

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 IM  
JAHR 2008

Inaugural –Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin der

Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vanessa Maria Katharina Meier

2020



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 IM  
JAHR 2008

Inaugural –Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin der

Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Vanessa Maria Katharina Meier

2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wulf Schneider

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung:

11.01.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Gattung <i>Enterococcus</i> .....	1
1.2. Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken .....	3
1.2.1. Glykopeptidresistenz bei Enterokokken.....	3
1.2.2. Historische Entwicklung der Vancomycinresistenz bei Enterokokken.....	7
1.3. Virulenzfaktoren .....	9
1.3.1. <i>esp</i> -Gen.....	9
1.3.2. <i>hyl</i> -Gen.....	10
1.4. Clonal Complex 17 (CC17) .....	11
1.5. Typisierungsmethoden für <i>E. faecium</i> .....	12
1.5.1. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	12
1.5.2. Amplified Fragment-Length-Polymorphism (AFLP).....	12
1.5.3. Multi-locus sequence typing (MLST) .....	13
1.5.4. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) .....	14
1.5.5. Whole Genome Sequencing (WGS).....	15
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	17
2.1. Materialien .....	17
2.2. Methoden .....	21
2.2.1. Methoden zum VRE-Nachweis im Jahr 2008 .....	21
2.2.1.1. Screening-Proben .....	21
2.2.1.2. Klinische Proben .....	23
2.2.2. Stammsammlung.....	25
2.2.3. Labortechnische Arbeiten im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2016.....	25
2.2.3.1. Keimidentifizierung und Resistenztestung.....	25

2.2.3.2.	Molekulare Charakterisierung der VRE <i>E. faecium</i> Isolate mittels PCR.....	27
2.2.3.3.	Gelelektrophorese und Fotodokumentation .....	30
2.2.3.4.	Weiterführende Analyse zur MLST-Typisierung.....	33
2.2.3.4.1.	Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte für die MLST-Typisierung .....	33
2.2.3.4.2.	Zuordnung der MLST-Sequenztypen.....	34
2.2.4.	Auswertung der Patientendaten .....	35
<b>3.</b>	<b>Resultate</b> .....	<b>37</b>
3.1.	Verteilung der Proben .....	37
3.2.	Geschlecht der Patienten .....	39
3.3.	Altersverteilung .....	40
3.4.	Jahresverlauf.....	41
3.5.	Krankenhäuser.....	43
3.6.	Verteilung der Isolate im UKR .....	43
3.6.1.	Fachabteilungen .....	44
3.6.2.	Stationen.....	45
3.7.	Stationsart .....	46
3.8.	Anteil der Screening-Proben und klinischen Proben .....	47
3.9.	Klinisches Material.....	48
3.10.	Molekulare Charakterisierung der VRE <i>E. faecium</i> Isolate.....	49
3.10.1.	Enterokokkenspezies .....	50
3.10.2.	Nachweis der Resistenzgene <i>vanA</i> und <i>vanB</i> .....	52
3.10.3.	Bestimmung der Antibiotikaresistenzen .....	55
3.11.	MLST-Typisierung .....	58
3.11.1.	MLST-Typisierung in den Nicht-UKR-Krankenhäusern .....	59
3.11.2.	MLST-Typisierung im UKR.....	59

3.11.2.1.	MLST-Typisierung in den Fachabteilungen des UKR .....	60
3.11.2.2.	MLST-Sequenzierung in den Stationen des UKR .....	62
3.11.3.	MLST-Sequenzierung in den Stationsarten .....	65
3.11.4.	MLST-Sequenzierung der Probenarten .....	67
3.11.5.	MLST-Sequenzierung der Materialgruppen .....	69
3.11.6.	MLST-Sequenztypen im Jahresverlauf .....	72
3.12.	Nachweis des <i>esp</i> - und <i>hyl</i> -Gens .....	75
3.12.1.	Analyse <i>espA</i> -Repeats im <i>esp</i> -Gens.....	76
3.12.2.	Nachweis des <i>hyl</i> -Gens.....	77
3.13.	Übersicht über alle MLST-Sequenztypen in Kombination mit <i>vanA/B</i> , <i>hyl</i> , <i>espA</i> .....	78
3.14.	Mehrfachisolate.....	79
3.14.1.	Krankenhäuser.....	80
3.14.2.	Zeitliche Abstände der Probenentnahmen .....	81
3.14.3.	Antibiotikaresistenzuntersuchung .....	81
3.14.4.	Untersuchung auf die Resistenzgene <i>vanA</i> und <i>vanB</i> .....	81
3.14.5.	Nachweis des <i>hyl</i> -Gens.....	82
3.14.6.	Nachweis der <i>espA</i> -Repeats des <i>esp</i> -Gens.....	82
3.14.7.	MLST-Sequenzierung.....	83
3.15.	Vergleich der Ergebnisse der Originalbefunde von 2008 mit den Ergebnissen dieser Arbeit von 2016 .....	85
3.15.1.	Vergleich Ergebnisse der Bestimmung der Enterokokkenspezies .....	85
3.15.2.	Vergleich der Ergebnisse der Antibiotikaresistenztestung .....	86
3.15.3.	Vergleich der Ergebnisse des Nachweises des <i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -Gens ...	86
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>87</b>
4.1.	Zusammenfassung.....	87
4.2.	Methoden der Eingangsdagnostik im Jahr 2008 .....	87

4.3.	Typisierungsmethode .....	89
4.4.	Alters- und Geschlechtsverteilung .....	90
4.5.	Zeitliche Entwicklung .....	91
4.6.	Klinische Herkunft.....	93
4.7.	Antibiotikaresistenzen .....	94
4.7.1.	Vancomycinresistenz .....	94
4.7.2.	Teicoplaninresistenz .....	97
4.7.3.	Linezolidresistenz .....	99
4.8.	Bedeutung des <i>esp</i> -Gens und des <i>hyl</i> -Gens in VRE <i>E. faecium</i> .....	100
4.8.1.	Vorliegen des <i>esp</i> -Gens .....	100
4.8.2.	Vorliegen des <i>hyl</i> -Gens .....	102
4.8.3.	Vorliegen sowohl des <i>esp</i> - als auch des <i>hyl</i> -Gens .....	103
4.9.	Epidemiologische Verteilung der MLST-Sequenztypen .....	104
4.9.1.	Mehrfachisolate.....	106
4.10.	Präventionsmaßnahmen .....	108
4.11.	Ausblick.....	110
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>119</b>
<b>7.1.</b>	<b>Tabellen .....</b>	<b>119</b>
<b>7.2.</b>	<b>Abbildungen .....</b>	<b>121</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>



# 1. Einleitung

## 1.1. Gattung *Enterococcus*

Als Teil der natürlichen Darmflora von Mensch und Tier werden Enterokokken zu den grampositiven, Katalase-negativen, fakultativ anaeroben Kokken gezählt. [1]

Kennzeichnend für Enterokokken ist ihre Fähigkeit, sich unter extremen Umweltbedingungen zu vermehren. Zu diesen Umweltbedingungen zählen unter anderem pH-Werte von 4,6 bis 9,9 und Temperaturen von 5°C bis 50°C (bis zu 30 Minuten bei 60°C überlebensfähig; Temperaturoptimum 42,7°C). Ebenso sind diese Bakterien in Medien mit bis zu 6,5%iger NaCl-Lösung oder mit bis zu 40% Gallen Salzen überlebensfähig. Weiterhin gelten Enterokokken als resistent gegenüber Austrocknung und als überlebensfähig auf abiotischen Oberflächen, was eine wichtige Rolle bei der Durchführung von krankenhausspezifischen Hygienemaßnahmen spielt. [2]

Eine weitere Eigenschaft von Enterokokken ist die Fähigkeit zur Spaltung von Aesculin, welche als wichtiges Nachweisverfahren dient. [1]

Innerhalb der Gattung *Enterococcus* sind über 50 Enterokokkenspezies bekannt, wobei *E. faecalis* und *E. faecium* die wichtigsten humanpathogenen Vertreter mit der größten klinischen Bedeutung sind. [3]

Als zweit- bis dritthäufigster Erreger der durch Bakterien hervorgerufener Krankenhausinfektionen (nosokomialer Infektionen) können Enterokokken eine Reihe zum Teil schwerwiegender Infektionen verursachen. [2] Als Beispiele für solche Infektionen können Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen, Katheter-assoziierte Infektionen bis hin zu gravierenden Erkrankungen wie Sepsis und Endokarditis aufgeführt werden. [1, 3]

Das hauptsächliche Vorkommen von Enterokokken in Krankenhäusern lässt sich durch bestimmte Umstände definieren (Tab. 1). So sind Patienten bestimmter Abteilungen, wie z.B. Hämatologie/Onkologie und Intensivstationen, besonders anfällig für eine Enterokokkeninfektionen. Außerdem sind vor allem ältere Patienten und immunsupprimierte Patienten als Risikopatienten aufzuführen. Weitere zu

berücksichtigende Aspekte für das gehäufte Auftreten im Krankenhaus sind der Antibiotika-Selektionsdruck und Hygienemängel. [3]

Tabelle 1: Begünstigende Faktoren, die zur Entstehung von Infektionen mit Enterokokken (inklusive VRE) beitragen [3]

<b>Begünstigende Faktoren für Enterokokken-/VRE-Infektionen</b>
Aufenthalt in bestimmten Abteilungen (z.B. Hämatologie/Onkologie, Chirurgie, Transplantationseinheiten, Neonatologie, Intensivstationen)
Art der Patienten (Früh-/Neugeborene, ältere Personen, Immunsupprimierte)
Antibiotika-Selektionsdruck
Behandlung mit Antibiotika mit „Enterokokkenlücke“ (keine Wirkung durch natürliche Resistenzen der Bakterien, z.B. Cephalosporine) bzw. vielschichtige und längere antibakterielle Therapie
Lange Krankenhausaufenthalte
Intraabdominal- und Herz/Thorax-chirurgische Eingriffe
Hygienemängel

## 1.2. Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken

Neben zahlreichen natürlichen Antibiotikaresistenzen stellen erworbene Antibiotikaresistenzen eine große Herausforderung bei der Behandlung von Enterokokkeninfektionen dar. Beispielsweise ist die Ampicillin-Resistenz ein wichtiges Merkmal Hospital-adaptierter Enterokokkenstämme. [1]

In Tabelle 2 sind die verschiedenen natürlichen und erworbenen Resistenzen gegen Antibiotika bei Enterokokken dargestellt.

Tabelle 2: Natürliche und erworbene Resistenzen gegen Antibiotika bei Enterokokken [1, 3]

Natürliche Resistenzen	Erworbene Resistenzen
Alle Cephalosporine (1. bis 4. Generation)	Ampicillin (v.a. <i>E. faecium</i> )
Semisynthetische Penicilline	Makrolide
Monobactame	Tetrazykline
Polymyxine	Aminoglykoside (high level)
Aminoglykoside (low level)	Chloramphenicol
Lincosamide ( <i>E. faecalis</i> )	Fluorchinolone
Streptogramine ( <i>E. faecalis</i> )	Glykopeptide (v.a. <i>E. faecium</i> )
Mupirocin ( <i>E. faecalis</i> )	Streptogramine (v.a. <i>E. faecium</i> )
Vancomycin (low level bei <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> )	Oxazolidinone (Linezolid)
	Glycylcycline (Tigecyclin)

### 1.2.1. Glykopeptidresistenzen bei Enterokokken

Im Interesse dieser Arbeit, die sich mit der Verbreitung und Typisierung von VRE *E. faecium* beschäftigt, ist die erworbene Resistenz gegen Glykopeptide hervorzuheben, weshalb in folgendem Abschnitt genauer auf die Funktionsweise von Glykopeptidantibiotika und der speziellen Resistenzmechanismen gegenüber Glykopeptiden eingegangen wird.

Glykopeptide hemmen die Zellwandsynthese grampositiver Bakterien. Die Funktionsweise von Glykopeptidantibiotika basiert auf einer nicht-kovalenten Bindung

mit den endständigen D-Alanyl-D-Alanin-Resten der Aminosäureseitenketten des Hauptbausteins der Bakterienzellwandsynthese. Durch die Größe des Glykopeptids ist es den beteiligten Enzymen der Zellwandbiosynthese nicht möglich, an ihr Substrat zu binden und dementsprechend kann keine Zellwandbiosynthese stattfinden. [1, 4]

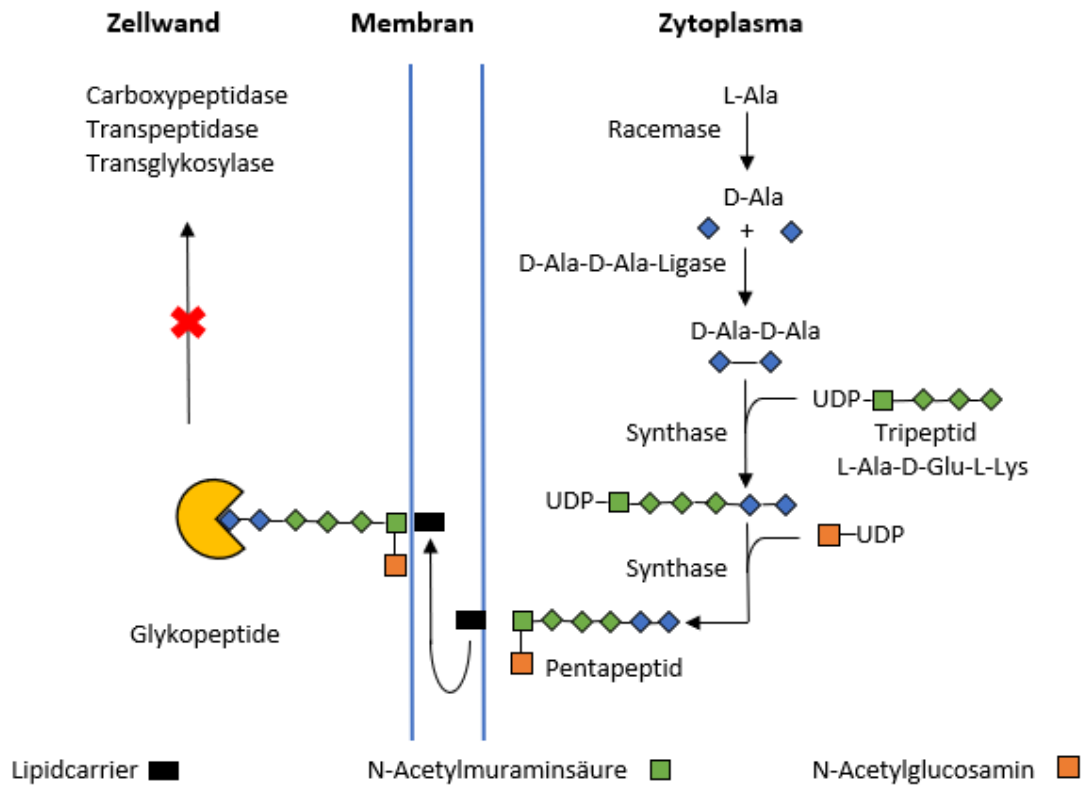


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs der Zellwandbiosynthese und des Wirkmechanismus von Glykopeptidantibiotika (z.B. Vancomycin) in Enterokokken: Glykopeptide binden an D-Alanyl-D-Alanyl (D-Ala-D-Ala) des Grundbausteins der Zellwand, wodurch eine Zellwandbiosynthese durch Carboxypeptidasen, Transpeptidasen und Transglykosylasen gehemmt wird (UDP = Uracildiphosphat); mod. nach Werner et al. [1], Arthur et al. [5] und Courvalin [6]

Der Mechanismus der Glykopeptidresistenz basiert auf der Modifikation des endständigen Rests der Aminosäureseitenketten dieses Grundbausteins der Bakterienzellwand. Mittels einer Ligase wird D-Alanin entweder durch D-Lactat oder D-Serin substituiert. Hieraus resultiert ein reduziertes Bindungsvermögen des Glykopeptides und folglich kann das Glykopeptid die Zellwandbiosynthese nicht mehr hemmen. [1]

Die Substitution mit D-Lactat führt zu einer High-Level Resistenz (minimale Hemmkonzentration (MHK) > 64 µg/ml) mit einer 1000fach reduzierten Affinität für Glykopeptide, während der Austausch mit D-Serin zu einer Low-Level Resistenz (MHK zwischen 4 und 32 µg/ml) mit einer siebenfach reduzierten Affinität zur Folge hat. [7]

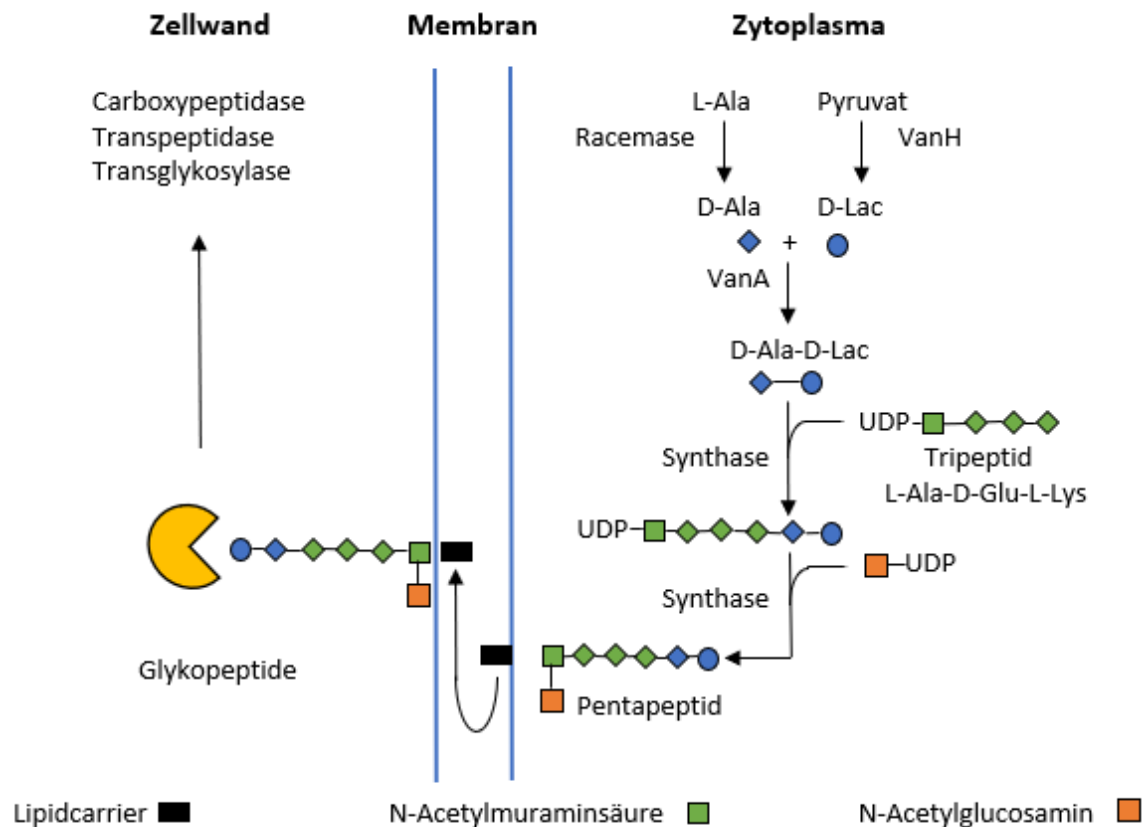


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Resistenzmechanismus gegenüber Glykopeptidantibiotika (z.B. Vancomycin) in Enterokokken des *vanA*-Resistenztyps: Glykopeptide können nicht an den veränderten Terminus D-Alanyl-D-Lactat (D-Ala-D-Lac) des Grundbaustein der Zellwand binden, wodurch die Zellwandbiosynthese nicht mehr gehemmt werden kann (UDP = Uracildiphosphat); mod. nach Arthur et al. [5]

Die oben genannte Ligase, die für den Resistenzmechanismus essenziell ist, ist ausschlaggebend für die Benennung des entsprechenden Resistenztyps. Insgesamt sind neun Resistenzgene bekannt: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* und *vanN*. Anzumerken ist, dass es sich genetisch betrachtet bei *vanC* um eine natürliche Resistenz und bei den übrigen Resistenzgenen um eine erworbene Resistenz handelt. Medizinisch relevant sind fast ausschließlich die Resistenzgene *vanA* und *vanB*, weshalb im Folgenden nur auf diese beiden Resistenzgene eingegangen wird. [1, 7]

Das *vanA*-Gen codiert eine Vancomycinresistenz mit einer MHK von 64-1000 µg/ml und eine Teicoplaninresistenz mit einer MHK von 16-512 µg/ml. [4] Das *vanA*-Operon ist Plasmid-codiert und eine Übertragung durch konjugativen Gentransfer ist möglich. Das genetische Element, das für die Glykopeptidresistenz verantwortlich ist, befindet sich auf dem Transposon Tn1546. [1]

Das *vanA*-Operon beinhaltet mehrere Genabschnitte für die Regulation, für die Glykopeptidresistenz und für weitere Hilfsfunktionen. Für die Regulation sind die Genabschnitte *vanR* und *vanS* verantwortlich. VanS, ein Transmembranprotein, fungiert als Sensor und reagiert auf die Anwesenheit von Glykopeptiden, indem es VanR, ein zytoplasmatisches Regulatorprotein, aktiviert. VanR bindet an die Promotorregion in Tn1546 und aktiviert die Transkription der Resistenzgene. Als erster Schritt wird *vanH* transkribiert, welches eine Dehydrogenase codiert, die Pyruvat zu D-Lactat reduziert. *VanA* codiert die bereits erwähnte Ligase, die den Einbau von D-Lactat in den endständigen Rest der Aminosäureseitenketten ermöglicht. *VanX* und *vanY* codieren zwei Enzyme, die verhindern, dass die gewöhnlichen D-Ala-Dipeptide nicht in die Zellwand eingebaut werden bzw. die bereits eingebauten D-Ala-Pentapeptide ausgebaut werden. Die Funktion des Gens *vanZ* ist bisher noch nicht geklärt, es wird aber ein Zusammenhang mit der Teicoplaninresistenz in *E. faecium* vermutet. [1, 7]

Das *vanB*-Gen codiert eine Vancomycinresistenz mit einer MHK von 4-1000 µg/ml, aber keine Teicoplaninresistenz (MHK = 0,5-1 µg/ml). [4] Das *vanB*-Gencluster ist oft chromosomal codiert und eine Übertragung durch konjugativen Gentransfer ist teilweise möglich. Die genetischen Elemente, die für die Glykopeptidresistenz verantwortlich sind, befinden sich auf den Transposons Tn1547, Tn1549 und Tn5382. [1] Die Funktionsweise des *vanB*-Clusters ähnelt der des *vanA*-Clusters. Die Proteine VanR<sub>B</sub> (Regulator) und VanS<sub>B</sub> (Sensor) ähneln jedoch nur entfernt den Regulator- und Sensorproteinen des *vanA*-Typs. VanS<sub>B</sub> kann nicht durch die Anwesenheit von Teicoplanin aktiviert werden und folglich keine Resistenz gegen Teicoplanin vermitteln. Anzumerken ist, dass dennoch durch Mutation von *vanS* eine Teicoplaninresistenz möglich ist. Des Weiteren befindet sich im *vanB*-Gencluster kein *vanZ*, sondern *vanW*, dessen Funktion ebenso unbekannt ist. [7]

Tabelle 3: Resistenztypen *vanA* und *vanB* mit minimaler Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Vancomycin und Teicoplanin, Genlokalisierung und mobilen Elementen, Ligase-Gene und dem dazugehörigen Ligase-Produkt [1, 4]

	VanA	VanB
MHK Vancomycin (µg/ml)	64-1000	4-1000
MHK Teicoplanin (µg/ml)	16-512	0,5-1
Lokalisation	Plasmid/Chromosom	Chromosom/Plasmid
Mobiles Element	Tn1546	Tn1547/ Tn1549/ Tn5382
Ligase-Gen	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>
Ligase-Produkt	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac
Enterokokken-Spezies	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>

### 1.2.2. Historische Entwicklung der Vancomycinresistenz bei Enterokokken

1899 wurde die erste Enterokokkeninfektion in Form einer Endokarditis beschrieben. Im Verlauf der darauffolgenden Jahre wurden unterschiedliche Infektionen (z.B. Harnwegsinfektionen, Endokarditis) mit Enterokokken in Verbindung gebracht. [8]

Ende der 1980er Jahre wurde von ersten Ausbrüchen in Krankenhäusern mit VRE *E. faecium* in Großbritannien und Frankreich berichtet. Die schnelle Verbreitung von VRE mit großen Ausbrüchen in Krankenhäusern begann in den USA in den 1990er Jahren, in Europa in den 2000er Jahren und anschließend weltweit. [9]

In Europa ließ sich historisch eine vergleichsweise hohe Anzahl gesunder VRE-Träger feststellen. Seit den 1970er Jahren wurde Avoparcin, ein Vancomycin ähnliches Glykopeptid, als Wachstumsbeschleuniger in Masttieren verwendet und es stand im Verdacht, zur Entstehung von VRE in Tieren und somit zu einer Übertragung auf den Menschen beizutragen. In den Jahren 1995-1997 wurde in Europa Avoparcin verboten. Nach dem Verbot konnte ein Rückgang der VRE-Besiedlung in Mensch und Tier festgestellt werden, wobei dieser langsam voranging und ein Reservoir an Resistenzen möglicherweise noch über Jahre vorhanden sein wird. In den 2000er Jahren wurde das

Verbot auf alle Antibiotika, die als Wachstumsbeschleuniger in Tieren verwendet wurden, ausgeweitet. [4, 8, 9]

In den USA hingegen wurde Avoparcin nie verwendet, dementsprechend fand sich dort keine Kolonisierung gesunder Menschen außerhalb des Krankenhauses. Dagegen wurde aufgrund der Häufigkeit von Ampicillin-resistenten Enterokokken als nosokomiale Infektionserreger vermehrt auf Vancomycin als Reserveantibiotikum zurückgegriffen, was wiederum in einem erhöhten Selektionsdruck resultierte. [10]

Die unterschiedlichen Entwicklungen der Vancomycinresistenzen in Europa und den USA zeigen, dass die Verbreitung von VRE über Grenzen, wie z.B. Mensch und Tier oder Länder bzw. Kontinente, hinaus erfolgen kann. [10]

Seit Mitte 2003 traten in Deutschland eine vermehrte Verbreitung von VRE *E. faecium* Stämme auf, die vor allem in Südwestdeutschland zu den ersten größeren Ausbrüchen führten. So betrug der Anteil von VRE *E. faecium* bei gleichbleibender Anzahl an untersuchten *E. faecium* Isolaten in der ersten Hälfte von 2003 4% und in der zweiten Hälfte von 2003 13% (durchgeführt von Labor Dr. Limbach in Heidelberg). [11, 12] In den darauffolgenden Jahren konnte ein stetiger Anstieg an VRE in Deutschland beobachtet werden, wie Abbildung 3 verdeutlicht. [13]

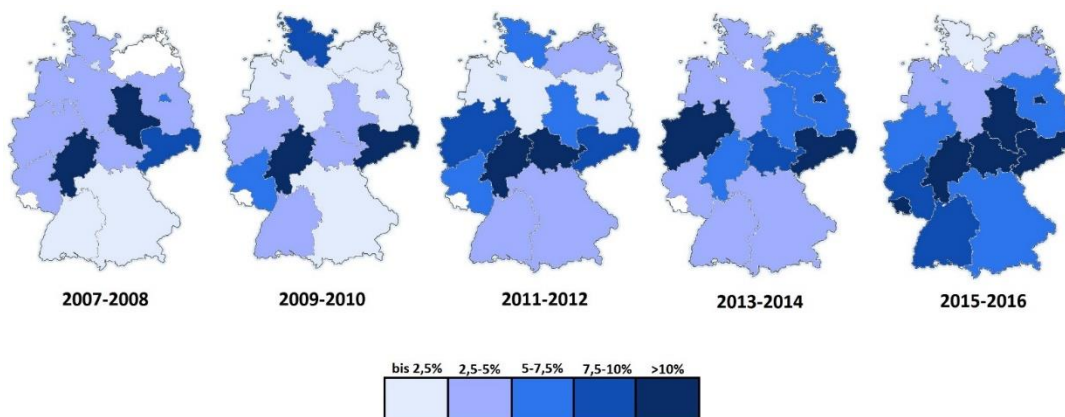


Abbildung 3: Verteilung der Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland (anhand der Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) 2007-2016); mod. nach Remschmidt et al [13]



2017 wurde von der World Health Organization (WHO) der Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika für VRE *E. faecium* eine hohe Priorität zugeschrieben. Insgesamt teilte die WHO zwölf verschiedene Erreger in drei Prioritätsstufen (kritisch, hoch, mittel) ein. Dies verdeutlicht abermals die weltweite Bedeutung von VRE *E. faecium*. [14]

### **1.3. Virulenzfaktoren**

Das alleinige Bestehen einer Vancomycinresistenz in *E. faecium* führt nicht zwingend zu einer klinischen Infektion oder einem VRE-Ausbruchsgeschehen. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass weitere genetische Elemente die Pathogenität bestimmter nosokomialer VRE *E. faecium* Stämme begünstigen.

#### **1.3.1. *esp*-Gen**

Das Enterococcal surface protein (Esp) ist ein Oberflächenprotein, das durch das *esp*-Gen codiert ist. Dieses Protein wird sowohl von *E. faecalis* als auch *E. faecium* unabhängig der Vancomycinresistenz exprimiert. Esp vermittelt die Bildung von Biofilm auf abiotischen Oberflächen und erhöht die Pathogenität bei experimenteller Endokarditis und Harnwegsinfektion. Das *esp*-Gen wird mit nosokomialen Infektionen und VRE-Ausbrüchen in Krankenhäusern in Verbindung gebracht. [8, 15, 16]

Leavis et al. zeigten in einer Studie, dass 94% der VRE-Isolate, von denen man einen Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen vermutete, *esp*-positiv waren. Außerdem waren ebenso 40% der klinischen VRE- und 57% der klinischen VSE-Isolate *esp*-positiv, während nur bei  $\leq 6\%$  der VRE bzw. VSE Surveillance-Isolate das *esp*-Gen nachgewiesen wurde. [16] Demnach scheint ein Zusammenhang zwischen dem *esp*-Gen und klinischer Isolate und dem Vorkommen nosokomialer Ausbrüche zu existieren.

Im Falle einer Infektion besteht die Möglichkeit einer direkten Interaktion des Oberflächenproteins Esp mit den Zellen des Wirts. Studien mit Mäusen zeigen ein erhöhtes Vorkommen von TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 und präinflammatorischen Zytokinen bei einer Infektion von Enterokokken, die das Esp-Protein besitzen. Daraus lässt sich folgern,

dass das Immunsystem des Wirts bei einer Enterokokkeninfektion mit dem Oberflächenprotein Esp stärker induziert wird. [17]

Das *esp*-Gen ist chromosomal codiert und Teil einer Pathogenitätsinsel mit sich wiederholenden genetischen Sequenzelementen. Diese sogenannten Repeats befinden sich in den Regionen A, B und C. Die variable Anzahl der Repeats kann gemeinsam mit einer weiteren genetischen Typisierungsmethode (z.B. Multilocus Sequence Typing) als zusätzlicher diskriminativer Faktor bei der Analyse von lokalen VRE-Ausbruchssituationen angewandt werden. [15]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anzahl der Repeats der Region A des *esp*-Gens der VRE *E. faecium* Isolate untersucht.

### **1.3.2. *hyl*-Gen**

Das *hyl*-Gen befindet sich auf einem großen, übertragbaren Megaplasmid mit unterschiedlichen Größen. Anfänglich wurde das *hyl*-Gen in VRE *E. faecium* Isolaten US-amerikanischer Krankenhäuser entdeckt. Anfang der 2000er Jahre wurde das *hyl*-Gen bereits in Europa nachgewiesen, darunter auch in Deutschland. [18]

Ursprünglich wurde dem Hyl-Protein eine Ähnlichkeit mit Hyaluronidase zugeschrieben. Diese Hyaluronidase gilt als Virulenzfaktor bei anderen gram-positiven Bakterien. Allerdings konnte eine Hyaluronidase-Aktivität bei *E. faecium* nicht nachgewiesen werden. Diese Hyaluronidase-Theorie wurde durch die Meinung ersetzt, dass das *hyl*-Gen vermutlich eine Glykosid-Hydrolase codiert. Dieser Glykosid-Hydrolase wurde zugeschrieben, eine intestinale Kolonisierung und das Eindringen in das Peritoneum zu erleichtern. [19, 20]

Aufgrund dieser Vermutungen und aus dem Grund, dass das *hyl*-Gen fast ausschließlich in Isolaten klinischen Ursprungs vorkommt, wurde dem *hyl*-Gen eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktor zugeschrieben. Hierbei konnte allerdings die genaue Funktionsweise als Virulenzfaktor nicht festgestellt werden. [19]

Neuste Erkenntnisse zeigen, dass das *hyl*-Gen keine Rolle als Virulenzfaktor bei experimenteller Peritonitis spielt. Weiterhin kann aber die Relevanz bei Isolaten

klinischen Ursprungs und Hospital-adaptierten Stämmen nicht abgesprochen werden, da das *hyl*-Gen fast ausschließlich bei diesen Isolaten bzw. Stämmen nachgewiesen werden kann. [19]

#### **1.4. Clonal Complex 17 (CC17)**

*E. faecalis* und *E. faecium* spielen eine große Rolle als Erreger nosokomialer Infektionen. Als Krankenhauskeime sind vor allem *E. faecium* Isolaten des Clonal Complex 17 (CC17) eine große Bedeutung zugeschrieben. Hierbei handelt es sich um eine genetische Linie von *E. faecium*, die epidemisch auftritt und besonders an die Krankenhausumgebung adaptiert ist. Kennzeichnend für CC17 sind Resistenzen gegen Ampicillin und Quinolone und eine häufige Assoziation mit bestimmten Virulenzfaktoren (wie *esp* und *hyl*). [4, 21, 22] Zu CC17 zählen unter anderem die MLST-Sequenztypen ST17, ST18, ST78 und ST192. [8]

Aufgrund der Umweltpersistenz dieser Hospital-assoziierten *E. faecium* Stämme können diese sich bereits bei kleinen Hygienemängel verbreiten. Dies spiegelt sich in dem häufigen Vorkommen Ampicillin/Vancomycin-resistenter *E. faecium* des CC17 in deutschen Kliniken wieder. Beispielsweise durch Patientenverlegungen können sich diese Keime auch in verschiedenen Kliniken oder Bundesländern ausbreiten. Ein lateraler Gentransfer des Resistenzgens *vanA* bzw. *vanB* kann das Auftreten verschiedener Klone der multiresistenten *E. faecium* Stämme innerhalb eines Krankenhauses als Folge haben. [12]

## **1.5. Typisierungsmethoden für *E. faecium***

Insgesamt gibt es fünf unterschiedliche Typisierungsmethoden für *E. faecium*: Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), *amplified fragment-length-polymorphism* (AFLP), *multilocus-sequence typing* (MLST), *multiple-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) und *whole genome sequencing* (WGS), die im Folgenden näher erläutert werden.

### **1.5.1. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

PFGE nutzt die gelelektrophoretische Auftrennung großer Restriktionsfragmente von chromosomaler DNA zur Unterscheidung verschiedener Bakterienstämme. Der erste Schritt beinhaltet das Einsetzen der Organismen in Agarose mit anschließender Lyse der Organismen. Mittels spezieller Restriktions-Endonukleasen wird die DNA an bestimmten Erkennungsstellen in Fragmente geschnitten. Je nachdem welcher Organismus untersucht wird, werden unterschiedliche Endonukleasen verwendet, die die DNA an unterschiedlichen Erkennungsstellen schneiden. Nachdem Teile der Agarose mit den Fragmenten in ein weiteres Agarosegel mit Löchern gegeben worden sind, wird dieses Gel an eine Wechselstromquelle angeschlossen. Durch diesen Vorgang entstehen bestimmte genomische Muster, die miteinander verglichen werden können. Somit ist eine Aussage über den Verwandtschaftsgrad der untersuchten Isolate möglich. [23, 24] Ein Datenaustausch ist wegen fehlender einheitlicher Protokolle nur dann möglich, wenn die zu vergleichenden Parteien dasselbe Protokoll verwenden. [24, 25] Für Enterokokken wurde beispielsweise von Murray *et al* ein Protokoll entwickelt, für das die Endonuklease *SmaI* ausgewählt wurde. [23]

### **1.5.2. *Amplified fragment-length-polymorphism* (AFLP)**

Die Typisierungsmethode *amplified fragment-length-polymorphism* (AFLP) verwendet Restriktionsenzyme, die die DNA schneiden, um kompatible DNA-Enden für die Polymerase Chain Reaction (PCR) zu schaffen. Die amplifizierten, spezifischen PCR-Produkte werden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgeteilt und anschließend analysiert. [26]

Trotz der schnellen Durchführbarkeit überwiegt jedoch der Nachteil einer schlechten Reproduzierbarkeit, vor allem zwischen zwei Laboren. [27]

### 1.5.3. Multi-locus sequence typing (MLST)

Bei der Methode des *multi-locus sequence typing* (MLST) werden die Allele der DNA-Fragment-Sequenzen von insgesamt sieben *housekeeping*-Genen analysiert. In jedem *housekeeping*-Gen gibt es eine unterschiedliche Anzahl an Allelvarianten (siehe Tabelle 4). Die Kombination der numerischen Allelvarianten der verschiedenen MLST-Gene zu einem siebenstelligen Zahlencode ergibt einen bestimmten Sequenztyp, der über eine kuratierte Internethomepage ermittelt werden kann. [28]

Mittels passender Primer für die Genloci *gdh*, *purK*, *pstS*, *atpA*, *gyd*, *adk* und *ddl* werden PCRs durchgeführt, die anschließend sequenziert werden. Durch Ermittlung der jeweiligen Allelvariante ist die Zuordnung einer Allel-Nummer zu den verschiedenen Loci möglich. Die Kombinationen der Allel-Nummern der sieben Housekeeping-Genen ergibt schließlich den Sequenztyp. [28]

Tabelle 4: Varianten der Allele der *housekeeping*-Gene mit der jeweiligen Sequenzlänge (bp = Basenpaare) [29]

Locus	Sequenzlänge (bp)	Allele
<i>gdh</i> (glucose-6-phosphat dehydrogenase)	530	93
<i>purK</i> (phosphoribosylaminoimidazol carboxylase ATPase subunit)	492	117
<i>pstS</i> (phosphate ATP-binding cassette transporter)	583	151
<i>atpA</i> (ATP synthase, alpha subunit)	556	124
<i>gyd</i> (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	395-398	69
<i>adk</i> (adenylate kinase)	437	65
<i>ddl</i> (D-alanine:D-alanine ligase)	456-465	111

Besonders bei überregionalen epidemiologischen Studien, bei Ausbruchssituationen und bei Untersuchungen zu speziellen Stämmen mit Multiresistenzen kann das MLST-Verfahren erfolgreich eingesetzt werden. Der Aufbau eines internationalen Netzwerks zur Erfassung der verschiedenen MLST-Sequenztypen kann zu einem besseren Verständnis der VRE-Situation in verschiedenen Krankenhäusern aber auch weltweit führen. [28, 30]

Basierend auf den MLST-Ergebnissen konnte die genetische Linie CC17 identifiziert werden, die mit nosokomialen Ausbrüchen und Infektionen durch *E. faecium* in Verbindung steht. [4, 22]

#### 1.5.4. *Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)*

Grundlage der Typisierungsmethode *multiple-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) sind die Unterschiede der Anzahl mehrerer unterschiedlicher Repeat-Regionen (VNTR = variable number of tandem repeats), die auf dem Chromosom eines Bakteriums lokalisiert sind. Insgesamt gibt es zehn verschiedenen VNTR Loci, wobei für die MLVA-Typisierung lediglich sechs VNTR-Loci herangezogen werden (siehe Tabelle 5). Die Kombination dieser VNTR-Loci ergibt einen bestimmten MLVA-Typ (MT). [27]

Mittels PCR kann die Anzahl der Repeats für jede VNTR-Region ermittelt werden. Anschließend ergibt die Kombination der Anzahl der Repeats den jeweiligen MLVA-Typ. [27]

Tabelle 5: VNTR-Loci mit Repeatlänge (bp = Basenpaare) und möglichen Anzahl an Repeats [27]

Locus	Repeatlänge (bp)	Anzahl an Repeats
VNTR-1	123	0-8
VNTR-2	279	1-14
VNTR-7	121	1-7
VNTR-8	121	1-7
VNTR-9	121	1-3
VNTR-10	121	0-3

### **1.5.5. *Whole genome sequencing* (WGS)**

Beim *whole genome sequencing* (WGS) wird das gesamte Genom eines Bakteriums sequenziert. Aufgrund seiner hohen Diskriminierungsfähigkeit und der Vergleichbarkeit der ermittelnden Sequenzen mit bereits bestehenden Datenbanken wird sich das WGS womöglich als neuer Goldstandard der molekulargenetischen Typisierung durchsetzen. Als Nachteil sind hingegen die hohen Kosten (Personal, Geräte, Reagenzien) für dieses Verfahren aufzuführen. [31, 32]

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Nicht nur am Universitätsklinikum Regensburg (UKR), sondern auch in ganz Deutschland bzw. Europa konnte in den letzten Jahren eine steigende Anzahl an VRE *E. faecium* Fällen festgestellt werden. Grundlage für Präventionsmaßnahmen bzw. die Bekämpfung von VRE *E. faecium* ist eine genaue Kenntnis über die Ausbreitung, die Resistenzgene, mögliche Virulenzfaktoren und die genetische Verwandtschaft. Die steigenden Zahlen an VRE-Infektionen und die Aneignung weiterer Antibiotikaresistenzen gegen Reserveantibiotika unterstreichen die Notwendigkeit des Verständnisses der Ausbreitungswege und damit auch die Weiterentwicklung von Schutzmaßnahmen und Bekämpfungsmaßnahmen gegenüber VRE *E. faecium*.

Seit dem Jahr 2004 werden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene am UKR die Erstnachweise von VRE in einer Stammsammlung asserviert. Durch die Analyse dieser Bakterienisolate ist es möglich, einen Rückschluss auf mögliche örtliche, zeitliche und genetische Zusammenhänge der VRE-Fälle der letzten Jahre zu schließen. Die vorliegende Arbeit ist ein Teil mehrerer Dissertationen der Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Wulf Schneider in der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKR, die als Ziel die epidemiologische und genetische Untersuchung der VRE *E. faecium* Isolate des UKR ab dem Jahr 2004 hat.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die VRE *E. faecium* Isolate der Stammsammlung des UKR aus dem Jahr 2008 retrospektiv untersucht und analysiert werden. Neben der Bestimmung der Resistenzgene *vanA* und *vanB* und der Virulenzfaktoren *esp* (spezifisch die Region A) und *hyl* soll der jeweilige MLST-Sequenztyp der Isolate ermittelt werden. Mittels dieser Ergebnisse soll die Ausbreitung und Häufung von VRE *E. faecium* in den einzelnen Fachabteilungen und Stationen, aber auch am gesamten UKR, analysiert werden. Durch den Vergleich mit anderen molekularepidemiologischen Studien soll ein genaueres Verständnis der VRE-Situation am UKR ermöglicht werden, aus dem sich Hinweise zur Optimierung der erforderlichen Präventionsmaßnahmen ableiten lassen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Materialien aufgelistet, die für diese Arbeit verwendet worden sind.

#### Chemikalien

- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| - AmpliTaq Gold® DNA Polymerase<br>with Buffer II & MgCl <sub>2</sub> | Life Technologies, Austin, USA     |
| - 100 mM dNTP Set   | Life Technologies, Austin, USA     |
| - Primer 50 µM (s. Tabelle xy)  | 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 <sub>2</sub> EDTA  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| - Borsäure  | Merck KGaA, Darmstadt              |
| - Tris  | Sigma-Aldrich, Steinheim           |

#### Puffer und Lösungen

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| - 1x TBE-Puffer                    | 10,8 g Tris<br>5,5 g Borsäure<br>4 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA<br>ad 1 l H <sub>2</sub> O |
| - 10x Loading Dye                  | 250 mg Bromphenolblau<br>33 ml 150 mM Tris<br>60 ml Glycerol<br>7 ml H <sub>2</sub> O       |
| - Lambda DNA/Eco471 (AvalI) Marker | Fermentas Life Sciences, Leon-Rot   |
| - O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>USA   |

- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder  
USA

### Geräte

- Pipetman (10, 20, 100, 200, 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, 2 - 20 µl LTS 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  
Italien
- MS1 Minishaker IKA Works, Inc., Wilmington, USA
- Tischzentrifuge POLY-LABO, Straßburg, Frankreich
- Centrifuge 5804 Eppendorf AG, Hamburg
- 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
- NanoDrop 1000 Spectrophotometer Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- Kühlschränk MediLine (-4 °C) Liebherr, Biberach an der Riß
- Gefrierschränk MediLine (-20 °C) Liebherr, Biberach an der Riß
- Gefrierschränk Comfort (-20 °C) Liebherr, Biberach an der Riß
- Gefrierschränk Hera Freeze (-80 °C) Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Moulinex Compact Mikrowelle Krups GmbH, Frankfurt am Main
- Brutschränk Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- NucleoVac 96 Vacuum Manifold Macherey&Nagel GmbH & Co. KG, Düren

- Waage Gottl. KERN & Sohn GmbH, Albstadt
- Ziegra Eismaschine Ziegra Eismaschinen GmbH,  
Isernhagen
- Magnetrührer IKA Works, Inc., Wilmington, USA
- Digital Graphic Printer Sony, Tokio, Japan
- Phoenix Bruker Daltronik GmbH, Billerica,  
USA
- MALDI-Tof MS BD (Becton, Dickinson and  
Company),  
  
Franklin Lakes, 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 VWR International, Radnor, USA  
(100 ml, 1000 ml)

### Verbrauchsmaterialien

- Microbank Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill,  
Kanada
- NucleoFast®96 PRC Plates Macherey&Nagel GmbH & Co. KG,  
Düren
- Neo-Touch Gloves Ansell Healthcare Europe, Brüssel,  
Belgien
- Einmal-Impfösen VWR International, Radnor, USA
- Falcon Tubes Corning Science, Mexico
- Microbank Bacterial and Fungal Preservation System Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill,  
Kanada



## **2.2. Methoden**

In diesem Abschnitt werden sowohl die Nachweismethoden für VRE im Jahr 2008 als auch die labortechnische Vorgehensweise und Auswertungsmethode im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2016 erläutert.

### **2.2.1. Methoden zum VRE-Nachweis im Jahr 2008**

Die Daten, die 2008 erhoben wurden, wurden freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene vom Universitätsklinikum Regensburg zur Verfügung gestellt.

Die Vorgehensweise zum Nachweis von VRE unterscheidet sich je nach Art der eingesandten Probe und Fragestellung. Es gab zwei verschiedene Probenarten, nämlich Screening-Proben und klinisch-mikrobiologische Proben. Im Folgenden sollen die beiden Nachweismethoden erläutert werden.

#### **2.2.1.1. Screening-Proben**

Für die Durchführung einer VRE-Screeninguntersuchung musste eines der im Folgenden beschriebenen Kriterien erfüllt werden: Patienten, die mit bekannter VRE-Besiedlung stationär aufgenommen wurden, oder VRE-Kontaktpatienten, welche durch das Teilen eines Zimmers mit einem VRE-Patienten definiert wurden, erfüllten die Voraussetzungen für ein VRE-Screening. Außerdem wurde die Screeninguntersuchung routinemäßig bei Patienten der Station 21 (Knochenmarkstransplantation) durchgeführt. Ein Szenario, das ein VRE-Screening von ganzen Stationen zur Folge hätte, wäre eine VRE-Ausbruchssituation. Wird bei mindestens zwei Patienten in einem zeitlichen und/oder räumlichen Zusammenhang eine nosokomiale VRE-Infektion diagnostiziert, so spricht man von einer VRE-Ausbruchssituation, welche, wie bereits erwähnt, ein erweitertes Screeningverfahren erfordert.

Bei der VRE-Screeninguntersuchung wurde ein Rektal- oder Perianalabstrich beim Patienten genommen. Dieser wurde in eine VRE-Bouillon eingerührt und über Nacht bei  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Die Bouillon enthielt  $8 \mu\text{g/ml}$  Vancomycin, das die Vancomycin-

sensiblen Enterokokken abtöteten sollte, sowie Aesculin, welches durch Enterokokken gespalten wird und in einer Schwarzfärbung der Bouillon resultiert. Bei fehlender Schwarzfärbung wurde die Probe eine weitere Nacht bebrütet. Blieb wiederum eine Schwarzfärbung aus, wurde die Untersuchung als VRE-negativ beendet.

Die Bouillons mit Schwarzfärbung wurden als VRE-positive Nachweise weiter untersucht. Mittels LightCycler und Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezies (z.B. *E. faecium*, *E. faecalis*) differenziert. Eine PCR mittels Blockcyclerverfahren diente als Methode zum genetischen Nachweis der Resistenzgene *vanA*, *vanB* oder gegebenenfalls *vanC 1-3*. Alle positiven VRE-Proben wurden der Stammsammlung hinzugefügt und bei -80°C eingefroren.

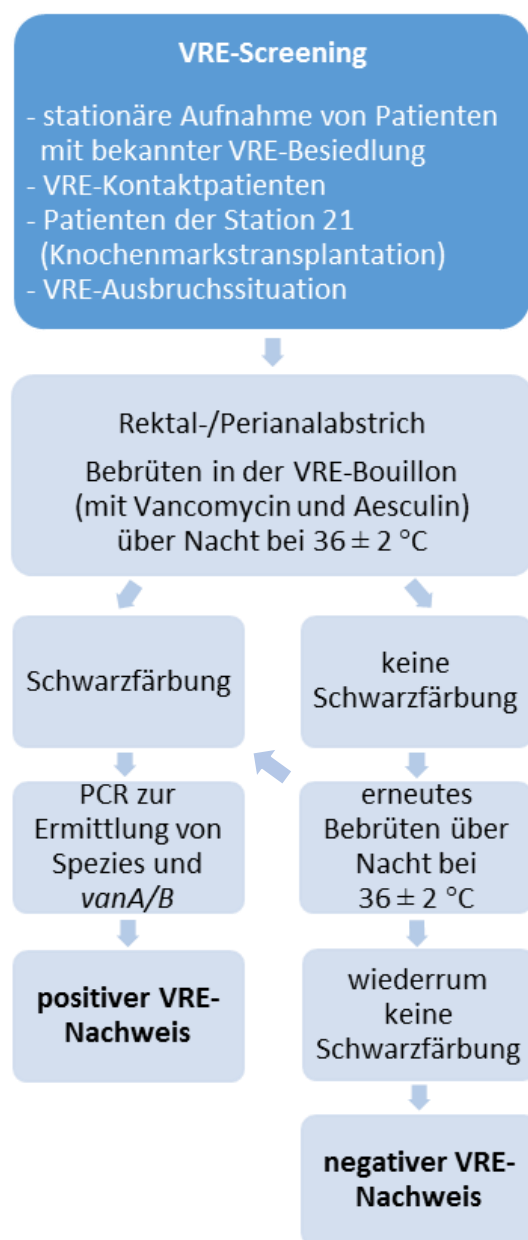


Abbildung 4: Darstellung des Ablaufs der VRE-Screeninguntersuchung am UKR

### 2.2.1.2. Klinische Proben

Klinische Proben sind Untersuchungsproben von Patienten mit Infektionsverdacht. Zuerst erfolgte ein kultureller Erregernachweis mittels Selektivmedien. Bei positivem Enterokokken-Nachweis wurde eine Reinkultur angelegt. Darauffolgend wurde die Spezies (z.B. *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) biochemisch mittels BD Phoenix differenziert. Die anschließende Resistenztestung wurde entweder mittels Plättchentest (Agardiffusion) oder mittels BD Phoenix (Mikrodilution) durchgeführt. Die jeweiligen Bewertungen resistent, intermediär und sensibel der Antibiotikaresistenz erfolgten nach CLSI-Kriterien 2008. Bei resistent oder intermediär bewerteten Proben wurde mittels E-Test (Gradientendiffusionstest) die MHK bestimmt und eine PCR zur Bestimmung der Resistenzgene *vanA*, *vanB* oder gegebenenfalls *vanC 1-3* durchgeführt. Außerdem wurden die Kulturen mit positivem VRE-Nachweis der Stammsammlung hinzugefügt und bei -80°C weggefroren.

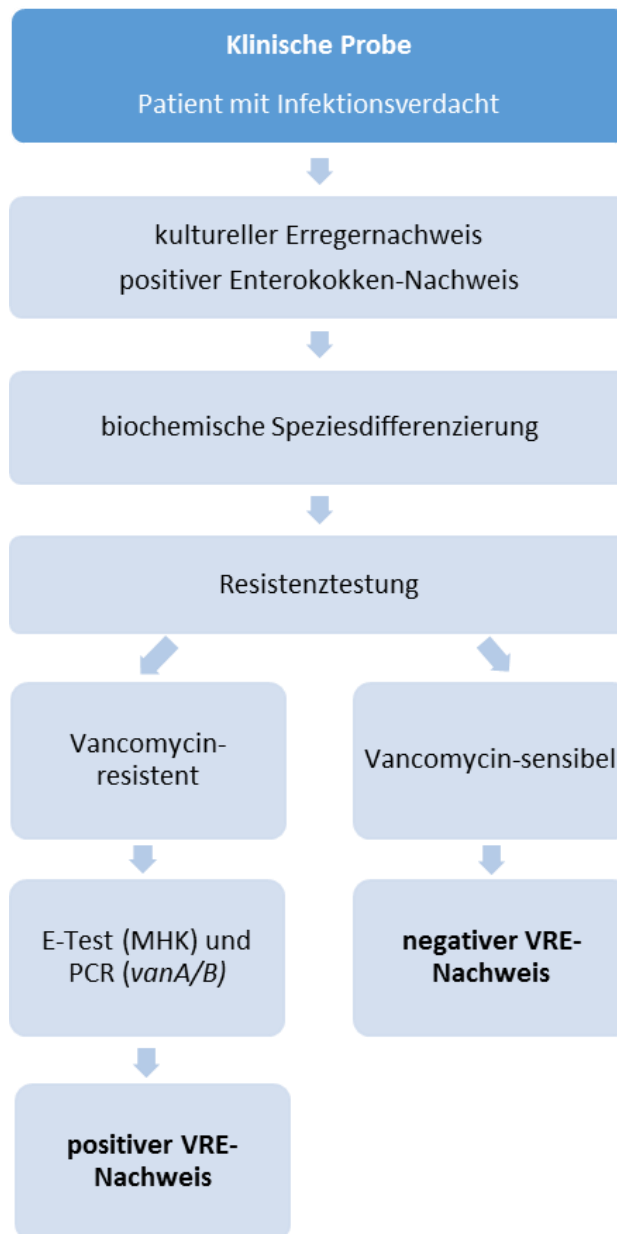


Abbildung 5: Darstellung des Ablaufs der Untersuchung klinischer Proben am UKR



### **2.2.2. Stammsammlung**

Der erste kulturelle Nachweis Vancomycin-resistenter Enterokokken eines Patienten wird als Erstnachweis bezeichnet. Alle Erstisolate wurden und werden in der Stammsammlung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Dabei wird nicht nach der Enterokokkenspezies (z.B. *E. faecium* oder *E. faecalis*) differenziert, sondern es werden generell alle Enterokokken mit Vancomycinresistenz der Stammsammlung hinzugefügt. Die Stammsammlung wurde im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet und alle 2008 asservierten VRE-Bouillons oder -Isolate aufgetaut und analysiert.

Über die Einfriernummer der Stammsammlung waren Befundnummern der jeweiligen VRE-Nachweise verfügbar. Aus der Befunddatenbank wurden alle zugehörigen kulturellen und PCR-basierten VRE-Befunde ausgedruckt und ausgewertet.

### **2.2.3. Labortechnische Arbeiten im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2016**

Alle der Stammsammlung zugehörigen VRE-Bouillons und -Isolate des Jahres 2008 wurden im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2016 zur genaueren Untersuchung aufgetaut. Die hierbei angewandten Methoden werden im Folgenden explizit erläutert.

#### **2.2.3.1. Keimidentifizierung und Resistenztestung**

Die VRE-Bouillons (Screening-Proben) der Stammsammlung wurden erneut in eine Bouillon mit Vancomycin und Aesculin (analog zu der 2008 verwendeten Bouillon) gegeben und über Nacht bei  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Die Bouillons mit Schwarzfärbung und dementsprechend VRE wurden mit einer Einmalöse auf einer Columbia-Blutplatte ausgestrichen und wiederum bei  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  über Nacht bebrütet. Hiervon wurde jeweils eine Einzelkolonie genommen und eine neue Columbia-Blutplatte beimpft und über Nacht bei  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Konnte nicht eindeutig eine Einzelkolonie abgegrenzt werden, wurden zwei neue Columbia-Blutplatten beimpft und erneut über Nacht bei  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  bebrütet.

Die VRE-Isolate (klinische Proben) der Stammsammlung wurden direkt auf einer Columbia-Blutplatte ausgestrichen und über Nacht bei  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  bebrütet.

Mittels MALDI-TOF (Massenspektrometrie) und BD Phoenix (Mikrodilution) wurden die Keimidentifizierung und die Antibiotikaresistenztestung durchgeführt. Zu den Antibiotikaresistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid wurden die MHK-Werte ermittelt und nach CLSI-Richtlinien (2016) als resistent, intermediär und sensibel bewertet. In dieser Arbeit wurden intermediär bewertete VRE-Isolate als resistent gewertet.

Die weitere molekulare Charakterisierung erfolgte ausschließlich für die VRE *E. faecium* Isolate, die eine Glykopeptidresistenz aufwiesen. Für die Durchführung der molekularen Charakterisierung der VRE *E. faecium* Isolate erfolgte zunächst die Isolierung der bakteriellen DNA mittels QIAamp DNA Mini Kit. Die isolierte DNA wurde für jedes Isolat auf jeweils zwei Cups verteilt. Die eine Hälfte der isolierten DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, um eine mögliche Neuuntersuchung zu gewährleisten. Die andere Hälfte der isolierten DNA wurde zur molekularen Charakterisierung verwendet.

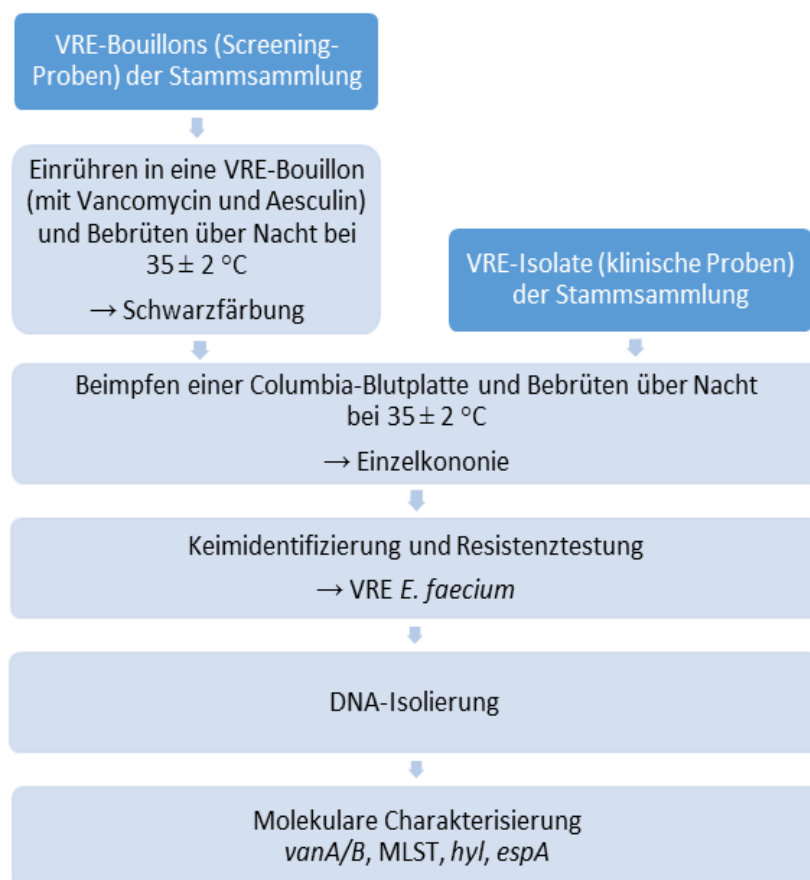


Abbildung 6: Darstellung der Arbeitsschritte der labortechnischen Untersuchungen dieser Arbeit im Jahr 2016

### 2.2.3.2. Molekulare Charakterisierung der VRE *E. faecium* Isolate mittels PCR

Generell ist eine Polymerase Chain Reaction (PCR) eine Technik, um bestimmte DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Benötigt werden eine DNA-Matrize, eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei Primer, die die gewünschte Sequenz einschließen, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Puffer und MgCl<sub>2</sub>. Beim ersten Schritt, der Denaturierung, wird die DNA durch die hohe Temperatur in ihre beiden Einzelstränge aufgespalten. Das darauffolgende Annealing beinhaltet die Anlagerung der Primer an die komplementären Bereiche der DNA-Stränge. Unter Verbrauch der dNTPs und mithilfe der DNA-Polymerase werden die Primer beim letzten Schritt, der DNA-Synthese, verlängert. [33]

Insgesamt wurden für alle VRE *E. faecium* Isolate zehn PCRs durchgeführt. Eine Multiplex-PCR differenzierte zwischen dem *vanA*- und *vanB*-Genotyp. Zur Bestimmung der MLST-Sequenztypen wurden sieben PCRs für die jeweiligen *housekeeping*-Gene benötigt. Eine weitere PCR überprüfte das Vorliegen des *hyl*-Gens. Die Anzahl der *espA*-Repeats des *esp*-Gens wurden mit einer zusätzlichen PCR analysiert. Die jeweiligen Primer, die für die einzelnen PCRs verwendet wurden, lassen sich aus Tabelle 6 entnehmen.

Tabelle 6: PCR-Primer

Primer		Nukleotidsequenz 5' → 3'	Quelle
<i>vanA</i>	forward	GG AGT AGC TAT CCC AGC ATT	Klare et al. [18]
	reverse	TCT GCA ATA GAG ATA GCC GC	
<i>vanB</i>	forward	GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT	
	reverse	CAT CGC CGT CCC CGA ATT TCA AA	
<i>atpA</i>	forward	TTC AAA TGG CTC ATA CGG	In Anlehnung an Homann et al. [28]
	reverse	AGT TCA CGA TAA GCA ACA	
<i>ddl</i>	forward	GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G	
	reverse	AAA AAG AAA TCG CAC CG	
<i>gdh</i>	forward	GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT	
	reverse	CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA	
<i>purK</i>	forward	CAG ATT GGC ACA TTG AAA G	
	reverse	TTC ATT CAC ATA TAG CCC G	
<i>gyd</i>	forward	CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C	
	reverse	CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC	
<i>pstS</i>	forward	TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G	
	reverse	CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC	
<i>adK</i>	forward	GAA CCT CAT TTT AAT GGG G	
	reverse	TGA TGT TGA TAG CCA GAC G	
<i>hyl</i>	forward	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG	Vankerckhoven et al. [34]
	reverse	GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA	
<i>espA</i>	forward	CGA CCG ATT TAG CAG TAA C	Leavis et al. [15]
	reverse	CAG CTG CGC TAA CAT CTA C	

Zur Durchführung der PCRs wurde ein PCR-Gemisch benötigt. Die Zusammensetzung pro PCR-Ansatz zeigt folgende Auflistung:

- H<sub>2</sub>O: 17,8 µl
- MgCl<sub>2</sub>: 2 µl
- 10xPuffer: 2,5 µl
- dNTPs (10 mM): 0,5 µl
- Goldtaq: 0,5 µl
- Primer (Forward): 0,5 µl
- Primer (Reverse): 0,5 µl
- Bakterielle DNA: 1 µl
- Insgesamt: 25 µl

Jeder PCR-Analyse wurde eine Negativkontrolle hinzugefügt, die anstatt der bakteriellen DNA 1 µl Wasser enthielt, um eine mögliche Kontamination auszuschließen.

Die Cups mit dem PCR-Gemisch wurden fünf Sekunden lang zentrifugiert und anschließend in den Cycler eingebracht. Nach Einstellen des Programms wurde die PCR im Cycler gestartet. Die verwendeten Cycler-Programme sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt. Programm 1 wurde für die Analyse der MLST-Marker, des Genotyps (*vanA/B*) und des *hyl*-Gens verwendet. Programm 2 diente dem Nachweis der *espA*-Repeats des *esp*-Gens. Nach Abschluss des Cyclerprogramms wurden die PCR-Produkte bis zur Entnahme auf 4°C gekühlt.

Tabelle 7: Cyclerprogramm 1 (Zeit- und Temperaturprogramm) für die PCRs zum Nachweis der MLST-Marker, der Gene *vanA/B*, *hyl* (Stage 1: Denaturierung; Stage 2: Annealing; Stage 3: DNA-Synthese)

Programm 1	Temperatur	Zeit
<b>Stage 1 (1 x)</b>	95°C	5 min
<b>Stage 2 (36 x)</b>	94°C	30 s
	55°C	30 s
	72°C	30 s
<b>Stage 3 (1 x)</b>	72°C	5 min
	4°C	∞

Tabelle 8: Cyclerprogramm 2 für die PCR zum Nachweis der *espA*-Repeats des *esp*-Gens (Stage 1: Denaturierung; Stage 2: Annealing; Stage 3: DNA-Synthese)

Programm 2	Temperatur	Zeit
<b>Stage 1 (1 x)</b>	95°C	5 min
<b>Stage 2 (35 x)</b>	94°C	50 s
	52°C	50 s
	72°C	1 min
<b>Stage 3 (1 x)</b>	72°C	5 min
	4°C	∞

Bei einer negativen *espA*-Untersuchung wurde zur Bestätigung dieses Ergebnisses eine weitere PCR durchgeführt, die ausschließlich das Vorhandensein des *esp*-Gens überprüfen sollte. Es wurde das Cyclerprogramm 1 verwendet und Tabelle 9 zeigt die verwendeten Primer.

Tabelle 9: PCR-Primer zum Nachweis des *esp*-Gens

Primer		Nukleotidsequenz 5' → 3'	Quelle
<i>esp</i>	forward	AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G	Vankerckhoven
	reverse	AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG	et al. [34]

### 2.2.3.3. Gelelektrophorese und Fotodokumentation

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, das an eine elektrische Spannung angeschlossen wurde. Die amplifizierte PCR-Produkte wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und das Agarosebild wurde dokumentiert und analysiert.

Die Gelelektrophorese beruht auf dem Prinzip, dass geladene Teilchen im elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Ladung wandern. DNA ist aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen und wandert dementsprechend zur Anode.

Ein wichtiger Bestandteil dieses Verfahrens ist die Gelmatrix, die es ermöglicht, die Amplifikate nach ihrer Größe zu trennen. Die Gele bestanden aus 0,6 g (1%ig) bzw. 1,2 g (2%ig) Agarosepulver, das in 60 ml 1xTBE in einer Mikrowelle aufgelöst wurde, und 100 µl Ethidiumbromid (c = 0,25 mg/ml pro Gel). Letzteres ist ein Fluoreszenzfarbstoff,

der sich zwischen den Basen festsetzt und unter UV-Licht die so markierte DNA sichtbar macht. Diese Mischung wurde zum Aushärten in Gelelektrophoresekammern gegeben und anschließend mit 1xTBE bedeckt. [33]

Die Laufstrecke der einzelnen DNA-Proben ist indirekt proportional zum Logarithmus der Länge der analysierten DNA-Fragmente, woraus eine Aufteilung der amplifizierten PCR-Fragmente der jeweiligen Größe resultiert. Um die Größe von DNA-Sequenzen mit unbekannter Länge zu bestimmen, werden ebenfalls kommerziell erhältliche Markerfragmente mit bekannter Größe aufgetragen, die als sogenannter Längenstandard dienen. [33]

Je 9 µl der PCR-Produkte und der Negativkontrolle wurden mit 1 µl LoadingDye vermischt und in die Taschen der Gele gegeben. Die Verwendung von LoadingDye führte zu einer gleichmäßigen Verteilung der PCR-Produkte in den Geltaschen.

Für die *espA*-Amplifikate wurde der Standard Lambda DNA/Eco471 (Avall) Marker verwendet, für die *vanA/B*-Amplifikate der Standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, für die *hyl*-Amplifikate und die MLST-Marker der Standard O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

Für den Standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder und die zugehörigen PCR-Produkte wurde das 2%ige Agarosegel und für alle anderen Standards und deren zugehörige PCR-Produkte wurde das 1%ige Agarosegel verwendet.

Anschließend wurden die Kammern an die Stromquelle PowerPac 300 bei 100 V für 30 bis 45 Minuten angeschlossen.

Mit dem Gerät AlphaImager HP konnten nun mittels UV-Licht die PCR-Amplifikate auf den Gelen sichtbar gemacht werden. Die verschiedenen Sequenzlängen aller PCR-Produkte sind in den Tabellen 10-12 anhand der jeweiligen Basenlänge aufgelistet.

Für die MLST-PCR diente die Gelelektrophorese und Fotoanalyse als Mittel zur Überprüfung des Erfolgs der PCR und der Eignung der Amplifikate zur Sequenzierung.

Die Fotoanalyse der Gelelektrophorese stellt den Abschluss der Untersuchung der Gene *vanA*, *vanB*, *hyl* und der *espA*-Repeats dar, die anhand spezifischer Sequenzlängen nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 10: Sequenzlängen in Basenpaaren (bp) für die *vanA*-/*vanB*-Gene, das *hyl*-Gen und das *esp*-Gen (Kontrolle des negativen Ergebnisses bei der *espA*-PCR) [18, 34]

Locus	Sequenzlänge (bp)
<i>vanA</i>	377
<i>vanB</i>	298
<i>hyl</i>	276
<i>esp</i>	510

Tabelle 11: Sequenzlängen in Basenpaaren (bp) der MLST-Marker *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS*, *adk* [29]

Locus	Sequenzlänge (bp)
<i>atpA</i>	556
<i>ddl</i>	456 - 465
<i>gdh</i>	530
<i>purK</i>	492
<i>gyd</i>	395 - 398
<i>pstS</i>	583
<i>adk</i>	437

Tabelle 12: Sequenzlängen in Basenpaaren (bp) der *espA*-Repeats [15]

Locus <i>espA</i>	Sequenzlänge (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



#### **2.2.3.4. Weiterführende Analyse zur MLST-Typisierung**

Für die Bestimmung der MLST-Sequenztypen wurden die PCR-Amplifikate zuerst aufgereinigt und anschließend sequenziert. Der exakte Ablauf wird im Folgenden geschildert.

##### **2.2.3.4.1. Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte für die MLST-Typisierung**

Die im Folgenden aufgezählten Arbeitsschritte wurden ausschließlich für die Amplifikate der sieben PCRs für die *housekeeping*-Gene *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS* und *adK* durchgeführt.

Das fertige PCR-Produkt wurde aufgereinigt, um die Primer zu entfernen, sodass letztendlich nur das gewünschte amplifizierte PCR-Produkt zurückblieb. Die dazu nötigen Schritte waren wie folgt: Zuerst wurde den Cups mit den PCR-Produkten je 80 µl Wasser hinzugefügt. Das Gemisch wurde nun in eine NucleoFast®96-Platte gegeben, welche unter Vakuum 10 Minuten an eine Pumpe angeschlossen wurde, wodurch das Gemisch gefiltert wurde, sodass sich nur noch die amplifizierten DNA-Fragmente in den einzelnen Plattenabschnitten befanden. Nachdem 40 µl Wasser hinzugefügt worden waren und der Inhalt mit einem Vortex durchmischt worden war, wurde die aufgereinigte DNA in neue Cups umgefüllt.

Mit dem Programm NanoDrop konnte der DNA-Gehalt quantifiziert werden und berechnet werden, wie viel DNA benötigt wurde, um den für die Sequenzierung notwendigen DNA-Gehalt von 150-300 ng zu erreichen. Der dementsprechenden Menge an DNA wurden 1 µl Reverse-Primer hinzugefügt, bzw. gab es für *pstS* noch einen zusätzlichen Ansatz mit Forward-Primer. Das Gemisch aus DNA und Primer wurde mit H<sub>2</sub>O vermengt, sodass sich letztendlich ein Volumen von 8 µl in dem Ansatz befand. Das fertige Gemisch wurde nun an die Firma GENEART GmbH in Regensburg geschickt, die die Sequenzierung durchführte. Die Sequenzierergebnisse wurden digital per E-Mail übermittelt und die Sequenzfiles konnten mit den Programmen GeneRunner und ChromasLite weiter bearbeitet und analysiert werden.

### 2.2.3.4.2. Zuordnung der MLST-Sequenztypen

Die sieben *housekeeping*-Gene *atpA* ( $\alpha$ -Untereinheit), *ddl* (D-Alanin-D-Alanin-Ligase), *gdh* (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase), *purK* (Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase ATPase-Untereinheit), *gyd* (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), *pstS* (Phosphat ATP-binding cassette Transporter) und *adK* (Adenylatkinase) zeigen jeweils unterschiedliche Sequenzvarianten, die eine Zuordnung zu Allel-Nummern erlauben. Die Kombination der sieben Allel-Nummern ergibt den MLST-Sequenztyp.

Die Sequenzdaten der MLST-Gene *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd* und *adK* wurden mit dem Programm Chromas Lite analysiert. Für *pstS* wurden für jedes Isolat zwei Sequenzierungen mit je einem forward- und einem reverse-Primer durchgeführt, um eine ausreichende Sequenzlänge zu erreichen. Für das Zusammenführen dieser beiden Sequenzdaten wurde das Programm GeneRunner verwendet.

Mit den daraus erhaltenen Sequenzen konnten anschließend mithilfe der Website [www.pubmlst.de](http://www.pubmlst.de) (Stand 05.10.2016) die Sequenztypen ermittelt werden. Für jedes *housekeeping*-Gen wurde die Sequenzvariante in die Maske der Website eingefügt und anschließend wurde die zugehörige Allel-Nummer angezeigt. Die sieben Allel-Nummern wurden mit einem zweiten Schritt in eine weitere Eingabemaske eingetragen, die automatisch den jeweiligen MLST-Sequenztyp ermittelte.

Tabelle 13: MLST-Sequenztypen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, mit den dazugehörigen Allel-Nummern der Housekeeping-Gene [35]

MLST-Sequenztyp	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adK</i>
17	1	1	1	1	1	1	1
78	15	1	1	1	1	1	1
117	9	1	1	1	1	1	1
186	7	2	1	1	5	1	1
192	15	1	1	1	1	7	1
202	1	1	1	1	1	7	1
203	15	1	1	1	1	20	1
378	1	2	1	1	1	7	1
780	9	1	1	1	1	7	1

#### 2.2.4. Auswertung der Patientendaten

Über die Einfriernummern der Stammsammlung waren Befundnummern der jeweiligen VRE-Nachweise verfügbar. Aus der Befunddatenbank wurden alle zugehörigen kulturellen und PCR-basierten VRE-Originalbefunde ausgedruckt und ausgewertet. Folgende Informationen konnten aus diesen Befunden entnommen werden:

- Name des Patienten
- Geschlecht
- Geburtsdatum
- Befunddatum
- Herkunft der Probe (Krankenhaus, Fachabteilung, Station, Stationsart)
- Material der Probe
- Probenart (Screening-Probe/klinische Probe)
- Enterokokkenspezies
- Antibiotikaresistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid mit MHK
- *vanA*- oder *vanB*-Genotyp

Um für die weitere Bearbeitung den Datenschutz zu gewährleisten, wurden die Namen der Patienten mit folgendem System anonymisiert:

Tabelle 14: Schema der Anonymisierung der Patientennamen

X1Y2	
<b>X</b>	dritter Buchstabe des Vornamens
<b>1</b>	Anzahl der Buchstaben des Vornamens (bei mehr als 9 wurde 0 verwendet)
<b>Y</b>	dritter Buchstabe des Nachnamens
<b>2</b>	Anzahl der Buchstaben des Nachnamens (bei mehr als 9 wurde 0 verwendet)

Umlaute wurden als zwei Buchstaben gewertet. Bei Doppelnamen wurde lediglich der erste Teil des Namens berücksichtigt, während Namenszusätze (z.B. von, Titel) keine Berücksichtigung fanden.

Die Ethikkommission an der Universität Regensburg erhebt keine Einwände gegen die Durchführung des Forschungsvorhaben „Molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken am Universitätsklinikum Regensburg – eine retrospektive

Auswertung“, zu dem auch diese Arbeit zählt. Dieses Votum wurde am 17.02.2016 unter dem Zeichen 16-104-0057 aufgenommen.

Zusätzlich zu den Informationen der Originalbefunde wurden die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit in eine gemeinsame Excel-Tabelle aufgenommen. Die Labordaten dieser Arbeit gliedern sich als:

- Interne Stammnummer
- Enterokokkenspezies
- Antibiotikaresistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid mit MHK
- *vanA*- oder *vanB*-Genotyp
- *hyl*-Gen
- Anzahl der *espA*-Repeats
- MLST-Sequenztyp (ST)

Außerdem wurde ein Vergleich der Daten der Originalbefunde mit den Daten dieser Arbeit für die Merkmale Enterokokkenspezies, Antibiotikaresistenzen und *vanA*-/*vanB*-Genotyp durchgeführt.

### 3. Resultate

#### 3.1. Verteilung der Proben

Für das Jahr 2008 wurden insgesamt 114 VRE-Proben von 74 Patienten in der Stammsammlung asserviert. Davon wurden 97 VRE-Proben von 64 Patienten als VRE *E. faecium* identifiziert. Konnte einem Patienten mehr als ein VRE *E. faecium* Nachweis zugeordnet werden, so wurden diese Nachweise als Mehrfachisolate gewertet. Insgesamt wurden 50 VRE *E. faecium* Proben von 18 Patienten als Mehrfachisolate aufgenommen, während die restlichen 47 VRE *E. faecium* Proben von 46 Patienten als Einzelnachweise dokumentiert wurden.

Von den 114 VRE-Proben konnten dem UKR 101 VRE-Proben von 64 Patienten zugeordnet werden. Unter diesen befanden sich 86 VRE *E. faecium* Proben von 56 Patienten. Davon wurden 46 VRE *E. faecium* Proben von 17 Patienten als Mehrfachisolate und 40 VRE *E. faecium* Proben von 40 Patienten als Einzelnachweise dokumentiert.

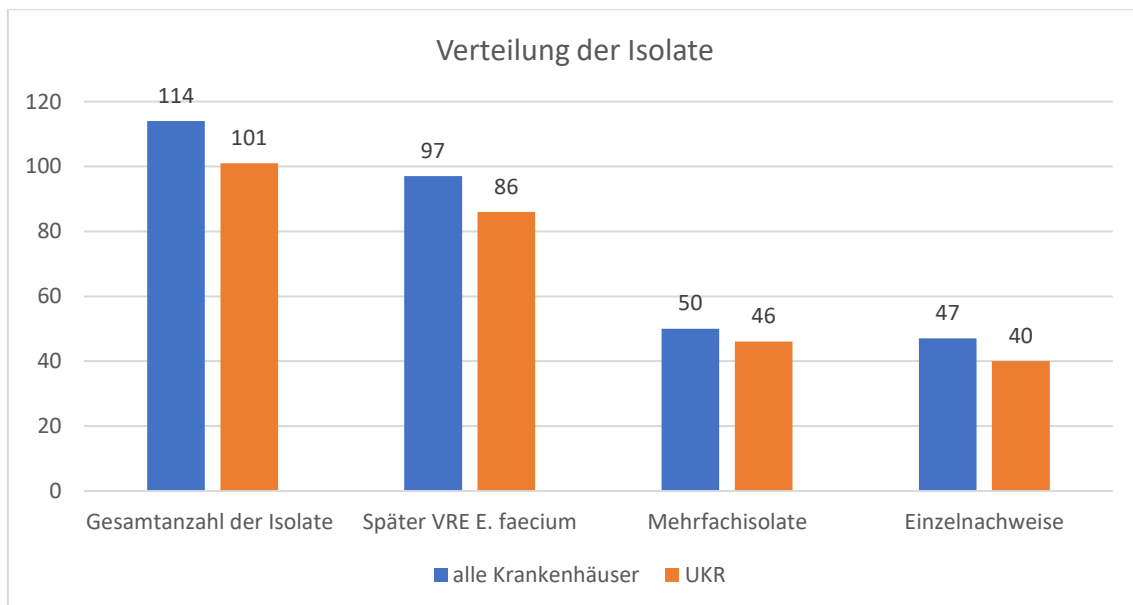


Abbildung 7: Darstellung (jeweils für alle Krankenhäuser und das UKR) der Anzahl aller untersuchten Isolate, der Isolate mit positivem Nachweis für VRE *E. faecium*, der Mehrfachisolate (pro Patient mehrere Isolate vorhanden) und der Einzelnachweise (pro Patient ein Isolat vorhanden)

Nach der Bebrütung auf einer Columbia-Blutplatte konnte bei zwei Stammsammlungsisolaten keine eindeutige Kolonie abgegrenzt werden, weshalb jeweils zwei Kolonien getrennt weiter untersucht wurden. Bei der weiteren Analyse des zweiten Stammsammlungsisolats konnten die zwei Kolonien als VRE *E. faecium* und *E. faecalis*, welcher nicht weiter analysiert wurde, identifiziert werden. Die zwei Kolonien des ersten Stammsammlungsisolats wurden als VRE *E. faecium* bestimmt. Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, werden die beiden VRE *E. faecium* Isolate nur bei den Punkten MLST-Sequenzierung und Analyse des *hyl*-Gens und der *espA*-Repeats als zwei getrennte Isolate behandelt.

Die Ergebnisse werden sowohl inklusive als auch exklusive der Mehrfachisolate betrachtet. Hierbei ergibt sich eine weitere Herangehensweise zur Darstellung der Ergebnisse. Dies soll durch ein Beispiel verdeutlicht werden: Es liegen von einem Patienten zwei VRE *E. faecium* Isolate vor, die aus dem UKR aus den Fachabteilungen Innere Medizin I und Chirurgie stammen. Werden nun alle Isolate des UKR betrachtet, so wird von diesem Patienten bei der Betrachtung exklusive der Mehrfachisolate nur ein Isolat herangezogen. Betrachtet man hingegen die Fachabteilungen des UKR, so wird von diesem Patienten ein Isolat der Inneren Medizin I und ein Isolat der Chirurgie der Auswertung hinzugezogen. Werden hingegen die Ergebnisse inklusive der Mehrfachisolate betrachtet, so wird jedes einzelne Isolat von jedem Patienten bei jeder Betrachtungsweise gewertet.

Bei den Punkten MLST-Typisierung und den Genen *vanA/B*, *hyl* und *espA* werden die Mehrfachisolate, die von einem Patienten stammen und denselben MLST-Sequenztyp besitzen, genauso gehandhabt wie oben beschrieben. Ergab die MLST-Sequenzierung aber bei den Mehrfachisolaten ein unterschiedliches Ergebnis, z.B. ein Patient mit zwei Isolaten mit je ST17 und ST192, so werden beide Ergebnisse immer bei allen Unterpunkten der molekulargenetischen Untersuchung miteinbezogen.

### 3.2. Geschlecht der Patienten

Um eine Abhängigkeit bezüglich des Geschlechts zu überprüfen, wurde die Anzahl der männlichen und weiblichen VRE *E. faecium* Patienten genauer betrachtet. Abbildung 8 zeigt diese Darstellung für jeweils alle Krankenhäuser und das UKR. Es zeigt sich, dass geringfügig mehr männliche Patienten als weibliche Patienten vertreten sind.

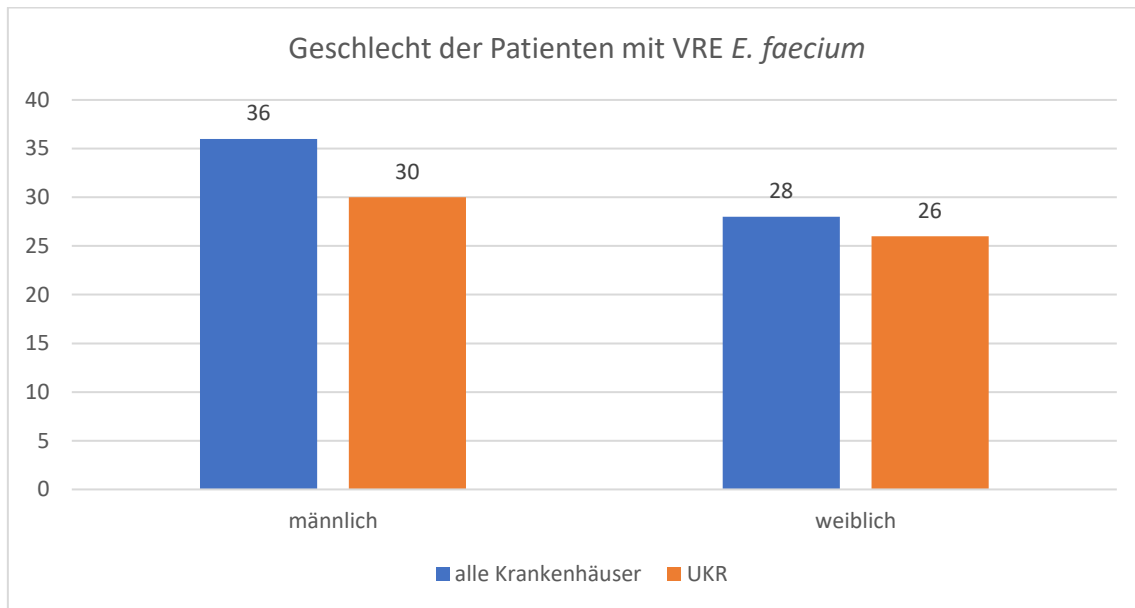


Abbildung 8: Verteilung der Geschlechter der Patienten mit positivem Nachweis für VRE *E. faecium* für alle Krankenhäuser (n = 64) und für das UKR (n = 56)

### 3.3. Altersverteilung

Zur Darstellung der Relevanz des Alters wurden die Patienten mit positivem VRE *E. faecium* Nachweis je einer Altersgruppe, die jeweils ein Jahrzehnt umfasst, zugeteilt. Die genaue Verteilung lässt sich aus Abbildung 9 entnehmen.

Hierbei wird deutlich, dass die Anzahl an VRE *E. faecium* Patienten mit zunehmendem Alter stetig steigt, bis der Höhepunkt bei den 70- bis 79-Jährigen erreicht wird.

Das durchschnittliche Alter aller Patienten beträgt 55 Jahre. Bei den Patienten des UKR beträgt das Durchschnittsalter 56 Jahre. Die männlichen Patienten haben ein durchschnittliches Alter von 60 Jahren, während die weiblichen Patienten im Durchschnitt 52 Jahre alt sind.

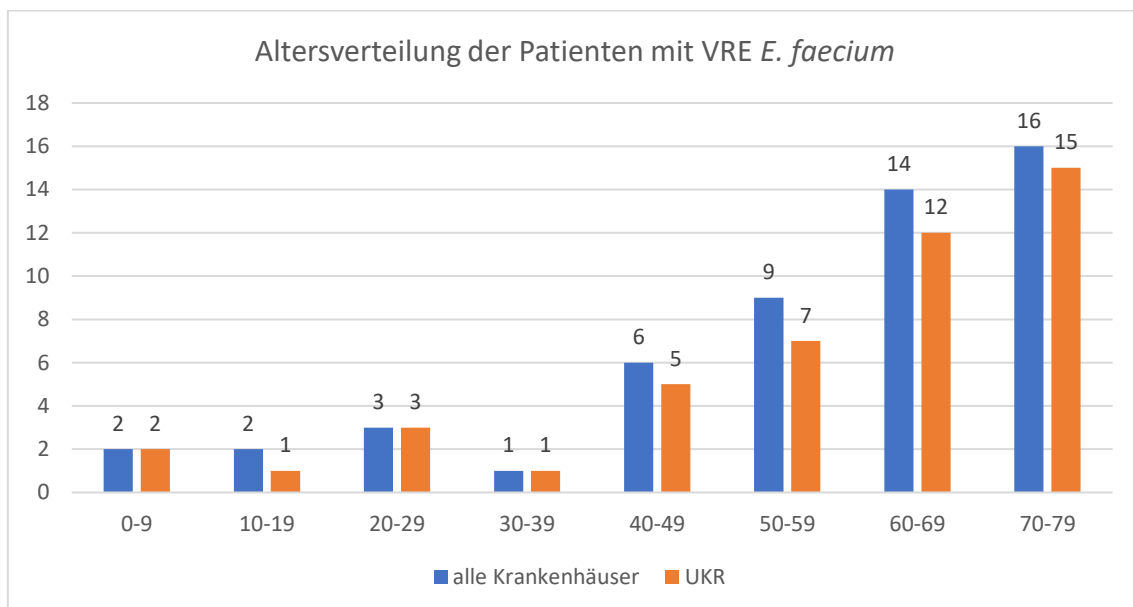


Abbildung 9: Darstellung der Altersverteilung der Patienten mit positivem Nachweis für VRE *E. faecium* für alle Krankenhäuser (n = 64) und für das UKR (n = 56)



### 3.4. Jahresverlauf

Um Auffälligkeiten im Gesamtjahresverlauf festzustellen, wurden die patientenzugeordneten Proben mit einer Delta-Schrittweite von einem Monat analysiert. In den Abbildungen 10 und 11 ist der zeitliche Verlauf des Probeneingangs der VRE *E. faecium* Isolate für alle Krankenhäuser und für das UKR dargestellt. Die Anzahl der VRE *E. faecium* Isolate inklusive der Mehrfachisolate lässt sich anhand der blauen Linie ablesen, die Anzahl der VRE *E. faecium* Isolate exklusive der Mehrfachisolate anhand der orangenen Linie.

Bei der Betrachtung der VRE *E. faecium* Isolate inklusive der Mehrfachisolate aller Krankenhäuser lassen sich drei Spitzen im Jahresverlauf feststellen, nämlich März, Juli und September. Als Tiefpunkte stellen sich die Monate April, Oktober, November und Dezember dar. Führt man diese Analyse nun exklusive der Mehrfachisolate durch, so sind die Spitzen deutlich weniger ausgeprägt. Auffälliger hierbei sind die Tiefpunkte, die sich ebenso im April, Oktober, November und Dezember befinden.

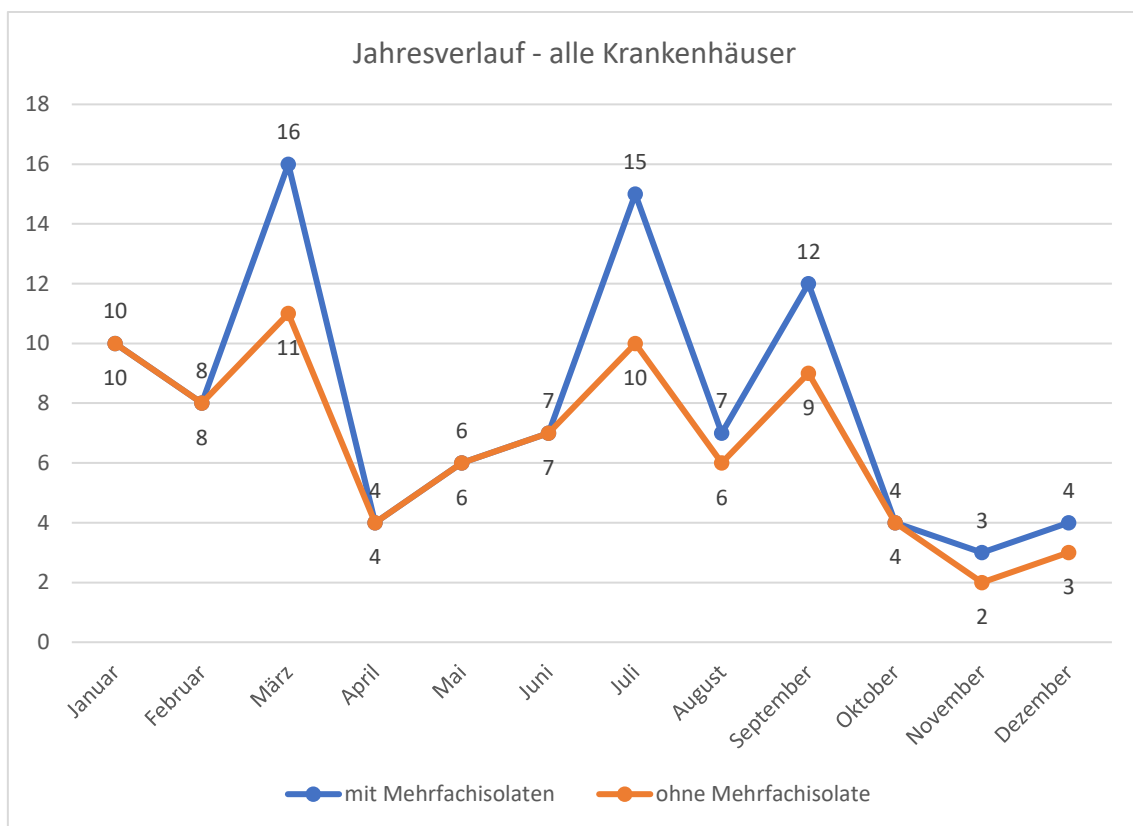


Abbildung 10: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Probeneingangs der Isolate mit positivem Nachweis von VRE *E. faecium* aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 80)

Bei der Analyse der VRE *E. faecium* Isolate inklusive der Mehrfachisolate des UKR zeigen sich zwei Spitzen im Jahresverlauf, nämlich März und Juli. November und Dezember zeigen hierbei die geringste Anzahl an VRE *E. faecium* Isolaten. Bei der Betrachtung dieser Daten exklusive der Mehrfachisolate zeigt sich eine weniger ausgeprägte Spitze im Jahresverlauf im Monat März. November und Dezember stellen ebenfalls die beiden Tiefpunkte dar.

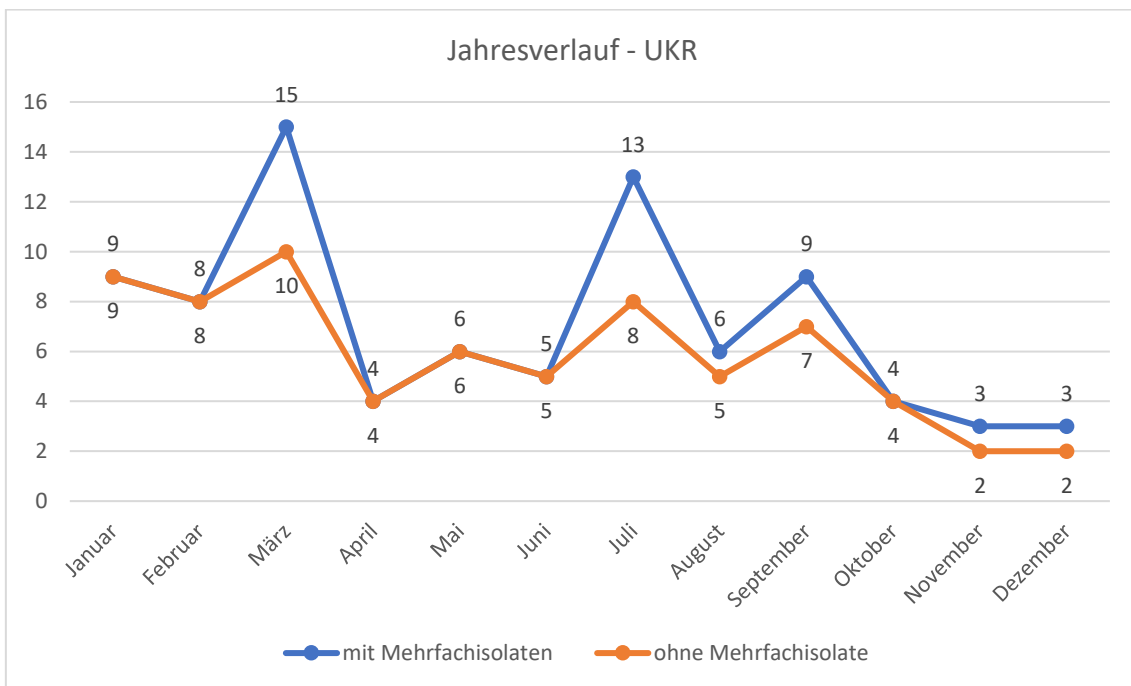


Abbildung 11: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Probeneingangs der Isolate mit positivem Nachweis von VRE *E. faecium* des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 70)

### 3.5. Krankenhäuser

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den VRE *E. faecium* Isolaten des UKR, welche mit 89% (inklusive Mehrfachisolate) bzw. 85% (exklusive Mehrfachisolate) den weitaus größten Anteil der untersuchten VRE *E. faecium* Isolate darstellen. Die elf (inklusive Mehrfachisolate) bzw. zehn (exklusive Mehrfachisolate) VRE *E. faecium* Isolate, die nicht aus dem UKR stammen, sind auf das Bezirksklinikum Regensburg (BZK Regensburg), das Krankenhaus St. Josef in Regensburg, das Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg und das Klinikum Bad Abbach verteilt (siehe Abbildung 12).

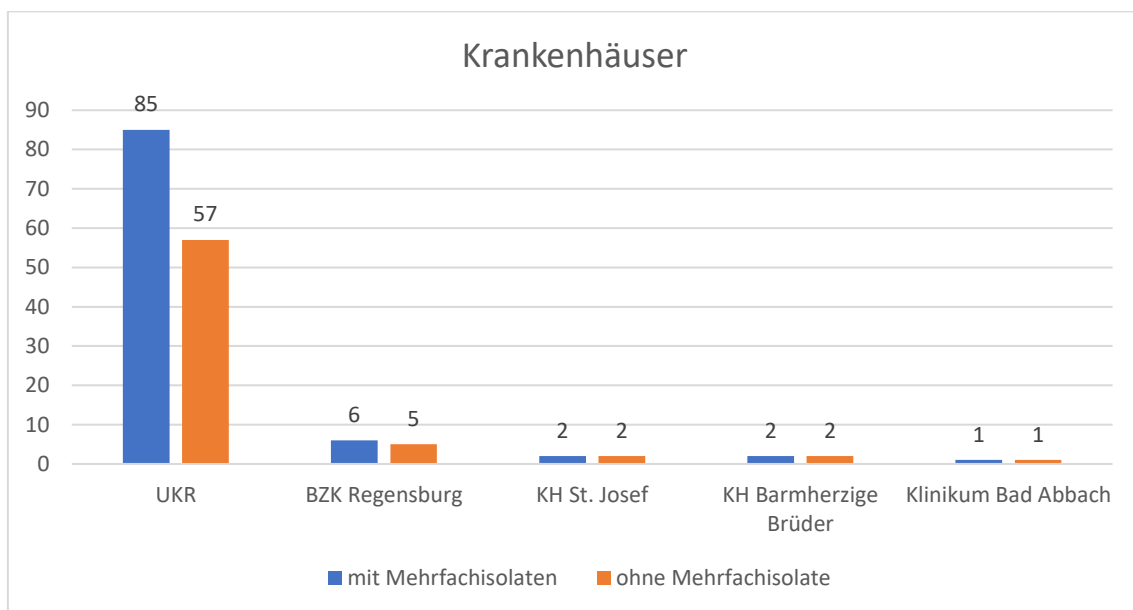


Abbildung 12: Darstellung der Anzahl der Einsendungen von VRE *E. faecium* Isolaten aus den verschiedenen Krankenhäusern inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67)

### 3.6. Verteilung der Isolate im UKR

Im folgenden Abschnitt wird die Verteilung der 85 VRE *E. faecium* Isolate des UKR genauer erläutert. Um Auffälligkeiten bei der Betrachtung der Herkunft der Isolate innerhalb des UKR festzustellen, wird bei dieser Analyse eine Unterscheidung bezüglich Fachabteilung und Station vorgenommen. Es findet jeweils eine Betrachtung inklusive und exklusive der Mehrfachisolate statt, wobei jeder Unterpunkt (z.B. Innere Medizin I als Fachabteilung) betrachtet wird und die Mehrfachnachweise des Unterpunkts herausgerechnet werden. Befand sich z.B. ein Patient erst in der Inneren Medizin I und

anschließend in der Chirurgie und es wurde beide Male ein VRE *E. faecium* Nachweis mit demselben MLST-Sequenztyp erbracht, so werden beide Nachweise jeweils in dem Unterpunkt „Innere Medizin I“ und „Chirurgie“ miteinbezogen. Mehrfachnachweise von einem Patienten mit unterschiedlichen MLST-Sequenztypen werden immer unabhängig von der Anzahl der Mehrfachisolate miteinbezogen.

### 3.6.1. Fachabteilungen

Die vier Hauptbereiche, aus denen Einsendungen von VRE *E. faecium* Isolaten erfolgten, sind die Fachabteilungen Innere Medizin I (Med I), Innere Medizin II (Med II), Innere Medizin III (Med III) und Chirurgie. Zur Med I gehören die klinischen Disziplinen Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Rheumatologie. Kardiologie, Pneumologie und internistische Intensivmedizin sind der Med II zugehörig. Innere Medizin III (Med III) beinhaltet die Hämatologie und Internistische Onkologie.

In Abbildung 13 lässt sich die Anzahl der VRE *E. faecium* Isolate der einzelnen Fachabteilungen erkennen. Hierbei wird deutlich, dass die meisten Isolate aus der Med I stammen.

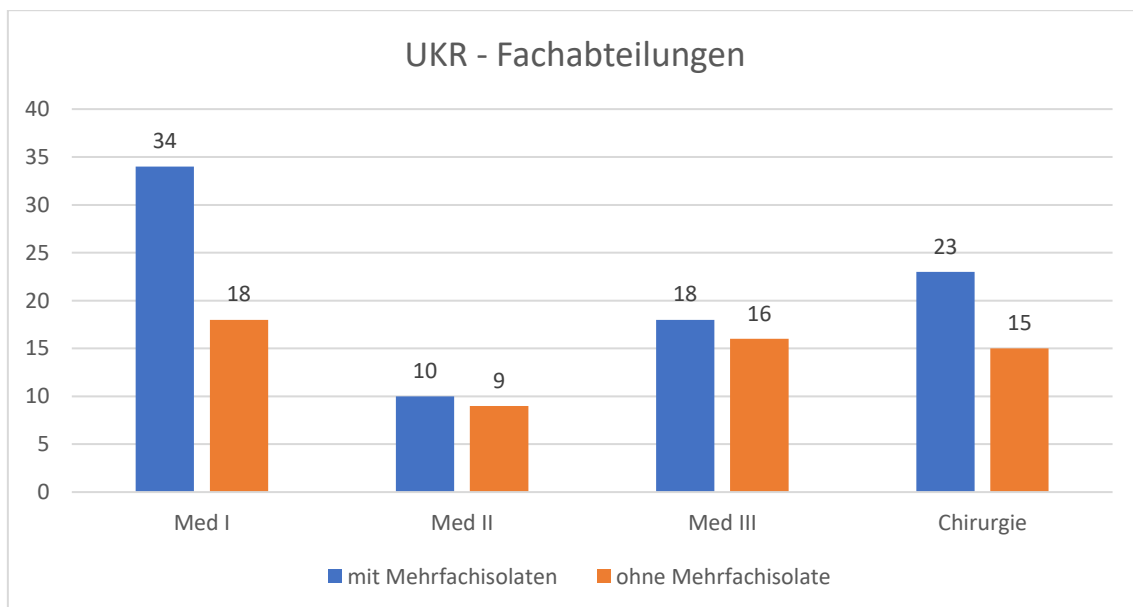


Abbildung 13: Darstellung der Anzahl der Einsendungen an VRE *E. faecium* Isolaten aus den verschiedenen Fachabteilungen des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58) (Med I-III: Innere Medizin I-III)

### 3.6.2. Stationen

Die Stationen 10, 14 und 15 gehören zur Inneren Medizin I und beinhalten die Disziplinen Gastroenterologie, Endokrinologie, Infektiologie und Rheumatologie. Die Innere Medizin II beinhaltet Dialyse (Station 16), Nephrologie (Station 17) und Kardiologie (Station 18 und 19). Die Stationen 20 und 21 sind Teil der Hämatologie und Onkologie und somit Teil der Inneren Medizin III. Die Chirurgie und Gefäßchirurgie sind auf den Stationen 56 und 57 vertreten. Station 58 gehört zur Neurochirurgie.

Die Stationen 90, 91, 92 und 93 sind Intensivstationen. Station 90 ist die operative Intensivstation. Die Neurochirurgie befindet sich auf Station 91. Die Einheiten 92 und 93 gehören zur Inneren Medizin I, II und III.

Die Verteilung der VRE *E. faecium* Isolate auf den einzelnen Stationen lässt sich aus Abbildung 14 entnehmen.

Auffallend ist, dass bei der Betrachtung inklusive der Mehrfachisolate die meisten VRE *E. faecium* Isolate aus Station 10 stammen, während bei der Betrachtung exklusive der Mehrfachisolate die meisten Isolate aus Station 21 stammen.

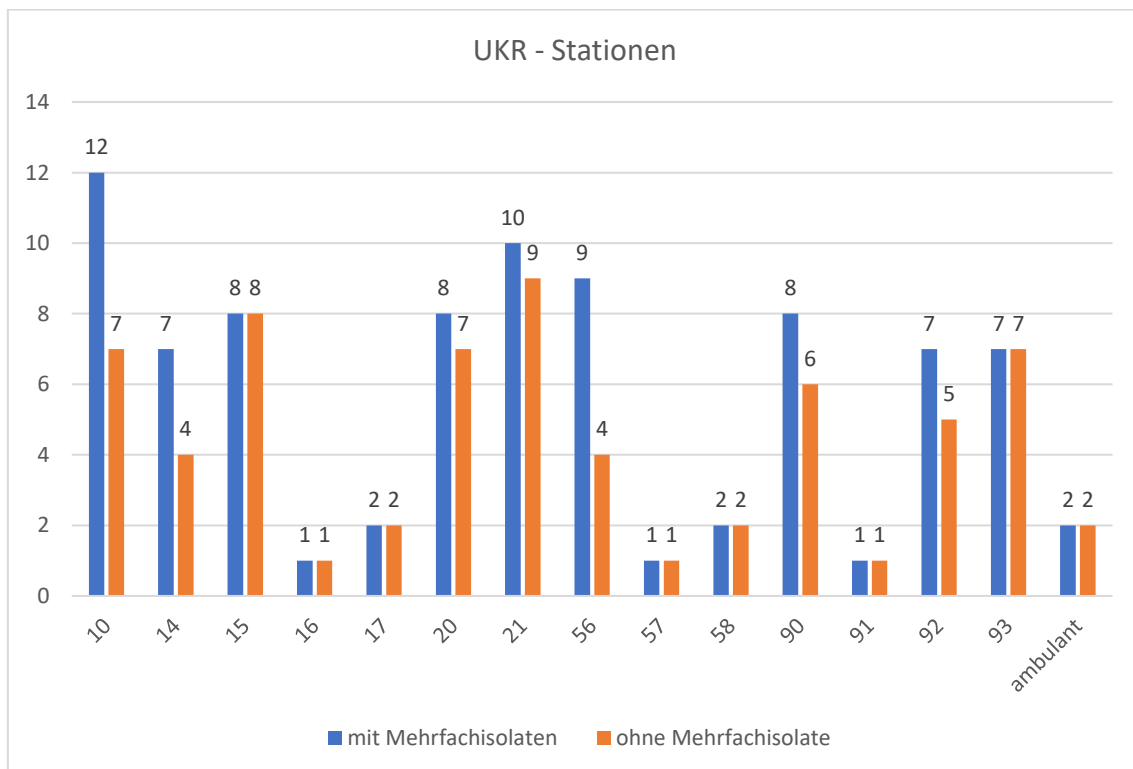


Abbildung 14: Darstellung der Verteilung der Einsendungen an VRE *E. faecium* Isolaten aus den Stationen des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66)

### 3.7. Stationsart

Zur Darstellung der Häufung der Isolate in einer der beiden Stationsarten Intensiv- oder Normalstation, wurde eine Analyse zur Verteilung in den Stationsarten durchgeführt.

Abbildung 15 zeigt die Verteilung der VRE *E. faecium* Isolate in den beiden Stationsarten „Normalstation“ und „Intensivstation“ aller Krankenhäuser. Die Verteilung im UKR wird in Abbildung 16 dargestellt.

In beiden Abbildungen wird deutlich, dass die meisten VRE *E. faecium* Isolate aus den Normalstationen stammen.

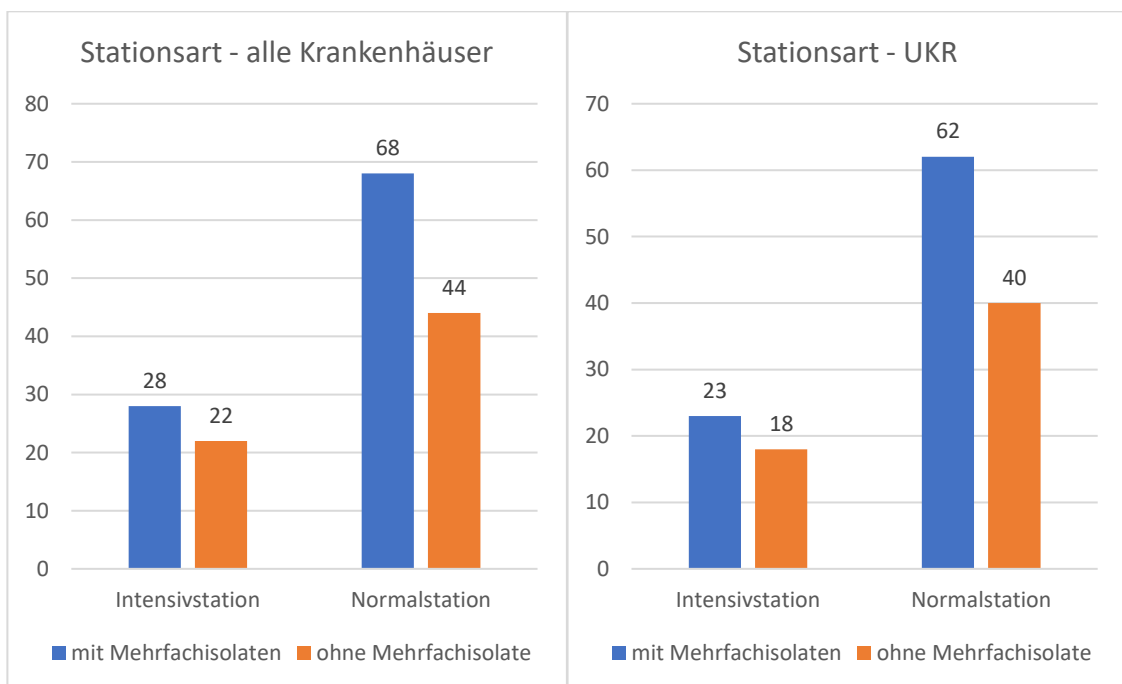


Abbildung 15: Darstellung der Anzahl der Einsendungen an VRE *E. faecium* Isolat der Stationsarten „Intensiv“ und „Normal“ aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66)

Abbildung 16: Darstellung der Anzahl der Einsendungen an VRE *E. faecium* Isolat der Stationsarten „Intensiv“ und „Normal“ des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58)

### 3.8. Anteil der Screening-Proben und klinischen Proben

Um Unterschiede der Probenart aufzuzeigen, werden die Proben in Screening-Proben und klinische Proben aufgeteilt. Während Screening-Proben in der Erstuntersuchung 2008 ausschließlich mittels Bouillon und PCR analysiert wurden, wurden klinische Proben mittels Phoenix getestet.

Ebenfalls anzumerken ist, dass die Screening-Proben ausschließlich aus Rektal-/Perianalabstrichen, Stuhlproben und Wundabstrichen stammen, während die Materialherkunft der klinischen Proben breiter gefächert ist.

Die Verteilung der VRE *E. faecium* Isolate für alle Krankenhäuser wird in Abbildung 17 dargestellt und die Verteilung der VRE *E. faecium* Isolate für das UKR in Abbildung 18.

In beiden Fällen ist zu erkennen, dass der Anteil der Screening-Proben überwiegt. Während dies bei der Betrachtung inklusive der Mehrfachisolate deutlich ist, ist die Differenz bei der Betrachtung exklusive der Mehrfachisolate marginal.

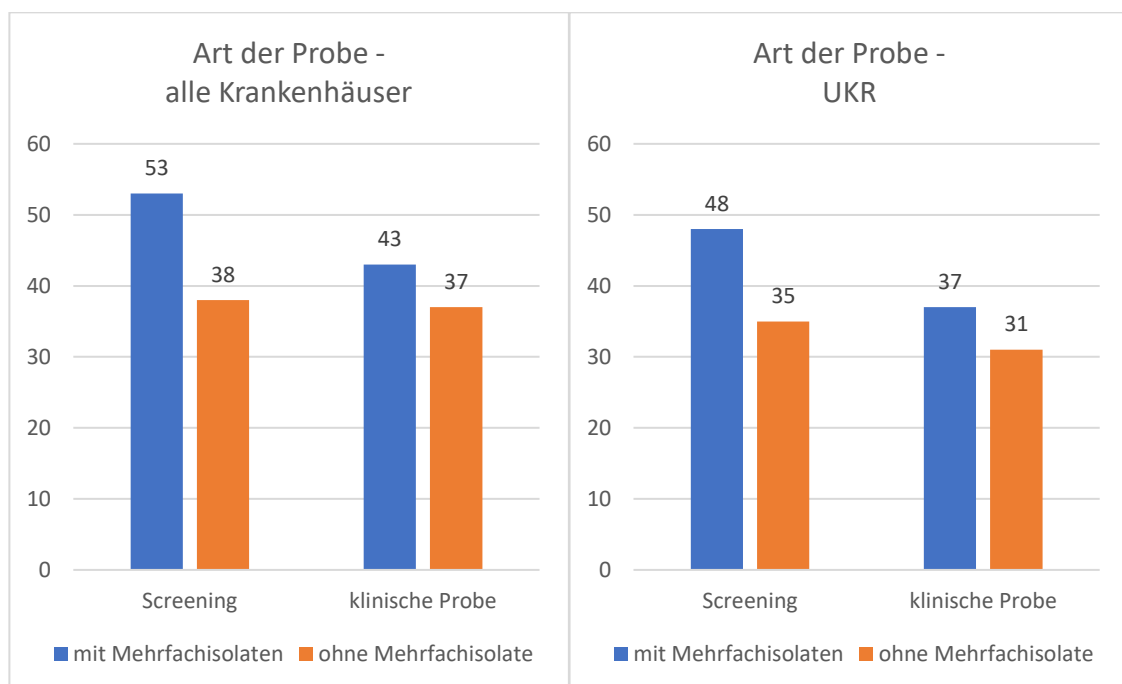


Abbildung 17: Darstellung der Verteilung der Anzahl der Probenarten „Screening“ und „klinische Probe“ mit positivem VRE *E. faecium* Nachweis aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 75)

Abbildung 18: Darstellung der Verteilung der Anzahl der Probenarten „Screening“ und „klinische Probe“ mit positivem VRE *E. faecium* Nachweis des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66)

### 3.9. Klinisches Material

Die klinischen Materialien, aus denen die einzelnen VRE *E. faecium* Isolate isoliert worden sind, setzen sich aus folgenden Materialgruppen zusammen: Rektal-/Perianalabstrich, Wundabstrich, Punktat, Stuhl, Abstrich, BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich, Blutkultur, Katheterspitze und Drainage/Sekret.

Abbildung 19 zeigt die Anzahl der verschiedenen klinischen Materialien der VRE *E. faecium* Isolate aller Krankenhäuser, während Abbildung 20 die Verteilung im UKR darstellt. In beiden Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass die meisten VRE *E. faecium* Isolate aus Rektal-/Perianalabstrichen stammen. Alle Rektal-/Perianalabstriche und Stuhlproben wurden als Screening-Proben eingesendet.

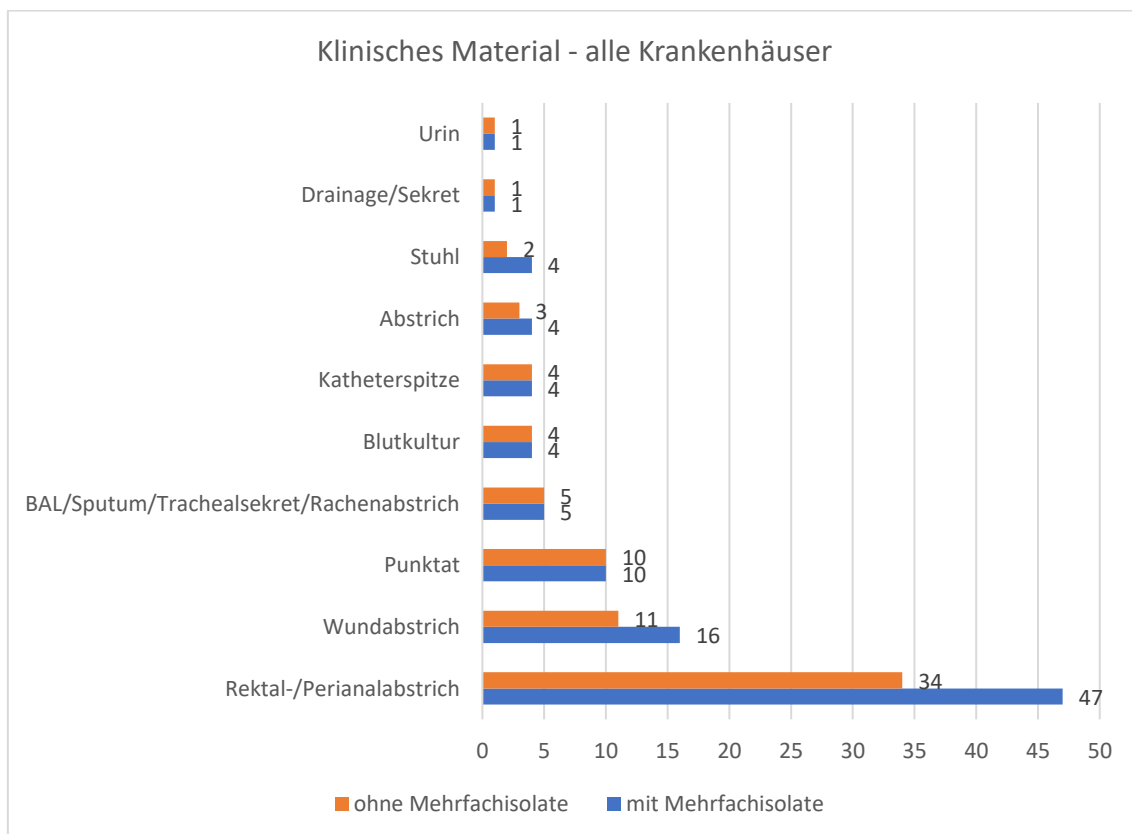


Abbildung 19: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Materialien der VRE *E. faecium* Isolate aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 71)



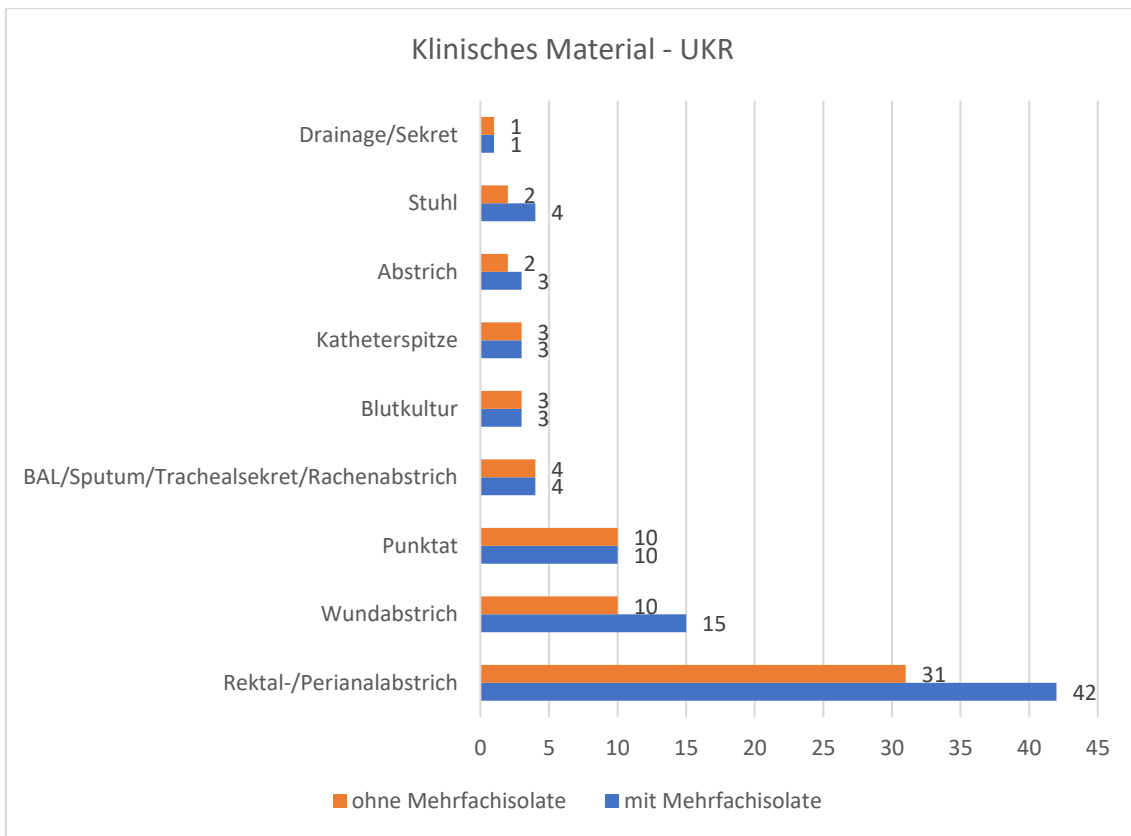


Abbildung 20: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Materialien der VRE *E. faecium* Isolate des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66)

### 3.10. Molekulare Charakterisierung der VRE *E. faecium* Isolate

Im folgenden Abschnitt wird die molekulare Analyse der Enterokokken genauer betrachtet. Diese gliedert sich in die Bestimmung der Enterokokkenspezies, des *vanA*- bzw. *vanB*-Resistenzgenotyps und der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid.

Bei der Auswertung der Daten zur Enterokokkenspezies werden alle 114 Isolate miteinbezogen, während bei der Auswertung des Resistenztyps (*vanA/B*) und der Antibiotikaresistenzen nur die 96 VRE *E. faecium* Isolate miteinbezogen werden.

### 3.10.1. Enterokokkenspezies

Das Ergebnis der Untersuchung der Enterokokkenspezies, die durch die Diagnostik im Jahr 2008 mittels PCR für Screening-Proben oder mittels Phoenix für klinische Proben durchgeführt wurde, wird in Abbildung 21 für alle Krankenhäuser und in Abbildung 22 für das UKR jeweils inklusive und exklusive der Mehrfachisolate dargestellt. Insgesamt wurden 114 Isolate analysiert, wobei vorrangig *E. faecium* gefolgt von *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. faecalis* sowie *E. casseliflavus* nachgewiesen wurden.

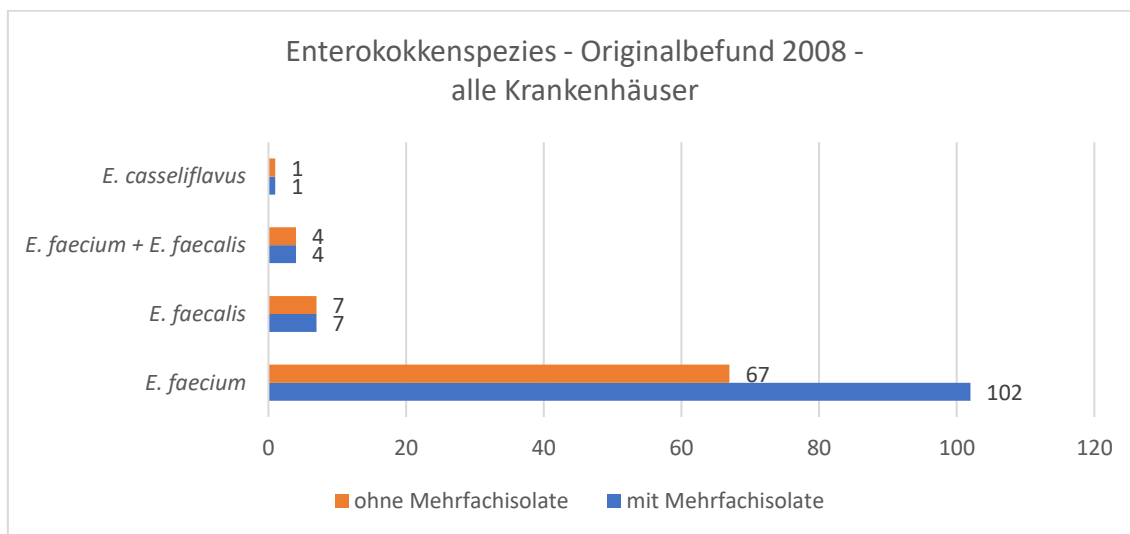


Abbildung 21: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Originalbefunden des Jahres 2008 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 114) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 79)

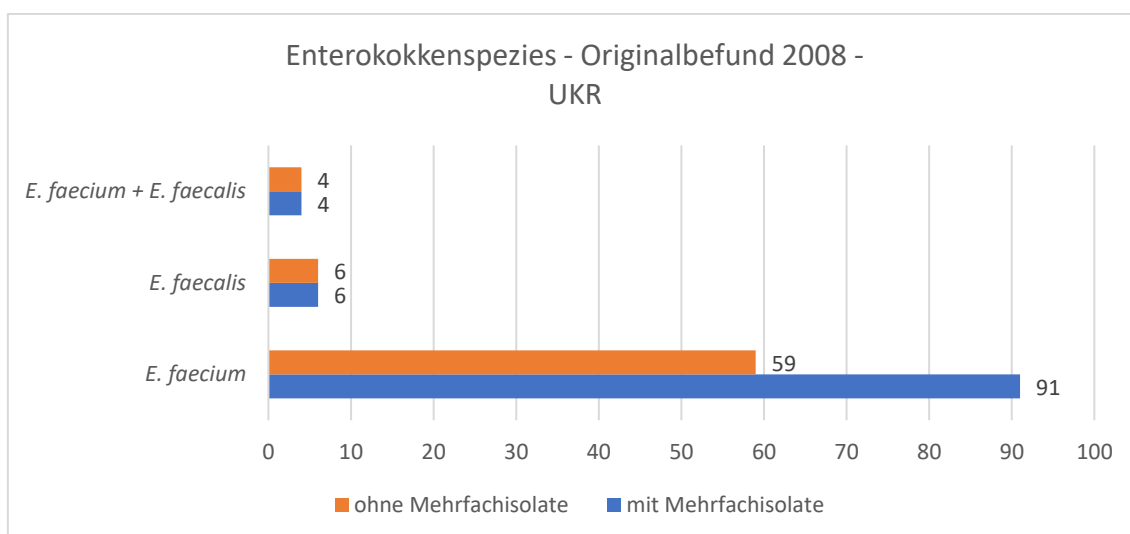


Abbildung 22: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Originalbefunden des Jahres 2008 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 101) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 69)

Das Ergebnis der erneuten Untersuchung auf die Enterokokkenspezies, die im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2016 mittels MALDI-TOF durchgeführt wurde, wird in Abbildung 23 für alle Krankenhäuser und in Abbildung 24 für das UKR jeweils inklusive und exklusive der Mehrfachisolate dargestellt. Insgesamt wurden 114 Isolate analysiert, wobei vorrangig *E. faecium* gefolgt von *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* und *Lactobacillus spp.* nachgewiesen wurden.

Im Vergleich mit den Daten der Originalbefunde des Jahres 2008 fällt auf, dass *E. gallinarum* und *Lactobacillus spp.* lediglich bei den Untersuchungen 2016 nachgewiesen wurden.

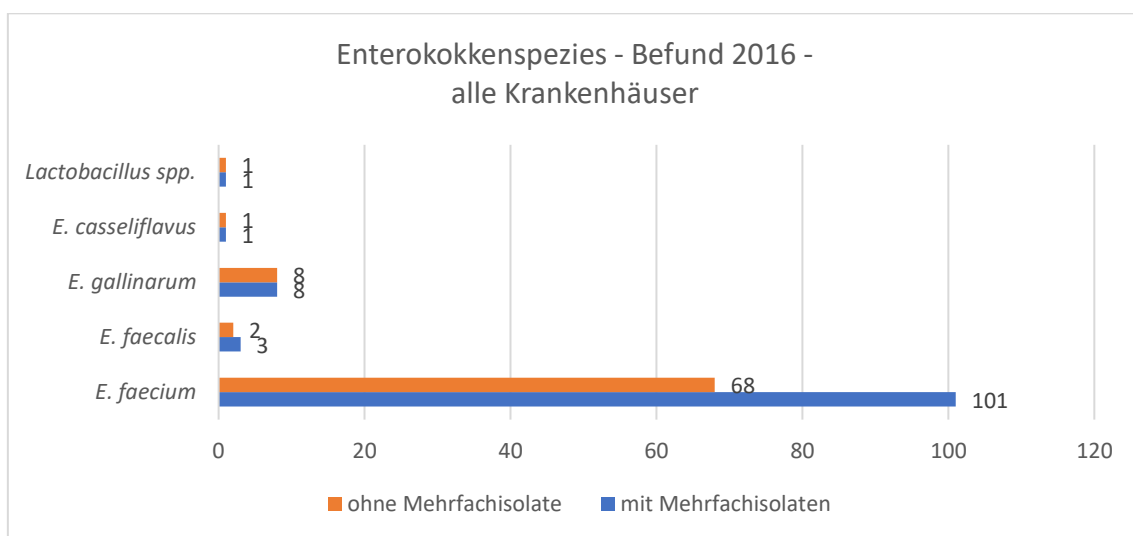


Abbildung 23: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Befunden dieser Arbeit im Jahr 2016 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 114) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 80)

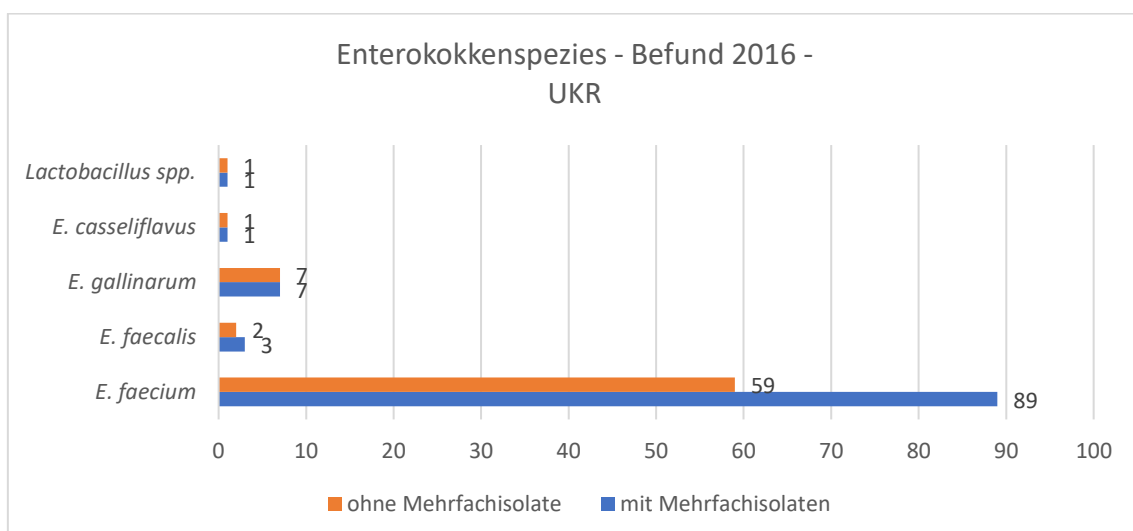


Abbildung 24: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Befunden dieser Arbeit im Jahr 2016 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 101) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 70)

### 3.10.2. Nachweis der Resistenzgene *vanA* und *vanB*

Die Gene *vanA* und *vanB* codieren Ligasen, die ausschlaggebend für die Namensgebung der jeweiligen Phänotypen der Glykopeptidresistenzen sind. Insgesamt gibt es sechs verschiedene Phänotypen. Es werden hier ausschließlich *vanA* und *vanB* betrachtet.

Die Untersuchung auf das Vorhandensein der Resistenzgene *vanA* und *vanB* wurde mittels PCR durchgeführt. Nach erfolgreicher Durchführung wurden die PCR-Produkte auf ein Gel aufgetragen, das anschließend an eine elektrische Spannung angeschlossen wurde. Die Untersuchung der Gele und der darauf sichtbaren Lauflängen der DNA-Fragmente wurde mittels Fotoanalyse durchgeführt. Abbildung 25 zeigt ein Beispielfoto der PCR-Produkte für die Untersuchung auf das Vorhandensein der Resistenzgene *vanA* und *vanB*.

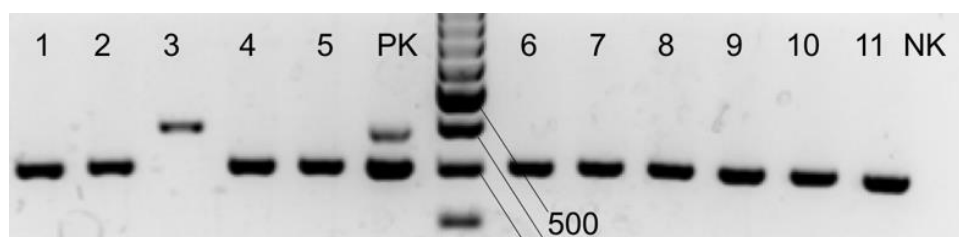


Abbildung 25: Beispielfoto der PCR-Produkte der PCR zum Nachweis der Resistenzgene *vanA* und *vanB* (1-2; 3-11: *vanB*; 3: *vanA*; PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle) mit Standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (bp) zwischen PK und 6

In diesem Abschnitt werden ausschließlich die VRE *E. faecium* Isolate betrachtet, die im Rahmen dieser Arbeit als solche identifiziert wurden. Folglich werden 96 Isolate aller Krankenhäuser, darunter 67 Isolate des UKR, betrachtet. Dargestellt werden die Ergebnisse der Untersuchung auf das Vorhandensein der Resistenzgene *vanA* und *vanB*. In den Abbildungen 26 und 27 sind die Ergebnisse der Originalbefunde aus dem Jahr 2008 für alle Krankenhäuser und das UKR dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die meisten Isolate dem *vanB*-Resistenztyp zugeordnet werden konnten, während bei lediglich einem Isolat der *vanA*-Resistenztyp nachgewiesen wurde. Ein Isolat konnte weder dem *vanA*- noch dem *vanB*-Resistenztyp zugeordnet werden.

Die *vanB*-positiven Enterokokken setzen sich vorrangig aus *E. faecium* und vier (UKR: drei) *E. faecalis* und zwei (UKR: zwei) *E. faecium* + *E. faecalis* zusammen. Eine Analyse bezüglich der Vancomycinresistenz wurde nicht bei allen Isolaten durchgeführt. Alle

*vanB*-positiven Isolate, bei denen eine Resistenztestung auf Vancomycin stattfand, wurden als Vancomycin-resistent bewertet.

Das *vanA*-positive Isolat wurde als *E. faecium* mit Vancomycinresistenz identifiziert. Bei der Analyse des Isolats ohne *vanA*- oder *vanB*-Gen wurde festgestellt, dass es sich hierbei um einen Vancomycin-sensiblen *E. faecalis* handelt.

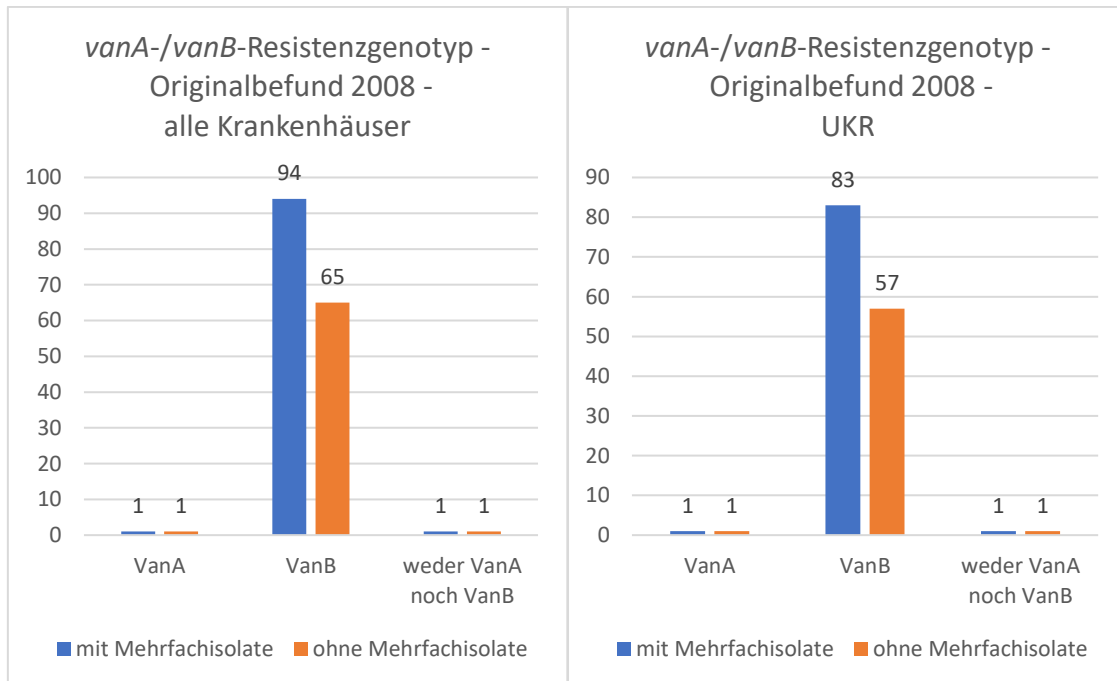


Abbildung 26: Darstellung der Verteilung der *vanA*-/*vanB*-Resistenzgenotypen der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Originalbefunden von 2008 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67)

Abbildung 27: Darstellung der Verteilung der *vanA*-/*vanB*-Resistenzgenotypen der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Originalbefunden von 2008 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 59)

In den Abbildungen 28 und 29 sind die Ergebnisse dieser Arbeit zur aus dem Jahr 2016 für alle Krankenhäuser und das UKR dargestellt. Durchgeführt wurde eine Analyse der Gene *vanA* und *vanB* der VRE *E. faecium* Isolate. Bei der Untersuchung wurde bei einem Isolat das *vanA*-Gen nachgewiesen, während alle anderen Isolaten zum VanB-Resistenztyp gehören.

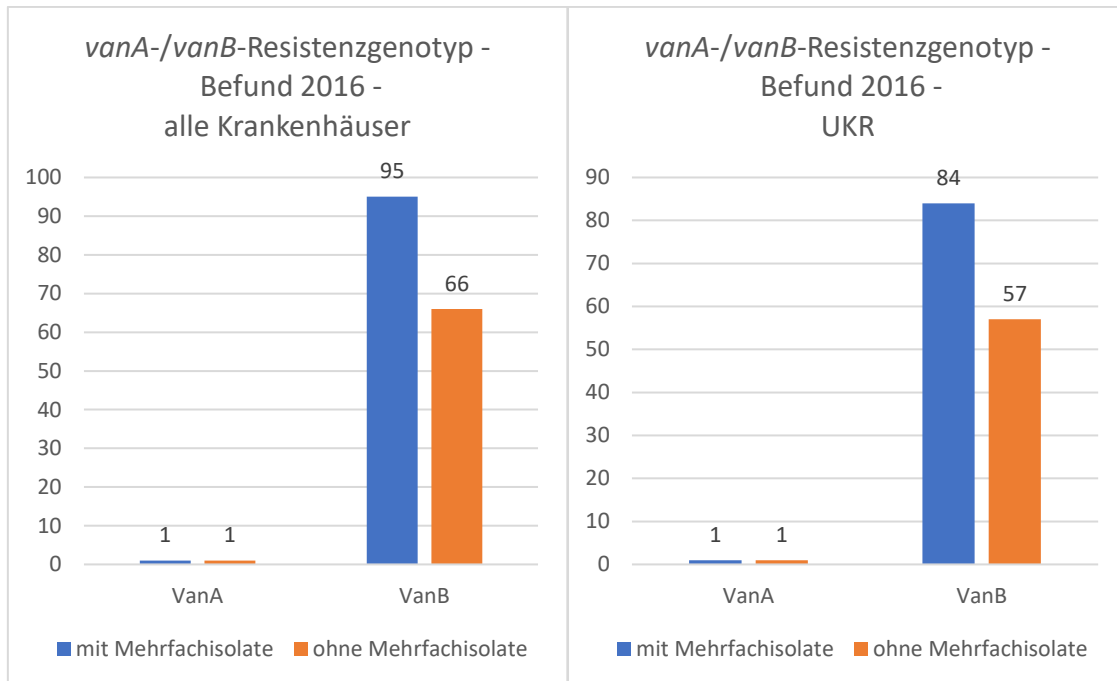


Abbildung 28: Darstellung der Verteilung der *vanA*-/*vanB*-Resistenzgenotypen der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Resultaten dieser Arbeit im Jahr 2016 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67)

Abbildung 29: Darstellung der Verteilung der *vanA*-/*vanB*-Resistenzgenotypen der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Resultaten dieser Arbeit im Jahr 2016 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58)

### 3.10.3. Bestimmung der Antibiotikaresistenzen

In diesem Abschnitt werden die Antibiotikaresistenzen der VRE *E. faecium* Isolate betrachtet. Zusätzlich zur Resistenz gegen Vancomycin wurden die Resistenzen gegen Teicoplanin und Linezolid untersucht.

Im Jahr 2008 wurden die Antibiotikaresistenzen von insgesamt 33 (UKR: 27) VRE *E. faecium* analysiert. Bei der Betrachtung exklusive der Mehrfachisolate ergibt sich eine Anzahl von 32 (UKR: 26) VRE *E. faecium* Isolaten.

Alle analysierten Isolate sind resistent gegen Vancomycin. Bei einem Isolat (VRE *E. faecium* mit *vanA*) wurde zusätzlich eine Teicoplaninresistenz nachgewiesen. Dieses stammt aus dem KH St. Josef. Eine Resistenz gegen Linezolid wurde bei keinem untersuchten Isolat festgestellt.

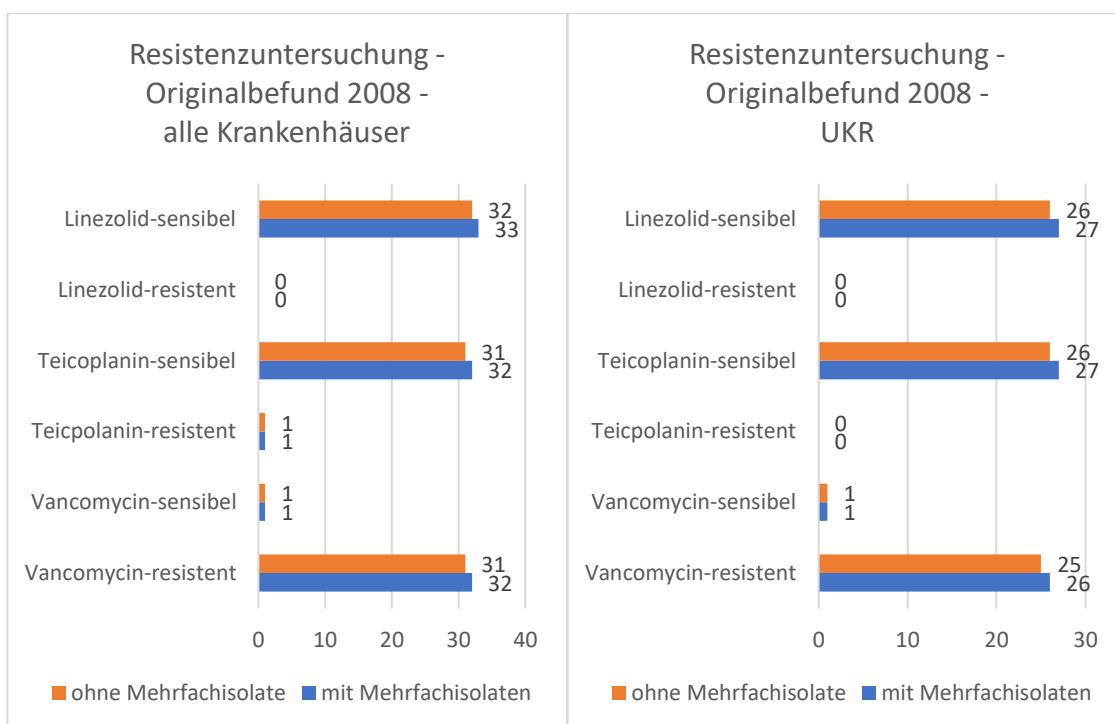


Abbildung 30: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Originalbefunden im Jahr 2008 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 33) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 32)

Abbildung 31: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Originalbefunden im Jahr 2008 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 27) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 26)

Die Resultate der Resistenzuntersuchung, die im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2016 durchgeführt wurden, werden im Folgenden aufgeführt.

Insgesamt wurden 97 VRE *E. faecium* Isolate untersucht, von denen 85 aus dem UKR stammen. Abzüglich der Mehrfachisolate werden 67 VRE *E. faecium* Isolate aller Krankenhäuser und 58 VRE *E. faecium* Isolate des UKRs betrachtet.

Alle hierbei analysierten Isolate weisen eine Vancomycinresistenz auf.

Bei der Betrachtung der Teicoplaninresistenz wird ersichtlich, dass 7 (UKR: 6) VRE *E. faecium* Isolate zusätzlich eine Teicoplaninresistenz aufweisen. Exklusive der Mehrfachisolate reduziert sich die Anzahl auf 5 (UKR: 4). Ein VRE *E. faecium* Isolat aus dem UKR zeigt zusätzlich zur Vancomycinresistenz eine Linezolidresistenz.

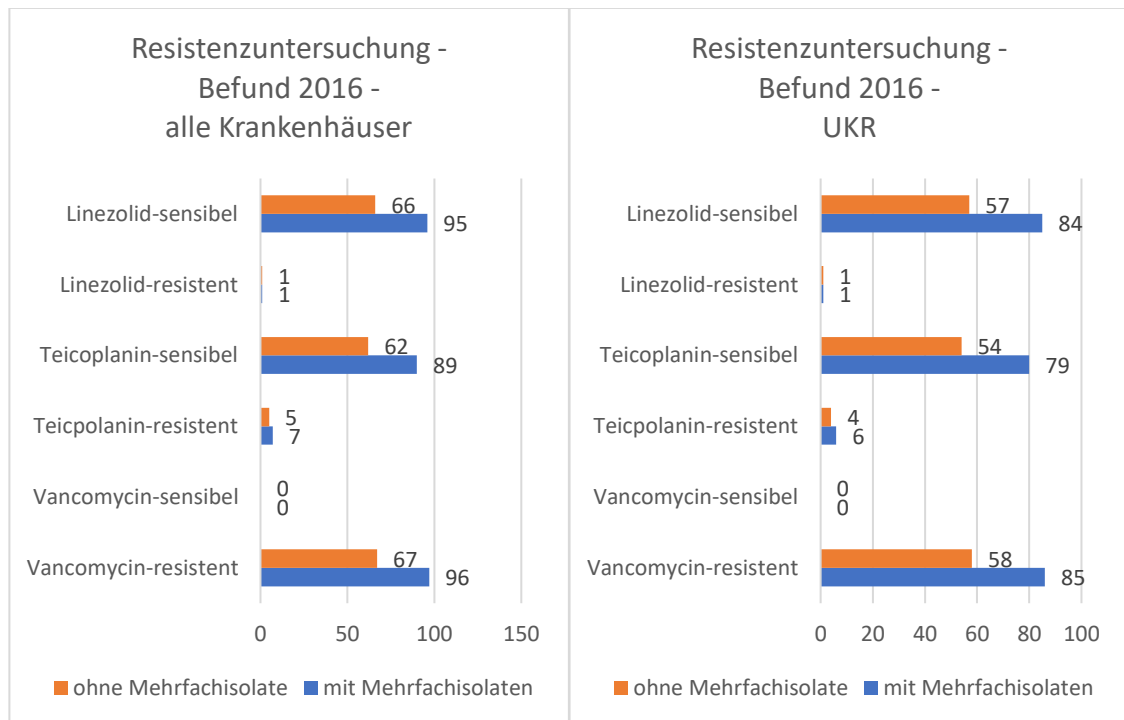


Abbildung 32: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit im Jahr 2016 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67)

Abbildung 33: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE *E. faecium* Isolate basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit im Jahr 2016 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58)



In diesem Abschnitt sollen die VRE *E. faecium* Isolate mit zusätzlicher Teicoplaninresistenz genauer betrachtet werden. Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 15. Von Patient 1 liegen drei Isolate vor, die alle die gleichen Eigenschaften aufweisen: Vancomycin- und Teicoplaninresistenz, *vanB*-Resistenztyp, *hyl*-positiv, vier *espA*-Repeats und MLST-Sequenztyp ST 17. Die Isolate von Patient 2 und 4 unterscheiden sich zu den eben aufgeführten Isolaten lediglich im MLST-Sequenztyp (ST 202 und ST 192). Zusätzlich zum MLST-Sequenztyp (ST 203) zeigt das Isolat von Patient 3 bezüglich des Vorhandenseins des *hyl*-Gens (negativ) Differenzen. Das Isolat von Patient 5 ist das einzige Isolat des *vanA*-Resistenztyps (*hyl*-positiv, vier *espA*-Repeats, ST 192).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass keines der VRE *E. faecium* Isolate mit Teicoplaninresistenz identisch ist (abgesehen der Mehrfachisolate).

Das einzige VRE *E. faecium* Isolat mit zusätzlicher Linezolidresistenz ist *vanB*-positiv und *hyl*-positiv, zeigt vier *espA*-Repeats und gehört ST 186 an. ST 186 wurde ein einziges Mal in dieser Arbeit detektiert.

Tabelle 15: Auflistung der VRE *E. faecium* Isolate, die neben der Vancomycinresistenz (V) eine weitere Resistenz gegenüber Teicoplanin (T) oder Linezolid (L) aufweisen, mit zugehörigen Daten (Befunddatum, Krankenhaus, Enterokokkenspezies, *vanA/B*-Genotyp, *hyl*-positiv/-negativ, *espA*-Repeats und MLST-Sequenztyp) \*von diesem Patienten existieren drei Isolate

		Befund- datum	Kranken- haus	Enterokokken- spezies	Antibiotika- resistenzen	<i>vanA/B</i>	<i>hyl</i>	<i>espA</i> - Repeats	MLST
<b>Teicoplanin- Resistenz</b>	*1	20.05.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
		15.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
		04.09.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	2	04.06.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	202
	3	24.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	negativ	vier	203
	4	25.09.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
	5	23.12.08	KH St. Josef	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanA</i>	positiv	vier	192
<b>Linezolid- Resistenz</b>	6	08.02.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + L	<i>vanB</i>	positiv	vier	186

### 3.11. MLST-Typisierung

Zur Bestimmung des MLST- Sequenztyps sind sieben PCRs notwendig. Hierbei werden die sieben Housekeeping-Gene *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purk*, *gyd*, *pstS* und *adK* hinsichtlich ihrer Allelvarianten untersucht. Aus der Kombination der sieben Allelvarianten ergibt sich der Sequenztyp (ST).

Zur Kontrolle des Erfolgs der durchgeführten PCRs wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese und Fotoanalyse untersucht. Ein Beispielfoto hierfür zeigt Abbildung 34.

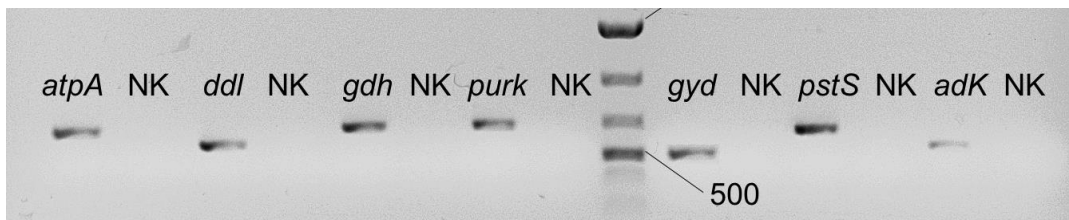


Abbildung 34: Beispielfoto der PCR-Produkte der MLST-Marker *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purk*, *gyd*, *pstS* und *adK* (NK: Negativkontrolle) mit Standard O'GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter (bp) zwischen NK und *gyd*

Die MLST-Typisierung wurde bei allen 98 VRE *E. faecium* Isolaten durchgeführt.

Diese Isolate wurden den Sequenztypen ST 17, ST 78, ST 117, ST 186, ST 192, ST 202, ST 203, ST 378 und ST 780 zugeordnet. Die genaue Verteilung inklusive und exklusive der Mehrfachisolate lässt sich aus Abbildung 35 entnehmen.

Auffallend ist, dass ST 192 und ST 17 mit mehr als 80% (inklusive Mehrfachisolate) bzw. 70% (exklusive Mehrfachisolate) stark dominieren.

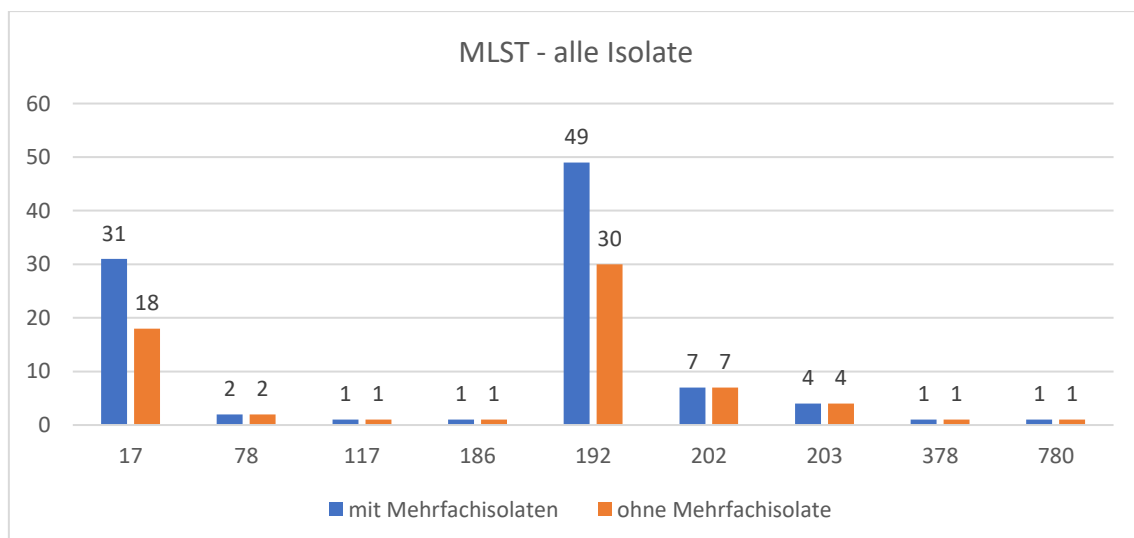


Abbildung 35: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen aller VRE *E. faecium* Isolate inklusive der Mehrfachisolate (n = 97) und exklusiv der Mehrfachisolate (n = 65)

### 3.11.1. MLST-Typisierung in den Nicht-UKR-Krankenhäusern

Elf VRE *E. faecium* Isolate stammen nicht aus dem UKR. In Tabelle 16 sind die Sequenztypen dieser Isolate aufgeführt, wobei deutlich wird, dass über 60% zum ST 192 gehören. ST 378 wurde von insgesamt allen Isolaten lediglich bei einem Isolat festgestellt und dieses Isolat stammt aus dem KH St. Josef.

Tabelle 16: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen aller VRE *E. faecium* Isolate der Nicht-UKR-Krankenhäuser (\*diese beiden Isolate stammen von einem Patienten)

Krankenhaus	MLST-Sequenztyp
BZK Regensburg	192
	192
	192
	*192
	*192
	202
KH St. Josef	192
	378
KH Barmherzige Brüder	17
	192
Klinikum Bad Abbach	17

### 3.11.2. MLST-Typisierung im UKR

Die MLST-Typisierung der VRE *E. faecium* Isolate des UKRs wurde mit 86 Isolaten durchgeführt. Exklusive der Mehrfachisolate reduziert sich die Anzahl der untersuchten Isolate auf 62. Im UKR sind die Sequenztypen ST 17, ST 78, ST 117, ST 186, ST 192, ST 202, ST 203 und ST 780 vertreten. Die genaue Verteilung ist in Abbildung 36 ersichtlich. Auch im UKR sind die beiden dominanten Sequenztypen mit mehr als 80% (inklusive Mehrfachisolate) bzw. 70% (exklusive Mehrfachisolate) ST 192 und ST 17.

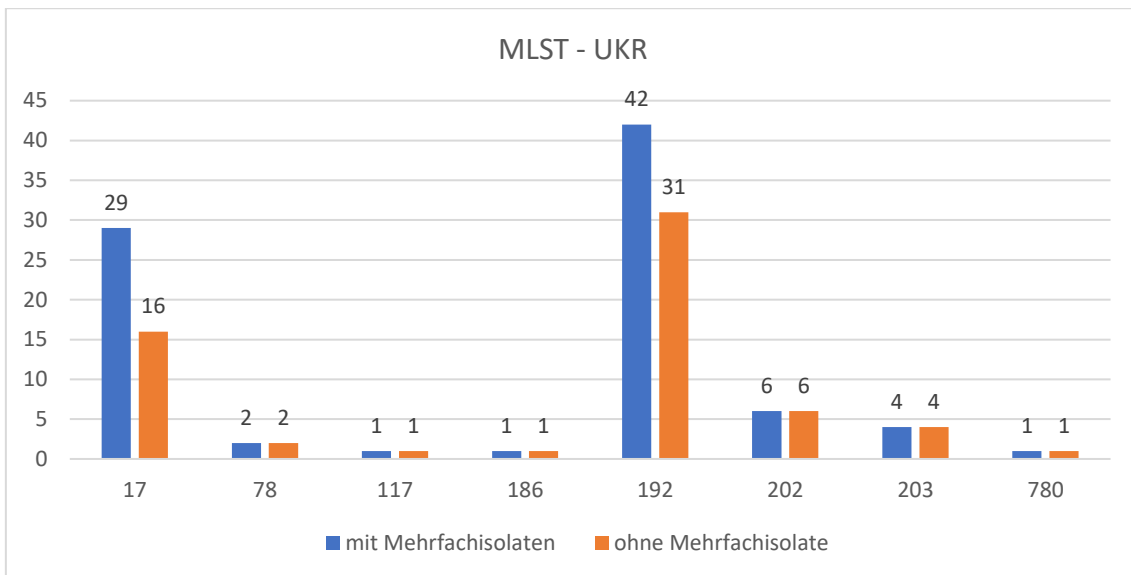


Abbildung 36: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 86) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 62)

### 3.11.2.1. MLST-Typisierung in den Fachabteilungen des UKR

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate in den Fachabteilungen Med I, Med II, Med III und Chirurgie dargestellt.

In Abbildung 36 ist die Verteilung inklusive der Mehrfachisolate dargestellt. Es ist auffallend, dass in allen Kliniken ST 192 dominiert und in Med I, Med III und Chirurgie neben ST 192 ebenso ST 17 überwiegt.

In Abbildung 37 ist die Verteilung exklusive der Mehrfachisolate dargestellt. Ebenso wie bei der Betrachtung mit Mehrfachisolaten dominiert ST 192 in allen Kliniken. In Med I und Med III ist der zweite dominierende Sequenztyp ST 17, in der Chirurgie hingegen ST 202.

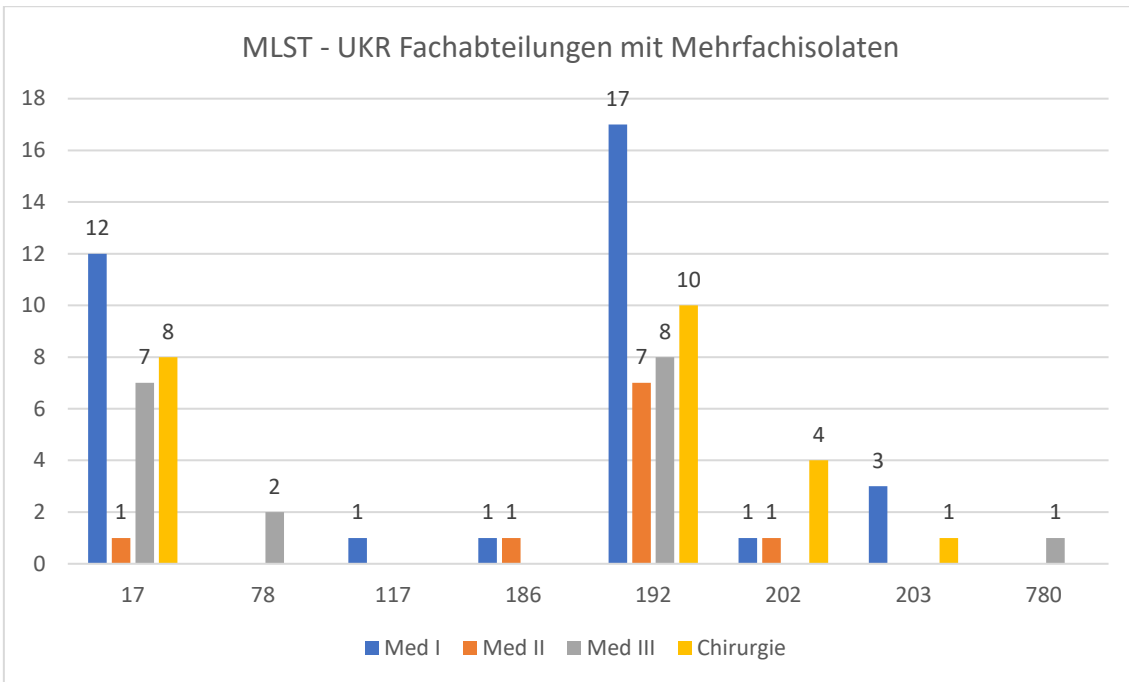


Abbildung 37: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate in den Fachabteilungen Innere Medizin (Med) I-III und Chirurgie des UKR mit Mehrfachisolaten (n = 86)

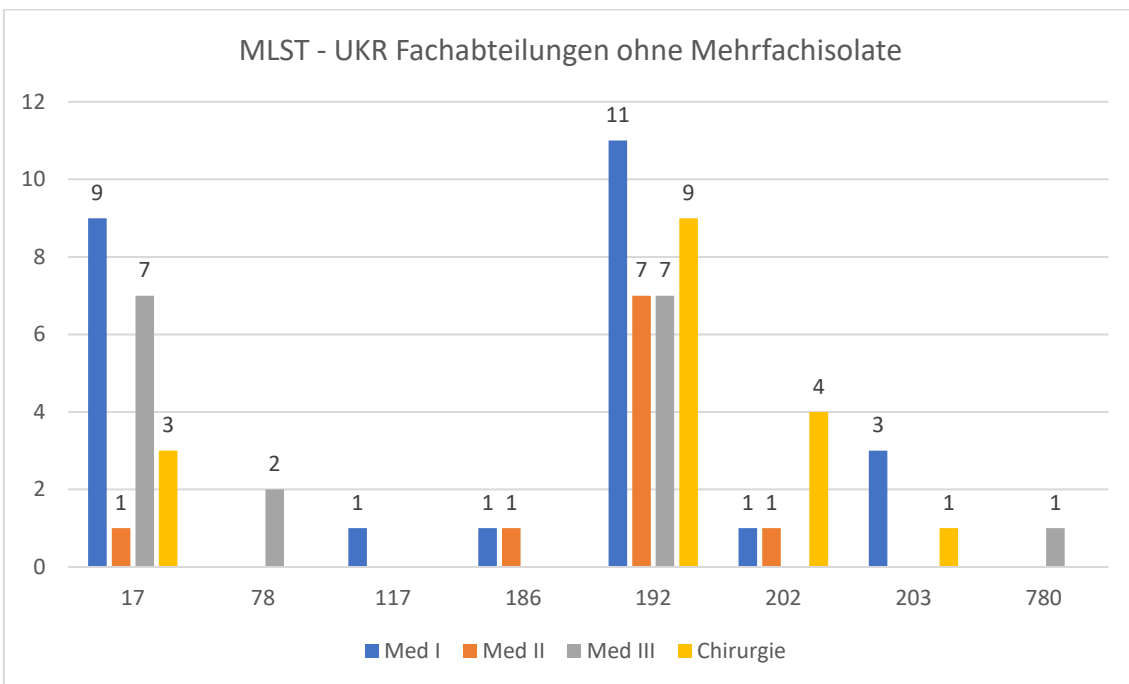


Abbildung 38: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate in den Fachabteilungen Innere Medizin (Med) I-III und Chirurgie des UKR ohne Mehrfachisolate (n = 70)

### 3.11.2.2. MLST-Sequenzierung in den Stationen des UKR

Die genaue Verteilung der Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate in den Stationen des UKR sowie auch die Anzahl der Isolate der Stationen lässt sich aus Tabelle 17 entnehmen. In dieser wird die Verteilung sowohl mit Mehrfachisolaten (blau) als auch ohne Mehrfachisolate (orange) dargestellt.

Tabelle 17: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate in den Stationen des UKR mit Mehrfachisolaten als erste Zahl in blau (n = 86) und ohne Mehrfachisolate als zweite Zahl in orange (n = 68)

		MLST								Anzahl
		17	78	117	186	192	202	203	780	
Station	10	1/1	-	1/1	-	8/4	-	2/2	-	12/8
	14	6/3	-	-	-	1/1	-	-	-	7/4
	15	2/2	-	-	-	5/5	-	1/1	-	8/8
	16	-	-	-	-	-	1/1	-	-	1/1
	17	-	-	-	-	2/2	-	-	-	2/2
	20	3/2	-	-	-	4/4	-	-	-	7/6
	21	4/4	2/2	-	-	3/2	-	-	1/1	10/9
	56	7/2	-	-	-	2/2	-	-	-	9/4
	57	-	-	-	-	-	1/1	-	-	1/1
	58	-	-	-	-	1/1	1/1	-	-	2/2
	90	1/1	-	-	-	5/5	2/2	-	-	8/8
	91	-	-	-	-	1/1	-	-	-	1/1
	92	3/2	-	-	-	2/1	1/1	1/1	-	7/5
	93	1/1	-	-	1/1	5/5	-	-	-	7/7
		ambulant	-	-	-	-	2/2	-	-	-

In Abbildung 39 ist die Verteilung der Sequenztypen inklusive der Mehrfachisolate dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass auf fast allen Stationen die Sequenztypen ST 192 oder ST 17 am häufigsten vorzufinden sind. Ausgeschlossen hiervon sind Station 16 (Dialyse) und 57 (chirurgische Station), die jeweils nur ein Isolat mit ST 202 aufweisen. Die Sequenztypen ST 78, ST 186 und ST 780 können jeweils nur einer Station zugeordnet werden. ST 78 und ST 780 sind auf Station 21 (Hämatologie und Onkologie) und ST 186 auf Station 93 (Intensivereinheit) aufzufinden. Alle anderen Sequenztypen können jeweils mehr als zwei Stationen zugeordnet werden.

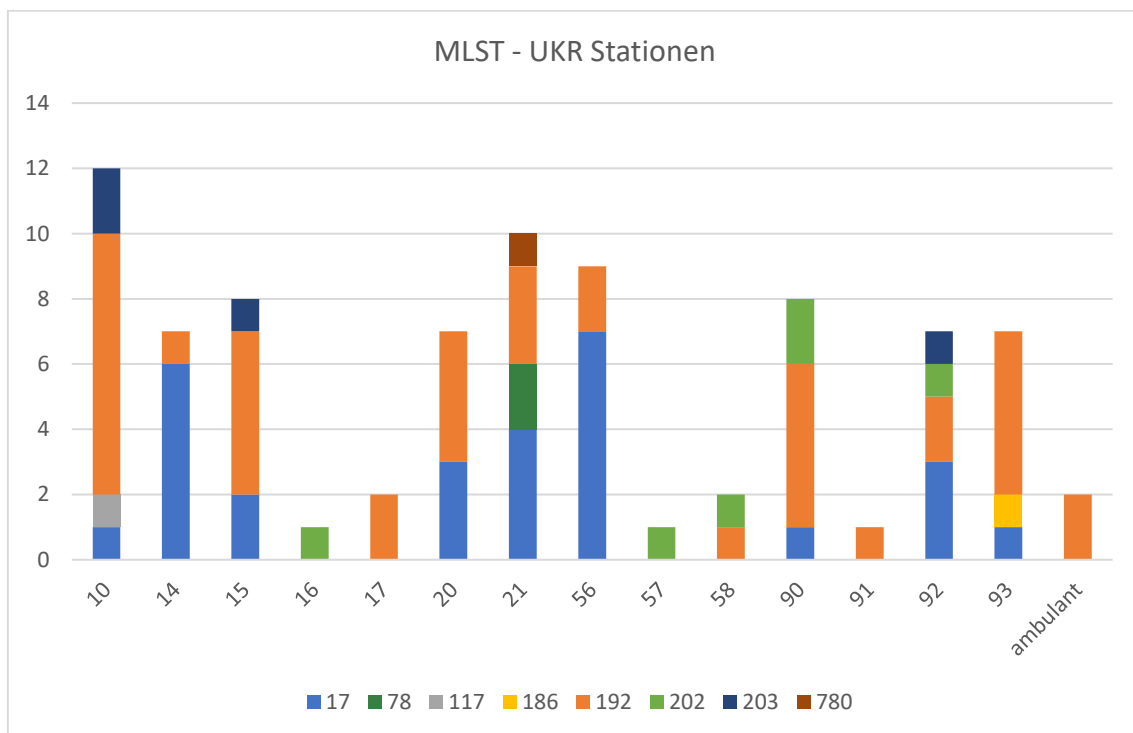


Abbildung 39: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate in den Stationen des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 86)

Bei der Betrachtung exklusive der Mehrfachisolate sind weiterhin die Sequenztypen ST 192 oder ST 17 in allen Stationen dominant, ausgenommen der Station 16 (Dialyse) und 57 (chirurgische Station) mit je einem Isolat des Sequenztyps ST 202. Im Vergleich mit der Verteilung inklusive der Mehrfachisolate ist auffallend, dass die Anzahl der Isolate auf den einzelnen Stationen verändert ist, jedoch sind weiterhin ST 192 und ST 17 dominierend.

Die Sequenztypen ST 78, ST 186 und ST 780 können jeweils ausschließlich einer Station zugeordnet werden. ST 78 und ST 780 sind auf Station 21 (Hämatologie und Onkologie) und ST 186 auf Station 93 (Intensiveinheit) aufzufinden. Alle anderen Sequenztypen können jeweils mehr als zwei Stationen zugeordnet werden.

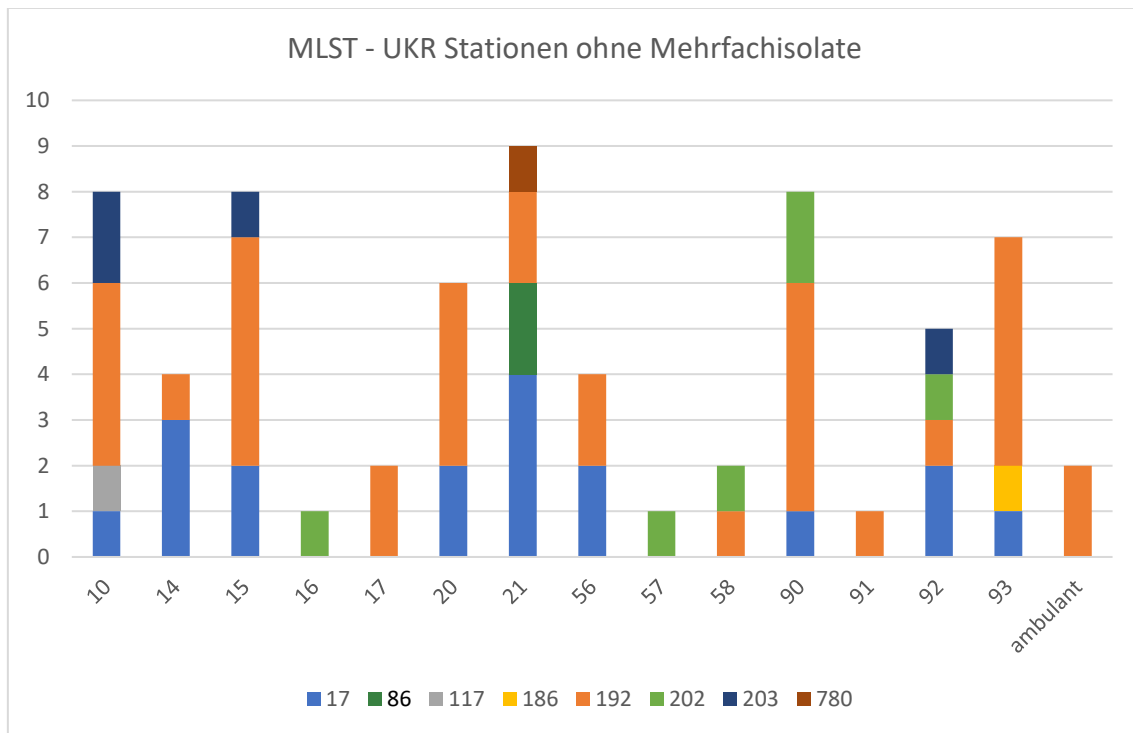


Abbildung 40: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate in den Stationen des UKR ohne Mehrfachisolate (n = 68)



### 3.11.3. MLST-Sequenzierung in den Stationsarten

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Stationsarten Normalstation und Intensivstation dargestellt.

Die Analyse der MLST-Sequenztypen der Stationsarten aller Krankenhäuser zeigt deutlich, dass sowohl auf den Normal- als auch den Intensivstationen die Sequenztypen ST 192 und ST 17 dominieren. Anzumerken ist, dass die Anzahl von ST 17 auf den Intensivstationen nur geringfügig höher ist als die der übrigen Sequenztypen. Die Sequenztypen ST 78, ST 117 und ST 780 kommen einzig auf den Normalstationen vor, während ST 186 und ST 378 lediglich auf den Intensivstationen vorkommen.

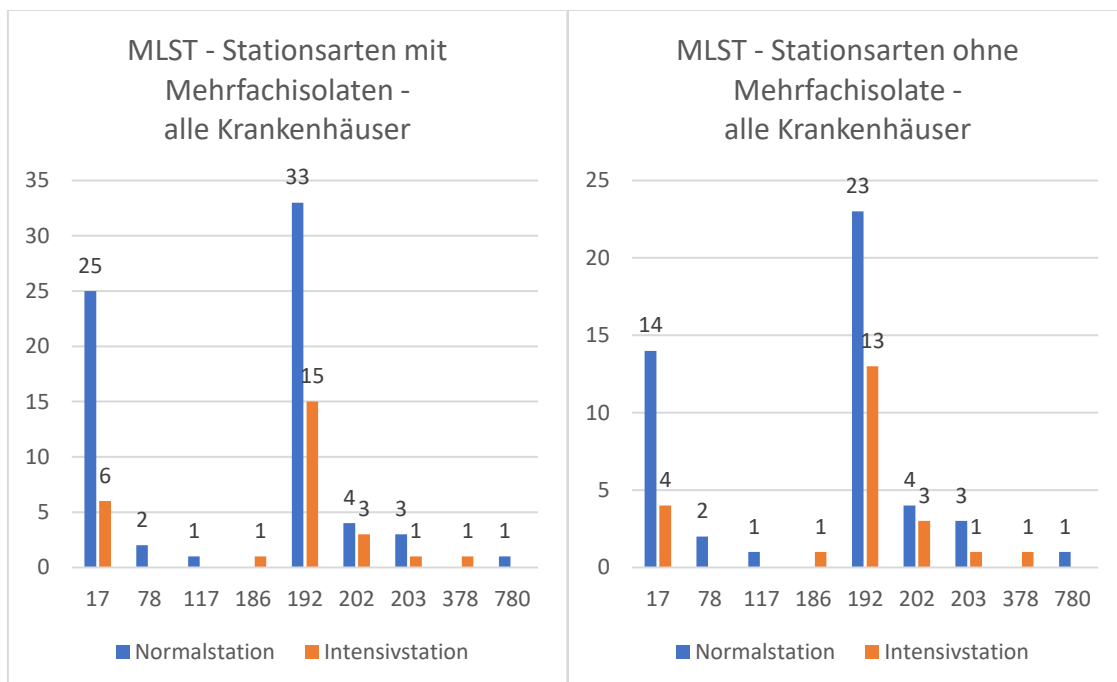


Abbildung 41: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 69) und Intensivstation (n = 27) aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate

Abbildung 42: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 48) und Intensivstation (n = 23) aller Krankenhäuser exklusive der Mehrfachisolate

Die Untersuchung der MLST-Sequenztypen der Stationsarten des UKR zeigt auf den Normal- als auch auf den Intensivstationen ebenso eine Dominanz des Sequenztyps ST 192. Der zweithäufigste Sequenztyp auf den Normalstationen ist ST 17. Auf den Intensivstationen ist bei der Betrachtung inklusive der Mehrfachisolate ebenso ST 17 der zweithäufigste Sequenztyp, während bei der Betrachtung exklusive der Mehrfachisolate ST 17 und ST 202 gleich häufig vorkommen. Die Sequenztypen ST 78, ST 117 und ST 780 kommen ausschließlich auf den Normalstationen vor, während ST 186 lediglich auf den Intensivstationen vorkommt.

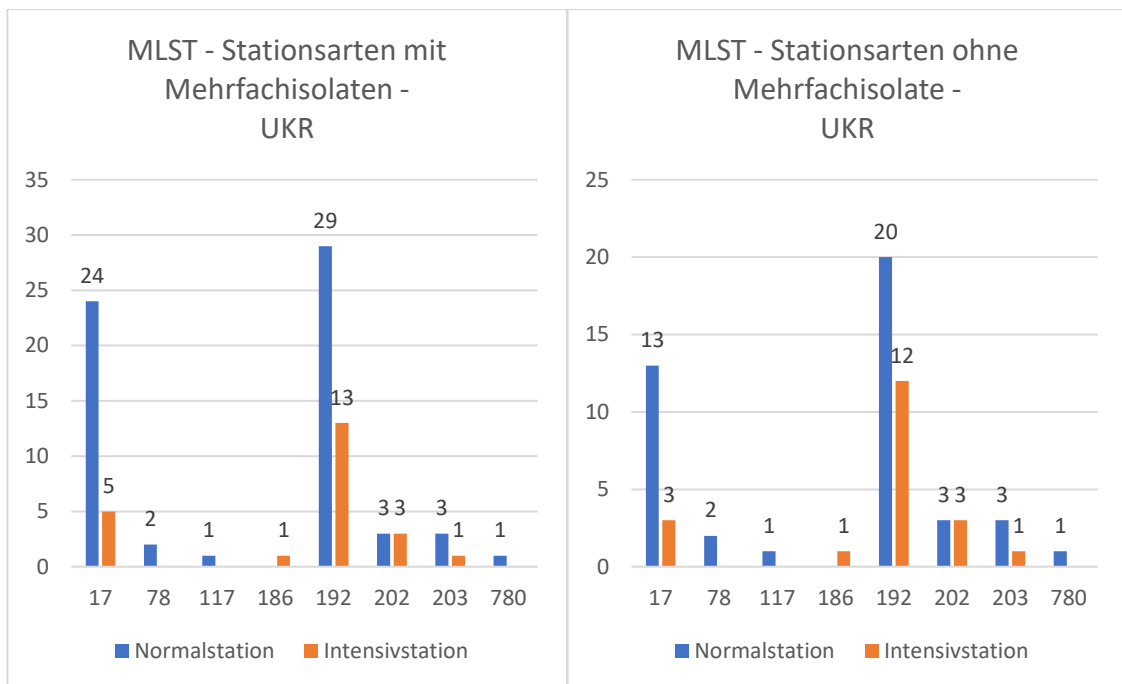


Abbildung 43: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 63) und Intensivstation (n= 20) des UKR inklusive der Mehrfachisolate

Abbildung 44: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 43) und Intensivstation (n = 17) des UKR exklusive der Mehrfachisolate

### 3.11.4. MLST-Sequenzierung der Probenarten

Die Analyse der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Screening-Proben zeigt, dass sowohl in allen Krankenhäusern inklusive des UKR als auch inklusive und exklusive der Mehrfachisolate die beiden Sequenztypen ST 192 und ST 17 eindeutig dominieren. Die Gegenüberstellung mit den klinischen Proben zeigt, dass ST 186 und ST 780 lediglich den Screening-Proben zuzuordnen sind.

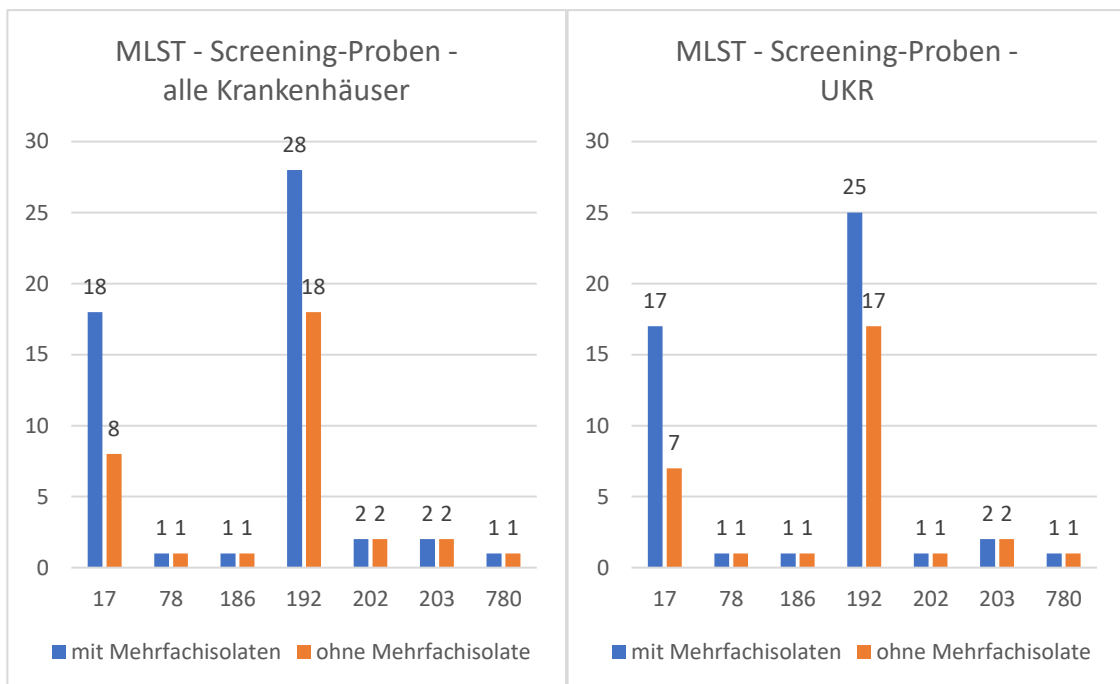


Abbildung 45: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Screening-Proben aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 53) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 33)

Abbildung 46: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Screening-Proben des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 48) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 30)

Die Untersuchung der MLST-Sequenztypen der klinischen Proben zeigt, dass ST 192 und ST 17 gefolgt von ST 202 dominieren. Beim Vergleich mit den Screening-Proben wird deutlich, dass ST 117 und ST 378 ausschließlich von klinischen Proben stammen.

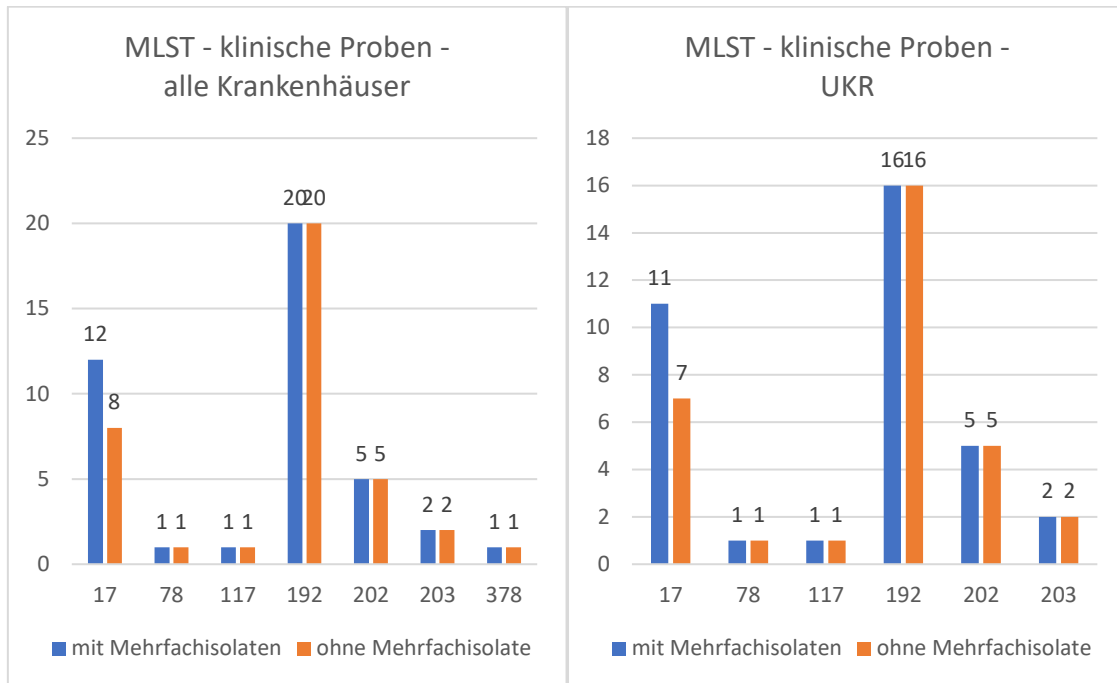


Abbildung 47: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der klinischen Proben aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 47) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 37)

Abbildung 48: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der klinischen Proben des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 36) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 32)

### 3.11.5. MLST-Sequenzierung der Materialgruppen

Die Analyse der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate bezogen auf die zugehörigen Materialgruppen zeigt, dass die beiden dominierenden Sequenztypen ST 192 und ST 17 in jeder Materialgruppe ausgenommen Drainage/Sekret (ST 202) zu finden sind. Die Sequenztypen ST 186 und ST 780 können ausschließlich der Materialgruppe Rektal-/Perianalabstrich zugeordnet werden, während ST 78, ST 117 und ST 378 ausschließlich aus Wundabstrichen stammen.

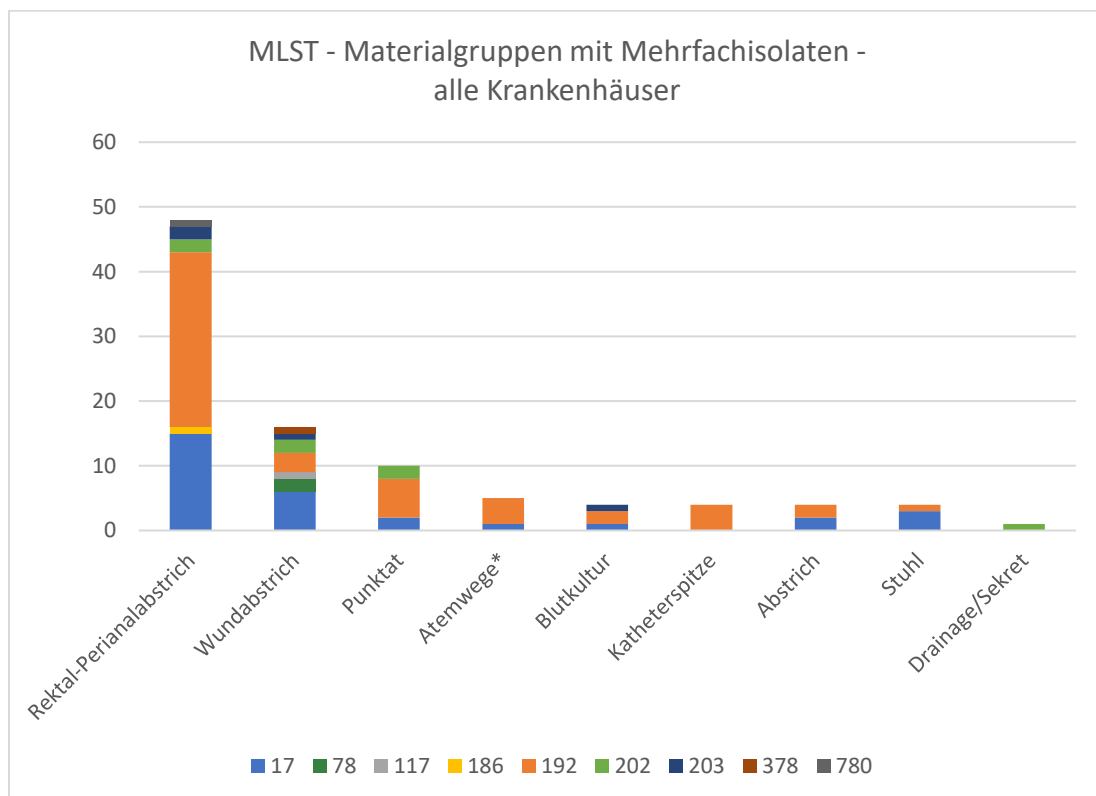


Abbildung 49: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der verschiedenen Materialgruppen aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) \*beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich

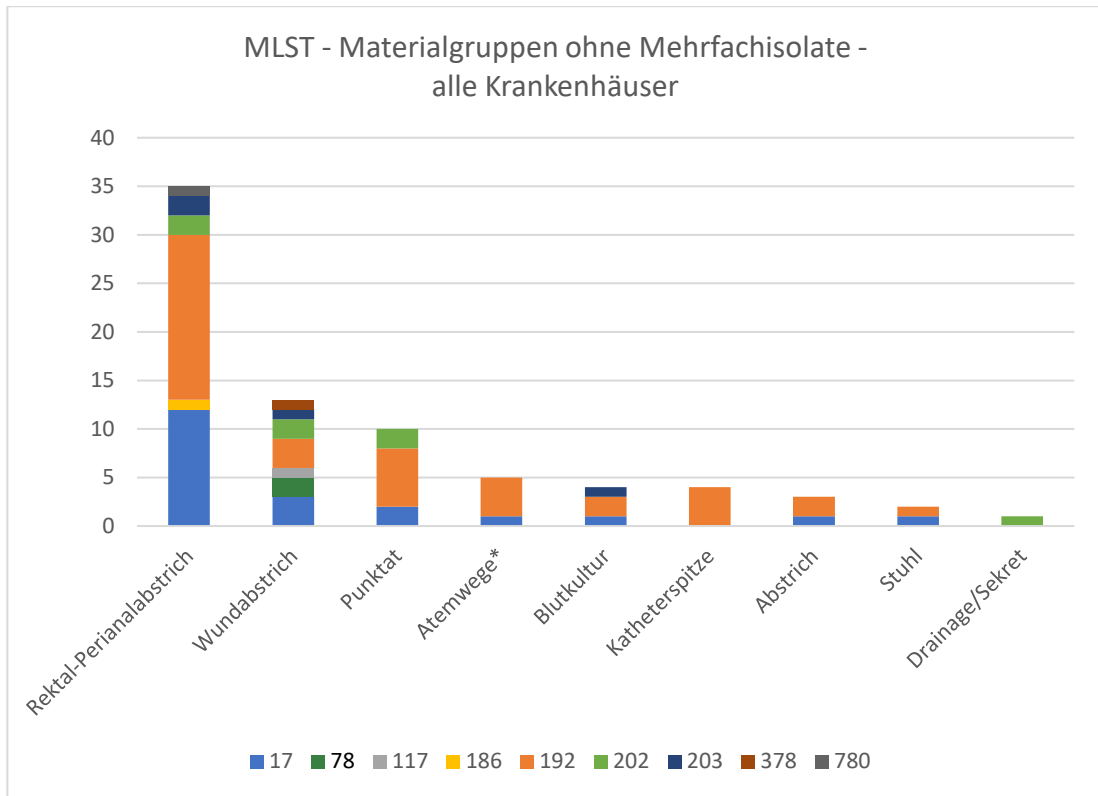


Abbildung 50: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der verschiedenen Materialgruppen aller Krankenhäuser exklusive der Mehrfachisolate (n = 77) \*beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich

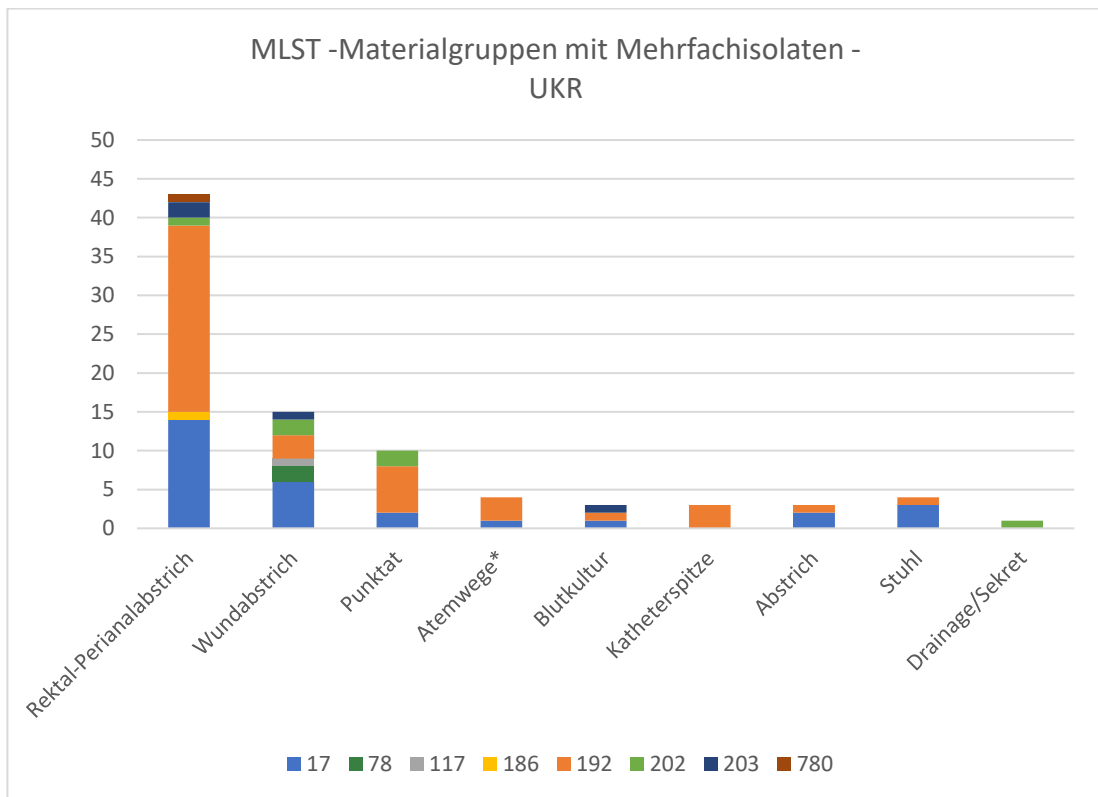


Abbildung 51: Darstellung der VRE *E. faecium* Isolate MLST-Sequenztypen der verschiedenen Materialgruppen des UKRs inklusive der Mehrfachisolate (n = 86) \*beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich

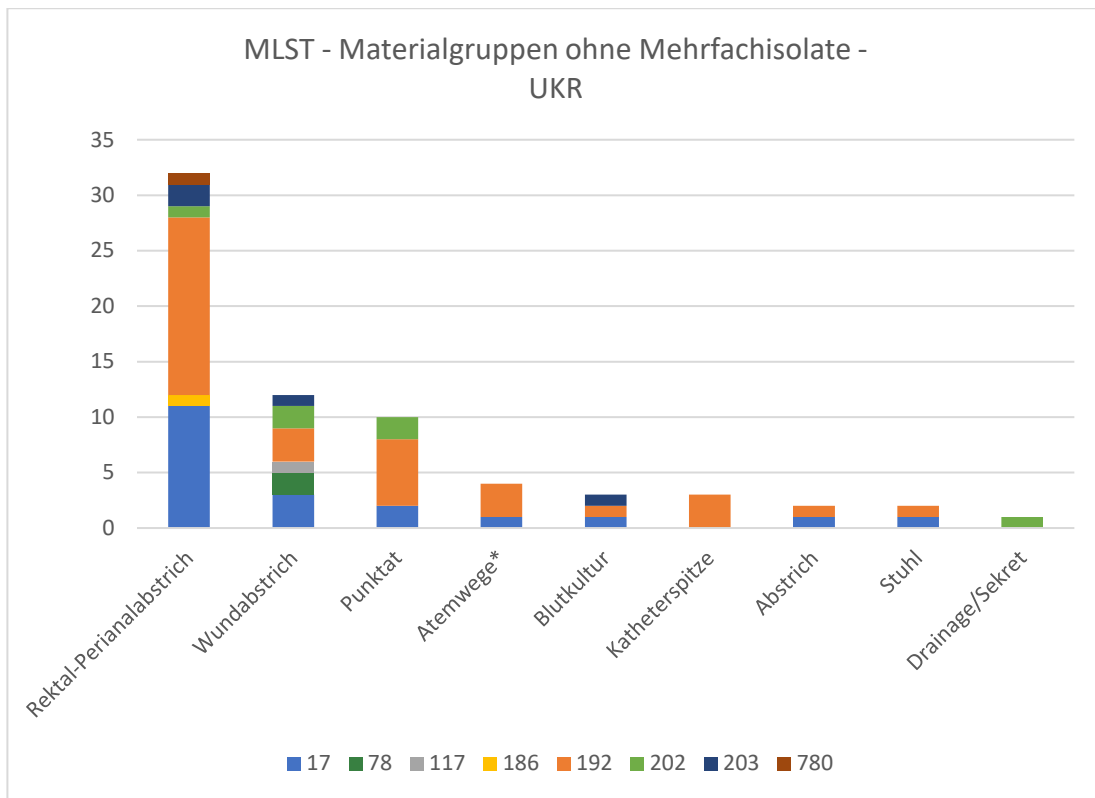


Abbildung 52: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der verschiedenen Materialgruppen des UKRs exklusive der Mehrfachisolate (n = 69)  
\*beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich

### 3.11.6. MLST-Sequenztypen im Jahresverlauf

Um die Verteilung der MLST-Sequenztypen im Jahresverlauf festzustellen, wurde eine Analyse diesbezüglich für alle Krankenhäuser und separat für das UKR jeweils inklusive und exklusive der Mehrfachisolate durchgeführt.

Hierbei wurde deutlich, dass in allen Monaten die dominierenden Sequenztypen ST 17 oder ST 192 sind. Ausgenommen davon ist der Monat Oktober, in dem ST 202 den häufigsten Sequenztyp darstellt. ST 186, ST 378 und ST 780 lassen sich lediglich einem einzigen Monat, nämlich März (ST 186 und ST 780) und April (ST 378), zuordnen.

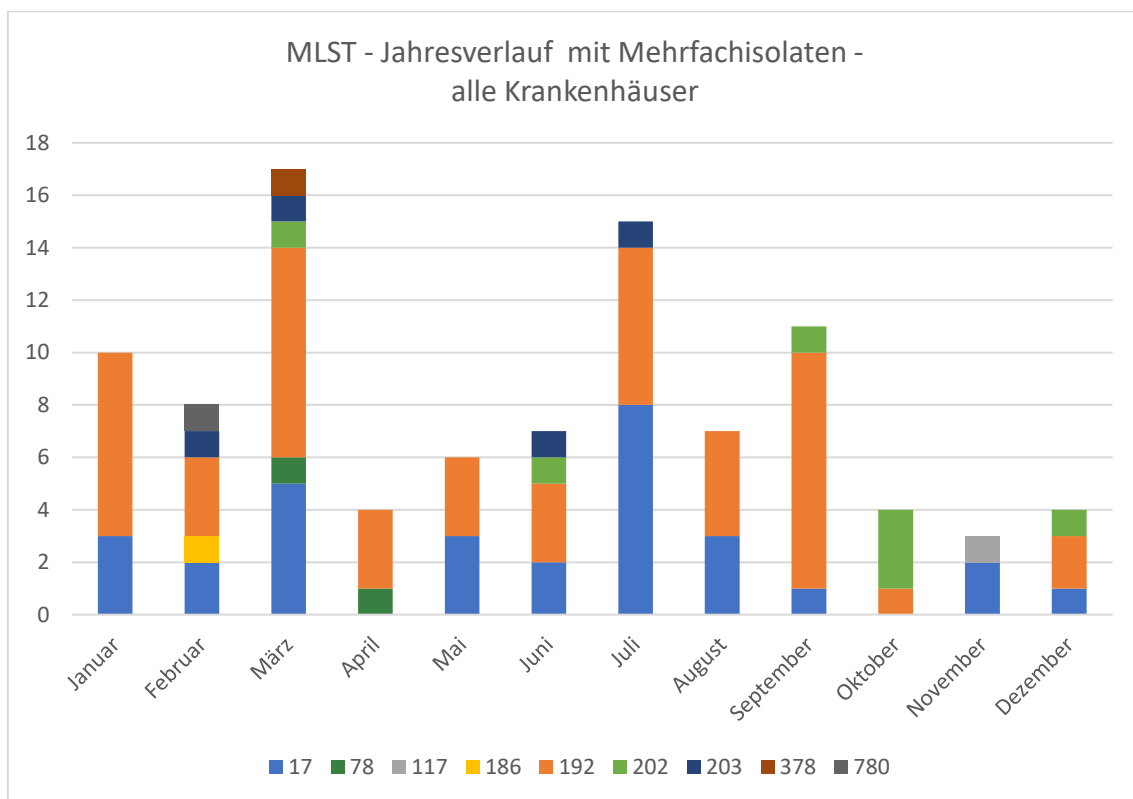


Abbildung 53: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate bezogen auf den Jahresverlauf inklusive der Mehrfachisolate für alle Krankenhäuser



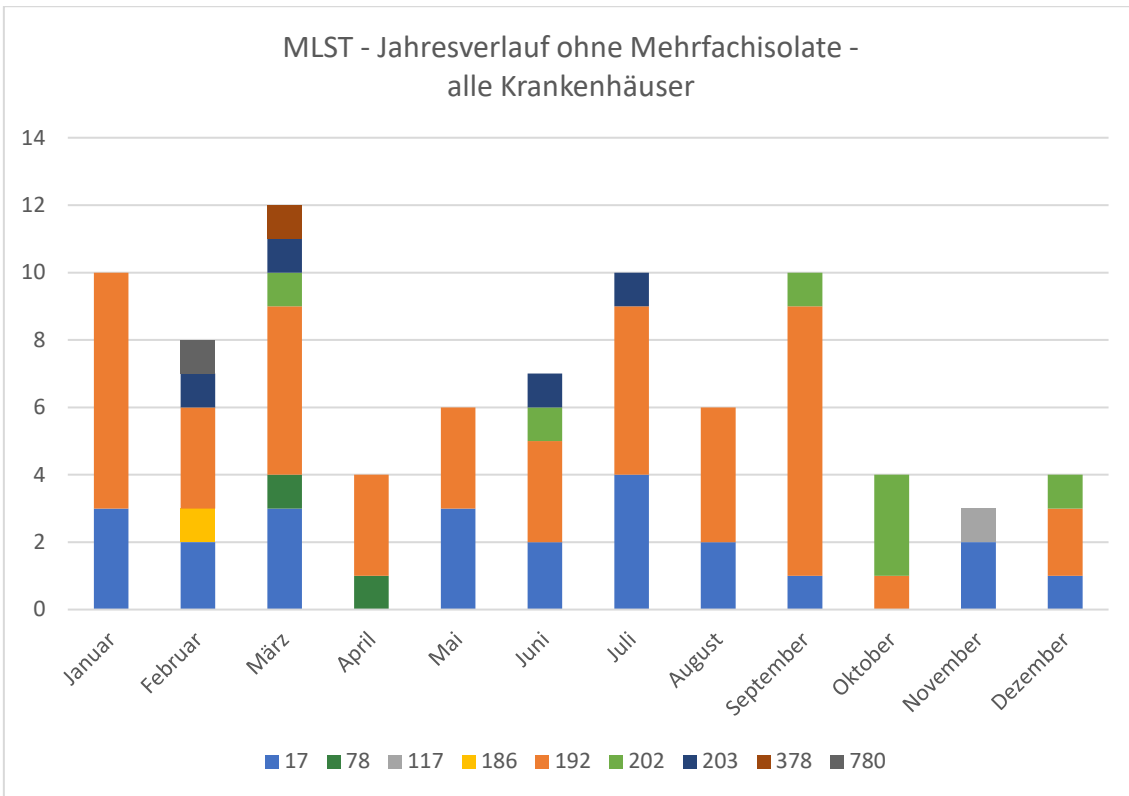


Abbildung 54: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate bezogen auf den Jahresverlauf exklusive der Mehrfachisolate für alle Krankenhäuser

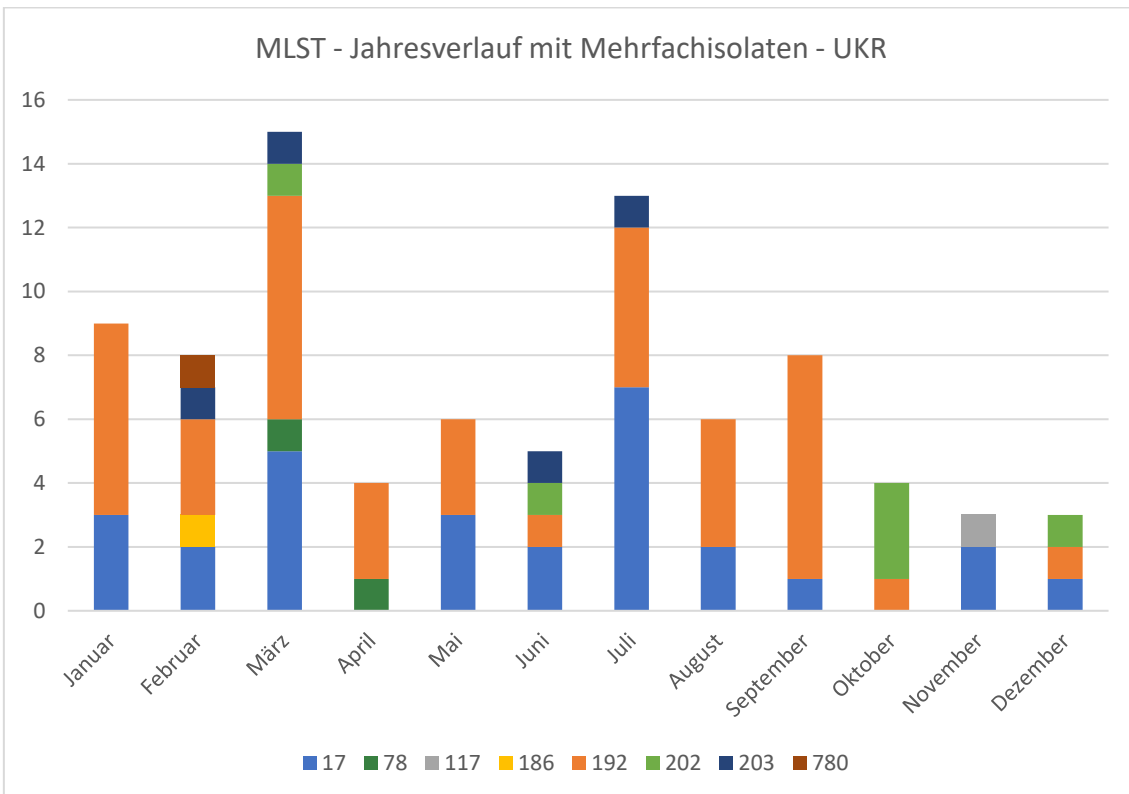


Abbildung 55: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate bezogen auf den Jahresverlauf inklusive der Mehrfachisolaten für das UKR

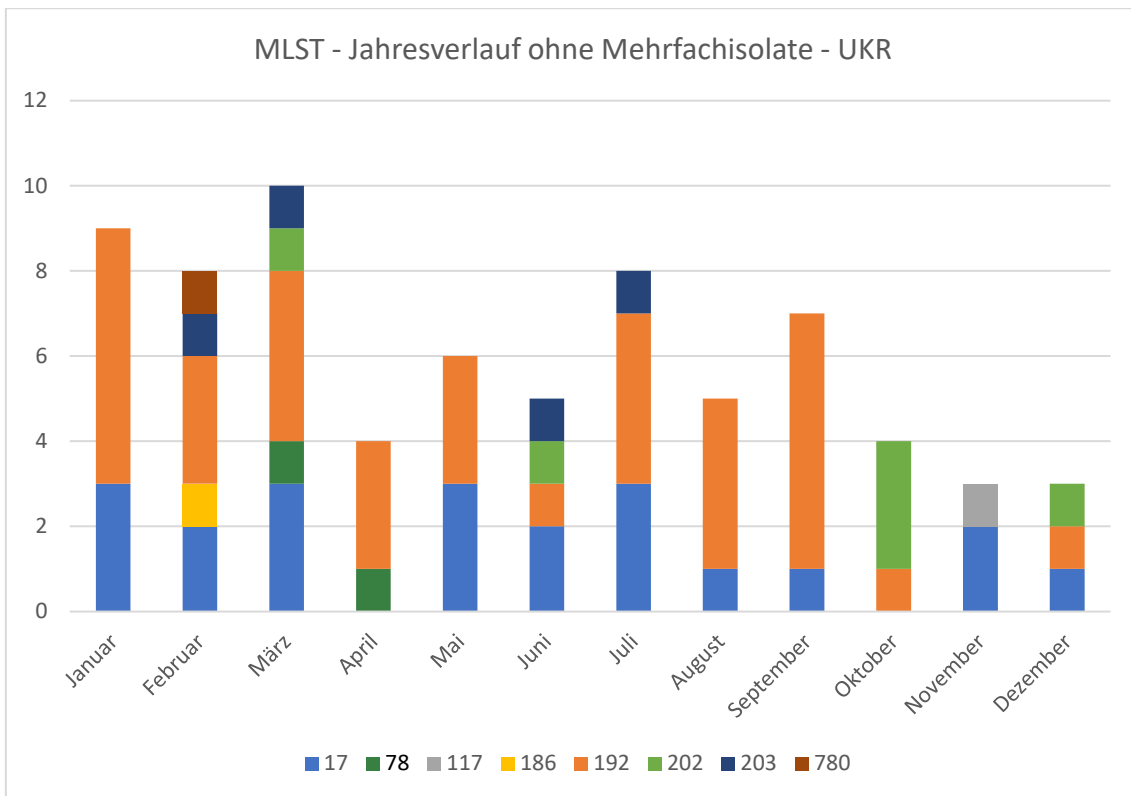


Abbildung 56: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate bezogen auf den Jahresverlauf exklusive der Mehrfachisolate für das UKR

### 3.12. Nachweise des *esp*- und *hyl*-Gens

Der Nachweise der Gene *esp* und *hyl* erfolgte durch PCR. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf ein Gel aufgetragen, das anschließend an eine elektrische Spannung angeschlossen wurde. Die Untersuchung der Gele und der darauf sichtbaren Lauflängen der DNA-Fragmente wurde mittels Fotoanalyse durchgeführt.

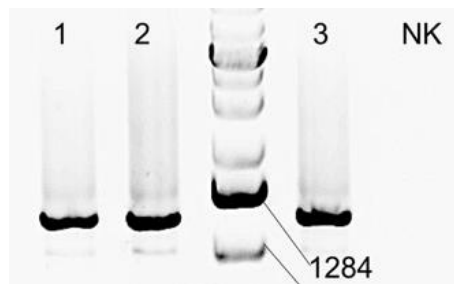


Abbildung 57: Beispielfoto der PCR-Produkte der PCR zum Nachweis der *espA*-Repeats (1-3: vier *espA*-Repeats; NK: Negativkontrolle) mit Standard Lambda DNA/Eco471 (AvaII) Marker (bp) zwischen 2 und 3

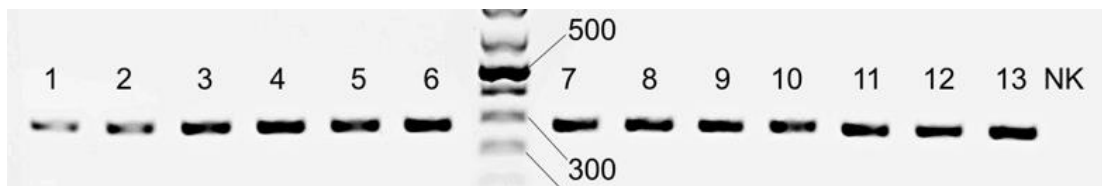


Abbildung 58: Beispielfoto der PCR-Produkte der PCR zum Nachweis des *hyl*-Gens (1-13: *hyl*-positiv; NK: Negativkontrolle) mit Standard O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (bp) zwischen 6 und 7

### 3.12.1. Analyse der *espA*-Repeats im *esp*-Gens

Das *esp*-Gen ist Teil einer Pathogenitätsinsel mit intragenischen repetitiven Genelementen, die sich in den Genabschnitten A, B und C befinden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anzahl der Repeats der Region A untersucht. Hierbei mögliche Ergebnisse sind 0 bis 10 Repeats bzw. *esp*-negativ.

Lediglich ein untersuchtes VRE *E. faecium* Isolat ist *esp*-negativ. Dieses stammt aus dem KH St. Josef, ist *vanB*-positiv und konnte dem Sequenztyp ST 378 zugeordnet werden. Dieser MLST-Sequenztyp wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein einziges Mal nachgewiesen.

Alle anderen VRE *E. faecium* Isolate zeigen vier Repeats in der Region A des *esp*-Gens.

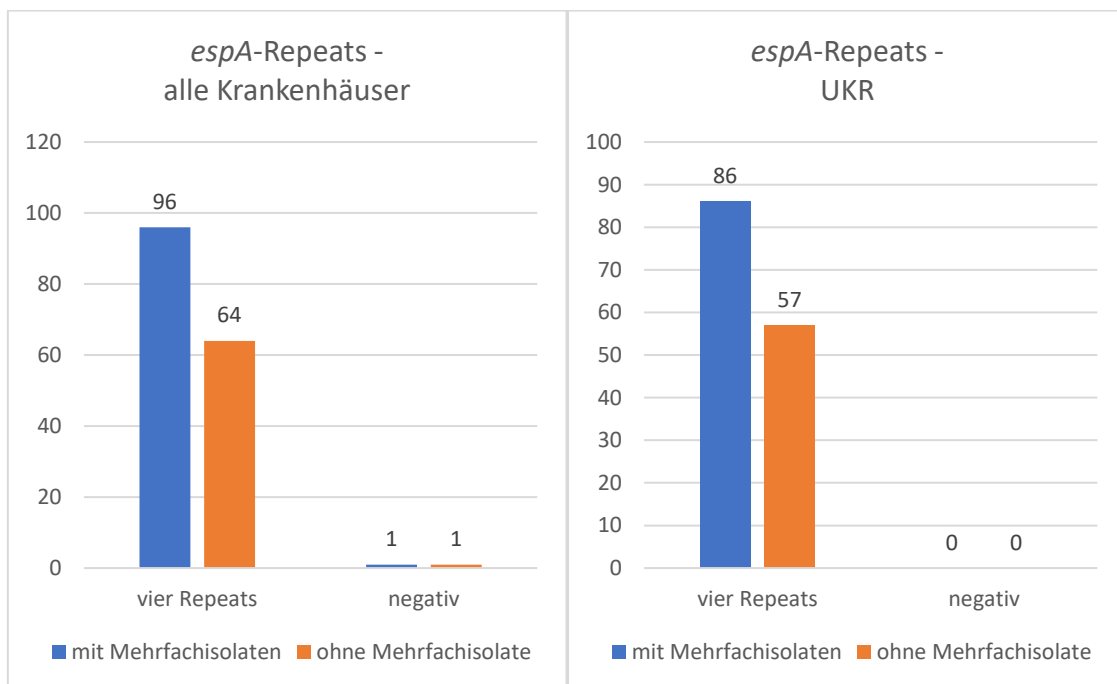


Abbildung 59: Darstellung der VRE *E. faecium* Isolate mit vier *espA*-Repeats im *esp*-Gen und Ergebnis *esp*-negativ für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 97) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 64)

Abbildung 60: Darstellung der VRE *E. faecium* Isolate mit vier *espA*-Repeats im *esp*-Gens und Ergebnis *esp*-negativ für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 89) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 57)

### 3.12.2. Nachweis des *hyl*-Gens

Das *hyl*-Gen wurde lange Zeit als Virulenzgen, das eine Hyaluronidase codiert, angesehen. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass das *hyl*-Gen nicht zu einer erhöhten Virulenz führt. Dennoch zeigt das *hyl*-Gen eine Relevanz bei Isolaten klinischen Ursprungs und Hospital-adaptierten Stämmen.

Die Analyse der Isolate dieser Arbeit bezüglich des *hyl*-Gens zeigt, dass mehr als 80% der VRE *E. faecium* Isolate das *hyl*-Gen besitzen. Lediglich neun Isolate wurden als *hyl*-negativ dokumentiert. Diese Isolate gehören dem *vanB*-Resistenztyp an und zeigen vier Repeats in der Region A des *esp*-Gens. Fünf der *hyl*-negativen Proben konnten ST 192, vier der *hyl*-negativen Proben konnten ST 203 zugeordnet werden. Alle untersuchten Isolate des MLST Sequenztyps ST 203 wiesen das *hyl*-Gen nicht auf.

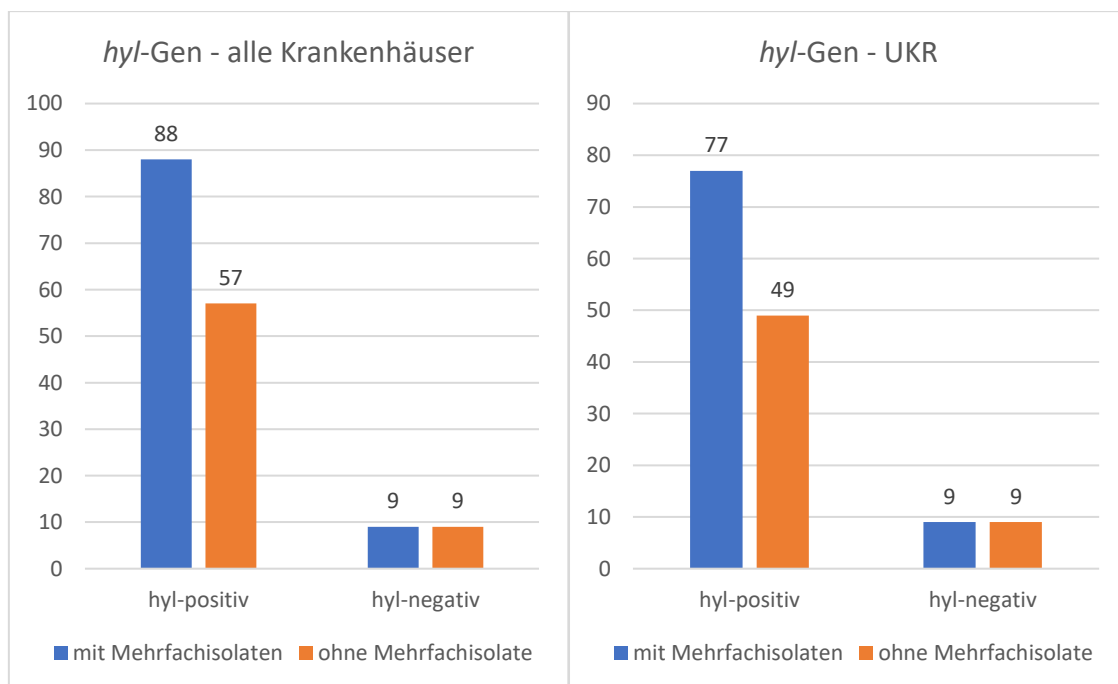


Abbildung 61: Verteilung der *hyl*-positiven und *hyl*-negativen VRE *E. faecium* für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 97) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66)

Abbildung 62: Verteilung der *hyl*-positiven und *hyl*-negativen VRE *E. faecium* für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 86) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58)

### 3.13. Übersicht über alle MLST-Sequenztypen in Kombination mit *vanA/B*, *hyl*, *espA*

Die in diesem Abschnitt gezeigte Abbildung 63 bietet einen Überblick über alle MLST-Sequenztypen aller VRE *E. faecium* Isolate und in welchen Kombinationen mit dem *vanA*- bzw. *vanB*-Gen, dem *hyl*-Gen und mit wie vielen *espA*-Repeats diese vorkommen. Hierbei wurden alle 97 VRE *E. faecium* Isolate berücksichtigt.

Auffallend ist, dass alle MLST-Sequenztypen außer ST 192 jeweils ein einziges Muster an Kombinationen aufweisen. ST 192 zeigt lediglich bei dem *hyl*-Gen zwei Kombinationsmöglichkeiten (positiv, negativ).

Außerdem besitzt nur ein Sequenztyp (ST 117) das *vanA*-Gen, während alle anderen Sequenztypen das *vanB*-Gen besitzen. Ebenso ist lediglich ein Sequenztyp (ST 378) *esp*-negativ, während alle anderen Sequenztypen *esp*-positiv mit vier *espA*-Repeats sind.

MLST	<i>vanA/vanB</i>	<i>hyl</i>	<i>espA</i>	Anzahl
17	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -positiv	vier Repeats	31
78	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -positiv	vier Repeats	2
117	<i>vanA</i>	<i>hyl</i> -positiv	vier Repeats	1
186	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -positiv	vier Repeats	1
192	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -positiv	vier Repeats	44
		<i>hyl</i> -negativ	vier Repeats	5
202	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -positiv	vier Repeats	6
203	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -negativ	vier Repeats	4
378	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -positiv	negativ	1
780	<i>vanB</i>	<i>hyl</i> -positiv	vier Repeats	1

Abbildung 63: Übersicht über alle MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate mit dazugehörigem Ergebnis zu *vanA/B*, *hyl*, *espA*-Repeats

### 3.14. Mehrfachisolate

In diesem Abschnitt werden die VRE *E. faecium* Mehrfachisolate genauer betrachtet. Eine Übersicht bietet hierzu Tabelle 18. Insgesamt stammen die 50 Mehrfachisolate von 18 Patienten.

Tabelle 18: Darstellung der VRE *E. faecium* Mehrfachisolate mit Befunddatum, Krankenhaus (BZK: Bezirksklinikum Regensburg), Enterokokkenspezies, Antibiotikaresistenzen (V: Vancomycin; T: Teicoplanin), *vanA/B*-Genotyp, *hyl*-Gen, *espA*-Repeats im *esp*-Gens und MLST-Sequenztyp (Sequenztypen der Mehrfachisolate von je einem Patienten mit unterschiedlichem Ergebnis sind fett hervorgehoben) (\*von diesem Isolat wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei Kolonien gepickt und getrennt weiteruntersucht)  
(Enterokokkenspezies und Antibiotikaresistenzen auf Basis der Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit)

Patient	Befund- datum	Kranken- haus	Enterokokken- spezies	Antibiotika- resistenzen	<i>vanA/B</i>	<i>hyl</i>	<i>espA</i> - Repeats	MLST
1	14.11.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanA</i>	positiv	vier	<b>117</b>
	21.11.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
2	21.10.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>202</b>
	21.11.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
3	17.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
	30.05.08*	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>
	30.05.08*	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
	05.06.08	BZK	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>
4	30.01.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>
	24.10.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>202</b>
5	23.12.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>202</b>
	23.12.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>
6	08.05.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	21.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	23.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	23.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	24.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	24.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
7	20.05.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	15.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
	04.09.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V + T	<i>vanB</i>	positiv	vier	17
8	10.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
	21.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
9	24.09.08	BZK	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
	24.09.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
	24.09.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
10	20.06.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
	21.07.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	192
	25.08.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	negativ	vier	192

		Befund- datum	Kranken- haus	Enterokokken- spezies	Antibiotika- resistenzen	vanA/B	hyl	espA- Repeats	MLST
Patient 11		26.06.08	BZK	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		04.07.08	BZK	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
12		28.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
		28.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
		31.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
13		07.02.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		01.09.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
14		28.01.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		17.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		25.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		25.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		25.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
15		28.02.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
		13.08.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
		13.08.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
16		25.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
		29.05.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	17
17		09.01.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		17.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
18		18.02.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192
		03.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	vanB	positiv	vier	192

### 3.14.1. Krankenhäuser

Die VRE *E. faecium* Mehrfachisolate stammen sowohl aus dem UKR als auch aus dem BZK Regensburg. Ein Patient (Patient 11) befand sich ausschließlich im BZK Regensburg, zwei Patienten (Patient 3 und 9) befanden sich sowohl im UKR als auch im BZK Regensburg, während alle anderen Patienten sich nur im UKR befanden.

Hierbei konnten bei Patient 3 Unterschiede hinsichtlich der MLST-Sequenztypen festgestellt werden. Die vier Isolate zeigen zwei verschiedene Sequenztypen, nämlich ST 17 und ST 192. Der zeitliche Abstand des Standortwechsels von UKR zu BZK beträgt sechs Tage. Ob es sich hierbei um eine Verlegung handelt oder der Patient in der Zwischenzeit entlassen wurde, wurde aus den vorliegenden Unterlagen nicht ersichtlich.

Die drei Isolate von Patient 9 stammen zwei Mal aus dem UKR und einmal aus dem BZK. In diesem Fall kann von einer Verlegung ausgegangen werden, da alle drei Proben am selben Tag entnommen wurden.



### 3.14.2. Zeitliche Abstände der Probenentnahmen

Die zeitlichen Abstände, in denen die Proben genommen wurden, variieren sehr. So wurden teilweise am selben Tag bis zu drei Proben (z.B. Patient 5 und 9) genommen. Die größte zeitliche Differenz beträgt neun Monate (Patient 4).

Von Patient 5 stehen beispielsweise zwei Isolate desselben Tages zur Verfügung, die zwei unterschiedliche MLST-Sequenztypen zeigen (ST 192 und ST 202).

### 3.14.3. Antibiotikaresistenzuntersuchung

Die Analyse der VRE *E. faecium* Mehrfachisolate bezüglich der Antibiotikaresistenzen zeigt, dass alle VRE *E. faecium* Isolate Vancomycin-resistent sind. Drei der Mehrfachisolate, die alle von Patient 7 stammen, besitzen eine zusätzliche Resistenz gegen Teicoplanin. Diese drei Isolate sind *vanB*-positiv, *hyl*-positiv, zeigen vier *espA*-Repeats und gehören zum MLST-Sequenztyp ST 17. Diese Proben wurden in zwei monatigen Abständen im UKR entnommen.

Keines der Mehrfachisolate zeigt eine Resistenz gegen Linezolid.

### 3.14.4. Untersuchung auf die Resistenzgene *vanA* und *vanB*

Bei allen VRE *E. faecium* Mehrfachisolaten mit ausgenommen einer Ausnahme konnte das *vanB*-Gen nachgewiesen werden. Ein Isolat von Patient 1 ist *vanA*-positiv und *hyl*-positiv und zeigt vier *espA*-Repeats und gehört zum MLST-Sequenztyp ST 117. Das zweite Isolat von Patient 1 zeigt das *vanB*-Gen, ist *hyl*-positiv, zeigt vier *espA*-Repeats und gehört zum MLST-Sequenztyp ST 17. Der zeitliche Abstand der Probenentnahme beträgt genau eine Woche. Beide Isolate stammen aus dem UKR.

### **3.14.5. Nachweis des *hyl*-Gens**

Bis auf eine Ausnahme zeigen alle VRE *E. faecium* Mehrfachisolate das *hyl*-Gen. Patient 10 zeigt in einem seiner drei Isolate ein *hyl*-negatives Ergebnis zusammen mit dem *vanB*-Gen, vier *espA*-Repeats und dem MLST-Sequenztyp ST 192. Die beiden anderen Isolate dieses Patienten unterscheiden sich zu diesem Isolat nur durch das Vorliegen des *hyl*-Gens. Der zeitliche Abstand der Probenentnahme beträgt jeweils einen Monat. Alle drei Isolate stammen aus dem UKR.

### **3.14.6. Nachweis der *espA*-Repeats des *esp*-Gens**

Die Analyse der *espA*-Repeats des *esp*-Gens zeigt ein einheitliches Ergebnis aller VRE *E. faecium* Mehrfachisolate mit vier *espA*-Repeats.

### 3.14.7. MLST-Sequenzierung

In Tabelle 19 sind die 12 VRE *E. faecium* Mehrfachisolate dargestellt, die unterschiedliche MLST-Sequenztypen zeigen. Insgesamt stammen diese Mehrfachisolate von fünf Patienten.

Tabelle 19: Darstellung der VRE *E. faecium* Mehrfachisolate der Patienten, deren Isolate unterschiedliche MLST-Sequenztypen zeigen, mit Befunddatum, Krankenhaus, Enterokokkenspezies, Antibiotikaresistenzen (V: Vancomycin), *vanA/B*-Genotyp, *hyl*-Gen, *espA*-Repeats und MLST-Sequenztyp (\*von diesem Isolat wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei Kolonien gepickt und getrennt weiteruntersucht)

		Befund- datum	Kranken- haus	Enterokokken- spezies	Antibiotika- resistenzen	<i>vanA/B</i>	<i>hyl</i>	<i>espA</i> - Repeats	MLST
<b>Patient 1</b>	1	14.11.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanA</i>	positiv	vier	<b>117</b>
		21.11.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
<b>2</b>		21.10.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>202</b>
		21.11.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
<b>3</b>		17.03.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
		30.05.08*	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>
		30.05.08*	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>17</b>
		05.06.08	BZK	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>
<b>4</b>		30.01.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>
		24.10.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>202</b>
<b>5</b>		23.12.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>202</b>
		23.12.08	UKR	<i>E. faecium</i>	V	<i>vanB</i>	positiv	vier	<b>192</b>

Die VRE *E. faecium* Mehrfachisolate zeigen ein einheitliches Ergebnis in den Punkten Antibiotikaresistenz (Vancomycin resistent, Teicoplanin und Linezolid sensibel), Vorliegen des *hyl*-Gens (*hyl*-positiv) und Anzahl der *espA*-Repeats im *esp*-Gens (vier Repeats).

Die Differenzen der VRE *E. faecium* Mehrfachisolate werden im Folgenden aufgezeigt.

Patient 1 können zwei Isolate zugeordnet werden. Diese Proben wurden in einem Abstand von einer Woche im UKR entnommen. Ein Isolat weist das *vanA*-Gen und den Sequenztyp ST 117 auf, das andere Isolat das *vanB*-Gen und den Sequenztyp ST 17.

Mit einem Abstand von einem Monat wurden im UKR zwei Proben von Patient 2 entnommen. Diese zwei Isolate wurden als VRE *E. faecium* mit *vanB*-Gen und den Sequenztypen ST 202 und ST 17 identifiziert.

Drei Proben wurden von Patient 3 analysiert. Von einer dieser Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Kolonien separat als zwei Isolate weiter

untersucht. Die erste Probe wurde im UKR entnommen und konnte als VRE *E. faecium* mit *vanB*-Gen und Sequenztyp ST 17 identifiziert werden. Die zweite Probe wurde einen Monat später im UKR entnommen und als die vorhin erwähnten zwei separaten Isolate weiter untersucht. Diese zwei Isolate wurden als VRE *E. faecium* mit *vanB*-Gen und den Sequenztypen ST 192 und ST 17 identifiziert. Eine Woche später wurde die dritte Probe dieses Patienten im BZK Regensburg entnommen. Dieses Isolat weist das *vanB*-Gen und den Sequenztyp ST 192 auf.

Von Patient 4 stehen zwei Proben zur Verfügung, die in einem Abstand von neun Monaten im UKR entnommen wurden. Diese Isolate zeigen das *vanB*-Gen und die Sequenztypen ST 192 und ST 202.

Patient 5 können zwei Proben, die am selben Tag im UKR entnommen wurden, zugeordnet werden. Die beiden Isolate weisen das *vanB*-Gen und die Sequenztypen ST 202 und ST 192 auf.

### 3.15. Vergleich der Ergebnisse der Originalbefunde von 2008 mit den Ergebnissen dieser Arbeit von 2016

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Originalbefunde von 2008 mit den Ergebnissen dieser Arbeit von 2016 verglichen.

#### 3.15.1. Vergleich Ergebnisse der Bestimmung der Enterokokkenspezies

Aufgrund des nicht vorhandenen Wachstums zweier Proben können insgesamt 112 Proben miteinander verglichen werden.

93 Isolate konnten sowohl 2008 als auch 2016 als *E. faecium* identifiziert werden.

19 Isolate hingegen weisen Abweichungen auf, welche in Tabelle 20 dargestellt sind. Auffallend ist, dass 16 dieser Isolate Screening-Proben sind, während nur drei davon klinische Proben sind.

Tabelle 20: Differenzen der Ergebnisse der Bestimmung der Enterokokkenspezies der Originalbefunde im Jahr 2008 und der Befunde dieser Arbeit im Jahr 2016

	<b>Ergebnis 2008</b>	<b>Ergebnis 2016</b>	<b>Art der Probe</b>
Isolat <b>1</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>2</b>	<i>E. faecium + faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>3</b>	<i>E. faecium + faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Screening
<b>4</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>5</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Klinische Probe
<b>6</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>7</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>8</b>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>9</b>	<i>E. faecium + faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Screening
<b>10</b>	<i>E. faecium + faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Screening
<b>11</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	Screening
<b>12</b>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Screening
<b>13</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>14</b>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Screening
<b>15</b>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	Screening
<b>16</b>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Klinische Probe
<b>17</b>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Klinische Probe
<b>18</b>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	Screening
<b>19</b>	<i>E. faecium</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	Screening

Des Weiteren soll angemerkt werden, dass 2016 von zwei Isolaten jeweils zwei Kolonien gepickt wurden. Bei dem ersten Isolat wurde zum einen *E. faecium* diagnostiziert, was mit der Diagnose von 2008 übereinstimmt, zum anderen *E. faecalis*. Bei dem zweiten Isolat wurde bei beiden Kolonien *E. faecium* festgestellt, was mit dem Ergebnis von 2008 übereinstimmt.

### 3.15.2. Vergleich der Ergebnisse der Antibiotikaresistenztestung

Eine Antibiotikaresistenztestung wurde in der Eingangsdagnostik 2016 bei 33 Isolaten durchgeführt, während im Rahmen dieser Dissertation 2016 die Antibiotikaresistenztestung bei 97 Isolaten durchgeführt wurde. Demnach können nur die Ergebnisse der 33 Isolate miteinander verglichen werden.

Bei der Testung der Vancomycinresistenz weist lediglich ein Isolat eine Abweichung auf. So wurde das Isolat 2008 als Vancomycin-sensibel bewertet, während es 2016 als Vancomycin-resistent bewertet wurde. Dieses Isolat stammt von einer klinischen Probe. Die Testungen auf die Teicoplanin- und Linzeolidresistenz lieferten in beiden Untersuchungen dieselben Ergebnisse.

### 3.15.3. Vergleich der Ergebnisse des Nachweises des *vanA*- und *vanB*-Gens

Beim Vergleich der VRE *E. faecium* Isolate hinsichtlich der Ergebnisse des Nachweises des *vanA*- und *vanB*-Gens der Originalbefunde von 2008 mit den Befunden dieser Arbeit von 2016 zeigen sich bei drei Isolaten abweichende Ergebnisse. Alle drei Proben stammen von Screening-Untersuchungen.

Tabelle 21: Differenzen der Ergebnisse des Nachweises des *vanA*- und *vanB*-Gens der Originalbefunde von 2008 und der Befunde dieser Arbeit von 2016

		<b>Ergebnis 2008</b>	<b>Ergebnis 2016</b>	<b>Art der Probe</b>
Isolat	<b>1</b>	weder <i>vanA</i> noch <i>vanB</i>	<i>vanB</i>	Screening
	<b>2</b>	<i>vanB</i>	<i>vanA</i>	Screening
	<b>3</b>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	Screening

## 4. Diskussion

### 4.1. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich retrospektiv mit der molekularen Typisierung und Epidemiologie von VRE *E. faecium* am UKR im Jahr 2008 und ist Teil einer groß angelegten Studie am UKR. Seit 2004 werden die VRE-Erstnachweise einer VRE-Stammsammlung zugefügt. Eine epidemiologische Analyse wurde mittels der Ergebnisse der Untersuchung der Resistenzgene *vanA* und *vanB*, der Virulenzfaktoren *esp* und *hyl* und der MLST-Typisierung durchgeführt.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 97 Proben (davon 86 Proben aus dem UKR) von 64 Patienten (davon 56 Patienten aus dem UKR) mit einem positiven VRE *E. faecium* Nachweis untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt 55 Jahre. Die meisten VRE *E. faecium* Isolate stammen aus dem UKR aus der Fachabteilung Med I und aus Normalstationen. Screeninguntersuchungen aus Rektal-/Perianalabstrichen stellen die häufigste Art der Probe dar.

Die molekulare Untersuchung der VRE *E. faecium* zeigte, dass der Großteil der Isolate zum *vanB*-Resistenztyp gehört, vier *espA*-Repeats im *esp*-Gen aufweist und *hyl*-positiv ist. Die dominanten MLST-Typen sind ST 17 und ST 192.

### 4.2. Methoden der Eingangsdiagnostik im Jahr 2008

Die Screeningproben wurden mittels VRE-Bouillon und anschließender PCR mit Blockcyclerverfahren (genetischer Nachweis von *vanA*, *vanB* oder *vanC 1-3*) untersucht. Im Gegensatz dazu wurde bei klinischen Proben eine Reinkultur angelegt. Die biochemische Speziesdifferenzierung wurde mittels BD Phoenix durchgeführt. Für die Resistenztestung wurde entweder ein Plättchentest (Agardiffusion) oder BD Phoenix (Mikrodilution) verwendet. Die Bestimmung der Resistenzgene *vanA*, *vanB* oder *vanC 1-3* erfolgte mittels PCR mit Blockcyclerverfahren.

Hierbei lässt sich festhalten, dass das Diagnostikverfahren der Speziesdifferenzierung für klinische Proben im Vergleich zu dem Verfahren für Screeningproben als deutlich spezifischer und zuverlässiger zu bewerten ist. So ist ein falsch-positives Ergebnis für die Enterokokkenspezies bei den Screeningproben möglich, da keine Reinkultur angelegt wurde, sondern die gesamte Probe in die Bouillon eingerührt wurde. Dabei ist es möglich, dass beispielsweise *Lactobacillus spp.* ein falsch-positives Ergebnis hervorrufen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Speziesdifferenzierung mit BD Phoenix und MALDI-TOF durchgeführt. Vergleicht man die Daten der Speziesdifferenzierungen der beiden Jahre 2008 und 2016, so lassen sich 19 Differenzen (17%) feststellen. Von diesen 19 Proben sind 16 Screeningproben, während nur drei davon klinische Proben sind. Des Weiteren wurde ein Isolat fälschlicherweise als *E. faecium* betitelt, obwohl es sich um *Lactobacillus spp.* handelte. Den anderen 18 Proben wurde lediglich eine andere Enterokokkenspezies festgestellt.

Dies unterstreicht die vorherige Aussage, dass die Speziesdifferenzierung mit der Bouillonuntersuchung und allein auf PCR-Basis nicht so zuverlässig ist wie mit BD Phoenix bei klinischen Isolaten. Insgesamt lässt sich aber zusammenfassen, dass lediglich bei einer Probe, also ca. 1%, eine andere Bakteriengattung fälschlicherweise diagnostiziert wurde. 99% der Proben wurde die korrekte Gattung zugeordnet, davon jedoch 16% der falschen Enterokokkenspezies.

Die Antibiotikaresistenztestung wurde in der Eingangsdiagnostik im Jahr 2008 mittels BD Phoenix ausschließlich bei den klinischen Proben durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden BD Phoenix und MALDI-TOF verwendet.

Für die Vancomycinresistenz zeigte sich von den 33 zu vergleichenden Proben eine Abweichung (3%). Die Ergebnisse für die Teicoplanin- und Linezolidresistenz stimmen jeweils überein.

Daraus lässt sich schließen, dass BD Phoenix und MALDI-TOF vergleichbare Ergebnisse liefern und sich gut für epidemiologische Untersuchungen wie in dieser Arbeit eignen.

Sowohl im Jahr 2008 als auch im Rahmen dieser Arbeit wurden die Resistenzgene *vanA* und *vanB* mit dem PCR-Verfahren ermittelt. Lediglich die Ergebnisse von drei Proben (3%) stimmen nicht überein.



Dieses Ergebnis zeigt, dass das PCR-Screeningverfahren auf *vanA/vanB* aus der Bouillon und der in dieser Arbeit angezüchteten VRE *E. faecium* Isolate eine hohe Übereinstimmung haben.

#### 4.3. Typisierungsmethode

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gilt als der Goldstandard für molekulare epidemiologische Untersuchungen bei nosokomialen Ausbrüchen. Diese Methode gilt als stabil, reproduzierbar und kosteneffektiv. Des Weiteren ist das Typisierungsverfahren PFGE sehr diskriminativ, wenngleich dies auch zu einer „Überdiskriminierung“ führen kann. Die Durchführung von PFGE erfordert viel Zeit und hoch qualifiziertes Personal. Als weiterer Nachteil ist der nur eingeschränkte standardisierbare Datenaustausch mit anderen Laboren zu nennen. [31, 36]

AFLP ist eine Typisierungsmethode, die schnell zu einem Ergebnis führt, aber Limitationen in der Reproduzierbarkeit und dem Datenaustausch zeigt. [26, 27]

*Multilocus sequence typing* (MLST) zählt als Standard für Datenaustausch. Diese Methode eignet sich zum Austausch zwischen Laboren, weil es Sequenz-basiert und damit sehr reproduzierbar ist. Die Ergebnisse können mit denen des Whole Genome Sequencing (WGS) abgeglichen und verglichen werden. Als Nachteil lässt sich anmerken, dass MLST weniger diskriminatorisch ist als PFGE und WGS. [31] Das RKI hat VRE-Isolate den jeweiligen MLST-Sequenztyp und Kerngenom MLST-Typ zugeordnet. Der Vergleich der Ergebnisse der beiden Methoden zeigt die höhere Auflösung der Kerngenom MLST-Typen. Werden ausschließlich MLST-Daten interpretiert, so besteht die Gefahr, Rückschlüsse auf eine scheinbare Verwandtschaft zu ziehen, die bei Betrachtung des gesamten Genoms jedoch ausgeschlossen werden kann. Dementsprechend muss ein gleicher MLST Sequenztyp nicht zwangsweise auf eine enge Verwandtschaft der Stämme und eine epidemiologische Relation zurückzuführen sein. [37]

*Multiple-locus variable-number tandem repeat* (MLVA) ist eine zuverlässige, reproduzierbare, kostengünstige und recht einfach durchführbare

Typisierungsmethode. Verglichen mit PFGE und MLST ist diese Methode weniger diskriminatorisch. Ebenso ist MLVA nicht für Ausbruchsituationen geeignet, da im Allgemeinen der exakte Stammtyp nicht identifiziert wird und demnach nicht verwandte Stammtypen als identische MLVA-Typen erscheinen, was zu einem falsch positiven Ergebnis führt. [36]

Whole Genome Sequencing (WGS) ist eine Typisierungsmethode, die als sehr diskriminatorisch und reproduzierbar gilt und einen Datenaustausch mit anderen Laboren ermöglicht. Die Vergleichbarkeit der Daten von WGS mit MLST-Ergebnissen ermöglicht somit auch einen Abgleich mit älteren MLST-Daten, wodurch zeitliche Entwicklungen analysiert werden können, als noch kein WGS möglich gewesen ist. WGS könnte in Zukunft als neuer Goldstandard für molekulare epidemiologische Typisierung von *E. faecium* fungieren. Nachteilig anzumerken sind jedoch die hohen Kosten für dieses Verfahren. [31]

Für diese Arbeit wurde als Typisierungsmethode das MLST-Verfahren ausgewählt.

#### **4.4. Alters- und Geschlechtsverteilung**

Für das Jahr 2008 wurden 64 Patienten mit positivem VRE *E. faecium* Nachweis identifiziert. 56 der 64 Patienten stammen aus dem UKR, die restlichen 8 Patienten aus umliegenden Krankenhäusern.

Bei der Betrachtung der Geschlechtsverteilung zeigt sich, dass tendenziell mehr männliche als weibliche Patienten einen positiven VRE *E. faecium* Nachweis aufzeigen. Die Alterskurve stellt einen stetigen Anstieg mit einem Höhepunkt bei den 70-79-jährigen Patienten dar. Das Durchschnittsalter aller Patienten liegt hierbei bei 55 Jahren, wobei das Durchschnittsalter der weiblichen Patienten um 8 Jahre weniger beträgt als das der männlichen Patienten.

Früh-/Neugeborene, ältere Patienten und sowohl Patienten mit einem Grundleiden und/oder einer Immunsuppression gelten als Risikopatienten für eine Infektion mit VRE. Der medizinische Fortschritt führt zu einer immer höher werdenden Lebenserwartung,

die im Alter oft mit Grunderkrankungen und/oder häufigen Krankenhausaufenthalten verbunden ist. Dementsprechend steigt dadurch auch die Zahl der Risikopatienten für VRE. [3] Diese Arbeit zeigt dieselben Ergebnisse, dass vermehrt ältere Patienten an VRE erkranken oder kolonisiert sind.

#### **4.5. Zeitliche Entwicklung**

In dieser Arbeit wurden Auffälligkeiten im Gesamtjahresverlauf die patientenbezogenen Isolate für jeden Monat analysiert. Um eine Verfälschung durch Mehrfachnennung eines Patienten auszuschließen, wird im Folgenden einzig auf den Jahresverlauf exklusive der Mehrfachisolate eingegangen.

Der Höhepunkt der positiven VRE *E. faecium* Nachweise befindet sich im März, dicht gefolgt von Januar und Juli.

Im Rahmen der Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene am UKR wurden und werden epidemiologische Daten der VRE *E. faecium* Fälle seit dem Jahr 2004 erhoben. Unter anderem wurde für das Jahr 2006 eine genaue Analyse der Häufung von VRE *E. faecium* Fällen im Jahresverlauf durchgeführt. Hier zeigen sich die meisten VRE *E. faecium* Fälle von April bis Juli. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit stellt Juli einen Monat mit einer höheren Anzahl an VRE *E. faecium* dar, während März und Januar hingegen keine Häufung aufweisen. [38]

Weitere Daten der AG von Prof. Wulf Schneider geben die Verteilung der VRE-Fälle am UKR der Jahre 2004 bis 2017 wieder. Die ersten Jahre 2004 bis 2006 wurden vereinzelte VRE-Fälle nachgewiesen. Daraufhin begann ein erster Anstieg, der seinen Höhepunkt 2008 erreichte. Der darauffolgende Abfall endete 2011 mit dem zweiten intensiveren Anstieg, der 2013 kulminierte. Bis zum Jahr 2016 folgte ein gradueller Abfall.

## Entwicklung der VRE-Fälle am UKR

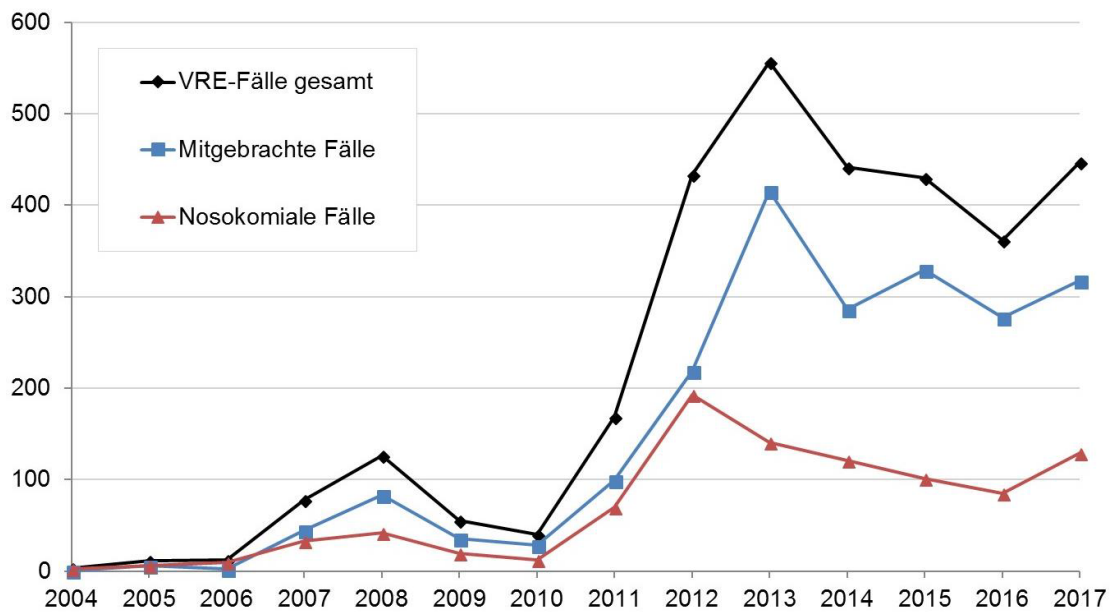


Abbildung 64: Verteilung der VRE-Fälle am UKR der Jahre 2004 bis 2017 (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKRs)

Insgesamt lässt sich am UKR ein deutlicher Anstieg der VRE-Fälle im Laufe der Jahre 2004-2017 feststellen. Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien, die die Entwicklung von VRE in Deutschland untersuchen. So zeigte die im Dreijahresrhythmus durchgeführte Resistenzstudie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (PEG-Resistenzstudie) ebenso einen Anstieg der Vancomycinresistenz bei *E. faecium* in den Jahren 1995 (3,8%) bis 2013 (16,6%). [3]

Die Antibiotika-Resistenz-Surveillance in Deutschland (ARS) zeigt für die Jahre 2008 bis 2014 einen ähnlichen Verlauf wie das UKR. So verzeichnet die Vancomycinresistenzhäufigkeit bei *E. faecium* nach einem relativ hohen Wert für 2008 zunächst einen Abfall. 2011 findet sich ein rasanter Anstieg, der seinen Höhepunkt 2012 erreicht. Bis 2014 folgte ein gradueller Abfall. [3]

Zusammenfassend zeigt sich sowohl regional am UKR als auch überregional in Deutschland ein steigender Trend an VRE *E. faecium*. Aufgrund der limitierten Therapieoptionen und eventuell weiterer neu akquirierter Resistenzen stellt VRE *E. faecium* eine große klinische und hygienische Herausforderung dar. Um diesem Trend entgegen wirken zu können, sind weitere Studien zur Epidemiologie von VRE *E. faecium* wichtig.

#### 4.6. Klinische Herkunft

VRE-Risikopatienten mit geschwächtem Immunsystem und meist längerem Krankenhausaufenthalt finden sich häufig auf Intensivstationen. So stammt ein Drittel der VRE *E. faecium* Isolate, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden waren, von den vier Intensivstationen des UKR. Die übrigen zwei Drittel verteilen sich auf die zehn Normalstationen des UKR. Daten des Robert-Koch-Instituts (RKI) zeigen eine ähnliche Verteilung von VRE auf Intensiv- und Normalstationen. [37, 39, 40]

Daten des Nationalen Referenzzentrums zeigen im zeitlichen Verlauf von 2008 bis 2015 eine fünffach erhöhte Prävalenz an VRE auf Intensivstationen. [41]

Die Analyse bezüglich der klinischen Disziplinen zeigt, dass 46% der VRE *E. faecium* Isolate des UKR der Inneren, 28% der Hämatologie/Onkologie und 26% der Chirurgie zugeordnet werden können. Der Vergleich mit den Daten des RKI zeigt ein ähnliches Vorkommen von VRE in der Chirurgie (26%), während die Innere Medizin (21%) und Hämatologie/Onkologie (6%) ein deutlich geringeres Vorkommen von VRE zeigen. Anzumerken ist hierbei jedoch, dass das RKI die klinischen Disziplinen detaillierter aufteilt, so werden z.B. Dialyse und Nephrologie als eigene Disziplin gewertet, wohingegen in dieser Arbeit diese zur Inneren Medizin gezählt werden. [39]

Die meisten VRE *E. faecium* Isolate dieser Arbeit wurden aus den klinischen Materialien Rektal-/Perianalabstrich (48%), Wundabstrich (15%) und Punktat (14%) isoliert. Die hohe Anzahl an Rektal-/Perianalabstrichen lässt sich dadurch erklären, dass die Hälfte aller Isolate von Screening-Untersuchungen stammen, bei denen zumeist ein solcher Abstrich gemacht wird. Insgesamt spiegelt sich diese Verteilung am UKR in den für die Jahre 2004 bis 2011 wider (unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider, Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie).

Daten des RKI zeigen ebenso, dass die VRE-Einsendungen zumeist aus Rektalabstrichen stammen. VRE-Isolate aus Wundabstrichen wurden gleichfalls relativ häufig untersucht. Auffallend ist, dass bei den Daten des RKI das zweithäufigste klinische Material Urinproben sind, diese in der vorliegenden Arbeit kaum eine Rolle spielen. Gegenteilig verhält es bei den VRE-Isolaten aus Punktaten. Während diese unter den Einsendungen

an das RKI kaum vorkommen, stellen Punktate das dritthäufigste Material in der vorliegenden Arbeit dar. [39, 40, 42]

#### **4.7. Antibiotikaresistenzen**

Die Therapieoptionen bei VRE sind äußerst begrenzt. Teicoplanin stellt bei *vanB*-VRE-Infektionen eine mögliche Variante der Therapie dar. Besteht hingegen eine Teicoplaninresistenz muss auf Reserveantibiotika wie Linezolid, Tigecyclin und Daptomycin zurückgegriffen werden. [43]

Generell, jedoch besonders für Reserveantibiotika, ist ein kontrollierter und verantwortungsvoller Einsatz von Antibiotika (*Antibiotic Stewardship*) geboten. Dieser Einsatz gelingt mithilfe des Nachweises einer bakteriellen Infektion, der Wahl des geeigneten Antibiotikums und die Erstellung eines optimierten Behandlungsplans bezüglich Dauer, Dosierung und Form der Antibiotikagabe. Ziel ist, eine Balance zwischen bestmöglicher individueller Therapie und gleichzeitiger Verhinderung von Selektionsprozessen, die zur Resistenzausbreitung führen. Erste Studien wurden bereits durchgeführt, die die Vermutung zulassen, dass ein unkontrollierter Antibiotikaeinsatz zu vermehrter Resistenzselektion führt. [44–46]

##### **4.7.1. Vancomycinresistenz**

Alle in dieser Arbeit untersuchten *E. faecium* Isolate sind Vancomycin-resistent. Die Keimidentifizierung und Antibiotikaresistenztestung wurden mittels MALDI-TOF und BD Phoenix durchgeführt. Zur Analyse der *van*-Genotypen diente eine Multiplex-PCR. Bei dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass 99% der untersuchten VRE *E. faecium* Isolate einen *vanB*-Genotyp und lediglich 1% einen *vanA*-Genotyp aufweisen.

In den Jahren vor 2003 wurden bei Untersuchungen des Robert-Koch-Instituts (RKI) überwiegend *vanA*-Resistenztypen und kaum *vanB*-Resistenztypen beschrieben. Ab 2009 kann eine annähernd gleiche relative Häufigkeit beider Resistenztypen beobachtet werden. 2016 beginnt ein erneuter Drift, dieses Mal jedoch zugunsten des *vanB*-Genotyps. Abbildung 65 stellt diese Entwicklung graphisch dar. [37, 39, 40, 42, 47, 48]

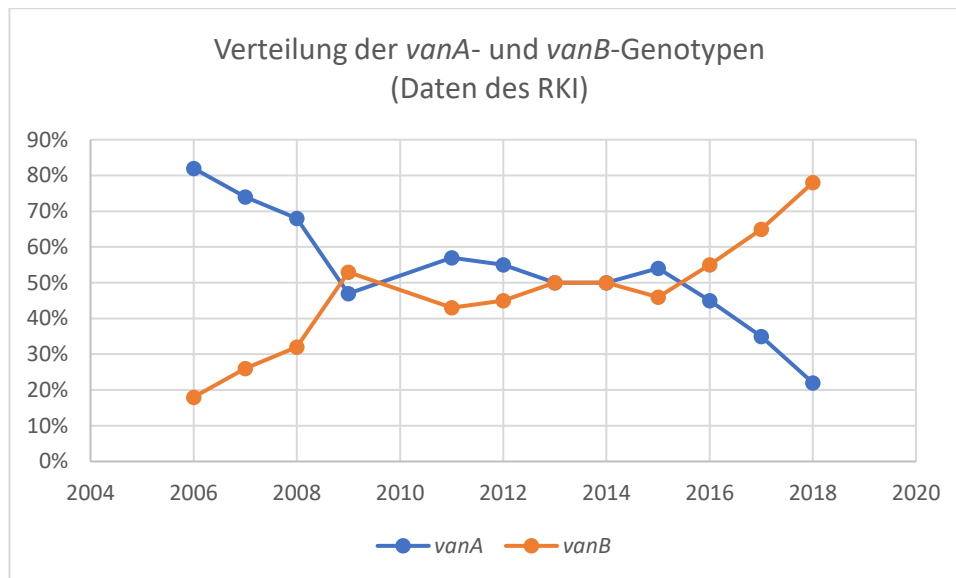


Abbildung 65: Prozentuale Verteilung der *vanA*-/*vanB*-Genotypen der VRE *E. faecium* Isolate der Einsendungen an das Robert-Koch-Institut (RKI) der Jahre 2006 bis 2009 und 2011 bis 2018 [37, 39, 40, 42, 47, 48]

Die VRE-Epidemiologie am UKR zeigte einen gegenläufigen Trend: 2004 bis 2010 trugen 96% der VRE *E. faecium* Isolate das *vanB*-Gen und ausschließlich 4% das *vanA*-Gen. Eine weitere Analyse der *van*-Genotypen im Zeitraum von April 2017 bis März 2018 zeigte 47% der VRE *E. faecium* Isolate mit einem *vanA*-Resistenztyp und 53% mit einem *vanB*-Resistenztyp. [43]

Für das Jahr 2005 wurde lediglich in einem weiteren Krankenhaus in Südwestdeutschland ein ähnlicher Trend festgestellt. So wiesen in dieser Studie 92,7% der VRE *E. faecium* Isolate einen *vanB*-Genotyp und 7,3% einen *vanA*-Genotyp auf. [49]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit untersuchten VRE *E. faecium* Isolate zu 99% einen *vanB*-Genotyp aufweisen, während zum gleichen Zeitpunkt in Deutschland Gegenteiliges, also überwiegend *vanA*-Genotypen (68%), vorzufinden ist. [42]

Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre eine klonale Ausbreitung der *vanB*-positiven *E. faecium* Stämme denkbar. Dagegen spricht jedoch das Auftreten mehrerer unterschiedlicher MLST-Typen, was demnach auf ein polyklonales Geschehen deutet. Daraus lässt sich folgern, dass neben dem vertikalen Gentransfer ebenso ein horizontaler Gentransfer des *vanB*-Genclusters unter den einzelnen *E. faecium* Stämmen stattgefunden haben könnte. Mehrere Studien berichten bereits von solchen

Entwicklungen. Hierbei verbreiten sich zunächst VSE *E. faecium* des CC17 (Clonal Complex 17) im Krankenhaus, die im Verlauf durch horizontalen Gentransfer eine Vancomycinresistenz erwerben. [49–52]

1997 wurde bei Woodford et al. eine Abwandlung des *van*-Genotyps während eines Ausbruchs beschrieben. Hierbei nahmen *vanB*-positive *E. faecium* Isolate das *vanA*-Gencluster auf und wechselten anschließend ihren *van*-Genotyp, indem sie das *vanB*-Gencluster verloren. Ein umgekehrtes Verhalten, also ein Genotypwechsel von *vanA* nach *vanB*, sollte als weitere mögliche Erklärung für das vermehrte Auftreten des *vanB*-Genotyps am UKR in Betracht gezogen werden. [49, 53]

Neben einer klonalen Verbreitung des *vanB*-Genclusters wäre eine *de novo* Aneignung denkbar. In Studien wurde bereits die Möglichkeit der *de novo* Aneignung von *vanB*-Tn1549 dokumentiert. Die Tn1549-Sequenz einige dieser VRE *E. faecium* Isolate erwies sich als identisch zu der Tn1549-Sequenz untersuchter *Clostridium spp.* Stämme aus dem Mikrobiom des Intestinaltraktes. Möglicherweise wurde eben diese Sequenz von *Clostridium spp.* auf *E. faecium* übertragen. [54, 55]

Eine definitive Aussage, welche das wahrscheinlichste Szenario für das Geschehen am UKR ist, ist ausschließlich nach weiteren Untersuchungen bezüglich der *van*-Gencluster möglich.

Typischerweise zeigen VRE *E. faecium* Isolate mit einem *vanA*-Genotyp mit einer MHK von 64-1000 µg/ml eine High-Level-Resistenz gegenüber Vancomycin, während beim *vanB*-Genotyp mit einer MHK von 4-1000 µg/ml auch Low-Level-Resistenzen und intermediäre Resistenzen gegenüber Vancomycin möglich sind. [4]

In dieser Arbeit werden *vanB*-Isolate ab einer MHK von 8 µg/ml, demnach ab einer intermediären Resistenz, als Vancomycin-resistent bewertet. In anderen Studien werden die untersuchten *vanB*-Isolate erst ab einer MHK von 16 µg/ml als Vancomycin-resistent eingestuft, so auch beispielweise in einer Studie von Werner et al. [50] Dadurch stellt sich die Frage, ob durch die hohe Schwelle der MHK *vanB*-positive Isolate nicht als solche erkannt werden und demnach falsch-negativ sind.

Eine Studie von Werner et al. zeigt die oben geschilderte Problematik ebenso auf. Als weiterer Kritikpunkt wird angemerkt, dass meist vor der Bestimmung des *van*-Genotyps eine Vorselektion mit Selektionsmedien stattfindet, wodurch einige *vanB*-Low-Level-Resistenztypen unerkannt bleiben. [56]



Dementsprechend ist hervorzuheben, dass eine Resistenzbewertung nicht nur anhand des Phänotyps, sondern auch anhand des Genotyps erfolgen sollte, damit keine *vanB*-positiven Isolate unentdeckt bleiben.

Als weiterer möglicher Erklärungsansatz für das im Gegensatz zum restlichen Deutschland Dominieren des *vanB*-Resistenztyps ist eine unbewusste Selektion *vanB*-positiver Stämme aufzuführen.

Während Vancomycin *vanA*- und *vanB*-positive Stämme selektiert, ist bei Teicoplanin eine Selektion *vanA*-positiver Stämme zu beobachten. Dies spiegelt sich auch im Vergleich der USA mit Europa wider: Im Gegensatz zu Europa wurde in den USA Teicoplanin nie eingeführt, demnach wird dort ausschließlich Vancomycin verwendet. VRE *E. faecium* Isolate US-amerikanischer Krankenhäuser zeigen folglich häufiger den *vanB*-Genotyp als VRE *E. faecium* Isolate europäischer Krankenhäuser. [18, 43]

Denkbar wäre es, dass ein Medikament die Selektion *vanB*-positiver Stämme provoziert, so wie Teicoplanin den *vanA*-Resistenztyp selektiert. Um abschließende konkrete Ergebnisse schlussfolgern zu können, sind genauere Analysen und Studien notwendig.

#### **4.7.2. Teicoplaninresistenz**

Eine Teicoplaninresistenz konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit bei 7,5% VRE *E. faecium* Isolate festgestellt werden.

Das einzige *vanA*-positive VRE *E. faecium* Isolat dieser Arbeit ist eines der Isolate mit einer Teicoplaninresistenz. Der *vanA*-Resistenztyp wird zusätzlich zur Vancomycinresistenz mit einer Teicoplaninresistenz assoziiert. Obwohl der *vanB*-Resistenztyp hauptsächlich mit einer Vancomycin-, nicht aber Teicoplaninresistenz in Verbindung gebracht wird, kann durch das *vanB*-Gen eine Teicoplaninresistenz verursacht werden. [4] Die übrigen vier VRE *E. faecium* Isolate dieser Arbeit mit Teicoplaninresistenz sind solche *vanB*-Resistenztypen.

In den Jahren 2004-2006 zeigten 8,7% der untersuchten VRE *E. faecium* Isolate am UKR eine Teicoplaninresistenz. Dadurch dass es sich hierbei jedoch um eine Untersuchung über einen Zeitraum von drei Jahren handelt, ist eine Aussage über die genaue Verteilung über diesen dreijährigen Zeitraum und demnach ein akkurater Vergleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit von 2008 nicht möglich. Unter der Annahme, dass

die Hälfte der Isolate mit der Teicoplaninresistenz aus dem Jahr mit den meisten Isolaten stammen (2006; n = 31), wären 3,2% der Isolate dieses ausgewählten Jahres resistent gegenüber Teicoplanin. Demnach hätte in den Jahren bis 2008 eine Zunahme der Teicoplaninresistenz um fast die Hälfte stattgefunden. [38]

Die von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. durchgeführte Resistenzstudie (PEG-Resistenzstudie) verzeichnet ebenso wie die vorliegende Arbeit einen Anstieg der Teicoplaninresistenz für VRE *E. faecium* (2010: 5,0%; 2013: 7,5%). [3] VRE *E. faecium* Einsendungen an das Robert-Koch-Institut (RKI) in den Jahren 2008-2009 und 2011-2012 zeigen für den *vanA*-Resistenztyp bei 100% der VRE *E. faecium* Isolate eine Teicoplaninresistenz und für den *VanB*-Resistenztyp der VRE *E. faecium* Isolate bei 0,0% eine Teicoplaninresistenz. [39, 42] Ein leichter Anstieg der Teicoplaninresistenz beim *vanB*-Resistenztyp ist in den Jahren 2013 (0,2%), 2014 (1,5%), 2015 (1,2%) und 2016 (0,5%) zu beobachten. [37, 40] Im Vergleich dazu scheint die Rate der *vanB*-positiven VRE *E. faecium* Isolate mit Teicoplaninresistenz dieser Arbeit mit 7,5% relativ hoch zu sein.

Obwohl Teicoplanin prinzipiell eine Therapieoption bei sensibel getesteten VRE-Isolaten des *vanB*-Resistenztyps darstellt und auch bereits als solche angewandt wird (z.B. am Universitätsklinikum Münster), muss der Einsatz von Teicoplanin kritisch betrachtet werden. Es wird ein Selektionsdruck befürchtet, der die Entstehung Teicoplaninresistenter Mutationen begünstigt. Insgesamt kann das Risiko schwer abgeschätzt werden, weshalb für eine fundierte Beurteilung des Einsatzes von Teicoplanin bei *vanB*-VRE-Infektionen weitere Untersuchungen und Daten benötigt werden. [43]

Ob die recht hohe Rate an *vanB*-positiven VRE *E. faecium* Isolaten mit Teicoplaninresistenz dieser Arbeit aus einem erhöhten Selektionsdruck durch den Einsatz von Teicoplanin resultierte, ließe sich lediglich mit detaillierten Untersuchungen der genetischen Struktur dieser Isolate und des medizinischen Hintergrunds der Patienten genauer bestimmen. Von äußerster Relevanz sind die weitere Beobachtung der Entwicklung dieses Trends und die eventuell daraus nötigen Maßnahmen, die mit dem weiteren Umgang von *vanB*-VRE getroffen werden müssen.

Im Hinblick auf das Vorkommen von *vanB*-VRE mit Teicoplaninresistenz bezüglich der Stationsart und der Station zeigt sich, dass drei der fünf Isolate von Patienten aus

Normalstationen stammen und zwei aus Intensivstationen. Station 92 (Intensivstation) weist zwei Patienten mit einem *vanB*-positiven VRE *E. faecium* Isolat mit Teicoplaninresistenz auf, die mit einem Monat Abstand dort stationär waren. Ebenso fanden sich auf Station 15 (Normalstation) im zeitlichen Abstand von zwei Monaten zwei Patienten mit *vanB*-VRE. Alle Isolate der vier Patienten zeigen jedoch einen unterschiedlichen MLST-Sequenztyp (ST 17, ST 192, ST 202, ST 203).

Durch eine Mutation eines Genabschnitts des *vanB*-Genclusters ist auch beim *vanB*-Resistenztyp eine Teicoplaninresistenz möglich. [7] Aufgrund der unterschiedlichen MLST-Sequenztypen lässt sich vermuten, dass es sich hierbei nicht um eine monoklonale Ausbreitung der Teicoplaninresistenz handelt. Denkbar wäre ein konjugativer Gentransfer des mutierten *vanB*-Genclusters mit akquirierter Teicoplaninresistenz.

#### **4.7.3. Linezolidresistenz**

Für eines (1,5%; ohne Mehrfachisolate) der in dieser Arbeit untersuchten VRE *E. faecium* Isolate wurde eine Linezolidresistenz festgestellt. Dieses ist vom *vanB*-Resistenztyp, *hyl*-positiv und zeigt vier *espA*-Repeats. Es konnte dem MLST-Sequenztyp ST 186 zugeordnet werden, der in dieser Arbeit lediglich ein einziges Mal vorkommt.

2004-2006 konnten am UKR zwei VRE *E. faecium* Isolate des ST 186 identifiziert werden. Diese waren ebenso *vanB*-positiv, *hyl*-positiv und zeigten vier *espA*-Repeats. Jedoch wiesen sie keine Linezolidresistenz auf. Generell wurde keinem VRE *E. faecium* Isolat der Jahre 2004-2006 eine Linezolidresistenz nachgewiesen. [38]

Im Vergleich mit den Daten des RKI der Jahre 2008/2009 zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung. So weisen lediglich 0,3% der *vanA*-positiven VRE *E. faecium* Isolate eine Linezolidresistenz auf, während alle *vanB*-positiven VRE *E. faecium* Isolate Linezolid-sensibel sind. [42]

In den Jahren 2010-2018 zeigen die Daten des Nationalen Referenzzentrums jedoch einen ansteigenden Trend der Linezolidresistenzrate (2010: 3,0%; 2018: 10,4%) bei den *E. faecium* Isolaten. [47]

Ebenso wie beim Einsatz von Teicoplanin ist vor allem bei langfristiger Gabe die Entstehung von Resistenzen möglich. [43] Womöglich entstand die Linezolidresistenz in dem in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen VRE *E. faecium* durch einen solchen

Selektionsdruck unter Linezolidgabe. Eine endgültige Aussage ist ohne weitere Daten und Untersuchungen nicht möglich.

#### **4.8. Bedeutung des *esp*-Gens und des *hyl*-Gens in VRE *E. faecium***

VRE *E. faecium* Stämme des Clonal Complex 17 (CC17) sind eine epidemisch auftretende genetische Linie mit einer Ampicillin- und Quinolonresistenz. Die Krankenhaus-adaptierten Erreger sind häufig mit Virulenzfaktoren versehen, zu denen das *esp*-Gen und *hyl*-Gen zählen. [4, 21, 22] Das Vorliegen dieser Virulenzfaktoren wird häufig mit Krankenhaus-adaptierten Stämmen und nosokomialen Infektionen assoziiert. [8, 15, 16, 19]

##### **4.8.1. Vorliegen des *esp*-Gens**

Das chromosomal lokalisierte *esp*-Gen codiert das Enterococcal Surface Protein (Esp), das sowohl bei VRE *E. faecium* und VSE *E. faecium* nachgewiesen wurde. Esp ermöglicht die Bildung von Biofilm auf abiotischen Oberflächen und erhöht die Pathogenität bei experimenteller Endokarditis und Harnwegsinfektion. Assoziiert wird das *esp*-Gen mit nosokomialen Infektionen und VRE-Ausbruchssituationen in Krankenhäusern. [8, 15, 16] Leavis et al. zeigten in einer Studie, dass 94% der VRE-Isolate, von denen man einen Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen vermutete, *esp*-positiv waren. Außerdem waren ebenso 40% der klinischen VRE- und 57% der klinischen VSE-Isolate *esp*-positiv, während nur bei  $\leq 6\%$  der VRE bzw. VSE Surveillance-Isolate das *esp*-Gen nachgewiesen wurde. [16] Demnach scheint ein Zusammenhang zwischen dem *esp*-Gen und dem Vorkommen sowohl nosokomialer Ausbrüche als auch Isolate klinischen Ursprungs zu existieren.

Eine weite Verbreitung des *esp*-Gens unter Hospital-assoziierten Stämmen konnte auch in einer Studie von Klare et al. nachgewiesen werden. [18]

Ebenso ist anzumerken, dass der Besitz des *esp*-Gens als wichtiges Charakteristikum des Clonal Complex 17 (CC17) gilt. [4, 16, 22, 37] Somit spricht ein positiver Nachweis des *esp*-Gens dafür, dass es sich um einen Hospital-assoziierten Stamm des CC17 handelt,

wohingegen ein negativer Nachweis nicht darauf schließen lässt, dass es sich nicht um einen Hospital-assoziierten Stamm des CC17 handelt. [57]

Lediglich bei einem der in dieser Arbeit untersuchten VRE *E. faecium* Isolate, das nicht aus dem UKR stammt, konnte das *esp*-Gen nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es sich bei den VRE *E. faecium* Isolaten des UKR des Jahres 2008 um Krankenhaus-assoziierte Stämme des CC17 handelt.

Daten des RKI zeigen für das Jahr 2008, dass 60,6% der VRE *E. faecium* Isolate mit *vanA*-Resistenztyp und 95,8% der VRE *E. faecium*-Isolate mit *vanB*-Resistenztyp *esp*-positiv waren. [42] Vergleicht man die Rate der *esp*- und *vanB*-positiven VRE *E. faecium* Isolate des RKI mit denen des UKR, so fällt eine ähnlich hohe, am UKR jedoch tendenziell höhere, Zahl auf. Ein Vergleich der *esp*- und *vanA*-positiven VRE *E. faecium* Isolate ist aufgrund der geringen Anzahl (n = 1) der *vanA*-positiven VRE *E. faecium* Isolate dieser Arbeit nicht sinnvoll.

Das *esp*-Gen ist Teil einer Pathogenitätsinsel mit repetitiven Genelementen. Die Regionen A, B und C zeigen jeweils eine variable Anzahl dieser Repeats. [15] Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Repeats der Region A analysiert.

Alle *esp*-positiven VRE *E. faecium* Isolate dieser Arbeit zeigen vier Repeats. Unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider zeigen, dass in den Jahren 2004-2010 annähernd alle VRE *E. faecium* Isolate *esp*-positiv mit vier Repeats (wenige Ausnahmen mit fünf, sechs bzw. zehn Repeats) waren.

Eine Studie von Eaton et al. zeigte bei der Untersuchung der A-Region ebenfalls vorwiegend vier und fünf Repeats. [58]

Die Häufung identischer Repeat-Anzahlen lässt eine Beziehung der entsprechenden Isolate vermuten. Denkbar wäre ein horizontaler Gentransfer per Konjugation des *esp*-Gens zwischen den einzelnen Sequenztypen, wie von Oancea et al. in vitro beschrieben wurde. [59]

#### 4.8.2. Vorliegen des *hyl*-Gens

Lokalisiert auf einem übertragbaren Megaplasmid wurde Hyl ursprünglich eine Ähnlichkeit mit Hyaluronidase zugeschrieben, die in anderen gram-positiven Bakterien als Virulenzfaktor beschrieben worden war. Jedoch konnte bei *E. faecium* eine Hyaluronidase-Aktivität nie festgestellt werden. Obwohl die genaue Funktionsweise als Virulenzfaktor nicht definiert werden konnte, wurde dem *hyl*-Gen eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktor zugeschrieben. Trotzdem besteht weiterhin die Relevanz bei klinischen Isolaten und Krankenhaus-adaptierten Stämmen. [19, 20]

2003 beschrieben Klare et al., dass bei etwas mehr als der Hälfte (10 von 19) der untersuchten VRE *E. faecium* Patienten deutscher Krankenhäuser das *hyl*-Gen nachgewiesen wurde. [18]

Das RKI untersuchte eingesendete *E. faecium* Isolate für das Jahr 2008 auf das Vorhandensein des *hyl*-Gens. Zusätzlich zu den VRE Isolaten wurden auch VSE *E. faecium* Isolate miteingeschlossen, von denen im Jahr 2008 sogar 83,3% *hyl*-positiv waren. [42] 51,7% der VRE *E. faecium* Isolate des *vanA*-Resistenztyps und 75,8% der VRE *E. faecium* Isolate des *vanB*-Resistenztyps konnten als *hyl*-positiv deklariert werden. [42]

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt mit 84,5% ein sogar noch höheres Vorkommen des *hyl*-Gens unter VRE *E. faecium* Isolaten des *vanB*-Resistenztyps am UKR. Aufgrund dessen, dass in dieser Arbeit ausschließlich ein *vanA*-Isolat detektiert wurde, ist ein Vergleich der Daten des *vanA*-Resistenztyps nicht sinnvoll.

Diese Daten zeigen die Relevanz des *hyl*-Gens in Hospital-adaptierten VRE *E. faecium* Stämmen (sowohl VRE als auch VSE). Der Besitz des *hyl*-Gens spricht dafür, dass es sich hierbei um Stämme des Clonal Complex 17 (CC17) handelt, und, dass dadurch möglicherweise die Ausbreitung dieser Stämme begünstigt wird.

Bei der Analyse der *hyl*-negativen VRE *E. faecium* Isolate ist auffallend, dass alle Isolate mit ST 203 dieselben genetischen Merkmale aufzeigen, nämlich den *vanB*-Resistenztyp, vier *espA*-Repeats, *hyl*-negativ und ST 203. Ein identisches Ergebnis zeigen die Untersuchungen der VRE *E. faecium* Isolate am UKR in den Jahren 2004 bis 2006. [38]

In dieser Arbeit konnte kein zeitlicher Zusammenhang dieser *hyl*-negativer ST 203 Isolate festgestellt werden, die Probenentnahmen wurden mit einer minimalen

Differenz von einem Monat durchgeführt. Zwei der vier Isolate konnten Patienten der Station 10 zugeordnet werden, jedoch mit einem zeitlichen Abstand von drei Monaten. Um eine detaillierte und fundierte Aussage über das Vorkommen dieser Isolate und den Zusammenhang des MLST Sequenztyp 203 mit dem *hyl*-Gen treffen zu können, sind weitere Studien diesbezüglich erforderlich.

#### **4.8.3. Vorliegen sowohl des *esp*- als auch des *hyl*-Gens**

Das Vorliegen der Gene *esp* und *hyl* scheint zu einer erhöhten Pathogenität zu führen und gilt als Charakteristikum des Clonal Complex 17 (CC17).

Rice et al. zeigten, dass beide Gene vorrangig bei VRE *E. faecium* Isolaten klinischen Ursprungs nachgewiesen werden konnten. Demnach wurde sowohl *esp* als auch *hyl* eine Rolle bei der nosokomialen Ausbreitung bestimmter VRE *E. faecium* Isolate zugeschrieben. [60]

In einer Studie von Werner et al. wurden für den Zeitraum 2004 bis 2006 VRE *E. faecium* Isolate deutsche Krankenhäuser auf das Vorhandensein von *esp* und *hyl* untersucht. Beide Gene wurden lediglich bei 16% der Isolate nachgewiesen, während einzeln jedoch *esp* bei 51% und *hyl* bei 24% der Isolate dokumentiert wurden. Der Anteil der Isolate, die weder *esp*- noch *hyl*-positiv waren, lag bei etwa 10%. [50]

Das RKI führte für das Jahr 2008 Untersuchungen an eingesendeten VRE *E. faecium* Isolaten durch, unter anderem auch für das Vorliegen des *esp*- und *hyl*-Gens. Hierbei konnte gezeigt werden, dass 74,7% der VRE *E. faecium* Isolate des VanB-Resistenztyps beide Gene exprimierten. Bei lediglich 31,5% der Isolate des *vanA*-Resistenztyps wurden ebenso sowohl *esp* als auch *hyl* nachgewiesen. [42]

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass 85% der VRE *E. faecium* Isolate sowohl *esp* als auch *hyl* besitzen. Die übrigen 15% der VRE *E. faecium* Isolate zeigen jedoch zumindest eines der beiden Gene, 10% dieser Isolate sind *hyl*-positiv und *esp*-negativ und 90% dieser Isolate sind *esp*-positiv und *hyl*-negativ. Im Vergleich mit den oben aufgeführten Daten des RKI des Jahres 2008 kann eine ebenso hohe Anzahl an VRE *E. faecium* Isolaten des *vanB*-Resistenztyps mit beiden Genen festgestellt werden. Aufgrund der geringen Anzahl an *vanA*-Isolaten in dieser Arbeit kann keine aussagekräftige Schlussfolgerung für den *vanA*-Resistenztyp getroffen werden.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Gene *esp* und *hyl* bei den meisten VRE *E. faecium* Isolaten sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Studien nachgewiesen werden können. Dies deutet darauf hin, dass es sich um VRE *E. faecium* Isolate nosokomialen Ursprungs handelt.

#### **4.9. Epidemiologische Verteilung der MLST-Sequenztypen**

Insgesamt wurden für das Jahr 2008 im UKR und den umliegenden Krankenhäusern neun verschiedene MLST-Sequenztypen identifiziert. Dabei wurde eine Häufung von ST 17 (28%) und ST 192 (46%) ersichtlich. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ein polyklonales Geschehen mit klonaler Ausbreitung von ST 17 und ST 192 vorliegt.

Die Isolate der externen Krankenhäuser zeigen zu 60% ST 192 und 20% ST 17. Ein MLST-Sequenztyp (ST 378) wurde ausschließlich hier nachgewiesen. Ein ähnliches Verteilungsmuster zeigt sich im UKR: 50% der VRE *E. faecium* Isolate konnten ST 192 und 26% konnten ST 17 zugeordnet werden. Fünf MLST-Sequenztypen (ST 78, ST 117, ST 186, ST 203, ST 780) wurden einzig im UKR und keinem externen Krankenhaus nachgewiesen.

Unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider zeigen die Häufung der einzelnen MLST Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate im zeitlichen Verlauf der Jahre 2004 bis 2011 am UKR. In den Jahren 2004 bis 2006 wurde überwiegend ST 208 nachgewiesen, der nach diesem Zeitraum komplett verschwand. ST 17 und ST 192 zeigen 2007 und 2008 einen sprunghaften Anstieg mit Höhepunkt im Jahr 2008. Die darauffolgenden Jahre ist bei diesen beiden Sequenztypen ein Rückgang zu beobachten. Auffällig für das Jahr 2008 ist, dass der dritthäufigste Sequenztyp (ST 202) vor und nach 2008 nicht mehr nachgewiesen wurde. 2009 stellen ST 17 und ST 192 immer noch die häufigsten Sequenztypen dar, wobei jedoch ST 117, der erstmals 2008 nachgewiesen wurde, im Vergleich zum Vorjahr häufiger vorzufinden war. 2010 verzeichnet einen weiteren Rückgang der einst dominanten Sequenztypen ST 17 und ST 192. 2011 kann eine rapide Zunahme an Isolaten mit ST 117 und ST 203 beobachtet werden. Gleichzeitig findet sich gehäuft ST 737, der 2011 zuerst nachgewiesen wurde.

Diese Ergebnisse zeigen eine dynamische Entwicklung der Häufung einzelner MLST-Sequenztypen. Grundlage dafür ist vermutlich die klonale Ausbreitung der jeweiligen



dominanten Sequenztypen. Ursache dieser VRE-Ausbrüche können Übertragungen innerhalb des Krankenhauses als nosokomiale Infektionen oder Einschleppung durch externe Patienten sein. Um dies abschließend zu klären, sind weitere Studien zur Abklärung der zeitlichen und örtlichen Zusammenhänge der Krankenhausaufenthalte der VRE-Patienten notwendig.

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

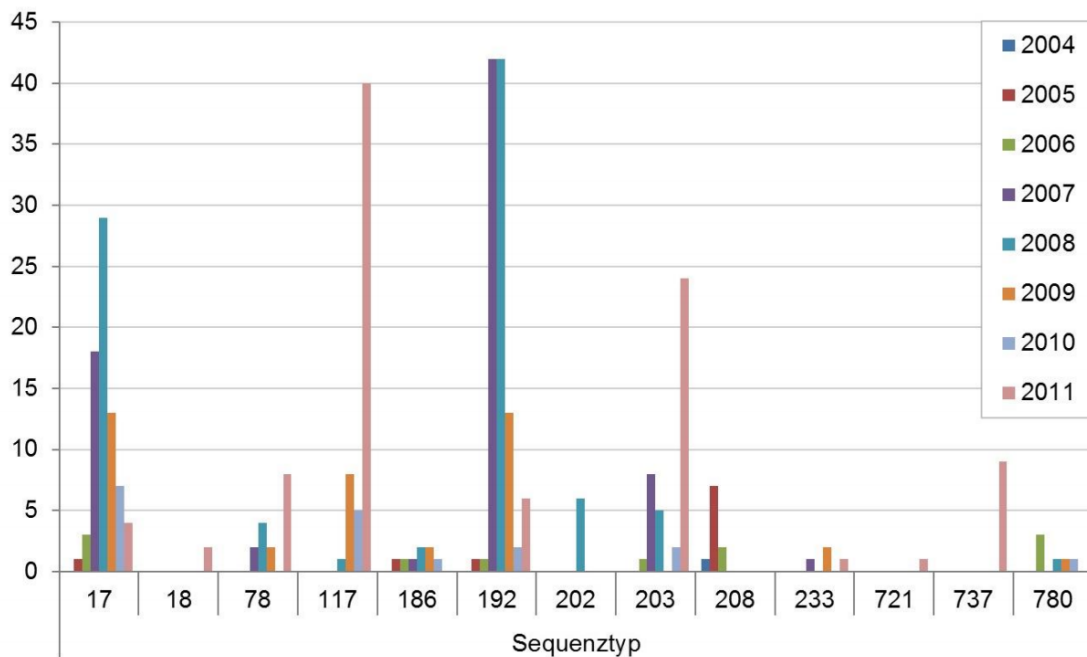


Abbildung 66: Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Jahre 2004 bis 2011 am UKR (unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene am UKR)

Daten des RKI zeigen, dass in den Jahren 2011 bis 2014 ST 117, ST 203, ST 192 und ST 17 zu den häufigsten MLST-Sequenztypen der dort eingesandten VRE *E. faecium* Isolate zählen. Wie auch 2011 am UKR sind ST 117 und ST 203 die beiden dominierenden Sequenztypen. Auffallend an den Daten des RKI ist, dass unter den *vanB*-Isolaten ST 192 am häufigsten vertreten ist. [40]

Eine Häufung von *vanB*-positiven VRE *E. faecium* Isolaten des MLST-Sequenztyp 192 beschrieben ebenso Werner et al. für ein südwestdeutsches Krankenhaus in den Jahren 2008 bis 2009. In dieser Studie wurde über eine Ausbruchssituation im Zusammenhang mit diesen *vanB*-positiven Stämmen des ST 192 berichtet. Nachweise des *hyl*- und *esp*-Gens für diese Isolate waren positiv. [56] Somit weisen die nachgewiesenen Stämme des

ST 192 dieselben genetischen Merkmale auf wie 90% der in dieser Arbeit untersuchten VRE *E. faecium* Isolate mit ST 192.

Zusammenfassend zeigt sich ein Trend von ST 192 und ST 17 für die 2007 bis 2009 am UKR. Ein gesteigertes Vorkommen von ST 192 des *vanB*-Resistenztyps in diesem Zeitraum wurde auch in Studien für Deutschland beschrieben. [56] Ab 2011 kann sowohl am UKR als auch deutschlandweit ein Switch zugunsten ST 117 und ST 203 beobachtet werden. [40] In den Folgejahren gewinnt ST 80, der in den Auswertungen des RKI 2015 zuerst beschrieben wurde, kontinuierlich an Bedeutung. [47]

Aufgrund der Dynamik des Vorkommens der verschiedenen MLST-Sequenztypen sind Durchführungen epidemiologischer Studien und Typisierungen von VRE *E. faecium* von großer Bedeutung zuzuschreiben, um frühzeitig etwaige Trends (z.B. Verbreitung neuer Stammvarianten) zu erkennen und dementsprechend handeln zu können.

#### **4.9.1. Mehrfachisolate**

Von insgesamt 18 Patienten liegen Mehrfachisolate vor, von denen sich bei fünf Patienten die MLST-Sequenztypen dieser Mehrfachisolate unterscheiden. Die molekulare Analyse zeigte Unterschiede im Resistenztyp und MLST-Sequenztyp, jedoch keine bezüglich der *espA*-Repeats (vier) und des *hyl*-Nachweises (positiv).

Von Patient 1 liegen zwei VRE *E. faecium* Isolate vor. Beide wurden als klinische Proben (Wundabstrich) im Abstand von einer Woche am UKR auf Station 10 (Med I) entnommen. Das erste Isolat ist *vanA*-positiv gehört zu ST 117, während das zweite Isolat als *vanB*-positiver ST 17 nachgewiesen wurde. Aufgrund der Unterschiede sowohl im Resistenztyp als auch im MLST-Sequenztyp kann davon ausgegangen werden, dass es sich um zwei verschiedene *E. faecium* Stämme handelt. Möglich wäre, dass zur Zeit der Aufnahme des Patienten bereits eine VRE-Infektion mit beiden Stämmen vorlag oder, dass die Infektion mit dem zweiten Stamm nach der ersten Probenentnahme als eventuelle nosokomiale Infektion oder Übertragung erfolgte.

Alle Isolate der vier weiteren Patienten gehören zum *vanB*-Resistenztyp, sodass sie sich lediglich in den MLST-Sequenztypen unterscheiden.

Die beiden Isolate von Patient 2 (UKR, Chirurgie, Station 90) wurden aus einer klinischen Probe (Punktat der Galle) und einer Screeningprobe (Rektal-/Perianalabstrich) im zeitlichen Abstand von einem Monat isoliert und als ST 202 und ST 17 identifiziert. Möglicherweise fand hier ein horizontaler Gentransfer des *vanB*-Clusters des ersten Stammes (ST 202) auf einen VSE *E. faecium* statt, der bei der zweiten Probe als zweiter VRE-Stamm mit ST 17 identifiziert wurde. Um diese Hypothese abzuklären, sind weitere Untersuchungen, beispielsweise der Vergleich des genetischen Aufbaus der beiden *vanB*-Gencluster, notwendig. Eine weitere Erklärung könnte die Rekombination von ST 17 zu ST 192 darstellen. Hierbei hätte die Rekombination lediglich an einem MLST-Locus stattfinden müssen (*pstS* 1 zu 7). Eine weitere Möglichkeit stellt das gleichzeitige Vorliegen beider Stämme dar. So könnte der Patient vor der ersten Probenentnahme bereits mit beiden Stämmen infiziert gewesen sein oder es könnte anschließend zu der zweiten möglicherweise nosokomialen Infektion mit dem MLST-Sequenztyp 192 gekommen sein.

Patient 3 konnten drei bzw. vier VRE *E. faecium* Isolate zugeordnet werden. Das erste Isolat (UKR, Med I, Station 20, klinische Probe, Sputum) gehört zum MLST-Sequenztyp ST 17. Bei der zweiten Probe (UKR, Med I, Station 20, Screening, Rektal-/Perianalabstrich) liegt eine Besonderheit vor: Beim Bebrüten der Columbia-Blutplatte konnte nicht eindeutig eine Koloniemorphologie abgegrenzt werden, weshalb zwei Kolonien getrennt weiteruntersucht wurden. Diese wurden als *vanB*-positive VRE *E. faecium* identifiziert, die sich lediglich in ihrem MLST-Sequenztyp (ST 17 und ST 192) unterscheiden. Das dritte Isolat (BZK Regensburg, Screening, Rektal-/Perianalabstrich) gehört zum MLST-Sequenztyp ST 192. Die zeitlichen Abstände der Probenentnahmen betragen zwei Monate und eine Woche.

Als mögliche Erklärungen sind, wie oben bereits aufgeführt, entweder der horizontale Gentransfer des *vanB*-Genclusters auf einen VSE-Stamm oder das Vorliegen beider Stämme (entweder zeitlich versetzt oder gleichzeitig) aufzuführen. Die Rekombination zu einem anderen MLST-Sequenztyp wäre hier zwar auch denkbar, jedoch hätte diese an zwei MLST-Loci (*atpA* 1 zu 15 und *pstS* 1 zu 7) stattfinden müssen.

Von Patient 4 liegen zwei VRE *E. faecium* Isolate mit einem zeitlichen Abstand der Probenentnahme von neun Monaten vor. Das erste Isolat wurde von einer Screeningprobe (Stuhlprobe) aus dem UKR (Med II, Station 17) isoliert. Die molekulare Untersuchung zeigt den MLST-Sequenztyp 192. Das zweite Isolat (UKR, Med II, Station 16, klinische Probe, Wundabstrich) hingegen gehört zum ST 202.

Als mögliche Erklärungen sind auch bei diesem Patienten der horizontale Gentransfer des *vanB*-Genclusters auf einen VSE-Stamm, die Rekombination zu einem anderen MLST Sequenztyp (*atpA* 15 zu 1) und das Vorliegen beider Stämme (entweder zeitlich versetzt oder gleichzeitig) aufzuführen.

Von Patient 5 wurden beide Proben als klinische Proben (Wundabstrich) am selben Tag im UKR (Chirurgie, Station 90) entnommen. Die Isolate gehören zu den MLST Sequenztypen 192 und 202.

Dadurch, dass beide Isolate vom selben Tag stammen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um zwei VRE-Stämme handelt, die als simultane Kolonisierung vorliegen.

#### **4.10. Präventionsmaßnahmen**

Um eine Ausbreitung von vor allem nosokomialen VRE-Infektionen zu verhindern, gibt es eine Reihe an Empfehlungen von Präventionsmaßnahmen. Diese werden unter anderem von der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim RKI veröffentlicht (2018). Zur Umsetzung effektiver Präventionsmaßnahmen ist es zwingend notwendig, Infektionen durch Enterokokken zu erkennen, erfassen und zu bewerten. Eine gute Surveillance setzt sich zusammen aus der Zusammenarbeit von Klinikern, Krankenhaushygienikern und Mikrobiologen zum Erstellen eines Protokolls der Enterokokkendiagnostik, dem Erkennen von Risikopatienten und Patientengruppen mit therapiebedürftiger *E. faecium* Infektion und der ständigen Kontrolle und gegebenenfalls Anpassung der Basishygiene und des *Antibiotic Stewardship*. [30]

Einer der wichtigsten Risikofaktoren für eine Infektion stellt die VRE-Kolonisation dar. Dementsprechend wichtig ist es, kolonisierte Patienten zu erkennen und eine

Übertragung ausgehend von diesen Patienten zu verhindern. Hierbei empfiehlt die KRINKO, Patientengruppen bezüglich des Risikos, eine VRE-Infektion zu erleiden, aufzuteilen und die Basishygiene (v.a. Händehygiene) konsequent durchzuführen. Zusätzlich zur Basishygiene können das Tragen von Einmalhandschuhen und Schutzkitteln der VRE-Übertragung vorbeugen. [30]

Maßnahmen, die über die Basishygiene hinaus gehen, werden beim Auftreten einer antibiotisch-therapiebedürftigen VRE-Infektion durchgeführt. Zu diesen Maßnahmen zählen Screeninguntersuchungen (Rektalabstrich oder Stuhlprobe; Fokus auf Risikopatienten), Isolierungen von VRE-Trägern (Einzelzimmer mit eigener Nasszelle; Verwenden von Handschuhen und Schutzkittel), antiseptisches Waschen, Einbeziehung (Schulung) des Patienten in die Hygienemaßnahmen und intensivierete Reinigung und Desinfektion der Umgebung. Grundlage der erfolgreichen Umsetzung solcher Maßnahmen stellt die Schulung des Personals dar. [30]

Im August 2018 wurde eine Studie von Pidot et al. vorgelegt, die die Hypothese aufstellt, dass eine Assoziation der Entwicklung von VRE mit erhöhter Alkoholtoleranz mit der Verwendung alkoholbasierter Händedesinfektionsmittel vorliegt. [61] Eine Stellungnahme des RKI im Epidemiologischen Bulletin Nr. 38 im September 2018 sieht nach hinreichender Prüfung dieser Studie keine Notwendigkeit des Zweifels an der Wirksamkeit geprüfter Händedesinfektionsmittel, sofern sie korrekt angewendet werden. [62]

Das VRE-Protokoll am UKR setzt sich unter anderem aus verschiedenen Hygienevorschriften, Screeningmaßnahmen und molekularepidemiologischer Untersuchungen und Typisierung der VRE Isolate zusammen. Die molekularepidemiologischen Untersuchungen, zu denen auch die vorliegende Arbeit gehört, stellen den Grundbaustein für die Kenntnisse über die Ausbreitung einzelner VRE Stämme dar. Dieses Wissen ermöglicht die Verbesserung und Ausarbeitung der Präventionsmaßnahmen, die eine Verringerung der Anzahl der VRE-Infektionen und VRE-Übertragungen zur Folge haben sollen.

#### 4.11. Ausblick

Die steigende Anzahl an Fällen mit VRE-Infektionen und -Kolonisierungen zeigen, dass sowohl in der Gegenwart als auch in der Zukunft Vancomycin-resistente Enterokokken eine große Bedeutung bei nosokomialen Infektionen haben und haben werden.

Eingeschränkte Therapieoptionen durch vermehrte Antibiotikaresistenzselektion und -entstehung, auch gegen Reserveantibiotika wie Linezolid, Tigecyclin und Daptomycin, stellen eine Problematik dar, mit derer in Zukunft sicher gerechnet werden muss. Eine weitere Thematik, die zukünftig befürchtet wird, ist die speziesartübergreifende Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen. Bereits 1992 wurde in einer Studie eine in-vitro Übertragung der Vancomycinresistenz von Enterokokken auf Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolate nachgewiesen. [63] Auch eine in-vivo Übertragung wurde bereits vereinzelt nachgewiesen. [64–66] Daten des RKI von 2019 zeigen, dass zwei der untersuchten MRSA-Isolate der 2017 und 2018 eingesandten MRSA-Isolate eine Resistenz gegenüber Vancomycin und Teicoplanin aufweisen, jedoch nicht die Resistenzgene *vanA* und *vanB*. [67] Die Akquirierung der *van*-Resistenzgene aus Enterokokken stellt dennoch ein mögliches problematisches Szenario für die Zukunft dar.

In Studien wurde auch eine mögliche Übertragung der *vanB*-Tn1549-Sequenz von *Clostridium spp.* auf *E. faecium* bereits diskutiert. [54, 55] Hierbei stellt sich die Frage, ob zukünftig weitere Resistenzen über einen solche Übertragungsweg bei Enterokokken auftreten können und, ob diese eine weitere komplexe Problematik darstellen werden.

Die Abwendung der aufgeführten Szenarien stellt ein bedeutsames Ziel dar, das ausschließlich mit der Eindämmung von VRE und anderen antibiotikaresistenten Erregern erreicht werden kann. Das frühzeitige Erkennen von Ausbrüchen und die rasche Durchführung von Präventionsmaßnahmen sind zwei wichtige Pfeiler der Strategie zur Erreichung dieses Ziels. Grundlage dafür stellt auch die molekularepidemiologische Untersuchung und Typisierung ausreichender Bakterienisolate dar.

So kann für VRE *E. faecium* mittels Bestimmung der MLST-Sequenztypen ein Vergleich der VRE-Situation auf sowohl nationaler als auch internationaler Ebene erfolgen, der zu einem besseren Verständnis der Epidemiologie und dadurch zu besseren

Präventionsmaßnahmen führt. Aufgrund der Schwachstelle des MLST-Verfahrens, dass trotz gleichem Sequenzierungstyp keine genetische Verwandtschaft vorliegen muss, werden epidemiologische Untersuchungen zukünftig vermutlich mit dem neuen Goldstandard der Typisierungsmethoden (Whole Genome Sequencing), der eine Analyse des kompletten Genoms erlaubt, durchgeführt werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine Senkung der Kosten und eine Verfügbarkeit dieses Verfahren.

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur molekularepidemiologischen Analyse und zum erweiterten Verständnis von VRE *E. faecium* dar. Auch weiterhin zukünftig effektive Maßnahmen zur Prävention und Therapie können alleinig aus der Erforschung der Erreger und deren Ausbreitung entwickelt werden.

## 5. Zusammenfassung

Im Verlauf der letzten Jahre haben Enterokokken, speziell *E. faecium*, als antibiotikaresistente Bakterien an Bedeutung gewonnen. Hierbei ist besonders die Glykopeptidantibiotikaresistenz, vor allem Vancomycin, hervorzuheben, die in Deutschland seit Anfang der 2000er Jahre vermehrt nachgewiesen wurden. Um dem stetigen Anstieg der VRE-Fälle entgegenzuwirken, müssen molekularepidemiologische Diagnostikmaßnahmen und die Ausarbeitung effektiver Präventions- und Therapiestrategien durchgeführt werden.

Das Institut für Mikrobiologie und Hygiene am UKR fügt jeden VRE-Erstnachweis seiner Stammsammlung hinzu. Die in diesem Zuge asservierten 114 VRE-Nachweise von 74 Patienten des Jahres 2008 wurden in dieser Arbeit hinsichtlich des *van*-Resistenztyps, des MLST-Sequenztyps und des Vorliegens des *hyl*-Gens und der Anzahl der Repeats in der Region A des *esp*-Gens untersucht. Die erneute Spezies- und Resistenzbestimmung aller im Jahr 2016 anzüchtbaren Bakterien wies 97 VRE *E. faecium* Isolate von 64 Patienten nach. Von 18 Patienten lagen mehr als ein VRE *E. faecium* Nachweis vor. Diese Mehrfachisolate wurden für eine bessere Aussagekraft gesondert betrachtet.

Innerhalb des UKR wurde knapp die Hälfte der VRE *E. faecium* Isolate aus der klinischen Fachdisziplin der Inneren Medizin isoliert, die andere Hälfte verteilt sich gleichmäßig auf

die Bereiche Hämatologie und Onkologie und Chirurgie. Zwei Drittel der VRE *E. faecium* Isolate stammen aus Normalstationen, ein Drittel aus Intensivstationen. Das Verhältnis der Isolate von Screeningproben und klinischer Proben zueinander ist gleichmäßig. Die meisten VRE *E. faecium* Isolate wurden aus Rektal-/Perianalabstrichen (48%) isoliert.

Die molekularepidemiologischen Untersuchungen zeigen, dass 99% der VRE *E. faecium* Isolate zum *vanB*-Resistenztyp gehören, während zur gleichen Zeit in Deutschland deutlich der *vanA*-Resistenztyp dominiert. In den letzten Jahren wurde deutschlandweit ein Dominanzwechsel von *vanA* zu *vanB* beobachtet. Des Weiteren wurde bei 86% der VRE *E. faecium* Isolate das *hyl*-Gen nachgewiesen. 98% erwiesen sich als VRE *E. faecium* Isolate mit vier *espA*-Repeats, während bei 2% das *esp*-Gen nicht nachgewiesen werden konnte.

Der Hauptbestandteil dieser Arbeit, die MLST-Sequenztypisierung, ermöglicht eine Aussage über die Verbreitung einzelner Sequenztypen im Großraum Regensburg, davon hauptsächlich im UKR. Als dominierende MLST-Sequenztypen wurden eindeutig ST 192 und ST 17 identifiziert. VRE-Ausbrüche mit *vanB*-ST 192 wurden auch deutschlandweit registriert. Im UKR stellt 2008 mit ST 17 und ST 192 die Spitze des ersten Gipfels der dokumentierten VRE *E. faecium* Fälle dar. Ein weiterer Anstieg wurde 2011 mit den dominierenden MLST-Sequenztypen 117 und 203 beobachtet.

Die Ergebnisse dieser retrospektiven Arbeit stellen einen wichtigen Teil der Dokumentation der VRE-Entwicklung am UKR dar. Der kritische Vergleich mit anderen Studien eröffnet die Möglichkeit, sowohl das Erkennen als auch die Handhabung von VRE-Fällen zu optimieren. Eine Verbesserung von Präventions- und Hygienemaßnahmen wie auch Therapieoptionen führt auf den Weg zur Eindämmung nicht nur von VRE sondern auch anderer antibiotikaresistenter nosokomialer Erreger.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Guido Werner, Ingo Klare, Johannes Hübner, Winfried V. Kern, Wolfgang Witte. Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemotherapie Journal* 2008; 17(5): 183–93.
2. Germap 2012: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch ; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. 1. Aufl. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence; 2014.
3. 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: Antiinfectives Intelligence; 2016.
4. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52(3): 297–308.
5. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(8): 1563–71.
6. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42 Suppl 1: S25-34.
7. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12(10): 1221–36.
8. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10(4): 266–78.
9. Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(4): 731–42.
10. Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis* 2001; 1(5): 314–25.
11. Werner G, Coque TM, Hammerum, A M et al. Emergence and spread of Vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance* 2008(13).

12. Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2012; 55(11-12): 1387–400.
13. Remschmidt C, Schröder C, Behnke M et al. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance. Antimicrob Resist Infect Control 2018; 7: 54.
14. Tacconelli E. WHO-PPL-Short\_Summary\_25Feb-ET\_NM\_WHO.
15. Leavis H, Top J, Shankar N et al. A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the esp Virulence Gene of Enterococcus faecium and Associated with Epidemicity. Journal of Bacteriology 2004; 186(3): 672–82.
16. Leavis HL, Willems RJL, Top J et al. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant Enterococcus faecium. Emerging Infect Dis 2003; 9(9): 1108–15.
17. Zou J, Shankar N. Surface protein Esp enhances pro-inflammatory cytokine expression through NF- $\kappa$ B activation during enterococcal infection. Innate Immun 2016; 22(1): 31–9.
18. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S 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(12): 815–25.
19. Panesso D, Montealegre MC, Rincón S et al. The hylEfm gene in pHylEfm of Enterococcus faecium is not required in pathogenesis of murine peritonitis. BMC Microbiol 2011; 11(1): 20.
20. Freitas AR, Tedim AP, Novais C et al. Global spread of the hyl(Efm) colonization-virulence gene in megaplasmids of the Enterococcus faecium CC17 polyclonal subcluster. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(6): 2660–5.
21. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 23/2008.
22. Top J, Willems R, van der Velden S et al. Emergence of clonal complex 17 Enterococcus faecium in The Netherlands. Journal of Clinical Microbiology 2008; 46(1): 214–9.
23. Murray BE, Singh KV, Heath JD et al. Comparison of Genomic DNAs of Different Enterococcal Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Site 1990.
24. Butter I. Guest Commentary. Physical Therapy 1995; 75(1): 65–6.

25. Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.). Mikrobiologische Diagnostik. 2. Aufl; 2009.
26. Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(21): 4407–14.
27. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4503–11.
28. Homan WL, Tribe D, Poznanski S et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(6): 1963–71.
29. Download allele sequences - *Enterococcus faecium* locus/sequence definitions. URL:  
[https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst\\_efaecium\\_seqdef&page=downloadAlleles](https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_efaecium_seqdef&page=downloadAlleles) [Stand am 26.01.2020].
30. Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen. *Bundesgesundheitsblatt* 2018.
31. 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.
32. Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA et al. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; 53(4): 1072–9.
33. H. Hof, R. Dörries, G. Geginat (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie*: 5th ed. Duale Reihe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2014.
34. Vankerckhoven V, van Autgaerden T, Vael C 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*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4473–9.
35. MLST profiles. URL:  
[https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst\\_efaecium\\_seqdef&page=downloadProfiles&scheme\\_id=1](https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_efaecium_seqdef&page=downloadProfiles&scheme_id=1) [Stand am 03.05.2020].

36. 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.
37. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Institut Ausgabe 46/2017.
38. Veronika Bayerl. Molekulare Epidemiologie von Vancomycin-resistenten Enterokokken am Universitätsklinikum Regensburg in den Jahren 2004 bis 2006 [Dissertation]; 2018.
39. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 33/2013.
40. Robert Koch-Institut. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland – Update 2013/2014. RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut); 2015.
41. Nationales Referenzzentrum für die Surveillance von nosokomialen Infektionen. URL: [www.nrz-hygiene.de](http://www.nrz-hygiene.de) [Stand am 03.01.2017].
42. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 44/2010.
43. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 27/2019.
44. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C. What is antimicrobial stewardship? *Clin Microbiol Infect* 2017; 23(11): 793–8.
45. Lellek H, Franke GC, Ruckert C et al. Emergence of daptomycin non-susceptibility in colonizing vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during daptomycin therapy. *Int J Med Microbiol* 2015; 305(8): 902–9.
46. Smith TT, Tamma PD, Do TB et al. Prolonged linezolid use is associated with the development of linezolid-resistant *Enterococcus faecium*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; 91(2): 161–3.
47. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Instituts Ausgabe 35/2019.
48. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 23/2008.
49. Katharina Englert. Molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter *E. faecium* Isolate an einem südwestdeutschen Krankenhaus der Maximalversorgung [Dissertation]; 2012.
50. 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(5-6): 515–27.
51. Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S et al. vanA and vanB Incorporate into an Endemic Ampicillin-Resistant Vancomycin-Sensitive *Enterococcus faecium* Strain: Effect on Interpretation of Clonality. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(12): 3934–9.
  52. Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M et al. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(5): 1781–7.
  53. Woodford N, Chadwick PR, Morrison D, Cookson BD. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their van genotypes during an outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(11): 2966–8.
  54. Bender JK, Kalmbach A, Fleige C et al. Population structure and acquisition of the vanB resistance determinant in German clinical isolates of *Enterococcus faecium* ST192. *Sci Rep* 2016; 6: 21847.
  55. Howden BP, Holt KE, Lam MMC et al. Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant enterococci. *mBio* 2013; 4(4).
  56. Werner G, Klare I, Fleige C et al. Vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. *Antimicrob Resist Infect Control* 2012; 1: 21.
  57. Bjørkeng E, Rasmussen G, Sundsfjord A et al. Clustering of polyclonal VanB-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a low-endemic area was associated with CC17-genogroup strains harbouring transferable vanB2-Tn5382 and pRUM-like repA containing plasmids with axe-txe plasmid addiction systems. *APMIS* 2011; 119(4-5): 247–58.
  58. 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(2): 269–75.

59. 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(1): 232–5.
60. Rice LB, Carias L, Rudin S et al. A Potential Virulence Gene, hylEfm, Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin 2003.
61. Pidot SJ, Gao W, Buultjens AH et al. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci Transl Med* 2018; 10(452).
62. Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 38/2018.
63. 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(2): 195–8.
64. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 275–80.
65. Chang S, Sievert DM, Hageman JC et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* 2003; 348(14): 1342–7.
66. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003; 302(5650): 1569–71.
67. Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 42/2019.

## 7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 7.1. Tabellen

Tabelle 1: Begünstigende Faktoren, die zur Entstehung von Infektionen mit Enterokokken (inklusive VRE) beitragen [3].....	2
Tabelle 2: Natürliche und erworbene Resistenzen gegen Antibiotika bei Enterokokken [1, 3].....	3
Tabelle 3: Resistenztypen VanA und VanB mit minimaler Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Vancomycin und Teicoplanin, Genlokalisierung und mobilem Element, Ligase-Gen und dem dazugehörigen Ligase-Produkt [1, 4].....	7
Tabelle 4: Varianten der Allele der Housekeeping-Gene mit Sequenzlänge (bp = Basenpaare) [29] .....	13
Tabelle 5: VNTR-Loci mit Repeatlänge (bp = Basenpaare) und möglichen Anzahl an Repeats [27].....	14
Tabelle 6: PCR-Primer .....	28
Tabelle 7: Cyclerprogramm 1 (Zeit- und Temperaturprogramm) für die PCRs zum Nachweis der MLST-Marker, der Gene <i>vanA/B</i> , <i>hyl</i> (Stage 1: Denaturierung; Stage 2: Annealing; Stage 3: DNA-Synthese).....	29
Tabelle 8: Cyclerprogramm 2 für die PCR zum Nachweis der <i>espA</i> -Repeats des <i>esp</i> -Gens (Stage 1: Denaturierung; Stage 2: Annealing; Stage 3: DNA-Synthese).....	30
Tabelle 9: PCR-Primer zum Nachweis des <i>esp</i> -Gens .....	30
Tabelle 10: Sequenzlängen in Basenpaaren (bp) für die <i>vanA</i> -/ <i>vanB</i> -Gene, das <i>hyl</i> -Gen und das <i>esp</i> -Gen (Kontrolle des negativen Ergebnisses bei der <i>espA</i> -PCR) [18, 34] .....	32
Tabelle 11: Sequenzlängen in Basenpaaren (bp) der MLST-Marker <i>atpA</i> , <i>ddl</i> , <i>gdh</i> , <i>purK</i> , <i>gyd</i> , <i>pstS</i> , <i>adk</i> [29] .....	32
Tabelle 12: Sequenzlängen in Basenpaaren (bp) der <i>espA</i> -Repeats [15] .....	32
Tabelle 13: MLST Sequenztypen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, mit den dazugehörigen Allel-Nummern der Housekeeping-Gene [29].....	34
Tabelle 14: Schema der Anonymisierung der Patientennamen.....	35
Tabelle 15: Auflistung der VRE <i>E. faecium</i> Isolate, die neben der Vancomycinresistenz (V) eine weitere Resistenz gegenüber Teicoplanin (T) oder Linezolid (L) aufweisen, mit	

zugehörigen Daten (Befunddatum, Krankenhaus, Enterokokkenspezies, <i>vanA/B</i> -Genotyp, <i>hyl</i> -positiv/-negativ, <i>espA</i> -Repeats und MLST-Sequenztyp) .....	57
Tabelle 16: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen aller VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Nicht-UKR-Krankenhäuser (*diese beiden Isolate stammen von einem Patienten) .....	59
Tabelle 17: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate in den Stationen des UKR mit Mehrfachisolaten als erste Zahl in blau (n = 86) und ohne Mehrfachisolate als zweite Zahl in orange (n = 68) .....	62
Tabelle 18: Darstellung der VRE <i>E. faecium</i> Mehrfachisolate mit Befunddatum, Krankenhaus (BZK: Bezirksklinikum Regensburg), Enterokokkenspezies, Antibiotikaresistenzen (V: Vancomycin; T: Teicoplanin), <i>vanA/B</i> -Genotyp, <i>hyl</i> -Gen, <i>espA</i> -Repeats im <i>esp</i> -Gens und MLST-Sequenztyp (Sequenztypen der Mehrfachisolate von je einem Patienten mit unterschiedlichem Ergebnis sind fett hervorgehoben) (*von diesem Isolat wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei Kolonien gepickt und getrennt weiteruntersucht).....	79
Tabelle 19: Darstellung der VRE <i>E. faecium</i> Mehrfachisolate der Patienten, deren Isolate unterschiedliche MLST-Sequenztypen zeigen, mit Befunddatum, Krankenhaus, Enterokokkenspezies, Antibiotikaresistenzen (V: Vancomycin), <i>vanA/B</i> -Genotyp, <i>hyl</i> -Gen, <i>espA</i> -Repeats und MLST-Sequenztyp .....	83
Tabelle 20: Differenzen der Ergebnisse der Bestimmung der Enterokokkenspezies der Originalbefunde im Jahr 2008 und der Befunde dieser Arbeit im Jahr 2016.....	85
Tabelle 21: Differenzen der Ergebnisse des Nachweises des <i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -Gens der Originalbefunde von 2008 und der Befunde dieser Arbeit von 2016 .....	86



## 7.2. Abbildungen

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs der Zellwandbiosynthese und des Wirkmechanismus von Glykopeptidantibiotika (z.B. Vancomycin) in Enterokokken: Glykopeptide binden an D-Alanyl-D-Alanyl (D-Ala-D-Ala) des Grundbausteins der Zellwand, wodurch eine Zellwandbiosynthese durch Carboxypaptidasen, Transpeptidasen und Transglykosylasen gehemmt wird (UDP = Uracildiphosphat); mod. nach Werner et al. [1], Arthur et al. [5] und Courvalin [6] .....	4
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Resistenzmechanismus gegenüber Glykopeptidantibiotika (z.B. Vancomycin) in Enterokokken des <i>vanA</i> -Resistenztyps: Glykopeptide können nicht an den veränderten Terminus D-Alanyl-D-Lactat (D-Ala-D-Lac) des Grundbaustein der Zellwand binden, wodurch die Zellwandbiosynthese nicht mehr gehemmt werden kann (UDP = Uracildiphosphat); mod. nach Arthur et al. [5]....	5
Abbildung 3: Verteilung der Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland (anhand der Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillancce-System (KISS) 2007-2016); mod. nach Remschmidt et al [13] .....	8
Abbildung 4: Darstellung des Ablaufs der VRE-Screeninguntersuchung am UKR .....	22
Abbildung 5: Darstellung des Ablaufs der Untersuchung klinischer Proben am UKR....	24
Abbildung 6: Darstellung der Arbeitsschritte der labortechnischen Untersuchungen dieser Arbeit im Jahr 2016.....	26
Abbildung 7: Darstellung (jeweils für alle Krankenhäuser und das UKR) der Anzahl aller untersuchten Isolate, der Isolate mit positivem Nachweis für VRE <i>E. faecium</i> , der Mehrfachisolate (pro Patient mehrere Isolate vorhanden) und der Einzelnachweise (pro Patient ein Isolat vorhanden) .....	37
Abbildung 8: Verteilung der Geschlechter der Patienten mit positivem Nachweis für VRE <i>E. faecium</i> für alle Krankenhäuser (n = 64) und für das UKR (n = 56) .....	39
Abbildung 9: Darstellung der Altersverteilung der Patienten mit positivem Nachweis für VRE <i>E. faecium</i> für alle Krankenhäuser (n = 64) und für das UKR (n = 56).....	40
Abbildung 10: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Probeneingangs der Isolate mit positivem Nachweis von VRE <i>E. faecium</i> aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 80) .....	41

Abbildung 11: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Probeneingangs der Isolate mit positivem Nachweis von VRE <i>E. faecium</i> des UKRs inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 70) .....	42
Abbildung 12: Darstellung der Anzahl der Einsendungen von VRE <i>E. faecium</i> Isolaten aus den verschiedenen Krankenhäusern inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67) .....	43
Abbildung 13: Darstellung der Anzahl der Einsendungen an VRE <i>E. faecium</i> Isolaten aus den verschiedenen Fachabteilungen des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58) (Med I-III: Innere Medizin I-III).....	44
Abbildung 14: Darstellung der Verteilung der Einsendungen an VRE <i>E. faecium</i> Isolaten aus den Stationen des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66) .....	45
Abbildung 15: Darstellung der Anzahl der Einsendungen an VRE <i>E. faecium</i> Isolaten der Stationsarten „Intensiv“ und „Normal“ aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66) .....	46
Abbildung 16: Darstellung der Anzahl der Einsendungen an VRE <i>E. faecium</i> Isolaten der Stationsarten „Intensiv“ und „Normal“ des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58) .....	46
Abbildung 17: Darstellung der Verteilung der Anzahl der Probenarten „Screening“ und „klinische Probe“ mit positivem VRE <i>E. faecium</i> Nachweis aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 75) .....	47
Abbildung 18: Darstellung der Verteilung der Anzahl der Probenarten „Screening“ und „klinische Probe“ mit positivem VRE <i>E. faecium</i> Nachweis des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66) .....	47
Abbildung 19: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Materialien der VRE <i>E. faecium</i> Isolate aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 71) .....	48
Abbildung 20: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Materialien der VRE <i>E. faecium</i> Isolate des UKRs inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66) .....	49
Abbildung 21: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Originalbefunden des Jahres 2008 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 114) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 79).....	50

Abbildung 22: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Originalbefunden des Jahres 2008 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 101) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 69) .....	50
Abbildung 23: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Befunden dieser Arbeit im Jahr 2016 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 114) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 80).....	51
Abbildung 24: Darstellung der Anzahl der verschiedenen Enterokokkenspezies basierend auf den Befunden dieser Arbeit im Jahr 2016 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 101) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 70) .....	51
Abbildung 25: Beispielfoto der PCR-Produkte der PCR zum Nachweis der Resistenzgene <i>vanA</i> und <i>vanB</i> (1-2; 3-11: <i>vanB</i> ; 3: <i>vanA</i> ; PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle) mit Standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (bp) zwischen PK und 6 .....	52
Abbildung 26: Darstellung der Verteilung der <i>vanA</i> -/ <i>vanB</i> -Resistenzgenotypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Originalbefunden von 2008 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67).....	53
Abbildung 27: Darstellung der Verteilung der <i>vanA</i> -/ <i>vanB</i> -Resistenzgenotypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Originalbefunden von 2008 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 57).....	53
Abbildung 28: Darstellung der Verteilung der <i>vanA</i> -/ <i>vanB</i> -Resistenzgenotypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Resultaten dieser Arbeit im Jahr 2016 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67) .....	54
Abbildung 29: Darstellung der Verteilung der <i>vanA</i> -/ <i>vanB</i> -Resistenzgenotypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Resultaten dieser Arbeit - im Jahr 2016 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58)....	54
Abbildung 30: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Originalbefunden im Jahr 2008 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 33) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 32) .....	55
Abbildung 31: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Originalbefunden im Jahr 2008 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 27) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 26) ...	55

Abbildung 32: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit im Jahr 2016 für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 67) .....	56
Abbildung 33: Darstellung der Resistenzen gegen Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid der VRE <i>E. faecium</i> Isolate basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit im Jahr 2016 für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 85) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58) .....	56
Abbildung 34: Beispielfoto der PCR-Produkte der MLST-Marker <i>atpA</i> , <i>ddl</i> , <i>gdh</i> , <i>purk</i> , <i>gyd</i> , <i>pstS</i> und <i>adK</i> (NK: Negativkontrolle) mit Standard O'GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter (bp) zwischen NK und <i>gyd</i> .....	58
Abbildung 35: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen aller VRE <i>E. faecium</i> Isolate inklusive der Mehrfachisolate (n = 97) und exklusiv der Mehrfachisolate (n = 65) .....	58
Abbildung 36: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 86) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 62) .....	60
Abbildung 37: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate in den Fachabteilungen Innere Medizin (Med) I-III und Chirurgie des UKR mit Mehrfachisolaten (n = 86) .....	61
Abbildung 38: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate in den Fachabteilungen Innere Medizin (Med) I-III und Chirurgie des UKR ohne Mehrfachisolate (n = 70) .....	61
Abbildung 39: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate in den Stationen des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 86) .....	63
Abbildung 40: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate in den Stationen des UKR ohne Mehrfachisolate (n = 68) .....	64
Abbildung 41: Darstellung der Verteilung der MLST- Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 69) und Intensivstation (n = 27) aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate .....	65
Abbildung 42: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 48) und Intensivstation (n = 23) aller Krankenhäuser exklusive der Mehrfachisolate .....	65

Abbildung 43: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 63) und Intensivstation (n= 20) des UKR inklusive der Mehrfachisolate .....	66
Abbildung 44: Darstellung der Verteilung der MLST- Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Stationsarten Normalstation (n = 43) und Intensivstation (n = 17) des UKR exklusive der Mehrfachisolate .....	66
Abbildung 45: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Screening-Proben aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 53) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 33) .....	67
Abbildung 46: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Screening-Proben des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 48) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 30) .....	67
Abbildung 47: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der klinischen Proben aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 47) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 37) .....	68
Abbildung 48: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der klinischen Proben des UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 36) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 32) .....	68
Abbildung 49: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der verschiedenen Materialgruppen aller Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 96) *beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich.....	69
Abbildung 50: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der verschiedenen Materialgruppen aller Krankenhäuser exklusive der Mehrfachisolate (n = 77) *beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich.....	70
Abbildung 51: Darstellung der VRE <i>E. faecium</i> Isolate MLST-Sequenztypen der verschiedenen Materialgruppen des UKRs inklusive der Mehrfachisolate (n = 86) *beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich.....	70
Abbildung 52: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der verschiedenen Materialgruppen des UKRs exklusive der Mehrfachisolate (n = 69) *beinhaltet BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich.....	71
Abbildung 53: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate bezogen auf den Jahresverlauf inklusive der Mehrfachisolate für alle Krankenhäuser .....	72

Abbildung 54: Darstellung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate bezogen auf den Jahresverlauf exklusive der Mehrfachisolate für alle Krankenhäuser .....	73
Abbildung 55: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate bezogen auf den Jahresverlauf inklusive der Mehrfachisolate für das UKR .....	73
Abbildung 56: Darstellung der Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate bezogen auf den Jahresverlauf exklusive der Mehrfachisolate für das UKR .....	74
Abbildung 57: Beispielfoto der PCR-Produkte der PCR zum Nachweis der <i>espA</i> -Repeats (1-3: vier <i>espA</i> -Repeats; NK: Negativkontrolle) mit Standard Lambda DNA/Eco471 (AvalI) Marker (bp) zwischen 2 und 3 .....	75
Abbildung 58: Beispielfoto der PCR-Produkte der PCR zum Nachweis des <i>hyl</i> -Gens (1-13: <i>hyl</i> -positiv; NK: Negativkontrolle) mit Standard O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (bp) zwischen 6 und 7 .....	75
Abbildung 59: Darstellung der VRE <i>E. faecium</i> mit vier <i>espA</i> -Repeats im <i>esp</i> -Gen und Ergebnis <i>esp</i> -negativ für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 97) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 64) .....	76
Abbildung 60: Darstellung der VRE <i>E. faecium</i> Isolate mit vier <i>espA</i> -Repeats im <i>esp</i> -Gens und Ergebnis <i>esp</i> -negativ für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 89) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 57) .....	76
Abbildung 61: Verteilung der <i>hyl</i> -positiven und <i>hyl</i> -negativen VRE <i>E. faecium</i> für alle Krankenhäuser inklusive der Mehrfachisolate (n = 97) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 66) .....	77
Abbildung 62: Verteilung der <i>hyl</i> -positiven und <i>hyl</i> -negativen VRE <i>E. faecium</i> für das UKR inklusive der Mehrfachisolate (n = 86) und exklusive der Mehrfachisolate (n = 58) .....	77
Abbildung 63: Übersicht über alle MLST-Sequenztypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate mit dazugehörigem Ergebnis zu <i>vanA/B</i> , <i>hyl</i> , <i>espA</i> -Repeats .....	78
Abbildung 64: Verteilung der VRE-Fälle am UKR der Jahre 2004 bis 2017 (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKRs).....	92
Abbildung 65: Prozentuale Verteilung der <i>vanA</i> -/ <i>vanB</i> -Genotypen der VRE <i>E. faecium</i> Isolate der Einsendungen an das Robert-Koch-Institut (RKI) der Jahre 2006 bis 2009 und 2011 bis 2018 [37, 39, 40, 42, 47, 48] .....	95

Abbildung 66: Verteilung der MLST-Sequenztypen der VRE *E. faecium* Isolate der Jahre 2004 bis 2011 am UKR (unveröffentlichte Daten der AG Prof. Schneider des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene am UKR) ..... 105

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wulf Schneider, Leiter der Abteilung für Hygiene am Institut für Mikrobiologie und Hygiene am UKR, gilt mein Dank für die umfassende Betreuung und freundliche Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger, Leiter der Abteilung für Infektiologie am UKR, für die Übernahme des Korreferats und die aufmerksame Durchsicht der Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Maria Kurz, die mir bei der Durchführung der Laborarbeiten dieser Dissertation jederzeit hilfsbereit und tatkräftig zur Seite stand. Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene danke ich für die Bereitstellung von Materialien und Geräten und für die angenehme Zusammenarbeit.

Bei meinen Promotionskolleginnen Johanna Peterander und Veronika Bayerl möchte ich mich für den persönlichen und fachlichen Austausch und die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Abschließend danke ich besonders meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit des Studiums und der Dissertation unterstützt und motiviert haben.