

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Jonathan Jantsch

**Vergleich von Stuhlproben und Rektalabstrichen  
mit und ohne Anreicherungsverfahren für den  
Nachweis von Drittgenerations-Cephalosporin-  
resistenten *Enterobacterales***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Tarek Jazmati  
aus Hagen

promoviert am 09. Oktober 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. N. Jazmati
2. Gutachterin: Privatdozent Dr. med. P. Köhler

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.


Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch meine Betreuerin, Frau PD Dr. Nathalie Jazmati, von mir selbst im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Universitätsklinikums Köln ausgeführt worden. Hierzu gehörten das Auswählen der Proben, das Beimpfen der Agarplatten und der Anreicherungsflüssigkeit mit anschließender Inkubation, die Qualitätskontrollen, die Begutachtung des Keimwachstums, die Identifizierung der Bakterienspezies, die Durchführung der Resistenztestung sowie der phänotypischen Bestätigungstests des Resistenzmechanismus und weiterführende molekulare Diagnostik, darunter die Extraktion der Bakterien-DNA, die PCR sowie die Sequenzierung der isolierten Stämme. Die zugrundeliegenden Daten wurden von mir selbst aus den Versuchsergebnissen erhoben und dokumentiert. Die Auswertung der erhobenen Daten und die statistische Analyse wurden von mir selbst, in Absprache mit meiner Betreuerin, Frau PD Dr. Nathalie Jazmati, durchgeführt.

### Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 16.06.2024

Unterschrift: .....  .....

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau PD Dr. Nathalie Jazmati, für die unerschöpfliche Geduld mit mir, die beispiellose Betreuung meiner Forschungsarbeit und die Hilfe bei der Veröffentlichung.

Zudem bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. Axel Hamprecht für das interessante Thema mit aktuellem Bezug, den Zugriff auf alle nötigen Ressourcen und die bedingungslose Unterstützung meiner Promotion.

Zusätzlich danke ich allen Mitarbeitenden des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene für die tatkräftige Mithilfe bei allen aufgetretenen Herausforderungen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, allen voran meinen Eltern, ohne deren Hingabe diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>6</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
2.1. Multiresistente Enterobakterien	7
2.2. $\beta$ -Laktam-Antibiotika	7
2.3. Resistenzmechanismen	8
2.3.1. Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamase	8
2.3.2. AmpC $\beta$ -Laktamase	9
2.3.3. Carbapenemase	9
2.4. Zunahme multiresistenter Enterobakterien	10
2.5. Globale Epidemiologie multiresistenter Enterobakterien	12
2.6. Infektionen durch 3GCREB	13
2.6.1. Endogene Infektion	13
2.6.2. Exogene Infektion	14
2.6.3. Klinische Folgen	14
2.7. Screening auf multiresistente Enterobakterien	15
2.7.1. Indikation	15
2.7.2. Probengewinnung	15
2.7.3. Kulturbasierte Diagnostik	16
2.8. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	16
<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>17</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>28</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>32</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>36</b>
6.1. Abbildungsverzeichnis	36

## Abkürzungsverzeichnis

3GCREB	Drittgenerations-Cephalosporin-resistente <i>Enterobacterales</i>
AmpC	AmpC $\beta$ -Laktamase
CPE	Carbapenemase produzierende <i>Enterobacterales</i>
CTX-M	Cefotaximase-Munich
ESBL	Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamase
ESBL-E	Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamase produzierende <i>Enterobacterales</i>
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MBL	Metallo- $\beta$ -Laktamase
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	New Delhi Metallo- $\beta$ -Laktamase
OXA	Oxacillinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
SHV	Sulfhydryl variable $\beta$ -Laktamase
spp.	species pluralis
TEM	Temoniera $\beta$ -Laktamase
VIM	Verona integron-encoded Metallo- $\beta$ -Laktamase

### Anmerkung:

In der folgenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit ausschließlich das generische Maskulinum verwendet. Diese Schreibweise bezieht sich auf Personen aller Geschlechter und soll keine Form der Diskriminierung darstellen.

# 1. Zusammenfassung

Multiresistente Erreger sind oftmals Auslöser von krankenhausessoziierten Infektionen, in deren Folge eine erhöhte Mortalität sowie eine prolongierte und kostenaufwändige Therapie resultieren. In vielen medizinischen Einrichtungen erfolgt im Rahmen der Infektionskontrolle ein Screening der Darmflora, um das Vorkommen von Drittgenerations-Cephalosporin-resistenten Enterobakterien (3GCREB) vor allem bei Risikopatienten auszuschließen. Zur Diagnostik wird Darmflora aus Stuhlproben oder Rektalabstrichen auf einem selektiven Nährmedium kultiviert. Aktuelle Daten zeigen, dass Stuhlproben und Rektalabstriche in der Diagnostik vergleichbare Leistungsfähigkeit aufweisen können und dass eine Voranreicherung von Stuhlproben und Rektalabstrichen in einem flüssigen Selektivnährmedium den Nachweis von 3GCREB verbessern kann. Ziel der Arbeit ist es, die optimale Screeningmethode für die Detektion von multiresistenten Enterobakterien systematisch zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden 478 Stuhlproben von 356 Patienten, die zwischen Februar und April 2016 in die Universitätsklinik Köln eingesendet wurden, in der Studie analysiert. Anhand der Stuhlproben und der daraus simulierten Rektalabstriche wurde die Leistung von vier Methoden zum Nachweis von 3GCREB bewertet: Stuhlproben ohne (A) und mit (B) Voranreicherung und Rektalabstriche ohne (C) und mit (D) Voranreicherung wurden verglichen.

In der vorliegenden Studie wurden 68 3GCREB-Träger (68/356, 19,1 %) und davon 34 Träger von Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamase produzierenden *Enterobacterales* (ESBL-E) (34/356, 9,6 %) sowie 4 Träger von Carbapenemase produzierenden *Enterobacterales* (CPE) (4/356, 1,1 %) detektiert. Mit Methode A wurden 44/68 (64,7 %) 3GCREB-Träger nachgewiesen, mit Methode B 56/68 (82,4 %), mit Methode C 42/68 (61,8 %) und mit Methode D 54/68 (79,4 %). Insgesamt wurde mit den Voranreicherungsmethoden (B und D) die Detektion von 3GCREB-Trägern um 29,4 % erhöht (20/68 wurden nur mit der Voranreicherung gefunden,  $p < 0,0001$ ) im Vergleich zum direkten Aufbringen der Darmflora auf dem Selektivagar (A und C). Zudem zeigt sich ein nicht signifikanter Vorteil der Stuhlproben gegenüber den Rektalabstrichen.

Die Studie zeigt die Verbesserung des 3GCREB-Nachweises durch Voranreicherung im Allgemeinen und einen geringfügigen Vorteil von Stuhlproben im Vergleich zu rektalen Abstrichen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für das Screening auf 3GCREB Stuhlproben bevorzugt und generell nicht auf eine Voranreicherung verzichtet werden sollte.

## 2. Einleitung

### 2.1. Multiresistente Enterobakterien

Antibiotikaresistente Keime zählen heutzutage zu den größten Herausforderungen für das globale Gesundheitssystem.<sup>1,2</sup> Darunter haben gramnegative Erreger immer mehr an Bedeutung gewonnen.<sup>3,4</sup> Vorwiegend handelt es sich dabei um Enterobakterien, die physiologisch in der Darmflora vorkommen, darüber hinaus aber auch Infektionserkrankungen auslösen können.<sup>5</sup> Ermöglicht die Resistenzlage der intestinalen Keime eine Widerstandsfähigkeit gegen Cephalosporine der dritten Generation, spricht man von Drittgenerations-Cephalosporin-resistenten *Enterobacterales* (3GCREB). Zu diesen antibiotikaresistenten Enterobakterien gehören in erster Linie Keime wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*.<sup>2,3</sup> Zusätzlich erweitern Nonfermenter wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* die Gruppe der multiresistenten gramnegativen Erreger.<sup>4,6,7</sup>

### 2.2. $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Im Falle einer bakteriellen Infektion mit gramnegativen Erregern werden diese mit antibiotisch wirksamen Substanzen therapiert. Im klinischen Alltag kommen vor allem  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zum Einsatz. Diese Medikamente inhibieren die D-Alanin-Transpeptidase und damit die Synthese der Peptidoglykane für den Aufbau der bakteriellen Zellwand. Dadurch wirken sie bakterizid auf sich teilende und wachsende Bakterien.<sup>2,8</sup>

Zu den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gehören Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame, die alle aus dem namensgebenden  $\beta$ -Laktam-Ring als chemische Grundstruktur aufgebaut sind.<sup>2,8</sup> Jede dieser vier Stoffklassen setzt sich aus mehreren Präparaten mit unterschiedlichem Wirkspektrum im grampositiven und gramnegativen Bereich zusammen. Entsprechend der pharmakologischen Effekte weisen die einzelnen Antibiotika unterschiedliche Indikationen auf.<sup>8</sup>

Die zu den Penicillinen zählenden Amino- und Ureidopenicilline können klassischerweise mit einem  $\beta$ -Laktamase-Inhibitor kombiniert werden, um das Wirkspektrum zu erweitern.<sup>8</sup>

Cephalosporine werden in aktuell fünf Generationen klassifiziert. Die Drittgenerations-Cephalosporine sind häufig verwendete Breitspektrumantibiotika mit einer überwiegenden Wirksamkeit im gramnegativen Bereich. Cephalosporine der vierten Generation verfügen zusätzlich über antibiotische Effekte gegen Pseudomonaden. Teilweise werden sie auch in fixer Kombination mit einem  $\beta$ -Laktamase-Inhibitor verabreicht. Die fünfte Generation fasst Antibiotika zusammen, die auch gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) eingesetzt werden können.<sup>8</sup>

Carbapeneme gelten als sehr potente antibakterielle Arzneimittel mit breitem Wirkspektrum und werden zumeist nach strenger Indikationsstellung als Reserveantibiotika eingesetzt.<sup>4</sup>

Multiresistente Enterobakterien besitzen vermehrt eine wirkungsvolle Resistenz gegenüber den oben genannten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika.<sup>4</sup> Die häufig empirisch verwendeten Cephalosporine der dritten Generation sind dann im Fall einer Infektion mit Drittgenerations-Cephalosporin-resistenten *Enterobacterales* nicht ausreichend wirksam.<sup>3</sup>

### **2.3. Resistenzmechanismen**

Die Resistenz der 3GCREB ist zumeist in der Produktion von  $\beta$ -Laktamasen begründet.<sup>1,2</sup> Diese bakteriell hergestellten Enzyme sind in der Lage,  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu spalten, somit zu inaktivieren und verleihen dadurch den Bakterien ihre Widerstandsfähigkeit.<sup>2,6</sup>

Die genetischen Informationen für die  $\beta$ -Laktamasen können auf Chromosomen oder auf Plasmiden der Bakterien codiert sein. Sie entstehen entweder durch eine spontane Mutation oder durch Übertragung von anderen Erregern.<sup>2</sup> Chromosomale  $\beta$ -Laktamasen werden im Rahmen der Zellteilung an die entstehenden Tochterzellen vertikal übertragen. Darüber hinaus sind plasmidisch codierte  $\beta$ -Laktamasen zu einem horizontalen Gentransfer befähigt und damit in der Lage, an andere Bakterien derselben oder sogar einer anderen Spezies weitergegeben zu werden. Plasmide mit einem  $\beta$ -Laktamase-Gen enthalten häufig Erbgut für weitere Resistenzmechanismen und tragen somit zur Multiresistenz von Erregern bei.<sup>6</sup>

Die häufigsten und demnach auch klinisch bedeutsamsten Resistenzmechanismen multiresistenter Enterobakterien sind die Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamasen, die AmpC  $\beta$ -Laktamasen und die Carbapenemasen.<sup>3,4,6</sup>

#### **2.3.1. Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamase**

Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamase (ESBL) sind entsprechend ihres Namens in der Lage, ein erweitertes Spektrum an  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren und damit zu inaktivieren. Enterobakterien, die über eine ESBL verfügen, sind resistent gegenüber den meisten Cephalosporinen, nicht jedoch gegenüber den Carbapenemen. Zudem sind sie dadurch charakterisiert, dass diese  $\beta$ -Laktamasen durch einen Zusatz von  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, vor allem Clavulansäure, gehemmt werden.<sup>6</sup>

Genotypisch werden diverse Varianten unterschieden. In den 1980er Jahren wurden mit SHV und TEM die ersten ESBL-Typen entdeckt. Sie gingen aufgrund des verbreiteten Einsatzes

von Cephalosporinen der dritten Generation aus den gleichnamigen Breitspektrum- $\beta$ -Laktamasen SHV-1 und TEM-1 hervor. Von diesen ESBL-Varianten bestehen eine große Vielzahl von Subtypen, die regional sehr unterschiedlich vorkommen. Auch wenn ihre klinische Relevanz geringer wird, da sie zunehmend von anderen Varianten wie CTX-M verdrängt werden, so gibt es dennoch Ausbrüche mit Subtypen, die eine zusätzliche Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren aufweisen. Die Cefotaximase-Munich (CTX-M) ist seit der Jahrtausendwende die am weitesten verbreitete Variante der ESBL. Unter den reichlichen Subtypen ist CTX-M-15 in Deutschland und auch weltweit dominierend.<sup>6,9</sup>

### 2.3.2. AmpC $\beta$ -Laktamase

AmpC  $\beta$ -Laktamase (AmpC) sind Cephalosporinasen und weisen eine Resistenz gegenüber vielen Penicillinen, und Cephalosporinen bis zur dritten Generation auf. Zudem zeigen  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren keine Wirksamkeit gegen AmpC, sodass eine klare phänotypische Abgrenzung zu den ESBL vorgenommen werden kann. Die Hydrolyse der Viertgenerations-Cephalosporine und Carbapeneme durch die AmpC erfolgt meist nur auf sehr geringem Niveau, sodass diese Antibiotika weiterhin über eine ausreichende Wirksamkeit verfügen.<sup>10</sup>

Es wird auch hier chromosomal von plasmidisch codierten AmpC- $\beta$ -Laktamasen unterschieden. Das im Erbgut von Enterobakterien vorkommende Gen chromosomaler AmpC- $\beta$ -Laktamasen wird vorwiegend von Spezies wie *Enterobacter* spp. und *Citrobacter freundii* exprimiert. Dabei kann die Genexpression kontinuierlich verlaufen oder erst durch  $\beta$ -Laktam-Antibiotika induziert werden. Eine Plasmid-codierte AmpC hingegen kommt vor allem bei *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* vor. Zumeist sind auf dem Plasmid weitere Resistenzgene lokalisiert, sodass die erworbene  $\beta$ -Laktamase mit einer zusätzlichen Resistenz gegen Chinolone und Aminoglykoside einhergehen kann.<sup>10</sup>

### 2.3.3. Carbapenemase

Carbapenemasen sind befähigt, Carbapeneme, die als hochpotente Reserveantibiotika Verwendung finden, zu hydrolysieren. Der massive Gebrauch der Carbapeneme, vor allem gegen Infektionen durch ESBL-tragende Bakterien, beschleunigt die Ausbreitung der Carbapenemasen.<sup>1,11</sup>

Man unterscheidet verschiedene genetische Subtypen. Die wichtigsten Varianten sind die *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasen (KPC), die Oxacillinasen (OXA), die Imipenemasen (IMP) und die Metallo- $\beta$ -Laktamasen (MBL), darunter die New Delhi MBL (NDM) und die Verona integron-encoded MBL (VIM). Unterschiedliche Bakterienordnungen verfügen über

andere Genotypen. Carbapenemasen in Enterobakterien sind typischerweise vorwiegend KPC, OXA (vor allem OXA-48) und NDM.<sup>4,12</sup>

Zur Therapie von Carbapenem-resistenten Bakterien eignet sich nur eine sehr limitierte Auswahl an Antibiotika. Somit stellt die Behandlung einer Infektion eine große medizinische Herausforderung dar und ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Neben konventionellen Medikamenten wie Colistin und Tigecyclin, kommen auch neuere Medikamente wie das 2015 zugelassene Ceftazidim/Avibactam zur Anwendung.<sup>4</sup> Allerdings wurden auch hiergegen bereits Resistenzen beschrieben, die sich bei einer übermäßigen Anwendung ausbreiten könnten.<sup>13</sup>

Neben den  $\beta$ -Laktamasen machen sich gramnegative Bakterien weitere Resistenzmechanismen zunutze, um eine Widerstandsfähigkeit gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu erreichen. Dazu zählen der Porinverlust, mit dem eine verringerte Aufnahme von Antibiotika in den periplasmatischen Raum verursacht wird, die Effluxpumpen, um Antibiotika aus dem Wirkungsbereich aktiv zu beseitigen und eine veränderte Zielstruktur, also ein modifiziertes Penicillin-bindendes Protein mit einer geringeren Affinität zu  $\beta$ -Laktam-Antibiotika.<sup>2,12</sup>

Eine Kombination der  $\beta$ -Laktamasen mit den zuletzt erwähnten Resistenzmechanismen kann eine verstärkte Multiresistenz hervorrufen<sup>1</sup> und limitiert zusätzlich die antibiotische Therapie.<sup>6</sup> Verbreitet ist die Kombination von Resistenzmechanismen bei *Pseudomonas aeruginosa*, einem ubiquitär vorkommenden und opportunistisch pathogenen Erreger.<sup>14,15</sup> Das gramnegative Bakterium kann über intrinsische Resistenzmechanismen, wie Effluxpumpen, chromosomale AmpC- $\beta$ -Laktamasen und eine verminderte Expression von Porinen verfügen.<sup>15</sup> Darüber hinaus können erworbene, plasmidisch codierte Carbapenemasen (vornehmlich NDM, VIM und IMP) das Resistenzspektrum erweitern, sodass vormals pseudomonadenwirksame Antibiotika signifikant in ihrer Effektivität eingeschränkt werden.<sup>4,15</sup> Damit zählen die Pseudomonaden zu einem der weitverbreitetsten Erreger einer nosokomialen Infektion, vor allem der beatmungsassoziierten Pneumonien.<sup>14,15</sup>

#### **2.4. Zunahme multiresistenter Enterobakterien**

Die übermäßige Verwendung von Antibiotika führt zur Selektion resistenter Keime. Durch die antibiotische Therapie werden sensible Bakterien abgetötet oder in ihrem Wachstum gehemmt. Resistente Erreger hingegen, die eine Widerstandsfähigkeit gegenüber dem verwendeten Medikament aufweisen, bleiben davon weitestgehend unberührt und können ungehindert proliferieren. Zudem erweitert sich der Lebensraum, da dieser nicht mehr mit den

konkurrierenden sensiblen Bakterien geteilt werden muss. Die sich aufbauende Nische kann von den resistenten Erregern besiedelt werden und begünstigt deren Vermehrung.<sup>11,12</sup>

Darüber hinaus spielt die Mobilisation der  $\beta$ -Laktamase-Gene auf Plasmide eine herausragende Rolle bei der Verbreitung der Resistenzmechanismen. Der horizontale Gentransfer plasmidisch codierter  $\beta$ -Laktamasen ermöglicht die Übertragung des Resistenzmechanismus auf andere Bakterien und verstärkt somit die Dissemination multiresistenter Keime immens.<sup>1,6,12</sup>

Seit der erstmaligen Beschreibung der ESBL im Jahr 1983 führte die daraufhin übermäßige Verwendung von Cephalosporinen der dritten Generation, wie Cefotaxim und Ceftazidim, zu einem schnellen Anstieg der Fallzahlen.<sup>6,16</sup> Zwischen 2005 und 2009 wurde beispielsweise ein 3,5-facher Anstieg von ESBL-bildenden Keimen bei Patienten auf deutschen Intensivstationen verzeichnet.<sup>17</sup> Resultierend daraus konnte 2015 bei 9,5 % der Patienten, die in deutsche Krankenhäuser aufgenommen wurden, eine Kolonisation mit ESBL-E nachgewiesen werden.<sup>9,18</sup>

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei den Carbapenemase produzierenden *Enterobacterales*. Diese breiten sich seit Ende des zwanzigsten Jahrhunderts in Folge einer exzessiven Verwendung der Carbapeneme weltweit aus.<sup>12,19</sup> Anschaulich zeigt sich dies bei dem Vergleich der Abbildung 1 mit der Abbildung 2. Dort werden nach Daten des *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* die Anteile Carbapenem-resistenter *Klebsiella pneumoniae* Isolate in europäischen Ländern aus dem Jahr 2012 sowie 2022 aufgeführt. Deutlich zu erkennen ist ein Anstieg der Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* Isolate in den verstrichenen 10 Jahren, vor allem auf der Iberischen Halbinsel und in den Ländern des östlichen Europas. Demzufolge ist beispielsweise in Portugal, Polen und Kroatien ein Anstieg der Raten von unter 1 % auf 10 % bis 25 % zwischen 2012 und 2022 zu verzeichnen.<sup>20,21</sup>

Der Anstieg multiresistenter Enterobakterien betrifft unsere Gesellschaft nicht überall im gleichen Maße. Besonders alarmierend sind die steigenden Prävalenzen in Assoziation zu Krankenhausaufenthalten, wo vermehrt nosokomiale Infektionen zu hohen Fallzahlen führen. Unter den stationären Patienten weisen solche auf Intensivstationen ein besonders hohes Vorkommen auf.<sup>3,4,22</sup> Aber auch im ambulanten Sektor nimmt die Kolonisation mit  $\beta$ -Laktamasen wie ESBL und CPE immer mehr zu.<sup>3,22-24</sup> In Ungarn beispielsweise wiesen von 2010 bis 2013 7,4 % der stationären Patienten eine ESBL-Kolonisation auf, während bei

ambulanten Patienten die Prävalenz lediglich bei 3,1 % lag. Auf Intensivstationen hingegen wurden 9,4 % der Patienten als Träger eines ESBL-E detektiert.<sup>22</sup>

## 2.5. Globale Epidemiologie multiresistenter Enterobakterien

Bei den Prävalenzen der 3GCREB lassen sich im internationalen Vergleich beträchtliche regionale Unterschiede aufzeigen.<sup>25</sup> Die Ausbreitung von  $\beta$ -Laktamasen ist maßgeblich von der Verwendung von Antibiotika abhängig. Das Vorkommen von ESBL und CPE ist dementsprechend in den Ländern höher, in denen übermäßig viele Antibiotika in Medizin und Landwirtschaft zum Einsatz kommen.<sup>26</sup> Weitere Faktoren, wie die strikte Implementierung von Hygienevorschriften im Gesundheitswesen oder unterschiedliches Reise- und Migrationsverhalten beeinflussen die regionale Prävalenz multiresistenter Enterobakterien.<sup>3</sup>

Das unterschiedliche Vorkommen ist bereits in Europa deutlich zu erkennen, wo südliche und östliche Länder signifikant stärker betroffen sind als zentraleuropäische und skandinavische Nationen. Dieses geografische Gefälle ist auf Abbildung 2 für Carbapenem-resistente *Klebsiella pneumoniae* Isolate und auf Abbildung 3 für Drittgenerations-Cephalosporin-resistente *Escherichia coli* Isolate für das Jahr 2022 dargestellt.<sup>21</sup>

Noch anschaulicher sind die geografischen Unterschiede im außereuropäischen Vergleich. Höhere Prävalenzen multiresistenter Enterobakterien zeigen sich vor allem in asiatischen und afrikanischen Staaten, während in Ländern in Europa, Ozeanien und Nordamerika diese vergleichsweise geringer ausfallen.<sup>1,25,27</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass die Prävalenzen ESBL-produzierender *Escherichia coli* in Europa über die Jahre 2003 bis 2018 bei 6 % lagen, während sie in Süd-Ost-Asien mit 27 % 4,5-mal höher waren.<sup>27</sup> Einzelne Länder weisen darüber hinaus nochmals deutlich höhere Vorkommen multiresistenter Enterobakterien auf. So waren 2020 41,4 % der taiwanesischen Erwachsenen im ambulanten Sektor mit 3GCREB kolonisiert.<sup>28</sup> In Äthiopien wiesen 2021 sogar über 70 % der Krankenhauspatienten eine intestinale Besiedlung mit ESBL-E auf.<sup>29</sup>

Die Globalisierung und der damit einhergehende interkontinentale Tourismus verstärken die Ausbreitung multiresistenter Bakterien zusätzlich. So hat sich die New Delhi Metallo- $\beta$ -Laktamase, die 2006 auf dem indischen Subkontinent entdeckt wurde, in weniger als fünf Jahren nach Europa und bis nach Nordamerika ausgebreitet.<sup>12</sup>

Aktuelle Studien zeigen darüber hinaus ein alarmierend hohes Vorkommen multiresistenter gramnegativer Erreger bei Aufnahme verwundeter ukrainischer Soldaten und ukrainischer Geflüchteten in deutsche und niederländische Krankenhäuser. Durch die internationalen

Bevölkerungsströme und die damit einhergehende starke Ausbreitung multiresistenter Enterobakterien kommt es zu weiteren Herausforderungen für die lokalen Gesundheitssysteme.<sup>30-32</sup>

Bei anhaltender, exzessiver Nutzung von Antibiotika wird die Entstehung neuer Resistenzen gegen die verwendeten Arzneimittel provoziert, sodass davon auszugehen ist, dass dadurch bedrohliche, panresistente Keime hervorgerufen werden. Diese höchstresistenten Bakterien, die auf keine antibiotische Therapie mehr ansprechen, könnten weitreichende, verheerende Folgen für das Gesundheitssystem bewirken.<sup>11,33,34</sup>

Um dem entgegenzuwirken, bedarf es der Einführung neuer und potenter Antibiotika. Die Entwicklung dieser Arzneimittel hat für die produzierenden pharmazeutischen Unternehmen allerdings nur einen geringen ökonomischen Anreiz, da die neuen Präparate nur nach strenger Indikationsstellung als Reservemedikament zum Einsatz kommen werden.<sup>2</sup>

Zum anderen bedient man sich dem *Antibiotic Stewardship*. Der zurückhaltenden und nach strenger Indikationsstellung korrekten Verwendung von Antibiotika kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. Somit erfolgt ein Verlangsamen der Resistenzausbreitung durch Eindämmen des Antibiotikagebrauchs.<sup>4,29</sup>

## **2.6. Infektionen durch 3GCREB**

Eine antibiotische Therapie ist jedoch medizinisch indiziert, sobald eine entsprechende bakterielle Infektion mit einem 3GCREB vorliegt. Voraussetzung dafür ist der Kontakt mit dem Erreger. Dabei können die multiresistenten Enterobakterien entweder vom kolonisierten Patienten selbst kommen oder von einer anderen besiedelten Person übertragen worden sein.<sup>3,35</sup>

### **2.6.1. Endogene Infektion**

Eine endogene Infektion entsteht zumeist durch eine Translokation des multiresistenten Erregers aus dem Darm in das Blut.<sup>11</sup> Für diese Bakteriämie stellt die asymptomatische intestinale Kolonisation eines Patienten den wichtigsten Risikofaktor dar.<sup>3,11</sup> Neben der global stark variierenden Prävalenz der multiresistenten Enterobakterien ist die Besiedelung eines Patienten auch von individuellen Faktoren abhängig. Betroffen sind vor allem Patienten mit einer Historie von langen Krankenhausaufenthalten, zurückliegenden antibiotischen Therapien und parenteraler Ernährung.<sup>36</sup> Darüber hinaus weisen Menschen, die in Pflegeeinrichtungen leben, eine erhöhte Prävalenz auf.<sup>25</sup> Aber auch gesunde Individuen können betroffen sein. Risikofaktoren, wie der kürzlich zurückliegende Aufenthalt in einem

Hochprävalenzgebiet, begünstigen eine intestinale Besiedlung mit 3GCREB.<sup>3,37</sup> Das im Krankenhaus tätige Pflegepersonal hingegen weist dieselben Prävalenzen auf, wie die ambulante Bevölkerung eines Landes. Somit ist der alleinige Aufenthalt im Krankenhaus nicht als Risikofaktor anzunehmen.<sup>3</sup>

Kommt es bei einem kolonialiserten Patienten zu einer Immunsuppression, können diese Keime eine Bakteriämie auslösen, da die Schwäche des Immunsystems einen Standortwechsel des Erregers begünstigt.<sup>3</sup> Am ehesten betrifft dies kritisch kranke Patienten auf einer Intensivstation oder hämatonkologische Patienten, die krankheitsbedingt oder iatrogen an einer Neutropenie leiden.<sup>24,29,38</sup> Zudem fördert die Verwendung von medizinischen Zugängen, wie nasogastralen Sonden und Harnblasenkathetern, den Standortwechsel der *Enterobacterales*, welche vermehrt bei intensivmedizinisch betreuten Patienten zum Einsatz kommen.<sup>3</sup>

### **2.6.2. Exogene Infektion**

Der exogenen Infektion geht die Übertragung des multiresistenten Enterobakteriums von einer anderen kolonisierten Person voraus. Diese Transmission stellt vor allem im hospitalisierten Kontext eine Herausforderung dar. Nosokomiale Infektionen entstehen hier durch Schmierinfektionen über die Hände der Pflegekräfte, über die Umgebung oder durch den direkten Kontakt zur kolonisierten Person. Besonders auf Intensivstationen, wo häufiger und enger Kontakt zu den betreuten Patienten nötig ist, ist eine Übertragung der 3GCREB wahrscheinlich.<sup>3,24</sup>

Jedoch lösen nicht alle Keime gleichermaßen eine nosokomiale Infektion aus. In Abhängigkeit von der Spezies variiert das Potenzial einer Übertragung auf eine andere Person. Diesbezüglich zeigen wissenschaftliche Studien, dass eine Transmission bei *Klebsiella pneumoniae* häufiger vorkommt als bei *Escherichia coli*.<sup>35</sup>

### **2.6.3. Klinische Folgen**

Die Infektion mit einem 3GCREB kann also entweder endogenen oder exogenen Ursprungs sein und vor allem immunkompromittierte Patienten sind davon betroffen. Bei Auftreten von Symptomen einer Infektion erfolgt der Einsatz von Antibiotika. Hierbei ist eine schnelle und adäquate antibiotische Therapie entscheidend.<sup>39</sup> Ist der auslösende Erreger nicht mikrobiologisch gesichert, so wird zumeist empirisch mit einem Cephalosporin der dritten Generation behandelt. Geht die Infektion jedoch von einem 3GCREB aus, ist das zur Anwendung kommende Cephalosporin nicht wirksam. Entsprechend erhält der Patient keine

adäquate antibiotische Therapie.<sup>3</sup> Die Folgen sind eine erhöhte Mortalität und Morbidität, verlängerte Krankenhausaufenthalte und höhere Kosten für das Gesundheitssystem.<sup>3,40,41</sup>

Dementsprechend ist es von zentraler Bedeutung zu wissen, ob ein Patient mit einem resistenten Enterobakterium kolonisiert ist, um eine Isolation sowie adäquate Hygienemaßnahmen zur Übertragungsprävention zu ermöglichen.<sup>42</sup> Zudem ist im Falle einer auftretenden Infektion die Kenntnis über den zugrunde liegenden Resistenzmechanismus und damit einhergehend über die wirksamen Antibiotika von klinischer Wichtigkeit, um initial eine zielgerichtete Therapie nach Antibiogramm durchzuführen.<sup>11</sup> Folglich sind der Nachweis von 3GCREB und deren mikrobiologische Untersuchung vor der Aufnahme eines Patienten von herausragender Relevanz.<sup>1</sup>

## **2.7. Screening auf multiresistente Enterobakterien**

### **2.7.1. Indikation**

Das Screening auf multiresistente Darmkeime gehört zum Standard in der stationären Infektionsprävention. Ziel ist es, Patienten vor der Aufnahme in eine Krankenhausabteilung auf eine mögliche Kolonisation zu untersuchen.<sup>1</sup>

Es erfolgt ein risikoadaptiertes Screening bei Patienten, bei denen eine Aufnahme auf eine Hochrisikostation vorgesehen ist. Dazu gehören in erster Linie Intensivstationen sowie hämatologische und onkologische Abteilungen, wo immunkompromittierte Patienten behandelt werden, bei denen eine Kolonisation mit 3GCREB vermehrt zu einer Infektion führen kann.<sup>11,24,38</sup>

### **2.7.2. Probengewinnung**

Das Reservoir der *Enterobacterales* befindet sich in der Darmflora, sodass der Nachweis dieser Bakterien aus Stuhlmaterial erfolgt. Demzufolge ist die Stuhlprobe der Goldstandard in der Probengewinnung.<sup>3</sup> Rektale Abstrichtupfer haben sich in der Vergangenheit jedoch klinisch behauptet. Sie bestechen durch eine höhere Praktikabilität aufgrund der zeitlich von der Defäkation unabhängigen Probenentnahme.<sup>1</sup> Wissenschaftliche Studien weisen auf eine adäquate Leistungsfähigkeit der Rektalabstriche in der Detektion von multiresistenten Enterobakterien hin.<sup>42,43</sup> Diese wird auch von dem Material des Abstrichtupfers beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass Tupfer aus Nylon oder Polyurethan-Zellschaum gegenüber denen aus Kunstseide überlegen sind.<sup>44</sup> Neben Stuhlproben und Rektalabstrichen ist in der Literatur auch die Verwendung von perianalen Abstrichen beschrieben. Aufgrund der

geringeren Kontamination mit Enterobakterien im Vergleich zu den Rektalabstrichen kommen perianale Abstriche klinisch jedoch seltener zur Anwendung.<sup>44,45</sup>

### **2.7.3. Kulturbasierte Diagnostik**

Nach Gewinnung der Darmflora erfolgt das Ausstreichen auf eine selektive Agarplatte mit nachfolgender Inkubation. Das Nährmedium dient zum einen dem Bakterienwachstum und bewirkt zum anderen durch Antibiotikazusätze die Hemmung nicht resistenter Erreger. ESBL-Agar sind zumeist mit einem Cephalosporin versetzt, während Agarplatten zur Detektion von Carbapenemase über einen Zusatz mit einem Carbapenem verfügen. Chromogene Agarplatten erlauben darüber hinaus mutmaßliche Rückschlüsse auf die Spezies des kultivierten Bakteriums.<sup>1</sup>

Neben der direkten Anlage der Darmflora auf die selektive Agarplatte besteht die Möglichkeit einer Voranreicherung der Probe. Dabei wird die gewonnene Stuhlprobe oder der Rektalabstrich in einem flüssigen, selektiven Nährmedium inkubiert und am Folgetag auf eine entsprechende Agarplatte ausgestrichen. Mit dieser Methode kann die Detektionsrate der multiresistenten Enterobakterien aus Stuhlproben<sup>46</sup>, Nylon-Rektalabstrichen<sup>47</sup> und Kunstseide-Abstrichen<sup>48</sup> signifikant erhöht werden.<sup>49</sup>

### **2.8. Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Ein optimales Screening mit hoher Sensitivität und Spezifität ist für den Nachweis von multiresistenten Darmbakterien von herausragender klinischer Bedeutung. In der Routinediagnostik kommen zur Probengewinnung Stuhlproben und Rektalabstriche zum Einsatz, und es konnte gezeigt werden, dass eine vorherige Anreicherung der gewonnenen Darmflora die kulturbasierte Detektion signifikant verbessert.

Bisher unerforscht war die Fragestellung, inwieweit sich die vier möglichen Screeningmethoden, Stuhlproben mit und ohne Voranreicherung sowie Rektalabstriche mit und ohne Voranreicherung, in der Detektion von 3GCREB unterscheiden.

Ziel der Arbeit ist es systematisch zu untersuchen, welches Vorgehen eine bestmögliche Detektion multiresistenter Enterobakterien ermöglicht. Dazu wurden in der vorliegenden Studie erstmals die Leistungsfähigkeit der oben genannten vier Screeningmethoden unmittelbar miteinander verglichen.

### 3. Publikation

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases  
<https://doi.org/10.1007/s10096-021-04250-1>

BRIEF REPORT



## Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales (3GCREB)

Tarek Jazmati<sup>1,2</sup> · Axel Hamprecht<sup>1,2,3</sup> · Nathalie Jazmati<sup>1,2,4</sup>

Received: 21 January 2021 / Accepted: 11 April 2021  
© The Author(s) 2021

### Abstract

To establish the optimal detection of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales (3GCREB), the performance of four different screening methods has been investigated: stool samples without (A) and with (B) pre-enrichment and rectal swabs without (C) and with (D) pre-enrichment were contrasted. Pre-enrichment approaches (B and D) increased the detection of 3GCREB carriers by 29.4% (20/68 3GCREB carriers only found using pre-enrichment,  $p < 0.0001$ ) compared to direct plating approaches (A and C). Moreover, the study demonstrates a minor advantage of stool samples in contrast to rectal swabs in both cases (with and without pre-enrichment). Registration number: DRKS00022520, 24 July 2020.

The prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales (3GCREB) is increasing worldwide [1]. Patients at risk often develop bacteraemia with the multidrug-resistant germs of the intestinal flora [2–4]. The initial empirical therapy of these infections is often insufficient and thereby results in an increased morbidity and mortality [5, 6]. For this purpose, many hospitals screen the intestinal flora of high-risk patients for the presence of 3GCREB before admission. Therefore, stool samples or rectal swabs are cultured on selective agar. Whereas stool samples represent the elaborated gold standard, the feasible use of rectal swabs is widely prevalent, since they can be easily obtained at any time. Lerner et al. [7] displayed a comparable performance of stool samples and rectal swabs in the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Moreover, studies demonstrated that pre-enrichment has the ability to improve the detection of

3GCREB in the stool sample and also in the rectal swabs [8–10]. It is up to now unknown whether pre-enrichment of stool samples or of rectal swabs has the best sensitivity for the detection of 3GCREB. Therefore, in this study, a direct comparison of the following four methods was performed: stool samples without pre-enrichment (A), stool samples with pre-enrichment (B), rectal swabs without pre-enrichment (C) and rectal swabs with pre-enrichment (D).

From February to April 2016, 478 stool samples from 356 consecutive patients of the University Hospital Cologne submitted for 3GCREB screening were included in the study. For patients from whom there was more than one sample, the first sample was always used for the calculation on patient level and for determination of the prevalence of 3GCREB and ESBL-E carriers.

All stool samples were homogenized by vortexing for up to 1 min and then processed by one investigator within 48 h of receipt. Gender, age and ward of each patient were recorded. The following four different algorithms were compared for the detection of 3GCREB, ESBL-E and CPE (Fig. 1).

- (A) *Stool sample without pre-enrichment*: A 10- $\mu$ l loop full of solid stool was directly plated onto selective ChromID ESBL (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) and McCARB agar, a MacConkey-based agar produced in house containing ertapenem, zinc and cloxacillin [11].
- (B) *Stool sample with pre-enrichment*: The whole stool sample was covered with 5 ml of a semi-selective

✉ Nathalie Jazmati  
nathalie.jazmati@uk-koeln.de

<sup>1</sup> Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Goldenfelsstrasse 19-21, 50935 Cologne, Germany

<sup>2</sup> German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Cologne, Germany

<sup>3</sup> Institute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg & Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany

<sup>4</sup> Laboratory Dr. Wisplinghoff, Cologne, Germany

Published online: 27 April 2021

Springer

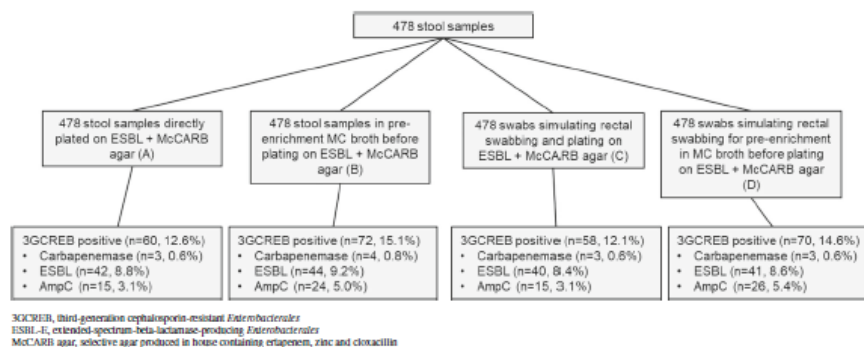


Fig. 1 Flow chart study design and description of sample flow

MacConkey broth (Roth, Germany, Karlsruhe) supplemented with vancomycin (64 mg/L) and vortexed for up to 1 min. This step was performed after sampling for C and D.

- (C) *Rectal swab without pre-enrichment*: A standard rayon swab in Amies medium (Copan, Brescia Italy) was used to imitate rectal swabbing. Therefore, the swab was slightly dipped into the fresh stool sample and wiped off carefully on the edge of the vial. For simulation of rectal swabbing, care was taken to handle all swabs in the same manner to assure that the amount of stool for each swab was similar and adequate. The swab was then streaked out onto ChromID ESBL and McCARB agar.
- (D) *Rectal swab with pre-enrichment*: Rectal swab was prepared as described above (C). Instead of plating the swab directly on the agar, the swab was put into above-mentioned enrichment broth.

Agar plates and enriched samples were incubated at 36 °C ± 1 °C in ambient air. After incubation for 18–24 h, ChromID ESBL and McCARB plates were read. Enriched samples (B/D) were vortexed for 1 min and 10 µl each subcultured

onto ChromID ESBL and McCARB agar. Plates were incubated at 36 °C ± 1 °C in ambient air and read after 18–24 h. Phenotypic detection and characterisation of 3GCREB as well as molecular characterisation of the isolates were performed as previously described [9]. McCARB agar was used in addition to ESBL agar to detect *Enterobacteriales* harbouring carbapenemases, especially OXA-48 which often show low minimum inhibitory concentration (MIC) to third-generation cephalosporins and potentially do not grow on ESBL agar as previously demonstrated [11]. A sample was considered 3GCREB/ESBL-positive, when at least one 3GCREB/ESBL-positive isolate was recovered in any of the four used algorithms. A combined gold standard was applied, consisting of all 3GCREB/ESBL-E recovered in any of the four approaches. If an isolate harboured more than one resistance mechanism, it was classified only once in the highest resistance mechanism (carbapenemase over ESBL over AmpC over SHV-1 β-lactamases/K1-hyperproducing isolates). Algorithms were compared using McNemar test.

In this study, 478 stool samples from 356 consecutive patients were analysed. Among all patients, 19.1% (68/356) were identified as positive for 3GCREB with at least one of the algorithms used, including 9.6% (34/356) as positive for

Table 1 Comparisons of the different algorithms for the detection of 3GCREB carriers by using McNemar

	Stool without pre-enrichment (A)	Stool with pre-enrichment (B)	Rectal swab without pre-enrichment (C)	Rectal swab with pre-enrichment (D)	Stool total (A+B)	Rectal swab total (C+D)
Stool without pre-enrichment (A) <sup>a</sup>	X	X	98.3/0.6875	X	X	X
Stool with pre-enrichment (B) <sup>a</sup>	95.5/0.0042	X	94.9/0.0013	93.8/0.8318	X	93.8/1
Rectal swab without pre-enrichment (C) <sup>a</sup>	X	X	X	X	X	X
Rectal swab with pre-enrichment (D) <sup>a</sup>	95.5/0.0213	X	95.5/0.0042	X	X	X
Stool total (A+B) <sup>a</sup>	96.1/0.0001	99.4/0.5	94.9/0.0001	93.8/0.5235	X	93.8/0.8318
Rectal swab total (C+D) <sup>a</sup>	95.5/0.0042	93.8/1	96.1/0.0001	99.4/0.5	X	X

The approach with the better performance is in each comparison located in the slot on the left side

<sup>a</sup>Overall percent agreement (%)<sup>a</sup>p value

**Table 2** Sensitivities, specificities, PPVs and NPVs of the four different algorithms for the detection of 3GCREB tested on 478 clinical specimens

Detection target (3GCREB or ESBL-E) Samples considered and used detection algorithm	No. of samples		Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	PPV, % (95% CI)	NPV, % (95% CI)	Prevalence, % (95% CI)
	TP <sup>a</sup>	FN <sup>c</sup>					
<b>Detection of 3GCREB</b>							
All growth considered <sup>d</sup>							
Stool without pre-enrichment (A)	60	27	69.0 (58.0–78.2)	88.2 (84.5–91.2)	56.6 (46.6–66.1)	92.7 (89.5–95.1)	18.2 (14.9–22.0)
Stool with pre-enrichment (B)	72	15	82.8 (72.8–89.7)	86.7 (82.8–89.8)	58.1 (48.9–66.8)	95.8 (93.0–97.5)	18.2 (14.9–22.0)
Rectal swab without pre-enrichment (C)	58	29	66.7 (55.7–76.2)	92.6 (89.4–94.9)	66.7 (55.7–76.2)	92.6 (89.4–94.9)	18.2 (14.9–22.0)
Rectal swab with pre-enrichment (D)	70	17	80.5 (70.3–87.9)	87.2 (83.4–90.3)	58.3 (49.0–67.2)	95.3 (92.4–97.1)	18.2 (14.9–22.0)
Stool total (A+B)	75	12	86.2 (76.8–92.4)	83.6 (79.5–87.1)	54.0 (45.3–62.4)	96.5 (93.7–98.1)	18.2 (14.9–22.0)
Rectal swab total (C+D)	74	13	85.1 (75.4–91.5)	86.7 (82.8–89.8)	58.7 (49.6–67.3)	96.3 (93.6–97.9)	18.2 (14.9–22.0)
Selected growth considered <sup>e</sup>							
Stool without pre-enrichment (A)	60	25	69.0 (58.0–78.2)	93.6 (90.6–95.7)	70.6 (59.6–79.7)	93.1 (90.0–95.3)	18.2 (14.9–22.0)
Stool with pre-enrichment (B)	72	15	82.8 (72.8–89.7)	94.9 (92.1–96.8)	78.3 (68.2–85.9)	96.1 (93.5–97.7)	18.2 (14.9–22.0)
Rectal swab without pre-enrichment (C)	58	15	66.7 (55.7–76.2)	96.2 (93.6–97.8)	79.5 (68.1–87.7)	92.8 (89.8–95.1)	18.2 (14.9–22.0)
Rectal swab with pre-enrichment (D)	70	13	80.5 (70.3–87.9)	96.7 (94.2–98.1)	84.3 (74.3–91.1)	95.7 (93.1–97.4)	18.2 (14.9–22.0)
Stool total (A+B)	75	12	86.2 (76.8–92.4)	92.6 (89.4–94.9)	72.1 (62.3–80.2)	96.8 (94.3–98.3)	18.2 (14.9–22.0)
Rectal swab total (C+D)	74	13	85.1 (75.4–91.5)	95.7 (93.0–97.4)	81.3 (71.5–88.4)	96.6 (94.2–98.1)	18.2 (14.9–22.0)
<b>Detection of ESBL-E</b>							
All growth considered <sup>d</sup>							
Stool without pre-enrichment (A)	42	64	87.5 (74.1–94.8)	85.1 (81.3–88.5)	39.6 (30.4–49.6)	98.4 (96.3–99.3)	10.0 (7.6–13.2)
Stool with pre-enrichment (B)	44	80	91.7 (79.1–97.3)	81.4 (77.3–84.9)	35.5 (27.4–44.6)	98.9 (96.9–99.6)	10.0 (7.6–13.2)
Rectal swab without pre-enrichment (C)	40	47	83.3 (69.2–92.0)	89.1 (85.6–91.8)	46.0 (35.4–57.0)	98.0 (95.8–99.0)	10.0 (7.6–13.2)
Rectal swab with pre-enrichment (D)	41	79	85.4 (71.6–93.5)	81.6 (77.6–85.1)	34.2 (25.9–43.5)	98.0 (95.8–99.1)	10.0 (7.6–13.2)
Stool total (A+B)	46	93	95.8 (84.6–99.3)	78.4 (74.1–82.1)	33.1 (25.5–41.6)	99.4 (97.1–99.9)	10.0 (7.6–13.2)
Rectal swab total (C+D)	43	83	89.6 (76.6–96.1)	80.7 (76.6–84.3)	34.1 (26.1–43.2)	98.6 (96.5–99.5)	10.0 (7.6–13.2)
Selected growth considered <sup>e</sup>							
Stool without pre-enrichment (A)	42	43	87.5 (74.1–94.8)	90.0 (86.7–92.6)	49.4 (38.5–60.4)	98.5 (96.5–99.4)	10.0 (7.6–13.2)
Stool with pre-enrichment (B)	44	48	91.7 (79.1–97.3)	88.8 (85.4–91.6)	47.8 (37.4–58.4)	99.0 (97.2–99.7)	10.0 (7.6–13.2)
Rectal swab without pre-enrichment (C)	40	33	83.3 (69.2–92.0)	92.3 (89.3–94.6)	54.8 (42.8–66.3)	98.0 (96.0–99.1)	10.0 (7.6–13.2)
Rectal swab with pre-enrichment (D)	41	42	85.4 (71.6–93.5)	90.2 (86.9–92.8)	49.4 (38.3–60.5)	98.2 (96.2–99.2)	10.0 (7.6–13.2)
Stool total (A+B)	46	58	95.8 (84.6–99.3)	86.5 (82.8–89.5)	44.2 (34.6–54.3)	99.5 (97.9–99.9)	10.0 (7.6–13.2)
Rectal swab total (C+D)	43	48	89.6 (76.6–96.1)	88.8 (85.4–91.6)	47.3 (36.8–57.9)	98.7 (96.8–99.5)	10.0 (7.6–13.2)

A combined gold standard consisting of all four approaches was applied for the calculation

<sup>a</sup>TP, true positive. A result was considered TP when at least one 3GCREB isolate was recovered from the sample

<sup>b</sup>FP, false positive. A result was considered FP when the isolate(s) recovered from the sample was not confirmed to be a 3GCREB

<sup>c</sup>FN, false negative

<sup>d</sup>When no selection criteria were applied (for calculation, all oxidase positive/negative and all colored/uncolored colonies growing on ESBL agar were counted)

<sup>e</sup>When selection criteria were applied (only oxidase negative and colored colonies growing on ESBL agar were counted)

**Table 3** Isolate characteristics of 3GCREEB isolates recovered by all 4 algorithms

Strain characteristics	3GCREEB isolates recovered by					
	Overall (n=97)	Stool without pre-enrichment (A) (n=68)	Stool with pre-enrichment (B) (n=81)	Rectal swab without pre-enrichment (C) (n=63)	Rectal swab with pre-enrichment (D) (n=75)	Without pre-enrichment total (A+C) (n=71)
<b>Species 3GCREEB</b>						
<i>Escherichia coli</i>	45 (46.4%)	42 (61.8%)	41 (50.6%)	37 (58.7%)	37 (49.3%)	43 (45.7%)
<i>Klebsiella species</i>	11 (11.3%)	6 (8.8%)	11 (13.6%)	5 (8.0%)	7 (9.3%)	11 (11.7%)
<i>Enterobacter species</i>	12 (12.4%)	8 (11.8%)	11 (13.6%)	9 (14.3%)	11 (14.7%)	12 (12.8%)
<i>Citrobacter species</i>	25 (25.8%)	10 (14.7%)	15 (18.5%)	9 (14.3%)	18 (24.0%)	25 (26.6%)
<i>Others</i>	4 (4.1%)	2 (2.9%)	3 (3.7%)	3 (4.8%)	2 (2.7%)	3 (3.2%)
<b>Resistance mechanism</b>						
ESBL (no. (%))	54 (55.7%)	47 (69.1%)	49 (60.5%)	43 (68.3%)	44 (58.7%)	52 (55.3%)
CTX-M-1 (no. (% of ESBL))	33 (61.1%)	30 (63.8%)	31 (63.3%)	29 (67.4%)	28 (63.6%)	32 (61.5%)
CTX-M-9 (no. (% of ESBL))	9 (16.7%)	7 (14.9%)	8 (16.3%)	6 (14.0%)	8 (18.2%)	7 (14.3%)
Unknown ESBL mechanism	12 (22.2%)	10 (21.3%)	10 (20.4%)	8 (18.6%)	8 (18.2%)	11 (21.2%)
AmpC (no. (%))	36 (37.1%)	15 (22.1%)	25 (30.9%)	15 (23.8%)	26 (34.7%)	35 (37.2%)
Hyper K1 (no. (%))	1 (1.0%)	1 (1.5%)	1 (1.2%)	1 (1.6%)	1 (1.3%)	1 (1.1%)
VIM carbapenemase (no. (%))	2 (2.1%)	1 (1.5%)	2 (2.5%)	1 (1.6%)	1 (1.3%)	2 (2.1%)
IMP carbapenemase (no. (%))	2 (2.1%)	2 (2.9%)	2 (2.5%)	2 (3.2%)	2 (2.7%)	2 (2.1%)
SHV-1 (no. (%))	2 (2.1%)	2 (2.9%)	2 (2.5%)	1 (1.6%)	1 (1.3%)	2 (2.1%)

3GCREEB, third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriales*

ESBL-E, extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriales*

If an isolate harboured more than one resistance mechanism, it was classified in the highest resistance mechanism (carbapenemase > ESBL > AmpC > Hyper K1/SHV-1)

ESBL-E. The prevalence of CPE carriers was 1.1% (4/356). In comparison to direct plating, the use of pre-enrichment increased the detection of 3GCREB carriers in both cases (stool samples and rectal swabs) by 17.6% (12/68,  $p = 0.004$ ). For the detection of ESBL-E carriers, the pre-enrichment in rectal swabs and in stool samples showed an insignificant advantage (stool samples: 5.9% only found using pre-enrichment (2/34,  $p = 0.625$ ); rectal swabs: 8.8% only found using pre-enrichment (3/34,  $p = 0.25$ )). Comparing approaches using stool (A and B) versus approaches with rectal swabs (C and D) for 3GCREB and ESBL-E carrier detection, there is a non-significant trend towards better detection using stool samples (3GCREB: 2.9% (2/68 only found using stool samples,  $p = 0.83$ ); ESBL-E: 5.9% (2/34 only found using stool samples,  $p = 0.69$ )). The most sensitive single approach for detection of 3GCREB and ESBL-E carriers was approach B (stool samples with pre-enrichment), which demonstrated a sensitivity for 3GCREB of 82.4% (56/68) and for ESBL-E of 91.2% (31/34). Taking together pre-enrichment approaches (B and D) increased the detection of 3GCREB carriers by 29.4% (20/68,  $p < 0.0001$ ) compared to direct plating approaches (A and C). By combining the screening methods (direct plating without pre-enrichment and plating after pre-enrichment), the detection of 3GCREB is slightly better compared to only using the pre-enrichment approach ( $p > 0.05$ ). Where applicable, the agreements of the different approaches were compared (Table 1).

Sensitivity, specificity, PPV and NPV for the detection of 3GCREB and ESBL-E were calculated for each algorithm on sample level. Results are shown in Table 2.

Overall, 97 3GCREB isolates were recovered from 87 positive stool samples. *Escherichia coli* was the most common species: 46.4% (45/97) of all 3GCREB. ESBL production was the most frequent resistance mechanism among all 3GCREB (54/97, 55.7%). Contrasting the pre-enrichment approaches (B and D) to direct plating (A and C), pre-enrichment increased the detection of *Citrobacter spp.* (by 250%, 25/10,  $p < 0.0001$ ) as well as the detection of AmpC-beta-lactamases (by 219%, 35/16,  $p < 0.0001$ ) (Table 3).

However, the detection of other species, resistance mechanisms and drug susceptibilities stay almost unaffected and no substantial differences between the four approaches were found (Online Resource 1–3).

The patient characteristics of 3GCREB and ESBL-E carriers that were detected by each of the four approaches were compared to each other, but no substantial differences between the groups were found (Online Resource 4 and Online Resource 5).

Due to the rising prevalence of 3GCREB worldwide, screening measures for multidrug-resistant Enterobacterales in microbiology laboratories are increasingly important. While stool samples are considered the gold standard in 3GCREB screening, rectal swabs predominate practically as they are time-independent from defecation and there is

evidence that pre-enrichment contributes to improvement. In the present study, for the first time, the performance of rectal swabs and stool swabs with and without pre-enrichment in one experimental study were compared. It could be shown that conducting pre-enrichment of stool samples and rectal swabs increased the detection of 3GCREB carriers significantly. The number of carriers that could only be found using pre-enrichment was as high as 29.4% (20/68 only found using pre-enrichment). The study results are consistent with previously published data showing that pre-enrichment improved the screening of 3GCREB from stool samples [10], nylon-flocked swabs [8] and rayon swabs [9]. Furthermore, there are no significant differences between stool samples and rectal swabs according to the amount of detected 3GCREB and ESBL-E carriers, but a minor trend was found towards the stool samples. Thus, stool samples with pre-enrichment have the highest sensitivity in the detection of 3GCREB and ESBL-E carriers. If the pre-enrichment procedure is combined with direct plating of stools on screening culture media, the highest sensitivity can be achieved. This can also compensate the prolonged turnaround time caused by pre-enrichment but results in higher costs. The study design conforms to a model of perfect swabbing, whereas under routine conditions, approximately 20% of rectal swabs are of minor quality [9]. Consequently, rectal swabs are likely favoured in comparison to the clinical situation. Using the McCARB agar did not lead to an additional detection of carbapenemase isolates, as all CPE in this study were also found on ESBL agar. However, there were no OXA-48 CPE in this study, which might have been missed by the ESBL agar [11].

Considering the data from the present study and from previous studies, we believe that screening for 3GCREB should always be performed with pre-enrichment. For optimal screening, stool samples should be favoured.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04250-1>.

**Acknowledgements** We thank Ahmad Saleh and Yvonne Stelzer for the excellent technical assistance.

**Availability of data and materials** All data generated and analysed during this study are included in this article [and its supplementary information files].

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study was supported by grants from the Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany, and by the Koeln Fortune Program, Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany.

**Declarations** All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Ethical approval** Ethical approval was assessed by the Ethics Commission of Cologne University's Faculty of Medicine. There are no ethical or legal concerns about the implementation of the project. For this type of study formal consent is not required.

**Competing interests** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Hamprecht A, Rohde AM, Behnke M, Feihl S, Gastmeier P, Gebhardt F, Kern WV, Knobloch JK, Mischnik A, Obermann B, Querbach C, Peter S, Schneider C, Schroder W, Schwab F, Tacconelli E, Wiese-Posselt M, Wille T, Willmann M, Seifert H, Zweigner J (2016) Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors. *J Antimicrob Chemother* 71(10):2957–2963. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw216>
- Comejo-Juarez P, Suarez-Cuenca JA, Volkow-Fernandez P, Silva-Sanchez J, Barrios-Camacho H, Najera-Leon E, Velazquez-Acosta C, Vilar-Compte D (2015) Fecal ESBL *Escherichia coli* carriage as a risk factor for bacteremia in patients with hematological malignancies. *Support Care Cancer*. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-2772-z>
- Dedic-Ljubovic A, Hukic M (2012) Occurrence of colonization and infection with multi-drug-resistant organisms in a neonatal intensive care unit. *Med Glas (Zenica)* 9(2):304–310
- Liss BJ, Vehreschild JJ, Cornely OA, Hallek M, Fatkenheuer G, Wisplinghoff H, Seifert H, Vehreschild MJ (2012) Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection* 40(6):613–619. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0269-y>
- Schwaber MJ, Carmeli Y (2007) Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 60(5):913–920. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm318>
- Rottier WC, Ammerlaan HS, Bonten MJ (2012) Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and patient outcome: a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 67(6):1311–1320. <https://doi.org/10.1093/jac/dks065>
- Lerner A, Romano J, Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y (2013) Rectal swabs are suitable for quantifying the carriage load of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 57(3):1474–1479. <https://doi.org/10.1128/aac.01275-12>
- Kluytmans-van den Bergh MF, Verhulst C, Willemsen LE, Verkade E, Bonten MJ, Kluytmans JA (2015) Rectal carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospitalized patients: selective pre-enrichment increases yield of screening. *J Clin Microbiol* 53(8):2709–2712. <https://doi.org/10.1128/JCM.01251-15>
- Jazmati N, Jazmati T, Hamprecht A (2017) Importance of pre-enrichment for detection of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae (3GCREB) from rectal swabs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36(10):1847–1851. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3000-1>
- Jazmati N, Hein R, Hamprecht A (2016) Use of an enrichment broth improves detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical stool samples. *J Clin Microbiol* 54(2):467–470. <https://doi.org/10.1128/JCM.02926-15>
- Göttig S, Walker SV, Saleh A, Koroska F, Sommer J, Stelzer Y, Steinmann J, Hamprecht A (2020) Comparison of nine different selective agars for the detection of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39(5):923–927. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03786-7>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* (3GCREB)  
 European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Tarek Jazmati<sup>a,b</sup>, Axel Hamprecht<sup>a,b,d</sup>, Nathalie Jazmati<sup>a,b,c,e</sup>

<sup>a</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>b</sup>German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Germany; <sup>c</sup>Laboratory Dr. Wisplinghoff, Cologne, Germany; <sup>d</sup>Institute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg & Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany

<sup>e</sup>Corresponding author: nathalie.jazmati@uk-koeln.de

Online Resource 1 Drug susceptibilities of 3GCREB isolates recovered by the four approaches and compared to each other

Strain characteristics	3GCREB isolates recovered by														
	Overall (n=97)			Stool without pre-enrichment (A) (n=68)			Stool with pre-enrichment (B) (n=81)			Rectal swab without pre-enrichment (C) (n=63)			Rectal swab with pre-enrichment (D) (n=75)		
Drug Susceptibility <sup>a</sup>	MIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>a</sup>	IR <sup>a</sup> (n, %)	MIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>a</sup>	IR <sup>a</sup> (n, %)	MIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>a</sup>	IR <sup>a</sup> (n, %)	MIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>a</sup>	IR <sup>a</sup> (n, %)	MIC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>a</sup>	IR <sup>a</sup> (n, %)
Piperacillin/Tazobactam	64	>128	60 (61.9%)	16	>128	36 (52.9%)	32	>128	46 (56.8%)	16	>128	33 (52.4%)	64	>128	46 (61.3%)
Cefpodoxime	>8	>8	97 (100%)	>8	>8	68 (100%)	>8	>8	81 (100%)	>8	>8	63 (100%)	>8	>8	75 (100%)
Cefotaxime	>64	>64	92 (94.8%)	>64	>64	66 (97.1%)	>64	>64	77 (95.1%)	>64	>64	62 (98.4%)	>64	>64	73 (97.3%)
Cefazidime	16	>64	76 (78.4%)	16	>64	53 (77.9%)	16	>64	65 (80.2%)	16	>64	49 (77.8%)	16	>64	59 (78.7%)
Ertapenem	<0.5	2	15 (15.5%)	<0.5	1	9 (13.2%)	<0.5	2	14 (17.3%)	<0.5	1	10 (15.9%)	<0.5	1	11 (14.7%)
Imipenem	<0.25	1	4 (4.1%)	<0.25	1	3 (4.4%)	<0.25	1	4 (4.9%)	<0.25	0.5	3 (4.8%)	<0.25	1	3 (4.0%)
Meropenem	<0.25	<0.25	2 (2.1%)	<0.25	<0.25	1 (1.5%)	<0.25	<0.25	2 (2.5%)	<0.25	<0.25	1 (1.6%)	<0.25	<0.25	1 (1.3%)
Ciprofloxacin	<0.25	>4	38 (39.2%)	<0.25	>4	30 (44.1%)	<0.25	>4	33 (40.7%)	<0.25	>4	25 (39.7%)	<0.25	>4	29 (38.7%)
Trimethoprim Sulfamethoxazole	<20	>320	43 (44.3%)	>320	>320	35 (51.5%)	<20	>320	38 (46.9%)	<20	>320	30 (47.6%)	<20	>320	34 (45.3%)

<sup>a</sup> MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> estimates the antibiotic concentration (ng/liter) that inhibits 50% (MIC<sub>50</sub>) and 90% (MIC<sub>90</sub>) of tested bacterial isolates; IR, number of isolates considered to be intermediate (I) or resistant (R) to the indicated antimicrobial agent according to EUCAST clinical MIC breakpoints.

\* p-value was obtained using  $\chi^2$  test and accounts for the comparison of 3GCREB isolates recovered by the four approaches.

3GCREB, third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*

Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriales* (3GCREB)

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Tarek Jazmati<sup>a,b</sup>, Axel Hamprecht<sup>a,b,d</sup>, Nathalie Jazmati<sup>a,b,c,e,f</sup>

<sup>a</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>b</sup>German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Germany; <sup>c</sup>Laboratory Dr. Wisplinghoff, Cologne, Germany; <sup>d</sup>Institute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg & Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany

<sup>e</sup>Corresponding author: nathalie.jazmati@uk-koeln.de

Online Resource 2 Strain characteristics of ESBL-E isolates recovered by the four approaches and compared to each other

Strain characteristics	Overall (n=54)				ESBL-E isolates recovered by							
	Stool without pre-enrichment (A) (n=47)		Stool with pre-enrichment (B) (n=49)		Rectal swab without pre-enrichment (C) (n=43)		Rectal swab with pre-enrichment (D) (n=44)					
Species	MIC50	IR (n, %)	MIC90	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)
<i>Escherichia coli</i>	45 (83.3%)	42 (89.4%)	41 (83.7%)	37 (86.0%)	37 (86.0%)	37 (84.1%)						
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (5.6%)	3 (6.4%)	3 (6.1%)	2 (4.7%)	2 (4.7%)	2 (4.5%)						
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2 (3.7%)	0	2 (4.1%)	1 (2.3%)	1 (2.3%)	1 (2.3%)						
<i>Enterobacter cloacae</i>	3 (5.6%)	2 (4.3%)	3 (6.1%)	3 (7.0%)	3 (6.8%)							
<i>Citrobacter farmari</i>	1 (1.9%)	0	0	0	0	1 (2.3%)						
<b>ESBL genes</b>												
CTX-M-1 (no. (% of ESBL))	33 (61.1%)	30 (63.8%)	31 (63.3%)	29 (67.4%)	28 (63.6%)							
CTX-M-9 (no. (% of ESBL))	9 (16.7%)	7 (14.9%)	8 (16.3%)	6 (14.0%)	8 (18.2%)							
Unknown (no. (% of ESBL))	12 (22.2%)	10 (21.3%)	10 (20.4%)	8 (18.6%)	8 (18.2%)							
<b>Drug Susceptibilities<sup>a</sup></b>	MIC50	IR (n, %)	MIC90	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)	MIC50	IR (n, %)
Piperacillin/Tazobactam	8 (>128)	19 (35.2%)	8 (>128)	16 (34.0%)	8 (>128)	16 (32.7%)	8 (>128)	14 (32.6%)	8 (>128)	16 (36.4%)		
Cefepodoxime	>8	54 (100%)	>8	47 (100%)	>8	49 (100%)	>8	43 (100%)	>8	44 (100%)		
Cefotaxime	>64	>64	53 (98.1%)	>64	46 (97.9%)	>64	48 (98.0%)	>64	>64	42 (97.7%)	>64	44 (100%)
Ceftazidime	8	>64	37 (68.5%)	8	>64	32 (68.1%)	8	>64	35 (71.4%)	8	>64	30 (68.2%)
Ertapenem	<0.5	<0.5	2 (3.7%)	<0.5	2 (4.3%)	<0.5	<0.5	2 (4.1%)	<0.5	<0.5	<0.5	2 (4.5%)
Imipenem	<0.25	<0.25	0	<0.25	0	<0.25	0	<0.25	0	<0.25	0.5	0
Meropenem	<0.25	<0.25	0	<0.25	0	<0.25	0	<0.25	0	<0.25	<0.25	0
Ciprofloxacin	>4	>4	32 (59.3%)	>4	28 (59.6%)	>4	28 (57.1%)	2	>4	23 (53.5%)	>4	26 (59.1%)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>320	>320	37 (68.5%)	>320	33 (70.2%)	>320	33 (67.3%)	>320	>320	29 (67.4%)	>320	32 (72.7%)

<sup>a</sup> MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> estimates the antibiotic concentration (mg/l) that inhibits 50% (MIC<sub>50</sub>) and 90% (MIC<sub>90</sub>) of tested bacterial isolates; IR, number of isolates considered to be intermediate (I) or resistant (R) to the indicated antimicrobial agent according to EUCAST clinical MIC breakpoints.

ESBL-E, extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriales*

Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriales* (3GCRESB)

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Tarek Jazmati<sup>a,b</sup>, Axel Hamprecht<sup>a,b,d</sup>, Nathalie Jazmati<sup>a,b,c,e,f</sup>

<sup>a</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>b</sup>German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Germany; <sup>c</sup>Laboratory Dr. Wisplinghoff, Cologne, Germany; <sup>d</sup>Institute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg & Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany

<sup>e</sup>Corresponding author: nathalie.jazmati@uk-koeln.de

Online Resource 3 Distribution of identified species and resistance mechanisms among the 97 3GCRESB study isolates

	ESBL (n (%))			Other resistance mechanism (n(%))					Total (n (%)) <sup>4</sup>
	CTX-M-1 group <sup>2</sup>	CTX-M-9 group <sup>2</sup>	unknown ESBL <sup>2</sup>	Total ESBL <sup>1</sup>	AmpC <sup>1</sup>	Hyper Kl <sup>1</sup>	<i>bla</i> <sub>AMP</sub> <sup>1</sup>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> <sup>1</sup>	
<i>Escherichia coli</i>	29 (64.4)	7 (15.6)	9 (20.0)	45 (100)	-	-	-	-	45 (46.4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (66.7)	-	1 (33.3)	3 (50.0)	1 (16.7)	-	-	2 (33.3)	6 (6.2)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	1 (1.0)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1 (50.0)	-	1 (50.0)	2 (50.0)	2 (50.0)	-	-	-	4 (4.1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (33.3)	2 (66.7)	-	3 (37.5)	5 (62.5)	-	-	-	8 (8.2)
Other <i>Enterobacter</i> spp.	-	-	-	-	4 (100)	-	-	-	4 (4.1)
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	17 (89.5)	-	-	2 (10.5)	19 (19.6)
<i>Citrobacter braakii</i>	-	-	-	-	4 (100)	-	-	-	4 (4.1)
Other <i>Citrobacter</i> spp.	-	-	1 (100)	1 (50.0)	1 (50.0)	-	-	-	2 (2.1)
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	-	2 (100)	-	-	-	2 (2.1)
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	2 (100)	-	2 (2.1)
<b>Total (n (%))</b>	<b>33 (61.3)</b>	<b>9 (16.7)</b>	<b>12 (22.2)</b>	<b>54 (55.7)</b>	<b>36 (37.1)</b>	<b>1 (1.0)</b>	<b>2 (2.1)</b>	<b>2 (2.1)</b>	<b>97 (100)</b>

<sup>1</sup>Percentage based on all isolates of the named species

<sup>2</sup>Percentage based on total number of ESBL positive isolates of the named species

<sup>3</sup>Percentage based on total number of ESBL positive isolates

<sup>4</sup>Percentage based on all 97 isolated 3GCRESB

3GCRESB, third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriales*; ESBL-E, extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriales*

Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriales* (3GCREB)

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Tarek Jazmati<sup>a,b</sup>, Axel Hamprecht<sup>a,b,d</sup>, Nathalie Jazmati<sup>a,b,c,e,f</sup>

<sup>a</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>b</sup>German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Germany; <sup>c</sup>Laboratory Dr. Wisplinghoff, Cologne, Germany; <sup>d</sup>Institute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg & Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany

<sup>e</sup>Corresponding author: nathalie.jazmati@uk-koeln.de

Online Resource 4 Patient characteristics of 3GCREB carriers detected by the four approaches and compared to each other

Patients characteristics <sup>a</sup>	Overall carrier (n=68)	3GCREB carrier recovered by			
		Stool without pre-enrichment (A) (n=44)	Stool with pre-enrichment (B) (n=56)	Rectal swab without pre-enrichment (C) (n=42)	Rectal swab with pre-enrichment (D) (n=54)
Age (years)	58.9 ± 22.2	59.1 ± 22.8	59.8 ± 21.5	56.1 ± 24.4	56.8 ± 23.4
No. Male (%)	40 (58.8%)	28 (63.6%)	33 (58.9%)	26 (61.9%)	31 (57.4%)
Clinical setting (no. (%))					
Internal Medicine	33 (48.5%)	21 (47.7%)	27 (48.2%)	20 (47.6%)	28 (51.9%)
Surgery	8 (11.8%)	4 (9.1%)	7 (12.5%)	3 (7.1%)	5 (9.3%)
Intensive Care Unit	13 (19.1%)	10 (22.7%)	12 (21.4%)	8 (19.0%)	10 (18.5%)
Pediatrics	5 (7.4%)	3 (6.8%)	3 (5.4%)	4 (9.5%)	5 (9.3%)
Others	9 (13.2%)	6 (13.6%)	7 (12.5%)	7 (16.7%)	6 (11.1%)

<sup>a</sup> Calculation is based on a patients level (i.e., patients with more than one positive sample were only included in the calculation once).

\* p-value by  $\chi^2$  test was calculated for 3GCREB carriers detected by the four approaches

3GCREB, third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriales*

Comparison of stool samples and rectal swabs with and without pre-enrichment for the detection of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriales* (3GCREB)

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Tarek Jazmati<sup>a,b</sup>, Axel Hamprecht<sup>a,b,d</sup>, Nathalie Jazmati<sup>a,b,c,e</sup>

<sup>a</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>b</sup>German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Germany; <sup>c</sup>Laboratory Dr. Wisplinghoff, Cologne, Germany; <sup>d</sup>Institute for Medical Microbiology and Virology, University of Oldenburg & Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany

<sup>e</sup>Corresponding author: nathalie.jazmati@uk-koeln.de

Online Resource 5 Patient characteristics of ESBL-E carriers detected by the four approaches and compared to each other

Patients characteristics <sup>a</sup>	Overall carrier (n=34)	ESBL-E carrier recovered by			
		Stool without pre-enrichment (A) (n=29)	Stool with pre-enrichment (B) (n=31)	Rectal swab without pre-enrichment (C) (n=27)	Rectal swab with pre-enrichment (D) (n=30)
Age (years)	59.2 ± 20.1	58.9 ± 17.4	58.1 ± 20.7	54.8 ± 20.1	56.6 ± 19.9
No. Male (%)	20 (58.8%)	20 (69.0%)	19 (61.3%)	18 (66.7%)	18 (60.0%)
Clinical setting (no. (%))					
Internal Medicine	21 (61.8%)	18 (62.1%)	19 (61.3%)	18 (66.7%)	20 (66.7%)
Surgery	3 (8.8%)	2 (6.9%)	3 (9.7%)	1 (3.7%)	1 (3.3%)
Intensive Care Unit	6 (17.6%)	6 (20.7%)	5 (16.1%)	4 (14.8%)	5 (16.7%)
Pediatrics	1 (2.9%)	0	1 (3.2%)	1 (3.7%)	1 (3.3%)
Others	3 (8.8%)	3 (10.3%)	3 (9.7%)	3 (11.1%)	3 (10.0%)

<sup>a</sup> Calculation is based on a patients level (i.e., patients with more than one positive sample were only included in the calculation once).

\* p-value by  $\chi^2$  test was calculated for ESBL-E carriers detected by the four approaches

ESBL-E, extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriales*

## 4. Diskussion

Angesichts der weltweiten Zunahme multiresistenter Enterobakterien, hat sich das Screening auf die gastrointestinale Kolonisation mit 3GCREB in vielen Einrichtungen zum Standard in der Infektionskontrolle etabliert. *Enterobacterales* besiedeln vorwiegend die Darmflora, sodass die Stuhlprobe als Goldstandard für die Detektion von 3GCREB gilt.<sup>3</sup> In der klinischen Anwendung werden jedoch aus Gründen der Praktikabilität die Rektalabstriche bevorzugt verwendet, da sie zeitlich unabhängig von der Defäkation gewonnen werden können.<sup>1</sup> Beim Nachweis von *Klebsiella pneumoniae*-Carbapenemasen konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass die Ergebnisse von Rektalabstrichen und Stuhlproben vergleichbar sind.<sup>43</sup>

Nach der Probenentnahme erfolgt das Screening bislang durch eine Direktanlage der Darmflora auf selektive Agarplatten. Es liegen jedoch wissenschaftliche Belege dafür vor, dass eine Voranreicherung der gewonnenen Darmflora in einem selektiven Flüssignährmedium die Sensitivität des Screenings auf 3GCREB signifikant verbessern kann.<sup>46-48,50</sup>

In der vorliegenden Studie erfolgte erstmals ein experimenteller Vergleich der Leistungsfähigkeit von Rektalabstrichen und Stuhlproben, sowohl mit als auch ohne Voranreicherung. Es wurde festgestellt, dass die Durchführung einer Voranreicherung sowohl bei Stuhlproben als auch bei Rektalabstrichen vor dem Auftragen auf ein selektives Nährmedium zu einer signifikanten Steigerung des Nachweises von 3GCREB-Trägern führt. 29,4 % der 3GCREB positiven Patienten wurden nur durch Verwendung einer Voranreicherung detektiert. Allerdings war nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der ESBL-E-Träger zu verzeichnen. Die starke Auswirkung der Anreicherung bei den 3GCREB-Trägern wurde maßgeblich durch den verbesserten Nachweis der AmpC- $\beta$ -Laktamasen erreicht. Vorausgehende Forschungsergebnisse sind im Einklang mit den Resultaten unserer Studie. Sie bestätigen, dass eine Voranreicherung die Detektion von 3GCREB aus Stuhlproben<sup>46</sup>, Nylon-Rektalabstrichen<sup>47</sup> und Kunstseide Abstrichen<sup>48</sup> verbessern kann.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass unabhängig von einer Voranreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen Stuhlproben und rektalen Abstrichen in Bezug auf die Anzahl der nachgewiesenen 3GCREB- und ESBL-E-Träger besteht, Stuhlproben jedoch marginal bessere Ergebnisse ermöglichen.

Somit wird durch die Verwendung von Stuhlproben mit einer vorherigen Anreicherung die höchste Sensitivität für den Nachweis von 3GCREB- und ESBL-E-Trägern erreicht. Dennoch konnte keiner der vier Methoden alle 3GCREB-Träger detektieren. Eine noch höhere Sensitivität kann erreicht werden, wenn das direkte Anlageverfahren auf selektive Agarplatten mit der Voranreicherung der Stuhlproben kombiniert wird.

Die Stärke der Studie besteht darin, dass die Untersuchungen mit klinischen Proben der Routinediagnostik durchgeführt und dass strenge Qualitätskriterien sichergestellt wurden.

Sie weist jedoch zeitgleich auch einige Einschränkungen auf. Die Rektalabstriche wurden durch Eintauchen des Tupfers in die Stuhlprobe simuliert, um eine hohe Qualität der Abstrichproben zu gewährleisten. Dieses Studiendesign entspricht einem Ideal des perfekten Abstrichs, während unter tatsächlichen Routinebedingungen 18,2 % der Rektalabstriche von geringer Qualität sind.<sup>48</sup> Daher könnten die in der Studie simulierten rektalen Abstriche eine bessere Performance aufweisen als in der Situation im Routinelabor.

Die verwendeten Abstrichtupfer bestanden aus Kunstseide und sind für die Gewinnung von Darmflora vorgesehen. Forschungsergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass aus Nylon oder Polyurethan-Zellschaum gefertigte Tupfer eine bessere Probengewinnung ermöglichen.<sup>44</sup> Mit diesen Abstrichtupfern könnte eine noch höhere Detektionsrate denkbar sein. An diesen Stellen besteht weiterer Forschungsbedarf, um die genannten Limitationen zu untersuchen.

Obwohl sich die Voranreicherung gegenüber der direkten Anlage als überlegen erwies, wurden dennoch drei 3GCREB-Isolate nur durch das direkte Ausstreichen der Probe und nicht durch die Voranreicherung nachgewiesen, was möglicherweise auf eine inhomogene Verteilung der multiresistenten Bakterien im Stuhl zurückzuführen ist.

In der klinischen Anwendung ist der größte Nachteil der Voranreicherung die längere Durchlaufzeit. Mikrobiologische Ergebnisse liegen bei Durchführung einer Anreicherung in der Regel einen Tag später vor als bei der Direktanlage. Zudem besteht ein höherer Aufwand, denn zusätzliche Arbeitsschritte müssen in die tägliche Routinediagnostik implementiert werden.<sup>1,3</sup> Trotz des zeitlichen und arbeitstechnischen Mehraufwands wird aufgrund der verbesserten Diagnostik die Voranreicherung beispielsweise in der Routinediagnostik im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Universitätsklinikums Köln umgesetzt.

Die erhöhte Durchlaufzeit der Voranreicherung kann durch die Kombination mit der direkten Anlage teilweise umgangen werden, was zu einer höheren Empfindlichkeit des kombinierten Screenings und teilweise schnelleren Ergebnissen, aber auch zu höheren Kosten und einem nochmals vermehrten Arbeitsaufwand führt. Die erhöhte Sensitivität der Kombination (direktes Ausstreichen und nachfolgende Voranreicherung) ist nur geringfügig und steht in keinem Verhältnis zum erforderlichen Aufwand. Dennoch kann ein solcher optimaler Screeningalgorithmus abseits der Routinediagnostik in Ausbruchssituationen besonders wichtig sein, um falsch-negative Ergebnisse zu minimieren.

Neben dem in der Studie verwendeten Ablauf zur Anreicherung, bei dem der Abstrichtupfer nach Einsendung in das Labor in der Anreicherungsflüssigkeit über Nacht inkubiert wird, sind

weitere klinisch praktikablere Methoden denkbar. So besteht alternativ die Möglichkeit, den Abstrichtupfer nach der klinischen Probenentnahme am Patienten direkt in einer vorbereiteten Anreicherungslösung zu platzieren. In diesem Medium erfolgt dann der Transport in das mikrobiologische Labor und das Probenmaterial kann in seinem Anreicherungsmedium direkt in den Inkubator umgelagert und dort bis zur kulturellen Anlage inkubiert werden. Auf diese Weise wird eine improvisierte Inkubation in dem selektiven Anreicherungsmedium bei minimalem zusätzlichem Kosten-, Zeit- und Personalaufwand bewerkstelligt. Hier bedarf es weiterer Forschungsarbeit, um diese Methodik mit der in der Studie angewendeten Anreicherungsverfahren zu vergleichen.

In der Studie wurde das Screening auf 3GCREB mithilfe der kulturbasierten Diagnostik untersucht. Darüber hinaus besteht heutzutage die Möglichkeit der molekularen Analyse direkt aus der Stuhlprobe, ohne vorherige Anzucht des Bakteriums.<sup>3</sup> Dabei werden mittels einer Multiplex Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Genen von zu erwartenden  $\beta$ -Laktamasen gesucht und anschließend der vorhandene Genabschnitt vervielfältigt und nachgewiesen.<sup>1,3</sup> Diese Methode gewinnt klinisch stetig an Bedeutung.<sup>1</sup> Hauptgrund dafür ist, neben der hohen Sensitivität dieser Diagnostik, die sehr kurze Zeit, häufig nur wenige Stunden, die benötigt wird, bis das Ergebnis des zugrundeliegenden Resistenzmechanismus vorliegt.<sup>51</sup> Zudem beeinflussen ein geringes Expressionslevel oder eine herabgesetzte katalytische Aktivität der  $\beta$ -Laktamase nicht das positive Ergebnis.<sup>1</sup> Jedoch ist diese Untersuchung kostspieliger und setzt entsprechend ausgebildetes Personal sowie eine maschinelle Infrastruktur voraus.<sup>1</sup> Darüber hinaus sind die Multiplex PCR sehr spezifisch auf die gewünschten  $\beta$ -Laktamasen zugeschnitten und decken zumeist nur die bekannten und häufigsten Subtypen der Carbapenemase oder ESBL ab. Die klinische Relevanz für das Screening ist demnach teilweise eingeschränkt, denn die Isolationsdauer des Patienten ist weiterhin vom Ergebnis der kulturellen Anzucht abhängig, da ausschließlich die implizierten Resistenzmechanismen detektiert werden und neue Varianten übersehen werden.<sup>52</sup> Im Falle eines Ausbruchs, beispielsweise durch Übertragung einer bekannten Carbapenemase, stellen die molekularen Analysen wiederum ein schnelles und hochsensitives Verfahren zur Untersuchung der Kontaktpersonen dar.<sup>52</sup>

Die Carbapenemase-Isolate, die in dieser Studie gefunden wurden, konnten alle auf einem ESBL-Agar nachgewiesen werden. Die Verwendung des McCARB-Agars führte somit nicht zu einer zusätzlichen Detektion von CPE. Allerdings gab es in dieser Studie keine OXA-48-CPE, die durch den ESBL-Agar hätten übersehen werden können und deren Wachstum nur auf dem McCARB-Agar zu erwarten gewesen wäre.<sup>53</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den vier in der Studie getesteten Screeningmethoden der Stuhl mit Voranreicherung die höchste Sensitivität für den Nachweis von 3GCREB- und ESBL-E-Trägern aufwies. Rektalabstriche mit Voranreicherung sind nur unwesentlich schlechter. Bei Direktanlage der Probe ist die Rate der falsch-negativen Ergebnisse inakzeptabel hoch. In Anbetracht der Daten aus der vorliegenden Studie und aus früheren Studien sollte demnach beim Screening auf 3GCREB nicht auf eine Voranreicherung verzichtet werden.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales-From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics (Basel)* 2021; **10**(9).
2. Kim D, Kim S, Kwon Y, et al. Structural Insights for  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Biomol Ther (Seoul)* 2023; **31**(2): 141-7.
3. Campos-Madueno EI, Moradi M, Eddoubaji Y, et al. Intestinal colonization with multidrug-resistant Enterobacterales: screening, epidemiology, clinical impact, and strategies to decolonize carriers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2023; **42**(3): 229-54.
4. Jean SS, Harnod D, Hsueh PR. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; **12**: 823684.
5. Mota R, Pinto M, Palmeira J, Gonçalves D, Ferreira H. Multidrug-resistant bacteria as intestinal colonizers and evolution of intestinal colonization in healthy university students in Portugal. *Access Microbiol* 2021; **3**(1): acmi000182.
6. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance* 2021; **3**(3).
7. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* 2021; **10**(10).
8. Pandey N, Cascella M. Beta-Lactam Antibiotics. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
9. Rohde AM, Zweigner J, Wiese-Posselt M, et al. Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales colonization on hospital admission and ESBL genotype-specific risk factors: a cross-sectional study in six German university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**(6): 1631-8.
10. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection* 2019; **47**(3): 363-75.
11. de la Court JR, Woudt SHS, Schoffelen AF, et al. Third-generation cephalosporin resistant gram-negative bacteraemia in patients with haematological malignancy; an 11-year multi-centre retrospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2022; **21**(1): 54.
12. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2020; **33**(2).
13. Di Bella S, Giacobbe DR, Maraolo AE, et al. Resistance to ceftazidime/avibactam in infections and colonisations by KPC-producing Enterobacterales: a systematic review of observational clinical studies. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2021; **25**: 268-81.
14. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances* 2019; **37**(1): 177-92.

15. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect* 2022; **11**(1): 811-4.
16. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and ceftazidime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; **11**(6): 315-7.
17. Geffers C, Gastmeier P. Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int* 2011; **108**(6): 87-93.
18. Hamprecht A, Rohde AM, Behnke M, et al. Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016; **71**(10): 2957-63.
19. Tilahun M, Kassa Y, Gedefie A, Ashagire M. Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review. *Infect Drug Resist* 2021; **14**: 4363-74.
20. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: 2013.
21. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2022. Stockholm: 2023.
22. Ebrahimi F, Mózes J, Monostori J, et al. Comparison of rates of fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria among patients in different wards, outpatients and medical students. *Microbiol Immunol* 2016; **60**(5): 285-94.
23. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents* 2017; **50**(2): 127-34.
24. Birgand G, Zahar JR, Lucet JC. Insight Into the Complex Epidemiology of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis* 2018; **66**(4): 494-6.
25. Rodríguez-Villodres Á, Martín-Gandul C, Peñalva G, et al. Prevalence and Risk Factors for Multidrug-Resistant Organisms Colonization in Long-Term Care Facilities Around the World: A Review. *Antibiotics (Basel)* 2021; **10**(6).
26. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 13.
27. Bezabih YM, Sabiiti W, Alamneh E, et al. The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. *J Antimicrob Chemother* 2021; **76**(1): 22-9.
28. Huang YS, Lai LC, Chen YA, et al. Colonization With Multidrug-Resistant Organisms Among Healthy Adults in the Community Setting: Prevalence, Risk Factors, and Composition of Gut Microbiome. *Front Microbiol* 2020; **11**: 1402.
29. Temsegen W, Gorems K, Mekonnen M, Fufa D, Kassa T. Fecal Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Among

- Oncology and Non-Oncology Patients at Jimma Medical Center in Ethiopia: A Comparative Cross-Sectional Study. *Cancer Manag Res* 2023; **15**: 1217-31.
30. Schultze T, Hogardt M, Velázquez ES, et al. Molecular surveillance of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in Ukrainian patients, Germany, March to June 2022. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2023; **28**(1).
  31. Berger FK, Schmartz GP, Fritz T, et al. Occurrence, resistance patterns, and management of carbapenemase-producing bacteria in war-wounded refugees from Ukraine. *Int J Infect Dis* 2023; **132**: 89-92.
  32. Stein C, Zechel M, Spott R, Pletz MW, Kipp F. Multidrug-resistant isolates from Ukrainian patients in a German health facility: a genomic surveillance study focusing on antimicrobial resistance and bacterial relatedness. *Infection* 2023; **51**(6): 1731-8.
  33. Kamal S, Varshney K, Uayan DJ, Tenorio BG, Pillay P, Sava ST. Risk Factors and Clinical Characteristics of Pandrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Cureus* 2024; **16**(4): e58114.
  34. Karakonstantis S, Kritsotakis EI, Gikas A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**(2): 271-82.
  35. Gurieva T, Dautzenberg MJD, Gniadkowski M, Derde LPG, Bonten MJM, Bootsma MCJ. The Transmissibility of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Intensive Care Units. *Clin Infect Dis* 2018; **66**(4): 489-93.
  36. Kizilates F, Yakupogullari Y, Berk H, Oztoprak N, Otlu B. Risk factors for fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains among patients at hospital admission. *Am J Infect Control* 2021; **49**(3): 333-9.
  37. Schwartz KL, Morris SK. Travel and the Spread of Drug-Resistant Bacteria. *Curr Infect Dis Rep* 2018; **20**(9): 29.
  38. Cornejo-Juarez P, Suarez-Cuenca JA, Volkow-Fernandez P, et al. Fecal ESBL *Escherichia coli* carriage as a risk factor for bacteremia in patients with hematological malignancies. *Support Care Cancer* 2015.
  39. Bonine NG, Berger A, Altincatal A, et al. Impact of Delayed Appropriate Antibiotic Therapy on Patient Outcomes by Antibiotic Resistance Status From Serious Gram-negative Bacterial Infections. *Am J Med Sci* 2019; **357**(2): 103-10.
  40. Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2007; **60**(5): 913-20.
  41. Ling W, Furuya-Kanamori L, Ezure Y, Harris PNA, Paterson DL. Adverse clinical outcomes associated with infections by Enterobacterales producing ESBL (ESBL-E): a systematic review and meta-analysis. *JAC Antimicrob Resist* 2021; **3**(2): dlab068.
  42. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20 Suppl 1**: 1-55.

43. Lerner A, Romano J, Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y. Rectal swabs are suitable for quantifying the carriage load of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**(3): 1474-9.
44. Warnke P, Johanna Pohl FP, Kundt G, Podbielski A. Screening for Gram-negative bacteria: Impact of preanalytical parameters. *Scientific reports* 2016; **6**: 30427.
45. Dyakova E, Bisnauthsing KN, Querol-Rubiera A, et al. Efficacy and acceptability of rectal and perineal sampling for identifying gastrointestinal colonization with extended spectrum  $\beta$ -lactamase Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2017; **23**(8): 577.e1-e3.
46. Jazmati N, Hein R, Hamprecht A. Use of an Enrichment Broth Improves Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Stool Samples. *Journal of clinical microbiology* 2016; **54**(2): 467-70.
47. Kluytmans-van den Bergh MF, Verhulst C, Willemsen LE, Verkade E, Bonten MJ, Kluytmans JA. Rectal Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Hospitalized Patients: Selective Preenrichment Increases Yield of Screening. *Journal of clinical microbiology* 2015; **53**(8): 2709-12.
48. Jazmati N, Jazmati T, Hamprecht A. Importance of pre-enrichment for detection of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae (3GCREB) from rectal swabs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; **36**(10): 1847-51.
49. Sadek M, Poirel L, Nordmann P. Optimal detection of extended-spectrum beta-lactamase producers, carbapenemase producers, polymyxin-resistant Enterobacteriales, and vancomycin-resistant enterococci from stools. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020; **96**(1): 114919.
50. Rondinaud E, Ruppé E, Matheron S, Lucet JC, Armand-Lefevre L. Screening methods for intestinal carriage of multidrug-resistant Enterobacteriales: interest of enrichment broth. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020; **97**(4): 115079.
51. Lucena Baeza L, Pfennigwerth N, Hamprecht A. Rapid and Easy Detection of Carbapenemases in Enterobacteriales in the Routine Laboratory Using the New GenePOC Carba/Revogene Carba C Assay. *J Clin Microbiol* 2019; **57**(9).
52. Saliba R, Aho-Glélé LS, Karam-Sarkis D, Zahar JR. Evaluation of polymerase chain reaction assays for direct screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from rectal swabs: a diagnostic meta-analysis. *J Hosp Infect* 2020; **104**(3): 381-9.
53. Göttig S, Walker SV, Saleh A, et al. Comparison of nine different selective agars for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriales (CPE). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; **39**(5): 923-7.

## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

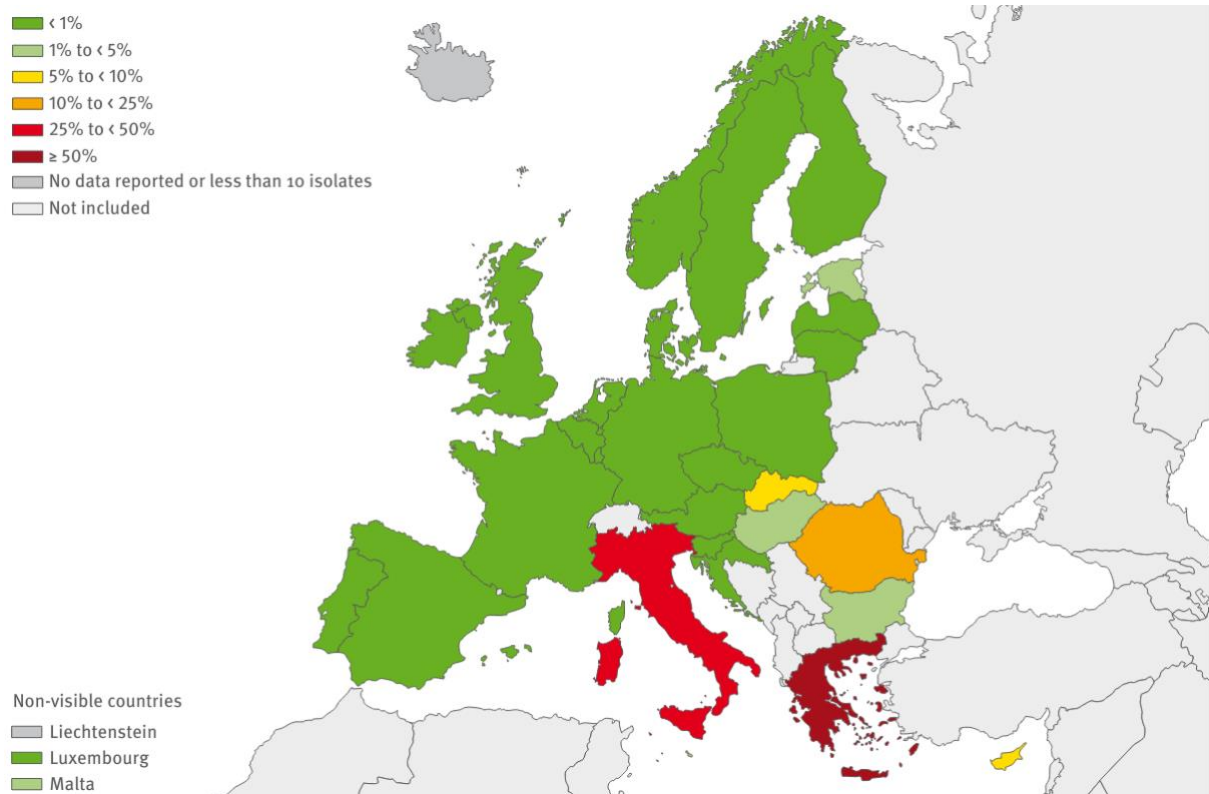


Abbildung 1: Prozent der *Klebsiella pneumoniae* Isolate mit einer Resistenz gegen Carbapeneme im Jahr 2012 in Europa.<sup>20</sup>

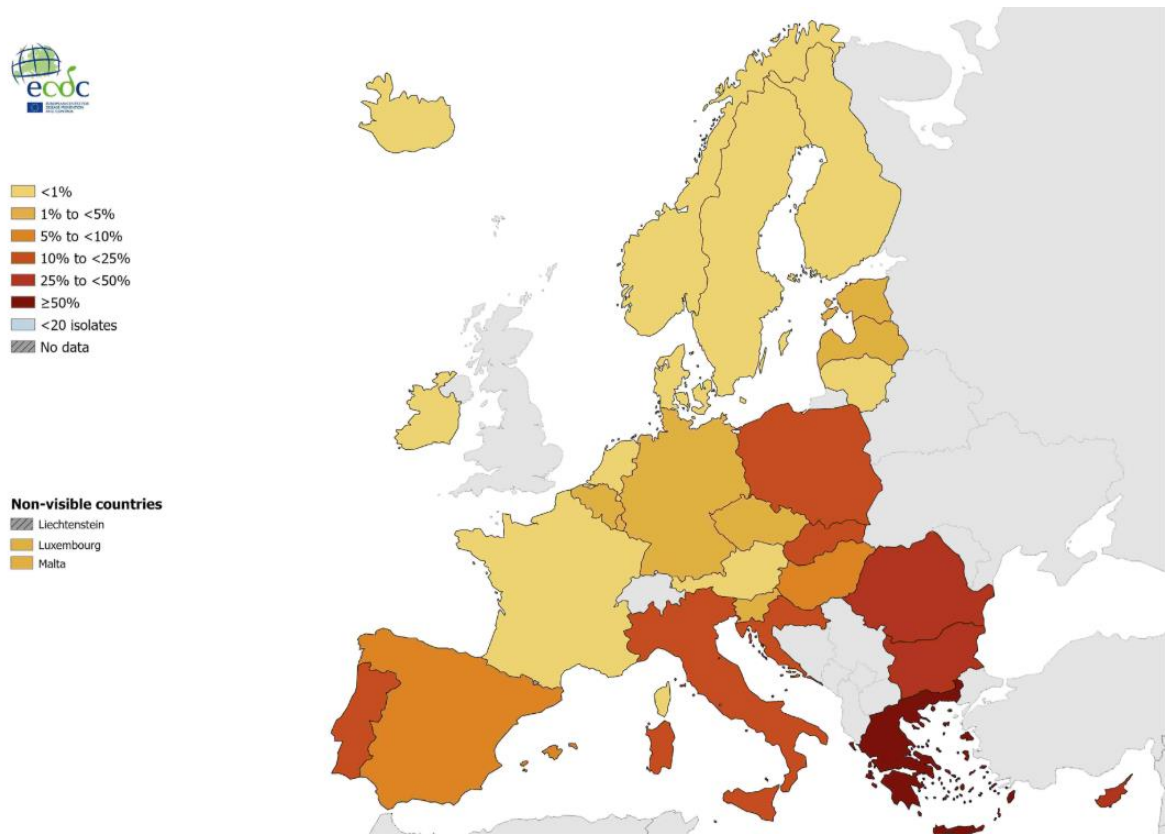


Abbildung 2: Prozent der *Klebsiella pneumoniae* Isolate mit einer Resistenz gegen Carbapeneme im Jahr 2022 in Europa.<sup>21</sup>

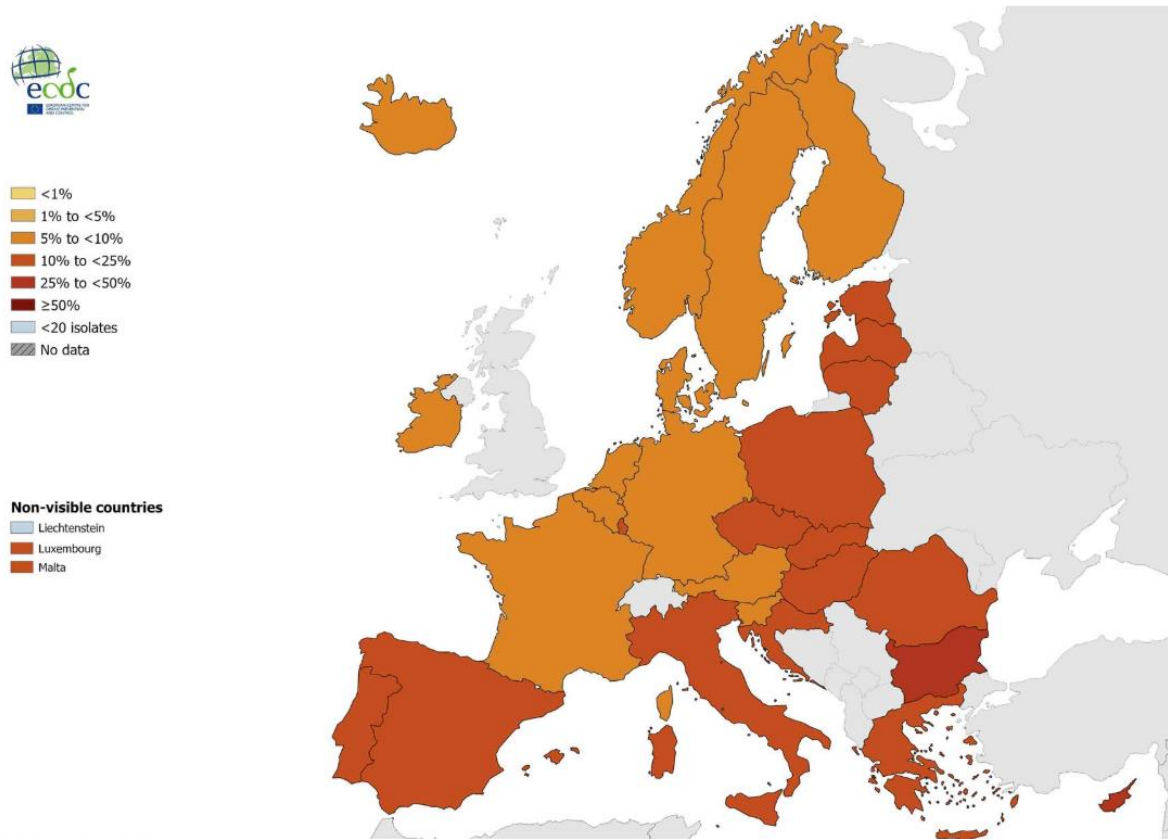


Abbildung 3: Prozent der *Escherichia coli* Isolate mit einer Resistenz gegen Drittgenerations-Cephalosporine im Jahr 2022 in Europa.<sup>21</sup>