einer Häufigkeit von 4-17% Erreger von nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen (58).

Taxonomisch werden Klebsiellen nach I. Ørskov in fünf Spezies eingeteilt (41). Dabei sind *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* im Infektionsbereich von Krankenhäusern die häufigsten Klebsiellenspezies.

Der Übertragungsweg kann endogen oder exogen verlaufen. Die endogene Infektion erfolgt über die eigene Darmflora, während die exogene Übertragung z.B. über kontaminierte medizinische Geräte wie Bronchoskope, Thermometer und Ultraschallgele oder erregertragendes Krankenhauspersonal erfolgt (23). Besonders gefährdet sind intubierte, katheterisierte oder transfundierte Patienten und vor allem Patienten in Krankenhäusern (34). Durch ihre gute Anpassungsfähigkeit an die Krankenhausumgebung und ihre schnelle Ausbreitungsfähigkeit sind Klebsiellen häufig der ursächliche Keim für nosokomiale Ausbrüche gerade auf Neonatalstationen (28). Folglich spielt neben der Dauer des Krankenhausaufenthaltes die Krankenhaushygiene eine sehr wichtige Rolle, um Infektionen durch diesen Hospitalismuskeim zu vermeiden.

Klebsiellen weisen eine natürliche Resistenz gegenüber Aminopenicillinen auf (48). Für diese Resistenz sind chromosomal kodierte β -Laktamasen verantwortlich. β -Laktamasen sind bakterielle Enzyme, die β -Laktamantibiotika durch Hydrolyse inaktivieren (13). 1940 wurde die erste β -Laktamase bei einem *Escherichia-coli*-Stamm isoliert (1). In den folgenden Jahren wurden bei zahlreichen Gram-negativen Bakterien chromosomal kodierte β -Laktamasen gefunden, was auf die breite Anwendung von β -Laktamantibiotika zurückzuführen war (62).

1965 wurde erstmalig eine Plasmid-kodierte β -Laktamase bei einem *E.-coli*-Stamm einer Patientin namens Temoniera in Griechenland entdeckt (18). Das Enzym erhielt daher die Bezeichnung TEM-1. Zur selben Zeit wurde eine weitere β -Laktamase, SHV-1 (Sulfhydrylvariabel), aus einem *K.-pneumoniae*-Stamm isoliert (47). Durch eine Aminosäuresubstitution entstand TEM-2 aus TEM-1 (4). Diese drei β -Laktamasen besitzen die Fähigkeit, Penicillin, Ampicillin und Erstgenerationcephalosporine zu hydrolysieren, jedoch nicht Oxyimino-Cephalosporine zu spalten (59).

1983 jedoch wurde die erste β -Laktamase mit einem erweiterten Substratspektrum, extended-spectrum β -lactamase (ESBL), in einem *K.-pneumoniae*-Isolat in Deutschland entdeckt (30). Durch eine Aminosäuresubstitution an Position 238 (Glycin zu Serin) ging SHV-2 aus SHV-1 hervor (29). Durch diese Mutation besitzt SHV-2 ein erweitertes Substratspektrum, so dass sie zusätzlich neuere Cephalosporine wie Cefotaxim inaktiviert (29). Durch Punktmutationen mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen oder -deletionen der Ursprungssequenz von TEM- und SHV-Enzymen erhöhte sich innerhalb weniger Jahre die Zahl dieser Mutanten rasch auf über 160 TEM-Typen und mehr als 110 SHV-Typen (<http://www.lahey.org/studies/>, Stand Januar 2009). Dies ist durch den intensiven Gebrauch von Antibiotika, besonders von Drittgenerationcephalosporinen wie Ceftazidim, bei infektiösen Erkrankungen zu erklären (51). ESBLs besitzen die Fähigkeit, Oxyimino-Cephalosporine und Monobactame zu hydrolysieren (31). Eine Gefahr ist, dass durch Genübertragung zwischen verschiedenen Stämmen weitere Resistenzen wie Aminoglykosid- und Chinolonresistenzen weitergegeben werden, so dass multiresistente Stämme entstehen (59). Die Spannbreite der wirksamen Antibiotika gegen diese zunächst nur β -Laktam-resistenten, dann zunehmend multiresistenten Keime wird somit immer geringer. Wirksam erweisen sich zur Zeit noch Carbapeneme, doch die ersten Carbapenemasen-produzierenden Stämme wurden schon beschrieben (59).

Da sich β -Laktamasen weitgehend Plasmid-vermittelt verbreiten, waren sie innerhalb weniger Jahre weltweit und auch bei anderen *Enterobacteriaceae* als *Klebsiella* und *E. coli*, bei *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoeae* zu finden (9).

Klebsiellen stellen jedoch den größten Anteil der ESBL-Produzenten dar. Der SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program)-Studie für den Zeitraum von 1997-2000 zufolge produzierten von 664 *K.-pneumoniae*-Isolaten in Lateinamerika 47,3% ESBL, während es von 1239 *E.-coli*-Isolaten nur 6,7% waren (24, 54, 64). Für Europa wurden in der gleichen Studie 22,6% von 946 *K.-pneumoniae*-Isolaten auf ESBL-Produktion positiv getestet, wohingegen es bei 3822 Isolaten von *E.coli* nur 5,3% waren (7, 27, 64).

Es bestehen große geographische Unterschiede bezüglich der Häufigkeit von ESBL-produzierenden Bakterien (11). Die MYSTIC-Studie (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) untersuchte diese Verteilung für den Zeitraum von 1997 bis 2003. Es wurde ermittelt, dass 16,7% von 1203 Klebsiellen-Stämmen in Nordeuropa ESBL-Produzenten waren, wohingegen in Südeuropa 24,4% als solche klassifiziert wurden. Ähnliche Nord-Süd-Unterschiede wurden auch auf dem amerikanischen Kontinent gefunden. In Nordamerika produzierten 12,3% von 1402 Klebsiellen-Isolaten ESBL, während es in Südamerika 51,9% waren. Mit 58,7% von 1310 Isolaten von Klebsiellen war in Osteuropa die Rate an ESBL-Produzenten unter den Klebsiellen am höchsten (62). Es liegt somit ein Nord-Süd-Gefälle ESBL-produzierender Klebsiellen mit einem Maximum in Osteuropa vor. In den neunziger Jahren variierte die Prävalenz von ESBL-produzierenden Klebsiellen auf Intensivstationen von 9% in Süddeutschland, 40% in Frankreich, 49% in Portugal und 59% in der Türkei (36, 64).

Über die oben genannten Risikofaktoren hinaus ist der entscheidende Faktor für eine Infektion mit ESBL-produzierenden Klebsiellen eine vorherige Antibiotikabehandlung besonders mit Drittgenerationscephalosporinen wie Cefotaxim (16, 20, 32). Durch eine Antibiotikarestriktion mit konsekutivem Rückgang der ESBL-Produzentenzahl konnte dieser Zusammenhang nachgewiesen werden (43, 50, 52).

Per definitionem handelt es sich bei ESBLs um Enzyme, die Oxyimino-Cephalosporine hydrolysieren und durch Clavulansäure inhibierbar sind. Anhand dieser Eigenschaften werden sie gemäß den Empfehlungen der CLSI (Clinical And Laboratory Standards Institute, vorher NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)) per Screening- und Bestätigungstest phänotypisch detektiert (39). Diese Untersuchungstechniken sind im mikrobiologischen Routinelabor durchführbar, wohingegen die molekularbiologischen Methoden wie z.B. die Nukleotid-Sequenzierung, die der Goldstandard der ESBL-Typen-Bestimmung ist, auf Speziallabore beschränkt sind (57). Wird ein ESBL-produzierendes Bakterium als solches klassifiziert, wird es als therapeutisch resistent für alle β -Laktame

angesehen (42, 55). Da jedoch die Detektion schwierig ist und die Wichtigkeit dieser multiresistenten Keime häufig unterschätzt wird, findet in vielen Routinelaboren eine Testung auf ESBL-Produktion nicht statt (44, 46, 51, 60). Diese Unkenntnis kann zur Folge haben, dass mit unwirksamen Antibiotika falsch therapiert wird. Dies kann zum einen sogar für eine weitere Vermehrung und Resistenzentwicklung der Bakterien sorgen und zum anderen für den Patienten eine fatale Entwicklung bedeuten (2, 65).

β -Laktamasen werden nach zwei Schemata klassifiziert. Nach der molekularen Klassifikation nach Ambler werden sie anhand ihrer Proteinhomologie in vier Gruppen (A-D) eingeteilt. ESBLs gehören den Klassen A und D an, da sie Serin im aktiven Zentrum besitzen (42). Bei der Bush-Jacoby-Mederos Klassifikation handelt es sich um eine funktionelle Einteilung, die sich nach dem Substrat- und Inhibitorverhalten der β -Laktamasen richtet (42). 2be und 2e kennzeichnen die Gruppe der ESBLs (14). Diese Spezifizierung war notwendig aufgrund der stark zunehmenden Variabilität von ESBLs. Neben den beiden häufigsten β -Laktamase-Typen, TEM und SHV, gibt es unter den ESBLs momentan ungefähr 40 weitere wie z. B. OXA oder CTX-M (8, 9).

Innerhalb der TEM- und SHV-Typen bestehen geographische Verteilungsunterschiede. So wurde TEM-10 besonders häufig in den USA gefunden, während dieser Typ in Europa selten ist (10). TEM-3 kommt häufig in Frankreich vor, hingegen in den USA kaum (40). SHV-5 wiederum ist weltweit zu finden (26).

Aufgrund der rasanten Expansion, der geographischen Typenverteilung sowie ihrem weltweiten Vorkommen ist es von großer Bedeutung, die epidemiologische Situation in Deutschland zu klären, insbesondere die Frage, ob eine Häufung einzelner Typen oder eine homogene Verteilung vorliegt. Über die Häufigkeitsverteilung von ESBL-Typen bei Klebsiellen in Nordeuropa gibt es nur spärliches Datenmaterial und zur ESBL-Situation in Schleswig-Holstein liegen überhaupt keine Daten vor. Aus diesem Grund hat erstmalig das Institut für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, seit 1998 eine Stammsammlung von ESBL-produzierenden Klebsiellen-Isolaten aus dieser Region angelegt.

Mithilfe dieser Sammlung soll die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen untersuchen:

1. Welche TEM- und SHV-Typen sind bei ESBL-produzierenden Klebsiellen in Schleswig-Holstein am häufigsten nachzuweisen?
2. Sind bestimmte Typen in Schleswig-Holstein dominierend bzw. gar ausschließlich vorkommend oder ist eine homogene Verteilung der nachgewiesenen Typen festzustellen?

Die gewonnenen Daten sollen Rückschlüsse darüber zulassen,

- ob es so etwas wie einen „Norddeutschen ESBL-Typen“ gibt oder
- ob in Schleswig-Holstein ein weltweit vorkommender Typ prädominiert oder
- ob eine rein zufällige Verteilung der bekannten ESBL-Typen vorherrscht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Massachusetts)

Analysenwaage BP 210 S (Sartorius, Göttingen)

Brutschrank Typ B 50 (Mettler, Schwabach)

Elektrophoresegelesystem (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad, California)

Elektrophoresis Power Supply EPS 500/400 (Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt am Main)

Heizblockthermostat HBT 130-2 (Haep Labor Consult, Bovenden)

Photo-Print Video-Dokumentationssystem 008-SD (peqLab, Erlangen)

Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen)

Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

2.1.2 Gebrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

Einmalfilter 0,45 µm (Sartorius)

Eppendorf-Pipetten (Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

Micro-Amp Einsatzhalter (Perkin – Elmer, Massachusetts)

Mikroschraubröhrchen 1,5 ml PP (Sarstedt, Nümbrecht)

Multiply-Pro Gefäß 0,2 ml PP (Sarstedt)

Probenröhrchen 15 ml PP (Sarstedt)

Reagiergefäße 1,5 ml PP (Sarstedt)

Reaktionsröhrchen 1,5 ml perforiert (Promega, Wisconsin)

Sample Tubes 0,5 ml Genetic Analyser (Applied Biosystems, California)

Septa for Sample Tubes Genetic Analyser (Applied Biosystems)

Sterile Petrischalen (Sarstedt)

2.1.3 Nährmedien

Mueller Hinton-Agar (Nr. 64884, BioRad): 12 g MH-Agar ad 1 l aqua dest, autoklaviert

Mueller Hinton-Bouillon (Nr. CM 0405, Oxoid): 21 g MH-Broth ad 1 l aqua dest, autoklaviert

Der Agar sowie die Bouillon wurden supplementiert mit einem der folgenden Antibiotika in der Konzentration von:

- Cefotaxim 0,25 µg/ml
- Ceftazidim 0,5 µg/ml
- Cefepim 2,0 µg/ml

Die Antibiotika wurden dem flüssigen Agar bei einer Temperatur von 50-60°C zugefügt. Anschließend wurden jeweils 20 ml des antibiotikahaltigen Agars in sterile Petrischalen gegossen.

2.1.4 Lösungen und Puffer

DEPC-distilliertes Wasser mit 0.1% Diäthylpyrocarbonat (USB, Ohio)

Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml (H 5041, Promega)

Hyper ladder IV geliefert mit 5x Loading Buffer for Sample Loading (Bio-33030, BioLine, Brüssel)

10x PCR-Puffer 15 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden)

10x TBE-Puffer (15581-04, Invitrogen, Karlsruhe)

dNTPs 100 mM (Promega)

2.1.5 Antibiotika und Chemikalien

Agarose, Molecular Biology Grade (Eurogentec, Liège)

Cefepim-Dihydrochlorid (Maxipime®) 0,5 g (Bristol-Myers Squibb, München)

Cefotaxim-Natrium (Claforan®) 0,5 g (Aventis Pharma, Frankfurt)

Ceftazidim (Fortum®) 0,5 g (Glaxo Smith Kline, Bühl)

2.1.6 Enzyme und Test-Kits

Big Dye Terminators 3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen)

MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) bestehend aus:

- PB-Puffer
- PE-Puffer
- MinElute-Röhrchen mit Silica-Gel-Membran
- Sammelröhrchen 1,5 ml

Polymer POP 6 (Applied Biosystems)

Polymerase Hot Start Taq 5 U/μl (Qiagen)

2.1.7 Primer

Für die PCR verwendete Primer:

- SHV: for (ATGCGTTATATTCGCCTGTG)
rev (TTAGCGTTGCCAGTGCTC)
- TEM: for (GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG)
back (CCAATGCTTAATCAGTGAGGCAAC)

Für das Cycle-Sequencing verwendete Primer:

- SHV: for (ATGCGTTATATTCGCCTGTG)
rev (TTAGCGTTGCCAGTGCTC)
seq4.rev (AGGCGGGTGACGTTGTC)
- TEM: for (GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG)
back (CCAATGCTTAATCAGTGAGGCAAC)
TEM 2 (ACAACGATCGGAGGACCG)
TEM 3 (GCGGTTAGCTCCTTCGGT)

Insgesamt verwendete Primer:

SHV for	(TIBMolbiol, Berlin)
SHV rev	(TIBMolbiol, Berlin)
SHV seq4.rev	(Invitrogen, Karlsruhe)
TEM for	(Invitrogen, Karlsruhe)
TEM back	(Invitrogen, Karlsruhe)
TEM 2	(TIBMolbiol, Berlin)
TEM 3	(TIBMolbiol, Berlin)

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

Es wurde ein Kollektiv von 56 extended-spectrum β -lactamase-produzierenden Klebsiellen-Isolaten aus der bestehenden Stammsammlung des Institutes für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum zu Kiel untersucht. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Klebsiellen, die aus klinischen Untersuchungsmaterialien des Raumes Schleswig-Holstein im Zeitraum von 1998 bis 2006 gewonnen und zur mikrobiologischen Diagnostik an das oben genannte Institut geschickt wurden.

Die ESBL-Produktion wurde im Routinelabor durch phänotypische Bestimmung mittels des ESBL-Etest-Streifens ermittelt. Direkt nach der Identifikation der ESBL-Produktion wurden alle positiven Stämme bei -80°C in Brain-Heart-Infusion/ 30% Glycerin eingefroren und in die Stammsammlung aufgenommen.

Als ESBL-Referenzstämme dienten *K. pneumoniae* ATTC 700603 (SHV-18) und *E. coli* CIA (TEM-7).

2.2.2 Gewinnung der DNA

Anzucht der Bakterien auf Müller-Hinton-Agar

Zu 1 l Müller-Hinton-Agar wurde eines der oben aufgeführten β -Laktame hinzugegeben, gegen welches der jeweilige Bakterienstamm resistent war, um die ESBL-produzierenden Bakterien zu selektieren.

Die zu untersuchenden Stämme wurden dreifach fraktioniert auf dem Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Herstellung der Lysate

Die Testisolate wurden in MH-Bouillon, deren Antibiotikakonzentration analog zu der im MH-Agar war, erneut über Nacht bei 37°C bebrütet. 200 µl der Bouillon wurden anschließend in ein fest verschließbares Sarstedt-Röhrchen pipettiert. Die Tubes wurden für 10 min bei 95°C zum Lysieren im Heizblock inkubiert. Die Lysate wurden sofort weiterverwendet oder zur späteren Untersuchung bei einer Temperatur von - 20°C aufbewahrt.

2.2.3 Amplifikation der SHV- und TEM-Sequenzen mittels der Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können bestimmte DNA-Sequenzen enzymatisch vervielfältigt werden, damit sie in großer Anzahl für Untersuchungen zur Verfügung stehen. In diesem Fall wurden SHV- und TEM-Sequenzen amplifiziert, falls sie im Lysat vorhanden waren. Hierbei handelt es sich um die DNA-Abschnitte, in denen Mutationen die Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum bewirkt haben.

Pro Lysat wurden zwei verschiedene PCR-Ansätze angelegt, um jeweils die SHV- und die TEM- Sequenzen zu amplifizieren. Die beiden Ansätze unterschieden sich hinsichtlich ihrer spezifischen Primer (SHV for und SHV rev bzw. TEM for und TEM back).

Tab. 2.1: Ausgangslösung für PCR-Ansatz

Reagenz	Menge	Konzentration in der Testlösung
10x PCR-Puffer	5 µl	100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂
dNTPs	4 µl	2,5 mM
Primer 1	0,5 µl	100 pmol/Reaktion
Primer 2	0,5 µl	100 pmol/Reaktion
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 U/Reaktion

Der Ansatz wurde mit 37,5 µl DEPC-Wasser auf insgesamt 48 µl aufgefüllt.

Für die PCR wurden pro Ansatz jeweils vier PCR-Röhrchen benötigt. In jedes Röhrchen wurden 48 µl des fertigen Mastermixes pipettiert sowie 2 µl jeweils eine der folgenden Substanzen:

Tab. 2.2: Spezielle Substanzen für PCR-Ansatz in verschiedenen Tubes

Tube	Substanz
1	Lysat der Testisolate
2	DEPC-Wasser als Negativkontrolle
3	Lysat aus ATTC 700603 einer <i>K. pneumoniae</i> als SHV-Positivkontrolle
4	Lysat aus <i>E. coli</i> CIA als TEM-Positivkontrolle

Zuerst wurden 2 µl DEPC-Wasser in das zweite Röhrchen pipettiert, um die Negativkontrolle nicht mit der Probe oder den Positivkontrollen zu kontaminieren. Danach wurden das erste, dritte und vierte Röhrchen komplettiert.

Amplifikation

Die Amplifikation wurde im Thermocycler unter folgenden Laufbedingungen durchgeführt:

Tab. 2.3: Ablauf der PCR

Schritte	Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
Initialisierung	15 min	95°C	1
Denaturierung der DNA	60 s	94°C	
Primeranlagerung „annealing“	60 s	55°C	30
Elongation	120 s	72°C	
Kühlung	∞	4°C	1

Laufdauer: 3 Stunden und 18 Minuten

2.2.4 Detektion der amplifizierten SHV- und TEM-Sequenzen mittels Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die SHV- und TEM-Sequenzen aufgetrennt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid wurden die Amplifikate angefärbt und anschließend im UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Agarose-Gelherstellung

Tab: 2.4: Herstellung der Agarosegele

Anzahl der Taschen	Agarose	TBE-Puffer	Ethidiumbromid
1 - 20	0,6 g	60 ml	3 µg

Zunächst wurden 30 ml des TBE-Puffers mit der Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden die verbleibenden 30 ml Puffer sowie Ethidiumbromid hinzugefügt. Nach Abkühlung der Lösung auf 50-60°C wurde es luftblasenfrei in einen zuvor vorbereiteten Gelträger mit Kamm gegossen. Als das Gel fest geworden war, wurden der Kamm sowie die Seitenteile entfernt und das Gel mit TBE-Puffer bis zu einer Höhe von 3 mm übergossen.

Laden der Proben

In die erste Geltasche wurden 5 µl Hyper ladder IV pipettiert. Dieser dient der Größenbestimmung der zu detektierenden DNA-Moleküle. Er identifiziert Molekülgrößen in einer Größenordnung zwischen 100 und 1000 Basenpaaren (bp). Diese lassen sich mithilfe der mitgelieferten Umrechnungstabelle in eine Masse [ng] umrechnen.

Es wurden 2,5 µl Loadingbuffer mit 10 µl jedes Amplifikates gemischt und die gesamte Menge in eine Tasche pipettiert. Der Loadingbuffer dient der Beschwerung und Markierung der Probe, so dass die gesamte Menge in eine Geltasche transferiert wurde.

Elektrophorese

Bei einer Spannung von 100 bis 150 Volt (V) befanden sich die Banden nach ca. 25 min ungefähr einen Zentimeter vor dem Gelende. Die Elektrophorese wurde an dieser Stelle gestoppt und das Gel in den UV-Transilluminator des Photo-Print Video-Dokumentationssystems gelegt. Bei einer Wellenlänge von 302 nm wurden die sichtbaren Banden zur Ergebnisinterpretation und Dokumentation fotografiert.

Ergebnisinterpretation

Ein Ergebnis wurde als positiv bewertet, wenn alle Kontrollen als valide beurteilt wurden und eine Kreuzkontamination ausgeschlossen werden konnte. Eine Kreuzkontamination kann als unwahrscheinlich angesehen werden, wenn die DEPC-Kontrolle negativ ausfällt.

Wenn die Banden der Probe und der Positivkontrolle auf gleicher Laufhöhe waren, besaßen sie somit auch die gleiche Menge an Basenpaaren. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die Probe die nachzuweisenden Sequenzen enthielt.

2.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient dazu, die Basenabfolge eines bestimmten DNA-Abschnittes zu ermitteln.

Die einzelnen Schritte sind folgende: Aufreinigung der PCR-Produkte, Konzentrationsbestimmung der DNA, Cycle-Sequencing, Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte, Sequenzierung und Sequenzauswertung.

Aufreinigung der PCR-Produkte

Bei der Aufreinigung wird die amplifizierte DNA von Substanzen befreit, die für die PCR verwendet wurden. Diese Substanzen, wie unerwünschte Primer oder Nukleotide, könnten die anschließende Sequenzierung stören.

Mithilfe des MinElute-PCR-Purification-Kits wurde die Aufreinigung des PCR-Produktes durchgeführt. Hierbei wurde durch eine Silica-Gel-Membran die DNA gebunden und so von den unerwünschten Substanzen getrennt. Anschließend wurde die gereinigte DNA mit DEPC-Wasser ausgewaschen und für die Sequenzierung verwendet.

Zunächst wurden 200 µl PB-Puffer zu 40 µl des PCR-Produktes gegeben. Die 240 µl wurden in das MinElute-Röhrchen überführt und eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Das im Auffangröhrchen gebildete Eluat wurde verworfen. Dann wurden 750 µl PE-Puffer in das MinElute-Röhrchen gegeben und ebenfalls eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde wiederum verworfen. Um den übrigen Waschpuffer zu entfernen, wurde nochmals bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Das MinElute-Röhrchen wurde in ein neues 1,5 ml-Röhrchen überführt. Es wurden 20 µl DEPC zentral auf die Membran gegeben, damit sich möglichst viel DNA von der Gelmembran löste. Anschließend wurde erneut bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Im Eluat befand sich nun die gereinigte DNA in 20 µl DEPC-Wasser gelöst, um für die anschließende Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung zur Verfügung zu stehen.

Konzentrationsbestimmung der DNA

Vor dem Cycle-Sequencing wurde die Konzentration der DNA ermittelt, um die gewünschte DNA-Menge für das Cycle-Sequencing einstellen zu können. Überschüssige oder fehlende DNA kann den Vorgang des Cycle-Sequencings behindern.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe der in 2.2.4. beschriebenen Gelelektrophorese. Hierbei wurden 10 µl Hyper ladder IV in die erste Geltasche pipettiert. Zu 10 µl jedes Amplifikates wurden jeweils 2,5 µl Loading Buffer zugefügt. Die 12,5 µl wurden dann in die weiteren Geltaschen pipettiert.

Ergebnisinterpretation

Durch den Vergleich der Bandenintensität der Amplifikate mit der Vergleichsgrafik des Hyper ladders IV konnte die DNA-Menge abgeschätzt werden. Daraufhin wurde die DNA mit DEPC-Wasser verdünnt, um die erforderliche Konzentration von 1 bis 50 ng/µl für das anschließende Cycle-Sequencing zu erhalten.

Cycle-Sequencing

Das Cycle-Sequencing dient dazu, bestimmte DNA-Sequenzen zu amplifizieren und die Basen mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren, so dass sie von einem Sequenzer aufgetrennt und detektiert werden können.

Das Prinzip ist folgendes:

Das Cycle-Sequencing verläuft ähnlich der Polymerasekettenreaktion in den drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation, die in dreißig Zyklen verlaufen, ab. Bei Einbau der dNTPs kommt es zu einer Kettenverlängerung über die 3'OH-Gruppe des letzten Nukleotids mit der 5'Phosphat-Gruppe des einzubauenden Nukleotids. Werden jedoch die ddNTPs eingebaut, denen die 2'OH- und die 3'OH-Gruppen fehlen, kann keine Polymerisierung zwischen den 3'OH-Gruppen und den 5'Phosphat-Gruppen stattfinden. Folglich kommt es zum Kettenabbruch. Dieser Kettenabbruch verläuft ganz zufällig, da dNTPs und ddNTPs im gleichen Konzentrationsverhältnis zueinander vorliegen. Es werden somit Einzelstränge unterschiedlicher Länge synthetisiert. Sie besitzen alle die gleichen 5'-Enden, aber unterschiedliche 3'-Enden.

Zusätzlich sind die Basen der ddNTPs mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Jede der vier Basen erhält einen anderen. Dies dient dazu, dass bei Kettenabbruch mithilfe des Sequenzers detektiert werden kann, um welche dieser vier Basen es sich handelt. Folglich kann so die Sequenz eines bestimmten DNA-Abschnittes ermittelt werden.

Der Mastermix enthält folgende Komponenten:

- DNA der Testisolate aus 2.2.5
- Sequenzprimer
- Big Dye Farbstoff-Mastermix bestehend aus Puffer, taq-Polymerase, dNTPs und ddNTPs
- Puffer
- DEPC-Wasser

Bei einem positiven SHV-Ergebnis der Polymerasekettenreaktion mit der sich anschließenden Elektrophorese wurden drei Reaktionsansätze vorbereitet aufgrund der drei verschiedenen erforderlichen SHV-Primer.

SHV-Ansätze

Tab.: 2.5: Reaktionsansätze für SHV

Ansatz	DNA	Primer	Big Dye	Puffer	DEPC
1	1 µl	1 µl SHV for	4 µl	2 µl	12 µl
2	1 µl	1 µl SHV rev	4 µl	2 µl	12 µl
3	1 µl	1 µl seq4.rev	4 µl	2 µl	12 µl

Die DNA der Testisolate wurde zunächst gemäß der erforderlichen Konzentration 1-50 ng/µl mit DEPC-Wasser verdünnt. Zu den Primern wurde ebenfalls DEPC-Wasser zugefügt, so dass sie im Verhältnis 1:10 vorlagen.

Die Primer SHV for und SHV rev waren die gleichen wie bei der Polymerasekettenreaktion. Zusätzlich wurde hier der Primer SHV seq4.rev verwendet.

Die Reaktionsansätze bei einem positiven TEM-Ergebnis wurden analog durchgeführt, jedoch waren vier Ansätze erforderlich, da vier verschiedene Primer nötig waren. Zusätzlich zu den Primern „TEM for“ und „TEM back“ wurden „TEM 2“ und „TEM 3“ hinzugefügt.

TEM-Ansätze**Tab. 2.6:** Reaktionsansätze für TEM

Ansatz	DNA	Primer	Big Dye	Puffer	DEPC
1	1 µl	1 µl TEM for	4 µl	2 µl	12 µl
2	1 µl	1 µl TEM back	4 µl	2 µl	12 µl
3	1 µl	1 µl TEM 2	4 µl	2 µl	12 µl
4	1 µl	1 µl TEM 3	4 µl	2 µl	12 µl

Die Mastermixe wurden in den Thermocycler überführt und das Cycle-Sequencing mit folgenden Laufbedingungen gestartet:

Tab. 2.7: Ablauf des Cycle-Sequencings

Schritte	Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
Initialisierung	15 min	95°C	1
Denaturierung der DNA	60 s	96°C	
Primeranlagerung „annealing“	60 s	50°C	30
Elongation	120 s	60°C	
Kühlung	∞	4°C	1

Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Die Aufreinigung dient dazu, die Sequenzierungsprodukte von den Sequenzierungskomponenten wie überschüssige dNTPs und ddNTPs, Puffern und Primern zu

separieren, da diese bei der sehr sensiblen Detektion der Basen im Sequenzer Hintergrundrauschen verursachen könnten.

Die Reinigung erfolgte mit dem DyeEx 2.0 Spin-Kit.

Die Spin-Säule wurde gevortext, der Deckel um eine viertel Drehung geöffnet und der untere Plastikverschluss entfernt. Die Säule wurde in ein 2 ml-Röhrchen überführt und drei Minuten lang bei 2800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde es in ein neues 2 ml-Röhrchen überführt und das Eluat verworfen. Das Sequenzierungsprodukt wurde langsam und zentral auf das Gelbett pipettiert, damit es sich gut im Gel verteilte und möglichst viele der zu entfernenden Substanzen im Gel haften blieben. Nachdem erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert worden war, wurde die Spin-Säule verworfen und die gereinigten Sequenzierungsprodukte in die Genetic Analyser Sample Tubes transferiert.

Sequenzierung

Die Auftrennung und Detektion der einzelnen Basen des untersuchten DNA-Abschnittes erfolgt mithilfe des ABI Prism 310-Sequenzers. Das Prinzip der Detektion beruht auf der laserinduzierten Fluoreszenzkapillarelektrophorese. Hierbei werden die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten Basen durch einen Laser angeregt und das emittierte Licht durch eine Kamera detektiert. Die Sequenzierungsprodukte werden in einer mit Polymer gefüllten Kapillare aufgetrennt. Die Daten werden mithilfe einer systeminternen DNA-Sequencing Analysis-Software verarbeitet und als Chromatogramme dargestellt.

Zunächst wurde der Autosampler herausgefahren und mit den Genetic Analyser Sample Tubes bestückt. Das Gerät wurde bei Neustart gemäß den Herstellerangaben kalibriert und Polymer oder Wasser nachgefüllt. Das Programm „ABI PRISM 310 Genetic Analyser“ wurde im Computer gestartet, so dass Reinigung, Kalibration, Maschinen-Setup und Erstellung des Sample Sheets durchgeführt werden konnten. Ein Lauf pro Probe dauerte zwei Stunden und fünfundvierzig Minuten.

Die Daten wurden mithilfe der DNA-Sequencing Analysis Software verarbeitet und als Chromatogramme dargestellt.

Sequenzauswertung

Bei der Sequenzauswertung werden die ermittelten Basenabfolgen der einzelnen Amplifikate zusammengelegt, so dass eine vollständige und durchgängige Abfolge des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes entsteht.

Die Sequenzauswertung wurde mit dem Programm „Lasergene“ (DNA-Star, Madison, Wisconsin) durchgeführt.

Die Daten wurden mittels einer 3,5-Diskette vom Sequenzer zum Auswertungscomputer überführt. Die Sequenzen wurden mithilfe des Programmmoduls „Seqman“ umgeschrieben, zusammengefügt und aneinandergelagert. Das Programm interpretiert die verschiedenen Peaks zu Basen. Die Produkte der unterschiedlichen Primer wurden verglichen. Es entstand eine Sequenz von ungefähr 840 Basenpaaren. Die Nukleotidabfolge wurde in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Da eine Aminosäure sich aus drei Nukleotiden zusammensetzt, bestehen drei Möglichkeiten für den Beginn des Leserasters. Das Raster, in dem kein Nonsensetriplett vorkam, wurde gespeichert.

Das Programmmodul „Edit Seq“ wurde verwendet, um die Aminosäuren in ihre internationalen Abkürzungen umzuschreiben, damit die Aminosäureabfolge komprimierter war und mit der internationalen Datenbank (<http://www.lahey.org/studies/>) verglichen werden konnte.

2.2.6 Datenbankrecherche

Aus der ermittelten Aminosäuresequenz lässt sich mithilfe der Referenz-Datenbank von Bush und Jacoby (<http://www.lahey.org/studies/>) für TEM- und SHV-Typen feststellen, wo relevante Aminosäuresubstitutionen stattgefunden haben und um welchen ESBL-Typ es sich somit handelt.

Die bestimmten Aminosäuresequenzen der Testisolate wurden mit denen der internationalen Datenbank verglichen und dadurch der ESBL-Typ ermittelt.

2.2.7 Statistische Berechnungen

Zur Berechnung der Signifikanz der Häufigkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungskollektiven wurde Yates korrigiertes Chi-Quadrat-Verfahren angewandt. Bei Besetzungen von Feldern mit weniger als fünf Beobachtungen kam Fishers Exakter Test zur Anwendung.

3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 56 klinische Isolate ESBL-produzierender Klebsiellen untersucht. Die ESBL-Produktion war initial phänotypisch im Routinelabor nachgewiesen worden.

Zu Beginn wurde eine Such-PCR durchgeführt, um das *blaSHV*- und *blaTEM*-Gen nachzuweisen. Bei positivem Nachweis wurde das entsprechende Gen sequenziert, um den jeweiligen SHV- und/oder TEM-Typen zu ermitteln.

Bei 51 dieser Isolate handelte es sich ausschließlich um Erstisolate. Ein Erstisolat ist die erstmalige Isolation einer gegebenen Bakterienspezies eines Patienten. An Hand dieser Isolate wurde die Verteilung der SHV- und TEM-Typen untersucht.

Die 5 weiteren Isolate waren Mehrfachisolate, die der Untersuchung hinsichtlich der Identität des ESBL-Typs dienten. Dies wird im letzten Teil der Ergebnisvorstellung aufgezeigt.

3.1 Häufigkeit des *blaSHV*- und *blaTEM*-Nachweises

Die Such-PCR der 51 ESBL-Isolate ergab folgende SHV- und TEM-Signalverteilung.

Tab. 3.1: Verteilung der SHV- und TEM-Signale (n = Anzahl der Isolate)

n	SHV	TEM
14	+	-
1	-	+
9	+	+
27	-	-

Es ließ sich bei insgesamt 24 der untersuchten ESBL-Stämme ein SHV- und/ oder TEM-Gen nachweisen. Dies entsprach 47% des Untersuchungskollektives. Es besaßen somit weniger als die Hälfte aller Isolate eine ESBL-Positivität der Typen SHV und/oder TEM. 14 der insgesamt 24 positiven Isolate zeigten lediglich ein SHV-positives Signal, ein Isolat ein TEM-positives und 9 ein sowohl SHV- als auch TEM-positives Signal.

Insgesamt wurde 33mal ein *blaSHV*- und/oder *blaTEM*-Gen nachgewiesen (23 gehörten der Gruppe SHV an und 10 der Gruppe TEM).

Bei 53% der untersuchten Stämme war kein Gen der Typen SHV und/oder TEM nachzuweisen.

3.1.1 Verteilung von SHV- und TEM-Typen

Mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung und anschließender Datenbankrecherche in der Referenz-Datenbank von Bush und Jacoby wurden die einzelnen Typen der SHV- und TEM-positiven Isolate ermittelt.

Hieraus ergab sich die in Tabelle 3.2 aufgezeigte Verteilung.

Insgesamt waren innerhalb der 33 positiven Signale, die durch die Such-PCR der 51 ESBL-positiven Klebsiellen-Isolate nachgewiesen wurden, 8 unterschiedliche SHV-Typen und 3 differente TEM-Typen vertreten.

Bei SHV-1 sowie bei TEM-1 handelt es sich um nicht-mutierte Ursprungs- β -Laktamasen. Folglich gehören diese beiden β -Laktamasen nicht zu den ESBLs. SHV-1 wurde einmal detektiert und TEM-1 achtmal. Demzufolge wurden diese 9 Isolate in den folgenden SHV- und TEM-Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt.

Somit handelte es sich lediglich um 24 ESBL-positive Signale der Typen SHV > 1 und TEM > 2. Ein Isolat wies die Typen SHV-2 und TEM-110 auf, weswegen es sich insgesamt um 23 ESBL-positive Isolate mit den Typen SHV und TEM handelte. 22 Isolate wiesen nur einen SHV-Typen, ein Isolat nur einen TEM-Typen auf und bei einem weiteren Isolat wurden sowohl ein SHV- als auch ein TEM-Typ nachgewiesen.

Tab. 3.2: Verteilung der SHV- und TEM-Typen (n = Anzahl der positiven Signale)

Typen	n
SHV-1	1
SHV-2	4
SHV-5	11
SHV-11	2
SHV-12	2
SHV-27	1
SHV-38	1
SHV-Typ nicht definierbar	1
TEM-1	8
TEM-26	1
TEM-110	1

Es wurden insgesamt 22 positive SHV-Signale detektiert. Die Hälfte der SHV-Typen machte SHV-5 mit 11 Isolaten aus. SHV-2 war viermal vertreten, gefolgt von SHV-11 und -12 mit jeweils 2 Isolaten. Einmal wurden lediglich die Isolate der Typen SHV-27 und -38 sowie der TEM-Typen TEM-26 und -110 gefunden.

Bei einem SHV-positiven Isolat konnte der Typ nicht ermittelt werden. Auch nach Sicherstellung der Reproduzierbarkeit des Ergebnisses stimmte der Typ mit keinem der bislang bekannten Typen überein.

3.1.2 Typenverteilung aufgeschlüsselt nach Spezies

Es wurden 33 *K.-oxytoca*- und 18 *K.-pneumoniae*-Isolate untersucht, die den ESBL-Phänotypen ausbildeten.

Die Häufigkeit des Nachweises von *bla*SHV- und *bla*TEM-Genen zeigt die Abbildung 3.1.

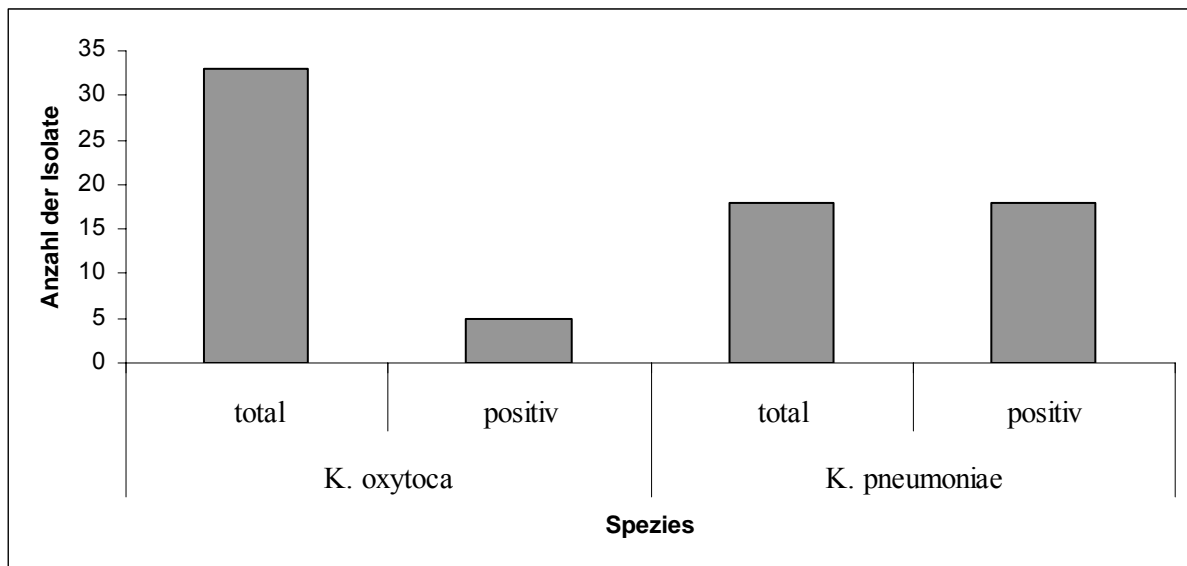


Abb. 3.1: Nachweishäufigkeit von *bla*SHV- und/oder *bla*TEM-Genen bei klinischen Isolaten der Spezies *K. oxytoca* (n = 33) und der Spezies *K. pneumoniae* (n = 18)

Das Verhältnis der untersuchten Isolate der beiden Spezies *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* betrug annähernd 2:1.

Fünf der untersuchten 33 *K.-oxytoca*-Isolate waren SHV- und/oder TEM-positiv. Diese machten somit 15% der untersuchten *K.-oxytoca*-Isolate aus. Demgegenüber wiesen alle 18 *K.-pneumoniae*-Isolate eine Positivität der Typen SHV und/oder TEM auf. Sie waren somit zu 100% SHV- und/oder TEM-positiv.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Verteilung der SHV- und TEM-positiven Isolate innerhalb der jeweiligen Spezies.

Tab. 3.3: Nachweis von *bla*SHV- und *bla*TEM-Genen bei ESBL-positiven klinischen Isolaten der Spezies *Klebsiella oxytoca* (n = 33)

Anzahl der Isolate	SHV-Typ > 1	TEM-Typ > 2
5	+	-
0	-	+
0	+	+
28	-	-

Von den 33 untersuchten *K.-oxytoca*-Isolate wiesen 5 eine ESBL-Positivität des Typs SHV auf. Bei 15% war somit das Merkmal „SHV+“ vertreten. Den größten Teil machten 28 Isolate aus, die sowohl SHV- als auch TEM-negativ waren. Kein *K.-oxytoca*-Isolat zeigte ein TEM-positives Verhalten.

Tab. 3.4: Nachweis von *bla*SHV- und *bla*TEM-Genen bei ESBL-positiven klinischen Isolaten der Spezies *Klebsiella pneumoniae* (n = 18)

Anzahl der Isolate	SHV-Typ > 1	TEM-Typ > 2
16	+	-
1	-	+
1	+	+
0	-	-

Alle 18 *K.-pneumoniae*-Isolate waren SHV- und/oder TEM-positiv. Es war somit zu 100% eine Positivität der Typen SHV und/oder TEM nachgewiesen. 16 Isolate wiesen das Merkmal „SHV+/TEM-“ auf, eins das Merkmal „SHV-/TEM+“ und eins „SHV+/TEM+“. 89% der *K.-pneumoniae*-Isolate waren lediglich SHV-positiv.

Es ist festzustellen, dass nur ein kleiner Teil der phänotypisch positiven ESBL-produzierenden *K.-oxytoca*-Isolate, nämlich 15%, für die beiden Typen SHV- und/oder TEM positiv war. Wenn sie positiv waren, dann jedoch nur für den Typen SHV. Es war somit kein *K.-oxytoca*-Isolat TEM-positiv. Demgegenüber waren alle *K.-pneumoniae*-Isolate SHV- und/oder TEM-positiv. Bei 89% konnte das Merkmal „SHV+/TEM-“ nachgewiesen werden, ein Isolat war ausschließlich TEM-positiv und ein Isolat war sowohl SHV- als auch TEM-positiv. Den größten Teil unter allen untersuchten Isolaten machten mit 85% die *K.-oxytoca*-Isolate mit dem Merkmal „SHV-/TEM-“ aus, demgegenüber wies kein *K.-pneumoniae*-Isolat dieses Merkmal auf.

Bei der Betrachtung der Signifikanz der Häufigkeitsunterschiede der beiden Spezies bezüglich ihrer SHV-Positivität oder –Negativität, wurde ein $P < 0,000001$ ermittelt. Dies bedeutet, dass ein hochsignifikanter Häufigkeitsunterschied zwischen den beiden Spezies hinsichtlich ihres SHV-Verhaltens vorlag.

3.2 Zeitliche Entwicklung der Typenverteilung

Die untersuchten 51 ESBL-produzierenden Klebsiellen-Isolate der Stammsammlung des Institutes für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum zu Kiel wurden in dem Zeitraum von 1998 bis 2006 aquiriert. Anhand dieser Isolate sollte eruiert werden, ob eine zeitliche Entwicklung in der Nachweisrate einzelner Typen bestand. In Tabelle 3.5 sind die Isolate Typ-spezifisch chronologisch dargestellt. Aufgetragen wurden sämtliche Isolate, die entweder für das Merkmal „SHV-Typ > 1“ und/oder „TEM > 2“ positiv waren (n = 23). In der letzten Zeile sind alle untersuchten Klebsiellen-Isolate aufgezeigt (n = 51).

SHV-5 war der Typ, der über den gesamten Untersuchungszeitraum am häufigsten vertreten war, wobei er in den letzten drei Jahren des Untersuchungszeitraumes nicht gefunden wurde.

Es war kein zeitlicher Trend eines bestimmten Typen auszumachen.

Tab. 3.5: Anzahl der SHV > 1- und/oder TEM > 2- positiven Isolate Typ-spezifisch und chronologisch aufgetragen für den Zeitraum von 1998 bis 2006 (n = 23) sowie insgesamt untersuchte Isolate (n = 51)

ESBL-Typ	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
SHV-2			2					1	
SHV-5	1	4		4		2			
SHV-11		1			1				
SHV-12	1					1			
SHV-27	1								
SHV-38				1					
SHV n. def.					1				
TEM-26					1				
SHV-2/TEM-110				1					
Isolate insgesamt	6	8	8	9	5	5	8	1	1

3.3 Untersuchung von Mehrfachisolaten hinsichtlich der Identität des ESBL-Typs

Exemplarisch wurde anhand der Isolate dreier Patienten geprüft, ob die den Erstisolaten folgenden Isolate (Mehrfachisolate) den gleichen ESBL-Typen aufwiesen oder ob ein Typenwechsel bzw. eine Mehrfachbesiedlung vorlag.

Die Isolate des ersten Patienten wiesen den gleichen ESBL-Typen auf. Hier wurde das Merkmal „SHV-5/TEM-negativ“ sowohl beim Erstisolat als auch bei allen Mehrfachisolaten nachgewiesen.

Zu den Isolaten der beiden anderen Patienten ist in dieser Hinsicht keine sichere Aussage zu machen, da sie weder SHV- noch TEM-positiv waren. Auch hier erscheint die Annahme einer Besiedlung mit dem gleichen Typen plausibel, da die Mehrfachisolate das gleiche SHV/TEM-Profil wie die Erstisolate aufwiesen.

Tab. 3.6: SHV- und TEM-Nachweis der Mehrfachisolate dreier Patienten

Patient	Isolate	SHV	TEM
1	Erstisolat	SHV-5	neg.
1	Zweitisolat	SHV-5	neg.
1	Drittisolat	SHV-5	neg.
1	Viertisolat	SHV-5	neg.
2	Erstisolat	neg.	neg.
2	Zweitisolat	neg.	neg.
3	Erstisolat	neg.	neg.
3	Zweitisolat	neg.	neg.

4 Diskussion

Das Vorkommen ESBL-produzierender Klebsiellen weist eine deutliche geographische Verteilung auf. Es liegt hierbei ein Nord-Süd-Gefälle sowohl auf dem amerikanischen als auch auf dem europäischen Kontinent vor. Das Maximum der ESBL-Produzenten ist in Osteuropa zu finden (62). Um die Resistenzlage in Deutschland, Österreich und der Schweiz zu untersuchen, hat sich die Paul-Ehrlich-Gesellschaft in ihrer Studie vom November 2004 unter anderem mit der Resistenzsituation von *Enterobacteriaceae*-Spezies beschäftigt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass 7,3% der *K.-pneumoniae*- und 12,4% der *K.-oxytoca*-Isolate ESBL-Bildner waren (www.p-e-g.org).

Um die bis dato unbekannte epidemiologische ESBL-Situation in Schleswig-Holstein einzuschätzen, hat das Institut für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, seit 1998 eine Stammsammlung von ESBL-produzierenden Klebsiellen-Isolaten aus dieser Region angelegt.

Hinsichtlich der Typen SHV und TEM bestehen ebenfalls geographische Unterschiede. So ist SHV-5 weltweit vertreten, TEM-10 eher in den USA und TEM-3 häufig in Frankreich zu finden (10, 26, 40). Aufgrund der mangelnden Datenlage über die Typenverteilung ESBL-produzierender Klebsiellen in Schleswig-Holstein hat sich die vorliegende Arbeit mit der Frage beschäftigt, welche TEM- und SHV-Typen bei ESBL-produzierenden Klebsiellen der Spezies *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* hier am häufigsten nachzuweisen sind.

Von den insgesamt 51 untersuchten phänotypisch positiven ESBL-Isolaten zeigten 24 ein positives SHV- und/ oder TEM-Verhalten. Es gehörte somit fast die Hälfte aller ESBL-positiven Klebsiellen den Typen SHV und TEM an. Da es sich bei den 27 SHV- und/oder TEM-negativen Isolaten phänotypisch ebenfalls um ESBLs handelte, mussten diese folglich andere ESBL-Typen wie z.B. CTX-M oder OXA aufweisen oder Nicht-ESBLs wie K1-Hyperproducer vertreten sein.

Die Ermittlung der Typenverteilung der ESBL-Typen SHV (> 1) und TEM (> 2) der untersuchten Klebsiellen-Isolate ergab, dass insgesamt sieben unterschiedliche SHV-Typen und zwei verschiedene TEM-Typen ermittelt wurden. SHV-5 war bei der Hälfte aller SHV-

positiven Signale zu finden. Der weltweit vorkommende Typ SHV-5 ist also auch in Schleswig-Holstein häufig vertreten. Er ist somit dominierend, jedoch nicht ausschließlich vorkommend.

Die Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Typen SHV > 1 und TEM > 2 in der vorliegenden Arbeit ergab, dass SHV-5 über den Zeitraum von 1998 bis 2006 am häufigsten vertreten war. Dies entspricht auch der weltweiten Datenlage, nach der, wie oben schon erläutert, SHV-5 der global häufigste Typ ist.

Bei der Betrachtung der epidemiologischen Lage anhand der untersuchten ESBL-positiven Klebsiellen in Schleswig-Holstein war weder eine Ausbruchssituation noch insgesamt eine Zunahme der ESBL-positiven Isolate im untersuchten Zeitraum zu beobachten. Da es sich um eine chronologische Sammlung ESBL-positiver Klebsiellen von Einsendern aus dem Raum Schleswig-Holstein handelte und somit die Zahl an eingesandten Isolaten über die Jahre variierte, lässt sich anhand der kleinen und schwankenden Fallzahlen lediglich feststellen, dass es keinen Hinweis für einen Ausbruch im untersuchten Zeitraum gab.

Es wurde weiterhin die Typenverteilung innerhalb der beiden untersuchten Spezies *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* verglichen. Es gehörten 33 Isolate der Spezies *K. oxytoca* und 18 der Spezies *K. pneumoniae* an. Das Verhältnis von annähernd 2:1 beruhte auf der chronologischen Sammlung ESBL-positiver Klebsiellen des Institutes für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Eine ähnliche Häufigkeitsverteilung von ESBL-Produzenten in den beiden Spezies ging auch aus der PEG-Resistenzstudie von 2004 hervor. Hierbei war der Anteil von ESBL-Produzenten bei *K.-oxytoca*-Isolaten etwa doppelt so hoch im Vergleich zu dem bei *K.-pneumoniae*-Isolaten (www.p-e-g.org).

Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Spezies war zu beobachten. Nur bei 15% der untersuchten *K.-oxytoca*-Isolate konnten die Typen TEM und/ oder SHV nachgewiesen werden, wohingegen es bei den *K.-pneumoniae*-Isolaten 100% waren. Zudem waren alle *K.-oxytoca*-Isolate TEM-negativ, während ein kleiner Teil der *K.-pneumoniae*-Isolate ein TEM-positives Verhalten aufwies. Der Häufigkeitsunterschied zwischen den beiden Spezies hinsichtlich ihres SHV-Verhaltens war hochsignifikant ($P < 0,000001$).

85% der phänotypisch ESBL-positiven *K.-oxytoca*-Isolate waren weder SHV- noch TEM-positiv. Eine Erklärungsmöglichkeit zu diesem Befund wäre, dass eine Überproduktion chromosomaler β -Laktamase, K1, vorliegt, die ausschließlich bei *K.-oxytoca*-Isolaten vorkommt. K1 ist eine chromosomal kodierte β -Laktamase, die ebenso wie die Plasmid-kodierten ESBLs der Gruppe 2be angehört (42). Sie hydrolysiert Penicillin, Cephalosporine der 3. Generation und Aztreonam und wird durch Clavulansäure inhibiert. Durch eine Mutation kommt es zur Überproduktion von K1 mit folgendem charakteristischem Antibiogramm: Sensibilität für Ceftazidim, Resistenz gegen Piperacillin, Cefuroxim und Aztreonam (25). 10-20% aller klinischen Isolate der Spezies *K. oxytoca* sind K1-Hyperproducer (36). Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft hat im Rahmen des Vergleichs ihrer Ergebnisse der Studien von 2001 und 2004 festgestellt, dass eine Zunahme von ESBL-Produzenten gerade unter den *K.-oxytoca*-Isolaten von 5,3% auf 12,4% bestand. Die PEG schloss hierbei auf einen großen Teil an K1-Hyperproducern unter den phänotypisch ESBL-positiven *K.-oxytoca*-Isolaten.

K1-Hyperproducer lassen sich von den Typen SHV und TEM phänotypisch schlecht unterscheiden. Daher ist es plausibel, dass es sich bei einem großen Teil der SHV- und TEM-negativen *K.-oxytoca*-Isolate um K1-Hyperproducer handelte, nicht aber um ESBL-Produzenten. Das Unvermögen der phänotypischen Tests, zwischen ESBL und K1-Hyperproducern zu differenzieren, stellt ein Problem dar. Es empfiehlt sich, einen Etest mit mehreren verschiedenen Antibiotika und vor allem mit Ceftazidim durchzuführen (33).

Alternativ könnte es sich bei den phänotypisch ESBL-positiven *K.-oxytoca*-Isolaten, die sowohl SHV- als auch TEM-negativ waren, um andere ESBL-Typen wie z.B. OXA oder CTX-M handeln.

OXA ist eine Oxacillinase mit erweitertem Substratspektrum; Einige Typen dieser Klasse gehören ebenfalls zu den ESBLs (42). Die erste OXA, OXA-10, wurde bei einem *P.-aeruginosa*-Isolat in Ankara/ Türkei entdeckt. OXA gehört der Gruppe 2d an und kommt bevorzugt bei *P. aeruginosa* vor, ist aber auch bei anderen *Enterobacteriaceae* zu finden. OXA-ESBLs weisen eine große Substratdiversität auf. In erster Linie werden Oxacillin und Cloxacillin hydrolysiert, wohingegen Cephalosporine mit erweitertem Spektrum nur mäßig inaktiviert werden. Die Aktivität gegen 3.Generationscephalosporine ist jedoch abhängig von

dem jeweiligen OXA-Typ. So weisen z. B. die Typen OXA-11, -14, -16 und -45 eine Resistenz gegen Cefotaxim und Ceftazidim auf (17, 61). Die meisten ESBLs des Typs OXA sind resistent gegen β -Laktamaseinhibitoren, wohingegen OXA-18 und -45 von Clavulansäure inhibiert werden (45, 61).

Da ESBLs des Typs OXA selten bei Klebsiellen zu finden sind und meistens eine β -Laktamaseinhibitor-Resistenz aufweisen, ist es unwahrscheinlich, dass sich Klebsiellen des ESBL-Typs OXA unter den 27 SHV- und/oder TEM-negativen Isolaten befanden.

Eine weitere β -Laktamase ist CTX-M, die nach Naas et al. die Gruppe der „New ESBLs“ ausmacht (38). Diese β -Laktamase, die bevorzugt Cefotaxim hydrolysiert, ist auf Grund ihres weltweiten Vorkommens und ihrer rasanten Verbreitung, gerade im Bereich der ambulant erworbenen Infektionen, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (63).

CTX-M wurde erstmalig 1989 in München bei einem *E.-coli*-Isolat entdeckt (5). Der Name stammt von der Fähigkeit, Cefotaxim zu hydrolysieren und dem ersten Fundort, München. CTX-M gehört der molekularen Klasse A an und ist hauptsächlich bei *E.-coli*-Isolaten und in geringerem Maße bei *K.-pneumoniae*-Isolaten zu finden (42). Im Jahr 2003 waren 89,7% der *E.-coli*-Isolate in Taiwan CTX-M positiv, wohingegen es nur 58,5% der *K.-pneumoniae*-Isolate waren (66). *E. coli* ist somit der Hauptproduzent dieser ESBL. Es gibt mittlerweile über 65 verschiedene CTX-M-Typen, die in sechs Gruppen eingeteilt werden. Die Gene von CTX-M stammen ursprünglich aus dem Genom der Bakterien *Kluyvera* spp. und werden Plasmid-vermittelt weitergegeben, was zu einer enormen Verbreitung von CTX-M führte (8, 53). CTX-M ist auf allen Kontinenten zu finden, wobei jeweils bestimmte Subtypen dominieren. Am häufigsten ist CTM-X in Südamerika und Europa zu finden (42).

Von besonderer Bedeutung ist, dass CTX-M zunehmend bei ambulant erworbenen Infektionen wie z.B. bei Harnwegsinfekten zu finden ist (46). Es handelt sich bei dieser Gruppe der „New ESBLs“ nicht um nosokomial erworbene Keime, was charakteristisch für die „Old ESBLs“ wie SHV und TEM war (38).

CTX-M sind aktiv gegen Cephalosporine mit erweitertem Spektrum, wobei sie Cefotaxim stärker hydrolysieren als Ceftriaxon und kaum Aktivität gegen Ceftazidim aufweisen. Zudem sind sie resistent gegen Aztreonam, Chinolone, Tetrazykline und Aminoglykoside. Das Resistenzverhalten gegenüber β -Laktamaseinhibitoren variiert stark, wobei Tazobactam sich als stärkerer Inhibitor erweist als Clavulansäure (15). Carbapeneme sind z. Z. noch stabil

gegenüber CTX-M, jedoch sind schon die ersten Resistenzen bei *K.-pneumoniae*-Isolaten aufgetreten durch Verlust von äußeren Membranproteinen (22). Dieses Verhalten gibt Anlass zu großer Sorge, da die verbleibenden therapeutischen Optionen limitiert sind.

Die hier untersuchten Klebsiellen könnten somit auch CTX-M-positiv sein, da die phänotypische Testung nicht zwischen CTX-M und SHV oder TEM differenzieren kann. Es wäre von Interesse, solch eine Unterscheidung in nachfolgenden Arbeiten durchzuführen.

Es ist festzuhalten, dass OXA eine Inhibitorresistenz aufweist. Sie lässt sich nicht oder schlecht von Clavulansäure inhibieren und zeigt ein anderes Substratspektrum auf als die Typen SHV und TEM. Somit wäre diese ESBL-Gruppe im Etest ausgesondert worden und fiel nicht unter das ausgesuchte Kontingent von 51 ESBL-positiven *Klebsiella*-Isolaten. Bei CTX-M ist es anders, da bei diesen ESBLs das Inhibitorverhalten stark variiert und sie somit per phänotypischer Testung nicht von den Typen SHV und TEM unterschieden werden können.

Eine weitere β -Laktamase ist AmpC, die nicht zu den ESBLs gehört, jedoch bei Überproduktion, so genannte High-Level-Producer, ein ähnliches Substratspektrum aufweist. AmpC hat sich zunächst chromosomal-vermittelt verbreitet, seit Ende der 80er Jahre jedoch auch Plasmid-vermittelt. Bei High-Level-AmpC-BL-Producer handelt es sich um eine β -Laktamase der Gruppe C, so dass sich β -Laktamaseinhibitoren im Allgemeinen als unwirksam erweisen (35). Darüberhinaus sind sie resistent gegen Oxyiminocephalosporine und Monobactame. Am häufigsten sind sie bei Isolaten der Spezies *K.-pneumoniae*, aber auch bei *K. oxytoca*-, *Salmonella*- und *Proteus mirabilis*-Isolaten zu finden (6).

Somit unterscheiden sich High-Level-AmpC-BL-Producer ebenfalls von den ESBL-Typen SHV und TEM hinsichtlich der β -Laktamaseinhibitorresistenz und würden in den phänotypischen Tests detektiert.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass einige Klebsiellen sowohl eine AmpC-Überproduktion als auch eine ESBL-Produktion aufweisen. Dies ist am häufigsten der Fall bei *Enterobacter* und *Citrobacter*. Durch die AmpC-Überproduktion, die eine β -Laktamaseinhibitorresistenz bewirkt, werden simultan vorkommende ESBLs phänotypisch nicht detektiert. Dies bedeutet, dass ESBLs wie SHV und TEM nicht entdeckt werden (19).

Ein noch größeres Problem stellen diese multiresistenten Erreger in Verbindung mit Carbapenemasen dar. Carbapenemasen, die ihre Resistenz durch Porinverlust erlangen, sind zunehmend zu finden. Dies stellt gerade den Kliniker vor eine enorme Herausforderung, da Reserveantibiotika wie Imipenem und Meropenem sich als unwirksam gegen diese multiresistenten Bakterien erweisen.

Zum einen sind OXA, CTX-M und High-Level-AmpC-BL-Producer selten bei *K.-oxytoca*-Isolaten zu finden, wohingegen K1-Hyperproducer ausschließlich bei der Spezies *K. oxytoca* vorkommen. Zum anderen werden K1-Hyperproducer im Gegensatz zu den drei anderen beschriebenen β -Laktamasen von Clavulansäure inhibiert. Aufgrund dieser Tatsachen ist es plausibel anzunehmen, dass es sich bei den 85% SHV- und TEM-negativen *K.-oxytoca*-Isolaten um K1-Hyperproducer handelt.

Weiterhin wurden acht Isolate dreier Patienten gewählt, um exemplarisch zu prüfen, ob die Identität der Mehrfachisolate derer der Erstisolate entsprach. Hierbei wurde ermittelt, dass die Mehrfachisolate den gleichen Typen bzw. das gleiche Muster wie die Erstisolate aufwiesen. Folglich werden Wirtsindividuum üblicherweise nur von einem, nicht aber von diversen ESBL-Typen besiedelt.

Zusammenfassend können aus den Ergebnissen dieser Arbeit folgende Aussagen gezogen werden:

- Ein Großteil der untersuchten phänotypisch ESBL-positiven *K.-oxytoca*-Isolate war SHV-negativ und kein einziges *K.-oxytoca*-Isolat war TEM-positiv. Dieses Verhalten lässt sich gut durch eine K1-Überproduktion erklären.
- Alle untersuchten *K.-pneumoniae*-Isolate waren SHV- und / oder TEM-positiv, wobei TEM nur bei einem kleinen Teil vertreten war. Der dominierende Typ in Schleswig-Holstein ist SHV-5, der auch weltweit am häufigsten zu finden ist.

Hieraus könnten sich weitere Untersuchungen ergeben:

Zum einen könnten die phänotypisch ESBL-positiven *K.-oxytoca*-Isolate, die jedoch sowohl SHV- als auch TEM-negativ waren, auf eine K1-Überproduktion getestet werden.

Zum anderen bleibt weiter zu beobachten, ob andere ESBLs wie z.B. CTX-M, die sich gerade im ambulanten Bereich zunehmend ausbreiten, eine noch stärkere Bedrohung darstellen werden als die Typen SHV oder TEM. Hieraus ergibt sich die Fragestellung, wie es sich mit dem Vorkommen von CTX-M in Schleswig-Holstein verhält. Auch dies sollte in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

Eine spezifische ESBL-Diagnostik ist wichtig, um entscheidende Hygienemaßnahmen einzusetzen. So wird z. Z. bei ESBL-Positivität der Patient isoliert und mit Carbapenemen therapiert. Handelt es sich um eine ESBL-Negativität oder um eine unentdeckte Positivität, was der Fall bei gleichzeitiger Produktion von ESBLs und High-Level-AmpC-BL-Producer sein kann, finden weder eine Isolation noch eine Therapie mit Carbapenemen statt. Dies stellt eine große Gefahr dar. Es sollte somit auch bei High-Level-AmpC-BL-Producern Isolationspflicht bestehen und eine Carbapenem-Therapie durchgeführt werden. Es besteht Nachholbedarf für klare Vorgaben von den entsprechenden Fachgesellschaften, was im Fall simultaner Produktion von ESBL und High-Level-AmpC-BL-Producer zu tun ist und wie die Optionen sind.

Es ist von enormer Wichtigkeit, bei der Forschung über ESBLs auf dem neuesten Stand zu bleiben, da es sich bei diesen β -Laktamasen mit erweitertem Substratspektrum und immer breiter werdendem Spektrum um eine rasante und sehr dynamische Entwicklung handelt. Gerade deswegen stellen diese Enzyme eine große Gefahr für den Patienten und eine Herausforderung für den Kliniker dar, weil die Therapiemöglichkeiten zunehmend limitiert sind.

5 Zusammenfassung

Klebsiellen, insbesondere *K. pneumoniae*, sind häufige Erreger nosokomialer Infektionen und weisen therapeutisch zunehmend Probleme durch die Produktion von extended-spectrum β -Laktamasen (ESBL) auf, so dass zur Bekämpfung dieser häufig multiresistenten Bakterien auf Carbapeneme zurückgegriffen werden muss.

ESBLs kommen weltweit vor, unterliegen jedoch einer geografischen Verteilung mit einem markanten Nord-Süd-Gefälle und einem Maximum in Südosteuropa. Die beiden häufigsten Typen unter den ESBLs sind die Gruppen der SHV- und TEM-Enzyme, deren Typen ebenfalls geographisch unterschiedlich häufig zu beobachten sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Verteilung von SHV- und TEM-Typen in Schleswig-Holstein zu ermitteln, da Daten zur Epidemiologie ESBL-bildender Klebsiellen in Norddeutschland bislang nicht vorlagen.

Es wurden 56 phänotypisch als ESBL-positiv identifizierte Klebsiellen der Spezies *K. oxytoca* und *K. pneumoniae* untersucht, die im Zeitraum von 1998 bis 2006 konsekutiv aus humanem Patientenmaterial schleswig-holsteinischer Krankenhäuser isoliert worden waren. Zunächst wurden in einer Such-PCR die *bla*SHV- und *bla*TEM-Gene der Isolate nachgewiesen und bei positivem Nachweis anschließend die entsprechenden PCR-Amplifikate sequenziert. Die ermittelten Aminosäuresequenzen wurden anhand einer internationalen Referenz-Datenbank (<http://www.lahey.org/studies/>) hinsichtlich des SHV- und TEM-Typs bewertet.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass

- alle *K. pneumoniae*-Isolate (n=18) ESBL der SHV- und/oder TEM-Familie aufwiesen, wobei TEM-Typen nur selten festzustellen waren.
- von den 33 untersuchten *K. oxytoca*-Isolaten fünf (15%) positiv für SHV-ESBLs waren, jedoch kein Isolat für TEM-ESBLs. Möglicherweise handelt es sich bei den anderen 28 Isolaten um K1-Hyperproducer, da diese sich phänotypisch nicht von ESBL-produzierenden Bakterien unterscheiden.

- in dem untersuchten Kollektiv ein Spektrum von sieben verschiedenen SHV- und zwei unterschiedlichen TEM-Typen zu beobachten war. Der weltweit am häufigsten nachgewiesene Typ SHV-5 prädominierte auch in Schleswig-Holstein.
- eine Ausbruchssituation eines bestimmten Typen nicht feststellbar war.

Diese Ergebnisse werfen zwei Folgefragen auf: Zum einen wäre es von Interesse zu ermitteln, wie häufig K1-Hyperproducer unter den regionalen *K. oxytoca*-Isolaten vertreten sind. Zum anderen ist unklar, inwiefern andere ESBLs, wie CTX-M, die zunehmend an Bedeutung gewinnen, in Schleswig-Holstein zu finden sind.

6 Literatur

1. Abraham, E. P., Chain, E. (1940): An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146, 837
2. Ariffin, H., Navaratnam, P., Mohamed, M. et al. (2000): Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in children with febrile neutropenia. *Int. J. Infect. Dis*, 4, 21-25
3. Bagley, S.T., Seidler, R. J., Talbot, H. W. J., Morrow, J. E. (1978): Isolation of *Klebsiellae* from within living wood. *Appl. Environ. Microbiol*, 36, 178-185
4. Barthélémy, M., Péduzzi, J., Labia, R. (1985): Distinction entre les structures primaires des β -lactamases TEM-1 et TEM-2. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*, 136, 311-321
5. Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S. (1990): A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18, 294-298
6. Bauernfeind, A., Chong, Y., Lee, K. (1998): Plasmid-encoded AmpC β -lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery. *Yonsei Med. J*, 39, 520-525
7. Bell, J. M., Turnidge, J. D., Gales, A. C., Pfaller, M. A., Jones, R. N. (2002): Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: Regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 42, 193-198
8. Bonnet, R. (2004): Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 1-14
9. Bradford, P. A. (2001): Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev*, 14, 933-951
10. Bradford, P. A., Cherubin, C. E., Idemyor, V., Rasmussen, B. A., Bush, K. (1994): Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: Identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*, 38, 761-766
11. Branger, C., Bruneau, B., Lesimple, A. L., Bouvet, P. J., Berry, P., Sevali-Garcia, J., Lambert-Zechovsky, N. (1997): Epidemiological typing of extended-spectrum beta-

- lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. *J. Hosp. Infect.*, 36, 23-36
12. Brown, C., Seidler, R. J. (1973): Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Microbiol.*, 25, 900-904
 13. Bush, K. (2001): New β -lactamases in gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 32, 1085-1089
 14. Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995): A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1211-1233
 15. Bush, K., Macalintal, C., Rasmussen, B. A., Lee, V. J., Yang, Y. (1993): Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 851-858
 16. Colodner, R. (2005): Extended-spectrum β -lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *Am. J. Inf. Control.*, 33, 104-107
 17. Danel, F., Hall, L. M., Gur, D., Livermore, D. M. (1998): OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 3117-3122
 18. Datt, N., Kontomichalou, P. (1965): Penicillinase synthesis controlled by infectious R-factor in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208, 239-241
 19. Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V. (2008): Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: Review and bench guide. *Clin. Microbiol. and Inf. Diseases*, 14, 90-103
 20. Du, B., Long, Y., Liu, H. et al. (2002): Extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: Risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med.*, 28, 1718-1723
 21. Edberg, S. C., Piscitelli, V., Cartter, M. (1986): Phenotypic characteristics of coliform and noncoliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 474-478
 22. Elliot, E., Brink, A. J., van Greune, J. et al. (2006): In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum β -lactamase. *Clin. Infect. Dis.*, 42, 95-98

23. Gaillot, O., Maruejols, C., Abachin, E., Lecuru, F., Arlet, G., Simonet, M., Berche, P. (1998): Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J. Clin. Microbiol*, 36, 1357-1360
24. Gales, A. C., Sader, H. H., Jones, R. N. (2002): Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 44, 301-311
25. Gheorghui, R., Yuan, M., Hall, L. M., Livermore, D. M. (1997): Bases of variation in resistance to beta-lactams in *Klebsiella oxytoca* isolates hyperproducing K1 beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother*, 40, 533-541
26. Gniadkowski, M., Schneider, I., Jungwirth, R., Hryniewicz, W., Bauernfeind, A. (1998): Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three polish hospitals: Identification of three novel TEM- and SHV-5-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 42, 514-520
27. Goossens, H. (2001): MYSTIC program: Summary of European data from 1997 to 2000. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 41, 183-189
28. Hart, C. A. (1993): *Klebsiellae* and neonates. *J. Hosp. Infect*, 23: 83-86
29. Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., Wiedemann, B. (1985): Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother*, 28, 302-307
30. Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S. (1983): Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxim in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11, 315-317
31. Knox, J. R. (1995): Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: Mutations, specificity and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother*, 39, 2593-2601
32. Lautenbach, E., Patel, J. B., Bilker, W. B., Edelstein, P. H., Fishman, N. O. (2001): Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin. Infect. Dis*, 32, 1162-1171

33. Leverstein-van Hall, M. A., Fluit, A. C., Paauw, A., Box, A. T., Brisse, S., Verhoef, J. (2002): Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J. Clin. Microbiol*, 40, 3703-3711
34. Lin, M. F., Huang, M. L., Lai, S. H. (2003): Risk factors in the acquisition of extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella pneumoniae*: A case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. *J. Hosp. Infect*, 53, 39-45
35. Livermore, D. M. (1995): β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev*, 8, 557-584
36. Livermore, D., Yuan, M. (1996): Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J. Antimicrob. Chemother*, 38, 409-424
37. Matsen, J. M., Spindler, J. A., Blosser, R. O. (1974): Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl. Microbiol*, 28, 672-678
38. Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P. (2008): Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect. Diseases*, 14, 42-52
39. NCCLS. (2003): M100-S13. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. NCCLS. NCCLS documents. Wayne, Pennsylvania, USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS documents
40. Nordmann, P. (1998): Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin. Infect. Dis*, 27, 100-106
41. Ørskov, I. (1984): Genus *Klebsiella*. In: N. R. Krieg, und J. G. Holt. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Band 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 461-465
42. Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005): Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev*, 18, 657-686
43. Patterson, J. E., Hardin, T. C., Kelly, C. A., Garcia, R. C., Jorgensen, J. H. (2000): Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*, 21, 455-458

44. Pfaller, M. A., Segreti, J. (2006): Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Infect. Dis*, 42, 153-163
45. Philippon, L. N., Naas, T., Bouthors, A. T., Barakett, V., Nordmann, P. (1997): OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 41, 2188-2195
46. Pitout, J. D. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., Poirel, L. (2005): Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother*, 56, 52-59
47. Pitton, J. S. (1972): Mechanism of bacterial resistance to antibiotics. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, 65, 15-93
48. Podschun, R., Ullmann, U. (1998): Diagnostische Bibliothek – *Klebsiella*. *Lab. Med*, 54, 1-8
49. Podschun, R., Ullmann, U. (1998): *Klebsiella* spp. as nosocomial Pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev*, 11, 589-603
50. Rahal, J. J., Urban, C., Horn, D. et al. (1998): Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA*, 280, 1233-1237
51. Ramphal, R., Ambrose, P. G. (2006): Extended-spectrum β -lactamases and clinical outcomes: Current Data. *Clin. Infect. Dis*, 42, 164-172
52. Rice, L. B., Eckstein, E. C., DeVente, J., Shlaes, D. M. (1996): Ceftazidim-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center. *Clin. Infect. Dis*, 23, 118-124
53. Rodriguez, M. M., Power, P., Radice, M. et al. (2004): Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: A possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 4895-4897
54. Sader, H. S., Jones, R. N., Silva, J. B. (2002): Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: Four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 44, 281-288
55. Samaha-Kfoury, J. N., Araj, G. F. (2003): Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *Br. Med. J*, 327, 1209-1213

56. Schaberg, D. R., Culver, D. H., Gaynes, R. P. (1991): Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med*, 91, 72-75
57. Shah, A. A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A. (2004): Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Research in Microbiol*, 155, 409-421
58. Spencer, R. C. (1996): Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 15, 281-285
59. Stürenburg, E., Mack, D. (2003): Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J. Infect*, 47, 273-295
60. Thomson, K. S. (2001): Controversies about extended-spectrum and AmpC β -lactamases. *Emerg. Infect. Dis*, 7, 333-336
61. Toleman, M. A., Rolston, K., Jones, R. N., Walsh, T. R. (2003): Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, 2859-2863
62. Turner, P. J. (2005): Extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Infect. Dis*, 41, 273-275
63. Tzouveleki, L. S., Tzelepi, E., Tassios, P. T., Legakis, N. J. (2000): CTX-M-type beta-lactamases: An emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14, 137-142
64. Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J. M., Legakis, N. (2001): Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis*, 32, 94-103
65. Wong-Beringer, A., Hindler, J., Loeloff, M. et al. (2002): Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. *Clin. Infect. Dis*, 34, 135-146
66. Yan, J. J., Hsueh, P. R., Lu, J. J. et al. (2006): Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother*, 50, 1861-1864

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. sc. hum. R. Podschun für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas. Ich bedanke mich für die exzellente und sehr flexible Betreuung, die über Länder und Kontinente hinausging. Herr Prof. Podschun hat es immer möglich gemacht, mit mir mittels Telefon, Internet, Post oder persönlich in Kontakt zu bleiben. Ich danke ihm für die geduldigen Beantwortungen meiner Fragen und aufschlussreichen Diskussionen. Darüber hinaus herrschte immer eine angenehme und motivierende Atmosphäre.

Dem Direktor des Instituts für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Herrn Prof. Dr. med. H. Fickenscher sowie dem ehemaligen Direktor dieses Instituts, Herrn Prof. Dr. med. U. Ullmann danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung in deren Institut.

Mein herzlicher Dank gilt den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau B. Großheim und Frau A. Hölzgen, die mich hervorragend in den Laboralltag eingewiesen haben. Ihre hilfreichen und konstruktiven Vorschläge haben einen großen Beitrag zur Durchführung der Experimente geleistet. Die freundschaftliche und ungezwungene Atmosphäre hat mich bei experimentellen Rückschlägen stets aufgemuntert.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn S. Künzel, der mir mit seinen guten und präzisen Vorschlägen beim Schreiben dieser Arbeit sehr weitergeholfen hat.

Abschließend danke ich meiner Familie für die unschätzbaren Korrekturhilfen. Ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen hat entscheidend zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Rike Wrede
 Anschrift: Niederstrich 11, 27632 Cappel
 Geburtsdatum: 24.03.1983
 Geburtsort: Cuxhaven

Schulische Laufbahn:

2002 **Lichtenberg - Gymnasium, Cuxhaven, Deutschland:**
 Gymnasium, Abitur

Hochschule:

2002 **Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland:**
 Beginn des Humanmedizinstudiums
 2004 **Physikum**

Praktika:

2005 **Beginn der Dissertation;** Thema: Epidemiologische Untersuchungen zur Typenverteilung von extended-spectrum β -Laktamasen bei Klebsiellen-Isolaten aus humanen Patientenproben in Schleswig-Holstein

2005 **Dr. Hering, Cuxhaven, Deutschland:**
 Famulatur, chirurgische Praxis

2005 **St. Joseph Hospitals, Bremerhaven, Deutschland:**
 Famulatur, Innere Medizin

2006 **Herzzentrum Bodensee, Kreuzlingen, Schweiz:**
 Famulatur, Kardiologie

2006 **Klinikum Bremerhaven Reinkenheide, Deutschland:**
 Famulatur, Anästhesie

2006 **DRK Kliniken Westend, Berlin, Deutschland:**
 Famulatur, Gynäkologie

2007 **Tribuvan Teaching Hospital, Kathmandu, Nepal:**
 Famulatur, Chirurgie, gefördert vom bvmd

2007 **Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, UBO-Brest, Frankreich:** Auslandssemester unterstützt von dem Sokrates-Erasmus-Austauschprogramm

2008 **Westküstenklinikum, Heide, Deutschland:**
 Praktisches Jahr, Anästhesie u. Chirurgie

2008 **Papworth Hospital NHS, University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien:**
 Praktisches Jahr, Chirurgie, Auslandsstipendium der CAU

2008 **Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Deutschland:**
 Praktisches Jahr, Innere Medizin