

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE

PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE VON VANCOMYCIN-RESISTENTEN

ENTEROKOKKEN AM UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG IN

DEN JAHREN 2004 BIS 2006

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Veronika Anna Bayerl

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE

PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE VON VANCOMYCIN-RESISTENTEN

ENTEROKOKKEN AM UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG IN

DEN JAHREN 2004 BIS 2006

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Veronika Anna Bayerl

2018

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wulf Schneider

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung:

18.01.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Die Gattung <i>Enterococcus</i>	9
1.2. Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken	10
1.2.1. Natürliche Resistenzen.....	11
1.2.2. Entwicklung und Verbreitung der Vancomycinresistenz	11
1.2.3. Mechanismus der Vancomycinresistenz.....	13
1.2.4. Teicoplanin- und Linezolidresistenz.....	18
1.3. Virulenzfaktoren	19
1.3.1. Enterococcal Surface Protein	19
1.3.2. Hyaluronidase.....	21
1.4. Klonaler Komplex 17 (CC17)	22
1.5. Epidemiologische Typisierungsmethoden.....	22
1.5.1. Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE)	22
1.5.2. Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)	23
1.5.3. Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST).....	23
1.5.4. Multi Locus Variable Number Of Tandem Repeats Analysis (MLVA)	24
1.5.5. Whole Genome Sequencing (WGS).....	24
1.6. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Materialien	26
2.2. VRE-Nachweis in den Jahren 2004 bis 2006.....	32
2.2.1. Übersicht über die Nachweismethoden	32
2.2.2. Screeningverfahren	33
2.2.3. Kultureller VRE-Nachweis	35
2.3. Laboranalysen im Jahr 2016.....	37

2.3.1.	VRE-Bouillon und Bakterienkultur	37
2.3.2.	Keimidentifizierung und MHK-Bestimmung	37
2.3.3.	DNA-Isolierung	38
2.3.4.	PCR zur molekularbiologischen Typisierung der <i>E. faecium</i> - Isolate	39
2.3.5.	Reagenzien und Amplifikationsbedingungen	41
2.3.6.	Gelelektrophorese und Fotodokumentation	43
2.3.7.	Aufreinigung und Sequenzierung der Amplifikate	46
2.3.8.	Auswertung der Sequenzen	47
2.4.	Patientendatenerhebung	47
2.4.1.	Pseudonymisierung der Patientendaten	47
2.4.2.	Tabelle und Spaltendaten	48
3.	Resultate	50
3.1.	Übersicht über VRE-Fälle	50
3.2.	Alter und Geschlecht der Patienten	51
3.3.	Jahresverlauf der VRE-Fälle	53
3.4.	Enterokokkenspezies und Resistenzen 2004 bis 2006	54
3.4.1.	Enterokokkenspezies	54
3.4.2.	Resistenzen	55
3.5.	Enterokokkenspezies und Resistenzen 2016: Vergleich mit Ausgangsdaten	58
3.5.1.	Enterokokkenspezies	58
3.5.2.	Resistenzen	59
3.6.	Nachweis von Enterococcal Surface Protein (<i>esp</i>) und Hyaluronidase (<i>hyl</i>)	62
3.7.	MLSTypisierung	65
3.7.1.	PCR der MLST-Gene	65

3.7.2.	Punktmutation im <i>gdh</i> -Allel	69
3.8.	MLST-Sequenztypen	70
3.8.1.	Übersicht der Sequenztypen	70
3.8.2.	Vergleich der Sequenztypen externer Krankenhäuser und des UKR	72
3.8.3.	Verteilung der Resistenzgene und Virulenzfaktoren für die einzelnen Sequenztypen	74
3.8.4.	Jahresverlauf der Sequenztypen 192 und 208	76
3.9.	Herkunft der Isolate	77
3.9.1.	Verteilung der Sequenztypen auf die verschiedenen Krankenhäuser	77
3.9.2.	Verteilung der Sequenztypen innerhalb des UKR	78
3.10.	Material	82
3.10.1.	Kulturelle Nachweise und Screenings	82
3.10.2.	Materialgruppen	83
3.10.3.	Kolonisierungen und Infektionen	84
3.11.	Patientenwiederholungen	85
4.	Diskussion	87
4.1.	Hinführung	87
4.2.	Alters- und Geschlechtsverteilung	89
4.3.	Jahresverlauf der VRE-Fälle	90
4.4.	Enterokokkenspezies	92
4.5.	Resistenzen	92
4.6.	Bedeutung der Virulenzfaktoren Enterococcal Surface Protein (<i>esp</i>) und Hyaluronidase (<i>hyl</i>)	97
4.7.	Methodik der epidemiologischen Typisierung: MLST	100
4.8.	Epidemiologie der MLST-Sequenztypen und deren Verteilung im UKR ..	101
4.9.	Präventionsmaßnahmen	106

4.10. Ausblick.....	108
5. Zusammenfassung.....	109
6. Literaturverzeichnis	111
7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	119
7.1. Tabellen	119
7.2. Abbildungen	120
Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
AG	Arbeitsgruppe
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BKH	Bezirkskrankenhaus
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
D-Ala	D-Alanin
D-Lac	D-Lactat
D-Ser	D-Serin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-Test	Epsilometertest
fwd.	forward
ggf.	gegebenenfalls
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMHR	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg
KH	Krankenhaus
KMT	Knochenmarkstransplantationsstation
LIS	Laborinformationssystem
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MHK	minimale Hemmkonzentration
MLST	Multilokus-Sequenz-Typisierung
MLVA	Multi Locus Variable number tandem repeat (VNTR) Analysis

mM	Millimolar (10^{-3} mol/l)
MRE	Multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Penicillinbindeprotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsed-Field-Gelelektrophorese
rev.	reverse
RKI	Robert Koch Institut
S.	<i>Streptococcus</i> bzw. <i>Staphylococcus</i>
sog.	sogenannte(n)
ST	Sequenztypus
TBE	Tris-Borat-EDTA
Temp.	Temperatur
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WGS	Whole Genome Sequencing

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Enterococcus*

Enterokokken sind Teil des physiologischen Darmmikrobioms von Menschen und Tieren. Zudem sind sie auch in der Umwelt – in der Erde, im Wasser und in Pflanzen – zu finden [1]. Derzeit sind 37 verschiedene Enterokokkenspezies bekannt [2]. Beim Menschen kommen vor allem *Enterococcus (E.) faecalis* und *E. faecium* vor, die natürlicherweise im Urogenital- und Darmtrakt sowie in der Mundhöhle lokalisiert sind. Diese Spezies gehören zu den häufigsten Erregern von nosokomialen Infektionen wie chronischen Harnwegsinfekten, aber auch andere Erkrankungen wie Endokarditis, Peritonitis, Cholangitis/ Cholecystitis und Infektionen von Operationswunden können durch Enterokokken ausgelöst werden. Besonders Neugeborene und ältere Menschen sowie Patienten mit geschwächtem Immunsystem sind dafür anfällig. [1] Weitaus seltener kommen beim Menschen die Spezies *E. durans*, *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* vor [3]. Bevor die ersten Fälle von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) bekannt wurden, galten Infektionen mit Enterokokken als vergleichsweise harmlos, da sie gut therapierbar waren [4].

Enterokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe Kokken. Sie gehören zur Lancefield-Gruppe D der Streptokokken, werden jedoch phylogenetisch als eigene Gattung betrachtet. Auf Agarplatten wachsen sie entweder vergrünend (α -hämolyisierend) oder nicht-hämolyisierend. Enterokokken sind tolerant gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen oder auch Veränderungen von Salzkonzentrationen. [1]

Diese Charakteristika werden zum Teil für die Diagnostik der Enterokokken genutzt. Zur Identifizierung und weitere Analyse dieser Bakterien ist ein Nachweis mit Aesculin-haltigen Medien oder auch eine vergleichsweise unkomplizierte Kultivierung auf Blutagar geeignet [3].

1.2. Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken

Seit dem Ende des 20. Jahrhunderts wandelte sich die Verteilung der Enterokokkenspezies zunehmend. Während Infektionen früher größtenteils durch *E. faecalis*- (80–90%) und kaum durch *E. faecium*-Isolate (etwa 10%) ausgelöst wurden, nahmen in den letzten Jahren *E. faecium*-verursachte Erkrankungen in Krankenhäusern deutlich zu. Dabei kam es besonders bei der Spezies *E. faecium* gleichzeitig zu einem Anstieg von Resistenzen gegenüber gängigen Antibiotika wie Ampicillin und Vancomycin. [5–7] Auch in Deutschland wurde seit Beginn der 2000er Jahre eine Zunahme der Vancomycinresistenz unter *E. faecium*-Stämmen verzeichnet, wobei die entsprechenden Werte für *E. faecalis* meist unter 1% betragen. [8]

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die natürlichen (intrinsischen) und erworbenen (extrinsischen) Resistenzen von Enterokokken. Auf den Resistenzmechanismus gegenüber einigen Antibiotika – insbesondere Vancomycin – wird in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen.

Tabelle 1: Natürliche und erworbene Resistenzen von Enterokokken; nach Klare et al. [9]

Natürliche Resistenz	Erworbene Resistenz
Cephalosporine	Ampicillin (meist <i>E. faecium</i> , sehr selten <i>E. faecalis</i>)
semisynthetische Penicilline (z.B. Oxacillin)	Aminoglykoside (Gentamicin, Streptomycin: High-level-Resistenzen)
Monobactame	Makrolide
Polymyxine	Chloramphenicol
Lincosamide	Fluorchinolone
Streptogramine (nur <i>E. faecalis</i>)	Streptogramine (bei <i>E. faecium</i>)
Mupirocin (nur <i>E. faecalis</i>)	Oxazolidinone (Linezolid)
Aminoglykoside (Gentamicin, Streptomycin: Low-level-Resistenzen)	Glykopeptide (Vancomycin, Teicoplanin: meist <i>E. faecium</i> , sehr selten <i>E. faecalis</i>)
Vancomycin (Low-level-Resistenzen in <i>E. gallinarum</i> und <i>E. casseliflavus</i>)	Tetracycline, inklusive von Glycylcyclinen (Tigecyclin)

1.2.1. Natürliche Resistenzen

Enterokokken sind gegenüber einigen Antibiotika natürlicherweise resistent. Benzylpenicillin (Penicillin G) beispielsweise kann die Zellwand dieser Bakterien nicht durchdringen. Wie Penicilline gehören auch Cephalosporine zu den Beta-Lactam-Antibiotika, welche normalerweise an Penicillinbindeproteine (PBP) in Bakterien binden. Da Enterokokken natürlicherweise ein verändertes Penicillinbindeprotein (PBP5) aufweisen, können Cephalosporine nur mit geringer Affinität binden und somit nicht wirken – dies wird als sogenannte (sog.) Enterokokkenlücke bezeichnet. [3]

Aminoglykoside wie Gentamicin sind nur in sehr hoher Dosis oder synergistisch mit Zellwandsynthese-Inhibitoren wie Aminopenicillinen (z.B. Ampicillin) bakterizid wirksam, da die Zellmembran der Enterokokken für sie kaum permeabel ist. Durch die Kombination beider Wirkstoffe wird die Zellwand zerstört, sodass Aminoglykoside intrazellulär am Ribosom wirken können. [3]

Zur Behandlung von leichten Enterokokken-Infektionen (insbesondere *E. faecalis*-Infektionen) wird üblicherweise Ampicillin als Monotherapie eingesetzt. Bei schweren Erkrankungen wie Enterokokken-Endokarditis sollte Ampicillin mit Aminoglykosiden kombiniert werden, um den synergistischen Effekt zu nutzen. Liegt allerdings eine Penicillinallergie oder -resistenz vor, gilt das Glykopeptid Vancomycin als Therapie der Wahl. [1]

1.2.2. Entwicklung und Verbreitung der Vancomycinresistenz

Mit steigenden Resistenzen von Enterokokken gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika wie Ampicillin und auch gegenüber Aminoglykosiden blieben nur noch Reserveantibiotika wie Vancomycin als mögliche Therapie übrig [10]. Im Jahr 1987 wurden erstmals auch Vancomycin-resistente Enterokokken nachgewiesen. Dabei wurde zudem gezeigt, dass die Vancomycinresistenz bei *E. faecium* Plasmid-getragen ist. [11] Einige Jahre später wurde das Gen auf einem Transposon (Tn1546), also einem wesentlich kleineren und mobilen genetischen Element, identifiziert [12].

Die Verteilung von VRE in Europa und den USA unterschied sich zu Beginn des VRE-Auftretens deutlich. In Europa zeigten sich VRE zunächst in der gesunden

Bevölkerung, erst später auch in Krankenhäusern. Als Ursache für die Verbreitung der Vancomycinresistenz wird der Einsatz von Avoparcin vermutet. Dieses Glykopeptid ähnelt Vancomycin in seiner molekularen Struktur stark und wurde in Europa häufig zur Wachstumsförderung bei der Tiermast eingesetzt. Durch das tierische Reservoir kam es wahrscheinlich zur Übertragung von VRE auf den Menschen. Avoparcin ist für die Tierhaltung seit 1996 in Deutschland und seit 1997 in der gesamten Europäischen Union verboten. Bereits einige Monate nach dem Verbot ist der Anteil an VRE in Tierprodukten und auch in der Darmflora gesunder Menschen stark gesunken, wodurch der Verdacht indirekt bestätigt wurde. [4,13] Zusätzlich erfolgte vermutlich eine weitere Verbreitung der Resistenzgene durch horizontalen Gentransfer unter den Enterokokken der Bevölkerung [4]. In Deutschland sind die ersten großen VRE-Ausbrüche Anfang der 2000er Jahre aufgetreten [14].

In den USA hingegen kamen VRE kaum in der gesunden Bevölkerung vor. Avoparcin wurde in den USA nicht eingesetzt. Jedoch kam es gehäuft in Krankenhäusern, besonders bei immunschwachen Patienten in Einrichtungen mit hohem Antibiotikaverbrauch, zu Infektionen mit VRE. Als mögliche Ursache für diese Entwicklung gilt unter anderem der hohe Selektionsdruck durch einen wesentlich höheren (bis zu zehnfachen) Vancomycin-Einsatz seit den 1980er Jahren in den USA verglichen mit europäischen Ländern. Wahrscheinlich hatte aber nicht nur der Einsatz von Vancomycin, sondern auch von anderen Antibiotika Einfluss auf die Resistenzentwicklung. Besonders Resistenzen gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika scheinen beim Erwerb der Vancomycinresistenz eine Rolle gespielt zu haben. [4]

Die eigentliche Entstehung der Vancomycin-Resistenzgene resultiert jedoch weder in Europa noch in den USA allein aus vermehrtem Antibiotikaeinsatz. Nahezu identische Gene waren schon vor dem Auftreten von VRE in der Natur vorhanden und konnten auch in Bodenproben nachgewiesen werden [15]. Möglicherweise stammen sie ursprünglich von Bakterien, die selbst Glykopeptide produzieren und diese Resistenzgene als Schutz benötigen. [4]

1.2.3. Mechanismus der Vancomycinresistenz

Vancomycin ist ein Glykopeptid, das die Zellwandsynthese grampositiver Bakterien hemmt. Im Gegensatz zu Beta-Lactam-Antibiotika werden jedoch nicht die benötigten Enzyme selbst, sondern die Bindung der Enzyme an die benötigten Substrate eingeschränkt. Glykopeptide bilden mit dem endständigen D-Alanyl-D-Alanin (D-Ala-D-Ala) der Peptidoglykan-Vorstufe der Zellwand einen Komplex und verhindern so die Bindung von Transglykosylasen, Transpeptidasen und Carboxypeptidasen (s. Abbildung 1). Dadurch wird eine vollständige Quervernetzung von Peptidoglykanen zum fertigen Mureinsacculus verhindert, was aufgrund der geringeren Stabilität und geringeren osmotischen Resistenz zur Lyse der Zelle führt. Da die äußere Zellmembran gramnegativer Bakterien für Moleküle in Größe von Vancomycin nicht durchlässig ist, sind diese Bakterien natürlicherweise resistent. [16]

Die Verbreitung der Glykopeptidresistenz resultiert vermutlich aus dem vermehrten Einsatz dieser Antibiotika. Der Mechanismus beruht auf der Produktion einer alternativen D-Alanin-D-Alanin-Ligase durch das Bakterium. Diese zusätzlich synthetisierte Ligase katalysiert den Einbau von D-Lactat (D-Lac) oder D-Serin (D-Ser) anstatt des Alanin-Restes (D-Ala), sodass Vancomycin nur noch mit geringer Affinität binden kann. Dadurch ist die Zellwandsynthese auch unter Anwesenheit von Glykopeptiden möglich (s. Abbildung 2). [16,17]

Während D-Ala-D-Lac meist für eine sog. High-Level-Resistenz gegenüber Vancomycin (minimale Hemmkonzentration (MHK) > 64 µg/ml) und somit für eine ungefähr tausendfach niedrigere Affinität der Bindung sorgt, wird die Affinität durch D-Ala-D-Ser nur etwa siebenfach herabgesetzt (Low-Level-Resistenz mit MHK < 32 µg/ml) [17].

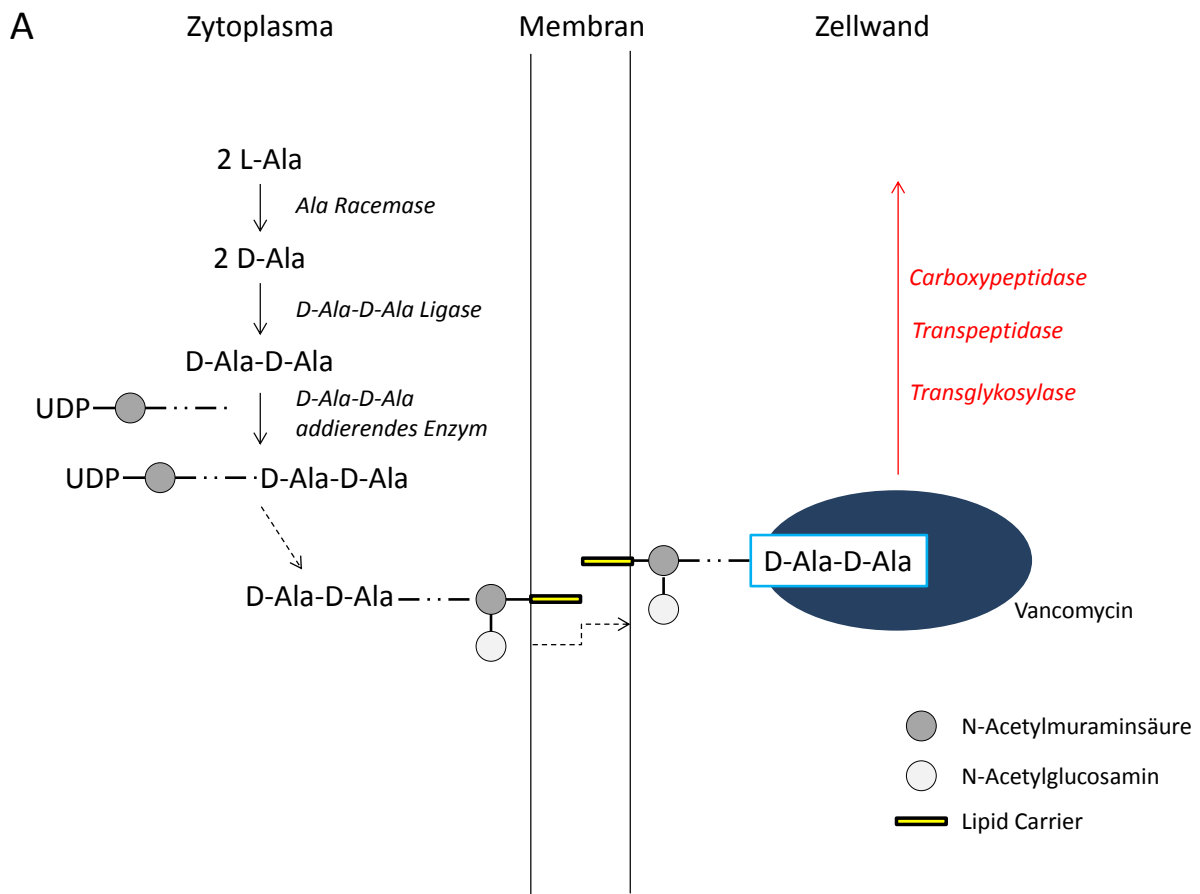


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Wirkmechanismus von Vancomycin bei der Zellwandbiosynthese: Komplexbildung mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Ende (D-Ala-D-Ala) einer Peptidoglykan-Vorstufe der Zellwand und Hemmung der Enzyme Transglykosylase, Transpeptidase und Carboxypeptidase (UDP = Uracil-Diphosphat); modifiziert nach Arthur et al. [16] und Courvalin [18]

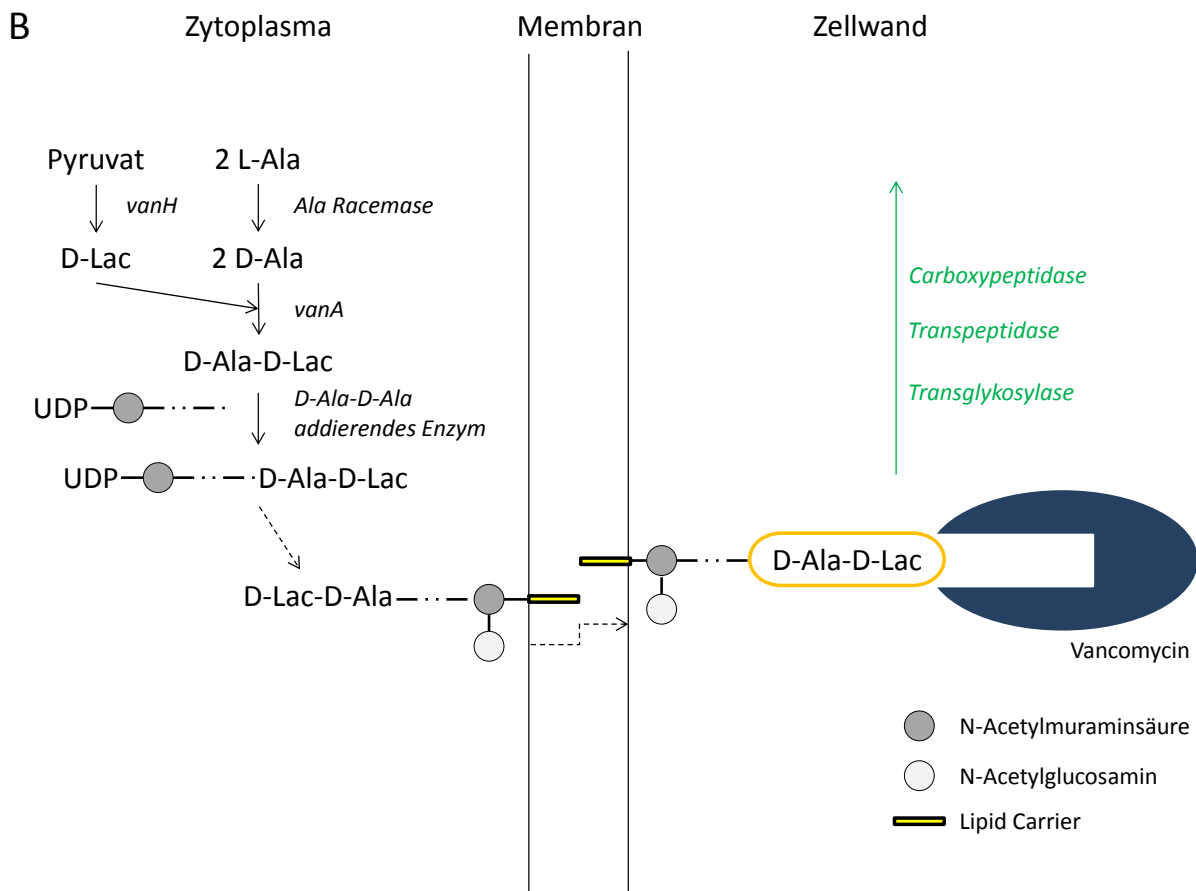


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung eines Resistenzmechanismus gegenüber Vancomycin am Beispiel der Wirkung des *vanA*-Gens als alternierende Ligase mit Bildung einer veränderten Vancomycin-Bindestelle: D-Alanyl-D-Lactat (D-Ala-D-Lac) (siehe auch Abbildung 3); (UDP = Uracil-Diphosphat); modifiziert nach Arthur et al. [16]

Es wurden bisher neun verschiedene Vancomycin-Resistenzgene gefunden: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* und *vanN*. Dabei kann zwischen intrinsischen und extrinsischen Resistenzen unterschieden werden. Nur *vanC* gehört zu den intrinsischen, alle anderen zu den extrinsischen Resistenzgenen. [17–19] Auch die Lokalisation der Gene ist verschieden. Die zwei wichtigsten – *vanA* und *vanB* – befinden sich auf Transposons, die entweder Teil von Plasmiden oder von Chromosomen sind und durch konjugativen Gentransfer übertragen werden können. *VanC*, *vanD*, *vanE* und *vanG* beispielsweise liegen nur chromosomal vor. [18] Da die Gene *vanC* bis *vanL* in der Humanmedizin bisher kaum eine Rolle spielen, werden sie in dieser Arbeit nur kurz dargestellt. Im Folgenden wird insbesondere auf *vanA* und *vanB* eingegangen.

VanA, das eine High-Level-Resistenz für die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin codiert, wurde als erstes beschrieben. Die MHK liegt für Vancomycin im Bereich von 64–100 µg/ml, die MHK für Teicoplanin bei 16–512 µg/ml. Das Resistenzgen *vanA* ist auf dem Transposon Tn1546 lokalisiert, welches ein Operon mit mehreren Genabschnitten beinhaltet (s. Abbildung 3). Die Abschnitte *vanR* und *vanS* des *vanA*-Operons dienen dabei als Regulator beziehungsweise (bzw.) als Sensor für die Transkription der nachfolgenden Resistenzgene. *VanH* codiert eine Dehydrogenase, die Pyruvat zu Lactat reduziert, sodass das *vanA*-Produkt anschließend als Ligase zur Produktion eines D-Ala-D-Lac-Depsideptids fungieren kann. Da das Bakterium jedoch natürlicherweise auch D-Ala-D-Ala-Endungen produziert, werden weitere Enzyme zur Entfernung dieser Vancomycin-Bindestelle benötigt. *VanX* codiert eine D,D-Dipeptidase, die diese Bindung spalten kann, und *VanY* führt zur Produktion einer D,D-Carboxypeptidase, die den D-Ala-Rest entfernt, sofern die Abspaltung durch die D,D-Dipeptidase nur unvollständig erfolgt ist. So wird die Peptidoglykan-Vorstufe für die alternative Ligase zugänglich gemacht. Durch diesen Mechanismus ist eine Zellwandsynthese auch unter Anwesenheit von Glykopeptiden möglich. [12,18]

VanZ ist ein Gen, das ebenfalls auf dem Transposon Tn1546 lokalisiert ist und vermutlich eine Teicoplaninresistenz codiert [20].

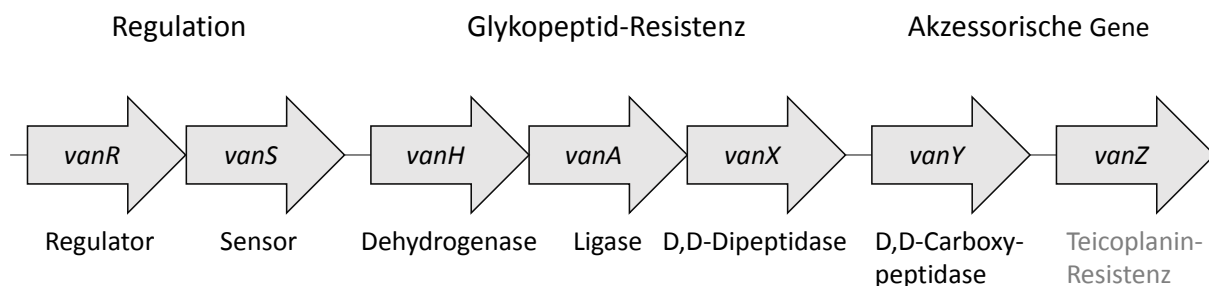


Abbildung 3: Darstellung des *vanA*-Operons mit zwei regulatorischen Genen, drei Glykopeptid-Resistenzgenen und zwei akzessorischen Genen; in Anlehnung an Courvalin [18] und Arthur et al. [20]

Das Resistenzgen *vanB* ist ebenfalls auf Transposons (Tn1547 oder Tn1549) zu finden und kann mit verschiedenen Resistenzgraden gegenüber Vancomycin

einhergehen. Die MHK für Enterokokken mit *vanB*-Gen liegt für Vancomycin bei 4–1000 µg/ml. Gegen Teicoplanin liegt in der Regel keine Resistenz vor, da die MHK nur 0,5–1 µg/ml beträgt [18]. *VanA* und *vanB* sind sich in ihrer Wirkungsweise ähnlich, sie unterscheiden sich jedoch unter anderem in der Regulation der Gene [16]. Auch *vanB* führt zur Bildung eines D-Ala-D-Lac Peptidoglykan-Rests und somit zu einer geringeren Affinität gegenüber Vancomycin [18].

VanC kann als chromosomales Gen (wie auch *vanD*, *vanE* und *vanG*) nicht auf andere Bakterien übertragen werden. Es kommt vor allem bei *E. gallinarum* (*vanC1*) und *E. casseliflavus* (*vanC2/3*) vor und ist mit einer intrinsischen Low-Level-Resistenz gegenüber Vancomycin (MHK = 2–32 µg/ml) assoziiert. Auch dieser Resistenztyp wirkt über eine Veränderung der Peptidoglykan-Vorstufe, jedoch wird hier im Gegensatz zu *vanA* und *vanB* ein D-Alanin-D-Serin-Rest synthetisiert. [2,18] In seltenen Fällen können *E. gallinarum*- und *E. casseliflavus*-Isolate neben ihrer intrinsischen Resistenz (*vanC*) auch die Resistenzgene *vanA* oder *vanB* aufnehmen und so hochgradig Vancomycin- (*vanB*) oder Vancomycin- und Teicoplanin-resistent (*vanA*) werden [2].

Die Resistenzgene *vanD* und *vanE* kommen hauptsächlich bei *E. faecalis*, aber nur selten bei *E. faecium* vor und werden daher nicht näher erläutert [2].

Da die untersuchten VRE-Isolate dieser Dissertation aus dem Zeitraum 2004 bis 2006 stammen, wird lediglich auf die bis 2006 bekannten Vancomycin-Resistenzgene *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* und *vanG* eingegangen. Eine Übersicht dieser Gene mit jeweiliger Resistenzart (intrinsisch oder extrinsisch), der MHK gegenüber Vancomycin und Teicoplanin, Genlokalisierung (auf Plasmid oder chromosomal, evtl. mit zugehörigem Transposon) und veränderter Bindestelle für Vancomycin zeigt Tabelle 2 nach Courvalin. [18]

Tabelle 2: Übersicht über die bis 2006 bekannten Vancomycin-Resistenzgene mit zugehöriger Resistenzart, minimaler Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Vancomycin (Vanco) und Teicoplanin (Teico) sowie der Genlokalisierung, dem mobilen Element und der modifizierten Vancomycin-Bindestelle (Peptidoglykan-Endung); (extr. = extrinsisch; intr. = intrinsisch; chrom. = chromosomal; D-Ala = D-Alanin; D-Lac = D-Lactat; D-Ser = D-Serin) nach Courvalin [18]

	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanG</i>	<i>vanE</i>	<i>vanC1/C2/C3</i>
Art der Resistenz	extr.	extr.	extr.	extr.	extr.	intr.
MHK Vanco [$\mu\text{g/ml}$]	64–100	4–1000	64–128	16	8–32	2–32
MHK Teico [$\mu\text{g/ml}$]	16–512	0,5–1	4–64	0,5	0,5	0,5–1
Mobiles Element	Tn1546	Tn1547/ Tn1549	-	-	-	-
Lokalisation	Plasmid/ chrom.	Plasmid/ chrom.	chrom.	chrom.	chrom.	chrom.
Peptidoglykan- Endung	D-Ala- D-Lac	D-Ala- D-Lac	D-Ala- D-Lac	D-Ala- D-Ser	D-Ala- D-Ser	D-Ala- D-Ser

Neuere Studien zeigen weitere Vancomycin-Resistenztypen: *VanL*, das erstmals im Jahr 2008 bei *E. faecalis* nachgewiesen wurde [21], produziert eine D-Ala-D-Ser-Endung wie auch *vanN*, das im Jahr 2011 identifiziert wurde [22]. *VanM* wurde im Jahr 2010 mit einem resultierenden D-Ala-D-Lac-Rest am Peptidoglykan gefunden [23].

1.2.4. Teicoplanin- und Linezolidresistenz

Bei Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken kann das Glykopeptid Teicoplanin als alternative Therapie verwendet werden. In manchen Fällen geht die Vancomycinresistenz jedoch mit einer Kreuzresistenz gegenüber Teicoplanin einher (z.B. bei *vanA*), sodass die Therapiemöglichkeiten stark eingeschränkt sind. Als wirksame Antibiotika stehen dann nur noch Linezolid, Daptomycin und Tigecyclin zur Verfügung. Eine weitere Alternative – Quinupristin/Dalfopristin – ist in Deutschland nicht mehr erhältlich. Bisher treten Resistenzen gegen diese Reserveantibiotika glücklicherweise selten auf, sie können sich jedoch während der Therapie mit selbigen bilden und möglicherweise in Zukunft zum Problem werden. [9]

1.3. Virulenzfaktoren

1.3.1. Enterococcal Surface Protein

Es gibt *E. faecium*-Stämme, die zwar eine Vancomycinresistenz aufweisen, aber dennoch nicht gehäuft zu klinischen Infektionen und VRE-Ausbrüchen führen. Deshalb wird vermutet, dass weitere genetische Faktoren ursächlich für die besondere Pathogenität mancher Enterokokkenstämme sind.

Das Enterococcal Surface Protein (codierendes Gen: *esp*) wurde zunächst in *E. faecalis* [24], später auch in *E. faecium* als Virulenzfaktor für pathogene Stämme nachgewiesen [25]. Die Funktion dieses Oberflächenproteins wurde vor allem für *E. faecalis* beschrieben. Es lagert sich in der Zellwand der Bakterien ein und steht mit erhöhter Infektiosität des Bakteriums [24], stärkerer Kolonisierung und längerer Persistenz bei Harnwegsinfekten [26,27] sowie der Adhäsion und Biofilm-Bildung an abiotischen Oberflächen [28,29] in Zusammenhang.

Obwohl sich die *esp*-Gensequenzen von *E. faecalis* und *E. faecium* zu 89% gleichen [30], wird vermutet, dass dieses Gen nicht von *E. faecalis* auf *E. faecium* übertragen wurde, sondern bei einigen *E. faecium*-Stämmen schon seit längerem bestand, unabhängig vom Erwerb der Ampicillin- oder Glykopeptidresistenzen [25,31]. Eine konjugative Übertragung des *esp*-Gens verschiedener Enterokokkenspezies untereinander wurde bisher nur *in vitro* nachgewiesen [32].

Einige Studien zeigten eine Häufung des *esp*-Gens bei Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten [25,33,34]. Andere hingegen konnten *esp* häufiger bei Vancomycin-sensiblen *E. faecium*-Stämmen nachweisen [35]. Insgesamt trat *esp* aber besonders häufig bei nosokomialen Infektionen und VRE-Ausbrüchen in Krankenhäusern auf [25,35]. Eine Erklärung für Ausbrüche dieser *E. faecium*-Stämme könnte die starke Adhärenz des Biofilms sein, da eine Übertragung der Keime in Krankenhäusern durch die längere Persistenz auf Oberflächen begünstigt wird.

Das *esp*-Gen ist chromosomal codiert und sowohl bei *E. faecalis* als auch bei *E. faecium* auf einer Pathogenitätsinsel lokalisiert [36,37]. Der Aufbau des Gens wurde schon im Jahr 1999 bei *E. faecalis* [24] und später auch bei *E. faecium* [30,36] untersucht. Es besteht aus einem N-Terminus, einer zwischenliegenden Repeat-

Region mit den Abschnitten A, B und C sowie einem T-Terminus. Repeats sind innergenische Wiederholungen derselben Gensequenz, die in verschiedenen Bakterienstämmen in unterschiedlicher Anzahl auftreten können. Auch der N- und T-Terminus des Gens können in ihrer Basenfolge variieren. [36] In dieser Arbeit wurde für die epidemiologische Analytik von *E. faecium*-Isolaten die Anzahl der Repeats des Abschnitts A untersucht. Abbildung 4 in Anlehnung an Leavis et al. stellt beispielhaft den Aufbau drei verschiedener *esp*-Varianten von *E. faecium* mit unterschiedlichen Termini und variablen repetitiven Mustern dar [36]

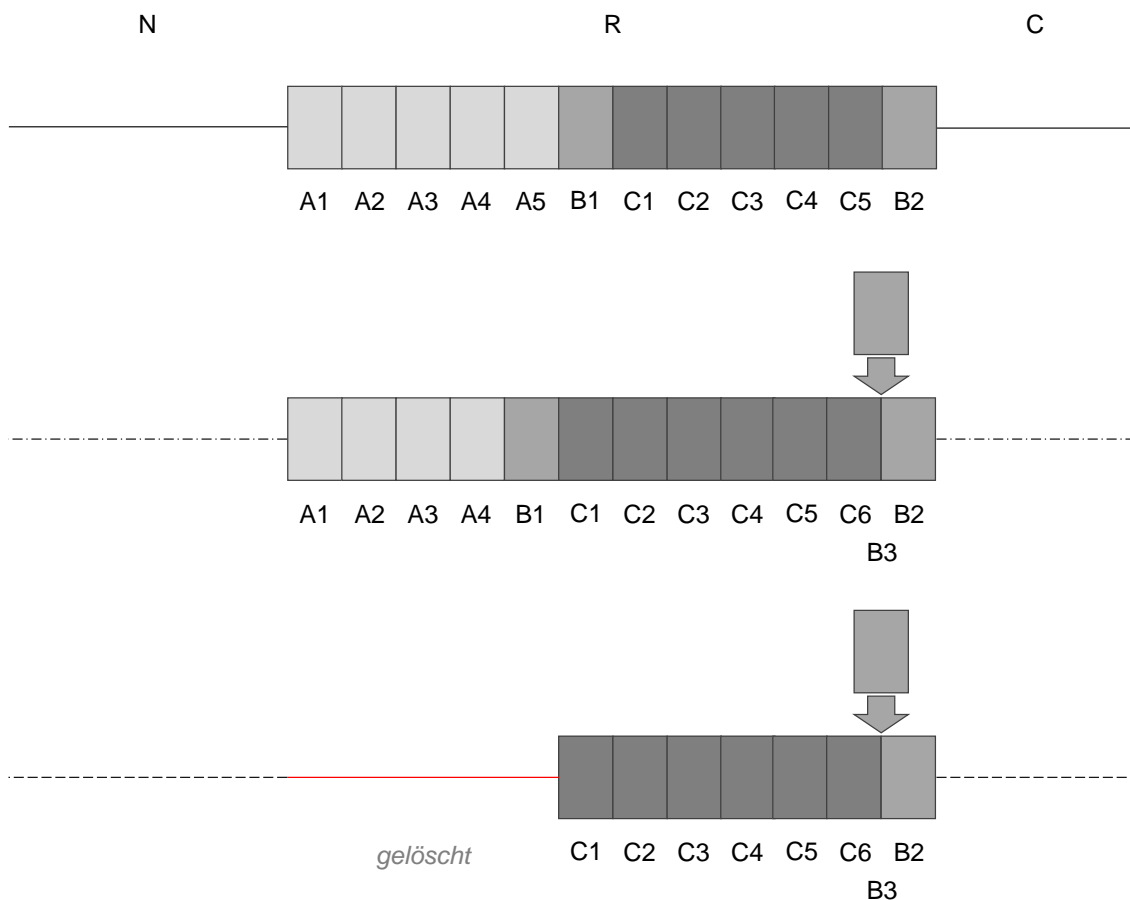


Abbildung 4: Darstellung verschiedener *esp*-Varianten mit N-(N) und C-Terminus (C) sowie der Repeat-Region (R) mit variablen Wiederholungen der Abschnitte A, B und C; in Anlehnung an Leavis et al. [36]

Neben Enterokokken können auch andere pathogene Keime wie *Streptococcus* (*S.*) *pyogenes*, *S. agalacticae* oder *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* ähnlich aufgebaute Virulenzfaktoren aufweisen, die ihnen eine protektive Immunität verleihen [36].

1.3.2. Hyaluronidase

Ein weiterer wichtiger Virulenzmarker bei *E. faecium* ist das *hyl*-Gen. Lange wurde angenommen, dass dieses Gen eine Hyaluronidase codiert. Hyaluronidasen dienen vielen anderen gramnegativen und grampositiven Bakterien, unter anderem *S. pyogenes* und *S. aureus*, als Virulenzfaktor, da diese Enzyme Hyaluronsäure spalten und somit die Permeabilität für Bakterien im Gewebe erhöhen können [38].

Das *hyl*-Gen scheint ebenso wie das *esp*-Gen für eine erhöhte Virulenz verantwortlich zu sein, da es vornehmlich bei Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten klinischen Ursprungs gefunden wird [34].

Hyl ist, neben anderen bisher kaum erforschten Genen, auf einem großen Plasmid lokalisiert und kann im konjugativen Cotransfer mit Vancomycinresistenzen von einem *E. faecium*-Stamm auf den anderen übertragen werden [39]. Mit diesem Plasmid wurde sowohl eine höhere Kolonisierung des Gastrointestinaltrakts bei Mäusen [40] als auch die Pathogenese einer experimentellen Peritonitis bei Mäusen in Verbindung gebracht [39].

Später wurde beschrieben, dass nicht das *hyl*-Gen für letzteren Effekt ursächlich ist, sondern vermutlich andere unerforschte Gene dieses Plasmids. Zudem hat sich die ursprüngliche Bezeichnung des *hyl*-Gens nicht bestätigt. Das Vorliegen dieses Gens führt bei *E. faecium* nicht zu einer nachgewiesenen Hyaluronidaseaktivität. Daher codiert es wahrscheinlich für ein anderes Enzym aus der Familie der Glykosidasen, nicht aber für eine Hyaluronidase. [41] Trotz der inkorrekten Bedeutung wurde diese Bezeichnung in vorliegender Arbeit wie auch in der Literatur zur einfacheren Verständlichkeit beibehalten.

Hyl ist demnach nicht als direkter Virulenzfaktor zu sehen, kann aber dennoch als indirekter Marker zum Nachweis eines großen virulenten Plasmids genutzt werden.

1.4. Klonaler Komplex 17 (CC17)

Bei der molekularbiologischen Untersuchung vieler *E. faecium*-Isolate mittels Multilokus-Sequenz-Typisierung (s. Abschnitt 1.5.3) stellte sich im Laufe der Zeit eine genetische Linie von *E. faecium*-Stämmen heraus, die besonders häufig zu klinischen Infektionen und Krankenhausausbrüchen führt. Dieser klonale Komplex 17 (CC17) zeichnet sich durch eine hochgradige Ampicillinresistenz, eine Pathogenitätsinsel und der Assoziation mit VRE-Ausbrüchen in Krankenhäusern aus. [42]

Häufig weisen diese Stämme eine Vancomycinresistenz sowie die Virulenzgene *esp* und *hyl* auf, sie können aber auch ohne diese Merkmale gefunden werden. [43] Heute sind CC17-*E. faecium*-Stämme in deutschen Kliniken weit verbreitet und führen immer wieder zu Ausbrüchen VRE-resistenter Enterokokken [2].

1.5. Epidemiologische Typisierungsmethoden

1.5.1. Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE)

Um die Ausbreitung verschiedener Subtypen der Enterokokken wissenschaftlich zu untersuchen, können mehrere epidemiologische Typisierungsmethoden angewandt werden. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die momentan verfügbaren Testverfahren gegeben.

Die Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine Methode zur Typisierung des bakteriellen Genoms. Dabei werden Restriktionsenzyme eingesetzt, um die chromosomale DNA in große Fragmente zu zerteilen. Diese werden dann durch ein ständig umgepoltes (pulsierendes) elektrisches Feld im Agarosegel nach Größe getrennt. Je nach entstehendem Bandenmuster, können Bakterienisolate gemeinsamen Stämmen zugeordnet werden. Nachteilig bei dieser Technik ist jedoch, dass zwischen den verschiedenen Labors, und somit auch in der Literatur, kaum ein Austausch der Daten möglich ist, da die Ergebnisse stark von den jeweiligen Laborbedingungen abhängig sind. [44]

1.5.2. Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)

AFLP ist die Abkürzung für Amplified Fragment-Length Polymorphism. Auch bei dieser Methode wird die DNA mittels Restriktionsenzymen zerschnitten. Einzelne wichtige Fragmente werden jedoch erst durch Polymerase-Kettenreaktionen (siehe unten) amplifiziert, also vervielfältigt, bevor sie in einem Elektrophoresegel nach Größe aufgetrennt werden. [45] Die Resultate der AFLP-Methode sind ebenso wie bei der PFGE nicht laborunabhängig reproduzierbar [46].

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zum Nachweis kleinster Mengen DNA durch Vervielfältigung (= Amplifikation). Dabei werden 20–40 Zyklen mit je drei Schritten durchgeführt: [47]

1. Denaturierung: Auftrennung der Matrizen-DNA in Einzelstränge bei ca. 95°C
2. Annealing (= Hybridisierung): Anlagerung von erregerspezifischen Primern an den jeweils komplementären DNA-Einzelstrang bei ca. 40°C bis 70°C
3. DNA-Synthese: Verlängerung der Primer zur Synthese eines neuen DNA-Doppelstranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei ca. 70°C

1.5.3. Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Eine Methode, die laborunabhängig durch elektronischen Datenaustausch für die internationale Forschung zur epidemiologischen Typisierung verwendet werden kann, ist die Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST). Für die Analyse von *E. faecium*-Isolaten werden dabei sieben verschiedene Loci des bakteriellen Genoms mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Variabilität der sogenannten „house-keeping“-Gene (Haushaltsgene) – also Genen, die das Bakterium für essentielle Stoffwechselforgänge benötigt – wird als Unterscheidungsmerkmal verwendet. Anhand von Online-Datenbanken können die Gensequenzen bekannten Allelen zugeordnet werden. Dadurch entsteht ein siebenstelliges Zahlenprofil, welches wiederum typisch für einen bestimmten MLST-Sequenztypus (ST) ist. [48]

Dieses Verfahren wurde auch in der vorliegenden Dissertation angewandt.

1.5.4. Multi Locus Variable Number Of Tandem Repeats Analysis (MLVA)

Multi Locus Variable Number Of Tandem Repeats Analyse, auch MLVA genannt, untersucht die Epidemiologie von Bakterien anhand ihrer spezifischen Anzahl innergenischer Wiederholungen – Tandem Repeats (VNTR). Diese Repeat-Regionen werden mittels PCR amplifiziert und erzeugen unterschiedlich große spezifische Banden in der Gelelektrophorese. Dadurch können bestimmte Repeat-Anzahlen mehrerer Regionen einem Bakterienstamm als Unterscheidungskriterium zugeordnet werden. [44]

Diese Methode ist wie die MLSTypisierung laborunabhängig reproduzierbar, jedoch weniger diskriminativ: Mehrere unabhängige MLST- oder PFGE-Typen können demselben MLVA-Typus zugeordnet werden. MLVA ist deshalb für epidemiologische Forschung krankenhausessoziierter *E. faecium*-Stämme nicht geeignet. [49]

1.5.5. Whole Genome Sequencing (WGS)

Die genaue Analyse der kompletten Gensequenz des bakteriellen Genoms wird Whole Genome Sequencing (WGS) genannt. Aktuelle Studien zeigen, dass sich das WGS möglicherweise als neuer Goldstandard der molekularepidemiologischen Typisierung etablieren wird, da es höchst diskriminativ ist und sogar ein Vergleich mit bereits vorhandenen MLST-Daten früherer Jahre möglich ist [50,51]. Nachteilig ist jedoch, dass diese Methode noch vergleichsweise teuer und aufwendig ist. Für viele krankenhaushygienische Untersuchungen wie der epidemiologischen Analyse von Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten in dieser Arbeit ist das WGS nicht zwingend nötig. Deshalb wurde in dieser Arbeit die für diese Fragestellung ausreichend diskriminative MLSTypisierung verwendet.

1.6. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Am Universitätsklinikum Regensburg (UKR) konnte in den letzten 14 Jahren wie auch national eine deutliche Zunahme an VRE-Fällen beobachtet werden. Um eine weitere Verbreitung der VRE-Stämme zu verhindern, bedarf es genauen Kenntnissen über deren Ausbreitungswege. Daher ist es relevant, ob in den vergangenen Jahren eine vermehrte Übertragung von Resistenzgenen auf bisher sensible Enterokokken stattfand, ein häufiger epidemiologischer Wandel resistenter Stämme auftrat oder der Anstieg von VRE-Infektionen eher auf eine klonale bzw. polyklonale Ausbreitung einzelner Stämme zurückzuführen ist.

Das Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKR ist eine der wenigen Institutionen, die von Beginn des Auftretens der ersten klinikinternen VRE-Fälle an systematisch alle VRE-Erstnachweise asserviert und einer Stammsammlung hinzugefügt haben. Damit besteht eine wertvolle Sammlung an VRE-Isolaten, die eine Betrachtung der zeitlichen und örtlichen Häufung bestimmter Subtypen in einem Krankenhaus der Maximalversorgung ermöglicht und in Zusammenhang mit bisher vorliegenden Daten dazu beitragen kann, die Ausbreitung der VRE-Stämme besser zu verstehen.

Ziel dieser Dissertation ist es, die molekulare Epidemiologie von Vancomycin-resistenten Enterokokken am Universitätsklinikum Regensburg in den Jahren 2004 bis 2006 retrospektiv zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit stellt den Anfang mehrerer Dissertationen dieser Arbeitsgruppe dar, die die VRE-Isolate des UKR seit 2004 kumulativ analysieren werden. Durch eine MLSTypisierung von *E. faecium*-Isolaten aus der VRE-Stammsammlung des UKR soll die Dynamik und der Grad der Ausbreitung von distinkten MLST-Typen beschrieben werden, welche zusätzlich anhand von verschiedenen Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzgenen differenziert werden. Insbesondere wird dabei auf die regionale Prävalenz der Subtypen innerhalb der einzelnen Kliniken und Stationen des UKR eingegangen, aber auch stichprobenartig eingesendete Isolate externer Krankenhäuser aus dem Raum Regensburg werden betrachtet. Im Vergleich mit nationalen und internationalen Studien ermöglichen die Resultate dieser Arbeit Rückschlüsse auf die Verbreitung und Häufung verschiedener MLST-Sequenztypen in diesem Zeitraum. Nur durch genaue Kenntnisse der Epidemiologie ist eine Einschätzung der Pathogenität einzelner Stämme möglich, die zur Entwicklung effektiver Präventionsmaßnahmen nötig ist.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Nachstehende Materialübersicht zeigt Chemikalien, Puffer und Lösungen, Geräte, Gefäße, Verbrauchsmaterialien sowie Software, die für die Laborarbeit dieser Studie benötigt wurden.

Chemikalien

AmpliTaq Gold® DNA Polymerase with Buffer II & MgCl ₂	Life Technologies, Austin, USA
dNTP Set (100 mM)	Life Technologies, Austin, USA
Primer (50 µM) (s. Tabelle 3)	Metabion International AG, Planegg
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Universalagarose	Bio&SELL GmbH, Feucht
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na ₂ EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
BBL-Enterococcusel-Bouillon	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Columbia-Agarbase 10455	Merck KGaA, Darmstadt
Schafblut, defibriniert	Acila Dr. Weidner GmbH, Weiterstadt

Puffer und Lösungen

VRE-Bouillon	43 g BBL-Enterococcosel-Bouillon 8 µg/ml Vancomycin 1000 ml H ₂ O
1x TBE-Puffer	10,8 g Tris 5,5 g Borsäure 4 ml 0,5 M Na ₂ EDTA ad 1 l H ₂ O
10x Loading Dye	250 mg Bromphenolblau 33 ml 150 mM Tris 60 ml Glycerol 7 ml H ₂ O
Columbia-Frischblut-Agar	40 g Columbia-Agarbase 1 l H ₂ O 8% Schafblut
Lambda DNA/Eco471 (Avall) Marker	Fermentas Life Sciences, Leon-Rot
O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Oligonukleotide

Tabelle 3: PCR-Primer (fwd = forward; rev = reverse)

Primer		Nukleotidsequenz 5' → 3'	Sequenzlänge der Amplifikate (bp)	Quelle
<i>vanA</i>	fwd	GG AGT AGC TAT CCC AGC ATT	377	Klare et al. [52]
	rev	TCT GCA ATA GAG ATA GCC GC		
<i>vanB</i>	fwd	GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT	298	
	rev	CAT CGC CGT CCC CGA ATT TCA AA		
<i>adK</i>	fwd	GAA CCT CAT TTT AAT GGG G	437	
	rev	TGA TGT TGA TAG CCA GAC G		
<i>atpA</i>	fwd	TTC AAA TGG CTC ATA CGG	556	
	rev	AGT TCA CGA TAA GCA ACA GC		
<i>ddl</i>	fwd	GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G	456–465	In Anlehnung an Homan et al. [48]
	rev	AAA AAG AAA TCG CAC CG		
<i>gdh</i>	fwd	GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT	530	
	rev	CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA		
<i>gyd</i>	fwd	CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C	395–398	
	rev	CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC		
<i>pstS</i>	fwd	TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G	583	
	rev	CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC		
<i>purK</i>	fwd	CAG ATT GGC ACA TTG AAA G	492	
	rev	TTC ATT CAC ATA TAG CCC G		
<i>espA</i>	fwd	CGA CCG ATT TAG CAG TAA C	s. Tabelle 9	Leavis et al. [36]
	rev	CAG CTG CGC TAA CAT CTA C		
<i>hyl</i>	fwd	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG	276	Vankerckhoven et al. [33]
	rev	GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA		

Geräte

Pipetman (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson Inc., Middleton, USA
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Research Pro (0,5–10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Repetman	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipet-Lite LTS (2–20 µl)	RAININ Instrument LLC, Oakland, USA
Transferpette -12 (20–200 µl)	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Dispensette S (10 ml)	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex-Schüttler	VELP Scientifica, Usmate Velate MB, Italien
MS1 Minishaker	IKA Works, Inc., Wilmington, USA
Tischzentrifuge	POLY-LABO, Straßburg, Frankreich
Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg
Waage	Gottl. KERN & Sohn GmbH, Albstadt
Moulinex Compact Mikrowelle	Krups GmbH, Frankfurt am Main
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research Inc., St. Bruno, Kanada
Veriti 96-Well Thermal Cycler	Life Technologies, Austin, USA
Agarose-Gelelektrophoresekammern	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Alphamager HP	ProteinSimple, San Jose, USA
Digital Graphic Printer	Sony, Tokio, Japan
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NucleoVac 96 Vacuum Manifold	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Kühlschrank MediLine (–4°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank MediLine (–20°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank Comfort (–20°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank Hera Freeze (–80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Ziegra Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Magnetrührer	IKA Works, Inc., Wilmington, USA

Gefäße

Laborglasflasche pressure plus	Schott Duran GmbH, Wertheim/Main
Erlenmeyerkolben (300 ml)	VWR International, Radnor, USA
Messzylinder (100 ml, 200 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Laborflasche mit Schraubverschluss (100 ml, 1000 ml)	VWR International, Radnor, USA

Verbrauchsmaterialien

Neo-Touch Gloves	Ansell Healthcare Europe, Brüssel, Belgien
Einmal-Impfösen	VWR International, Radnor, USA
Pipettenspitzen	
- Combitips advanced (1 ml, 2,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
- Biosphere Filter Tips (0,1–10 µl, 2–20 µl, 2–200 µl, 100–1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- SurPhob (100 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
- BioClean Universal Tips (10 µl)	RAININ Instrument LLC, Oakland, USA
Cups	
- Protein LoBind Tube (1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
- Mikro-Schraubröhre (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- PCR Cups SoftStrips (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Falcon Tubes	Corning Science, Mexico
Microbank Bacterial and Fungal Preservation System	Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada

NucleoFast 96 PRC Plates	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH Germany, Hilden
Microflex LT MALDI-TOF	Bruker Daltronik GmbH, Billerica, USA
Phoenix 100	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, USA

Software

Alphamager HP (3.4.0)	ProteinSimple
NanoDrop 1000 (3.8)	Nanodrop Technologies, Inc.
Gene Runner (4.0.9.63 Beta)	Frank Buquicchio and Michael Spruyt
Chromas Lite (2.1.1)	Technelysium Pty Ltd
Excel 2016	Microsoft

Labor

Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg

Homepage

www.pubmlst.org (Stand 10.11.2016)

2.2. VRE-Nachweis in den Jahren 2004 bis 2006

2.2.1. Übersicht über die Nachweismethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die eingefrorenen VRE-Isolate der VRE-Stammsammlung des UKR aus den Jahren 2004 bis 2006 aufgetaut. Unter der Annahme, dass es sich um *E. faecium*-Isolate handelte, wurden diese erneut im Labor spezifiziert und sowohl genetisch als auch phänotypisch auf verschiedene Resistenzen geprüft. Die damaligen VRE-Befunde – *E. faecium*, *vanA/B* und minimale Hemmkonzentration (MHK) – wurden dann mit den aktuellen Versuchsergebnissen der aufgetauten VRE-Isolate verglichen. Zusätzlich wurden weitere genetische Faktoren – *espA* und *hyl* – untersucht sowie eine MLSTypisierung durchgeführt.

Im Folgenden wird die Befundtechnik aus den Jahren des VRE-Nachweises von 2004 bis 2006 dargestellt.

Damals wurden zwei verschiedene Herangehensweisen verwendet, mit der ein VRE nachgewiesen werden konnte: VRE-Screening oder kultureller Nachweis. Beim VRE-Screening wurde das Probenmaterial in eine spezielle Bouillon eingerührt und gezielt auf Vancomycin-resistente Enterokokken getestet. Bei VRE-Verdacht erfolgten dann PCRs zur Speziesidentifizierung (*E. faecium*/ *E. faecalis*) und zur Untersuchung der Vancomycin-Resistenzgene (*vanA/B*) (s. Abschnitt 2.2.2). Die Spezies klinischer Isolate hingegen wurde biochemisch identifiziert (*E. faecium*/ *E. faecalis*/ *E. gallinarum*/ *E. casseliflavus*) und deren Antibiotikaresistenzen sowohl genetisch (*vanA/B*) als auch phänotypisch (MHK) ermittelt (s. Abschnitt 2.2.3).

Anschließend wurden die jeweiligen Materialien oder Isolate der Erstnachweise in die VRE-Stammsammlung des UKR überführt.

2.2.2. Screeningverfahren

2.2.2.1. Kriterien

Ein VRE-Screening wurde im UKR unter bestimmten Voraussetzungen durchgeführt. Dazu gehörte die stationäre Aufnahme von Patienten mit VRE-Anamnese oder die Untersuchung sogenannter Kontaktpatienten, die mit einem VRE-positiven Patienten das Zimmer geteilt hatten. Als Teil des Screenings für Multiresistente Erreger (MRE-Screening) vor Knochenmarkstransplantationen der Station 21 wurden ebenfalls Patienten mit einem Perianalabstrich auf VRE-Besiedlung getestet. Zusätzlich wurden im Falle eines VRE-Ausbruchs gegebenenfalls (ggf.) Patienten einer ganzen Station gescreent. Ein Ausbruch ist durch das Auftreten von mindestens zwei nosokomialen VRE-Fällen definiert, die in engem räumlichen und/oder zeitlichen Zusammenhang stehen (IfSG¹§23). Weitere VRE-Isolate aus dem Untersuchungszeitraum wurden von externen Krankenhäusern des Raumes Regensburg zur Diagnosesicherung an das Mikrobiologische Labor des UKR gesandt und dort asserviert.

2.2.2.2. VRE-Untersuchungsverfahren

Für das VRE-Screening wurden Rektal- oder Perianalabstriche mit einem sterilen Tupfer entnommen. Nach Einrühren in eine spezielle VRE-Bouillon wurde diese über Nacht bei 35°C bebrütet. Um Vancomycin-sensible Bakterien weitestgehend zu eliminieren, wurde die Bouillon mit 8 µg/ml Vancomycin versetzt. Das zusätzlich enthaltene Aesculin diente dem Nachweis von Enterokokken: Diese Bakterienspezies ist in der Lage Aesculin zu hydrolysieren, wodurch eine olivgrüne bis schwarze Färbung der Bouillon eintrat.

Wenn in der Bouillon kein Farbumschlag erfolgte, wurde erneut über Nacht bebrütet. Im Fall einer weiterhin ausbleibenden Färbung wurde das Testergebnis als negativ bewertet und die Untersuchung als VRE-negativ befundet.

¹ Infektionsschutzgesetz

Bei Schwarzfärbung wurde demnach angenommen, dass ein Vancomycin-resistenter Enterokokkus enthalten sein könnte.

Zur genaueren Untersuchung der verdächtigen Bouillon erfolgten PCR-Analysen zum Nachweis der beiden Enterokokken-Spezies *E. faecium* oder *E. faecalis* sowie der beiden Glykopeptid-Resistenzgene *vanA* und *vanB*. Bei einem negativen *vanA*- und *vanB*-Testergebnis erfolgte ggf. eine zusätzliche PCR-Untersuchung auf *vanC* und *vanD*.

Handelte es sich dabei um den ersten VRE-Nachweis dieses Patienten während des aktuellen Krankenhausaufenthalts, wurde ein Teil der Bouillon zur VRE-Stammsammlung hinzugefügt und bei -80°C eingefroren (s. Abbildung 5).

VRE-Screening

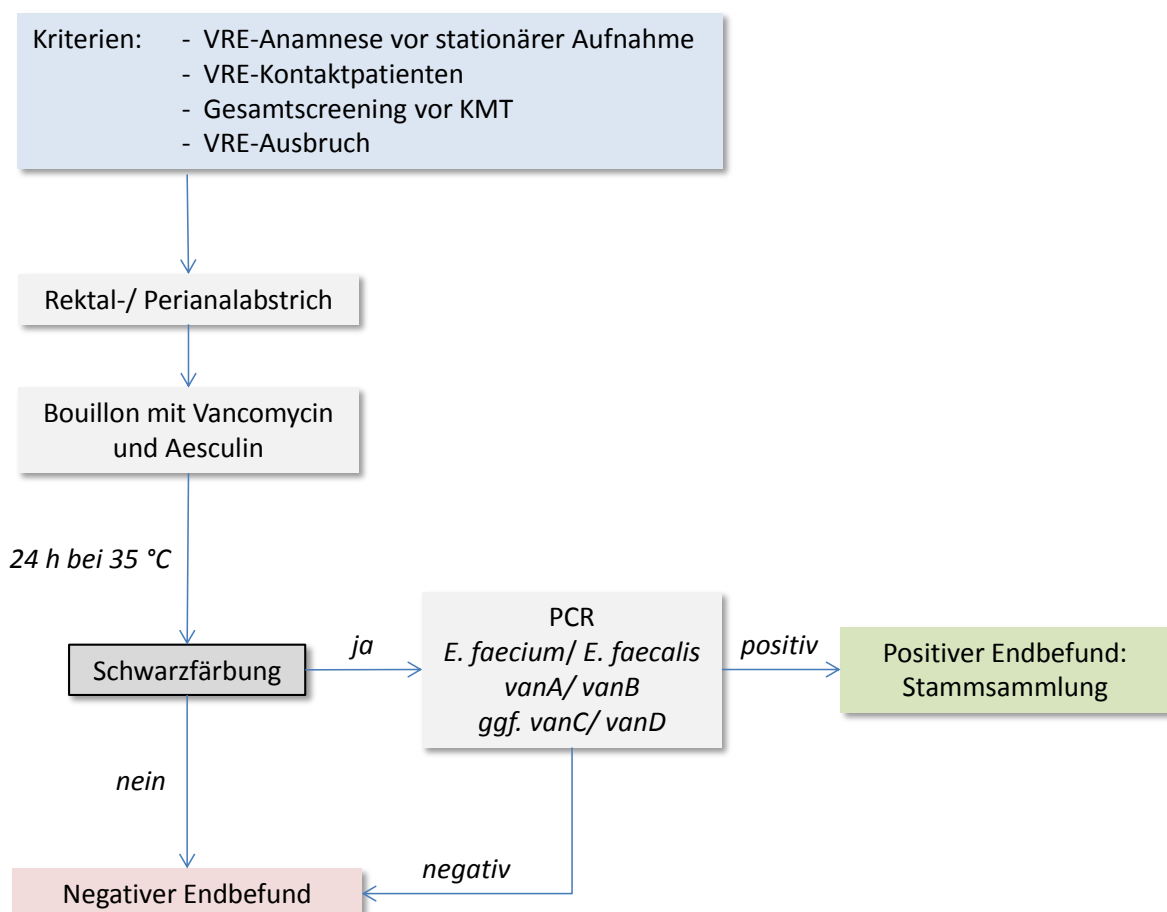


Abbildung 5: Schema zum Ablauf des VRE-Screenings am UKR; (KMT = Knochenmarkstransplantation)

2.2.3. Kultureller VRE-Nachweis

Neben eben dargelegtem Screeningverfahren wurde ein VRE auch im Rahmen der klinisch-mikrobiologischen Untersuchung von Patientenproben kulturell diagnostiziert. Bei Verdacht auf das Vorliegen einer Infektionserkrankung wurden dem Patienten Untersuchungsproben zum Erregernachweis entnommen. Falls bei der Kultivierung das Wachstum von Enterokokken vermutet wurde, erfolgte eine biochemische Keimidentifizierung mittels BD Phoenix zur Bestimmung der genauen Spezies. Zusätzlich erfolgte eine Resistenztestung gegenüber verschiedenen Antibiotika mit der Agardiffusion (Plättchentest) oder dem Mikrobouillonverfahren (BD Phoenix). Diese Methoden wurden nach den Richtlinien der amerikanischen Norm für Resistenztestung des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) durchgeführt, die zum damaligen Zeitpunkt gültig waren. Die Einteilung der Ergebnisse der Tests erfolgte gemäß den gültigen MHK-Breakpoints in resistent (R), intermediär (I) und sensibel (S).

Bei Nachweis eines gegenüber Vancomycin intermediären oder resistenten Enterokokkus erfolgte eine genaue Bestimmung der MHK. Dazu wurde ein Gradientendiffusionstest durchgeführt: Beim Epsilometertest (E-test) wird ein Streifen mit abnehmenden Antibiotikakonzentrationen auf die Bakterienkultur gelegt. Der Schnittpunkt des bakteriellen Hemmhofes mit der aufgedruckten Konzentrationskala wird dann als MHK-Wert abgelesen.

Die genetische Ausprägung der Glykopeptidresistenz wurde – analog zum Screening – anhand einer PCR mit den Primern für das *vanA*- und *vanB*-Gen und bei negativem *vanA/B*-Ergebnis teilweise auch für das *vanC*- und *vanD*-Gen ermittelt.

Im Falle eines positiven VRE-Endbefundes wurde das vollständig identifizierte und differenzierte Isolat bei -80°C in der Stammsammlung des UKR eingefroren (s. Abbildung 6).

VRE in Routinekultur

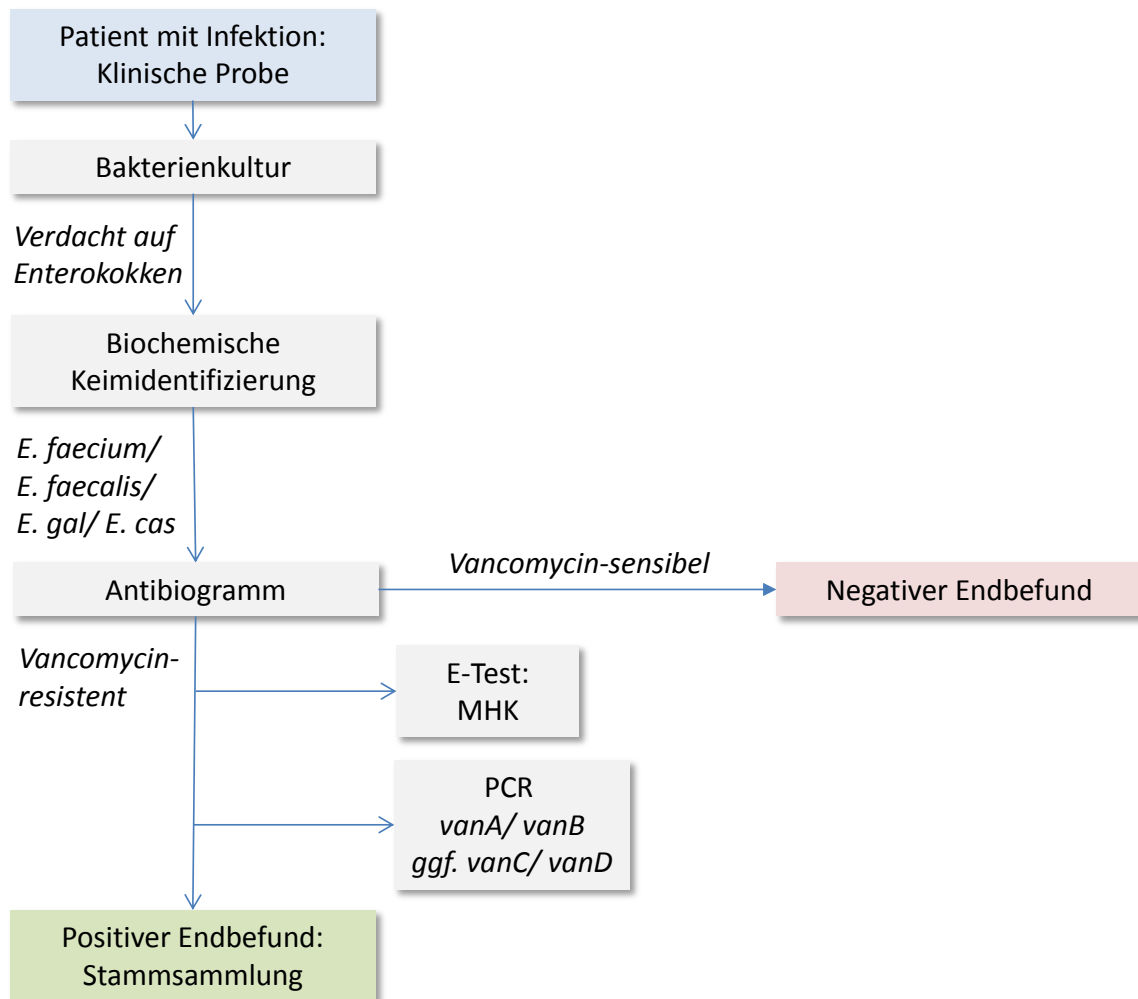


Abbildung 6: Schema zum Ablauf des kulturellen VRE-Nachweises am UKR (*E. gal* = *E. gallinarum*; *E. cas* = *E. casseliflavus*)

2.3. Laboranalysen im Jahr 2016

2.3.1. VRE-Bouillon und Bakterienkultur

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten VRE-Isolate wurden in den Jahren 2004 bis 2006 mit den oben beschriebenen Testmethoden nachgewiesen und zur VRE-Stammsammlung des UKR hinzugefügt. Zur weiteren molekularbiologischen Differenzierung wurden diese Isolate im Jahr 2016 aufgetaut und mit den nachstehenden Verfahren untersucht.

Aus den VRE-Bouillons der VRE-Screenings mussten zunächst Einzelkolonien isoliert werden. Die Abimpfungen wurden dafür in eine spezielle Bouillon übertragen, die auch beim ursprünglichem VRE-Screening Verwendung fand. Diese wurde über Nacht bei 35°C bebrütet und am folgenden Tag auf typisches Wachstum geprüft. Bei vorhandener Schwarzfärbung der Bouillon erfolgte eine Abimpfung auf eine Columbia-Blutplatte.

Die VRE-Isolate aus der kulturellen Nachweismethode wurden direkt auf eine Columbia-Blutplatte ausgestrichen.

Beim Auftreten mehrerer verschiedener Keime oder zu hoher Dichte wurde erneut ausgestrichen und bebrütet bis eindeutige Einzelkolonien vorlagen.

2.3.2. Keimidentifizierung und MHK-Bestimmung

Die Identifizierung der Enterokokkenspezies erfolgte mittels MALDI-TOF-Technologie. Bei dieser Methode werden Proteine des Bakteriums zunächst durch Laserbeschuss ionisiert (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization: MALDI) und anschließend mittels Massenspektroskopie anhand ihrer Flugzeit (Time of Flight: TOF) analysiert. Durch Abgleich der gewonnenen Profile mit einer hinterlegten Datenbank können die Bakterien auf Speziesebene bestimmt werden.

Durch ein automatisiertes Mikrodilutionsverfahren (BD Phoenix) wurde die MHK der Enterokokken bestimmt. Für die Empfindlichkeitstestung der drei untersuchten Antibiotika Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid wurden Interpretationskriterien der

aktuellen CLSI-Richtlinien (2015) verwendet, die in Tabelle 4 dargestellt sind. Für die Auswertungen dieser Arbeit wurden intermediäre Isolate als resistent gewertet.

Tabelle 4: Interpretationskriterien der Empfindlichkeitstestung für Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid nach den CLSI-Richtlinien für Enterokokken (Stand Jan. 2015; MHK = minimale Hemmkonzentration) [53]

	MHK [$\mu\text{g/ml}$]		
	Sensibel	Intermediär	Resistent
Vancomycin	≤ 4	8–16	≥ 32
Teicoplanin	≤ 8	16	≥ 32
Linezolid	≤ 2	4	≥ 8

In dieser Dissertation sollte die Ausbreitung distinkter Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Stämme am UKR und im Raum Regensburg von 2004 bis 2006 mittels molekularepidemiologischer Typisierungsverfahren untersucht werden. Zum Einsatz kamen Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) sowie weitere Analysen zur Verteilung von Vancomycin-Resistenzgenen (*vanA* und *vanB*) und den pathogenitätsassoziierten Genen *esp* und *hyl*.

Die folgenden Typisierungen berücksichtigen daher nur Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate, nicht jedoch weitere VRE-Isolate anderer Enterokokkenspezies – *E. faecalis*, *E. gallinarum* oder *E. casseliflavus*.

2.3.3. DNA-Isolierung

Für die molekulargenetischen Untersuchungen der *E. faecium*-Isolate wurde die bakterielle DNA mittels QIAamp DNA Mini Kit isoliert.

Aliquots der DNA-Lösung wurden in mehreren separaten Cups in einem Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Diese Trennung erfolgte, um bei unklaren PCR-Ergebnissen eine spätere Testwiederholung mit einem bisher ungeöffneten DNA-Aliquot ohne Kontamination zu ermöglichen.

2.3.4. PCR zur molekularbiologischen Typisierung der *E. faecium*-Isolate

2.3.4.1. *vanA*- und *vanB*-PCR

Bei allen *E. faecium*-Isolaten wurden im Rahmen dieser Dissertation zehn verschiedene PCR-Analysen durchgeführt: eine Multiplex-PCR für die Resistenzgene *vanA/B*, sieben PCRs zur MLSTypisierung und zwei PCRs zur Detektion der Virulenzmarker *esp* und *hyl*. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Zunächst wurde die Enterokokken-DNA erneut auf die Vancomycin-Resistenzgene *vanA* und *vanB* untersucht, um die Ergebnisse der früheren Befunde zu überprüfen. Durch den gleichzeitigen Einsatz beider Primerpaare konnte im Rahmen einer Multiplex-PCR das Vorliegen beider Resistenzgene in einem PCR-Durchlauf getestet werden. Dabei konnte ein Stamm entweder keines oder nur eines der Resistenzgene aufweisen. In seltenen Fällen konnten auch positive PCR-Ergebnisse für beide Vancomycin-Resistenzgene gefunden werden. Die für die Multiplex-PCR verwendeten Primerpaare wurden nach Klare et al. ausgewählt [52].

2.3.4.2. MLST-PCR

Bei jedem *E. faecium*-Isolat wurde anhand von sieben Sequenz-Analysen eine MLSTypisierung durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle 3 dargestellten Primer in Anlehnung an Homan et al. verwendet [48]. Mittels PCR wurden definierte Fragmente der Haushaltsgene Adenylatkinase (*adK*), ATP-Synthase, α -Untereinheit (*atpA*), D-Alanin-D-Alanin-Ligase (*ddl*), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*gdh*), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gyd*), Phosphat ATP-binding cassette Transporter (*pstS*) und Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase ATPase-Untereinheit (*purK*) amplifiziert. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Gene, die Anzahl der verschiedenen Allelvarianten und die Sequenzlänge der jeweiligen amplifizierten DNA-Abschnitte. Die Werte wurden der Datenbank www.pubmlst.org entnommen (Stand 08.02.17).

Tabelle 5: Genname, Anzahl der verschiedenen Allelvarianten und Sequenzlänge der MLST-Gene (bp = Basenpaare)

Gen	Produkt	Allele	Sequenzlänge (bp)
<i>adK</i>	Adenylatkinase	49	437
<i>atpA</i>	ATP-Synthase, α -Untereinheit	100	556
<i>ddl</i>	D-Alanin-D-Alanin-Ligase	91	456–465
<i>gdh</i>	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	82	530
<i>gyd</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	52	395–398
<i>pstS</i>	Phosphat ATP-binding cassette Transporter	122	583
<i>purK</i>	Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase ATPase-Untereinheit	96	492

Die Amplifikate wurden bewusst etwas größer als der zur MLSTypisierung erforderliche Genabschnitt gewählt, da die Sequenziererergebnisse am Anfang und Ende des DNA-Abschnitts oft schlecht lesbar sind. Dadurch konnte ein genaueres Sequenziererergebnis erzielt werden.

Nach einer Sequenzierung der Amplifikate durch die Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH konnten die amplifizierten Genabschnitte mit Hilfe von www.pubmlst.org einzelnen Allelvarianten und der numerische Code der sieben Allelvarianten zusammen einem MLST-Typ zugeordnet werden. Für genauere Erläuterungen zu Aufreinigung, Sequenzierung und Auswertung siehe Abschnitt 2.3.7 und 2.3.8.

2.3.4.3. Nachweis von Enterococcal Surface Protein (*esp*) und Hyaluronidase (*hyl*)

Der Nachweis der beiden Virulenzmarker, Enterococcal Surface Protein (*esp*) und Hyaluronidase (*hyl*), erfolgte ebenfalls über eine PCR-Amplifikation eines definierten Genabschnitts.

Die Auswertung des *esp*-Amplifikate wurde dabei nach der Anzahl innergenischer Duplikationen von Gensequenzen, sogenannten internen Repeats des Abschnitts A analog zu Leavis et al. durchgeführt [36] (s. Tabelle 9).

Die Amplifikation des *hyl*-Gens erfolgte mit einem Primerpaar, das nur die Anwesenheit oder Abwesenheit des *hyl*-Gens qualitativ nachweisen sollte. Jedes negative PCR-Ergebnis wurde zur Kontrolle einmal wiederholt und dadurch bestätigt.

2.3.5. Reagenzien und Amplifikationsbedingungen

Die Durchführung der Reaktionen erforderte einen PCR-Ansatz bestehend aus 24 μ l Mastermix und 1 μ l bakterieller DNA. Amplitaq Gold, 10x Puffer und $MgCl_2$ wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die jeweiligen Primer (s. Tabelle 3) wurden mit sterilem Wasser zu einer 10 μ M-Lösung und die dNTPs zu einer 10 mM-Lösung verdünnt. Die Herstellung des Mastermixes erfolgte nach den Angaben der Tabelle 6 in einem 1,5 ml Cup.

Tabelle 6: Ansatz für eine PCR (fwd = forward; rev = reverse)

	Volumen [μ l]
H ₂ O steril	17,8
10x Puffer (ohne $MgCl_2$)	2,5
$MgCl_2$	2
dNTPs (10 mM)	0,5
Primer fwd (10 μ M)	0,5
Primer rev (10 μ M)	0,5
Amplitaq Gold (5 U/ μ l)	0,2
DNA	1
Gesamt	25

Um mehrere DNAs parallel mit einem Primerpaar analysieren zu können, wurden die Mengen der Einzelkomponenten mit der jeweiligen DNA-Probenanzahl multipliziert (Mastermix). Nach Vermischung mittels Vortex-Rüttler wurde der Mastermix auf 0,2 ml PCR Cups verteilt und die jeweilige bakterielle DNA hinzu pipettiert. Zusätzlich wurde

bei jeder PCR-Untersuchung immer eine Negativkontrolle – mit 1 µl Wasser statt DNA – angesetzt. Für die korrekte Längenbestimmung der *esp*-Amplifikate und Auswertung der verschiedenen *esp*-Repeatmuster wurden aus Vorversuchen ermittelte *esp*-Repeats als standardisierte Längenmarker zur genauen Größenbestimmung verwendet. Auch bei der *vanA/B*-PCR wurde eine doppelt positive DNA als Positivkontrolle verwendet, um die entstandenen Amplifikatlängen später besser unterscheiden zu können.

Bevor die eigentliche PCR im Cycler erfolgte, wurde der Inhalt der Cups fünf Sekunden lang zentrifugiert.

Die drei Abschnitte einer PCR erforderten je nach untersuchtem Gen unterschiedliche Temperatur- und Zeitprofile: Denaturierung (Stage 1: 95°C), Primer-Hybridisierung (Stage 2: 55°C) und DNA-Synthese (Stage 3: 72°C).

Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurden die Cups mit den fertigen Amplifikaten im Cycler bis zur Entnahme bei 4°C gekühlt.

Das Cyclerprogramm 1 (s. Tabelle 7) wurde für die MLSTypisierung und den Nachweis der Gene *vanA*, *vanB* sowie *hyl* verwendet. Für die *espA*-Analyse wurde ein spezielles Zeit- und Temperaturprogramm verwendet (s. Tabelle 8):

Tabelle 7: Ablaufstadien des Cyclerprogramms 1 für die PCRs zum Nachweis der Gene *vanA*, *vanB* und *hyl* sowie zur MLSTypisierung; Darstellung von Temperatur- und Zeitverlauf

Programm 1	Temp. in °C	Zeit
Stage 1 (1x)	95	5 min
Stage 2 (36x)	94	30 s
	55	30 s
	72	30 s
Stage 3 (1x)	72	5 min
	4	∞

Tabelle 8: Ablaufstadien des Cyclerprogramms 2 zur Analyse der *espA*-Repeats; Darstellung von Temperatur- und Zeitverlauf

Programm 2	Temp. in °C	Zeit
Stage 1 (1x)	95	5 min
Stage 2 (36x)	94	50 s
	52	50 s
	72	1 min
Stage 3 (1x)	72	5 min
	4	∞

2.3.6. Gelelektrophorese und Fotodokumentation

Im Anschluss an die PCR wurde die amplifizierte DNA auf Agarosegele aufgetragen und das Ergebnis der Gelelektrophorese fotografisch dokumentiert.

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Trennung geladener Teilchen nach ihrer Größe. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld zur Anode und werden dabei im Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Vergleich mit einem Standard bekannter Länge können die analysierten Amplifikate ihrer Basengröße entsprechend identifiziert werden. Um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, muss dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zugefügt werden.

Zur Herstellung der Agarose-Gele wurde Tris-borat(TBE)-Puffer benötigt. Hierfür wurden 10,8 g Tris, 5,5 g Borsäure und 4 ml Na₂EDTA (0,5 M) mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von einem Liter aufgefüllt.

Für ein 1- bzw. 2-prozentiges Agarosegel wurden jeweils 60 ml TBE-Puffer und 0,6 g bzw. 1,2 g Universalagarose unter Erwärmung in der Mikrowelle vermischt. Dem flüssigen Gel wurden dann 200 µl Ethidiumbromid (c = 0,25 mg/ml) hinzugefügt. Nach dem Einfüllen in Elektrophoresekammern und Erkalten der Gele wurden diese mit TBE-Puffer bedeckt.

Anschließend wurden auf einer Kunststoffplatte je 9 µl DNA mit 1 µl Loading Dye vermischt und in eine Geltasche pipettiert. Loading Dye sorgte dabei für die

Visualisierung der DNA während des Auftragens und für ein gleichmäßiges Absinken im Gel. Seine Herstellung erfolgte aus 250 mg Bromphenolblau, 33 ml 150 mM Tris, 60 ml Glycerol und 7 ml H₂O.

Drei verschiedene DNA-Längenstandards wurden als Referenz benutzt: Lambda DNA/Eco471 (AvalI) Marker für die *espA*-, 100 bp DNA Ladder für die *vanA/B*- sowie 1 kb Plus DNA Ladder für die MLST- und *hyl*-Amplifikate. Bei allen Gelen wurde zudem eine Negativkontrolle sowie im Fall von *vanA/B* und *espA* jeweils eine PCR-spezifische Positivkontrolle pipettiert.

Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem Spannungsgeber PowerPac 300 bei 100 V für ca. 30 Minuten. Mit Hilfe des Geldokumentationssystems Alphamager HP konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Kriterien für eine erfolgreiche PCR waren eine korrekte Bande der Positivkontrolle und kein PCR-Produkt bei der Negativkontrolle. Im Fall der *espA*-PCR wurde bei Mehrfachbanden die größte Bande als korrektes Repeatmuster gewertet.

Die MLST-PCR Produkte wurden nicht mittels Gelelektrophorese ausgewertet, sondern lediglich als visuelle Kontrolle für die erfolgreiche Amplifikation aufgetragen, bevor sie für die spätere Sequenzierung aufgereinigt wurden. Zu erwartende Amplifikatlängen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Im Gegensatz dazu konnten die Ergebnisse der Nachweise von *vanA*, *vanB* und *hyl* sowie die Differenzierung der *espA*-Repeatmuster bereits an diesem Punkt dargestellt und ausgewertet werden.

Die Resistenzgene *vanA* und *vanB* konnten anhand der Sequenzlänge von 377 bp bzw. 298 bp identifiziert werden [52].

Der Nachweis des Virulenzmarkers *hyl* erfolgte durch ein spezifisches Amplifikat von 276 bp [33].

Die *esp*-Repeatmuster wurden anhand der Anzahl der Repeats in der Region A unterschieden (s. Tabelle 9). Die Größenunterschiede der Amplifikate resultierten aus der einfachen Länge eines A-Repeats von 252 bp [36].

Tabelle 9: *EspA*-Sequenzlänge und Repeatauswertung (bp = Basenpaare)

<i>espA</i>	
Größe (bp)	Anzahl Repeats
185	0
437	1
689	2
941	3
1193	4
1445	5
1697	6
1949	7
2201	8
2453	9
2705	10

Tabelle 10 zeigt eine Gesamtübersicht über die durchgeführten PCRs, zugehörige Cyclerprogramme, Standards, Amplifikatgrößen und verwendete Elektrophoresegele (1- oder 2-prozentig in Abhängigkeit der Größe der zu erwarteten Amplifikate).

Tabelle 10: Gesamtübersicht aller PCRs der untersuchten Gene mit Cyclerprogrammen, Prozentangaben der Elektrophoresegele, verwendetem Standard und der Gengröße in bp (100 bp = 100 bp DNA Ladder; 1 kbPlus = 1 kb Plus DNA Ladder; Eco 471 = Lambda DNA/Eco471 (Avall) Marker; bp = Basenpaare)

Gen	Cyclerprogramm	Gel [%]	Standard	Größe (bp)
<i>vanA/B</i>	1	2	100 bp	A: 377 B: 298
<i>adK</i>	1	1	1 kb Plus	437
<i>atpA</i>	1	1	1 kb Plus	556
<i>ddl</i>	1	1	1 kb Plus	456–465
<i>gdh</i>	1	1	1 kb Plus	530
<i>gyd</i>	1	1	1 kb Plus	395–398
<i>pstS</i>	1	1	1 kb Plus	583
<i>purK</i>	1	1	1 kb Plus	492
<i>espA</i>	2	1	Eco471	s. Tabelle 9
<i>hyl</i>	1	1	1 kb Plus	276

2.3.7. Aufreinigung und Sequenzierung der Amplifikate

Nach erfolgreicher PCR wurden die jeweiligen Amplifikate der MLSTypisierung mit weiteren 80 µl H₂O verdünnt. Die Aufreinigung der amplifizierten DNA erfolgte dann mittels NucleoFast[®]96 PCR Plates. Durch eine integrierte Filtermembran wurden während eines zehninütigen Vakuumschlusses dabei Primer, dNTPs und Salze entfernt. In den Wellplatten blieb aufgereinigte DNA zurück, die mit Zugabe von 40 µl H₂O wieder mobilisiert wurde. Um ein optimales Ergebnis bei der Sequenzierung zu erhalten, wurde zusätzlich der DNA-Gehalt [ng/µl] in den aufgereinigten Proben bestimmt. Die Messung wurde mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer durchgeführt. Nach Vorgabe des auswertenden Labors sollten hierfür jeweils 150–300 ng DNA sowie 1 µl Primer (10 mM) mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 8 µl aufgefüllt werden. Die fertigen Cups wurden dann an die Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH in Regensburg geschickt, welche die Sequenzen als digitale Datenfiles an das Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKR rückübermittelte.

2.3.8. Auswertung der Sequenzen

Die DNA-Sequenzen der Gene *adK*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS* und *purK* wurden im Programm Chromas Lite analysiert.

Für die Analyse des *pstS*-Gens mussten im Programm GeneRunner zwei Gensequenzen – eine mit forward- und eine mit reverse-Primer – zusammengesetzt werden, bevor eine ausreichende Länge zur Auswertung vorhanden war. Bei den restlichen sechs Genen war meist eine Sequenz mit dem reverse-Primer ausreichend.

Mittels der Internetplattform www.pubmlst.org (Stand 10.11.2016) erfolgte anschließend die MLST-Auswertung anhand der Sequenzdaten. Für die sieben untersuchten Gene sind in dieser Onlinedatenbank alle bekannten Sequenzvarianten unter einer bestimmten Allelnummer gespeichert. Zusammengefügt entstand demnach für jedes *E. faecium*-Isolat ein siebenstelliges Allelprofil, das einem distinkten Sequenztypus zugeordnet werden konnte.

Bei kleineren Abweichungen in der Basensequenz konnte eine Probe mit dem komplementären forward-Primer zur erneuten Analyse eingeschickt werden. Aus diesem Grund wurden die aufgereinigten DNA-Proben bis Abschluss der Sequenzauswertung gekühlt aufbewahrt. In seltenen Fällen waren größere Teile der Basenfolge nicht identifizierbar, sodass für diese Probe eine neue PCR durchgeführt werden musste. Alle Sequenzen waren letztlich auswertbar.

2.4. Patientendatenerhebung

2.4.1. Pseudonymisierung der Patientendaten

Zusätzlich zu den beschriebenen Laboranalysen der VRE-Isolate wurden im Rahmen dieser Arbeit die zugehörigen Patientendaten aus dem klinikinternen Laborinformationssystem (LIS) erhoben. Anhand einer Liste mit den jeweiligen Labornummern der eingefrorenen VRE-Proben wurde eine systematische Recherche der Anforderungsscheine und Originalbefunde durchgeführt. Die Ergebnisse wurden später nach verschiedenen Parametern ausgewertet.

Die Verschlüsselung der Patientendaten wurde wie folgt durchgeführt: Vom Vor- und Familiennamen wurde der jeweils dritte Buchstabe mit der Anzahl der Buchstaben kombiniert, wobei für mehr als neun Buchstaben eine Null eingetragen wurde. Im Fall von zusammengesetzten Namen wurde nur der erste Namensteil berücksichtigt, Namenszusätze (z.B. Dr., von) hingegen wurden nicht gewertet. Umlaute wurden als zwei Buchstaben gezählt.

2.4.2. Tabelle und Spaltendaten

Die Gesamtergebnisse aller untersuchten Parameter wurden schließlich in einer Tabelle² verwaltet. Die Spalten enthielten eine interne Nummerierung der VRE-Stämme, Namens-Pseudonym, Geburtsmonat und -jahr sowie das Geschlecht des Patienten (m, w, unbekannt). Zusätzlich wurde das Befunddatum (Tag, Monat, Jahr) des ersten positiven VRE-Nachweises eingetragen.

Die Herkunft des Präparates wurde in Krankenhaus, Abteilung und Station unterteilt und anschließend einer Stationsart zugeordnet. Dabei wurde zwischen Intensivstation und Normalstation unterschieden. Außerdem wurden Material, Materialgruppe und Organ aufgelistet, aus dem die eingesendete Probe stammte. Mit dieser Kombination konnten die Proben dann verschiedenen Gruppen von klinischem Material zugeordnet werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurde die Zusammenfassung der klinischen Materialien analog der Einteilung des Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 durchgeführt [6] (für die genauen Zuordnungen zu den einzelnen Gruppen s. Abschnitt 3.10.2).

Des Weiteren wurden die Nachweismethoden in den Jahren 2004 bis 2006 in VRE-Screening mittels Bouillon oder VRE-Kultivierung unterteilt sowie die Besiedlungsform des Patienten mit VRE einer Kolonisierung oder einer möglichen Infektion zugeordnet.

Dem LIS wurden die Labordaten der Befunde aus den Jahren 2004 bis 2006 entnommen: die Enterokokkenspezies (*E. faecium* oder *E. faecalis*), der Nachweis der

² Programm Excel 2016, Microsoft

Gene *vanA*, *vanB* oder *vanC*, sowie das Ergebnis der Empfindlichkeitstestung und die MHK für Vancomycin und Teicoplanin, einschließlich der Resistenz-Bewertung für Linezolid.

Dem gegenüber gestellt wurden die korrespondierenden Parameter, die im Jahr 2016 nach dem Auftauen der Bakterienstämme mittels MALDI-TOF, BD Phoenix und verschiedenen PCRs in dieser Arbeit untersucht wurden. Weitere Spalten dienen dem Vergleich der Ergebnisse der Originalbefunde mit den Ergebnissen der erneuten Testungen dieser Arbeit: Spezies identisch, *vanA/B* identisch und MHK-Bewertungen identisch.

Zuletzt wurden die Ergebnisse der durchgeführten MLSTypisierung (*adK*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS*, *purK* und Sequenztyp), des *hyl*-Nachweises und die Anzahl der *espA*-Repeats in die Gesamttabelle eingefügt.

Die Auswertung einzelner Parameter erfolgte durch eine Filterauswahl in den entsprechenden Spalten der Tabelle. Grafiken und Diagramme wurden ebenfalls erstellt³.

Der größte Anteil der VRE-Daten stammte aus dem Universitätsklinikum Regensburg. Diese Daten wurden für viele Faktoren zusätzlich separat untersucht. Die neun externen Krankenhäuser hatten lediglich Stichproben der VRE-Nachweise zur Bestätigung an das Mikrobiologische Labor des UKR gesendet. In diesen Kliniken erfolgte demnach keine systematische Dokumentation der Erstdiagnose, weshalb die epidemiologischen Daten für VRE-Isolate der externen Kliniken nur eingeschränkt aussagekräftig sind. Aus diesem Grund wurden bei den meisten Auswertungen die Ergebnisse aller untersuchten Isolate mit den Ergebnissen der systematisch eingefrorenen Isolate des UKR verglichen.

³ Programm Excel 2016, Microsoft

3. Resultate

3.1. Übersicht über VRE-Fälle

Ausgangssituation dieser Arbeit war die Einfrierliste der VRE-Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie des UKR. In der Annahme, dass es sich bei fehlendem Hinweis auf *E. faecalis*, *E. gallinarum* oder *E. casseliflavus* um ein *E. faecium*-Isolate handelte, konnten für die Jahre 2004 bis 2006 nach systematischer Recherche 53 VRE-Stämme von 51 verschiedenen Patienten aufgetaut und analysiert werden. Davon stammten 24 VRE-Isolate aus dem UKR und 29 aus neun weiteren Krankenhäusern des Großraumes Regensburg.

In Abbildung 7 ist die Anzahl der VRE-Eingänge im untersuchten Zeitraum für alle untersuchten Krankenhäuser ($n = 53$) bzw. die Anzahl der VRE-Eingänge des UKR ($n = 24$) dargestellt. Zudem ist die Zahl der davon im Jahr 2016 als *E. faecium* diagnostizierten und weiter typisierten Isolate ($n = 47$ bzw. $n = 23$) erkennbar (s. auch Abbildung 22). In zwei Fällen waren jeweils zwei Isolate von einem Patienten enthalten. Eines davon war ein Doppelisolat des gleichen Sequenztypus und wurde für die weiteren Untersuchungen nur einmal gewertet ($n = 46$; in Abbildung 7 als „ohne Doppelisolat“ bezeichnet). Beim zweiten Patienten wurden zwei verschiedene Sequenztypen isoliert, weshalb im weiteren Verlauf immer beide Isolate mit einbezogen wurden. Für eine genaue Darstellung der Mehrfachisolate s. Abschnitt 3.11.

Lediglich für die Darstellung der Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten wurde unabhängig von den Mehrfachnachweisen jeder Patient nur einmal gewertet ($n = 45$ bzw. $n = 22$; in Abbildung 7 als „Einzelnachweise“ bezeichnet).

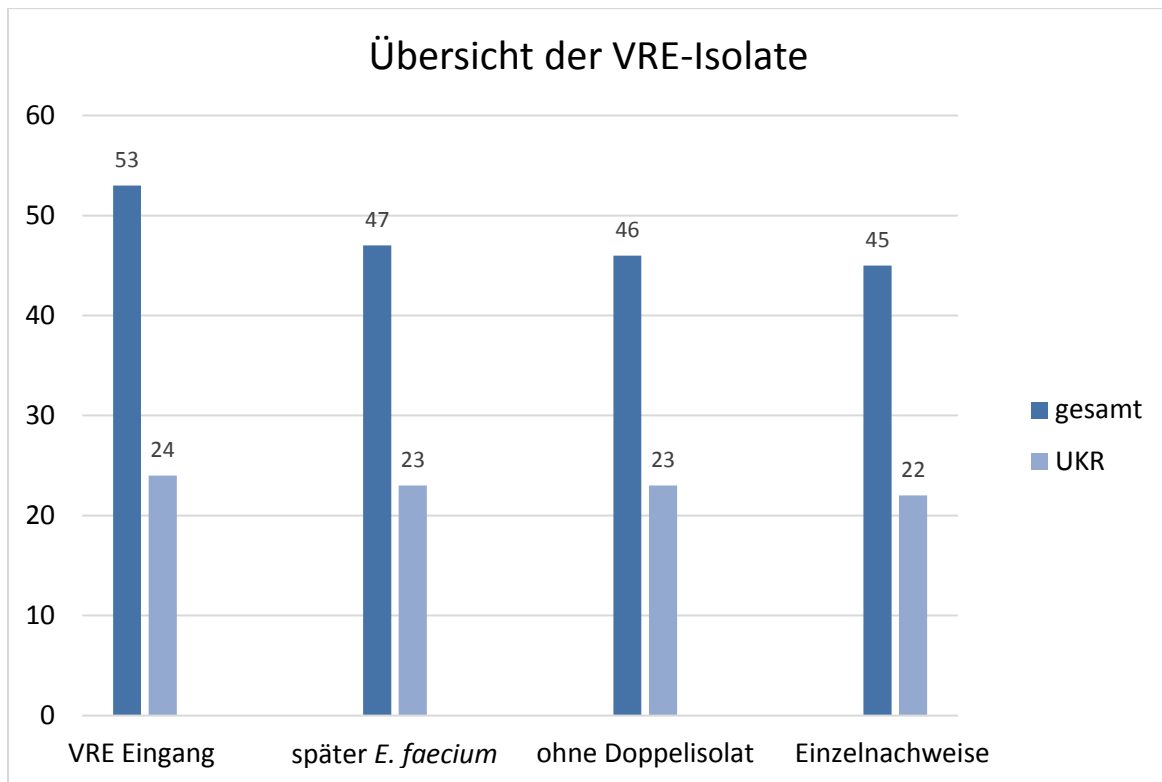


Abbildung 7: Übersicht über die untersuchten VRE-Isolate: VRE-Gesamtzahl beim Eingang der Isolate in den Jahren 2004–2006, davon später (2016) als *E. faecium* identifiziert, Anzahl der *E. faecium*-Isolate ohne Doppelnachweis (des gleichen Sequenztypus bei demselben Patienten) und Anzahl der *E. faecium*-Einzelnachweise der Patienten; Jeweils Gesamtzahl der VRE-Isolate aller eingeschlossenen Krankenhäuser (gesamt) bzw. des UKR

3.2. Alter und Geschlecht der Patienten

Für die Geschlechts- und Altersverteilung wurde die Gesamtzahl an *E. faecium*-Isolaten verwendet und jeder Patient nur einmal gewertet: 45 Gesamtisolate und 22 Isolate aus dem UKR. Mit 23 weiblichen und 22 männlichen Personen war das Geschlechterverhältnis ausgeglichen. Die *E. faecium*-Isolate des UKR stammten häufiger von männlichen ($n = 14$) als von weiblichen Personen ($n = 8$) (s. Abbildung 8 und Abbildung 9).



Abbildung 8: Geschlechterverteilung aller Patienten mit *E. faecium*-Fällen; Patientenwiederholungen nicht gewertet (gesamt: 45)

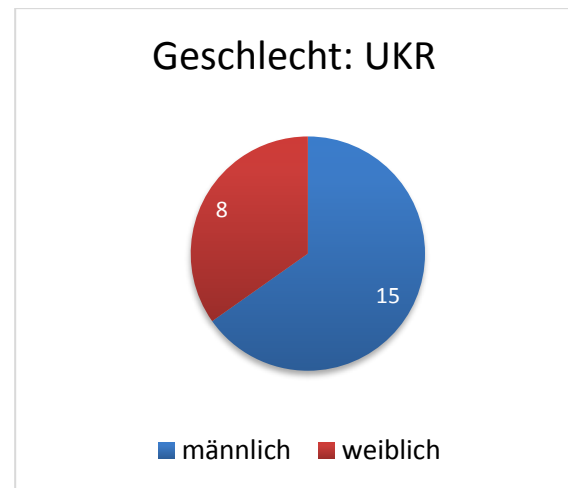


Abbildung 9: Geschlechterverteilung der Patienten mit *E. faecium*-Fällen im UKR; Patientenwiederholungen nicht gewertet (gesamt: 22)

Das Alter der Patienten wurde für den Zeitpunkt des VRE-Nachweises errechnet und einer von vier Gruppen zugeteilt (< 20 J., 20–40 J., 40–60 J., > 60 J.). Für die Gesamtheit der *E. faecium*-Isolate kann eine mit dem Alter steigende Tendenz der Fälle beobachtet werden (s. Abbildung 10). Auch bei den *E. faecium*-Nachweisen des UKR ist für die männlichen Patienten ein Anstieg der Fälle mit zunehmendem Alter erkennbar. Die Anzahl der *E. faecium*-Fälle bei Frauen stieg im UKR bis zum Alter von 60 Jahren an und sank bei den über 60-jährigen Patientinnen wieder (s. Abbildung 11).

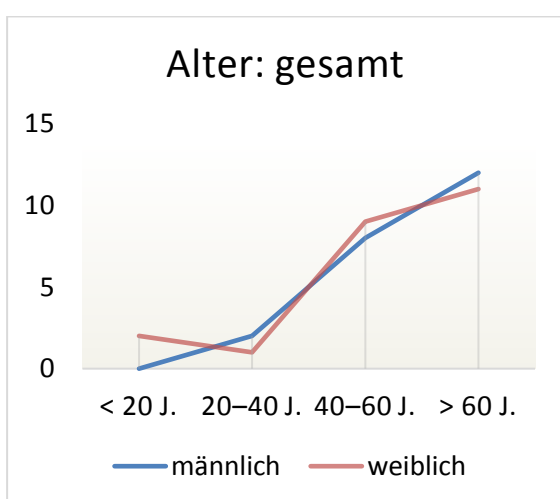


Abbildung 10: Altersverteilung aller Patienten mit *E. faecium*-Fällen (gesamt: 45; J. = Jahre)

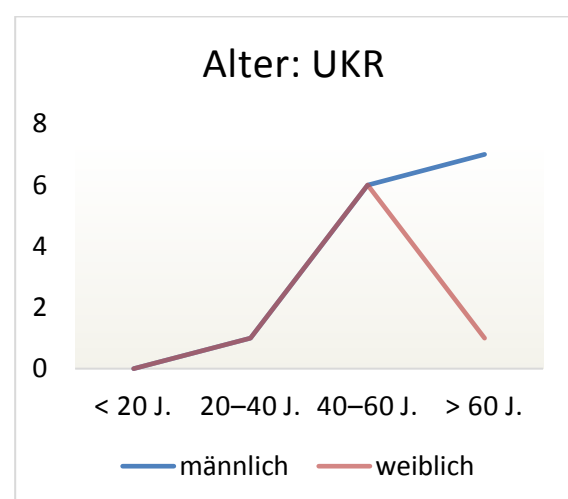


Abbildung 11: Altersverteilung der Patienten mit *E. faecium*-Fällen im UKR (gesamt: 22; J. = Jahre)

3.3. Jahresverlauf der VRE-Fälle

Zur Darstellung des Jahresverlaufs der VRE-Fälle wurde das Datum des Abschlussbefundes der Labordiagnostik verwendet. Dabei wurden alle Isolate zur Auswertung herangezogen, die bei erneuter Testung im Jahr 2016 als *E. faecium* identifiziert wurden. Im Falle des Doppelisolates mit gleichem Sequenztypus wurde das Datum des ersten Nachweises gewertet.

Für die untersuchten Jahre 2004 bis 2006 konnte eine stark ansteigende Anzahl von *E. faecium*-Fällen mit Vancomycinresistenz aus dem UKR und aus Einsendungen externer Krankenhäuser festgestellt werden (2004: n = 1, 2005: n = 14, 2006: n = 31) (s. Abbildung 12).

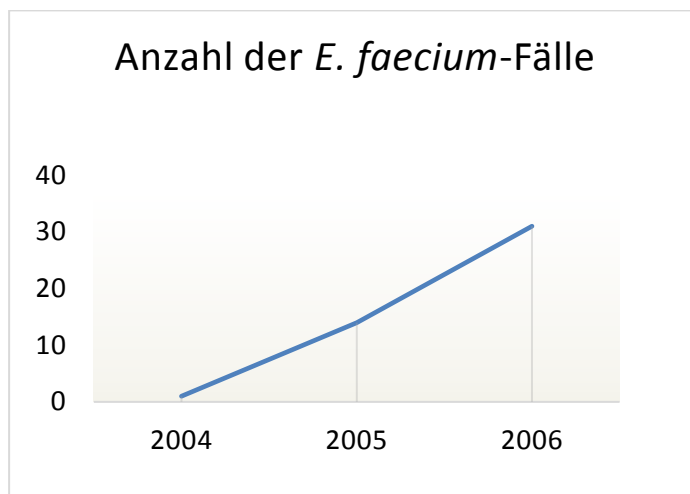


Abbildung 12: Jahresverlauf aller eingesendeten *E. faecium*-Fälle von 2004 bis 2006 (gesamt: 46)

Die Anzahl der *E. faecium*-Fälle im Monatsverlauf wurde stellvertretend für diesen Zeitraum aufgrund höherer Fallzahlen für das Jahr 2006 analysiert. Dabei zeigte sich eine Anhäufung der *E. faecium*-Nachweise in den Monaten April bis Juli und geringere Nachweiszahlen für August bis Oktober sowie für Dezember und Januar (s. Abbildung 13).

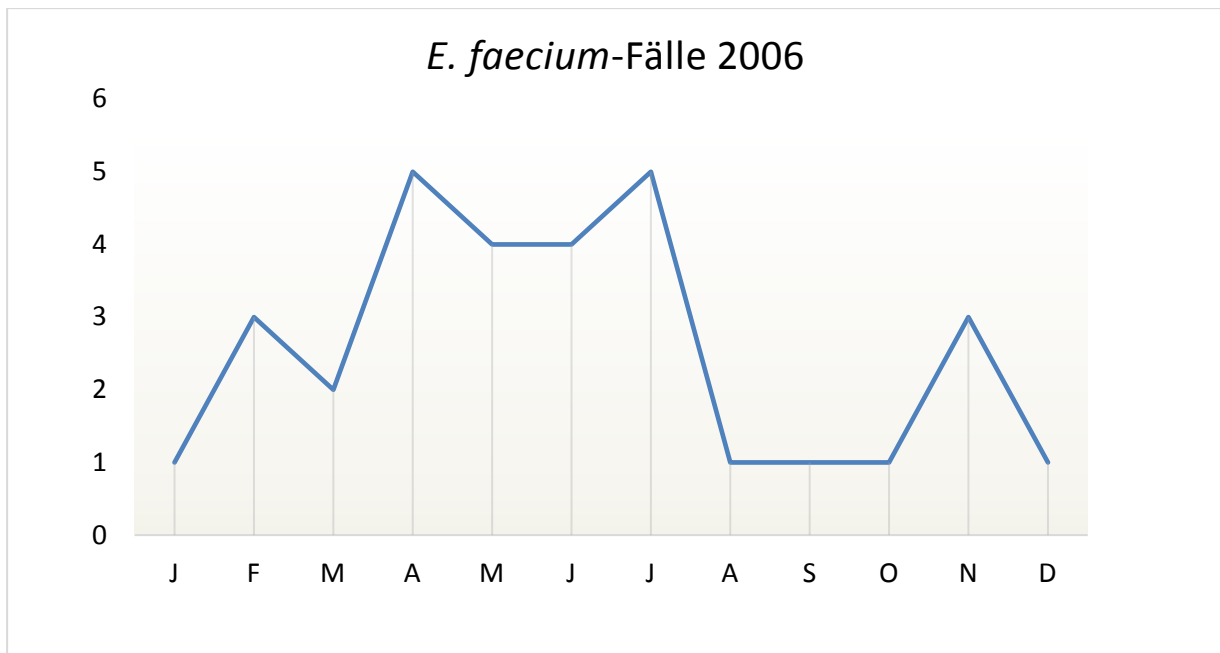


Abbildung 13: Anzahl aller eingesendeten *E. faecium*-Fälle im Monatsverlauf des Jahres 2006 (gesamt: 46)

3.4. Enterokokkenspezies und Resistenzen 2004 bis 2006

3.4.1. Enterokokkenspezies

Zunächst werden die Daten der VRE-Erstnachweise aus den Jahren 2004 bis 2006 beschrieben (in den Abbildungen mit (1) bezeichnet) und im Anschluss mit den Ergebnissen der erneuten Labortests im Jahr 2016 (mit (2) bezeichnet) verglichen. Die verschiedenen Untersuchungsmethoden sind in Abschnitt 2.2 und 2.3 aufgezeigt.

Im Rahmen der VRE-Nachweise in den Jahren 2004 bis 2006 wurden insgesamt 52 *E. faecium*- und ein *E. faecalis*-Isolat analysiert (s. Abbildung 14).

Unter den 24 VRE-Proben des UKR waren dabei ausschließlich *E. faecium*-Isolate (s. Abbildung 15).

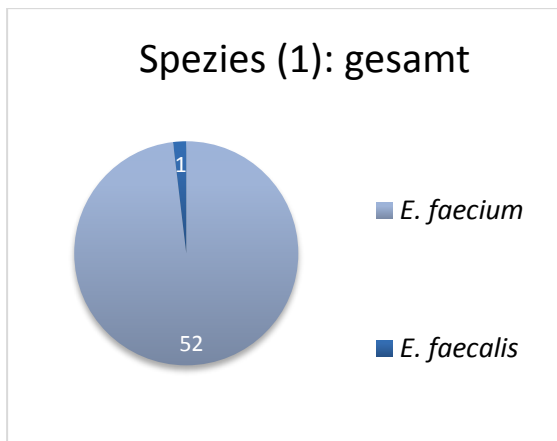


Abbildung 14: Enterokokkenspezies aller untersuchten VRE-Isolate beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 53)

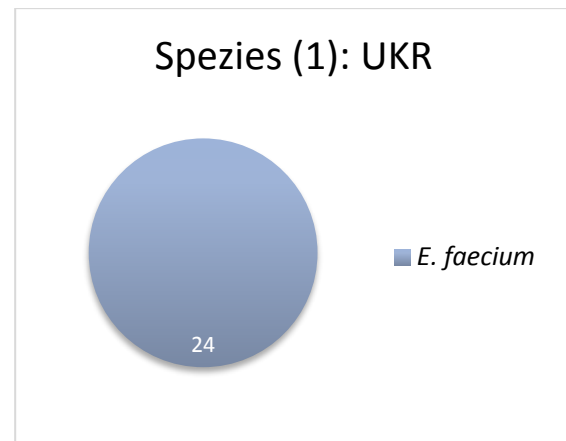


Abbildung 15: Enterokokkenspezies der VRE-Isolate des UKR beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 24)

3.4.2. Resistenzen

Die 53 VRE-Isolate wurden anschließend nach den vorhandenen Resistenzgenen ausgewertet. Es wurden 45 *vanB*-, vier *vanA*- und zwei *vanC1*-positive Isolate nachgewiesen. Zudem wurden zwei doppelt-positive Stämme isoliert. Der eine davon war sowohl *vanA*- als auch *vanB*-positiv, der andere war *vanB*- und *vanC1*-positiv (s. Abbildung 16). Unter den VRE des UKR wurden 23 *vanB*- und ein *vanA*-positives Isolat gefunden (s. Abbildung 17).

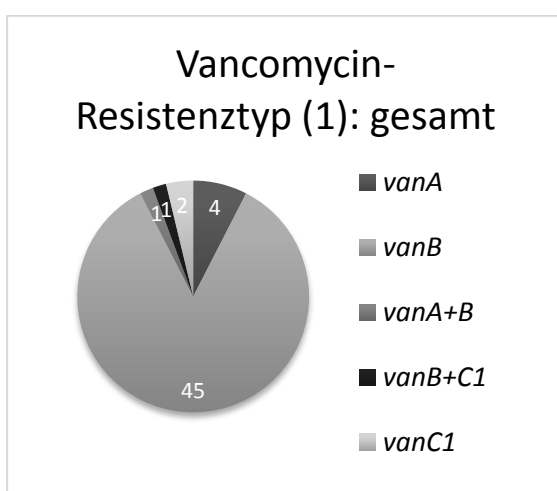


Abbildung 16: Vancomycinresistenz aller VRE-Isolate beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 53)

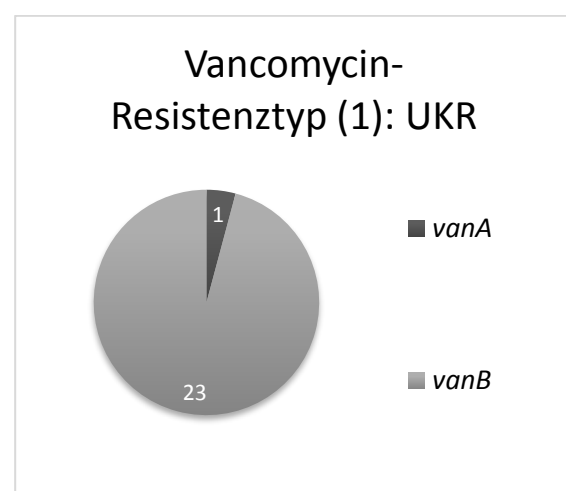


Abbildung 17: Vancomycinresistenz der VRE-Isolate des UKR beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 24)

Des Weiteren wurde die Ausprägung der phänotypischen Resistenz aller *E. faecium*-Isolate gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid näher betrachtet. Dazu wurde jeweils die Bewertung des AntibioGRAMMS mit der MHK des Epsilon-Termtests verglichen. Bis auf einen Fall stimmten deren Ergebnisse überein. Bei dieser Ausnahme wurde der genauere Wert des E-Tests verwendet. Intermediäre Resistenzen (MHK = 8–16 µg/ml) wurden in dieser Arbeit als resistent gewertet.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Befunden des Jahres 2016 wurden hier nicht alle 53 VRE-Isolate, sondern nur die 46 insgesamt getesteten *E. faecium*-Fälle bzw. die 23 *E. faecium*-Fälle des UKR analysiert. Anhand der gespeicherten Befunde konnten folgende Werte ermittelt werden (s. Abbildung 18):

Vancomycin-sensibel waren zwei *vanB*-positive *E. faecium*-Isolate, die restlichen 44 waren Vancomycin-resistent.

Dabei fiel auf, dass alle *vanA*-positiven Stämme eine $MHK_{\text{Vancomycin}} \geq 32 \mu\text{g/ml}$ besaßen. Unter den Stämmen, die allein den Genotyp *vanB* trugen, wiesen nur knapp 20% eine MHK dieser Größe auf. Der Großteil zeigte eine Resistenz von 8–24 µg/ml. Aufgrund der tendenziell niedrigeren MHK, ist es möglich, dass ein Isolat zwar genotypisch *vanB* aufweist, phänotypisch jedoch Vancomycin-sensibel ist (MHK $\leq 4 \mu\text{g/ml}$).

Gegenüber Teicoplanin waren die meisten Isolate (n = 41 von 46) sensibel. Dennoch war ein *vanB*-positives und alle fünf *vanA*-positiven *E. faecium*-Isolate, einschließlich des *vanA*- und *vanB*-positiven Stammes, Teicoplanin-resistent.

Eine Linezolidresistenz wurde lediglich bei einem *vanB*-positiven *E. faecium*-Stamm gefunden.

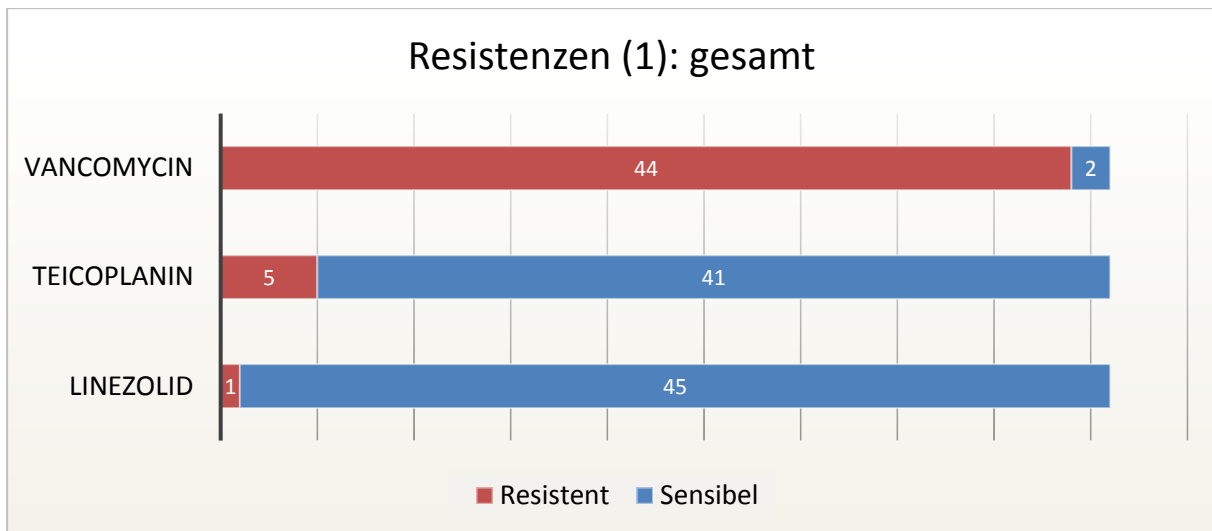


Abbildung 18: Resistenzen aller untersuchten *E. faecium*-Isolate gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 46)

Für die alleinige Betrachtung der Resistenzverteilung der *E. faecium*-Isolate des UKR zeigten sich ähnliche Ergebnisse (s. Abbildung 19). Vancomycin-sensibel war nur eines von 23 Isolaten. Eine Teicoplaninresistenz konnte bei zwei von 23 Isolaten und eine Linezolidresistenz in bereits genanntem einem Fall nachgewiesen werden.

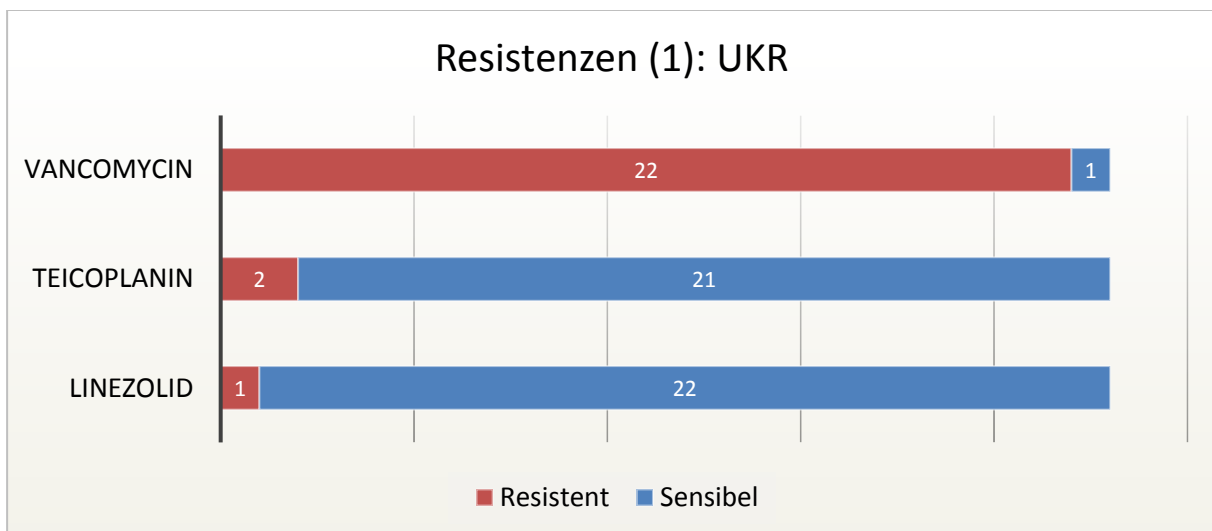


Abbildung 19: Resistenzen der *E. faecium*-Isolate des UKR gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 23)

3.5. Enterokokkenspezies und Resistenzen 2016: Vergleich mit Ausgangsdaten

3.5.1. Enterokokkenspezies

Wie oben beschrieben erfolgt nun ein Vergleich der Ausgangsdaten aus den Jahren 2004 bis 2006 mit den Ergebnissen der im Jahr 2016 erneut untersuchten Isolate.

Bei allen VRE-Proben der Stammsammlung wuchs nach dem Auftauen wieder ein Vancomycin-resistenter Enterokokkus an.

Dabei konnten mittels MALDI-TOF-Technologie 47 *E. faecium*-, ein *E. faecalis*- und fünf *E. gallinarum*-Isolate identifiziert werden. Demnach zeigte sich bei fünf der anfangs als *E. faecium* deklarierten Stämme nach dem Auftauen ein *E. gallinarum*-Stamm. Wie zu erwarten, stellten sich die drei Isolate mit dem Genotyp *vanC1* im Verlauf der erneuten Testungen im Jahr 2016 als *E. gallinarum* heraus, zudem aber auch zwei zunächst *vanB*-positive Isolate. Das bereits 2005 als *E. faecalis* nachgewiesene Isolat wurde 2016 wieder als solches identifiziert (s. Abbildung 20 und Abbildung 22).

Die Spezifizierung der VRE-Isolate des UKR zeigten nach dem Auftauen 23 *E. faecium*- und ein *E. gallinarum*-Isolat (s. Abbildung 21).

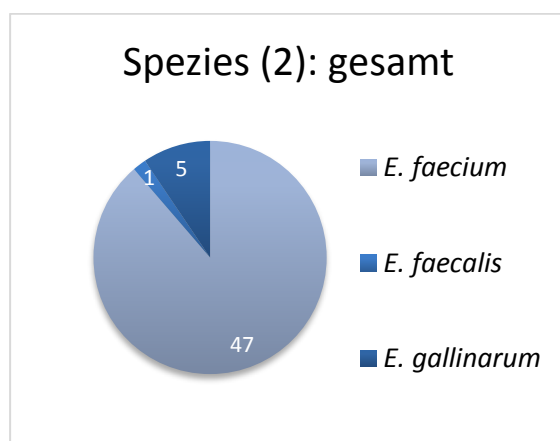


Abbildung 20: Enterokokkenspezies aller VRE-Isolate nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 53)

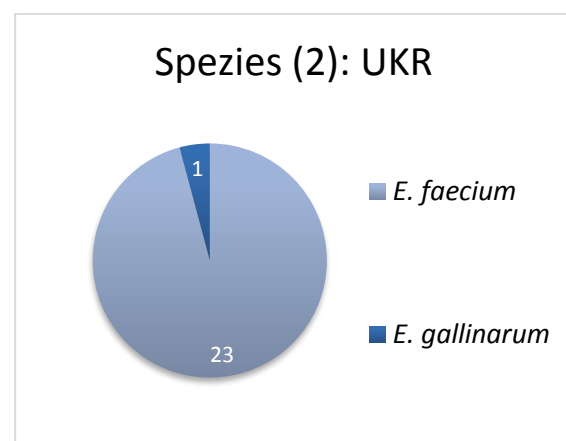


Abbildung 21: Enterokokkenspezies der VRE-Isolate des UKR nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 24)

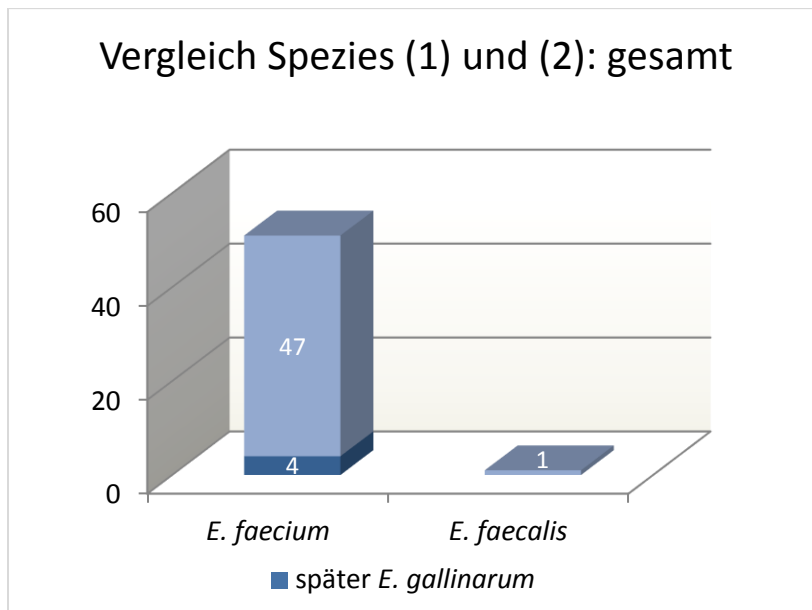


Abbildung 22: Vergleich der Ergebnisse der Speziesuntersuchung aller VRE-Isolate beim Erstnachweis 2004 bis 2006 und nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 53)

3.5.2. Resistenzen

Im Rahmen der PCR Analyse 2016 wurden die Resistenzgene *vanA* und *vanB*, nicht aber *vanC* und *vanD* getestet. Da in dieser Studie nur auf Isolate der Spezies *E. faecium* eingegangen werden sollte, wurden in nachstehender Abbildung 23 die fünf *E. gallinarum*- Stämme nicht berücksichtigt. Auch der anfangs nachgewiesene *vanA*-positive *E. faecalis*-Stamm wurde nicht weiter analysiert.

Unter den getesteten *E. faecium*-Stämmen zeigten sich drei *vanA*- und 43 *vanB*-positive sowie ein doppelt positives Isolat. Auch nach Einzelvergleichen der Isolate erwiesen sich die Ergebnisse der Ausgangsbefunde und der späteren Nachweise der Vancomycin-Resistenzgene somit für alle 47 *E. faecium* als identisch.

Die *E. faecium*-Isolate des UKR wiesen in einem Fall Genotyp *vanA* und 22 Mal *vanB* auf. Auch bei der isolierten Betrachtung der Proben des UKR ergaben sich somit die gleichen Ergebnisse wie bei den Ausgangsbefunden (s. Abbildung 24).

Das in Abschnitt 3.1 beschriebene Doppelisolat des gleichen Sequenztypus (*vanB*-positiv) wurde in den weiteren Analysen nicht mehr berücksichtigt (gesamt: 46).

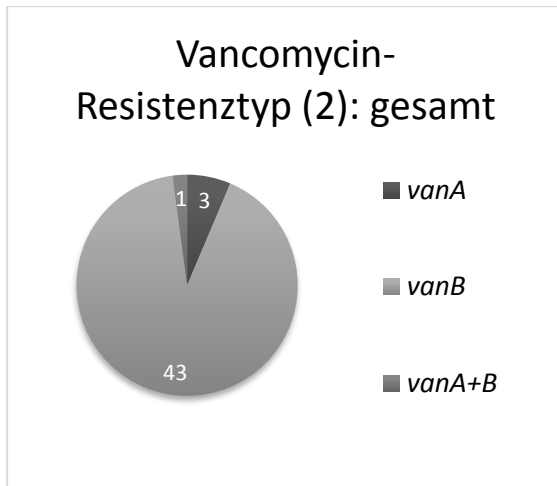


Abbildung 23: Vancomycinresistenz aller untersuchten *E. faecium*-Isolate nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 47)

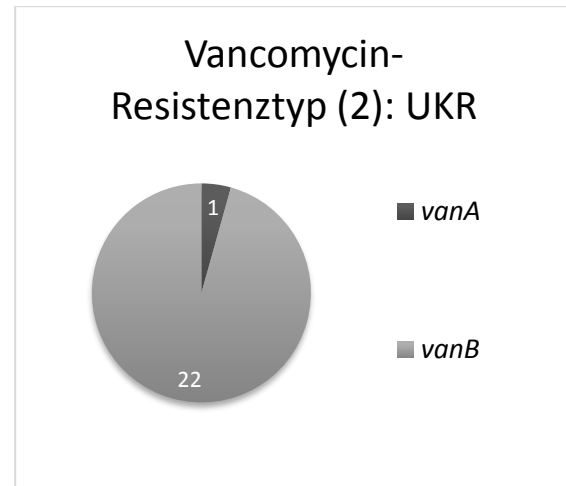


Abbildung 24: Vancomycinresistenz der *E. faecium*-Isolate des UKR nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 23)

Das *vanA*-Gen konnte anhand der Sequenzlänge von 377 bp, das *vanB*-Gen bei 298 bp nachgewiesen werden [52]. Abbildung 25 zeigt die Fotografie eines Elektrophoresegels der *vanA/B*-PCR aus einer Versuchsreihe dieser Arbeit.

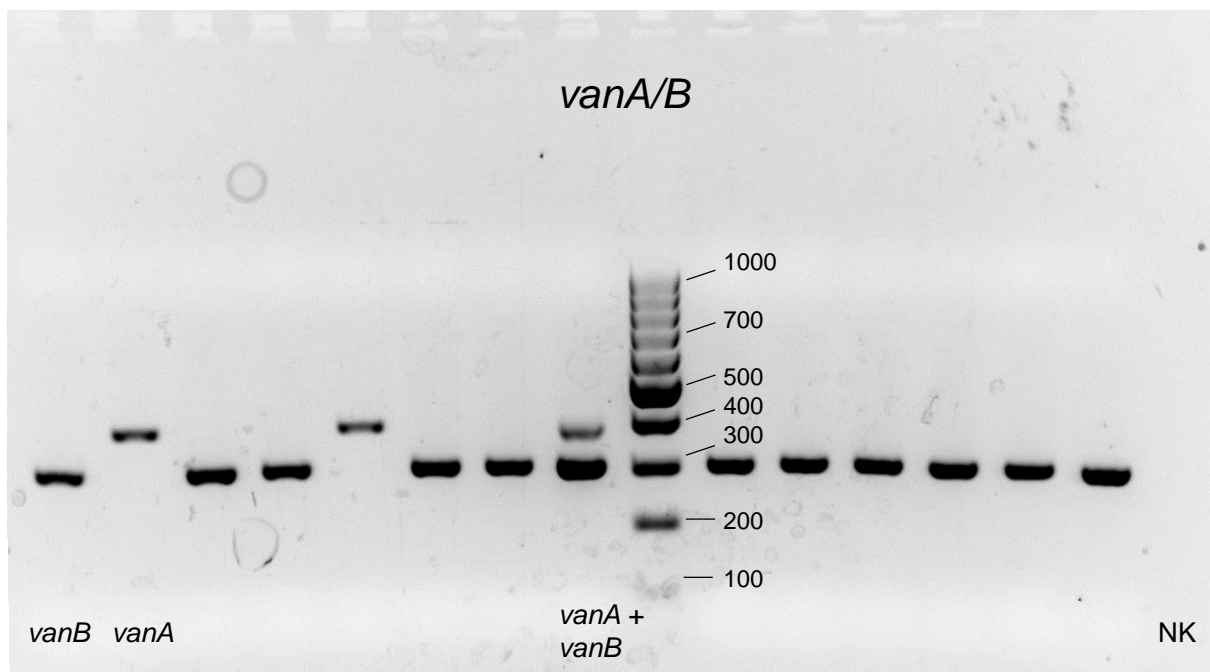


Abbildung 25: Beispielbild eines Gels der *vanA/B*-PCR mit Standard 100 bp DNA Ladder (NK = Negativkontrolle; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren)

Die Untersuchung der Antibiotikaresistenzen mittels BD Phoenix führte im Wesentlichen zu ähnlichen Ergebnissen wie die Originalbefunde. Dennoch sind einige Unterschiede festzustellen (s. Abbildung 26):

Die drei Vancomycin-sensiblen Isolate entsprachen nicht denjenigen zwei, die beim Ausgangsbefund Sensibilität zeigten. Es handelte sich um drei andere genotypisch *vanB*-positive, aber phänotypisch Vancomycin-sensible Stämme.

Die Untersuchung für Teicoplanin hingegen zeigte wiederum dieselben resistenten Isolate wie beim Erstnachweis in den Jahren 2004 bis 2006.

Eine Linezolidresistenz wurde nicht mehr nachgewiesen. In zwei Fällen konnte der Resistenztest durch das automatisierte Verfahren nicht korrekt beendet werden. Sie wurden der Abbildung als Drop-out für Linezolid zugefügt.

Zur Beurteilung der unterschiedlichen $MHK_{\text{Vancomycin}}$ -Werte für *vanA* und *vanB* ist diese Untersuchungsmethode nicht geeignet, da lediglich zwischen ≤ 4 und ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ unterschieden wurde.

Die alleinige Betrachtung der *E. faecium*-Isolate des UKR zeigte zwei der drei genannten genotypisch *vanB*-positiven, aber phänotypisch Vancomycin-sensiblen Isolate (s. Abbildung 27).

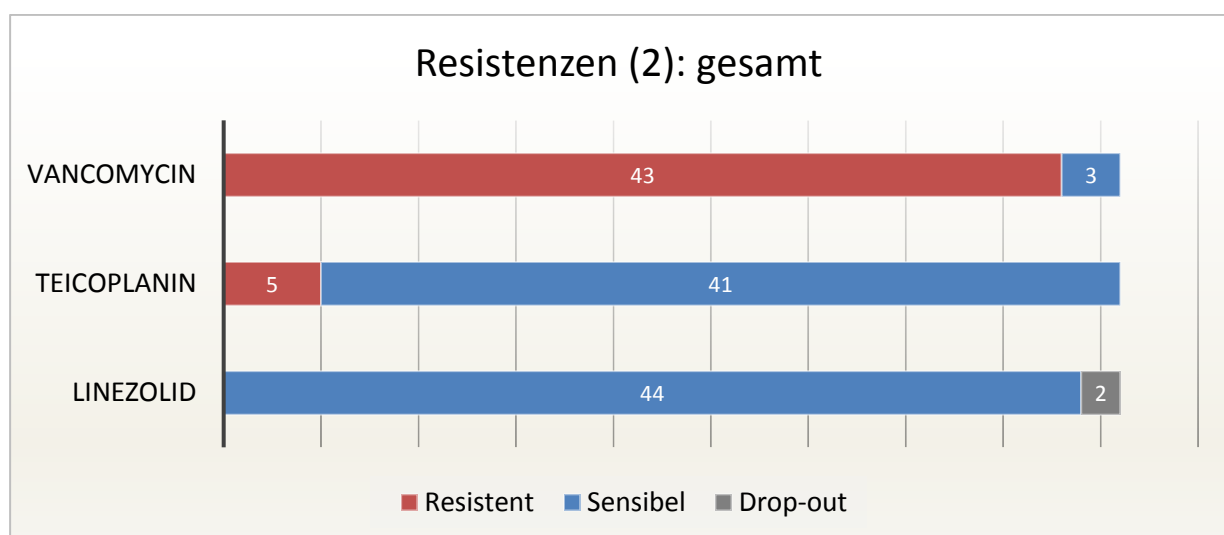


Abbildung 26: Resistenzen aller untersuchten *E. faecium*-Isolate gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 46)

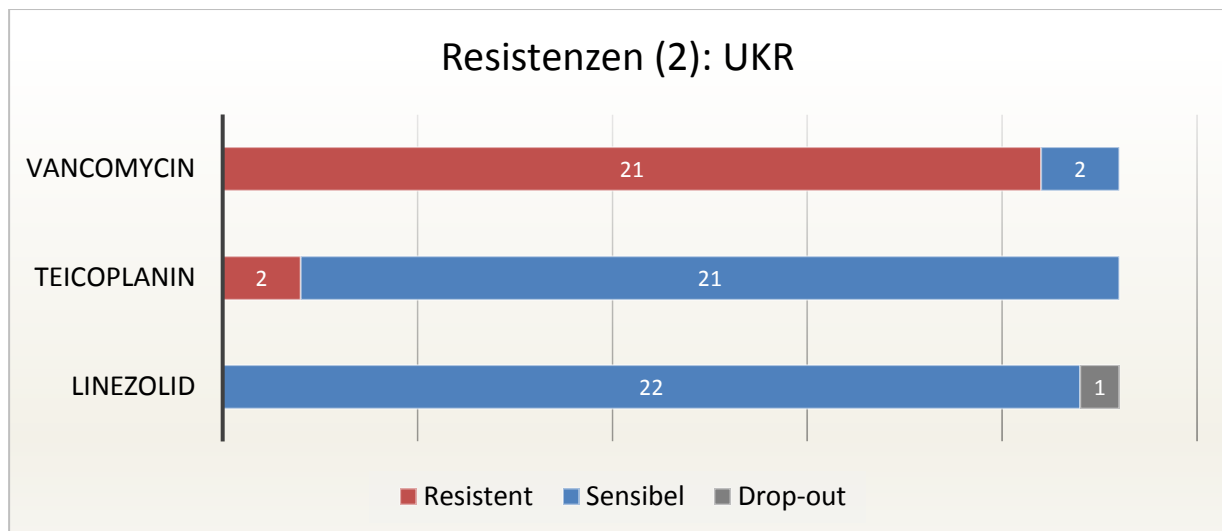


Abbildung 27: Resistenzen der *E. faecium*-Isolate des UKR gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 23)

3.6. Nachweis von Enterococcal Surface Protein (*esp*) und Hyaluronidase (*hyl*)

Alle weiteren PCRs erfolgten wie die Untersuchung der Antibiotikaresistenzen nur für die 46 insgesamt untersuchten *E. faecium*-Isolate ohne Doppelnachweis bzw. für die 23 *E. faecium*-Isolate des UKR.

Die Isolate wurden im Labor zunächst anhand von zwei PCRs auf die Virulenzfaktoren Enterococcal Surface Protein (*esp*) und Hyaluronidase (*hyl*) untersucht.

Für das Gen des Oberflächenproteins *esp* wurde die Anzahl der Repeats in Region A unterschieden. Insgesamt wurden in 89% der Fälle vier Repeats gefunden, sechs bzw. zehn Repeats hingegen kamen je nur einmal vor. Bei drei *E. faecium*-Stämmen konnte kein *esp*-Gen nachgewiesen werden (s. Abbildung 28). Bei den *esp*-negativen Isolaten handelte sich dabei sowohl um verschiedene Resistenz- als auch um unterschiedliche Sequenztypen: ST 17 (*vanB*), ST 18 (*vanA*) und ST 125 (*vanB*).

Bei den *E. faecium*-Isolaten des UKR konnten in 21 Fällen vier Repeats, einmal sechs Repeats und ein *esp*-negativer Stamm – eben genannter Sequenztyp 17 – festgestellt werden (s. Abbildung 29).

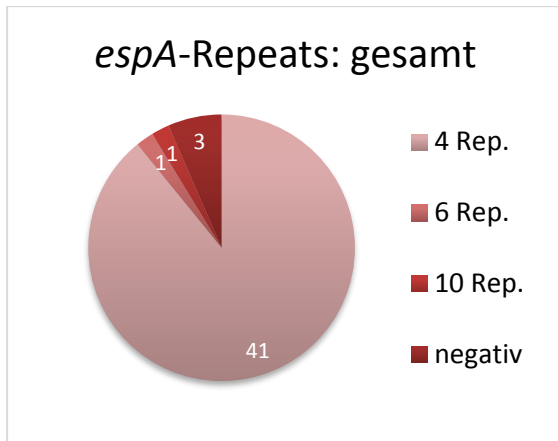


Abbildung 28: Anzahl der *espA*-Repeats aller untersuchten *E. faecium*-Isolate (gesamt: 46; Rep. = Repeats)

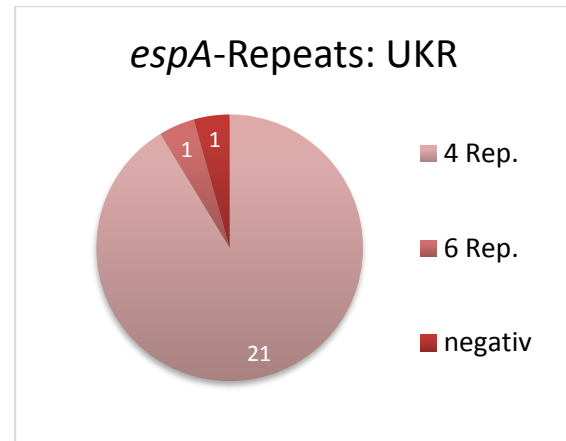


Abbildung 29: Anzahl der *espA*-Repeats der *E. faecium*-Isolate des UKR (gesamt: 23; Rep. = Repeats)

Nachstehende Abbildung 30 zeigt ein Mustergel aus zusammengestellten Proben dieser Versuchsreihe. Vier *espA*-Repeats zeigen sich in einer Größe von 1193 bp, sechs Repeats bei 1697 bp und zehn Repeats bei 2705 bp (s. Tabelle 9). Zudem ist ein *esp*-negatives Isolat sowie die Negativ-Kontrolle der PCR aufgetragen worden.

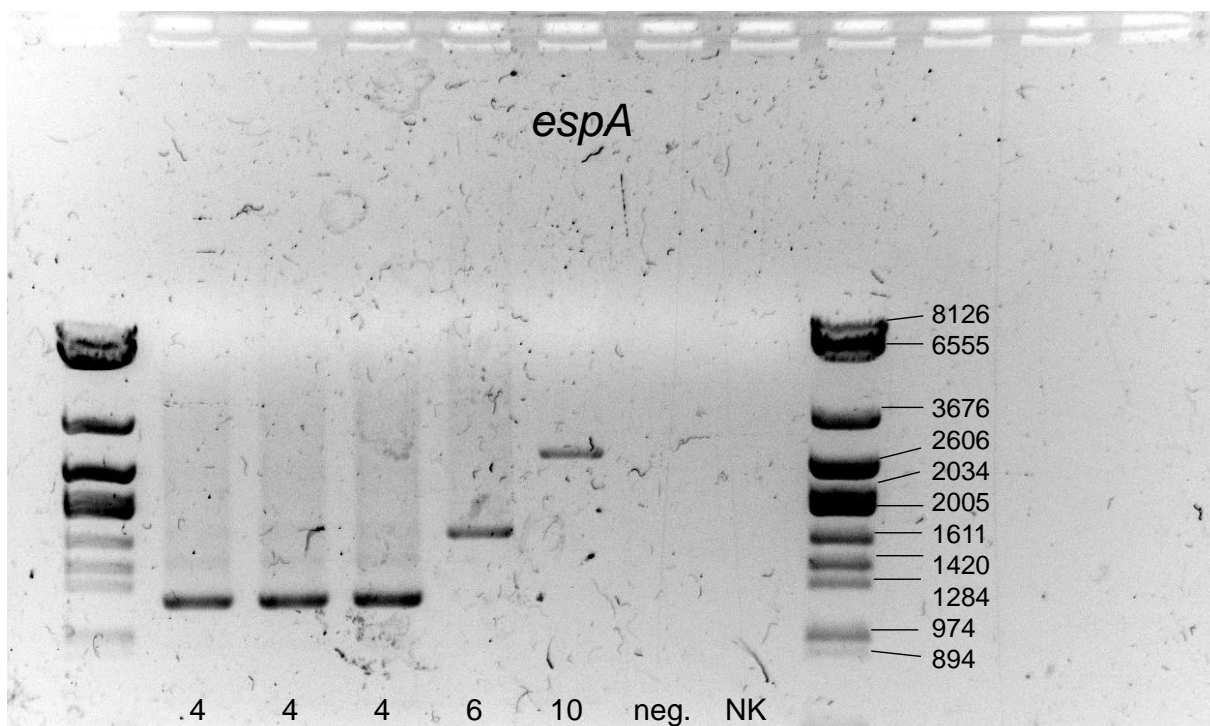


Abbildung 30: Beispielbild eines Gels der *espA*-PCR mit Standard Lambda DNA/Eco471 (Avall) Marker (4, 6, 10 = Anzahl der *espA*-Repeats; neg. = *esp*-negativ; NK = Negativkontrolle; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren)

Außerdem wurde das Vorliegen des Gens für Hyaluronidase (*hyl*) untersucht. Es wurde in 40 Fällen nachgewiesen, bei sechs Isolaten fehlte es (s. Abbildung 31). Von den Isolaten des UKR waren 19 *hyl*-positiv und vier *hyl*-negativ (s. Abbildung 32).

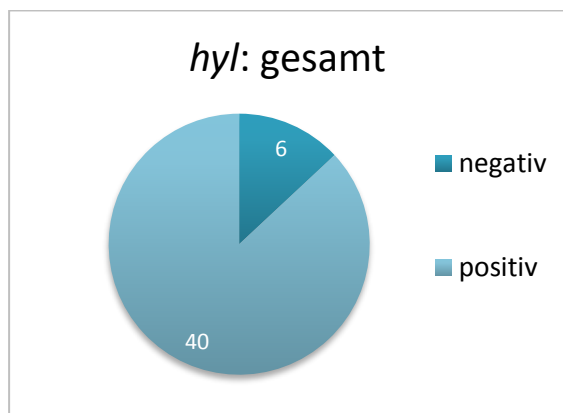


Abbildung 31: Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse des *hyl*-Nachweises aller untersuchten *E. faecium*-Isolate (gesamt: 46)

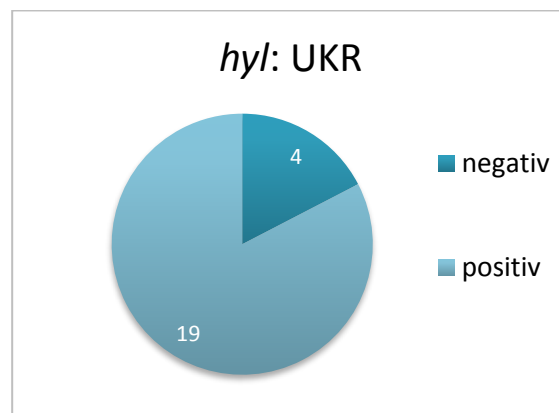


Abbildung 32: Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse des *hyl*-Nachweises der *E. faecium*-Isolate des UKR (gesamt: 23)

Abbildung 33 zeigt ein Elektrophoresegel mit *hyl*-Nachweisen bei 276 bp [33].

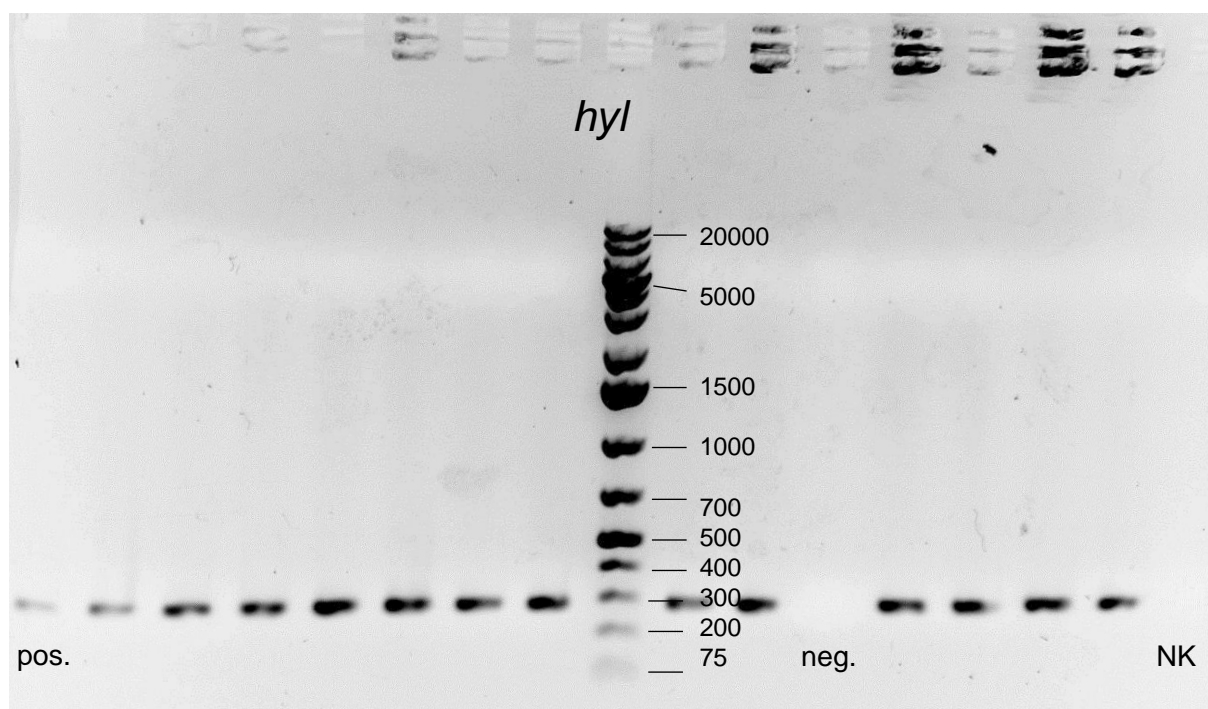


Abbildung 33: Beispielbild eines Gels der *hyl*-PCR mit Standard 1 kb Plus DNA Ladder (pos. = *hyl*-positiv; neg. = *hyl*-negativ; NK = Negativkontrolle; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren)

83% (n = 38 von 46) der insgesamt untersuchten *E. faecium*-Isolate waren sowohl *esp*- als auch *hyl*-positiv. Bei fünf Fällen (11%) war allein das *esp*-Gen, in bei zwei Fällen (4%) allein das *hyl*-Gen zu finden. Nur ein Isolat (ST 17, *vanB*) wies keines der beiden Gene auf.

Ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen des *hyl*-Gens und der Anzahl von *espA*-Repeats mit dem Sequenztypus konnte nicht gefunden werden. Lediglich ST 203, der insgesamt in nur zwei Fällen nachgewiesen wurde, wies jeweils vier *espA*-Repeats auf und war *hyl*-negativ (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Ausschnitt aus der Gesamttabelle der Dissertation mit Darstellung aller *hyl*-negativen Isolate mit zugehörigen Sequenztypen und *espA*-Repeats (ST = Sequenztypus)

<i>espA</i> -Repeats	<i>hyl</i>	ST
6	negativ	17
4	negativ	208
4	negativ	203
10	negativ	192
<i>esp</i> -negativ	negativ	17
4	negativ	203

3.7. MLSTypisierung

3.7.1. PCR der MLST-Gene

Einer der Kernpunkte dieser Arbeit war die Analyse der MLST-Sequenztypen. Mit sieben verschiedenen PCRs konnten die Gene *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS* und *adK* auf verschiedene Allelvarianten untersucht werden.

Die Kombination der einzelnen Allelvarianten zu einem siebenstelligen Zahlencode wurde dann einem Sequenztypus zugeordnet.

Abbildung 34 zeigt ein Mustergel mit jeweils positiven Isolaten der oben genannten sieben Gene und Negativkontrollen. Die Länge des Amplifikats ist bewusst etwas größer gewählt als die zu untersuchende Gensequenz, um eine bessere Auswertung der Sequenzen zu ermöglichen (s. Abschnitt 2.3.4.2).

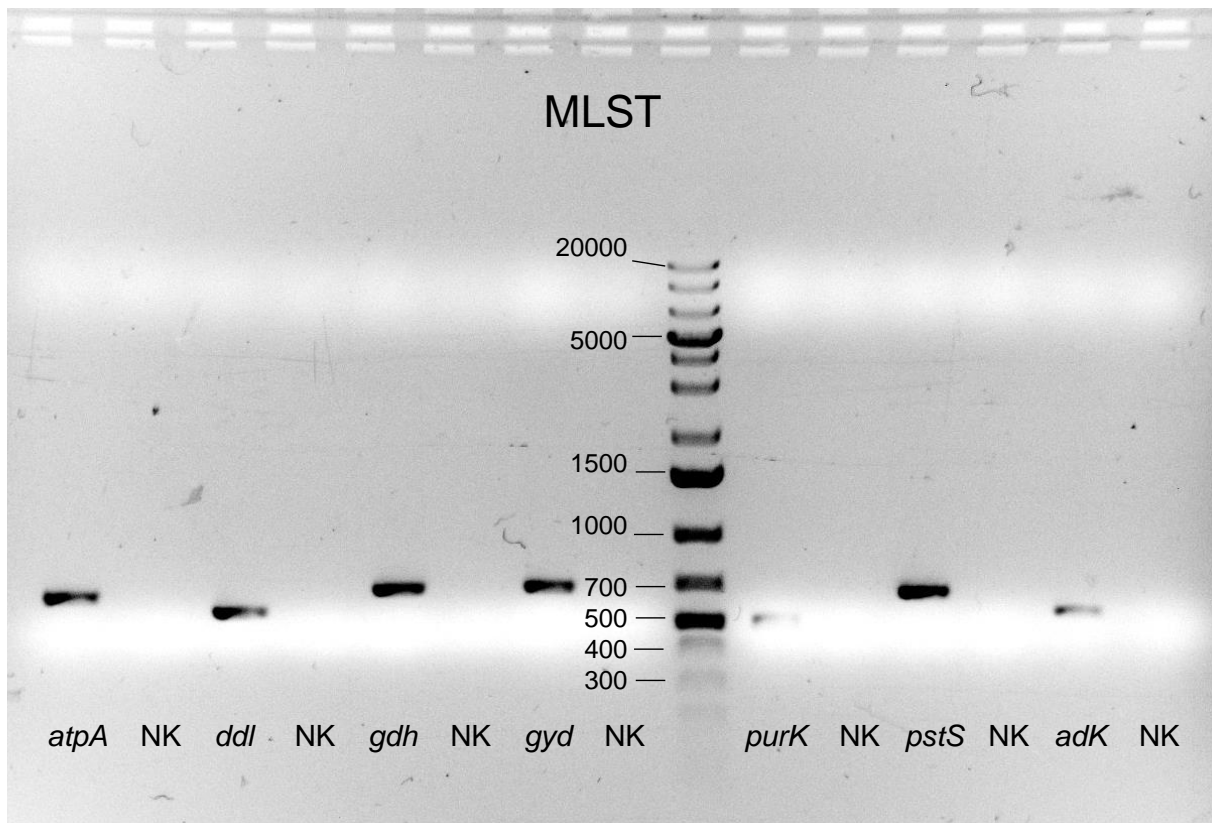


Abbildung 34: Beispielbild eines Gels der MLST-PCRs mit Standard 1 kb Plus DNA Ladder: *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS*, *adK* (NK = Negativkontrolle der vorhergehenden PCR; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren)

Nachfolgende Ergebnisse beziehen sich wie auch die Nachweise der Virulenzmarker *esp* und *hyl* nur auf die 46 insgesamt untersuchten *E. faecium*-Isolate bzw. 23 *E. faecium*-Isolate des UKR.

Die Allele des *atpA*-Gens zeigten sich als Allelvarianten 1, 7, 9, 15 und 33, wobei 15 insgesamt am häufigsten war und 33 gehäuft im UKR auftrat (s. Abbildung 35 und Abbildung 36).

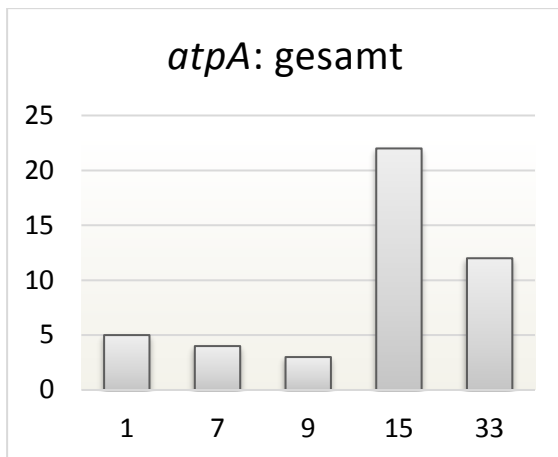


Abbildung 35: Anzahl der Allelvarianten des *atpA*-Gens aller untersuchten *E. faecium*-Isolate (gesamt: 46)

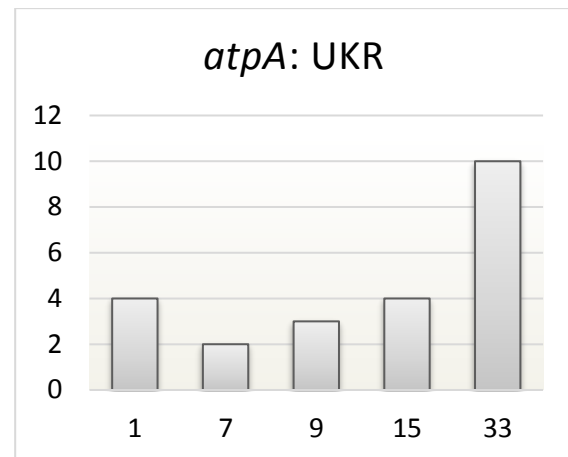


Abbildung 36: Anzahl Allelvarianten des *atpA*-Gens der *E. faecium*-Isolate des UKR (gesamt: 23)

Für das *ddl*-Gen ergaben sich meist die Allelvarianten 1 oder 2. Nur einmal wurde Variante 3 in einem externen Krankenhaus festgestellt (s. Abbildung 37 und Abbildung 38).

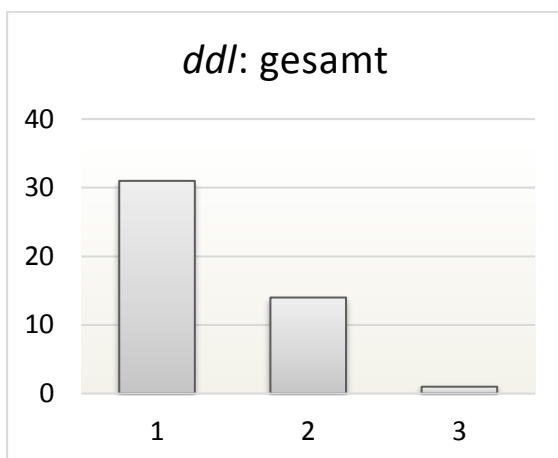


Abbildung 37: Anzahl der Allelvarianten des *ddl*-Gens aller untersuchten *E. faecium*-Isolate (gesamt: 46)

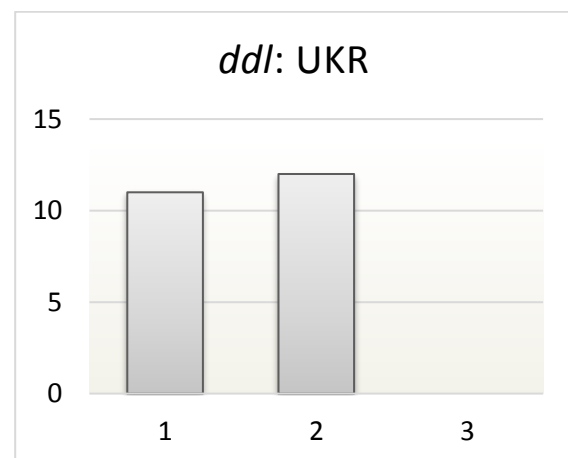


Abbildung 38: Anzahl der Allelvarianten des *ddl*-Gens der *E. faecium*-Isolate des UKR (gesamt: 23)

Die Analyse des *gyd*-Gens ergab hauptsächlich Allel-Typ 1. Nur bei vier Fällen insgesamt bzw. zwei Isolaten des UKR wurde Typ 5 registriert (s. Abbildung 39 und Abbildung 40).

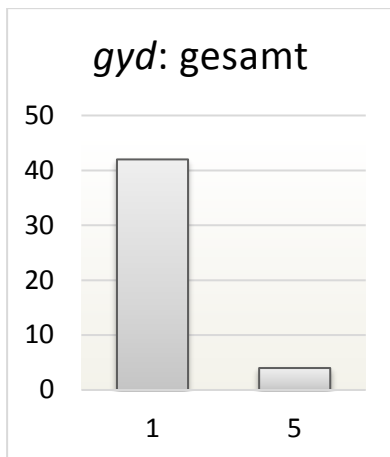


Abbildung 39: Anzahl der Allelvarianten des *gyd*-Gens aller untersuchten *E. faecium*-Isolate (gesamt: 46)

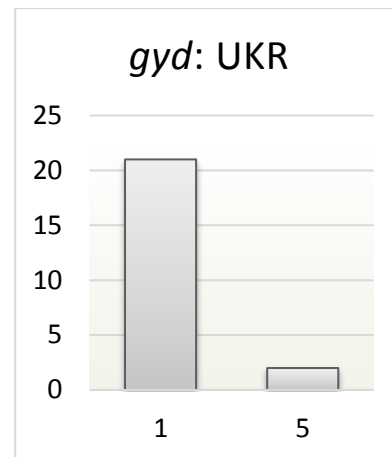


Abbildung 40: Anzahl der Allelvarianten des *gyd*-Gens der *E. faecium*-Isolate des UKR (gesamt: 23)

Das *pstS*-Gen trat am Häufigsten mit Variante 1 und 7 auf. Subtyp 20 konnte insgesamt nur zweimal, einmal davon im UKR nachgewiesen werden (s. Abbildung 41 und Abbildung 42).

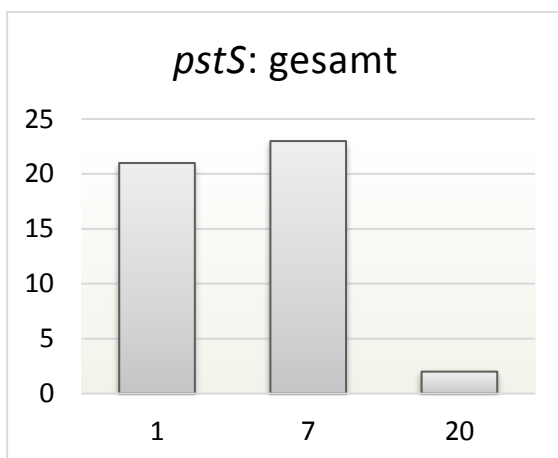


Abbildung 41: Anzahl der Allelvarianten des *pstS*-Gens aller untersuchten *E. faecium*-Isolate (gesamt: 46)

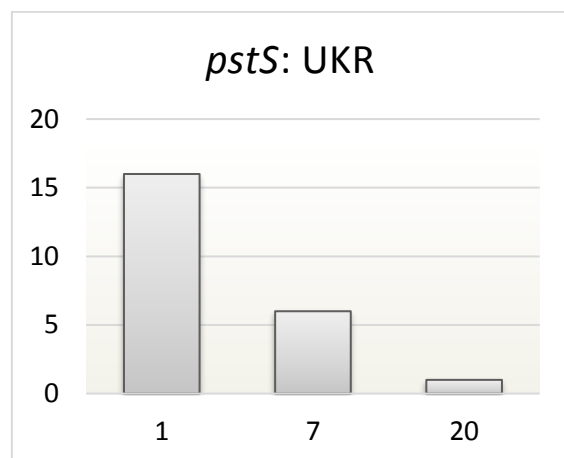


Abbildung 42: Anzahl der Allelvarianten des *pstS*-Gens der *E. faecium*-Isolate des UKR (gesamt: 23)

Die Untersuchung der Gene *adK*, *gdh* und *purK* ergab bei nahezu allen Isolaten die Allelvariante 1. Lediglich ein Stamm zeigte eine veränderte Variante des *gdh*-Allels 1, die im folgenden Abschnitt 3.7.2 genauer dargestellt wird.

3.7.2. Punktmutation im *gdh*-Allel

Für den oben beschriebenen Stamm wurde eine Basensequenz des *gdh*-Allels ermittelt, die in der Datenbank von pubmlst.org noch nicht verzeichnet war. Deshalb war keine Zuordnung zu bekannten Sequenztypen möglich. Anhand von Abbildung 43 und Abbildung 44 kann man eine Punktmutation in einem Basenpaar erkennen (jeweils markiert). In der Darstellung der Basensequenz mit Chromas Lite (s. Abbildung 44) ist ein eindeutiger Guanin-Peak zwischen Locus 410 und 420 zu sehen. In der regulären Basensequenz des *gdh* 1 stünde an dieser Stelle ein Thymin. Ansonsten gleicht die Sequenz dem *gdh*-Alleltyp 1.

Closest match: [gdh: 1](#)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
Query NYTTTGGCGCACTAAAAGATATGGTGCAAAATCATATTTTACAGGTTGTAGCATTACTTGCAATGGAACCGCCAGTAGCATTTCGGA AAAAGAAATCCG
Ref -----
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Query TACAGAAAAGATCAAAAGCATTGAAAGCTATCCGCATTTATAACGAAGAAGAAGTGTAGAAAACCTTCGTTCCGGGCAATATGCTCAAGGTGAATTGGAT
Ref -----
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Query GGTGTACAATTCAAGGGCTATCGCGAAGAAGACAAAGTGGATGCTCAATCAGAGACTGAAACATTTCGTCGCAGGCAAAATTCACATATCGATAACTTCGGTT
Ref -----
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Query GGTCCAGTGTTCCTTTCTATGTACGTACAGGCAAAACGTTTGACTGAAAAGGGGACTCGGATCAACATCGTATTCAAACAAGTTCTCTTTAATGTATTCAA
Ref -----
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
Query AACATCTGTCGAGGAAACCATGTGACGATACGACACTTCCACCTAATGTTCTAACGATCTATATTCAGCCAACTGAAGGATTTTCTTTATCCTTGAATGGG
Ref .....T.....
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
Query AAAGAAGTAGGGCAAGGATTGAAACGGAACCAATCAAATTTGGAATTTAGAAAATAGTGCAGAAATGGTTGAAAATAGCCCAGAAGCTTACGAAAAATTAC
Ref -----
      610     620
Query TATTAGATGCGTGAAATGTGATGA
Ref -----

```

Differences

1 difference found. ⓘ

345T → 413G

Abbildung 43: Ausschnitt der Basensequenz des *gdh*-Gens des abweichenden *E. faecium*-Isolates; Markierung der Punktmutation (T → G) zwischen Locus 410 und 420; Darstellung mit www.pubmlst.org (Stand 10.11.2016)

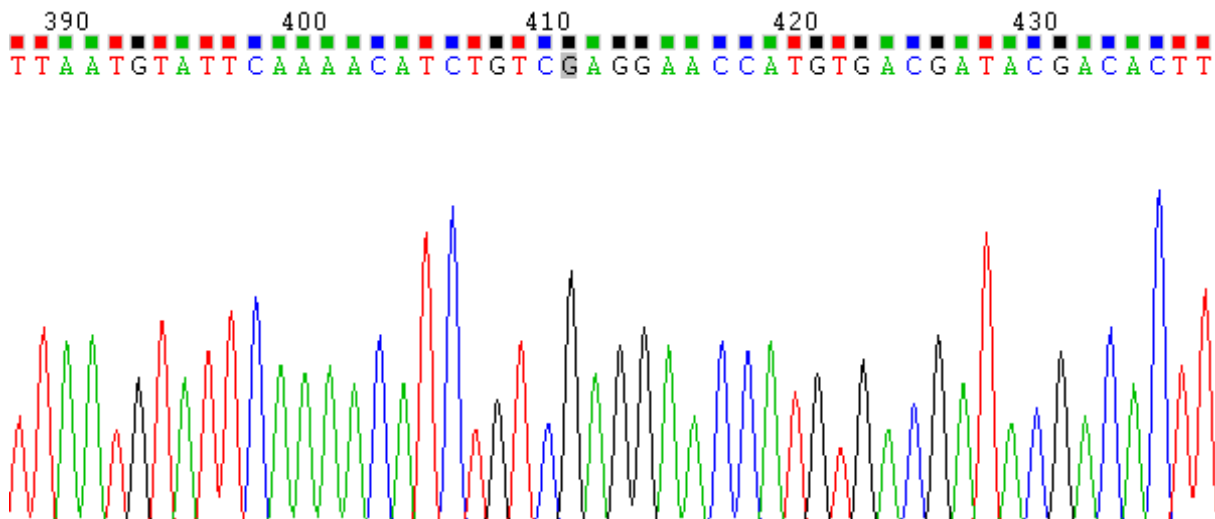


Abbildung 44: Ausschnitt der Basensequenz des *gdh*-Gens des abweichenden *E. faecium*-Isolates; Markierung der Punktmutation (T → G) zwischen Locus 410 und 420; Darstellung mit Chromas Lite

3.8. MLST-Sequenztypen

3.8.1. Übersicht der Sequenztypen

Anhand des Zahlencodes der MLST-Allele entstand ein siebenstelliges Allel-Profil, welches einem spezifischen Sequenztypus zugeordnet werden kann. Besonders für die epidemiologische Untersuchung ist eine genaue Typisierung wichtig.

Tabelle 12 zeigt die Zusammensetzung des Allel-Zahlencodes des jeweiligen MLST-Sequenztypus sowie dessen Häufigkeit sowohl unter den insgesamt getesteten 46 *E. faecium*-Isolaten, als auch unter den 23 Isolaten des UKR.

Wie in Abschnitt 3.7.2 erwähnt, wurde im Rahmen dieser Laboranalyse ein neuer Sequenztypus gefunden, der in der Basenfolge des *gdh*-Fragments von den bisher bekannten Subtypen abweicht. Da der Genabschnitt dem Typus *gdh* 1 dennoch bis auf eine Base gleicht, lässt die Abfolge des gesamten Zahlenprofils auf eine Verwandtschaft zum Sequenztyp 192 schließen.

(Für eine anteilige Darstellung der Sequenztypen siehe Abbildung 45 und folgende)

Tabelle 12: Übersicht über die Häufigkeit der MLST-Sequenztypen unter den gesamten untersuchten *E. faecium*-Isolaten bzw. den *E. faecium*-Isolaten des UKR sowie jeweils zugehöriges Zahlenprofil der Allelvarianten (ST = Sequenztypus)

gesamt	UKR	<i>adK</i>	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>purK</i>	ST
4	4	1	1	1	1	1	1	1	17
1	0	1	7	1	1	5	1	1	18
1	0	1	15	1	1	1	1	1	78
1	0	1	7	3	1	5	1	1	125
2	2	1	7	2	1	5	1	1	186
18	2	1	15	1	1	1	7	1	192
1	0	1	1	1	1	1	7	1	202
2	1	1	15	1	1	1	20	1	203
12	10	1	33	2	1	1	1	1	208
3	3	1	9	1	1	1	7	1	780
1	1	1	15	1	neu	1	7	1	neu

Insgesamt waren elf verschiedene Sequenztypen unter den *E. faecium*-Isolaten aller Krankenhäuser. Besonders häufig traten ST 192 (39%) und ST 208 (26%) auf. Diese zwei stellten zusammen über die Hälfte der nachgewiesenen Sequenztypen dar. Alle anderen kamen mit maximal vier Isolaten (ST 17) vergleichsweise selten vor (s. Abbildung 45).

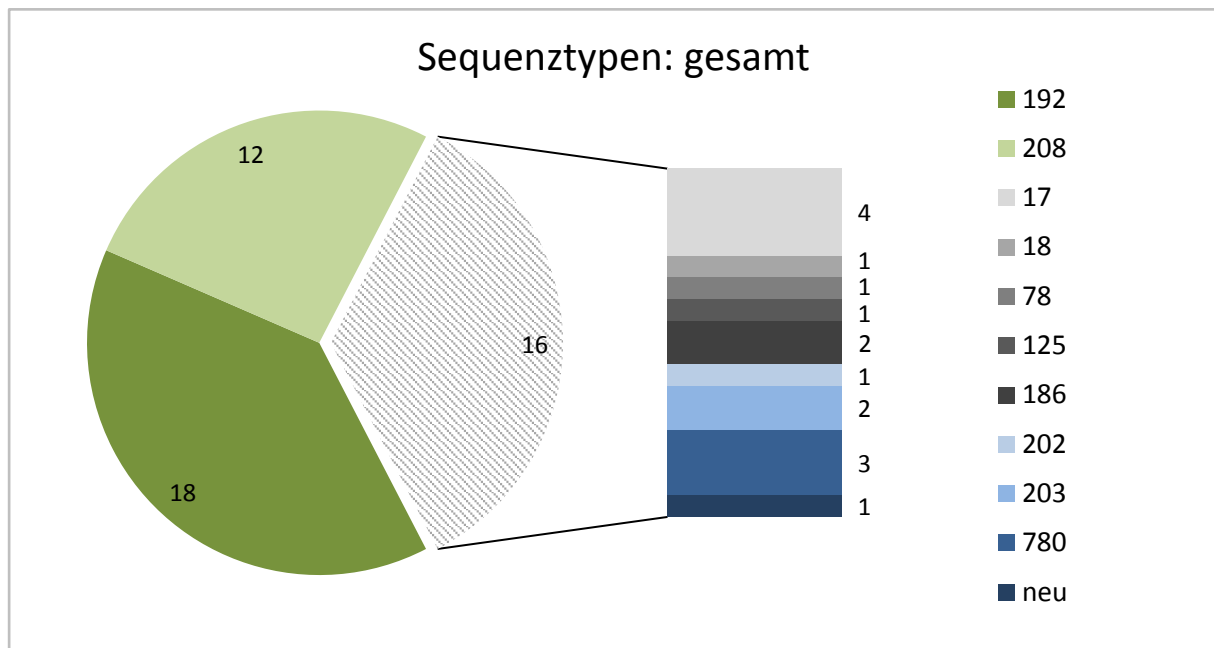


Abbildung 45: Anteile der verschiedenen MLST-Sequenztypen der *E. faecium*-Isolate aller untersuchten Krankenhäuser (gesamt: 46)

3.8.2. Vergleich der Sequenztypen externer Krankenhäuser und des UKR

Die Einsendung der Isolate erfolgte aus zehn verschiedenen Krankenhäusern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere auf das Universitätsklinikum Regensburg eingegangen.

Die vorherrschenden Sequenztypen im UKR und in externen Krankenhäusern unterschieden sich deutlich (s. Abbildung 46 und Abbildung 47).

Während im UKR der Sequenztyp 208 mit zehn von insgesamt 23 (43%) Isolaten überwog, zeigte sich bei den externen Krankenhäusern in 70% der Isolate (n = 16 von 23) der Sequenztyp 192. Zudem ist erkennbar, dass die Sequenztypen 17, 186 und 780 nur im UKR vertreten waren. Andere hingegen wurden ausschließlich in den umgebenden Krankenhäusern nachgewiesen (ST 18, 78, 125, 202).

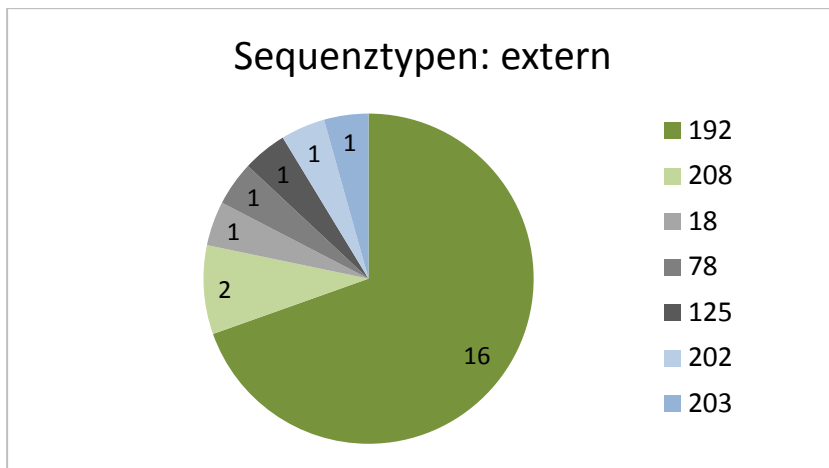


Abbildung 46: Anteile der verschiedenen MLST- Sequenztypen aller *E. faecium*-Isolate der externen Krankenhäuser (gesamt: 23)

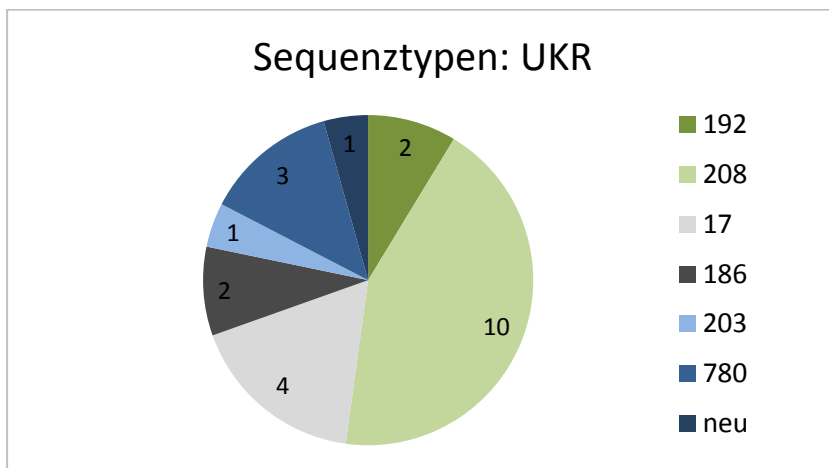


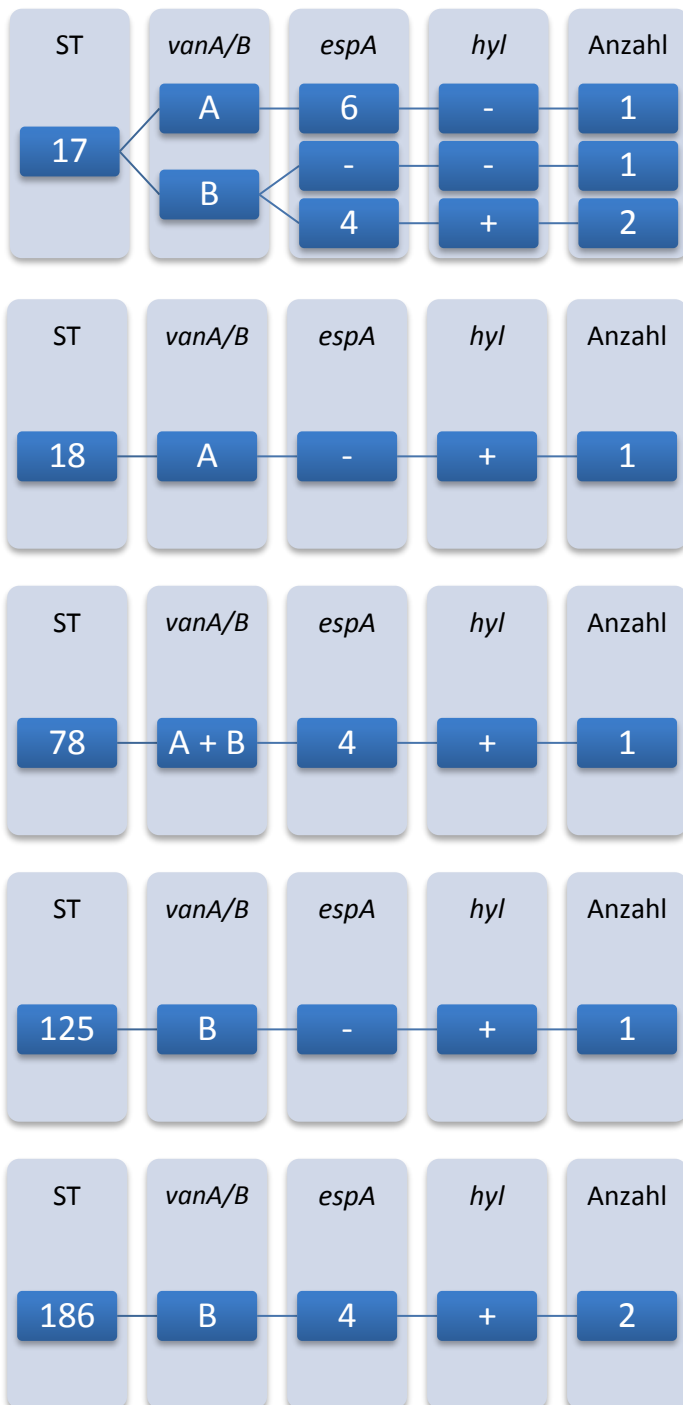
Abbildung 47: Anteile der verschiedenen MLST-Sequenztypen der *E. faecium*-Isolate des UKR (gesamt: 23)

ST 192 war in 17 von 18 Fällen Vancomycin-resistent, *vanB*-positiv, *hyl*-positiv und wies vier *espA*-Repeats auf. Ein Isolat war ebenfalls *vanB*-positiv, jedoch *hyl*-negativ und zeigte zehn *espA*-Repeats. Im Ausgangsbefund war es phänotypisch Vancomycin-resistent, nach dem Auftauen 2016 erwies es sich aber als sensibel.

Auch die Stämme des ST 208 waren sich ähnlich. Wie bei ST 192 war der Großteil der Isolate ($n = 10$ von 12) Vancomycin-resistent, *vanB*- und *hyl*-positiv und zeigte vier *espA*-Repeats. Ein Stamm wich dadurch ab, dass er *hyl*-negativ war. Der zweite zeigte phänotypisch eine Sensibilität gegenüber Vancomycin.

3.8.3. Verteilung der Resistenzgene und Virulenzfaktoren für die einzelnen Sequenztypen

Nachfolgende Abbildung 48 zeigt die verschiedenen MLST-Sequenztypen und deren Kombination mit den Resistenzgenen *vanA/B*, mit der Anzahl der *espA*-Repeats, dem Vorkommen des Virulenzmarkers *hyl* sowie der jeweiligen Häufigkeit der Subgruppe.



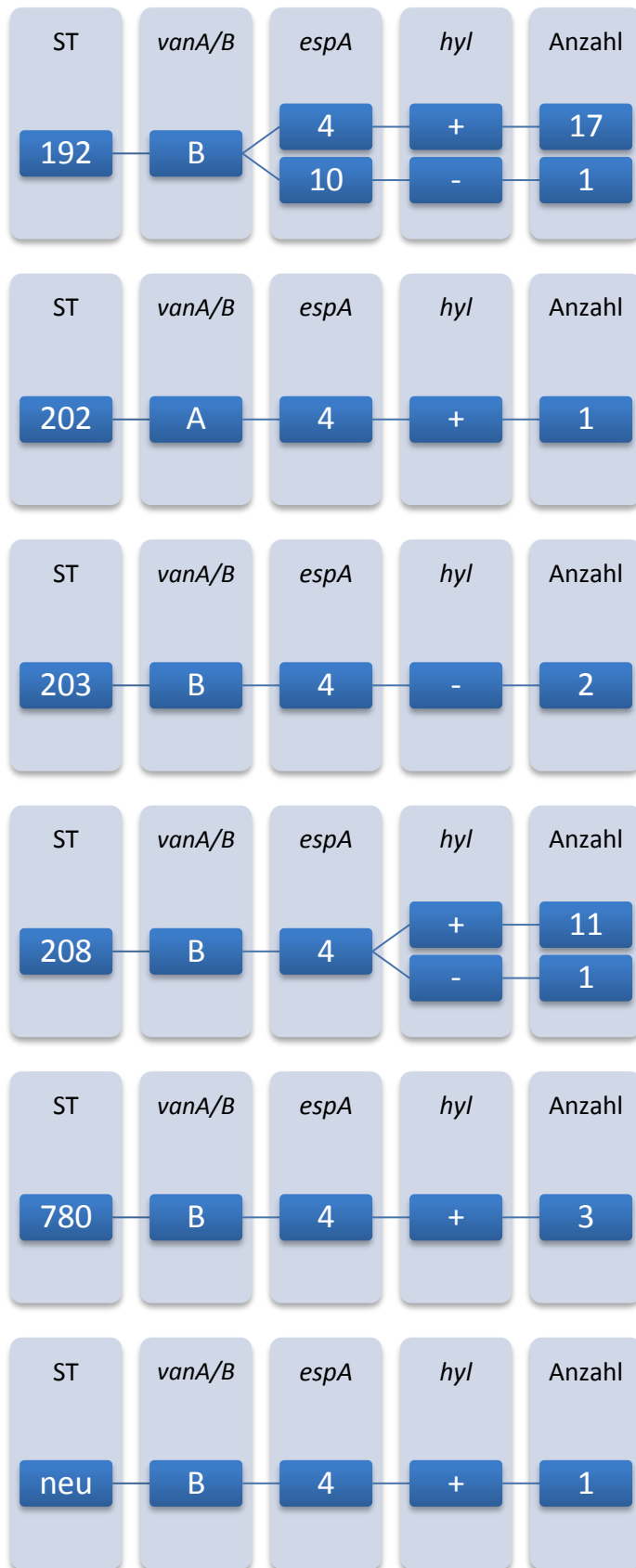


Abbildung 48: Darstellung der MLST-Sequenztypen mit den jeweiligen Varianten des Resistenztyps, der *espA*-Repeats, des *hyl*-Gens und der Anzahl dieser Kombinationen

3.8.4. Jahresverlauf der Sequenztypen 192 und 208

Für die häufigsten Sequenztypen 192 und 208 wurde der zeitliche Ablauf der Nachweise gesondert betrachtet. Dabei fällt auf, dass ST 208 im untersuchten Zeitraum persistiert. ST 192 hingegen trat im letzten Viertel des Jahres 2005 erstmalig auf. Es folgte ein Anstieg der Nachweise jenes Sequenztyps zwischen April und Juni des Jahres 2006 sowie sinkende Zahlen in der zweiten Hälfte des Jahres. Für diese Darstellung wurden die Isolate aller untersuchten Krankenhäuser mit einbezogen (s. Abbildung 49).

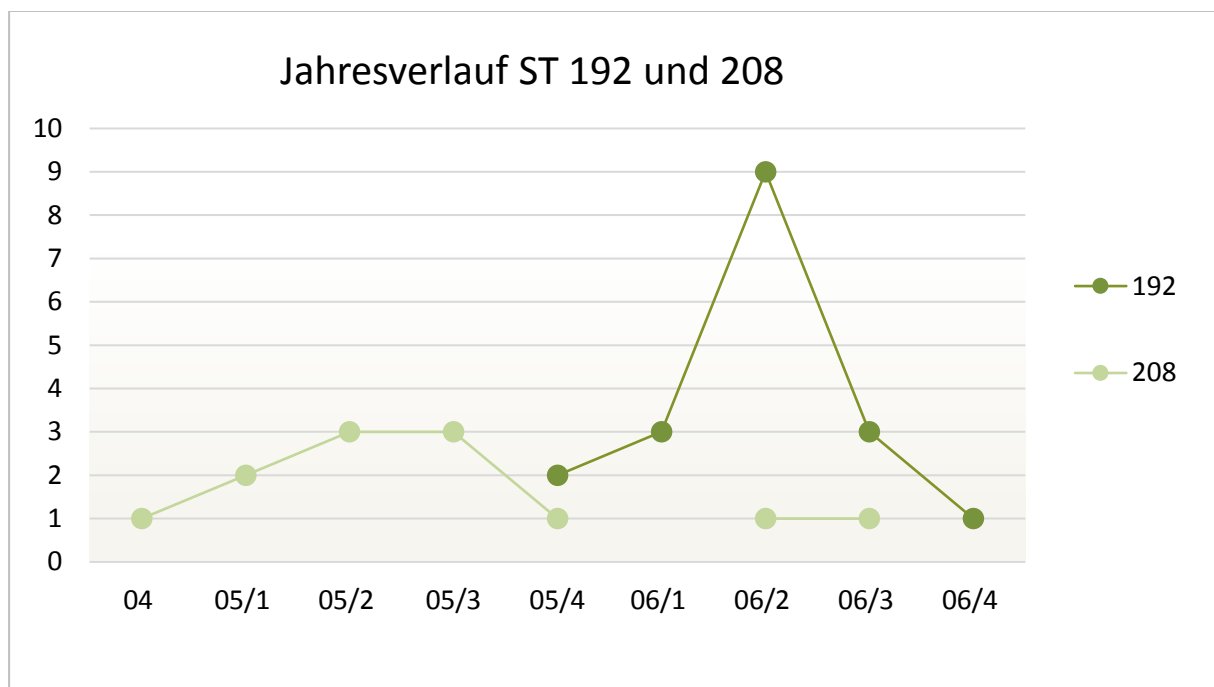


Abbildung 49: MLST-Sequenztypen 192 und 208 der *E. faecium*-Isolate aller untersuchten Krankenhäuser im Jahresverlauf von 2004 bis 2006 (2005 und 2006 vierteljährlich unterteilt)

3.9. Herkunft der Isolate

3.9.1. Verteilung der Sequenztypen auf die verschiedenen Krankenhäuser

Wie schon beim Jahresverlauf wurde auch bei der Verteilung der Sequenztypen auf verschiedene Krankenhäuser besonders auf ST 192 und 208 eingegangen (s. Abbildung 50).

Diese zwei Sequenztypen stellten zusammen über die Hälfte (52%) aller nachgewiesenen Isolate des UKR dar (s. auch Abbildung 47). Zudem ist erkennbar, dass ST 208 hauptsächlich (n = 10 von 12) im UKR auftrat. Lediglich im Bezirksklinikum (BKH) Regensburg sowie im Krankenhaus (KH) Neustadt an der Waldnaab wurde er je einmal identifiziert.

Dem gegenüber steht ST 192 mit nur zwei Nachweisen im UKR und 16 Nachweisen in anderen Krankenhäusern. Vom Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg, den Kliniken Fürth, Landshut und Asklepios Bad Abbach sowie von der Krankenhaus-Gesellschaft Schwandorf wurden ausschließlich Isolate dieses Typus eingeschendet. Im Krankenhaus St. Josef in Regensburg konnte zweimal der ST 192 und ein einzelnes Isolat eines anderen Sequenztyps isoliert werden. Allein das Krankenhaus St. Hedwig in Regensburg wies keinen der beiden häufigsten Typen – weder ST 192 noch ST 208 – auf.

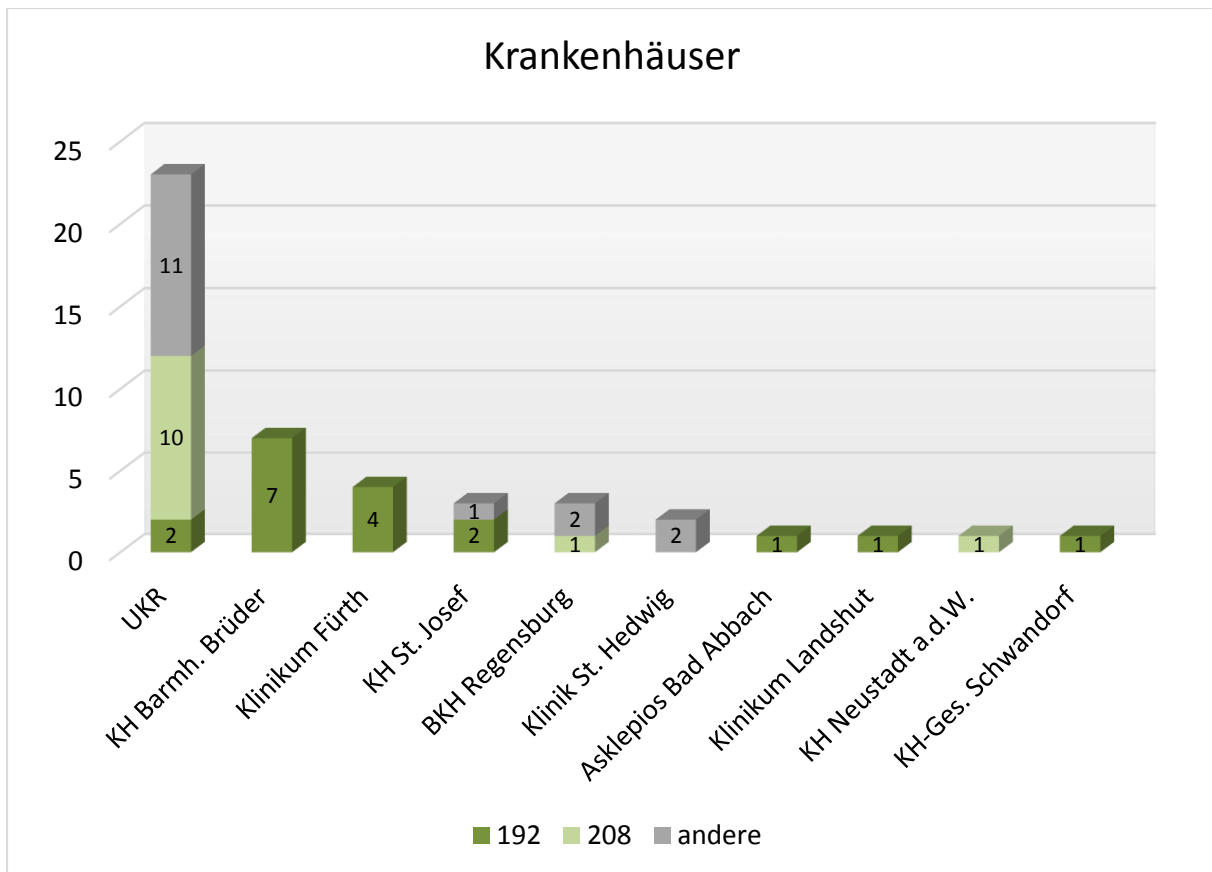


Abbildung 50: Verteilung der häufigsten MLST-Sequenztypen 192 und 208 sowie anderer Sequenztypen auf alle untersuchten Krankenhäuser (KH = Krankenhaus; Barmh. Brüder = Barmherzige Brüder; BKH = Bezirkskrankenhaus; KH-Ges. = Krankenhaus-Gesellschaft; gesamt: 46)

3.9.2. Verteilung der Sequenztypen innerhalb des UKR

3.9.2.1. Verteilung auf die Abteilungen des UKR

Eine Einteilung der 23 VRE-Fälle des UKR erfolgte nach Abteilungen, Stationen und deren Zuordnung zu den Stationsarten Normalstation und Intensivstation.

Die Zuordnung der *E. faecium*-Fälle zu fachspezifischen Abteilungen lässt für das Uniklinikum Regensburg eine deutliche Anhäufung der Einsendungen innerhalb von drei großen Bereichen des Klinikums feststellen: Chirurgie (39%), Hämato-Onkologie (30%) und Innere Medizin (26%). Ein weiteres Isolat konnte der Strahlentherapie zugeordnet werden (s. Abbildung 51).

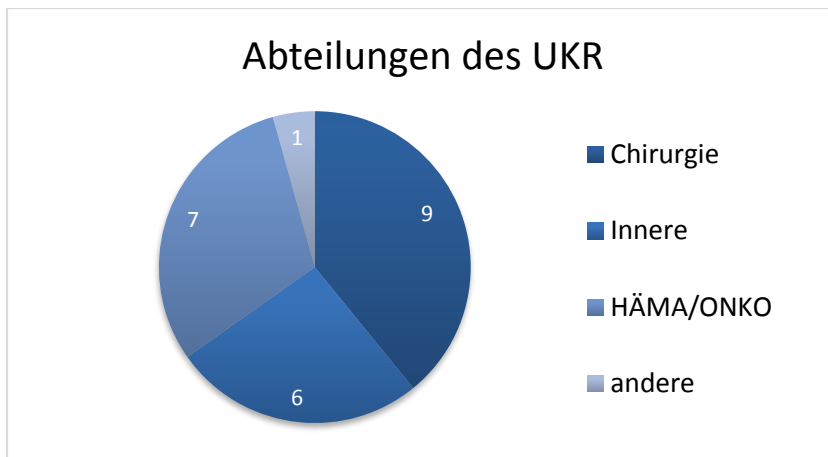


Abbildung 51: Verteilung der *E. faecium*-Fälle auf Abteilungen des UKR (gesamt: 23; HÄMA/ONKO = Hämato-Onkologie)

Analog zum UKR kann bei den *E. faecium*-Einsendungen der neun externen Krankenhäuser eine Anhäufung der Nachweise in der Chirurgie (57%) beobachtet werden. Andere Bereiche des *E. faecium*-Nachweises waren Neurologie (13%) sowie Onkologie (9%) und Orthopädie (4%). Bei einem Isolat der externen Krankenhäuser konnte die einsendende Abteilung nicht bestimmt werden (in Abbildung 53 als Drop-out bezeichnet).

Bei der Betrachtung der *E. faecium*-Fälle nach Stationsarten zeigt sich ein ausgeglichenes Verhältnis von Normalstationen 52% und Intensivstationen 48% (s. Abbildung 52)

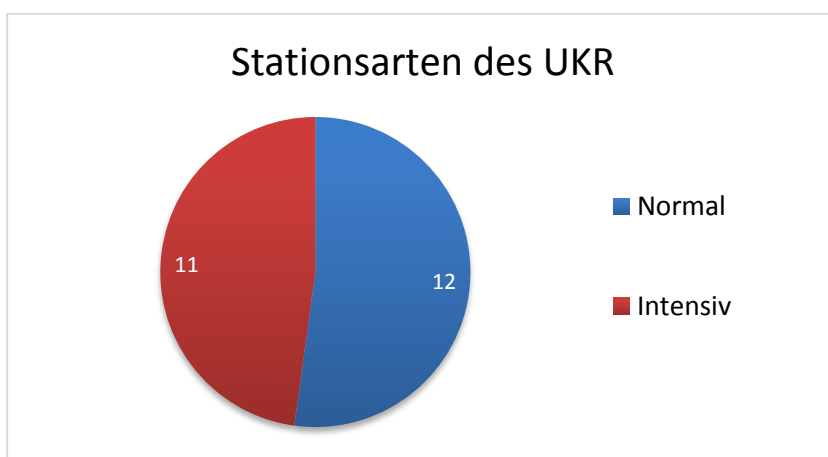


Abbildung 52: Verteilung der VRE-Fälle auf Stationsarten im UKR; (gesamt: 23; Intensiv = Intensivstationen, Normal = Normalstationen)

Unter den von extern eingesendeten VRE-Isolaten anderer Krankenhäuser ergab sich das gleiche Verhältnis der Stationsarten zueinander wie am UKR (Normalstationen 52%, Intensivstationen 48%).

Abbildung 53 zeigt die Verteilung der drei häufigsten Sequenztypen 192, 208 und 17 auf Intensiv- und Normalstationen aller untersuchten Krankenhäuser. Bei den Sequenztypen 192 und 208 überwiegt der Anteil an Proben aus Normalstationen (ST 192: 65%, ST 208: 58%), während ST 17 etwas häufiger auf Intensivstationen (75%) nachgewiesen wurde.

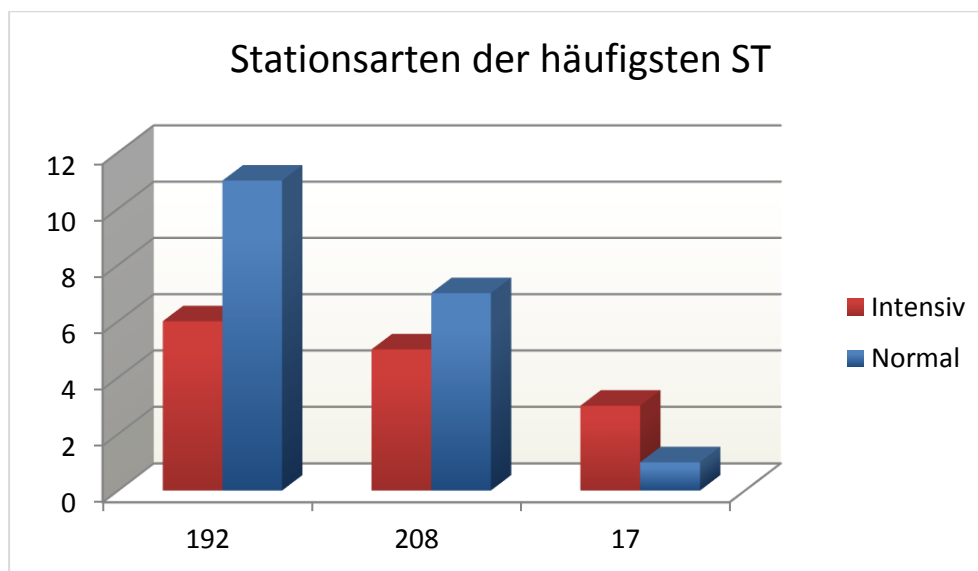


Abbildung 53: Zuordnung der drei häufigsten Sequenztypen ST 192, 208 und 17 zu den Stationsarten Normalstation und Intensivstation unter Einbeziehung aller untersuchten *E. faecium*-Isolate (gesamt: 33; Drop-out: 1; Intensiv = Intensivstationen, Normal = Normalstationen)

3.9.2.2. Verteilung auf die Stationen des UKR

Abbildung 54 zeigt die Verteilung der Sequenztypen der 23 *E. faecium*-Isolate auf die einzelnen Stationen des UKR. Die Zugehörigkeit der einzelnen Stationen zu Abteilungen des UKR kann nachstehender Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 13: Übersicht über Zugehörigkeit von Stationen zu Abteilungen des UKR; (KMT = Knochenmarkstransplantationsstation)

UKR Stationen		
Normal	12	Strahlentherapie
	15	Innere
	21 - KMT	Hämato-Onkologie
	55	Chirurgie
	56	
	57	
Intensiv	90	Chirurgie
	92	Innere
	97	Chirurgie

Unter den Normalstationen stellte sich mit 30% der Einsendungen eine Anhäufung der *E. faecium*-Fälle in der Knochenmarkstransplantations-Station (KMT) 21 der Hämato-Onkologie dar. Zudem zeigte sich ein häufigerer *E. faecium*-Nachweis in den Intensivstationen 90, 92 und 97. In den Stationen 12, 15, 55, 56 und 57 trat jeweils nur einmal ein VRE auf.

Die Zuordnung von MLST-Sequenztypen der 23 *E. faecium*-Isolate auf die Stationen des UKR zeigte eine Verteilung des ST 208 auf Normal- und Intensivstationen. Eine leichte Häufung mit drei bzw. zwei Fällen fand auf Station 92 und der Knochenmarkstransplantationsstation 21 statt. Zudem konnte auf der Station 21 dreimal der ST 780 nachgewiesen werden. Dieser war im untersuchten Zeitraum in keinem anderen Krankenhaus der Region zu finden. ST 192 wurde je einmal auf Station 90 und 92 gefunden. Beide gehören zum Intensivbereich. Eine Isolierung des ST 17 erfolgte für die Stationen 90, 92 und 21. Von den weiteren Sequenztypen 186 (Station 12 und 21), 203 (Station 90) und dem neuen Sequenztypus (Station 57), konnte nur ST 203 auch in einem externen Krankenhaus nachgewiesen werden.

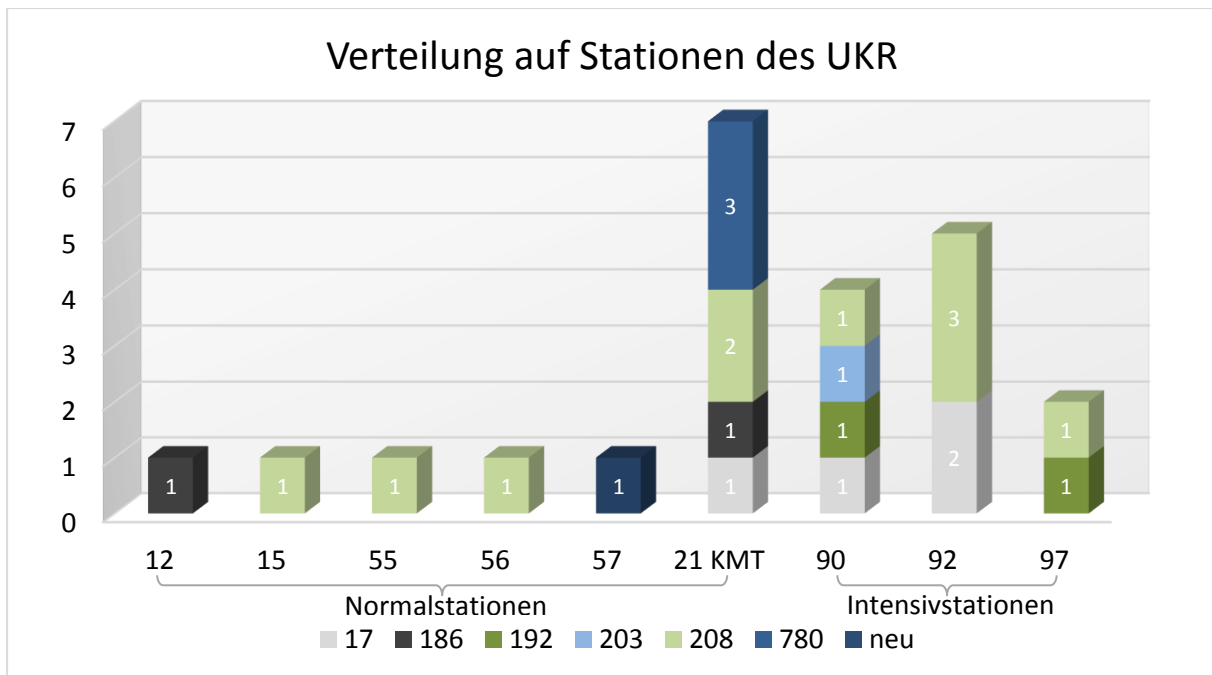


Abbildung 54: Verteilung der verschiedenen Sequenztypen der *E. faecium*-Isolate auf die Stationen des UKR; (gesamt: 23; KMT = Knochenmarkstransplantationsstation)

3.10. Material

3.10.1. Kulturelle Nachweise und Screenings

In den Jahren 2004 bis 2006 wurden *E. faecium* zum Nachweis hauptsächlich in Routinekulturen angezüchtet (98%). Es wurde lediglich ein einzelnes VRE-Screening-Isolat in die Untersuchung einbezogen, das durch einen Rektalabstrich in einem externen Krankenhaus entnommen wurde (s. Abbildung 55).

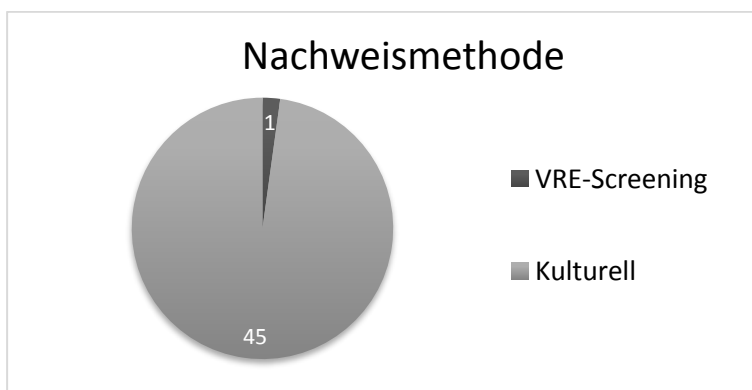


Abbildung 55: Anteil der Nachweismethoden VRE-Screening und kultureller Nachweis (gesamt 46)

3.10.2. Materialgruppen

Eine Zuordnung der untersuchten *E. faecium*-Proben zu Materialgruppen wird in Abbildung 56 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurde die Einteilung analog zum Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 vorgenommen [6]. Wundabstriche von abdominal, rektal, urethral, subkutan sowie von Galle, Dekubitus und Colonfistel wurden zu „Wundabstrichen“ zusammengefasst. Dazu wurden ebenso Abstriche von Wunden im Bereich von Drainagen und PEG-Einstichen (Perkutane Endoskopische Gastrostomie) oder Abszessabstriche gerechnet. Alle Abstriche, die keiner Wunde entstammten, z.B. Abstriche der Haut von Leiste und Gesicht oder Vaginalabstriche wurden als „Abstriche“ bezeichnet. Die Einteilung der restlichen Gruppen erfolgte in: „Punktat“, „Blutkultur“, „Katheterspitze“, „Urin“, „Drainage/Sekret“, „Bronchoalveoläre Lavage (BAL)/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich“ und „Rektalabstrich/Perianalabstrich/Stuhl“.

Der größte Anteil zeigte sich im Bereich der Wundabstriche (46%). Zudem waren Nachweise in Punktaten (15%), Blutkulturen (11%) und Abstrichen (9%) gehäuft.

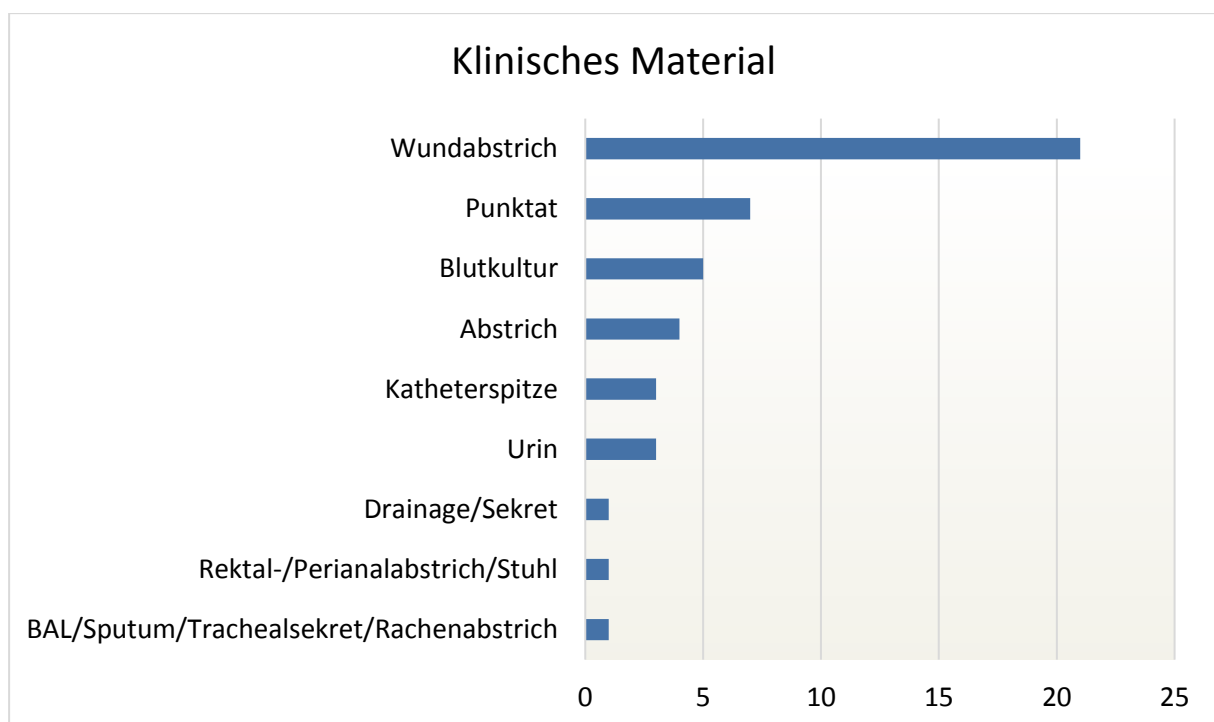


Abbildung 56: Materialgruppen der *E. faecium*-Proben (BAL = Bronchoalveoläre Lavage; gesamt: 46)

3.10.3. Kolonisierungen und Infektionen

Die einzelnen Materialgruppen konnten in eine Kolonisierung des Patienten bzw. eine mögliche bakterielle Infektion unterteilt werden. Als Kolonisierung wurden Isolate aus den Gruppen Abstrich, BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich und Rektalabstrich/Perianalabstrich/Stuhl gewertet. Von einer möglichen Infektion wurde bei Proben aus Wundabstrichen, Punktaten, Blutkulturen, Katheterspitzen und Drainagen/Sekreten ausgegangen.

Bei den Isolaten der Materialgruppe Urin erfolgte die Einteilung für jedes Isolat einzeln. Im Falle einer Keimzahl von $>10^5$ /ml bei einem einzeln untersuchten *E. faecium*-Isolat, wurde von einer möglichen Infektion ausgegangen. Bei niedrigerer Keimbesiedlung oder bei gleichzeitiger Untersuchung mehrerer Keime pro Antibiotogramm wurde das Isolat als Kolonisierung gewertet.

Der Anteil an *E. faecium*-Kolonisierungen lag bei 20%, von einer VRE-Infektion wurde in 80% der Fälle ausgegangen (s. Abbildung 57).

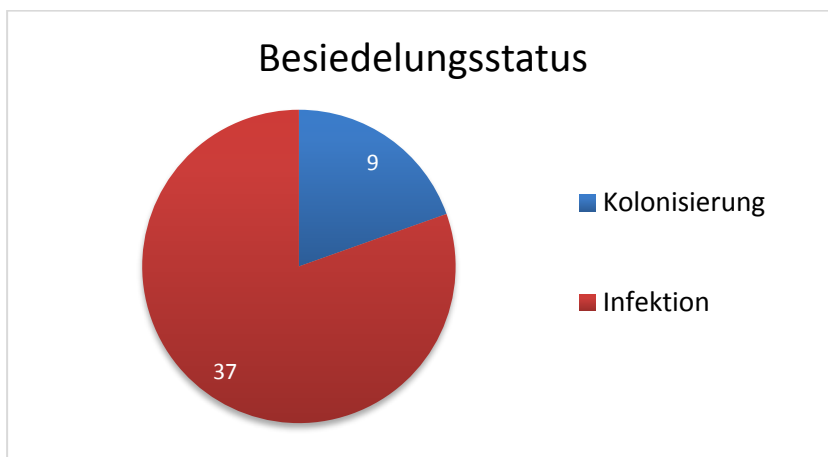


Abbildung 57: Verteilung von Kolonisierungen und möglichen Infektionen mit *E. faecium* (gesamt: 46)

Nachstehende Abbildung 58 stellt den Anteil der MLST-Sequenztypen von *E. faecium* an Kolonisierungen und möglichen Infektionen dar. Einzelne Sequenztypen konnten jeweils nur als Infektion (ST 18, 125, 203, neu), andere nur im Rahmen einer Kolonisierung (ST 78, 202) nachgewiesen werden. Die Sequenztypen 17, 186, 192

und 780 zeigten sich in beiden Besiedlungsformen, wobei die Häufigkeit der Infektionen bei ST 192 und 208 deutlich überwog.

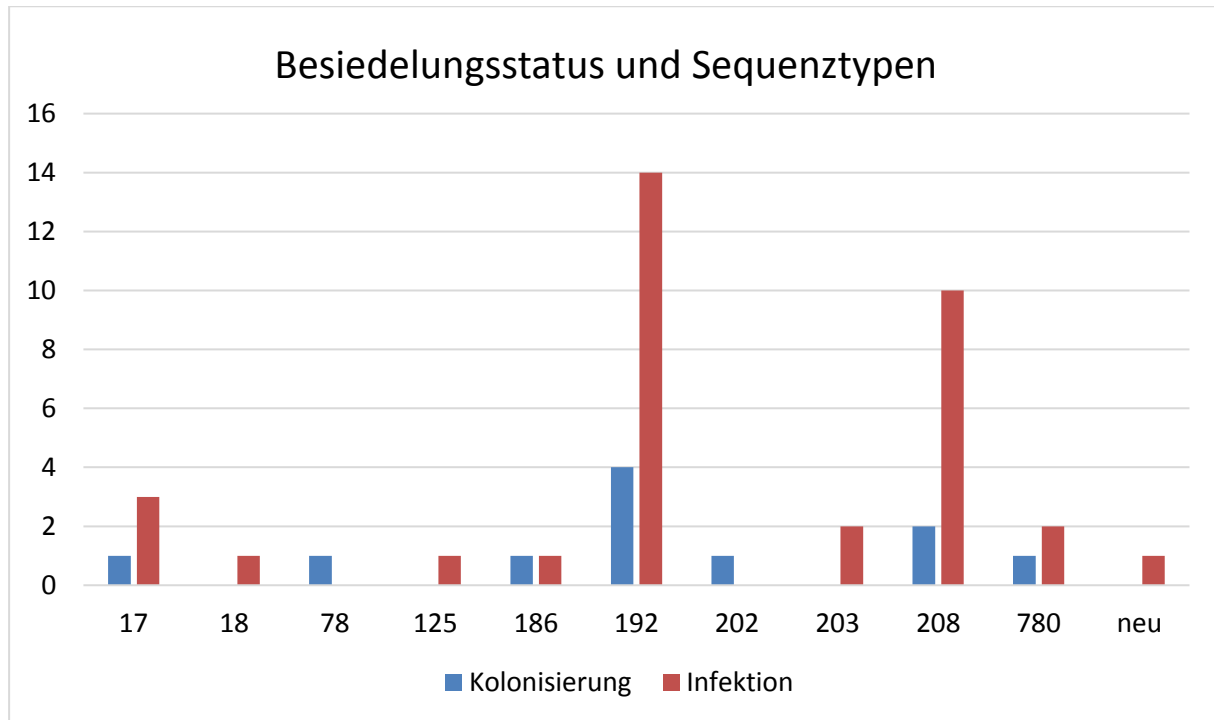


Abbildung 58: Anzahl der Fälle an Kolonisierungen und möglichen Infektionen mit *E. faecium* zugeordnet zu Sequenztypen (gesamt: 46)

3.11. Patientenwiederholungen

In zwei Fällen konnten VRE-Isolate demselben Patienten zugeordnet werden. Bei einem Patienten wurde im Abstand von zwei Monaten je eine Probe eingesendet, die beide Male einen *vanB*- und *hyl*-positiven Sequenztyp 192 mit vier *espA*-Repeats ergab. Der Patient befand sich durchgehend auf derselben Station und die Proben entstammten einem ähnlichen Kompartiment (Abstrich Haut rektal – Abstrich Wunde Colonfistel) (s. Abbildung 59). Wie bereits erwähnt wurde dieser Doppelnachweis in den meisten Auswertungen nur einfach gewertet.

<p>03.01.06 ST 192 <i>vanB</i> 4 <i>espA</i>-Repeats, <i>hyl</i>-pos.</p>	<p>28.03.06 ST 192 <i>vanB</i> 4 <i>espA</i>-Repeats, <i>hyl</i>-pos.</p>
→	
<p>Barmherzige Brüder Anästhesie – O ITS St. Pius Rektalabstrich</p>	<p>Barmherzige Brüder Anästhesie – O ITS St. Pius Wunde Colonfistel</p>

Abbildung 59: VRE-Mehrfachnachweis von Patient 1: ST 192 (ST = Sequenztyp; pos. = positiv; O ITS = operative Intensivstation)

Das andere Mehrfachisolat zeigte im Abstand von etwa 1,5 Monaten hingegen unterschiedliche Sequenztypen. Auch dieser Patient wurde nicht verlegt. Allerdings wurde der *vanB*- und *hyl*-positive ST 780 mit vier *espA*-Repeats einem Rektalabszess entnommen, während der *vanB*-positive und *hyl*- sowie *esp*-negative ST 17 aus der Blutprobe eines ZVK angezüchtet werden konnte (s. Abbildung 60). Da hier zwei unterschiedliche Sequenztypen vorlagen, wurden beide Isolate in die Auswertungen einbezogen.

<p>08.06.06 ST 780 <i>vanB</i> 4 <i>espA</i>-Repeats, <i>hyl</i>-pos.</p>	<p>27.07.06 ST 17 <i>vanB</i> <i>esp</i>-neg., <i>hyl</i>-neg.</p>
→	
<p>UKR HÄMA/ONKO 21 KMT Rektalabszess</p>	<p>UKR HÄMA/ONKO 21 KMT Blut ZVK</p>

Abbildung 60: VRE-Mehrfachnachweis von Patient 2: ST 780 → ST 17 (ST = Sequenztyp; pos. = positiv; neg. = negativ; HÄMA/ONKO = Hämato-Onkologie; KMT = Knochenmarkstransplantationsstation; ZVK = Zentralvenenkatheter)

4. Diskussion

4.1. Hinführung

Enterokokken sind Bakterien, die ubiquitär in der Umwelt zu finden sind und auch im Darmtrakt des Menschen als harmlose Kommensalen auftreten. Sie können jedoch gerade bei geschwächten Patienten schwerwiegende Erkrankungen wie nosokomiale Harnwegsinfekte, Endokarditis oder Peritonitis hervorrufen. [1] Lange galten jene Infektionen als gut behandelbar [4]. Neben einer Reihe an natürlichen Resistenzen weisen Enterokokken jedoch seit der Jahrtausendwende immer häufiger auch erworbene Antibiotikaresistenzen auf, die diese Erreger zunehmend zum Therapieproblem werden lassen. Während zunächst *E. faecalis* für die meisten Infektionen mit Enterokokken verantwortlich war, gilt mittlerweile *E. faecium* als häufigste humanpathogene Enterokokkenspezies. [7] Dabei ist besonders die steigende Resistenz gegenüber Vancomycin problematisch, weil dieses Antibiotikum als Standardtherapeutikum bei den weit verbreiteten Ampicillin-resistenten Enterokokkenstämmen eingesetzt wird [9].

Die Vancomycinresistenz unter den invasiven *E. faecium*-Isolaten stieg in Deutschland von 3% im Jahr 2003 zunächst schwankend auf 16% in den Jahren 2012 [8] und 2014, sank dann 2015 auf 9% und erhöhte sich seitdem wieder bis auf aktuell 12% im Jahr 2016 [54]. Für die Spezies *E. faecalis* betrug der Anteil an Vancomycin-resistenten Stämmen meist unter 1% [8]. Damit lag Deutschland beim Auftreten von Resistenzen gegen Vancomycin bei invasiven *E. faecium*-Isolaten europaweit im Jahr 2016 prozentual im mittleren Bereich (s. Abbildung 61). [54]

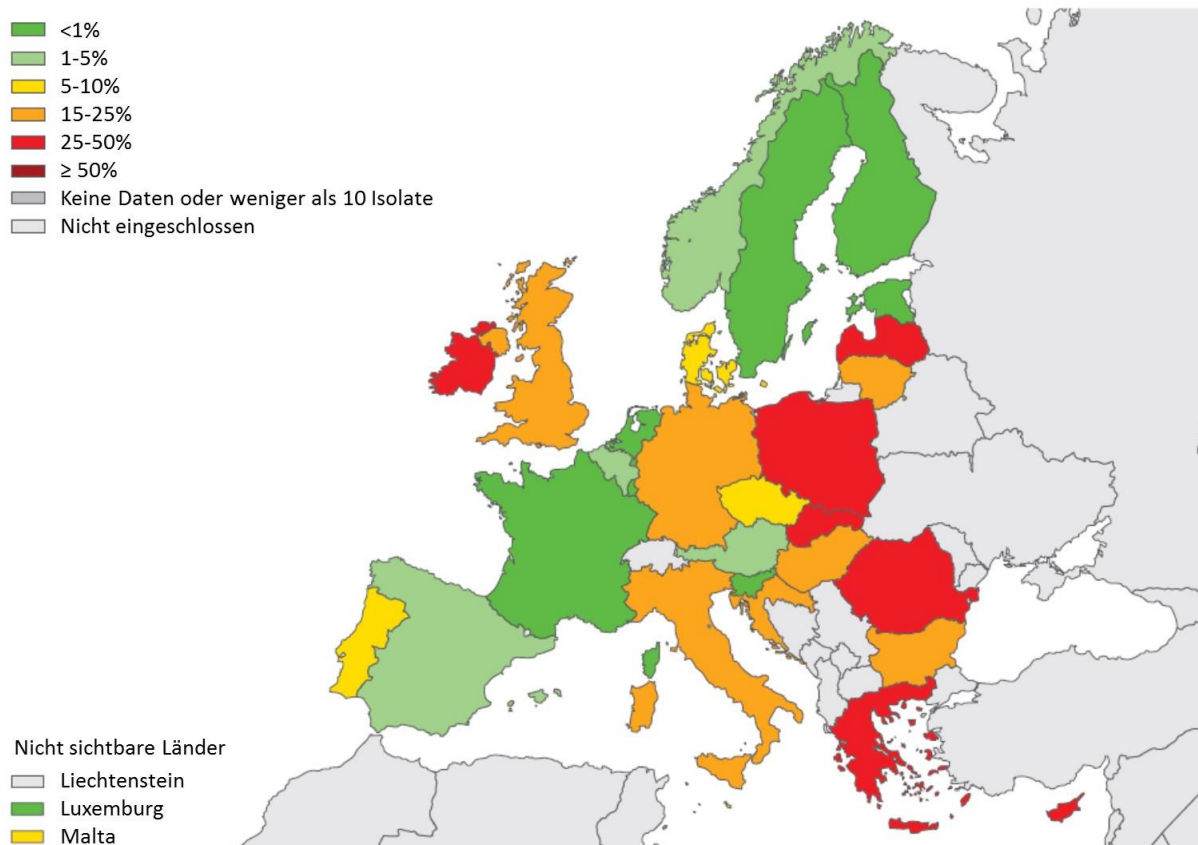


Abbildung 61: Prozentualer Anteil an Vancomycinresistenzen unter invasiven *E. faecium*-Isolaten der einzelnen europäischen Länder im Jahr 2016 (aus Blutkulturen); nach dem European Centre for Disease Prevention and Control [54]

Das gehäufte Vorkommen von Vancomycinresistenzen unter *E. faecium*-Stämmen stellt somit sowohl in Deutschland als auch im Rest Europas nach wie vor ein ernst zu nehmendes Problem dar. Um zukünftig die weitere Ausbreitung dieser Bakterien zu einzudämmen und geeignete Barrieremaßnahmen zu ergreifen, ist es sehr wichtig, die Epidemiologie der verschiedenen Subtypen besser zu verstehen.

Diese Dissertation ist Teil einer größeren retrospektiven Studie, die durch weitere Doktoranden und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wulf Schneider am Institut für Mikrobiologie und Hygiene (IMHR) des UKR durchgeführt wird. Das Gesamtkonzept liegt in einer molekularbiologischen epidemiologischen Analyse aller Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate der VRE-Stammsammlung des UKR seit 2004. Die Besonderheit ist, dass dies eines der wenigen Institute ist, die seit dem ersten klinikinternen Auftreten von VRE systematisch alle VRE-Erstisolate untersucht

und einer Stammsammlung hinzugefügt haben. Dadurch lässt sich in der Gesamtheit der Arbeiten die Ausbreitung distinkter MLST-Sequenztypen in dieser Zeit stellvertretend für größere Krankenhäuser Süddeutschlands darstellen. Die vorliegende Dissertation behandelt den Zeitraum 2004 bis 2006, entsprechend dem Beginn des Auftretens von VRE am UKR. Dabei wurde insbesondere auf die Isolate des UKR selbst, deren Sequenztypen und Virulenzfaktoren sowie den Ursprung der Isolate – hinsichtlich der Abteilung und Station, aber auch des Probenmaterials – Wert gelegt.

4.2. Alters- und Geschlechtsverteilung

Für den Zeitraum 2004 bis 2006 konnten aus der Stammsammlung des UKR 53 VRE-Isolate von 51 verschiedenen Patienten aufgetaut und analysiert werden. Davon stammten 24 aus dem UKR und 29 aus umliegenden Krankenhäusern der Region. Da eine Vancomycinresistenz bei der Spezies *E. faecium* verglichen mit *E. faecalis* wesentlich häufiger auftritt [7,8,54], erfolgten die meisten Auswertungen dieser Arbeit nur für *E. faecium*-Isolate, nicht jedoch für andere Enterokokkenspezies.

Insgesamt konnte bei den Patienten mit *E. faecium*-Isolaten ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis und eine geschlechtsunabhängig zunehmende Alterstendenz verzeichnet werden.

Der demografische Wandel in Deutschland führt zu einem steigenden Anteil älterer Patienten. Diese besitzen meist ein schlechteres Immunsystem, sind somit anfälliger für Krankheiten und befinden sich auch aufgrund von Grunderkrankungen häufiger und länger in Krankenhäusern. Enterokokken sind dafür bekannt, insbesondere bei immunschwachen Menschen schwerwiegende Erkrankungen hervorzurufen. Dazu gehören nicht nur ältere Menschen, sondern auch Säuglinge und Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immundefiziten. [1,55] Auch die ständige Entwicklung neuer invasiver Behandlungstechniken vor allem in Industrieländern lässt die Anzahl der Risikopatienten für Enterokokkeninfektionen ansteigen [9].

4.3. Jahresverlauf der VRE-Fälle

Im Verlauf der Jahre 2004 bis 2006 zeigte sich eine deutliche Zunahme der untersuchten VRE-Fälle am UKR, die sowohl vom UKR selbst als auch von Krankenhäusern der Umgebung stammten. Dies resultiert insbesondere aus der Verbreitung resistenter VRE-Stämme, wahrscheinlich spielt aber auch das spätere VRE-Screening eine Rolle bei dieser Entwicklung. Da zu Beginn des VRE-Auftretens am UKR noch keine systematischen VRE-Screenings erfolgten, wurden vermutlich zunächst viele Kolonisierungen mit diesen Erregern nicht diagnostiziert. Im deutschlandweiten Trend zeigte sich der Anstieg von Infektionen mit Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten vor allem von 2001 bis 2004, im beobachteten Zeitraum 2004 bis 2006 war die Tendenz leicht rückläufig [56]. In den Jahren danach kam es jedoch wieder zu einem starken Anstieg von Infektionen mit Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Stämmen [54] (s. Abschnitt 4.1). Der Vergleich mit unveröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Wulf Schneider am IMHR zeigt, dass sich auch im UKR die Anzahl der VRE-Fälle seit 2004 ($n = 1$) deutlich erhöht hat. Abbildung 62 stellt den zweigipfligen Verlauf der Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Fälle am UKR mit dem ersten Gipfel im Jahr 2008 ($n = 126$), rückläufiger Tendenz in den Jahren 2009 ($n = 50$) und 2010 ($n = 36$) und einem starken Anstieg seit 2011 ($n = 163$) bis zum bisherigen Maximum im Jahr 2013 ($n = 557$) dar. Seitdem befinden sich die Fallzahlen leicht schwankend auf einem hohen Niveau, wobei die Anzahl der mitgebrachten VRE-Fälle seit 2013 deutlich über der Anzahl der nosokomialen Fälle liegt.

Entwicklung der VRE-Fälle am UKR

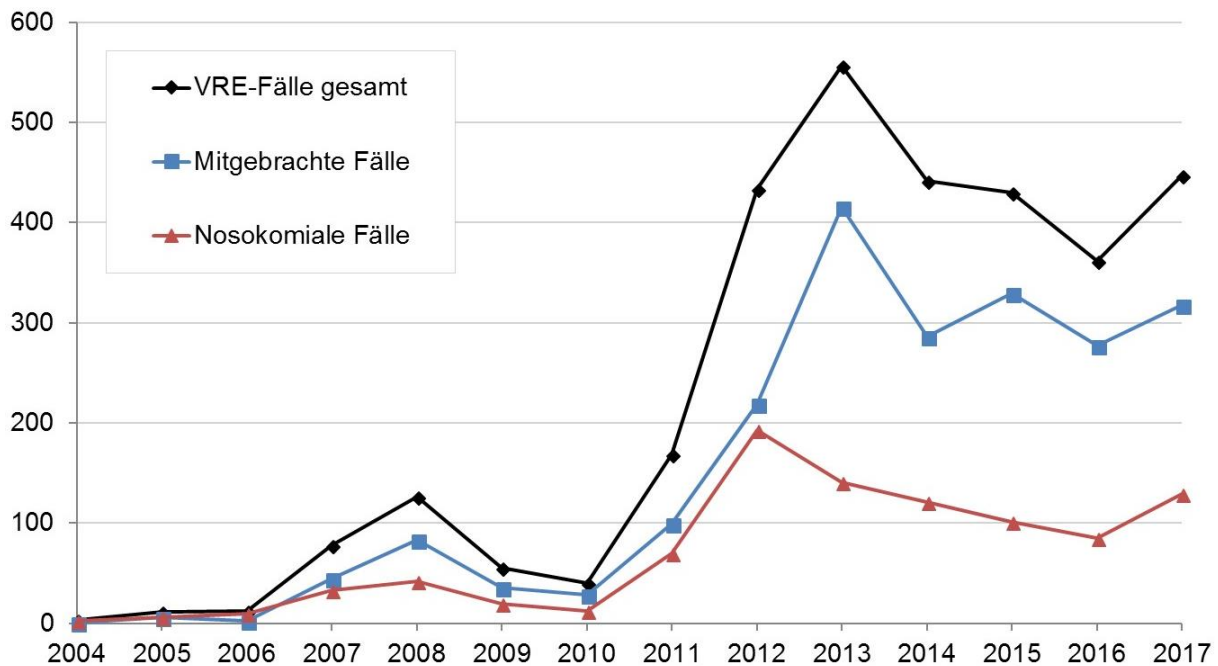


Abbildung 62: Verteilung der VRE-Fälle am UKR von den Jahren 2004 bis 2014 (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Wulf Schneider des Instituts für klinische Mikrobiologie und Hygiene am UKR)

Aufgrund der höheren Fallzahlen wurde das Jahr 2006 stellvertretend für den untersuchten Zeitraum 2004 bis 2006 ausgewertet. Im Verlauf dieses Jahres zeigten sich die VRE-Fälle gehäuft in den Monaten April bis Juli ($n = 4-5$) und seltener von August bis Oktober sowie im Dezember und Januar ($n = 1-2$). Zusammengefasst lässt sich ein leichter Anstieg in den wärmeren Monaten von Frühling bis in den Hochsommer erkennen. Da eine derartige Differenzierung in der Literatur bisher nicht durchgeführt wurde und die VRE-Fallzahl im UKR im Jahr 2006 verglichen mit den darauffolgenden Jahren noch sehr niedrig war (s. Abbildung 62), bedarf es diesbezüglich weiterer Untersuchungen.

4.4. Enterokokkenspezies

Die Basis dieser Arbeit stellte die VRE-Stammsammlung des UKR dar. Eingefrorene VRE-Isolate, bei denen kein Hinweis auf *E. faecalis*, *E. gallinarum* oder *E. casseliflavus* zu finden war, wurden unter Verdacht eines *E. faecium*-Isolates aufgetaut. Nach den Laborstandards der Jahre 2004 bis 2006 wurden alle VRE, die Ampicillin-resistent waren, kollektiv als *E. faecium* klassifiziert. Mit dem Bewusstsein, dass diese Methode eine gewisse Unschärfe hinterlässt, wurden die Isolate nach dem Auftauen mittels MALDI-TOF-Technologie spezifiziert. Dabei wurde festgestellt, dass es sich in fünf der untersuchten 53 Isolate um die Spezies *E. gallinarum* handelte. Ein einzelnes *E. faecalis*-Isolat wurde bei genauer Recherche bereits 2005 als *E. faecalis* erkannt, damals jedoch falsch klassifiziert. Bei allen Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten wurden weitere Laboruntersuchungen wie z.B. Resistenztestungen gegenüber verschiedenen Antibiotika, PCRs zur epidemiologischen Typisierung oder PCRs zum Nachweis von Virulenzmarkern durchgeführt.

4.5. Resistenzen

Für die Therapie von Erkrankungen, die durch Enterokokken (insbesondere *E. faecalis*) verursacht werden, wird meist ein Aminopenicillin wie Ampicillin oder Amoxicillin verwendet. Bei schwereren Formen sollte dieses Medikament mit einem Aminoglykosid kombiniert werden, um einen synergistischen Effekt zu erzielen (s. Abschnitt 1.2.1). Liegt bereits gegen einen der beiden Wirkstoffe eine Unverträglichkeit seitens des Patienten oder eine Resistenz des Enterokokkus vor, werden Glykopeptide wie Vancomycin oder Teicoplanin verwendet. Mittlerweile sind bei *E. faecium*-Isolaten nicht nur in nahezu allen Fällen Aminopenicilline, sondern oft auch Glykopeptide wirkungslos, sodass nur noch auf Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin zurückgegriffen werden kann. Gegen diese drei Antibiotika wurden bisher glücklicherweise nur vereinzelt Resistenzen gefunden [9].

Im Rahmen der durchgeführten Laboranalysen wurden daher neben der Vancomycinresistenz auch die klinisch wichtigen Resistenzen gegenüber den zwei Reserveantibiotika Teicoplanin und Linezolid getestet.

Die genetische Vancomycinresistenz bei *E. faecium*-Isolaten lag in anderen deutschen Krankenhäusern im untersuchten Zeitraum vorwiegend in Form des Resistenzgens *vanA* vor. Abele-Horn et al. beispielsweise konnten in den Jahren 2000 bis 2004 ausschließlich *vanA*-positive und *vanB*-negative Isolate nachweisen [57]. Auch Werner et al. untersuchten nur Isolate mit dem im Zeitraum 2004 bis 2006 häufigeren Genotyp *vanA* [43]. In den nachfolgenden Jahren wurde deutschlandweit ein zunehmendes Auftreten von *vanB*-positiven *E. faecium*-Stämmen verzeichnet. Die Einsendungen des Robert Koch Instituts (RKI) lassen erkennen, dass bis 2008 deutlich mehr *vanA*- als *vanB*-positive *E. faecium*-Stämme vorkamen. Erst im Jahr 2009 trat der *vanB*-Genotyp häufiger auf als *vanA*. [2]

Die vorliegende Arbeit hingegen zeigt, dass im UKR und den Krankenhäusern der Umgebung bereits 2004 bis 2006 deutlich der *vanB*-Genotyp (n = 43 von 47) überwog. Diese Entwicklung bestätigen auch die Ergebnisse der am UKR parallel durchgeführten Arbeiten über die folgenden Jahre, bei denen kaum noch *vanA*-positive *E. faecium*-Isolate diagnostiziert wurden. Insgesamt ergaben sich dabei in den Jahren 2004 bis 2010 am UKR nur neun *vanA*- und 243 *vanB*-Nachweise (unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider des IMHR). Außerhalb des UKR zeigte lediglich eine Studie aus einem südwestdeutschen Krankenhaus eine ähnliche Tendenz in diesem Zeitraum: Für das Jahr 2005 wurden in 92,7% der Fälle *vanB*-positive *E. faecium*-Isolate gefunden, nur 7,3% waren *vanA*-positiv. [58]

Eine mögliche Erklärung für die deutschlandweiten gegensätzlichen Trends wäre, dass sich einzelne der im Raum Regensburg vorliegenden *vanB*-positiven *E. faecium*-Stämme klonal ausgebreitet haben. Trotz einer deutlichen Anhäufung zweier MLST-Sequenztypen wurden in dieser Studie jedoch auch viele einzeln vorkommende Sequenztypen gefunden, sodass nicht von einer rein monoklonalen Ausbreitung ausgegangen werden kann. Aus diesem Grund ist neben einer vertikalen – und somit klonalen Ausbreitung von *vanB*-positiven Stämmen auch ein horizontaler Transfer der *vanB*-Genkassette unter den *E. faecium*-Stämmen in Betracht zu ziehen. Dieser Übertragungsweg wurde sowohl für *vanA* als auch für *vanB* mehrfach in Studien beschrieben. Dabei kommt es zur Ausbreitung zunächst Vancomycin-sensibler Enterokokkenstämme, die im Verlauf Vancomycin-Resistenzgene erwerben. Insbesondere *E. faecium*-Stämme des Krankenhaus-adaptierten klonalen Komplexes

17 (CC17 s. Abschnitt 1.4) sind dafür bekannt. [43,59,60] Um eine Übertragung der Resistenzgene zu erkennen, müsste in weiteren Untersuchungen eine genaue Analyse der Basenfolge der jeweiligen *vanA*- und *vanB*-Genkassetten durchgeführt werden.

Da eines der vier Isolate des MLST-Sequenztyps 17 im UKR im Gegensatz zu den restlichen drei Isolaten den *vanA*-Genotyp aufwies, ist zudem an eine weitere Verbreitungsvariante der Resistenzgene zu denken. In diesem Fall erfolgte möglicherweise ein Wechsel des *vanA/B*-Genotyps während eines Ausbruchs, wie er bereits 1997 von Woodford beschrieben wurde. Durch zwei Plasmide wechselte ein Stamm damals vom Genotyp *vanB* über die Zwischenstufe mit beiden Resistenzgenen auf den Genotyp *vanA*. [61] Dieses Szenario ist auch umgekehrt ausgehend vom *vanA*-Gen denkbar.

Auch wenn eine klonale Ausbreitung von *vanB*-positiven Stämmen oder eine horizontale Genübertragung ein möglicher Grund für die besondere Ausbreitung von *vanB*-tragenden Enterokokken im Raum Regensburg ist, bleibt dennoch die Frage warum dieses Phänomen nicht ebenso in vielen anderen Krankenhäusern Deutschlands zu finden war.

Möglicherweise spielt bei der Dominanz bestimmter Genotypen auch der krankenhauserneinsatz von Antibiotika eine Rolle. In den USA war zu dieser Zeit der Anteil an *vanB*-positiven Isolaten deutlich höher als in Deutschland. Der Grund dafür war vermutlich der Einsatz von Teicoplanin in Deutschland, nicht aber in den USA. Beim Einsatz dieses Antibiotikums führt die Teicoplaninresistenz der *vanA*-Kassette wahrscheinlich zu einer Selektion des *vanA*-Genotyps. [52] Demnach wäre es vorstellbar, dass es mit dem *vanB*-Cluster ähnliche Zusammenhänge gibt, die bei verstärktem Einsatz eines Medikaments zur Selektion von *vanB* führen. Um diesen Aspekt zu klären, bedarf es jedoch weiterer Studien.

Das vermehrte *vanB*-Auftreten im Raum Regensburg kann zudem auch aus der Art und Weise resultieren nach der die VRE-Isolate ausgewählt wurden. In der Studie von Werner et al. beispielsweise wurden Enterokokken erst mit einer $MHK_{\text{Vancomycin}} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ als resistent eingestuft [43]. In vorliegender Studie des UKR (wie auch in oben genannter Dissertation mit *vanB*-Dominanz in diesem Zeitraum [58]) hingegen

wurden bereits intermediäre Isolate mit einer $MHK_{\text{Vancomycin}} \geq 8 \mu\text{g/ml}$ berücksichtigt. Da das *vanA*-Gen in der Regel eine High-Level-Resistenz gegenüber Vancomycin ($MHK > 64 \mu\text{g/ml}$) codiert, während *vanB* auch intermediäre oder Low-Level-Resistenzen beinhaltet [18], ist es somit möglich, dass in einigen Studien ein beträchtlicher Teil der *vanB*-positiven Isolate nicht zur Analyse herangezogen wurde. Dies würde das Verhältnis unbewusst zugunsten des *vanA*-Gens verändern.

Obwohl all diese Anhaltspunkte denkbar sind, ist eine endgültige Aussage zum Grund des vermehrten *vanB*- Auftretens im Raum Regensburg im Rahmen dieser Studie nicht möglich. Wahrscheinlich bestand ein Zusammenspiel vieler Faktoren, die dieses Ergebnis begünstigt haben.

Alle aufgetauten VRE-Isolate der Stammsammlung des UKR erwiesen sich in dieser Studie als genotypisch Vancomycin-resistent. Dennoch zeigten einzelne Isolate in der phänotypischen Testung mittels automatisierter Mikrodilution (BD Phoenix) eine Sensibilität gegenüber Vancomycin. Dafür ursächlich ist vermutlich, dass der in dieser Studie dominierende Genotyp *vanB* wie bereits erwähnt mit verschiedenen Resistenzgraden einhergehen kann [18]. In dieser Studie zeigten die untersuchten *vanB*-positiven Isolate nur in knapp 20% eine $MHK_{\text{Vancomycin}} \geq 32 \mu\text{g/ml}$. Die *vanA*-positiven Stämme hingegen wiesen alle eine MHK dieser Größe auf. Die geringere MHK scheint die phänotypische Sensibilität einzelner *E. faecium*-Isolate trotz Vorliegen des *vanB*-Gens zu erklären. Auch die Untersuchungen des RKI der Jahre 2006/2007 zeigten in nur 67,8% der genotypisch *vanB*-positiven *E. faecium*-Isolate gleichzeitig eine phänotypische Vancomycinresistenz (*vanA*: 99,3%). Da die Wirkung von Antibiotika im Körper nicht mit der Wirkung in in vitro-Tests gleichzusetzen ist, sollten Enterokokken mit nachgewiesenem *vanB*-Gencluster auch bei einer phänotypischen Sensibilität als potenziell Vancomycin-resistent eingestuft werden. [55]

Gegenüber dem zweiten getesteten Glykopeptid-Antibiotikum Teicoplanin waren die meisten untersuchten Isolate dieser Studie ($n = 41$ von 46) sensibel. Den Erwartungen entsprechend wiesen jedoch alle fünf *vanA*-positiven *E. faecium*-Isolate, einschließlich des *vanA*- und *vanB*-positiven Stammes eine Teicoplaninresistenz auf, da das *vanA*-Gen in den meisten Fällen mit einer Kreuzresistenz gegenüber Teicoplanin einhergeht (s. Abschnitt 1.2.3). Zudem konnte bei einem einzelnen *vanB*-positiven Isolat eine

phänotypische Teicoplaninresistenz gezeigt werden. Auch das *vanB*-Gen kann – wenn auch in wesentlich geringerem Umfang – eine Teicoplaninresistenz verursachen. Das RKI zeigte in den Jahren 2006/2007 in 75,3% der Isolate mit *vanA* eine Teicoplaninresistenz und bei keinem Fall mit *vanB*. Während sich der Anteil an Vancomycin- und Teicoplaninresistenzen unter den *E. faecium*-Isolaten deutscher Krankenhäuser in den ersten Jahren kaum unterschied, zeigt sich seit dem vermehrten Auftreten von *vanB* in den letzten Jahren logischerweise ein immer geringer werdender Prozentsatz der Teicoplanin-resistenten Stämme [8].

Bei fehlender Wirksamkeit von Teicoplanin können nur noch Reserveantibiotika wie Linezolid, Daptomycin und Tigecyclin angewandt werden. Eine Resistenz gegenüber Linezolid wurde in dieser Studie unter den Befunden der Jahre 2004 bis 2006 lediglich bei einem *vanB*-positiven *E. faecium*-Stamm gefunden. Nach dem Auftauen der Isolate im Jahr 2016 zeigte sich dieser Stamm Linezolid-sensibel. Möglicherweise lag hier eine $MHK_{\text{Linezolid}}$ im intermediären Bereich (s. Tabelle 1) vor, die bei zwei aufeinanderfolgenden Messungen unterschiedliche Resultate liefern kann. Da die Ergebnisse des Linezolid-Resistenztests jedoch nur in resistent und sensibel unterteilt wurden, ist die genaue Angabe der gemessenen MHK-Werte nicht möglich. Insgesamt ist die Resistenzrate gegenüber Linezolid in der vorliegenden Studie sehr niedrig. In den Jahren 2006/2007 konnte das RKI bei *vanB*-positiven Isolaten ebenfalls keine Linezolidresistenz zeigen und unter den *vanA*-positiven *E. faecium*-Stämmen fanden sich nur 0,7% mit einer Resistenz [55]. Unter den Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten zeigen sich diese Resistenzen beim *vanA*-Genotyp generell etwas häufiger als bei *vanB* [8]. Dies hängt wiederum möglicherweise mit dem gehäuften Auftreten von Teicoplaninresistenzen bei *vanA* und dem dadurch vermehrten Einsatz des Reserveantibiotikums Linezolid zusammen, da sich unter der Therapie mit Linezolid auch Resistenzen bilden können [9]. Obwohl die Resistenzraten gegenüber Linezolid und Tigecyclin unter Vancomycin-resistenten Enterokokken insgesamt noch mäßig sind, kann in den letzten Jahren bereits eine zunehmende Tendenz verzeichnet werden. So konnte das Nationale Referenzzentrum beispielsweise für das Jahr 2013 noch bei 4,55% der *vanA*-positiven Enterokokken (*E. faecium*- und *E. faecalis*-Isolate) eine Linezolidresistenz feststellen, während im Jahr 2014 schon 10,23% eine derartige Resistenz aufwiesen. Der Anteil an Tigecyclin-resistenten Stämmen stieg unter den

vanA-positiven Enterokokken von 0,72% (2013) auf 3,07% (2014) und unter den *vanB*-positiven von 0,23% (2013) auf 0,51% (2014). [62]

Vor diesem Hintergrund sollte eine Antibiotikatherapie grundsätzlich, aber insbesondere bei ohnehin (multi)resistenten Keimen nur unter sorgfältiger Indikationsstellung und nach ausreichender Resistenztestung mittels Antibiogramm erfolgen. Um auch in Zukunft Resistenzbildungen durch Selektionsdruck zu minimieren und die Wirksamkeit der Reserveantibiotika möglichst lange zu erhalten, ist eine Verabreichung der Reserveantibiotika Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin nur bei nachgewiesener Vancomycin- und Teicoplaninresistenz sinnvoll. Gerade im Hinblick auf die Verbreitung der Vancomycin-Resistenzgene in Europa durch den vermehrten Einsatz von Avoparcin in der Tiermast (s. Abschnitt 1.2.2) wird zudem deutlich, dass auch außerhalb von Krankenhäusern, besonders im tiermedizinischen Bereich, ein überlegter Umgang mit Antibiotika äußerst wichtig ist.

4.6. Bedeutung der Virulenzfaktoren Enterococcal Surface Protein (*esp*) und Hyaluronidase (*hyl*)

Für die Ausbreitung bestimmter Enterokokkenstämme ist nicht allein die Vancomycinresistenz verantwortlich. Auch Stämme, die bei diesem Antibiotikum Sensibilität zeigen, breiten sich vermehrt in Krankenhäusern aus. Dafür bekannt ist eine genetische Linie an *E. faecium*-Stämmen – CC17 –, die eine hochgradige Ampicillinresistenz, jedoch nicht zwingend eine Resistenz gegenüber Vancomycin aufweisen. [42] Hinzu kommen bei diesen Enterokokkenstämmen gehäuft weitere Pathogenitätsfaktoren, die als Ursache für die beschleunigte Ausbreitung in Krankenhäusern diskutiert werden. Zu den wichtigsten Virulenzgenen gehören dabei das Gen des Enterococcal Surface Proteins (*esp*) und das Gen für Hyaluronidase (*hyl*) (s. Abschnitt 1.3). Das *esp*-Gen kodiert für ein Oberflächenprotein, das sowohl bei *E. faecalis* als auch bei *E. faecium* eine Rolle bei der Adhäsion an abiotischen Oberflächen und bei der Biofilm-Formation zu spielen scheint [28,29]. Zudem wurde es mit einer erhöhten Infektiosität [24] sowie mit verstärkter Kolonisierung und Persistenz dieser Bakterien bei Harnwegsinfektionen in Verbindung gebracht [26,27]. Willems et al. untersuchten humane sowie animale Vancomycin-resistente *E. faecium*

Isolate unterschiedlicher Kontinente. Es wurde beobachtet, dass das Virulenzgen *esp* bei nahezu allen Isolaten vorkam, die mit einem Krankenhausausbuch in Verbindung standen, während es bei nicht epidemischen Stämmen und den tierischen Isolaten fehlte [25]. Eine andere Studie der Universität Tübingen hingegen zeigt, dass eine Aussage über die epidemischen Eigenschaften *esp*-tragender Isolate nur bedingt möglich ist, da auch zwei Drittel der nicht-epidemischen Isolate *esp*-positiv waren [63]. Zudem wurde *esp* bereits vereinzelt in Vancomycin-sensiblen Enterokokken aus Kliniken und der Umwelt nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass dieses Gen bereits vor dem Erwerb von Resistenzen verbreitet war. [31]

Ebenso wie das *esp*-Gen scheint auch das *hyl*-Gen für eine erhöhte Pathogenität von *E. faecium*-Stämmen verantwortlich zu sein. Lange galt *hyl* selbst als Virulenzgen, das eine Hyaluronidase codiert. Obwohl diese Bezeichnung nicht bestätigt wurde, kann das *hyl*-Gen nach wie vor als indirekter Marker für ein virulentes, aber weitgehend unerforschtes Plasmid von *E. faecium* verwendet werden (s. 1.3.2) [41]. Rice et al. fanden *esp* und *hyl* vornehmlich bei Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten klinischen Ursprungs, während diese Gene in Proben gesunder Menschen mit *E. faecium* nicht nachgewiesen werden konnten. Daher wurde vermutet, dass beide Gene eine Rolle bei der klinischen Ausbreitung bestimmter *E. faecium*-Stämme spielen. [34] Während in der Studie von Rice et al. 83% der *hyl*-positiven *E. faecium*-Isolate auch eine Vancomycinresistenz aufwiesen [34], zeigten Vankerckhoven et al. eine ähnliche Häufigkeit des *hyl*-Gens unter Vancomycin-sensiblen und -resistenten *E. faecium*-Isolaten [33].

Von den Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten aus den Jahren 2004 bis 2006, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, wiesen 83% der 46 untersuchten Isolate sowohl *esp* als auch *hyl* auf. Bei 11% war allein das *esp*-Gen, bei 4% allein das *hyl*-Gen zu finden. Lediglich bei einem Isolat (2%) konnte keines der beiden Gene nachgewiesen werden. Daten des RKI über die Jahre 2006 und 2007 zeigten ähnliche Verteilungen von *esp* und *hyl* unter *vanB*-positiven *E. faecium*: in 73% der Fälle konnten beide Virulenzgene, in 17% nur *esp*, in 8% nur *hyl* und in 2% keines der Gene nachgewiesen werden. [55] Leicht abweichende Werte ergab die Auswertung der Daten deutscher Krankenhäuser aus den Jahren 2004 bis 2006: nur 16% der Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate exprimierten beide Gene, fast 51% jedoch

alleine *esp* bzw. 24% alleine *hyl*. Bei knapp 10% der Isolate konnte weder *esp* noch *hyl* gefunden werden. [43] Diesen Studien ist gemeinsam, dass der Anteil an Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten in Krankenhäusern, die weder *esp* noch *hyl* aufweisen, unter 10% liegt.

Leavis et al. analysierten das *esp*-Gen klinischer Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Isolate zudem anhand innergenischer Wiederholungen bestimmter Genabschnitte – sog. Repeats, um Verwandtschaften und Unterschiede des *esp*-Gens zu erkennen (s. Abschnitt 1.3.1). Es konnte gezeigt werden, dass Isolate eines Ausbruchs dasselbe Muster in den Repeat-Regionen A, B und C aufwiesen [36]. Eaton et al. fanden bei der Analyse der A-Region dabei vorwiegend vier und fünf Repeats, aber auch zwei und sechs Wiederholungen wurden diagnostiziert [30].

In der aktuellen Studie wurden in 89% der Fälle ebenfalls vier Repeats des Abschnitts A nachgewiesen. Lediglich in je einem Fall (2%) konnten sechs bzw. zehn A-Repeats identifiziert werden. Auch die Isolate der nachfolgenden Jahre im UKR wiesen in der überwiegenden Zahl vier *espA*-Repeats bei gleichzeitigem Vorliegen von *hyl* auf (unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider des IMHR). Diese Anhäufung identischer Repeat-Anzahlen lässt demnach einen Zusammenhang zwischen den einzelnen Isolaten erahnen. Möglicherweise wurde das *esp*-Gen neben klonaler Vermehrung der Stämme auch durch konjugativen Gentransfer unter den verschiedenen Sequenztypen verbreitet, wie es bereits 2004 von Oancea et al. in vitro beschrieben wurde [32].

Aufgrund der starken Anhäufung von *esp* und *hyl* unter *E. faecium*-Stämmen in den beschriebenen Studien scheinen also beide Virulenzgene die Ausbreitung von Enterokokken in Krankenhäusern zu begünstigen. Dennoch ist eine alleinige Untersuchung dieser Gene für eine definitive Aussage zur Pathogenität eines VRE-Isolates, die zu weiteren Maßnahmen im Klinikalltag wie z.B. der Isolation des erkrankten Patienten führen würde, wahrscheinlich wenig geeignet. Um ein umfassenderes Verständnis für diese und andere Virulenzfaktoren zu erreichen, bedarf es weiterer Studien. Insbesondere sollte eine genauere Untersuchung der Gene erfolgen (wie bei *esp* durch die Repeat-Analyse bereits begonnen), um mögliche Unterschiede in der DNA zu erkennen und so falsche Schlussfolgerungen auf die Verbreitung einzelner Enterokokkenstämme zu vermeiden.

4.7. Methodik der epidemiologischen Typisierung: MLST

Zur molekularepidemiologischen Typisierung der Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate wurde in dieser Studie die Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) verwendet (s. Abschnitt 1.5). Dies ist eine gute Methode, um Enterokokkenstämme anhand sieben genetischer Marker zu Sequenztypen zusammenzufassen [48]. So können Rückschlüsse auf die Ausbreitung bestimmter Subtypen von Enterokokken gezogen werden. Die MLSTypisierung ist auch deshalb sehr gut geeignet, weil die Ergebnisse im Gegensatz zu anderen Methoden wie PFGE [44] und AFLP [46] unabhängig von den jeweiligen Laborbedingungen sind und so auch einen nationalen und internationalen Vergleich von Studien zulassen [48]. Die MLVA-Methode ist zwar ebenso reproduzierbar, jedoch weniger diskriminativ und deshalb weniger aussagekräftig für epidemiologische Untersuchungen [49]. Eine Alternative zur MLSTypisierung ist das Whole Genome Sequencing (WGS), das in den letzten Jahren immer mehr Verwendung gefunden hat und sich wahrscheinlich in Zukunft als Goldstandard etablieren wird. Diese Methode basiert auf einer Analyse der gesamten Gensequenz des Bakteriums. Dies ist zwar vergleichsweise aufwendig und teuer, jedoch liefert es einen sehr hohen Informationsgewinn. Zudem lassen sich anhand des WGS auch MLST-Typen zuordnen, sodass auch ein Daten-Abgleich mit Studien möglich ist, die eine MLSTypisierung verwendet haben [50,51].

Obwohl sie weniger diskriminativ ist, ist die MLSTypisierung für viele epidemiologische Fragestellungen in Krankenhäusern dennoch ausreichend. Insgesamt erschien diese Methode deshalb für die epidemiologische Analyse von Sequenztypen als das am besten geeignete Verfahren und wurde auch in den nachfolgenden Studien des UKR (ab 2007) weiter angewandt. Die Verteilung einzelner Sequenztypen auf Kliniken und Stationsarten lässt sich deskriptiv gut darstellen und auch bezüglich einer Übertragung von VRE innerhalb des Krankenhauses sind Rückschlüsse möglich. Im Fall von unterschiedlichen Sequenztypen ist eine direkte Übertragung von einem Patienten auf den anderen zwar unwahrscheinlich, ein Vorliegen gleicher Typen ist dennoch kein eindeutiges Indiz für eine Übertragung. Wie bereits beschrieben, können sich verbreitete Sequenztypen Vancomycin-sensibler Enterokokken spontan Resistenzen aneignen [43,59,60]. Jedoch ist nicht anzunehmen, dass ein derartiger Erwerb von Resistenzgenen häufig zur gleichen Zeit im selben Krankenhaus stattfindet. Auch ein

simultanes Auftreten gleicher Mutationen bei resistenten Stämmen scheint angesichts der Vielzahl an möglichen Allelkombinationen sehr unwahrscheinlich. Bei mehrfachem Auftreten derselben resistenten Sequenztypen innerhalb kurzer Zeit kann also von einer Verbreitung eines einzelnen Klons ausgegangen werden. Die MLSTypisierung liefert demnach trotz fehlender Sicherheit der Übertragung einen guten Anhaltspunkt für die Ausbreitung von resistenten Erregern.

4.8. Epidemiologie der MLST-Sequenztypen und deren Verteilung im UKR

Insgesamt lassen die Ergebnisse der MLST-Analyse dieser Studie ein polyklonales Geschehen in den Jahren 2004 bis 2006 im Raum Regensburg vermuten. Eine Anhäufung der Sequenztypen 192 und 208, die zusammen 65% aller untersuchten Isolate darstellten, deutet dabei auf eine klonale Ausbreitung dieser beiden Stämme hin. Dabei wurden jedoch regionale Unterschiede deutlich. Während in den Krankenhäusern der Umgebung der ST 192 (70%) vorherrschend war, zeigte sich im UKR selbst überwiegend der ST 208 (43%) und eine leichte Häufung des ST 17 (17%). Interessanterweise traten einige Sequenztypen dabei nur im UKR (ST 17, 186 und 780), andere Sequenztypen hingegen nur in den umgebenden Kliniken auf (ST 18, 78, 125 und 202). Zudem konnte im UKR ein Sequenztypus gezeigt werden, der im bisherigen Datensatz von pubmlst.org nicht verzeichnet war. Dieser neue Sequenztypus glich dem häufigen Sequenztyp 192 bis auf eine einzelne Veränderung im *gdh*-Allel. Wahrscheinlich entstand dieser neue Typus nicht wie viele andere Sequenztypen allein durch Rekombination der verschiedenen bekannten Allele [42], sondern durch eine Punktmutation im *gdh*-Gen, die die Basenfolge des Gens veränderte (s. Abschnitt 3.7.2).

Bei der Betrachtung des zeitlichen Auftretens der Nachweise der Sequenztypen 192 und 208 im Großraum Regensburg zeigte sich eine Persistenz des ST 208 im untersuchten Zeitraum. ST 192 hingegen trat im letzten Viertel des Jahres 2005 erstmalig auf.

Unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider des IMHR über die Jahre 2004 bis 2011 (s. Abbildung 63) zeigen, dass der in den Jahren 2004 bis 2006 im UKR vorherrschende Sequenztyp 208 in den darauffolgenden Jahren verschwand. Der zweithäufigste, ST 17, zeigte sich hingegen mit einem starken Anstieg in den Jahren 2007 und 2008 und einem Rückgang in den Jahren 2009 bis 2011. Interessant ist zudem, dass ST 192 – der in den Jahren 2004 bis 2006 kaum im UKR auftrat, in den Krankenhäusern der Umgebung aber bereits vorherrschte – in den Jahren 2007 und 2008 dann auch im UKR gehäuft nachgewiesen wurde. Ursächlich dafür sind möglicherweise zwei Vorgänge: Zum einen ist eine vermehrte Einschleppung des Keims in das UKR von extern denkbar, zum anderen kann aber auch die hohe Pathogenität dieses Stammes zu einem zeitverzögerten Ausbruch im UKR geführt haben. Eine erhöhte Virulenz ist womöglich auch der Grund für die rasche Ausbreitung des ST 17 im UKR. Dieser Typus wurde wie erwähnt in den externen Krankenhäusern des Großraumes Regensburg den Jahren 2004 bis 2006 zwar nicht detektiert, jedoch durchaus in anderen Regionen Deutschlands [43,48,57]. Im Allgemeinen ist dieser Sequenztypus schon seit langem bekannt, da er bereits für den Klonalen Komplex 17 (CC17) namensgebend war. Obwohl der Sequenztyp 17 im untersuchten Zeitraum in nur vier Fällen nachgewiesen wurde, zeigten sich bei genauer Betrachtung der Sequenztypen und deren Kombinationen mit den Resistenzgenen *vanA/B* sowie den Virulenzgenen *esp* und *hyl* bei diesem Typus die meisten Varianten (drei verschiedene). Die häufigeren Sequenztypen 192 und 208 konnten nur in je zwei verschiedenen Ausprägungen gefunden werden (s. Abschnitt 3.8.3). Je geringer die Anzahl der verschiedenen Kombinationen, desto wahrscheinlicher scheint eine klonale Ausbreitung der Sequenztypen.

Ob die genannten VRE-Ausbrüche im UKR Folge von Übertragungen waren und gehäuft zu nosokomialen Infektionen führten oder ob die Bakterien womöglich in vielen Fällen von extern infizierten Patienten mit ins UKR gebracht wurden, lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend klären. Dafür sind weitere Studien am UKR geplant, die die zu den Isolaten gehörigen Patientendaten statistisch auswerten sollen. Unter anderem wird dabei der Zeitpunkt des VRE-Nachweises beim Krankenhausaufenthalt und die Liegedauer der Patienten auf den einzelnen Stationen berücksichtigt, um Übertragungswege aufzudecken. Obwohl das UKR einen hohen Hygienestandard einhält, da Patienten nach positivem VRE-Nachweis unmittelbar in Einzelzimmern

untergebracht werden und Kontaktpräventionsmaßnahmen eingeleitet werden, ist eine Ausbreitung durch Übertragung nicht auszuschließen.

MLSTypen VRE *E. faecium* am UKR 2004–2011

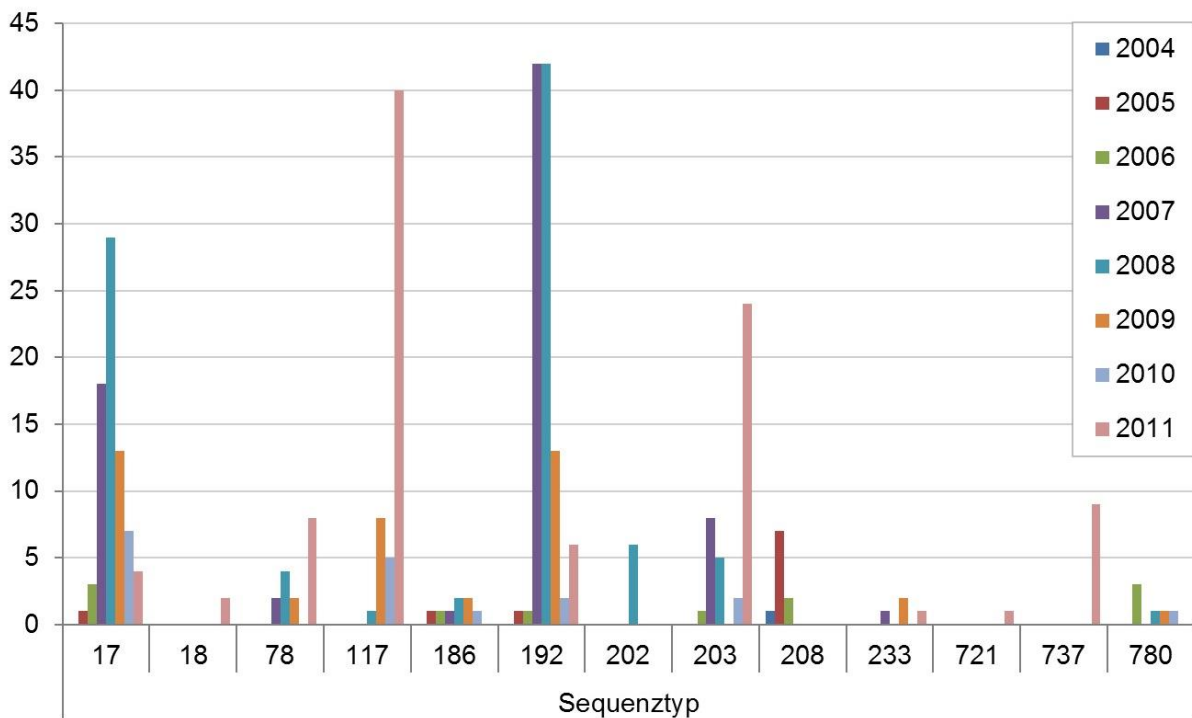


Abbildung 63: Verteilung der MLST-Sequenztypen der Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate des UKR der Jahre 2004 bis 2011 (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Wulf Schneider des Instituts für klinische Mikrobiologie und Hygiene am UKR)

Eine deutsche Studie des Zeitraums 2004 bis 2006 konnte den Sequenztyp 208 nur einmal, ST 192 und ST 17 nur viermal nachweisen. Es zeigte sich vielmehr eine Häufung der Sequenztypen 203 ($n = 9$) und 18 ($n = 11$). [43] In einem Krankenhaus in Baden-Württemberg zeigten sich in den Jahren 2004 und 2005 Ausbrüche mit den Sequenztypen 203 und 208 [63]. Dabei ist jedoch zu anmerken, dass zu dieser Zeit vor allem der *vanA*-Genotyp in Deutschland gefunden wurde. Der etwas höher festgelegte Grenzwert für die Vancomycinresistenz in den damaligen Studien hatte möglicherweise zur Folge, dass manche *vanB*-positiven Stämme nicht registriert wurden (s. Abschnitt 4.5). Denkbar ist, dass diese variierenden Einschlusskriterien auch das Ergebnis der Verteilung der Sequenztypen veränderten, sodass ein Vergleich der vorliegenden Arbeit mit früheren Studien nur bedingt möglich ist. Im UKR

wurden von 2004 bis 2010 vor allem die Sequenztypen 192 und 17 nachgewiesen. Im Jahr 2011 folgten dann VRE-Ausbrüche der zuvor selteneren Sequenztypen 117 und 203. Für die darauffolgenden Jahre 2011–2014 zeigen auch die Daten des Nationalen Referenzzentrums deutschlandweit am häufigsten die Sequenztypen 117 (42%), 203 (26%), 192 (25%), und 17 (24%) [62].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je zwei Doppelnachweise bei zwei Patienten analysiert (s. Abschnitt 3.11). Bei einem Patienten konnte im Abstand von zwei Monaten je ein *E. faecium*-Isolat isoliert werden, das in den Untersuchungen in beiden Fällen einen *vanB*- und *hyl*-positiven Sequenztyp 192 mit vier *espA*-Repeats ergab. Der Patient befand sich in diesem Zeitraum durchgehend auf derselben Station und die Proben entstammten einer ähnlichen Körperregion: Rektalabstrich bzw. Abstrich einer Colonfistel. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Isolaten um einen doppelten Nachweis desselben VRE-Stammes handelte.

Der zweite Patient mit doppeltem VRE-Nachweis hingegen zeigte im Abstand von etwa 1,5 Monaten unterschiedliche Sequenztypen. Auch dieser Patient wechselte die Station nicht, allerdings entstammten die Proben unterschiedlichen Kompartimenten: der *vanB*- und *hyl*-positive ST 780 mit vier *espA*-Repeats wurde in einem Rektalabszess nachgewiesen, während der *vanB*-positive und *hyl*- sowie *esp*-negative ST 17 aus der Blutprobe eines ZVK angezüchtet werden konnte. Eine Übertragung des *vanB*-Gens durch horizontalen Gentransfer auf einen kommensalen *E. faecium*-Stamm des Patienten ist theoretisch denkbar. Zur Klärung wäre beispielsweise ein Abgleich des genetischen Aufbaus beider *vanB*-Kassetten hilfreich. Auch könnte eine spontane Rekombination des ST 780 zu ST 17 vorgelegen haben. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da sich zum einen die beiden Sequenztypen in zwei MLST-Loci unterscheiden (*atpA* 9 bzw. 1; *pstS* 7 bzw. 1) und zum anderen auch die Virulenzfaktoren *esp* und *hyl* dieser Isolate verschieden ausgeprägt waren. Es ist davon auszugehen, dass bei diesem Patienten eine simultane VRE-Infektion zweier Stämme oder eine zweite Infektion mit einem VRE anderen Sequenztyps innerhalb kurzer Zeit vorlag.

Enterokokken infizieren vor allem Patienten mit schwächerem Immunsystem, also sehr junge und sehr alte Menschen oder Menschen mit schwerem Grundleiden bzw. Immunsuppression. Es ist daher naheliegend, dass besonders Patienten in den

Abteilungen Innere Medizin, Hämato-Onkologie und Chirurgie unter VRE-Infektionen leiden, da dort gehäuft derartige Risikopatienten behandelt werden. Der Chirurgie konnten in dieser Studie 39% der Isolate und der Inneren Medizin 26% der Isolate zugeordnet werden. Auf der Knochenmarkstransplantations-Station (KMT) der Hämato-Onkologie wurden 30% aller Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Fälle nachgewiesen. Auch für die Intensivstationen 90 (Chirurgie) und 92 (Innere Medizin) wurde mit 17% bzw. 22% der Fälle ein vermehrtes VRE-Auftreten verzeichnet. Die Verteilung der VRE-Infektionen auf Normal- und Intensivstationen zeigte in dieser Studie insgesamt ein ausgeglichenes Verhältnis (52% Normal-, 48% Intensivstation). Bei der Zuordnung der Sequenztypen zu Stationen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Typen 192 und 208 überwiegend auf Normalstationen vorkamen, während ST 17 etwas häufiger auf Intensivstationen nachgewiesen wurde.

Vergleichbare Daten liefern die Einsendungen an das Nationale Referenzzentrum in den Jahren 2011/2012, die nach klinischen Disziplinen aufgeschlüsselt wurden. Auch hier konnten die meisten VRE-Isolate in den Chirurgie-Abteilungen (26%), der Inneren Medizin und internistischen Intensivstationen (21%), der Intensivtherapie (7%) sowie der Hämatologie/Onkologie (6%) zugeordnet werden. Alle anderen Herkünfte zeigten sich in einem Anteil von jeweils unter 5% (mit Ausnahme von 25% der Isolate mit unbekannter Abteilung). [6]

Die Einteilung der VRE-Isolate nach klinischen Materialien wurde in vorliegender Studie zur besseren Vergleichbarkeit der Daten analog zur Darstellung des Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 durchgeführt (s. Abschnitt 3.10.2). Dort zeigten sich für die Jahre 2011/2012 insbesondere Nachweise aus Stuhlproben und Rektalabstrichen (27%), aber auch Urinproben (25%) [6]. In vorliegender Arbeit wurde für die Jahre 2004 bis 2006 lediglich ein Rektalabstrich – also nur ein Screening-Isolat – ausgewertet, das in einem externen Krankenhaus entnommen wurde. Da VRE-Screenings zu dieser Zeit noch nicht standardmäßig verwendet wurden, erfolgte der Nachweis der restlichen 98% der Isolate kulturell. In den nachfolgenden Jahren wurden mit Umstellung der Nachweismethodik jedoch auch im UKR immer mehr Screeningmaterialien (Rektal- und Perianalabstriche) verwendet: In der Gesamtheit der Jahre 2004 bis 2010 entstammten die meisten Proben somit VRE-Screenings (n = 119 von 248), gefolgt von Wundabstrichen (n = 50) und Punktaten (n = 24)

(unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider des IMHR). Auch in den Jahren 2004 bis 2006 konnten für die Krankenhäuser der Region Regensburg größtenteils VRE-Nachweise durch Wundabstriche (46%) sowie durch Punktate (15%), Blutkulturen (11%) und Abstriche (9%) verzeichnet werden. Der Anteil an *E. faecium*-Kolonisierungen betrug dabei 20%, von einer VRE-Infektion wurde in 80% der Fälle ausgegangen (für die Zuordnung der Materialgruppen zu Kolonisierung oder Infektion s. Abschnitt 3.10.3). Grundsätzlich werden Kolonisierungen mit Enterokokken als wesentlich häufiger beschrieben [9], dennoch ist ein Übertritt der Erreger in die Blutbahn, also eine entstehende Infektion nach einer VRE-Besiedelung z.B. über Wunden denkbar.

Obwohl in dieser Studie lediglich ein Screeningisolat untersucht wurde, ist besonders im Hinblick auf die spätere standardisierte Einführung von VRE-Screenings zu erwähnen, dass diese Nachweismethode gelegentlich auch falsch positive Ergebnisse liefern kann. Es ist in seltenen Fällen möglich, dass die Merkmale der Vancomycinresistenz und der Aesculin-Spaltung (*Enterococcus*) von zwei verschiedenen Bakterien stammen und so fälschlicherweise eine Bouillon ohne VRE als VRE-positiv gekennzeichnet wird. Auch beim kulturellen VRE-Nachweis können kleinere Abweichungen auftreten, da keine Methode eine hundertprozentige Spezifität liefern kann. Deshalb erfolgte in dieser Arbeit nach dem Auftauen der Isolate nochmals eine Speziesidentifizierung mittels MALDI-TOF-Technologie.

4.9. Präventionsmaßnahmen

Die Prävention von Erkrankungen mit Antibiotika-resistenten Keimen bedarf einem kritischen, gezielten Umgang mit Antibiotika nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch im Bereich der Tiermedizin. Sofern sich Erreger – wie z.B. Vancomycin-resistente Enterokokken – bereits klinikintern verbreiten, werden für deren Eindämmung vorgegebene Abläufe und sorgfältig gewählte Barrieremaßnahmen benötigt.

Eine Übertragung von VRE erfolgt hauptsächlich durch direkten Kontakt (Hände) oder indirekten Kontakt über kontaminierte Flächen und Gegenstände, wo diese Bakterien aufgrund ihrer hohen Widerstandsfähigkeit Tage bis Wochen nachweisbar sind. Dabei

können die Erreger beispielsweise durch Fäkalien oder durch Sekrete VRE-kontaminierter Wunden verbreitet werden [64].

Das RKI zeigt im Epidemiologischen Bulletin 23 von 2008 eine Zusammenstellung von Empfehlungen mehrerer Autoren für den Umgang mit VRE. Dabei wird unter anderem auf das VRE-Screening (z.B. Aufnahme-Screening von Risikopatienten und Kontaktpatienten), die durchzuführende Labordiagnostik (z.B. Kultivierung auf Selektivnährmedien, Speziesdifferenzierung und Resistenztestung gegenüber Vancomycin und Teicoplanin) sowie die allgemeinen Hygienemaßnahmen bei VRE-Nachweis eingegangen. Zu letzteren gehören beispielsweise die Isolierung des Patienten im Einzelzimmer mit eigener Toilette, die Verwendung eines Schutzkittels bei Patientenkontakt, das Tragen von Handschuhen bei möglichem Erregerkontakt sowie eine sorgfältige Händedesinfektion sowohl vor Patientenkontakt als auch nach Ablegen der Handschuhe und vor Verlassen des Patientenzimmers. [55] Die Effektivität eines derartigen Hygieneplans ist abhängig von der Einhaltung der vorgeschriebenen Maßnahmen durch alle Beteiligten – nicht nur durch das Klinikpersonal, sondern auch durch die Patienten und Besucher. Des Weiteren werden vom RKI besondere Maßnahmen bei Ausbrüchen mit VRE empfohlen: z.B. das VRE-Screening aller Patienten, um die genaue Prävalenz der VRE-Erkrankungen festzustellen, die Ansammlung und Typisierung aller VRE-Isolate durch das mikrobiologische Labor sowie die Schulung des gesamten Personals hinsichtlich der VRE-Problematik [55].

Auch am UKR wurden und werden entsprechende Konzepte bei VRE-Nachweisen eingehalten. Neben verschiedenen Hygienevorschriften wird dabei insbesondere auf die molekularepidemiologische Typisierung und Sammlung der VRE-Isolate Wert gelegt. Durch genauere Kenntnisse über die Ausbreitung einzelner Stämme können pathogene MLST-Sequenztypen, die unbedingt isoliert werden müssen, womöglich schneller erkannt und behandelt werden. Beim Nachweis weniger virulenter, sich nicht verbreitender Sequenztypen, könnte dadurch in Zukunft eine andernfalls zwingende Isolation des Patienten vermieden werden. Dieser Informationsgewinn würde neben dem Arbeitsaufwand auch die Kosten der Klinik reduzieren und somit die Effizienz der Abläufe verbessern.

4.10. Ausblick

Vancomycin-resistente Enterokokken werden auch in Zukunft eine beachtliche Rolle in der Medizin spielen. Zum einen könnten mit der Zeit auch flächendeckend Resistenzen gegenüber den aktuell noch wirksamen Reserveantibiotika wie Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin entstehen, aus denen unbehandelbare Infektionen mit multiresistenten Enterokokken resultieren würden. Zum anderen könnte aber auch eine Übertragung der Vancomycin-Resistenzgene auf andere Bakterienarten problematisch werden. So wurde schon 1992 *in vitro* gezeigt, dass Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA)-Isolate Vancomycinresistenzen von Enterokokken übernehmen können [65]. *In vivo* wurde die Übertragung des *vanA*- oder *vanB*-Gens durch horizontalen Gentransfer auf MRSA bisher jedoch glücklicherweise nur vereinzelt nachgewiesen [66–68]. Da Vancomycin bei vielen MRSA-Infektionen aktuell als Therapie der Wahl gilt, ist eine Aneignung von Resistenzgenen mit nachfolgenden Ausbrüchen Vancomycin-resistenter *S. aureus*-Stämme in Zukunft denkbar. Nicht nur bei MRSA, auch bei *E. faecalis* oder anderen klinisch bedeutsamen Erregern wie Streptokokken könnte der Erwerb von Vancomycin-Resistenzgenen zu deutlich eingeschränkten Therapiemöglichkeiten führen.

Um diese Szenarien zu verhindern, muss die Verbreitung von VRE eingedämmt werden. Damit dies gelingt, ist eine frühzeitige Erkennung von Ausbrüchen zur Einleitung infektionspräventiver Maßnahmen essentiell. Auch das Verständnis der Epidemiologie bestimmter Subtypen ist von Vorteil für die Ausbreitungsprävention. Durch die MLSTypisierung ist eine molekularbiologische Untersuchung der *E. faecium*-Isolate möglich, die auch international mit vorliegenden Studien verglichen werden kann. Zwar ist diese Typisierungsmethode für viele epidemiologische Untersuchungen ausreichend, dennoch können auch gleiche MLST-Sequenztypen unterschiedliche Gene aufweisen. Daher wird die MLST-Analyse in Zukunft vermutlich in vielen Studien auf Genomweite ausgedehnt – besonders wenn der Goldstandard des Whole Genome Sequencing (WGS) kostengünstiger wird. Die vorliegende Arbeit trägt durch die systematische Analyse der VRE-Isolate zum Gesamtverständnis der Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken bei. Denn nur durch kontinuierliches Erforschen von Krankheitserregern und deren Ausbreitung können auch in Zukunft effektive Wege der Prävention und Therapie gefunden werden.

5. Zusammenfassung

Enterokokken – insbesondere die Spezies *E. faecium* – haben mit zunehmendem Erwerb von Resistenzgenen weltweit an Bedeutung gewonnen. Neben der weit verbreiteten Ampicillinresistenz zeigen sich seit Anfang der 2000er Jahre auch in Deutschland immer mehr Resistenzen gegenüber dem Glykopeptid Vancomycin. Um eine weitere Ausbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) zu vermeiden, bedarf es neben hygienischen Präventionsmaßnahmen auch einer frühzeitigen Diagnostik der einzelnen Isolate mittels epidemiologischer Typisierungsmethoden.

Am Universitätsklinikum Regensburg (UKR) wurde seit dem Auftreten der ersten VRE-Infektionen jeder VRE-Erstnachweis asserviert und einer Stammsammlung zugefügt. In dieser Arbeit wurden 53 VRE-Isolate der Jahre 2004 bis 2006 von 51 verschiedenen Patienten untersucht. Bei der erneuten Untersuchung im Jahr 2016 bestätigten sich 47 davon als Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate, die daraufhin weiter typisiert wurden. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter anderem auf das Vorliegen der Resistenzgene *vanA* und *vanB* sowie der Virulenzmarker *esp* und *hyl* getestet. Dabei erwiesen sich 91% der Isolate als *vanB*-positiv, 6% als *vanA*-positiv und 2% exprimierten beide Resistenzgene. Demnach war am UKR zu dieser Zeit vornehmlich der Genotyp *vanB* verbreitet – im Gegensatz zur deutschlandweiten Anhäufung von *vanA*-positiven Isolaten. Dieser Resistenztyp nahm in den letzten Jahren auch in anderen Krankenhäusern zu und ist bei *E. faecium* mittlerweile deutlich häufiger als das *vanA*-Gen zu finden. Der Virulenzmarker *esp* wies in 89% der Fälle vier Repeats der Region A (*espA*) und in je 2% sechs bzw. zehn Repeats auf. Bei nur 6% der Isolate konnte *esp* nicht nachgewiesen werden. *Hyl*-positiv zeigten sich 87% der Isolate, *hyl*-negativ waren 13%.

Darüber hinaus erfolgte eine Auswertung der Materialherkunft. 98% der Isolate wurden in Routinekulturen angezchtet, wobei der Großteil aus Wundabstrichen (46%), Punktaten (15%) und Blutkulturen (11%) gewonnen wurde. Nur 2% der Isolate stammten im untersuchten Zeitraum aus VRE-Screenings, da diese erst ab dem Jahr 2007 standardmäßig am UKR eingeführt wurden. Der Anteil an VRE-Kolonisierungen betrug 20%, von einer Infektion mit VRE wurde in 80% der Fälle ausgegangen. Innerhalb des UKR wurde die Herkunft der Isolate zudem nach Abteilung und

Stationsart unterschieden. 39% der VRE-Nachweise zeigten sich in der Chirurgie, 30% in der Hämato-Onkologie und 26% in der Inneren Medizin. Dabei war das Verhältnis von Normal- zu Intensivstationen nahezu ausgeglichen (52% bzw. 48%).

Als wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit erfolgte eine Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) der Isolate, um die Verbreitung einzelner Subtypen innerhalb des UKR und der Region zu untersuchen. Insgesamt traten die Sequenztypen (ST) 192 (39%) und ST 208 (26%) am häufigsten auf. Alle weiteren zeigten sich deutlich seltener: ST 17 (9%), ST 780 (7%), ST 186 und 203 (je 4%) sowie ST 18, 78, 125 und 202 (je 2%). Bei dieser Analytik konnte zudem ein bisher nicht verzeichneter Sequenztypus nachgewiesen werden, der ST 192 bis auf eine Punktmutation im *gdh*-Allel gleicht. Interessanterweise war innerhalb des UKR zu dieser Zeit noch vornehmlich ST 208 zu finden, während in den umliegenden Krankenhäusern bereits ST 192 überwog. In den Folgejahren kam es im UKR dann besonders bei ST 192 und ST 17, später auch ST 117 und ST 203 zu lokalen Häufungen. Die MLSTypisierung der VRE-Isolate lässt daher eine klonale Ausbreitung einzelner Sequenztypen innerhalb des UKR vermuten.

Die retrospektiven Untersuchungen aller VRE-Isolate des UKR seit dem Jahr 2004 ermöglichen einen Einblick in die VRE-Entwicklung der letzten Jahre stellvertretend für Krankenhäuser der Maximalversorgung in Deutschland. Diese Informationen können in Zusammenhang mit weiteren Studien zu einer besseren Prävention und zur Optimierung von Barrieremaßnahmen bei VRE-Ausbrüchen genutzt werden. Nicht nur die zunehmende Verbreitung von Vancomycin-Resistenzgenen unter Enterokokken, auch die Übertragung dieser Gene auf andere klinisch bedeutsame Erreger wie *Staphylococcus aureus* muss verhindert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Köhler W, Ansorg R, Brandis H. Medizinische Mikrobiologie. 8th ed. Urban & Fischer, München; 2001. 914 p. ISBN: 3437416405.
2. Robert Koch Institut. Enterokokken mit Vancomycin-Resistenz in deutschen Krankenhäusern 2008/2009 – Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. Epidemiologisches Bulletin. 2010; 44: 427–440.
3. Hof H, Dörries R, Geginat G. Medizinische Mikrobiologie. 5th ed. Duale Reihe. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 2014. 752 p. ISBN: 978-3-13-125315-6.
4. Bonten MJM, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci – Why are they here, and where do they come from? The Lancet Infectious Diseases. 2001; 1: 314–325. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00145-1.
5. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 Enterococcus faecium: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52: 297–308. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x. PMID: 18279340.
6. Robert Koch Institut. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung aus dem NRZ für Staphylokokken und Enterokokken, 2011 – 2012. Epidemiologisches Bulletin. 2013; 33: 303–312.
7. Iwen PC, Kelly DM, Linder J, Hinrichs SH, Dominguez EA, Rupp ME, et al. Change in prevalence and antibiotic resistance of Enterococcus species isolated from blood cultures over an 8-year period. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 494–495. PMID: 9021217.
8. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. Germap 2015: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence, Rheinbach; 2016. 184 p. ISBN: 978-3-9818383-0-5.
9. Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) – Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. Bundesgesundheitsblatt. 2012; 55: 1387–1400. DOI: 10.1007/s00103-012-1564-6. PMID: 23114437.
10. Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, Girolami PC de, Ferraro MJ, et al. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates

-
- of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 2180–2184. PMID: 1803989.
11. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988; 319: 157–161. DOI: 10.1056/NEJM198807213190307. PMID: 2968517.
 12. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol.* 1993; 175: 117–127. PMID: 8380148.
 13. Klare I, Badstubner D, Konstabel C, Bohme G, Claus H, Witte W. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb Drug Resist.* 1999; 5: 45–52. DOI: 10.1089/mdr.1999.5.45. PMID: 10332721.
 14. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS annual report 2004. RIVM - National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven; 2005. 136 p. ISBN: 90-6960-131-1.
 15. Guardabassi L, Agerso Y. Genes homologous to glycopeptide resistance vanA are widespread in soil microbial communities. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 259: 221–225. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00270.x. PMID: 16734783.
 16. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37: 1563–1571. PMID: 8215264.
 17. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12: 1221–1236.
 18. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical infectious diseases.* 2006; 42: 25–34. DOI: 10.1086/491711. PMID: 16323116.
 19. Cercenado E. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España – [Enterococcus: phenotype and genotype resistance and epidemiology in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29: 59–65. DOI: 10.1016/S0213-005X(11)70045-3. PMID: 22305671.
-

20. Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P. The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*. 1995; 154: 87–92. PMID: 7867956.
21. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 2667–2672. DOI: 10.1128/AAC.01516-07. PMID: 18458129.
22. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 4606–4612. DOI: 10.1128/AAC.00714-11. PMID: 21807981.
23. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 4643–4647. DOI: 10.1128/AAC.01710-09. PMID: 20733041.
24. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. 1999; 67: 193–200. PMID: 9864215.
25. Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheувel M, Tribe D, Manziros X, et al. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*. 2001; 357: 853–855. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04205-7. PMID: 11265956.
26. Shankar N, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*. 2001; 69: 4366–4372. DOI: 10.1128/IAI.69.7.4366-4372.2001. PMID: 11401975.
27. Leendertse M, Heikens E, Wijnands LM, van Luit-Asbroek M, Teske GJD, Roelofs, Joris J T H, et al. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. *J Infect Dis*. 2009; 200: 1162–1165. DOI: 10.1086/605609. PMID: 19702507.
28. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 4538–4545. PMID: 11571153.

-
29. Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol.* 2007; 189: 8233–8240. DOI: 10.1128/JB.01205-07. PMID: 17827282.
 30. Eaton TJ, Gasson MJ. A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 216: 269–275. PMID: 12435513.
 31. Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Gherardi G, Creti R. Variant esp gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet.* 2001; 357: 1802. PMID: 11407387.
 32. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 232–235. DOI: 10.1093/jac/dkh249. PMID: 15192049.
 33. Vankerckhoven V, van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4473–4479. DOI: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004. PMID: 15472296.
 34. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis.* 2003; 187: 508–512. DOI: 10.1086/367711. PMID: 12552437.
 35. Leavis HL, Willems RJL, Top J, Spalburg E, Mascini EM, Fluit AC, et al. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 1108–1115. DOI: 10.3201/eid0909.020383. PMID: 14519248.
 36. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol.* 2004; 186: 672–682. PMID: 14729692.
 37. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature.* 2002; 417: 746–750. DOI: 10.1038/nature00802. PMID: 12066186.

-
38. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 183: 201–207. PMID: 10675584.
 39. Arias CA, Panesso D, Singh KV, Rice LB, Murray BE. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 4240–4246. DOI: 10.1128/AAC.00242-09. PMID: 19667280.
 40. Rice LB, Lakticová V, Carias LL, Rudin S, Hutton R, Marshall SH. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *J Infect Dis.* 2009; 199: 342–349. DOI: 10.1086/595986. PMID: 19049434.
 41. Panesso D, Montealegre MC, Rincón S, Mojica MF, Rice LB, Singh KV, et al. The hylEfm gene in pHylEfm of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 20. DOI: 10.1186/1471-2180-11-20. PMID: 21266081.
 42. Willems RJL, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 821–828. DOI: 10.3201/eid1106.041204. PMID: 15963275.
 43. Werner G, Klare I, Fleige C, Witte W. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of vanA clusters. *Int J Med Microbiol.* 2008; 298: 515–527. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.05.008. PMID: 17977789.
 44. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis, George, Jr. *Textbook of Diagnostic Microbiology.* 4th ed. Elsevier Health Sciences, London; 2014. 1101 p. ISBN: 9781416061656.
 45. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 4407–4414. PMID: 7501463.
 46. Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJL. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4503–4511. DOI: 10.1128/JCM.42.10.4503–4511.2004. PMID: 15472301.

-
47. Rassow J. Biochemie. 2nd ed. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart; 2008. 836 p. ISBN: 3131253517.
 48. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 1963–1971. DOI: 10.1128/JCM.40.6.1963–1971.2002.
 49. Werner G, Klare I, Witte W. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol*. 2007; 7: 28. DOI: 10.1186/1471-2180-7-28. PMID: 17425779.
 50. Lytsy B, Engstrand L, Gustafsson Å, Kaden R. Time to review the gold standard for genotyping vancomycin-resistant enterococci in epidemiology: Comparing whole-genome sequencing with PFGE and MLST in three suspected outbreaks in Sweden during 2013-2015. *Infect Genet Evol*. 2017; 54: 74–80. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.06.010. PMID: 28627467.
 51. Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA, Land TA, Hoogestraat DR, Cookson BT. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 1072–1079. DOI: 10.1128/JCM.03385-14. PMID: 25631811.
 52. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24: 815–825. DOI: 10.1007/s10096-005-0056-0. PMID: 16374593.
 53. CLSI. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015. ISBN: 1-56238-990-4.
 54. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016 – Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm; 2017. 100 p. ISBN: 978-92-9498-099-1.
 55. Robert Koch Institut. Vancomycin-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern 2006/2007 – Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. *Epidemiologisches Bulletin*. 2008: 179–192.

-
56. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS annual report 2006. RIVM - National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven; 2007. 162 p. ISBN: 978-90-6960-183-0.
 57. Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kurihara R, et al. Molecular Epidemiology of Hospital-Acquired Vancomycin-Resistant Enterococci. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4009–4013. DOI: 10.1128/JCM.00195-06. PMID: 17005748.
 58. Englert Katharina. Molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Isolate an einem südwestdeutschen Krankenhaus der Maximalversorgung [Dissertation]. Justus-Liebig-Universität, Gießen; 2013.
 59. Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. vanA and vanB incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3934–3939. PMID: 10565910.
 60. Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1781–1787. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1781-1787.2001. PMID: 11325990.
 61. Woodford N, Chadwick PR, Morrison D, Cookson BD. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their van genotypes during an outbreak. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2966–2968. PMID: 9350769.
 62. Robert Koch Institut. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) in Deutschland – Update 2013/2014. *Epidemiologisches Bulletin.* 2015; 40: 429–438.
 63. Borgmann S, Schulte B, Wolz C, Gruber H, Werner G, Goerke C, et al. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect.* 2007; 67: 49–55. PMID: 17669548.
 64. Baum H von, Dettenkofer M, Fahr A-M, Heeg P, Wendt C. Konsensusempfehlung Baden-Württemberg: Umgang mit Patienten mit Glykopeptid-resistenten

- Enterokokken (GRE)/Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE). *Hygiene und Medizin*. 2006; 31: 30–32.
65. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992; 72: 195–198. PMID: 1505742.
66. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 275–280. PMID: 14693550.
67. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1342–1347. DOI: 10.1056/NEJMoa025025. PMID: 12672861.
68. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 2003; 302: 1569–1571. DOI: 10.1126/science.1090956. PMID: 14645850.

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1. Tabellen

Tabelle 1: Natürliche und erworbene Resistenzen von Enterokokken; nach Klare et al. [9].....	10
Tabelle 2: Übersicht über die bis 2006 bekannten Vancomycin-Resistenzgene mit zugehöriger Resistenzart, minimaler Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Vancomycin (Vanco) und Teicoplanin (Teico) sowie der Genlokalisierung, dem mobilen Element und der modifizierten Vancomycin-Bindestelle (Peptidoglykan-Endung); (extr. = extrinsisch; intr. = intrinsisch; chrom. = chromosomal; D-Ala = D-Alanin; D-Lac = D-Lactat; D-Ser = D-Serin) nach Courvalin [18]	18
Tabelle 3: PCR-Primer (fwd = forward; rev = reverse).....	28
Tabelle 4: Interpretationskriterien der Empfindlichkeitstestung für Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid nach den CLSI-Richtlinien für Enterokokken (Stand Jan. 2015; MHK = minimale Hemmkonzentration) [53].....	38
Tabelle 5: Genname, Anzahl der verschiedenen Allelvarianten und Sequenzlänge der MLST-Gene (bp = Basenpaare)	40
Tabelle 6: Ansatz für eine PCR (fwd = forward; rev = reverse).....	41
Tabelle 7: Ablaufstadien des Cyclerprogramms 1 für die PCRs zum Nachweis der Gene <i>vanA</i> , <i>vanB</i> und <i>hyl</i> sowie zur MLSTypisierung; Darstellung von Temperatur- und Zeitverlauf	42
Tabelle 8: Ablaufstadien des Cyclerprogramms 2 zur Analyse der <i>espA</i> -Repeats; Darstellung von Temperatur- und Zeitverlauf	43
Tabelle 9: <i>EspA</i> -Sequenzlänge und Repeatauswertung (bp = Basenpaare).....	45
Tabelle 10: Gesamtübersicht aller PCRs der untersuchten Gene mit Cyclerprogrammen, Prozentangaben der Elektrophoresegele, verwendetem Standard und der Gengröße in bp (100 bp = 100 bp DNA	

Ladder; 1 kbPlus = 1 kb Plus DNA Ladder; Eco 471 = Lambda DNA/Eco471 (Avall) Marker; bp = Basenpaare)	46
Tabelle 11: Ausschnitt aus der Gesamttabelle der Dissertation mit Darstellung aller <i>hyl</i> -negativen Isolate mit zugehörigen Sequenztypen und <i>espA</i> -Repeats (ST = Sequenztypus).....	65
Tabelle 12: Übersicht über die Häufigkeit der MLST-Sequenztypen unter den gesamten untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolaten bzw. den <i>E. faecium</i> -Isolaten des UKR sowie jeweils zugehöriges Zahlenprofil der Allelvarianten (ST = Sequenztypus).....	71
Tabelle 13: Übersicht über Zugehörigkeit von Stationen zu Abteilungen des UKR; (KMT = Knochenmarkstransplantationsstation)	81

7.2. Abbildungen

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Wirkmechanismus von Vancomycin bei der Zellwandbiosynthese: Komplexbildung mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Ende (D-Ala-D-Ala) einer Peptidoglykan-Vorstufe der Zellwand und Hemmung der Enzyme Transglykosylase, Transpeptidase und Carboxypeptidase (UDP = Uracil-Diphosphat); modifiziert nach Arthur et al. [16] und Courvalin [18]	14
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung eines Resistenzmechanismus gegenüber Vancomycin am Beispiel der Wirkung des <i>vanA</i> -Gens als alternierende Ligase mit Bildung einer veränderten Vancomycin-Bindestelle: D-Alanyl-D-Lactat (D-Ala-D-Lac) (siehe auch Abbildung 3); (UDP = Uracil-Diphosphat); modifiziert nach Arthur et al. [16]	15
Abbildung 3: Darstellung des <i>vanA</i> -Operons mit zwei regulatorischen Genen, drei Glykopeptid-Resistenzgenen und zwei akzessorischen Genen; in Anlehnung an Courvalin [18] und Arthur et al. [20]	16
Abbildung 4: Darstellung verschiedener <i>esp</i> -Varianten mit N-(N) und C-Terminus (C) sowie der Repeat-Region (R) mit variablen Wiederholungen der Abschnitte A, B und C; in Anlehnung an Leavis et al. [36]	20

Abbildung 5: Schema zum Ablauf des VRE-Screenings am UKR; (KMT = Knochenmarkstransplantation)	34
Abbildung 6: Schema zum Ablauf des kulturellen VRE-Nachweises am UKR (<i>E. gal</i> = <i>E. gallinarum</i> ; <i>E. cas</i> = <i>E. casseliflavus</i>).....	36
Abbildung 7: Übersicht über die untersuchten VRE-Isolate: VRE-Gesamtzahl beim Eingang der Isolate in den Jahren 2004–2006, davon später (2016) als <i>E. faecium</i> identifiziert, Anzahl der <i>E. faecium</i> -Isolate ohne Doppelnachweis (des gleichen Sequenztypus bei demselben Patienten) und Anzahl der <i>E. faecium</i> -Einzelnachweise der Patienten; Jeweils Gesamtzahl der VRE-Isolate aller eingeschlossenen Krankenhäuser (gesamt) bzw. des UKR. 51	
Abbildung 8: Geschlechterverteilung aller Patienten mit <i>E. faecium</i> -Fällen; Patientenwiederholungen nicht gewertet (gesamt: 45)	52
Abbildung 9: Geschlechterverteilung der Patienten mit <i>E. faecium</i> -Fällen im UKR; Patientenwiederholungen nicht gewertet (gesamt: 22)	52
Abbildung 10: Altersverteilung aller Patienten mit <i>E. faecium</i> -Fällen (gesamt: 45; J. = Jahre)	52
Abbildung 11: Altersverteilung der Patienten mit <i>E. faecium</i> -Fällen im UKR (gesamt: 22; J. = Jahre).....	52
Abbildung 12: Jahresverlauf aller eingesendeten <i>E. faecium</i> -Fälle von 2004 bis 2006 (gesamt: 46).....	53
Abbildung 13: Anzahl aller eingesendeten <i>E. faecium</i> -Fälle im Monatsverlauf des Jahres 2006 (gesamt: 46).....	54
Abbildung 14: Enterokokkenspezies aller untersuchten VRE-Isolate beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 53).....	55
Abbildung 15: Enterokokkenspezies der VRE-Isolate des UKR beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 24)	55
Abbildung 16: Vancomycinresistenz aller VRE-Isolate beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 53).....	55

Abbildung 17: Vancomycinresistenz der VRE-Isolate des UKR beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 24) 55

Abbildung 18: Resistenzen aller untersuchten *E. faecium*-Isolate gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 46)..... 57

Abbildung 19: Resistenzen der *E. faecium*-Isolate des UKR gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid beim Erstnachweis 2004 bis 2006 (gesamt: 23) 57

Abbildung 20: Enterokokkenspezies aller VRE-Isolate nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 53)..... 58

Abbildung 21: Enterokokkenspezies der VRE-Isolate des UKR nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 24) 58

Abbildung 22: Vergleich der Ergebnisse der Speziesuntersuchung aller VRE-Isolate beim Erstnachweis 2004 bis 2006 und nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 53)..... 59

Abbildung 23: Vancomycinresistenz aller untersuchten *E. faecium*-Isolate nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 47)..... 60

Abbildung 24: Vancomycinresistenz der *E. faecium*-Isolate des UKR nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 23) 60

Abbildung 25: Beispielbild eines Gels der *vanA/B*-PCR mit Standard 100 bp DNA Ladder (NK = Negativkontrolle; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren) 60

Abbildung 26: Resistenzen aller untersuchten *E. faecium*-Isolate gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 46)..... 61

Abbildung 27: Resistenzen der *E. faecium*-Isolate des UKR gegenüber Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid nach erneuter Testung im Jahr 2016 (gesamt: 23) 62

Abbildung 28: Anzahl der <i>espA</i> -Repeats aller untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate (gesamt: 46; Rep. = Repeats).....	63
Abbildung 29: Anzahl der <i>espA</i> -Repeats der <i>E. faecium</i> -Isolate des UKR (gesamt: 23; Rep. = Repeats)	63
Abbildung 30: Beispielbild eines Gels der <i>espA</i> -PCR mit Standard Lambda DNA/Eco471 (Avall) Marker (4, 6, 10 = Anzahl der <i>espA</i> -Repeats; neg. = <i>esp</i> -negativ; NK = Negativkontrolle; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren)	63
Abbildung 31: Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse des <i>hyl</i> -Nachweises aller untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate (gesamt: 46).....	64
Abbildung 32: Verteilung der positiven und negativen Ergebnisse des <i>hyl</i> -Nachweises der <i>E. faecium</i> -Isolate des UKR (gesamt: 23)	64
Abbildung 33: Beispielbild eines Gels der <i>hyl</i> -PCR mit Standard 1 kb Plus DNA Ladder (pos. = <i>hyl</i> -positiv; neg. = <i>hyl</i> -negativ; NK = Negativkontrolle; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren)	64
Abbildung 34: Beispielbild eines Gels der MLST-PCRs mit Standard 1 kb Plus DNA Ladder: <i>atpA</i> , <i>ddl</i> , <i>gdh</i> , <i>gyd</i> , <i>purK</i> , <i>pstS</i> , <i>adK</i> (NK = Negativkontrolle der vorhergehenden PCR; Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren) ..	66
Abbildung 35: Anzahl der Allelvarianten des <i>atpA</i> -Gens aller untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate (gesamt: 46)	67
Abbildung 36: Anzahl Allelvarianten des <i>atpA</i> -Gens der <i>E. faecium</i> -Isolate des UKR (gesamt: 23).....	67
Abbildung 37: Anzahl der Allelvarianten des <i>ddl</i> -Gens aller untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate (gesamt: 46)	67
Abbildung 38: Anzahl der Allelvarianten des <i>ddl</i> -Gens der <i>E. faecium</i> -Isolate des UKR (gesamt: 23).....	67
Abbildung 39: Anzahl der Allelvarianten des <i>gyd</i> -Gens aller untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate (gesamt: 46)	68

Abbildung 40: Anzahl der Allelvarianten des <i>gyd</i> -Gens der <i>E. faecium</i> -Isolate des UKR (gesamt: 23).....	68
Abbildung 41: Anzahl der Allelvarianten des <i>pstS</i> -Gens aller untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate (gesamt: 46)	68
Abbildung 42: Anzahl der Allelvarianten des <i>pstS</i> -Gens der <i>E. faecium</i> -Isolate des UKR (gesamt: 23)	68
Abbildung 43: Ausschnitt der Basensequenz des <i>gdh</i> -Gens des abweichenden <i>E. faecium</i> -Isolates; Markierung der Punktmutation (T → G) zwischen Locus 410 und 420; Darstellung mit www.pubmlst.org (Stand 10.11.2016)	69
Abbildung 44: Ausschnitt der Basensequenz des <i>gdh</i> -Gens des abweichenden <i>E. faecium</i> -Isolates; Markierung der Punktmutation (T → G) zwischen Locus 410 und 420; Darstellung mit Chromas Lite.....	70
Abbildung 45: Anteile der verschiedenen MLST-Sequenztypen der <i>E. faecium</i> -Isolate aller untersuchten Krankenhäuser (gesamt: 46)	72
Abbildung 46: Anteile der verschiedenen MLST- Sequenztypen aller <i>E. faecium</i> -Isolate der externen Krankenhäuser (gesamt: 23).....	73
Abbildung 47: Anteile der verschiedenen MLST-Sequenztypen der <i>E. faecium</i> -Isolate des UKR (gesamt: 23)	73
Abbildung 48: Darstellung der MLST-Sequenztypen mit den jeweiligen Varianten des Resistenztyps, der <i>espA</i> -Repeats, des <i>hyl</i> -Gens und der Anzahl dieser Kombinationen.....	75
Abbildung 49: MLST-Sequenztypen 192 und 208 der <i>E. faecium</i> -Isolate aller untersuchten Krankenhäuser im Jahresverlauf von 2004 bis 2006 (2005 und 2006 vierteljährlich unterteilt)	76
Abbildung 50: Verteilung der häufigsten MLST-Sequenztypen 192 und 208 sowie anderer Sequenztypen auf alle untersuchten Krankenhäuser (KH = Krankenhaus; Barmh. Brüder = Barmherzige Brüder; BKH =	

Bezirkskrankenhaus; KH-Ges. = Krankenhaus-Gesellschaft; gesamt: 46)	78
Abbildung 51: Verteilung der <i>E. faecium</i> -Fälle auf Abteilungen des UKR (gesamt: 23; HÄMA/ONKO = Hämato-Onkologie).....	79
Abbildung 52: Verteilung der VRE-Fälle auf Stationsarten im UKR; (gesamt: 23; Intensiv = Intensivstationen, Normal = Normalstationen).....	79
Abbildung 53: Zuordnung der drei häufigsten Sequenztypen ST 192, 208 und 17 zu den Stationsarten Normalstation und Intensivstation unter Einbeziehung aller untersuchten <i>E. faecium</i> -Isolate (gesamt: 33; Drop-out: 1; Intensiv = Intensivstationen, Normal = Normalstationen)	80
Abbildung 54: Verteilung der verschiedenen Sequenztypen der <i>E. faecium</i> -Isolate auf die Stationen des UKR; (gesamt: 23; KMT = Knochenmarkstransplantationsstation).....	82
Abbildung 55: Anteil der Nachweismethoden VRE-Screening und kultureller Nachweis (gesamt 46)	82
Abbildung 56: Materialgruppen der <i>E. faecium</i> -Proben (BAL = Bronchoalveoläre Lavage; gesamt: 46).....	83
Abbildung 57: Verteilung von Kolonisierungen und möglichen Infektionen mit <i>E. faecium</i> (gesamt: 46)	84
Abbildung 58: Anzahl der Fälle an Kolonisierungen und möglichen Infektionen mit <i>E. faecium</i> zugeordnet zu Sequenztypen (gesamt: 46).....	85
Abbildung 59: VRE-Mehrfachnachweis von Patient 1: ST 192 (ST = Sequenztyp; pos. = positiv; O ITS = operative Intensivstation)	86
Abbildung 60: VRE-Mehrfachnachweis von Patient 2: ST 780 → ST 17 (ST = Sequenztyp; pos. = positiv; neg. = negativ; HÄMA/ONKO = Hämato-Onkologie; KMT = Knochenmarkstransplantationsstation; ZVK = Zentralvenenkatheter).....	86

Abbildung 61: Prozentualer Anteil an Vancomycinresistenzen unter invasiven *E. faecium*-Isolaten der einzelnen europäischen Länder im Jahr 2016 (aus Blutkulturen); nach dem European Centre for Disease Prevention and Control [54]..... 88

Abbildung 62: Verteilung der VRE-Fälle am UKR von den Jahren 2004 bis 2014 (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Wulf Schneider des Instituts für klinische Mikrobiologie und Hygiene am UKR)..... 91

Abbildung 63: Verteilung der MLST-Sequenztypen der Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate des UKR der Jahre 2004 bis 2011 (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Wulf Schneider des Instituts für klinische Mikrobiologie und Hygiene am UKR)..... 103

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wulf Schneider, dem Leiter der Abteilung für Hygiene am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKR, für die umfassende Betreuung. Die stets freundliche und geduldige Unterstützung in zahlreichen fachlichen Gesprächen hat maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger, dem Leiter der Abteilung für Infektiologie am UKR, möchte ich für die Übernahme des Korreferats und die aufmerksame Durchsicht der Arbeit danken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Maria Kurz, die mir bei der Durchführung der Laborarbeit dieser Studie jederzeit hilfsbereit und tatkräftig zur Seite stand. Auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene möchte ich für die Bereitstellung von Materialien und Geräten und die angenehme Zusammenarbeit danken.

Meinen Promotionskolleginnen Vanessa Meier und Johanna Peterander danke ich für den persönlichen und fachlichen Austausch und die schöne gemeinsame Zeit.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie für den Rückhalt und die Motivation während des gesamten Studiums und dem Verfassen dieser Dissertation.