



# **Resistenztransfer in der Darmflora am Beispiel von ESBL- und Carbapenemase-Genen**

**Yvonne Pfeifer**

FG13 Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen  
Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode

**Bad Honnef-Symposium 2015**

**30.-31. März 2015, Königswinter**

# ESBL: „extended-spectrum $\beta$ -lactamase“

- **$\beta$ -Laktamasen:** Bakterielle Enzyme, die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika hydrolysieren

- **Phänotyp:** Resistenz gegen Aminoacylpenicilline (Ampicillin)



Resistenz gegen 1., 3., 4. Gen. Cephalosporine (Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftazidim, Cefepim)

Resistenz gegen Monobactame (Aztreonam)

Empfindlich gegenüber Cephamycinen (z.B. Cefoxitin) und Carbapenemen (Imipenem, Meropenem)

**ESBL-Inhibitoren: Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam**

- **Vielfalt:**



CTX-M-ESBL > 100 Varianten

TEM-ESBL > 80 Varianten

SHV-ESBL > 50 Varianten

OXA-ESBL > 20 Varianten

GES-ESBL > 15 Varianten

VEB-ESBL > 10 Varianten

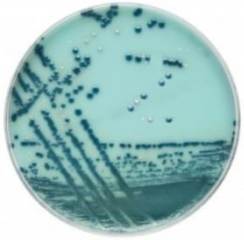
PER-ESBL > 8 Varianten

„klassische“ ESBL, häufig in Enterobacteriaceae

„seltene“ ESBL, sporadisch in Enterobacteriaceae, *Acinetobacter* spp. und *Pseudomonas aeruginosa*

# Carbapenemasen

- **Phänotyp:** Resistenz gegen Aminoacylpenicilline, 1.-4. Gen. Cephalosporine und Carbapeneme



Empfindlich gegenüber Aztreonam → Metallo- $\beta$ -Laktamasen (MBL)  
nicht hemmbar durch ESBL-Inhibitoren (Clavulansäure)

**Carbapenemase-Inhibitoren: EDTA (MBL) und Borsäure (KPC)**

---

► **Vielfalt:**

**OXA-58/23/72** → ausschließlich und weit verbreitet in *Acinetobacter* spp.

**KPC** → „*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase“ überwiegend in *K. pneumoniae*

**OXA-48** → in Enterobacteriaceae; häufig in Türkei, Nordafrika, Indien, Arab. Raum

**VIM** → „Verona Integron-borne Metallo- $\beta$ -Laktamase“ in Enterobacteriaceae und *P. aeruginosa*

**NDM** → „Neu-Delhi Metallo- $\beta$ -Laktamase“ in Enterobacteriaceae und *A. baumannii*

**IMP** → selten in *E. cloacae*, *K. pneumoniae*; häufiger in *P. aeruginosa*

**GIM** → „German Imipenemase“ vereinzelt in NRW vorkommend in *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *A. pittii*

# ESBL-Bildner in Deutschland

- ▶ **ESBL-bildende *E. coli* in der Allgemeinbevölkerung (Valenza *et al.* 2014)**

**6,3% Besiedlungsrate**

Häufigste Varianten: **CTX-M-15 (46%)**, CTX-M-1 (24%), CTX-M-14 (15%)



- ▶ **ESBL-bildende *E. coli*/K. *pneumoniae* in Arztpraxen und Klinik**



<https://ars.rki.de>

ESBL-*E. coli*: **12% in 2013 stationär; 7,5% in 2013 ambulant**

ESBL-K. *pneumoniae*: **14,9% in 2013 stationär, 9,1% in 2013 ambulant**



- ▶ **ESBL-bildende *E. coli* in Arztpraxen und Klinik (Pfeifer *et al.* HygMed, 2013)**

Varianten in Arztpraxen: **CTX-M-15 (50%)**, CTX-M-1 (32%), CTX-M-14 (5%)

Varianten im Krankenhaus: **CTX-M-15 (52%)**, CTX-M-1 (25%), CTX-M-14 (7%)

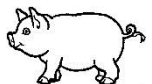
- ▶ **ESBL-bildende *E. coli* beim Masthuhn/Mastschwein (Laube H. *et al.* 2013/2014)**

**>50% Besiedlungsrate**

Häufigste Varianten Schwein: **CTX-M-1 (>60%)**, CTX-M-15 u. CTX-M-14 (<10%)

Häufigste Varianten Huhn: **CTX-M-1 (>30%)**, CMY-2 (AmpC)(>30%), TEM-52(>10%)

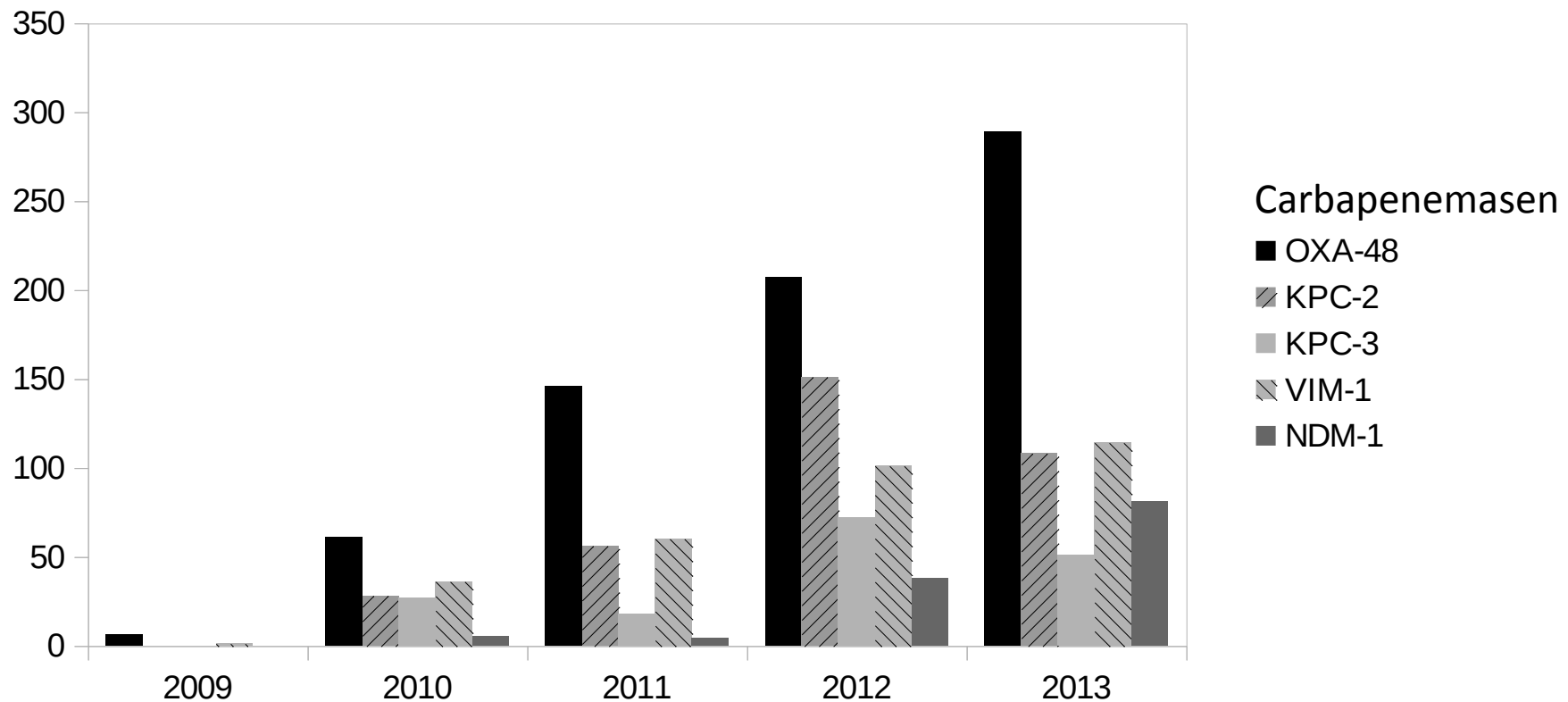
Varianten Hühnerfleisch: **CTX-M-1 (>40%)**, SHV-12 (>40%) (Kola *et al.* JAC 2012)



# Carbapenemase-Nachweise in Deutschland

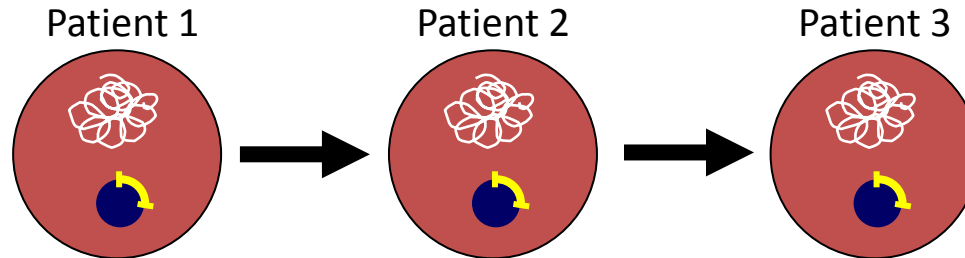
## ► Nachweise Carbapenemase-bildender Gram-negativer Bakterien 2009-2013

Daten des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhauserreger  
Bochum (Dr. Martin Kaase)



# ESBL und Carbapenemasen - Verbreitungstrategien

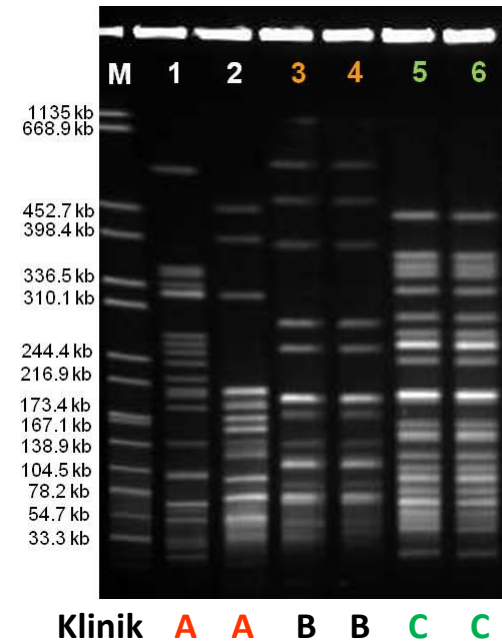
## ► Klonale Verbreitung resistenter Bakterien-Stämme (Klone)



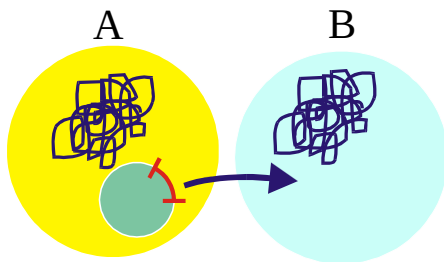
**Erreger-Typisierung:**

DNA-Makrorestriktion + Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Unterscheidung Ausbruchsisolat/Nicht-Ausbruchsisolat



## ► Verbreitung der ESBL/Carbapenemase-Gene durch Horizontalen Gentransfer (HGT)



Ausbreitung von Resistenz-Plasmiden zwischen verschiedenen Spezies

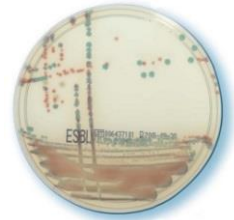
A Donor  
B Rezipient

Lage der ESBL/Carbapenemase-Gene innerhalb von mobilen genetischen Elementen (z.B. Transposons) auf konjugativen Plasmiden

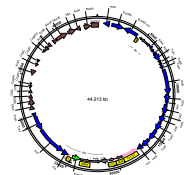


# Resistenztransfer im Darm: STEC und ESBL

- ▶ ESBL-Screening von *E. coli*-Isolaten aus Stuhlproben im Rahmen des Ausbruchsgeschehens *E. coli* O104:H4 in Hessen in 2011
- ▶ Positive Stuhlprobe einer 60 Jahre alten gesunden Frau, die an einer Feier teilnahm, auf der Salat mit mutmaßlich *E. coli* O104:H4 kontaminierten Sprossen serviert wurde:



*E. coli* O91:H14    Phylogruppe B1    positiv: CTX-M-15 + TEM-1; *stx1a*  
*E. coli* O16:H4    Phylogruppe B2    positiv: CTX-M-15 + TEM-1



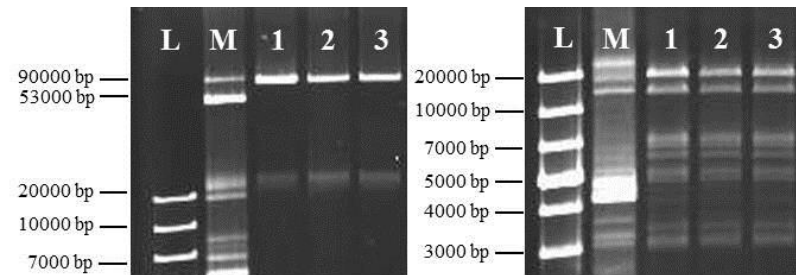
- ▶ Eigenschaften der Resistenzplasmide der beiden *E. coli* und des *E. coli* O104:H4 Ausbruchsstammes sind identisch:

Plasmidgröße ca. 85-90 kb

Plasmid-Typ: IncI1 pMLST-Typ ST31

Plasmidrestriktionsmuster identisch

Resistenzgene: *bla*<sub>CTX-M-15</sub> + *bla*<sub>TEM-1</sub>



Transkonjuganten: 1 = *E. coli* O91:H14; 2 = *E. coli* O16:H4; 3 = *E. coli* O104:H4; L+M = Marker

- ▶ Untersuchung RKI: 16 Patienten mit *E. coli* O104:H4 trugen gleichzeitig einen weiteren *E. coli*-Stamm mit dem gleichen Resistenzplasmid

Arvand *et al.* IJMM 2015  
Diercke *et al.* 2013  
Mellmann *et al.* 2012

# Therapie-Transfer-Selektion: Salmonella/Shigella und ESBL

## Patient 1:

15 Jahre

Colitis ulcerosa

Blutige Diarrhö

## Patient 2:

21 Monate

Familienfeier (Türkei)

Diarrhö, Dehydratation

## Patient 3:

9 Jahre

Neuroblastom

milde Diarrhö



Screening auf Enteritiserreger



*Salmonella* Shubra



*Shigella boydii*



*Salmonella* Manhattan

Therapie mit Cephalosporinen 3. Generation, da alle Erreger initial sensibel getestet



Cefotaxim (6d)



Cefotaxim (5d)



Ceftazidim (3d)



# Therapie-Transfer-Selektion: Salmonella/Shigella und ESBL

## Patient 1:

*Salmonella* Shubra

## Patient 2:

*Shigella boydii*

## Patient 3:

*Salmonella* Manhattan

Therapie mit Cephalosporinen 3. Generation, da Erreger initial sensibel getestet



Nachweis **Cephalosporin-resistenter** *Salmonella* und *Shigella*-Isolate nach Therapie

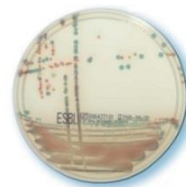


*Salmonella* Shubra mit  
**CTX-M-14 ESBL**

*Shigella boydii* mit  
**CTX-M-15 ESBL**

*Salmonella* Manhattan  
mit **SHV-12 ESBL**

ESBL-Screening



aller Stuhlproben der Patienten

# Therapie-Transfer-Selektion: Salmonella/Shigella und ESBL

## Patient 1:

### 1. Stuhlprobe:

*S. Shubra* sensibel

*E. coli* **CTX-M-14 ESBL**



### Stuhlprobe nach Therapie

*S. Shubra* **CTX-M-14 ESBL**

*E. coli* **CTX-M-14 ESBL**

*A. hydrophila* **CTX-M-14 ESBL**

## Patient 2:

### 1. Stuhlprobe:

*S. boydii* sensibel

*E. coli* **CTX-M-15 ESBL**



### Stuhlprobe nach Therapie

*S. boydii* **CTX-M-15 ESBL**

*E. coli* **CTX-M-15 ESBL**

## Patient 3:

### 1. Stuhlprobe:

*S. Manhattan* sensibel

*E. coli* **SHV-12 ESBL**

*C. freundii* **SHV-12 ESBL**



### Stuhlprobe nach Therapie

*S. Manhattan* **SHV-12 ESBL**

*E. coli* **SHV-12 ESBL**

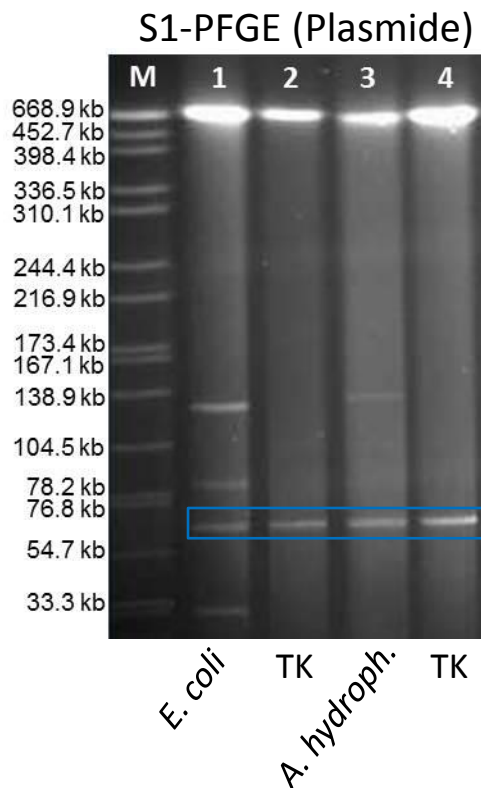
*C. freundii* **SHV-12 ESBL**

*K. pneumoniae* **SHV-12 ESBL**

# Therapie-Transfer-Selektion: Salmonella/Shigella und ESBL

## Patient 1:

Nachweis eines konjugativen Plasmides (65kb, IncFII) mit *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in *S. Shubra*, *E. coli* und *A. hydrophila*



## Patient 2:

Nachweis eines Plasmides (ca. 100kb) mit *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *S. boydii* und *E. coli*

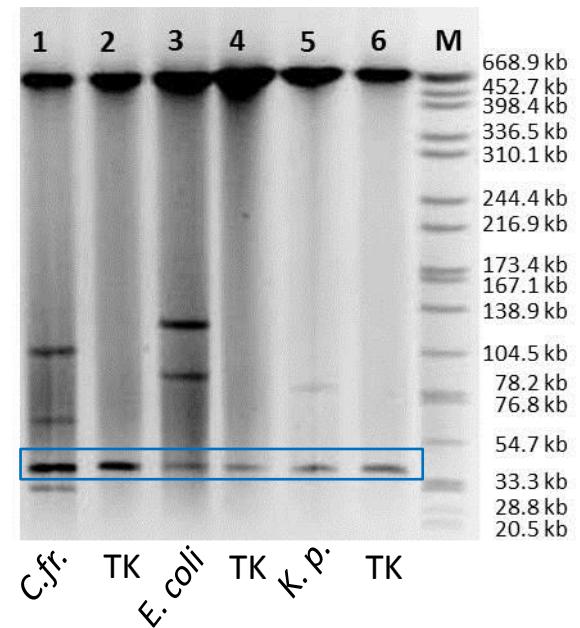
*In vitro* Transfer (Konjugation /Transformation) war nicht erfolgreich

TK = Transkonjugant (*E. coli* K12J53)  
M = *S. Braenderup* Standard

## Patient 3:

Nachweis eines konjugativen Plasmides (ca. 45kb) mit *bla*<sub>SHV-12</sub> in *E. coli*, *C. freundii* und *K. pneumoniae*

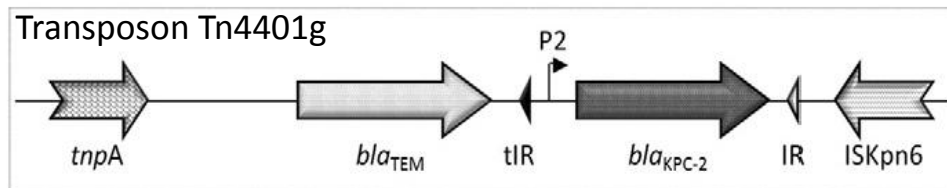
Nachweis eines Plasmides (ca. 22kb) mit *bla*<sub>SHV-12</sub> in *S. Manhattan*



# Carbapenemasen in Hessen „Multispezies-Ausbruch“

## Epidemiol. Bulletin 24/2014

- ▶ Von Oktober 2013 bis Sept 2014 Nachweis Carbapenem-resistenter Enterobacteriaceae in einer Klinik bei 132 Patienten (überwiegend rektale Kolonisation)
- ▶ Analyse NRZ Bochum bzw. Uni Gießen: **KPC-2** Carbapenemase-Bildung in verschiedenen Spezies (*C. freundii*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *E. coli*)
- ▶ Verdacht: Multispezies-Ausbruch durch **KPC-2**-Plasmidtransfer in verschiedene Gram-negative Spezies
- ▶ Uni Gießen: Ganzgenomsequenzierung von *Citrobacter spp.*-Ausbruchsisolaten  
Identifikation eines 54 kb IncN Plasmids mit *bla*<sub>KPC-2</sub> innerhalb einer spezifischen Transposon-Struktur



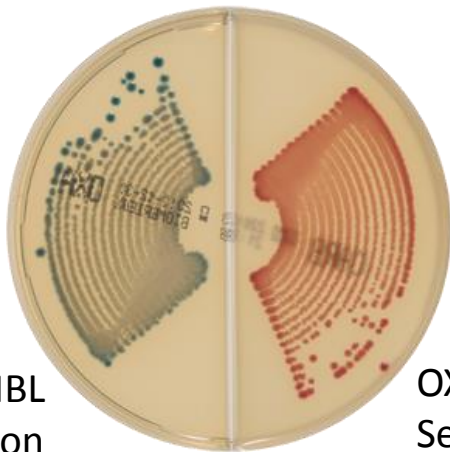
Yao Y. *et al.* 2014

Chmelnitsky *et al.* 2014

# Studie: KPC-Besiedlung (Ausbruch Hessen)

- ▶ Folgescreening von 13 Patienten mit nachgewiesener Besiedlung durch KPC-Bildner
- ▶ Probenahme 3-5 mal pro Patient im Abstand von jeweils 2 Tagen
- ▶ Kultivierung ü.N. auf Fertig-Selektionsplatten

chromID® CARBA SMART



KPC/MBL  
Selektion

OXA-48  
Selektion

Linke Seite: enthält Carbapenem zur Selektion Carbapenem-resistenter Gram-negativer Erreger (Carbapenemase- und Nicht-Carbapenemase-bildner)

Rechte Seite: enthält Temocillin zur Selektion OXA-48-bildender Gram-negativer Erreger

Spezies-Differenzierung durch Chromogene

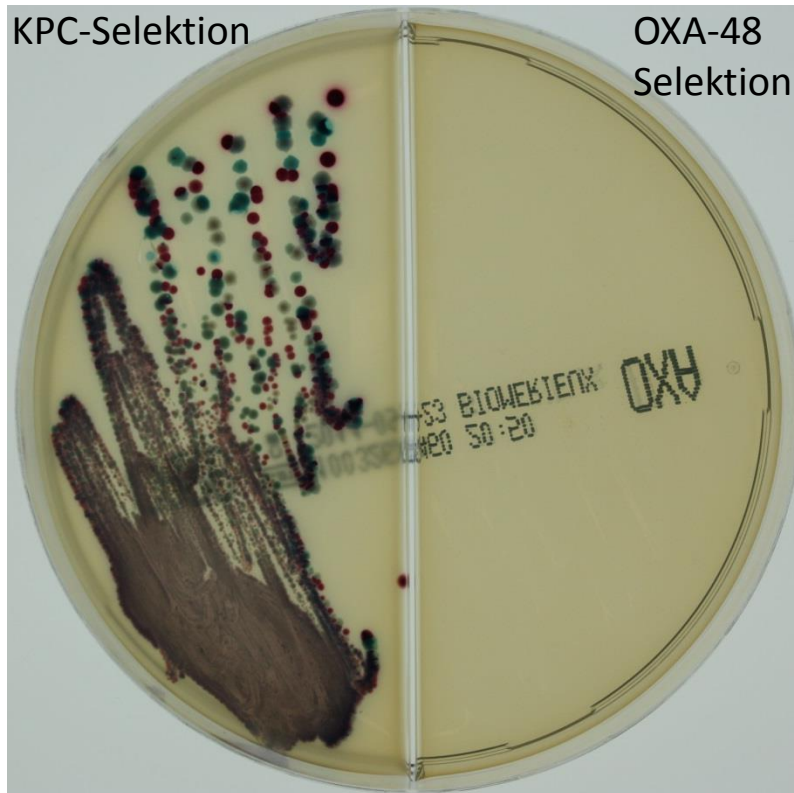
Rot = Carbapenem-resistente *E. coli*

Blau = Carbapenem-resistente *K. pneumoniae*

Grau = Carbapenem-resistente *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. u.a.

# Studie: KPC-Besiedlung (Ausbruch Hessen)

- ▶ Nachweis der rektalen Kolonisation mit mind. 2 verschiedenen **KPC-2**-bildenden Spezies bei 9 von 13 Patienten (*E. coli*, *C. freundii*)
- ▶ 1 Patient „4-fach-**KPC**-positiv“ (*E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*)
- ▶ Zunahme des Anteils **KPC**-Bildender *E. coli* von Tag 1-10 der Probenahme



Rot = KPC-2 *E. coli*

Blau = KPC-2 *K. pneumoniae*

Grau = KPC-2 *Citrobacter* spp. u.a.

# Zusammenfassung

- ▶ Der Transfer von **ESBL- und Carbapenemase**-Genen zwischen verschiedenen Gram-negative Spezies erfolgt im Darm auch ohne Selektionsdruck durch Antibiotika
- ▶ Eine Antibiotikagabe kann **ESBL- und Carbapenemase**-Bildner gezielt selektieren und ihre Anzahl enorm erhöhen
- ▶ Ein **ESBL**-Screening von Gastroenteritis-Patienten vor einer Cephalosporin-Therapie ist sinnvoll zur Vermeidung weiterer Selektion resistenter Erreger
- ▶ Durch unzureichendes Screening kann eine „stille Verbreitung“ **ESBL- oder Carbapenemase**-bildender Spezies als Darmbesiedler lange unentdeckt bleiben
- ▶ Unter Beachtung des Resistenzgentransfers ist beim Auftreten mehrerer **Carbapenemase**-bildender Spezies ein epidemiologischer Zusammenhang nicht auszuschließen → Meldung und Sendung ans NRZ!



# Vielen Dank

## Robert Koch-Institut Wernigerode:

**Guido Werner**

Michael Pietsch

Sibylle Müller-Bertling

Kirstin Ganske

Wolfgang Rabsch

Rita Prager

## Robert Koch-Institut Berlin

Martin Mielke

Muna Abu Sin

Schielke Anika

[pfeifery@rki.de](mailto:pfeifery@rki.de)

## Universitätsklinikum Ulm

Barbara Spellerberg

## Labor Limbach

Constanze Wendt

