

AUS DER ABTEILUNG FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTILOGIE
PROF. DR. WULF SCHNEIDER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE VON
VANCOMYCIN-RESISTENTEN ENTEROKOKKEN
AM UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG
IN DEN JAHREN 2009 UND 2010

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Corinna Seisenberger

2020

AUS DER ABTEILUNG FÜR KRANKENHAUSHYGIENE UND INFEKTILOGIE
PROF. DR. WULF SCHNEIDER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE VON
VANCOMYCIN-RESISTENTEN ENTEROKOKKEN
AM UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG
IN DEN JAHREN 2009 UND 2010

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Corinna Seisenberger

2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wulf Schneider

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung:

30.10.2020

*Für meine Mutter,
die stärkste Frau, die ich kenne.*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die Evolution der Enterokokken	8
1.2	Die Gattung <i>Enterococcus</i>	9
1.3	Klonaler Komplex CC17	11
1.4	Virulenzfaktoren	13
1.4.1	<i>enterococcal surface protein</i>	13
1.4.2	Hyaluronidase	15
1.4.3	Kollagenbindendes Adhäsın	16
1.5	Enterokokken und Antibiotikaresistenzen.....	17
1.5.1	Allgemein	17
1.5.2	Glykopeptidresistenz bei Enterokokken	19
1.5.3	Therapie von Enterokokken- und VRE-Infektionen	29
1.6	Methoden zur Typisierung	30
1.6.1	<i>Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)</i>	30
1.6.2	Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)	30
1.6.3	Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST).....	31
1.6.4	<i>Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)</i>	32
1.6.5	<i>Whole Genome Sequencing (WGS)</i>	32
1.7	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	34
2	Material und Methoden	36
2.1	Materialien.....	36
2.1.1	Chemikalien und Kits	36
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	37
2.1.3	Kulturmedien.....	37

2.1.4	Vancomycin-resistente Enterokokken-Stämme	37
2.1.5	Primer	38
2.1.6	Laborgeräte.....	39
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	40
2.1.8	Fremdlabor zur DNA-Sequenzierung.....	41
2.1.9	Software und Datenbanken	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Übersicht über die Methodik	42
2.2.2	VRE-Diagnostik in den Jahren 2009 und 2010	42
2.2.3	VRE-Analysen im Jahr 2017	45
2.2.4	Datenerhebung	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Auswahl der VRE-Proben.....	58
3.2	Monatsverlauf der VRE-Fälle	59
3.3	Geschlecht und Alter der Kohorte	61
3.4	Gegenüberstellung der Enterokokkenanalysen 2009/2010 und 2017	62
3.5	Glykopeptidresistenz	65
3.5.1	Genotypischer Nachweis der Glykopeptidresistenz	65
3.5.2	Phänotypische Glykopeptidresistenz	68
3.5.3	Phänotypische und genotypische Glykopeptidresistenz	70
3.6	MLST: Haushaltsgene und ihre Allelvarianten.....	73
3.7	MLSTypen	78
3.7.1	Übersicht.....	78
3.7.2	Sequenztypen am Universitätsklinikum Regensburg und an externen Krankenhäusern.....	80
3.7.3	Sequenztypen im Untersuchungszeitraum	82

3.8	Virulenzfaktoren: <i>enterococcal surface protein</i> , Hyaluronidase und Kollagenbindendes Adhäsın	84
3.9	Sequenztypen in Verbindung mit Glykopeptidresistenzgenen und Virulenzfaktoren	88
3.10	Zusammenstellung der analysierten Patientenproben.....	90
3.11	Herkunft der Proben	95
3.11.1	Sequenztypen am UKR und an externen Häusern	95
3.11.2	Verteilung der Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus faecium</i> -Proben innerhalb des UKR.....	96
3.12	Probenmaterial	101
3.12.1	Herkunft: Kultureller Nachweis und VRE-Screening	101
3.12.2	VRE-Screening am UKR: Sequenztypen.....	102
3.12.3	Materialgruppen.....	103
3.12.4	Analyse des VRE-Status.....	104
4	Diskussion	106
4.1	Hinführung.....	106
4.2	Zeitliche Entwicklung der VRE-Fälle.....	108
4.3	Alter und Geschlecht der Kohorte	110
4.4	Enterokokkenspezies	111
4.5	Glykopeptidresistenzen	112
4.6	Virulenzfaktoren: <i>enterococcal surface protein</i> , Hyaluronidase und Kollagenbindendes Adhäsın	119
4.7	Molekularepidemiologische Typisierung.....	122
4.7.1	Methodik: MLST.....	122
4.7.2	Epidemiologie der MLSTypen und deren Verteilung am UKR	124
4.8	Präventionsmaßnahmen	132
4.9	Ausblick.....	134

5	Zusammenfassung	136
6	Anhang	138
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	138
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	141
6.3	Tabellenverzeichnis.....	147
7	Literaturverzeichnis	149
8	Danksagung	163

1 Einleitung

Schon lange stellen Antibiotika-resistente Bakterien sowie die davon ausgelösten Infektionen ein wachsendes Problem in Krankenhäusern dar. [1] Diese Entwicklung hat ihren Ursprung in der Kombination aus bestimmten bakteriellen Eigenschaften, gesellschaftlichen/technologischen Veränderungen, die zur Übertragung resistenter Keime führen, sowie Selektionsdruck durch (teilweise unsachgemäßen) Antibiotika-Einsatz. [1, 2] So konnte man beispielsweise 1946 in Großbritannien kurz nach der Einführung des Antibiotikums Penicillin das Auftreten resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme beobachten. Wenige Jahre später wurden sogar Resistenzraten von knapp 50 % festgestellt. [3]

Eine weitere Gruppe grampositiver Bakterien, die mit stets steigenden Resistenzraten auf sich aufmerksam macht, sind die Enterokokken. [4, 5] Zur Therapie einer Infektion mit grampositiven, resistenten Bakterien wird oft das Antibiotikum Vancomycin verwendet. [6, 7] Ist ein Enterokokkus gegenüber Vancomycin resistent (Vancomycin-resistenter Enterokokkus = VRE), ist das Therapiespektrum stark eingeschränkt und vor allem nosokomiale Infektionen können zu einer großen Herausforderung werden. [2, 7–9]

1.1 Die Evolution der Enterokokken

Den Ursprung der Gattung *Enterococcus spp.* haben Lebreton *et al.* [10] 2017 bis in das geologische Zeitalter des Paläozoikums zurückverfolgt:

als Kommensale (sich von Nahrungsrückständen eines Wirts ernährend, den Wirt aber nicht schädigend) lebten die Vorfahren der Enterokokken zunächst in Meereslebewesen bzw. maritimer Umgebung.

Mit der Terrestrialisierung der Tiere (vor etwa 425 bis 500 Millionen Jahren) und der damit verbundenen Diversifizierung der Lebewesen wurde den Enterokokken-vorfahren die Besiedlung vieler verschiedener Wirte ermöglicht. Und da jene Wirte sich beispielsweise in der Kohlenhydrat-Verfügbarkeit im Darm unterschieden, geht man heute davon aus, dass es so zur Entstehung verschiedener Enterokokken-spezies kam. Zudem hat das Leben an Land wohl zu einer Selektion derjenigen Bakterien geführt, die bereits eine stabilere Zellwand und damit eine gewisse Widerstandsfähigkeit aufweisen konnten. Dieser Selektionsdruck führte zu einer sukzessiven Anpassung verschiedener Enterokokkenspezies an ihre jeweiligen Wirte. Die multiresistenten (MDR) *E. faecium* passten sich so schließlich ihrem Wirt, dem Menschen, an (siehe Abbildung 1).

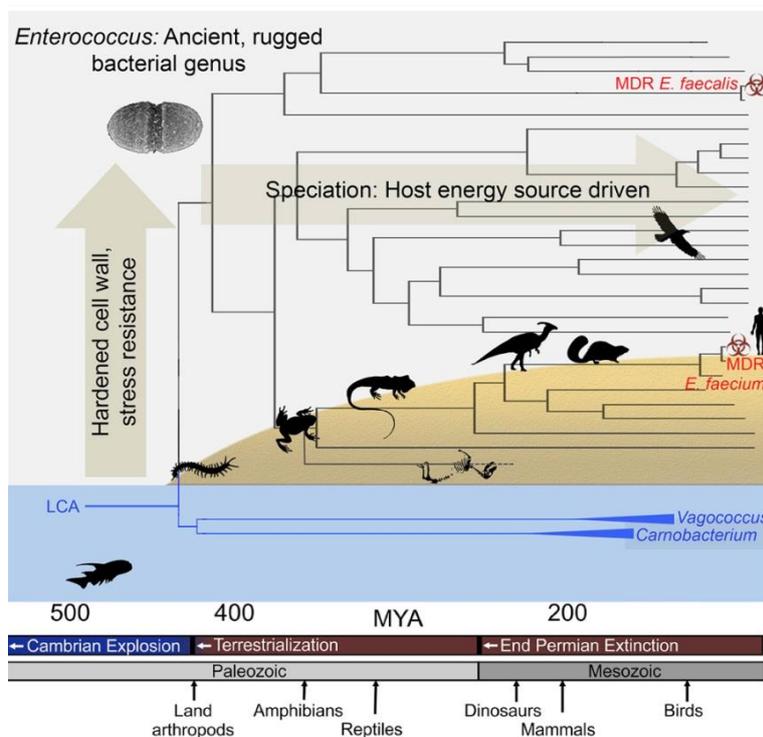


Abbildung 1: Die Evolution der Enterokokken. [10]

1.2 Die Gattung *Enterococcus*

Enterokokken sind grampositive, Katalase-negative und fakultativ anaerobe Kugelbakterien.

Früher wurden sie der Gattung der Streptokokken, Lancefield-Gruppe D, zugeordnet.

[11] Als Schleifer und Kilpper-Bälz 1984 nur eine entfernte Verwandtschaft der Spezies *Streptococcus (S.) faecalis* und *S. faecium* mit den anderen Streptokokken feststellten, wurden jene beiden Spezies und sieben weitere zu einer neuen Bakteriengattung, der Gattung *Enterococcus spp.*, zusammengefasst. [12, 13]

Mittlerweile gehören 57 Spezies zur Gattung der Enterokokken (Stand September 2019, [14]), wobei *E. faecium* und *E. faecalis* als medizinisch relevanteste Spezies gelten. [7, 14]

Auf einem Blutagar aufgetragen wird bei Enterokokken α -, γ - oder gar keine Hämolyse beobachtet. Wechselnde Umwelteinflüsse wie Temperaturschwankungen zwischen 5 und 50 °C, pH-Wert-Änderungen im Bereich zwischen 4,6 und 9,9 sowie Kochsalz- bzw. Gallekonzentrationen von bis zu 6,5 bzw. 40 % beeinflussen das Wachstum der Enterokokken nicht. [15] Zudem können sie auf unbelebten Oberflächen überleben, was vor allem im Rahmen nosokomialer Infektionen zu Übertragungen führen kann. [7]

Ihr natürliches Habitat finden Enterokokken im Intestinaltrakt, doch auch in Vaginalsekret, in Gallenwegen und selten im Oropharynx können jene Bakterien auftreten. Ferner sind sie im Abwasser, auf Pflanzen sowie in tierischen Produkten regelmäßig nachweisbar. [7]

Enterokokken sind opportunistisch pathogene Keime. Vor allem bei bestimmter Patientenklientel (z.B. bei sehr jungen oder alten Patienten, bei immunsupprimierten Personen oder bei Menschen mit schweren Grunderkrankungen) können Enterokokken schwere nosokomiale Infektionen verursachen: Harnwegs- und Wundinfektionen, Peritonitiden, selten auch Endokarditiden und Bakteriämien/Sepsen. [7, 16] Eine Auflistung von Risikofaktoren für eine Enterokokkeninfektion ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Risikofaktoren für Infektion oder Kolonisierung von Patienten durch Enterokokken/VRE. [7, 17]

Risikofaktoren für Infektion oder Kolonisierung von Patienten durch Enterokokken/VRE
Andauernde Krankenhausaufenthalte mit längerer Antibiotikatherapie
Aufenthalt in spezifischen Abteilungen (Hämatologie/Onkologie, Urologie/Nephrologie, Transplantationseinheiten, Neonatologie)
Vorangegangene Antibiotikatherapie durch Präparate mit sog. Enterokokkenlücke
Schwere Grunderkrankungen
Große Operationen im Thorax-/Rumpfbereich
Mängel in der Basishygiene
Kontakt zu einem infizierten oder kolonisierten Patienten
Kontakt mit kontaminierten Gegenständen oder Oberflächen
Immunsuppression
Patienten mit speziellen medizinischen Hilfsmitteln (Harnwegskatheter, zentralvenöser Katheter, Dialyse, perkutane endoskopische Gastroskopie..)

E. faecium und *E. faecalis* sind mittlerweile (zusammen mit *Clostridioides difficile*) die dritthäufigsten Erreger nosokomialer Infektionen in Deutschland. [18, 19] Weltweit stellen sie die dritt- bis vierthäufigsten Erreger nosokomialer Infektionen dar. [20] Dabei sind *E. faecalis* für etwa 60 % und *E. faecium* für circa 40 % der Infektionen verantwortlich. Andere Spezies, wie *E. casseliflavus* oder *E. gallinarium*, verursachen seltener Infektionen. Häufiger als Infektionen ist die Kolonisierung von Patienten durch Enterokokken. [7]

Diese Dissertation soll vor allem Vancomycin-resistente *E. faecium* als Auslöser nosokomialer Infektionen behandeln. Inwiefern bei dieser Spezies eine Krankenhaus-Adaptation stattfand, wird im nachfolgenden Kapitel erläutert.

1.3 Klonaler Komplex CC17

Die durch *E. faecium* ausgelösten nosokomialen Infektionen sind bedingt durch das weltweite Auftreten einer genetischen Linie, dem klonalen Komplex 17 (CC17), dem die Mehrheit aller VRE-Isolate angehört [21, 22].

Mithilfe der Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST; für mehr Informationen zum Verfahren siehe 1.6.3) identifizierten Willems *et al.* [22] diesen ersten weltweit vorkommenden, an das Krankenhaus-Umfeld angepassten klonalen Komplex, welcher nachträglich nach dem mutmaßlichen Begründer, Sequenztyp (ST) 17, benannt worden war.

Man geht davon aus, dass ST17 zum dominanten Klon wurde, nachdem dieser sich erfolgreich an das Krankenhaus-Umfeld adaptiert hatte. Genetische Diversifikation über einen langen Zeitraum hinweg sowie der kumulative Erwerb von zusätzlichen Elementen (wie Virulenzfaktoren oder Resistenzen) resultierten dann im CC17, einem Komplex aus eng verwandten Genotypen, welche allesamt gut angepasste nosokomiale Pathogene sowie weltweit verteilt sind.

Eine anschauliche Grafik stammt hierzu von Leavis *et al.* [23] (siehe Abbildung 2).

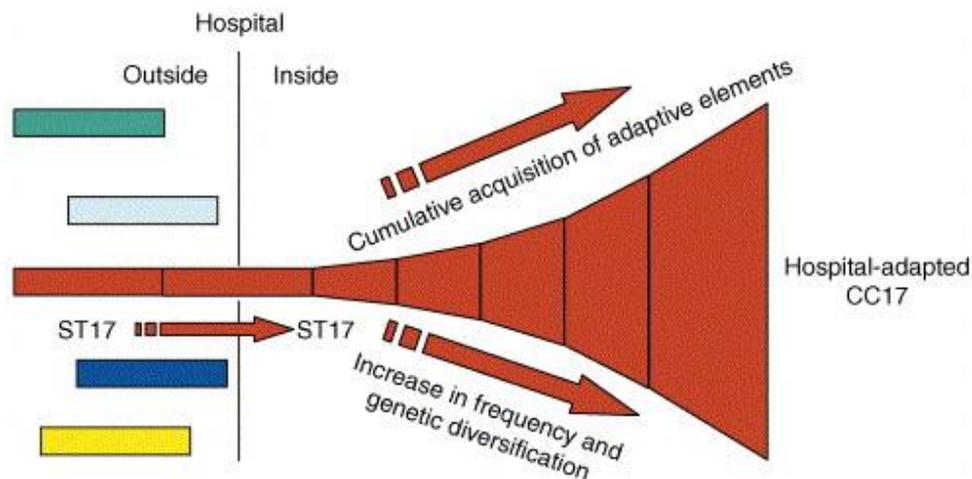


Abbildung 2: Entstehung des CC17. Hypothetisches Schema zur Beschreibung der verschiedenen Prozesse, welche zur Entstehung des an das Krankenhaus-Umfeld angepassten CC17 führten. [23] CC17 ist ein Beispiel für Erreger, deren Erwerb wertvoller Anpassungsmechanismen ihr Überleben und ihre Ausbreitung im Krankenhausumfeld sicherstellt. Dieses Phänomen ist auch bekannt als „genetischer Kapitalismus“: die (anpassungs-)reichen Erreger werden immer (anpassungs-)reicher. [23]

Charakterisiert sind *E. faecium*-Klone des CC17 durch eine Assoziation mit Ausbrüchen in Krankenhäusern, eine Pathogenitätsinsel sowie durch eine Ampicillinresistenz. [22] Des Weiteren sind CC17-*E. faecium*-Stämme mit zunehmender Tendenz auch gegen Vancomycin resistent [24] und mit den beiden Virulenzgenen *esp* (*enterococcal surface protein*) und *hyl* (Hyaluronidase) assoziiert [25].

Die soeben genannten Virulenzgene *esp* und *hyl* sind den Virulenzfaktoren zuzurechnen, also den Eigenschaften eines Mikroorganismus, welche ihre pathogene Wirkung beeinflussen. Im folgenden Kapitel werden einige im Zusammenhang mit *E. faecium* entscheidende Virulenzfaktoren behandelt.

1.4 Virulenzfaktoren

1.4.1 *enterococcal surface protein*

Wie bereits erwähnt, wurden für *E. faecium* verschiedene Virulenzfaktoren beschrieben. Dazu zählen das *enterococcal surface protein* (Esp), die Hyaluronidase (Hyl) und das Kollagenbindende Adhäsion (Acm). [26]

Im Allgemeinen wirken Virulenzfaktoren an der Pathogenität von Erregern mit. So können sie beispielsweise Pathogene dazu befähigen, an Zellen zu haften oder in jene einzudringen.

Das *enterococcal surface protein* ist ein Zellwand-assoziiertes Protein, welches zuerst von Shankar *et al.* [27] beschrieben wurde. Es gehört zu einer Familie gram-positiver, repetitive Strukturen enthaltender Oberflächenproteine, welche alle mit Virulenz und protektiver Immunität in Verbindung gebracht werden. [26]

Kodiert wird das Protein durch das 5622 bp [27] große chromosomale *esp*-Gen, welches Teil einer Pathogenitätsinsel ist. [26] Es wird assoziiert mit einer erhöhten Infektiosität des Bakteriums über eine potentielle Umgehung der Immunantwort des Wirts [27], Kolonisierung [28], Biofilmbildung und somit Adhäsion sowohl an eukaryotischen Zellen (wie im Urogenitaltrakt [28]) als auch an unbelebten Oberflächen [29].

Bisher konnte kein direkter Zusammenhang zwischen dem Protein und der Pathogenität von nosokomialen *E. faecium*-Infektionen nachgewiesen werden, doch die hohe Prävalenz des *esp*-Gens in hospitalen *E. faecium*-Isolaten [30, 31] deutet auf einen solchen Zusammenhang hin. [26]

Die Hauptregion des *esp*-Gens besteht aus drei verschiedenen Abschnitten (A, B und C). Begrenzt wird diese zentrale Region durch einen N- sowie einen C-Terminus (siehe Abbildung 3).

Die zentrale Region enthält zwei distinkte Tandem-Repeat-Regionen: die A-Repeat-Region und die C-Repeat-Region. Die B-Region dient als Platzhalter.

Unter (Tandem-)Repeats versteht man die Wiederholungen einer variablen Basensequenz innerhalb eines Gens. Bei verschiedenen Bakterienstämmen kann die Anzahl der Repeats in den einzelnen Regionen (A und C) variieren [26].

So wurden die unterschiedlichen Repeat-Anzahlen in der A-Repeat-Region der untersuchten Proben im Rahmen dieser Doktorarbeit als ein epidemiologisches Unterscheidungsmerkmal verwendet. Neben der Repeatanzahl können auch der N- und der C-Terminus eine unterschiedliche Basenabfolge aufweisen. [26]

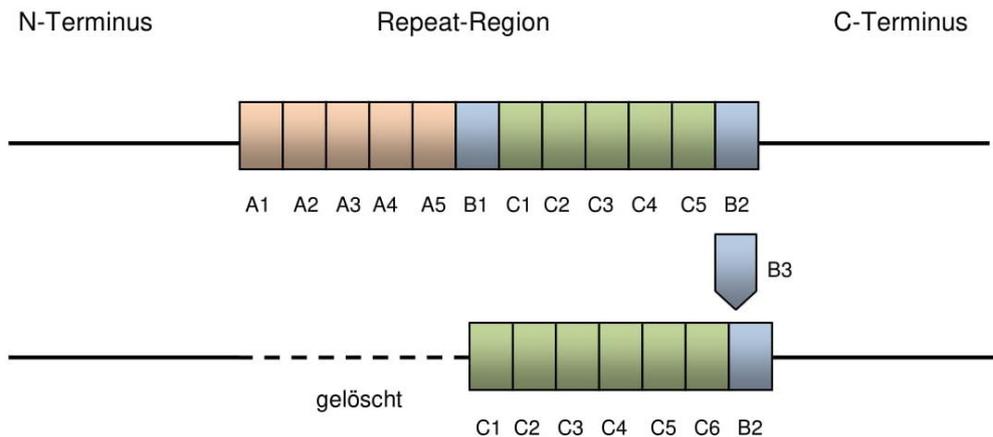


Abbildung 3: Schematische Darstellung zweier verschiedener Varianten eines *esp*-Gens. Obere Variante mit fünf Tandem-Repeats in der A-Region sowie der C-Region. Untere Variante ohne A-Repeat-Region und mit sechs Tandem-Repeats in der C-Region. In Anlehnung an [26].

1.4.2 Hyaluronidase

In der Hyaluronidase wurde anfangs eine Virulenzdeterminante der Hospital-assoziierten Vancomycin-resistenten *E. faecium* (VREfm) vermutet, da das *hyl*-Gen häufiger in VREfm-Proben hospitalen Ursprungs als in Fäkal-Proben identifiziert worden war [32]. Zudem war *hyl* zu 100 % nur in VREfm-Isolaten und gar nicht in VSEfm (Vancomycin-sensibler *E. faecium*) festgestellt worden [32].

Anfangs wurde angenommen, dass das chromosomale *hyl*-Gen eine *E. faecium*-Hyaluronidase kodieren würde, die eine Ähnlichkeit zu bereits beschriebenen bakteriellen Hyaluronidasen [33] aufweist, welche mit gesteigerter Virulenz in Verbindung gebracht worden waren [34].

Von Laverde Gomez *et al.* [35] konnte jedoch bei *hyl*-positiven *E. faecium* keine Hyaluronidase-Aktivität festgestellt werden.

Panesso *et al.* [25] löschten Bestandteile des *hyl*-Gens sogar und konnten keinen *in vivo*-Effekt auf die Virulenz beobachten. Sogar als jene einem *hyl*-negativen Isolat das *hyl*-Gen induzierten, konnte kein virulenter Effekt erreicht werden. Das *hyl*-Cluster stellt nach diesen Ergebnissen also keinen Virulenz-Vermittler (in der Pathogenese der Peritonitis bei Mäusen) dar.

Stattdessen ließen DNA-Sequenzanalysen darauf schließen, dass es sich bei dem kodierten Enzym wahrscheinlich um eine Glykosyl-Hydrolase der Familie 84 [36] handelt. [25] Die Bezeichnung „Hyaluronidase“ wurde dennoch in der Literatur sowie in dieser Dissertation aus Verständnisgründen beibehalten.

Hyl befindet sich auf übertragbaren Megaplasmiden, die eine Größe von 145 000 bis 375 000 Basenpaaren (bp) haben können. [37, 38] Diese Plasmide können auch weitere Antibiotikaresistenz-Determinanten enthalten und werden wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer verbreitet. [35, 38]

Welche Rolle das Enzym im Rahmen bakterieller Virulenz einnimmt, ist noch nicht abschließend geklärt. [25, 30] Es wurde jedoch festgestellt, dass das Megaplasmid, welches auch *hyl* trägt, zum einen die Fähigkeit der *E. faecium* zur Kolonisation des Gastrointestinaltrakts von Mäusen erhöht und zum anderen die Virulenz von kommensalen *E. faecium* im Rahmen einer experimentellen Peritonitis bei Mäusen steigert. [38, 39]

1.4.3 Kollagenbindendes Adhäsिन

Die meisten pathogenen Bakterien sind in der Lage an Komponenten der extrazellulären Matrix und damit an Gewebe des Wirts zu haften. [40] Der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist Kollagen, wobei vor allem Typ-I-Kollagen in wichtigen Geweben wie beispielsweise Haut, Sehnen, Knochen und der Kornea enthalten ist. [41]

Nallapareddy *et al.* [40] identifizierten einen weiteren potentiellen Virulenzfaktor, das Kollagenbindende Adhäsिन (*Acm*; *adhesin of collagen of E. faecium*).

Es wird an der Bakterienoberfläche exprimiert und ist *E. faecium*-spezifisch. [40]

Das *acm*-Gen ist unter *E. faecium* zwar weit verbreitet, doch nicht alle *acm*-positiven Isolate besitzen die Fähigkeit Kollagen zu binden. Diese nicht-bindenden Isolate weisen allesamt ein durch ein Transposon unterbrochenes *acm*-Gen auf (also ein Pseudogen). Nallapareddy *et al.* fanden das intakte Gen zur Kollagenbindung vorwiegend in Isolaten aus Krankenhäusern, während sie in nicht-nosokomialen Isolaten (aus Speisen oder Stuhl) das Pseudogen ermittelten. Wurde das Transposon aus dem *acm*-Pseudogen entfernt, so konnte eine gesteigerte *acm*-Expression beobachtet werden.

Aufgrund dieser Tatsachen wurde davon ausgegangen, dass *acm* zur Ausbreitung der *E. faecium* im Kontext nosokomialer Infektionen beitragen könnte. [40, 42]

Mittlerweile wurde ein zweites Kollagenbindendes Adhäsिन identifiziert. [43]

Scm (*second collagen adhesin of E. faecium*) bindet dabei (anders als *Acm*) nicht an Kollagen I und IV, sondern an Kollagen V.

Ob eines oder gar beide Adhäsine eine Rolle in der Virulenz des *E. faecium* einnehmen, ist bisher noch unbekannt.

1.5 Enterokokken und Antibiotikaresistenzen

1.5.1 Allgemein

Enterokokken verfügen über eine Reihe natürlicher Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Substanzen, können jedoch zusätzlich noch weitere Resistenzen erwerben. Eine Auflistung aller natürlichen und erworbenen Resistenzen stellt Tabelle 2 dar.

Die natürlichen Resistenzen sind im Enterokokken-Chromosom kodiert. Dazu zählen beispielsweise die Unempfindlichkeit gegen semisynthetische Penicilline, Monobactame und Lincosamide. Therapeutisch bedeutsam ist auch die Resistenz gegen Cephalosporine. [44] Ursächlich dafür ist eine Veränderung der Oberflächenstruktur, an die das Antibiotikum binden soll. So lässt das niedrig-affine Penicillin-bindende Protein der Enterokokken (PBP5) nur eine geringe Bindung der Cephalosporine an das Bakterium zu. [45, 46] Diese Antibiotika werden aufgrund ihres Wirkdefizits auch als Substanzen mit „Enterokokkenlücke“ bezeichnet. [47] Alle Enterokokken besitzen gegenüber Aminoglykosiden eine Low-Level-Resistenz. Eine natürliche Low-Level-Resistenz gegen Vancomycin ist nur bei *E. casseliflavus* und *E. gallinarium* zu finden. [7, 47]

Die erworbenen Resistenzen können entweder durch spontane Chromosom-Mutationen oder durch die Aufnahme sogenannter mobiler genetischer Elemente hervorgerufen werden. Zu den mobilen genetischen Elementen zählt man Transposons, Integrons und Plasmide. Ein Plasmid ist ein kurzes, ringförmiges, doppelsträngiges DNA-Fragment, welches zusätzlich zur chromosomalen DNA im Bakterium vorkommt. Es wird autonom repliziert und kann Gene enthalten, welche zur Überlebenssicherung des Bakteriums beitragen können, wie beispielsweise Resistenzgene gegen bestimmte Antibiotika. Diese Resistenzgene sind jedoch nicht immer von Beginn an Teil der Plasmid-DNA, sondern primär befinden sie sich auf Transposons oder Integrons. Dabei handelt es sich um kurze DNA-Stücke, die entweder ein oder mehrere Resistenzgene kodieren und sich enzymatisch selbst in Plasmide (oder direkt in das Bakterienchromosom) inserieren oder ausschneiden können. Übertragen werden die mobilen genetischen Elemente über horizontalen

Gentransfer, zum Beispiel durch Konjugation. [47–49] Auf diese Weise können Resistenzgene sogar zwischen phylogenetisch weit entfernten Spezies ausgetauscht werden.

Zu den erworbenen Resistenzen der Enterokokken werden beispielsweise die Unempfindlichkeit gegen Ampicillin (nur *E. faecium*; bei *E. faecalis*-Infektionen Antibiotikum der Wahl), Aminoglykoside (High-Level-Resistenzen) oder Oxazolidinone gezählt. Vor allem die Resistenz gegen die Glykopeptidantibiotika Teicoplanin und Vancomycin spielt seit den 1980ern eine große Rolle. [44] Wie es zu dieser Entwicklung kam und welche Molekulargenetik bzw. Mechanismen bei der immer häufiger auftretenden Vancomycinresistenz vorliegen, wird im Folgenden erläutert.

Tabelle 2: Antibiotikaresistenzen von Enterokokken. [7, 44]

Natürliche Resistenzen	Erworbene Resistenzen
Aminoglykoside (Low-Level-Resistenzen)	Aminoglykoside (High-Level-Resistenzen)
alle Cephalosporine	Ampicillin (fast ausschließlich <i>E. faecium</i>)
Lincosamide	Chloramphenicol
semisynthetische Monobactame	Daptomycin
Mupirocin (nur <i>E. faecalis</i>)	Fluorchinolone (Hochresistenz bei Hospital-assoziierten (HA) <i>E. faecium</i>)
semisynthetische Penicilline	Glykopeptide (Vancomycin, Teicoplanin)
Polymyxine	Makrolide
Streptogramine	Oxazolidinone
Vancomycin (Low-Level-Resistenzen in <i>E. gallinarium</i> und <i>E. casseliflavus</i>)	Streptogramine
	Tetracycline inklusive Glycylcycline

1.5.2 Glykopeptidresistenz bei Enterokokken

1.5.2.1 Vancomycinresistenz bei Enterokokken

1.5.2.1.1 Ätiologie und Ausbreitung der Vancomycinresistenz

Seit den ersten VRE-Meldungen in Europa im Jahre 1987 [50, 51] machen die Enterokokken auch heute noch mit steigenden Resistenzraten auf sich aufmerksam. Dabei beschränkt sich die Vancomycinresistenz in Deutschland nahezu ausschließlich auf *E. faecium*: knapp 95 % aller VRE sind *E. faecium*. Vancomycinresistente *E. faecalis* treten selten auf (3,8 %). [52]

In Deutschland ist laut ARS, der Antibiotika-Resistenz-Surveillance des Robert Koch-Instituts, die Unempfindlichkeit von *E. faecium* gegenüber Vancomycin von 7,3 % (2008) auf 24,4 % (2018) gestiegen. [53] In nur zehn Jahren ist das fast eine Vervierfachung.

Diese Entwicklung wird auch bestätigt durch die Ergebnisse der aktuellen nationalen Prävalenzstudie zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung (2011: 10,2 %; 2016: 23,1 %) [18] sowie durch die Daten des deutschen Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) [4]. Die in Abbildung 4 dargestellte Verteilung der VRE-Infektionen in Deutschland während der Jahre 2007 bis 2016 verdeutlicht die Zunahme der VRE-Infektionen zudem sehr anschaulich.

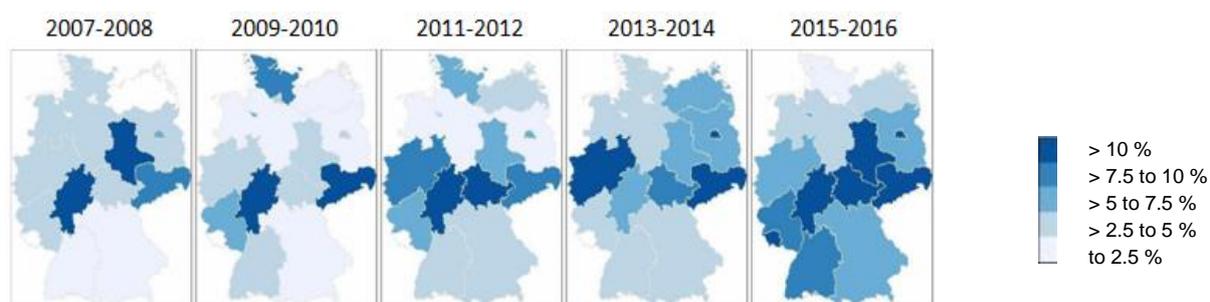


Abbildung 4: Verteilung der VRE-Infektionen in deutschen Bundesländern. Die Daten entstammen dem deutschen Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS), 2007-2016. [1]

Werden nur deutsche Intensivstationen betrachtet, so lässt sich von 2001 bis 2015 sogar eine enorme Zunahme von 1416 % feststellen. Die steigenden Resistenzraten korrelieren dabei mit dem Glykopeptidantibiotikaverbrauch: 2015 wurden um 48 %

mehr Glykopeptide als noch 2001 verwendet. [54] Auch Remschmidt *et al.* haben einen Zusammenhang zwischen Infektionen mit Hospital-assoziierten(HA)-VRE und dem Glykopeptidverbrauch festgestellt. [55]

Es stellt sich die Frage, wie der zur natürlichen Darmflora des Menschen gehörende und deshalb „harmlose“ Enterokokkus zu einem der - laut der Weltgesundheitsorganisation - wichtigsten Antibiotika-resistenten Bakterien, deren Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika priorisiert werden soll [56], werden konnte.

Lebreton *et al.* stellten 2013 fest, dass sich die multiresistenten Enterokokkenstämme heutzutage in drei Gruppen bzw. *Clades* einteilen lassen: *Clade B* stellt dabei die Kommensalen der Menschen dar, *Clade A1* die Hospital-assoziierten Stämme und *Clade A2* größtenteils Stämme aus dem Gastrointestinaltrakt von Tieren (siehe Abbildung 5).

Die Forschungsgruppe stellte weiter fest, dass sich vor etwa 3000 Jahren die Kommensalen der Menschen von den Tierstämmen abspalteten, also etwa zu der Zeit, in der die Menschen sich in Städten niederließen und Hygienemaßnahmen einführten. Die *E. faecium*-Stämme von Menschen und die von Tieren unterscheiden sich also genetisch.

Eine zweite Abspaltung fand vor etwa 80 Jahren statt: von den Tierstämmen (und interessanterweise nicht von den Kommensalen der Menschen) spalteten sich die heutigen Hospital-assoziierten Stämme ab. Zu dieser Zeit wurden die ersten Antibiotika eingeführt. Ein steigender Antibiotika-Selektionsdruck führte also zur Selektion der Hospital-assoziierten Stämme, wobei jene den Tierstämmen ähnlicher sind als den Kommensalen der Menschen. [57]

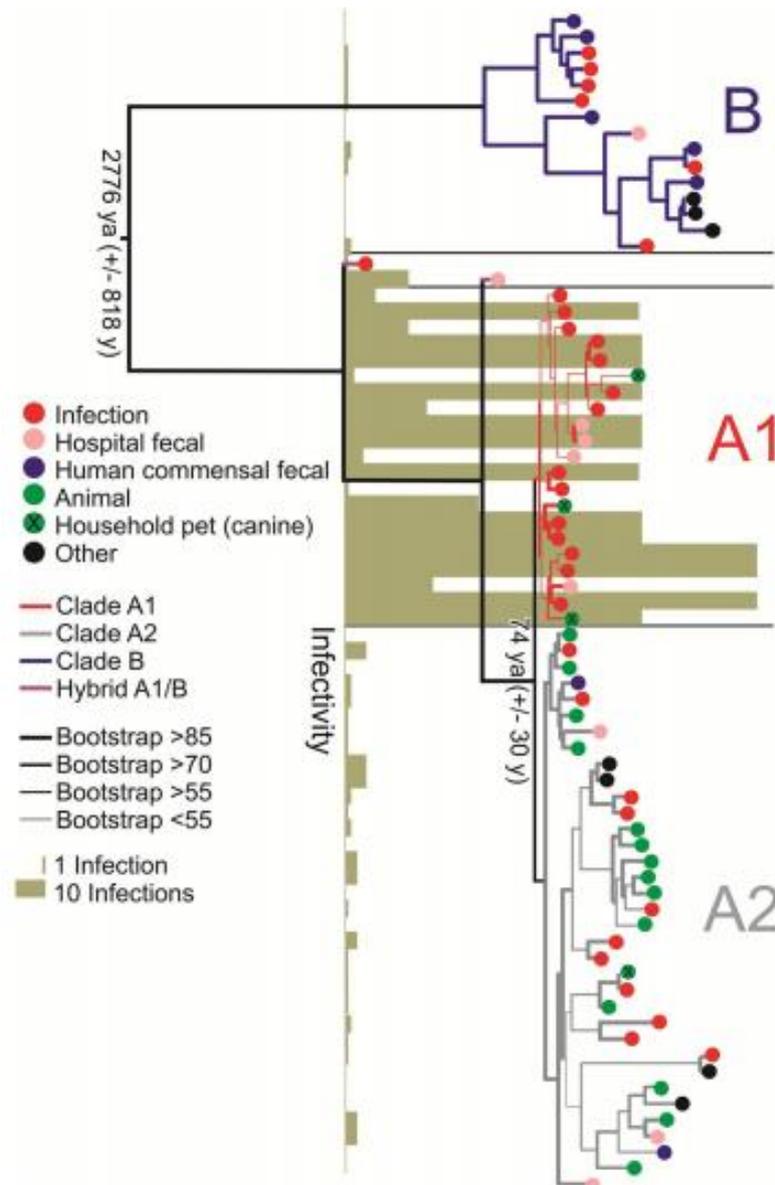


Abbildung 5: Abstammungslinien des multiresistenten *E. faecium*. *Clade B*: Kommensalen der Menschen; *Clade A1*: HA-Stämme; *Clade A2*: Tierstämme. ya = years ago. [57]

Bestätigt werden diese beiden Erkenntnisse durch Folgendes: als 1987 in Europa die ersten VRE-Fälle gemeldet worden waren, wurde eine große Prävalenz der VRE in gesunden Menschen sowie im Viehbestand festgestellt. Als ursächlich wurde das seit den 1970ern in der europäischen Viehzucht als Wachstumsförderer verwendete Glykopeptidantibiotikum Avoparcin vermutet. Avoparcin überstieg in seiner Verwendungsmenge das Antibiotikum Vancomycin zwar weit, brachte jedoch auch

eine Vancomycin-Kreuzresistenz mit sich. Über die Nahrungsmittelkette wurde der VRE dann wahrscheinlich Teil des Darmmikrobioms gesunder Menschen.

Daraus eine Konsequenz ziehend, wurde 1996 die Avoparcin-Nutzung verboten.

Daraufhin sank zwar der VRE-Anteil in gesunden Menschen, jedoch steigen die Resistenzraten bei nosokomialen Infektionen seit Jahren an [4, 8, 58]. [8, 58]

Auch in den USA werden steigende Resistenzen verzeichnet. Doch im Gegensatz zu Europa wurde dort kein Avoparcin verwendet, sodass auch keine Kolonisation gesunder Menschen stattfand. Stattdessen korrelierte der Anstieg der VRE in den USA direkt mit dem enormen Vancomycinverbrauch in Krankenhäusern [8, 58] (jener war fünf- bis zehnfach höher als in europäischen Krankenhäusern [59]). Da die Enterokokken immer mehr Resistenzen gegen Aminoglykoside und Betalaktamantibiotika wie Ampicillin entwickelten, musste in den USA vermehrt auf Reserveantibiotika wie Vancomycin zurückgegriffen werden. [60]

Der über die Maße erhöhte Verbrauch von Glykopeptidantibiotika, sei es in Europa mit Avoparcin oder in den USA mit Vancomycin direkt, scheint jedoch nicht der einzige Auslöser zur Entstehung von Vancomycinresistenzgenen gewesen zu sein. Guardabassi *et al.* [61] isolierten aus Bodenproben Resistenzgene, die sehr große Ähnlichkeit zu den heutigen Vancomycinresistenzgenen aufwiesen. Daraus - sowie aus dem komplexen Resistenzmechanismus und der großen Zahl an Vancomycinresistenz-Genclustern [62] - kann geschlossen werden, dass jene Resistenzgene schon vor den ersten VRE-Ausbrüchen in der Natur vorkamen. Bakterien nutzten sie wohl zu ihrem eigenen Schutz und gaben sie später womöglich über horizontalen Gentransfer an Enterokokken weiter. [8]

1.5.2.1.2 Molekulargenetik und Mechanismus der Vancomycinresistenz

Die bakterielle Zellwand liegt der Zellmembran auf und besteht aus Peptidoglykanen (auch: Murein). Durch Elongation und Quervernetzung der Peptidoglykane durch die Enzyme Transglykolase und Transpeptidase entsteht eine relativ stabile Zellwand des Bakteriums.

Glykopeptidantibiotika wie Vancomycin können durch die Zellmembran zum Ort der Synthese der Peptidoklykan-Ketten gelangen und Wasserstoffbrücken mit dem D-Alanin-D-Alanin-Terminus der Peptidoglykan-Vorläufer bilden. Die beiden Enzyme werden so sterisch blockiert und die Quervernetzung des Mureins scheitert. Dem osmotischen Druck nicht mehr standhaltend, kommt es zur Zytolyse und zum Tod der Bakterienzelle. [63, 64]

Bei Vancomycin-resistenten Enterokokken ist das terminale D-Alanin-D-Alanin des Peptidoglykan-Vorläufers durch D-Alanin-D-Lactat oder D-Alanin-D-Serin ersetzt. Dies geht dann mit einer gesunkenen Bindungsaffinität des Vancomycins an den Vorläufer und somit einem Wirkungsverlust auf Seiten des Antibiotikums einher. Beim Ersatz des terminalen D-Alanins durch D-Lactat wird eine Wasserstoffbrücke eliminiert, was in einer bis zu 1000fach verringerten Bindungsaffinität des Vancomycins und in sog. High-Level-Resistenzen (Minimale Hemmkonzentration (MHK) > 64 µg/ml) resultiert. Beim Ersatz durch D-Serin ist die Bindungsaffinität zwar auch reduziert, jedoch nur etwa siebenfach (Low-Level-Resistenzen mit MHK = 4-32 µg/ml). [58, 65, 66] So kann trotz Vancomycin-Anwesenheit die Zellwandsynthese ungehindert ablaufen.

Der Einbau von D-Lactat oder D-Serin anstelle von D-Alanin wird durch spezielle Ligasen katalysiert. Diese Ligasen werden durch verschiedene Resistenz-Genotypen kodiert. [65] Heute sind neun unterschiedliche Vancomycinresistenz-Genotypen bekannt: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* und *vanN*. [44]

Erworbene Resistenzen stellen die acht Gencluster *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* und *vanN* dar. Davon sind *vanA* und *vanB* medizinisch am relevantesten. [44] Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit auf die Gencluster *vanA* und *vanB* eingegangen.

Jene beiden Resistenztypen (*vanA* und *vanB*) sind induzierbar. Die Resistenzgene werden also erst bei Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums exprimiert. [44]

Der *vanA*-Typ bewirkt eine Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz. [62]

Dabei liegt die MHK für Vancomycin bei 16-1000 µg/ml und für Teicoplanin bei (4-)16-512 µg/ml. [44]

Das *vanA*-Operon (DNA-Funktionseinheit) befindet sich auf dem Transposon Tn1546, welches oft plasmidgetragen ist. [65] Tn1546 gehört der Tn3-Familie an, besitzt eine Größe von 10 851 bp und kodiert sieben Polypeptide, die letztendlich für die erniedrigte Vancomycin-Bindeaffinität verantwortlich sind. [67] Diese Polypeptide können in drei funktionelle Gruppen unterteilt werden: Gene zur Regulation (*vanR* und *vanS*), Gene für die Glykopeptidresistenz (*vanH*, *vanA* und *vanX*) sowie akzessorische Gene, welche für die (Vancomycin-)Resistenz nicht notwendig sind (*vanY* und *vanZ*). [6, 65]

Laut Leclercq und Courvalin ist „der biochemische Mechanismus und die Regulation der Expression der erworbenen Resistenz gegen Glykopeptide [ist] eines der anspruchsvollsten und perfektsten Beispiele der genetischen Adaption von Bakterien“ [6] (für die schematische Darstellung eines *vanA*-, *vanB*- und *vanC*-Operons siehe Abbildung 6).

So dienen *vanR* und *vanS* auf dem *vanA*-Operon der Transkriptionsregulierung. *VanH* kodiert eine Dehydrogenase, die Pyruvat zu Lactat reduziert und somit das Substrat der Ligase liefert. [68] Jene Ligase wird vom *vanA*-Gen kodiert und katalysiert die Bindung von D-Lactat an D-Alanin. [69] Damit genug D-Alanin-Enden, an die D-Lactat angehängt werden können, vorhanden sind, spaltet eine D,D-Dipeptidase (kodiert durch *vanX*) das D-Alanin-D-Alanin-Ende der Zellwandvorläufer. [70] Von dieser D,D-Dipeptidase nur unvollständig abgespaltene D-Alanin-Enden werden von einer D,D-Carboxypeptidase (*vanY*) entfernt. [71] *Van Z* hingegen bewirkt wahrscheinlich über einen noch unbekanntem Mechanismus eine Low-Level-Teicoplaninresistenz. [72]

Das *vanA*-Resistenzgen hat sich mittlerweile auch auf andere Bakterienspezies, wie beispielsweise den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA),

ausgebreitet. [44, 62] Außerdem ist der *vanA*-Resistenztyp in Nordamerika und Europa der dominierende Genotyp. [73] In Deutschland überwiegt jedoch nach einem kontinuierlichen Anstieg im Moment der *vanB*-Genotyp. [5, 53, 74]

Der *vanB*-Resistenztyp wird ebenso durch ein Transposon kodiert. Das konjugative Transposon vom Subtyp Tn1549/Tn5382 ist chromosomalen Ursprungs, wurde jedoch auch auf Plasmiden gefunden.

VanB bewirkt eine Resistenz gegen Vancomycin. Die MHK liegt dabei bei 4-32 (-1000) µg/ml. [44] Verwendet man im Rahmen der VRE-Diagnostik eine zu hohe Vancomycin-Konzentration, so kann es sein, dass dieser Phänotyp aufgrund seiner manchmal sehr niedrigen MHK übersehen wird. [62] Da in den letzten Jahren die *vanB*-VRE-Diagnostik stets besser geworden ist, könnte der oben bereits genannte *vanB*-Anstieg auch auf die Verbesserung der Diagnoseverfahren (also nicht nur auf eine steigende *vanB*-Prävalenz) zurückzuführen sein. [44]

Anders als *vanA* kodiert das *vanB*-Cluster keine Teicoplaninresistenz. Durch spontane Mutationen kann es aber dennoch zu einer solchen Resistenz bei *vanB*-positiven *E. faecium* kommen. [62]

Das *vanB*-Cluster enthält ein distinktes *vanW*-Gen. *VanZ* fehlt und *vanY* befindet sich an einer anderen Stelle als bei *vanA* [62] (siehe Abbildung 6). Jedoch kodieren beide Cluster verwandte Dehydrogenasen, Ligasen und D,D-Dipeptidasen, sodass letztendlich von einem gleichen Glykopeptidresistenz-Mechanismus ausgegangen werden kann. [75]

Von der *vanB*-Ligase gibt es drei Subtypen (*vanB1-vanB3*), wobei *vanB2* der häufigste Subtyp ist. [44, 76, 77]

Der Mechanismus der *vanB*-vermittelten Vancomycinresistenz mag zwar geklärt sein, der der *vanB*-Übertragung wird hingegen immer noch diskutiert. Es besteht die Hypothese, dass der initiale Erwerb des Vancomycinresistenz-Transposons Tn1549 möglicherweise via Transposition von anaeroben Darmbakterien (und keiner Enterokokkenspezies) stattfindet und die Resistenz erst sekundär unter Enterokokken verbreitet wird. [78]

VanB2-Resistenzgene sind so eventuell bereits Teil der natürlichen Darmflora und

eine Therapie mit Vancomycin könnte sich möglicherweise begünstigend auf die Übertragung von Resistenzgenen auf relevante Erreger auswirken. So scheint für die Ausbreitung des *vanB*-Resistenztypus in deutschen Klinikisolaten der Austausch von genetischem Material zwischen Vancomycin-resistenten und Vancomycin-sensiblen Enterokokken ursächlich zu sein. [78]

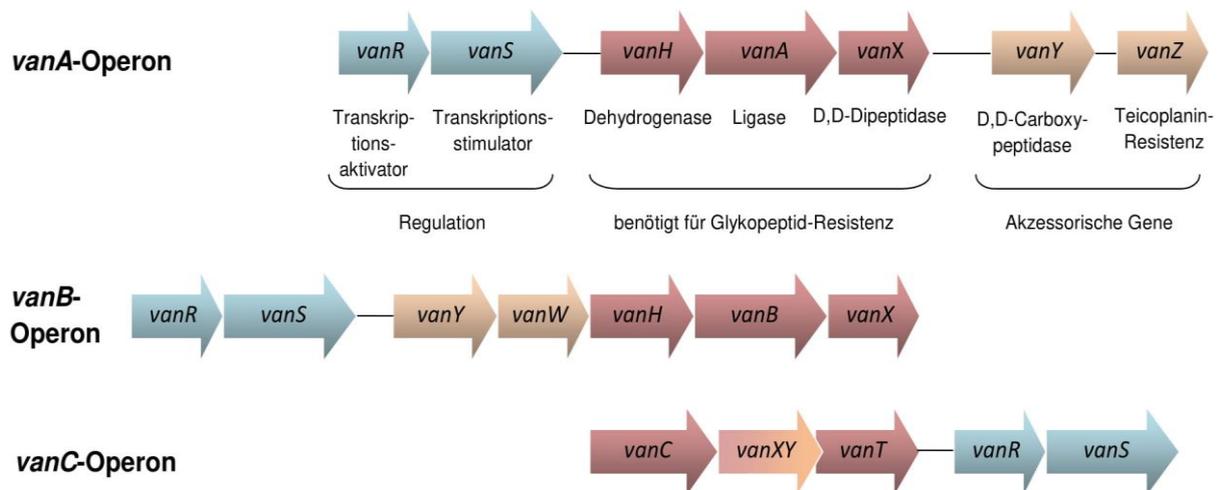


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines *vanA*-, *vanB*- und *vanC*-Operons, eingeteilt in drei funktionelle Gruppen. [6, 39, 42]

Der Resistenztypus *vanC* stellt die einzige natürliche Resistenz gegen Vancomycin dar. Diese Low-Level-Resistenz ist chromosomal kodiert, nicht übertragbar und meist nur bei den Spezies *E. gallinarium* (*vanC1*) und *E. casseliflavus* (*vanC2/3*) zu finden. In sehr seltenen Fällen können jene Spezies zudem auch ein *vanA*- oder *vanB*-Gencluster erwerben und dann phänotypisch als *vanA*- oder *vanB*-Isolat auftreten. [7] Anders als bei den Clustern *vanA/vanB* wird durch das *vanC*-Gen ein terminales D-Serin geschaffen (*vanA/vanB*: terminales D-Laktat). Dabei ist *vanH* durch *vanT* ersetzt und *vanX* sowie *vanY* sind zu *vanXY* verschmolzen (siehe Abbildung 6). [64]

Zusammenfassende Informationen über die erläuterten Resistenzphänotypen samt Subtypen, MHK für Vancomycin und Teicoplanin, Peptidoglykan-Endung, Art der Resistenz, Expression, Lokalisation, Übertragbarkeit sowie Vorkommen in Enterokokkenspezies können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Varianten der Vancomycinresistenz bei Enterokokken. Samt Subtypen, MHK für Vancomycin und Teicoplanin, Peptidoglykanendung, Resistenzart, Expression, Lokalisation, Übertragbarkeit sowie Vorkommen in Enterokokkenspezies. In Anlehnung an [44, 64].

Resistenzphänotyp	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>
Subtypen	-	<i>vanB1-3</i>	<i>vanC1-3</i>
MHK für Vancomycin [µg/ml]	16-1000	4-32(-1000)	2-32
MHK für Teicoplanin [µg/ml]	(4-)16-512	0,5-1	0,5-1
Peptidoglykanendung	D-Alanin D-Lactat	D-Alanin D-Lactat	D-Alanin D-Serin
Resistenzart	erworben	erworben	natürlich
Expression	induzierbar	induzierbar	konstitutiv
Lokalisation	Plasmid Chromosom	Plasmid Chromosom	Chromosom
Vorkommen in Enterokokkenspezies	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. cecorum</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarium</i> <i>E. durans</i>	<i>E. gallinarium</i> <i>E. casseliflavus</i>

1.5.2.2 Teicoplaninresistenz

Liegt eine Infektion mit Vancomycin-resistenten Enterokokken vor, so kann alternativ auf das Antibiotikum Teicoplanin zurückgegriffen werden. Neben Vancomycin ist auch Teicoplanin der Gruppe der Glykopeptide zuzuordnen.

Teicoplanin bindet in seiner antibiotischen Wirkung ebenso wie Vancomycin an das terminale D-Alanin-D-Alanin. Wie Vancomycin wirkt es gegen grampositive Bakterien, jedoch beweist Teicoplanin eine bessere Wirksamkeit gegenüber manchen klinischen Erregern der Gattung der Staphylokokken, Streptokokken oder Enterokokken. [79, 80]

Wie bereits erläutert, können Enterokokken (neben vielen weiteren Resistenzen) auch eine Unempfindlichkeit gegenüber Teicoplanin erwerben (*vanA*-positive VRE). Der genaue Resistenzmechanismus ist bisher ungeklärt. Wahrscheinlich ist das akzessorische *vanZ*-Gen auf dem *vanA*-Operon für die Unempfindlichkeit verantwortlich. [72]

1.5.3 Therapie von Enterokokken- und VRE-Infektionen

Für gewöhnliche *E. faecalis*-Infektionen wird eine antimikrobiotische Therapie mit Ampicillin empfohlen. Liegt eine schwere Infektion vor, wird zusätzlich zu Ampicillin ein Aminoglykosidantibiotikum verwendet, um einen synergistischen, vielfach gesteigerten bakteriziden Effekt zu erreichen. Liegt jedoch bereits eine Resistenz gegen eines der verwendeten Antibiotika vor, so versagt der synergistische Effekt und Glykopeptidantibiotika sind das Mittel der Wahl. Da *E. faecium* in den meisten Fällen eine Resistenz gegen Ampicillin erworben haben, werden *E. faecium*-Infektionen fast ausschließlich mit Glykopeptidantibiotika (vor allem mit Vancomycin) behandelt. [7]

Liegt eine Resistenz gegen Vancomycin (und/oder Teicoplanin) vor, so ist das Therapiespektrum stark eingeschränkt und Reserveantibiotika wie Linezolid, Tigecyclin, Daptomycin oder Quinupristin/Dalfopristin müssen angewandt werden. [7] Quinupristin/Dalfopristin ist in seiner Wirksamkeit nur auf *E. faecium* beschränkt und in Deutschland zudem nicht mehr erhältlich.

Daptomycin als Therapeutikum wird kontrovers diskutiert und ist außerdem in den zugelassenen Dosierungen nicht gegen Enterokokken wirksam. [7, 44, 74]

Tigecyclin wird nur eingeschränkt für eine Behandlung von VRE empfohlen. Es liegen zu wenig Daten zum Gebrauch bei Bakteriämie/Sepsis vor, sodass es nur als *ultima ratio* mit Monitoring etwaiger Nebenwirkungen Anwendung finden sollte.

Linezolid hingegen stellt eine wertvolle Therapieoption dar. [44, 74]

Obwohl stets zum umsichtigen Umgang mit Antibiotika gemahnt wird, konnten in den letzten Jahren Resistenzen gegen Reserveantibiotika wie Linezolid oder Tigecyclin beobachtet werden. [42, 81]

1.6 Methoden zur Typisierung

Zur epidemiologischen Analyse von Enterokokken bzw. deren Subtypen können verschiedene Typisierungsverfahren herangezogen werden. Im Folgenden werden die gegenwärtig verfügbaren Methoden kurz erläutert.

1.6.1 *Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)*

Unter *Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)* versteht man eine molekularbiologische Technik zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks. Dabei zerschneiden zwei Restriktionsenzyme die zu analysierende DNA in Fragmente. Im Anschluss daran werden nur bestimmte Fragmente amplifiziert (vervielfältigt). Dies geschieht durch zwei Polymerasekettenreaktionen (PCR; für eine Erläuterung der Funktionsweise einer PCR siehe 2.2.3.5). Die erhaltenen Fragmente werden dann durch ein Elektrophoresegel nach Größe getrennt. Das daraus entstandene Muster gibt Auskunft über nahe Verwandtschaften oder kann zur Unterscheidung von Individuen verwendet werden. [82]

AFLP ist zwar ein sehr schnelles Typisierungsverfahren, jedoch ist es schlecht reproduzierbar und erhaltene Daten können nicht standardisiert zwischen Labors ausgetauscht werden. [83, 84]

1.6.2 *Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)*

Die Puls-Feld-Gelelektrophorese, kurz PFGE, ist ein Verfahren zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten und eignet sich zur Typisierung eines bakteriellen Genoms.

Das Genom wird dazu erst mithilfe von Restriktionsenzymen in Fragmente zerschnitten, bevor jene in einem periodisch umgepolten elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei wandern große Fragmente langsamer als kleine. Im Gegensatz zur herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese bewirkt die ständige Umpolung des elektrischen Felds, dass sich die Moleküle in einer bestimmten Frequenz („Puls“) stets neu ausrichten müssen. Dies resultiert in einer verbesserten Auflösung des Trennbereichs, vor allem für große Moleküle. [85, 86]

Leider sind die Ergebnisse stark von den herrschenden Laborbedingungen abhängig, sodass jene nicht zwischen Labors ausgetauscht und verglichen werden können. [87, 88] Zudem ist dieses Verfahren sehr zeitaufwendig und erfordert hohen technischen Standard sowie qualifizierte und erfahrene Labormitarbeiter. [88]

1.6.3 Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Die Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) stellt derzeit den Goldstandard zur epidemiologischen Typisierung vieler bakterieller Pathogene dar [23, 89].

Dazu werden die Allelvarianten verschiedener bakterieller Haushaltsgene, also für die Aufrechterhaltung des bakteriellen Stoffwechsels essentielle Gene, untersucht. Da bei Haushaltsgenen von einer eher geringen Mutationsrate ausgegangen wird (Mutationen könnten den wichtigen Stoffwechsel negativ beeinflussen), stellen diese eine geeignete Region zur Analyse dar.

Nach Homan *et al.* [90] werden im Falle einer *E. faecium*-Typisierung sieben Haushaltsgene untersucht. Mittels PCR werden spezielle Abschnitte jener Gene erst einzeln amplifiziert und anschließend sequenziert, sodass für jedes Haushaltsgen eine Allelvariante festgestellt werden kann. Die Allelvarianten aller Haushaltsgene ergeben dann ein siebenstelliges Allelprofil, welches wiederum einem distinkten MLSTypen zugeordnet werden kann. Die Zuordnung der Sequenzen zu Allelvarianten sowie der Allelprofile zu Sequenztypen erfolgt dabei über eine im Internet öffentlich zugängliche Datenbank, sodass diese Methode global angewandt werden und Datenaustausch weltweit stattfinden kann. Außerdem ist jenes Verfahren hoch reproduzierbar und liefert eine gute diskriminierende Leistung. [83]

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Dissertation mit der Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung gearbeitet. Für genaue Informationen zur Amplifikation der Haushaltsgene sowie zur Zuordnung der Sequenzen bzw. Allelprofile siehe 2.2.3.5.2 bzw. 2.2.3.10.

1.6.4 *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)*

MLVA steht für *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*. Dieses Typisierungsverfahren analysiert die unterschiedliche innergenetische Anzahl an Tandem-Repeats an mehreren Genloki im bakteriellen Genom.

Die Tandem-Repeat-Regionen werden mittels PCR detektiert und amplifiziert. So ergeben sich für jeden Locus Fragmente einer spezifischen Repeat-Anzahl und somit einer spezifischen Größe. Durch Auftrennung der verschiedenen großen Fragmente mittels Gelelektrophorese können Bakterienstämme anhand der entstandenen spezifischen Banden unterschieden und Verwandtschaftsgrade festgestellt werden. [83]

MLVA stellt ein reproduzierbares und gut transportables Typisierungswerkzeug dar. Zudem ist es ein schnelles und vergleichsweise günstiges Verfahren. [83] Obwohl die diskriminierende Fähigkeit der *MLVA* lange als schlechter als die der MLST oder PFGE galt [91], ermitteln mittlerweile immer mehr Studien eine höhere Diskrimination bei *MLVA* als bei MLST [92, 93].

1.6.5 *Whole Genome Sequencing (WGS)*

Unter *Whole Genome Sequencing (WGS)* wird die Analyse der vollständigen Nukleotidsequenz eines (bakteriellen) Genoms verstanden. [94]

WGS gewährleistet eine hohe, basenweise Auflösung [87, 95] der kompletten DNA und erfasst auch Abschnitte, die von anderen Typisierungsmethoden eventuell nicht registriert worden wären. Somit ist dieses Verfahren ein passendes Werkzeug zur molekular-epidemiologischen Analyse von Ausbruchssituationen. [87]

Obwohl die Kosten dieses Verfahrens mittlerweile gesunken sind [95], ist es dennoch vergleichsweise teuer und trotz des in kurzer Zeit gewonnenen enormen Datenvolumens relativ aufwendig.

Da für die epidemiologische Analyse von Vancomycin-resistenten Enterokokken im Rahmen dieser Dissertation die Diskrimination der MLST ausreichend ist, entschied man sich gegen *WGS*. Enterokokken-Analysen mittels *WGS* sind mittlerweile jedoch

Bestandteil aktueller Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Dr. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am Universitätsklinikum Regensburg (UKR).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Vancomycin-resistente Enterokokken, vor allem die Spezies *E. faecium*, gehören weltweit sowie speziell auch in Deutschland mittlerweile zu den wichtigsten multiresistenten nosokomialen Pathogenen. Im Rahmen von Analysen der Populationsstruktur von *E. faecium* wurde eine phylogenetische Kluft zwischen den Hospital-assoziierten VRE und allen weiteren VRE festgestellt. Die Hospital-assoziierten VREfm haben sich sowohl durch den Erwerb von Antibiotikaresistenzen und mobiler Elemente zur Steigerung ihrer Virulenz als auch durch ihre von Natur aus hohe Tenazität hervorragend an das Krankenhaus-Umfeld adaptiert. Eine adäquate antimikrobielle Therapie, vor allem bei vornehmlich betroffenen Risikopatienten, durchzuführen, kann demnach eine große Herausforderung darstellen.

Umso wichtiger ist es, die molekulare Epidemiologie von Vancomycin-resistenten *E. faecium* besser zu verstehen, um eine weitere Verbreitung zu unterbinden und die Entwicklung effektiver Präventionsmaßnahmen zu unterstützen.

Als Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken und Enterokokken veröffentlicht das Robert Koch-Institut (RKI, Bereich Wernigerode) im Epidemiologischen Bulletin regelmäßig aktuelle Daten und Informationen zu Vancomycin-resistenten Enterokokken in deutschen Krankenhäusern.

In dieser Dissertation soll speziell für das Universitätsklinikum Regensburg sowie den Großraum Regensburg die molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken in den Jahren 2009 und 2010 retrospektiv untersucht werden. Neben dieser Arbeit beschäftigen sich noch weitere Dissertationen der Arbeitsgruppe mit den VRE-Proben des UKR, welche ab dem erstmaligen Auftreten klinikinterner VRE-Fälle im Jahr 2004 systematisch asserviert worden waren.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung die Ausbreitung bestimmter MLSTypen (zusätzlich anhand Glykopeptidresistenzgen sowie Virulenzmarker unterschieden) am UKR und im Großraum Regensburg zu analysieren. Dabei soll vor allem die Verteilung der Sequenztypen auf einzelne Abteilungen bzw. Stationen des UKR betrachtet werden.

So sollen die Ergebnisse dieser Dissertation nationalen und internationalen Studien gegenübergestellt werden, um Aussagen über Verteilung und Akkumulation einzelner MLSTypen in den Jahren 2009 und 2010 am UKR und im Großraum Regensburg treffen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die hier aufgeführten Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien, Kulturmedien, Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Kits, Puffer und Lösungen, Primer, Proben sowie Software und Datenbanken wurden zum Ausführen der Labortätigkeiten im Rahmen dieser Dissertation verwendet.

2.1.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Kits

Chemikalie, Kit	Hersteller
Universalagarose	Bio&SELL GmbH (Feucht, Deutschland)
Glycerol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Trihydroxyaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Na ₂ EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ampli Taq Gold® DNA Polymerase	Life Technologies (Austin, USA)
10 mM dNTP Set	Life Technologies (Austin, USA)
MgCl ₂ Solution	Life Technologies (Austin, USA)
10x PCR Buffer II	Life Technologies (Austin, USA)
Primer (50 µM) (s. Tabelle 3)	Metabion International AG (Planegg, Deutschland)
Proteinase K	QIAGEN (Venlo, Niederlande)
O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
QIAmp® DNA Mini Kit (250)	QIAGEN (Venlo, Niederlande)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
5x TBE-Puffer	10,8 g Tris 5,5 g Borsäure 4 ml 0,5 M Na ₂ EDTA <i>Aqua bidest. ad 1000 ml</i>
10 x Loading Dye	250 mg Bromphenolblau 33 ml 150 mM Tris 60 ml Glycerol 7 ml <i>Aqua bidest.</i>
Universalagarosegel 1,0 %	0,6 g Universalagarose 60 ml 1x TBE-Puffer

2.1.3 Kulturmedien

Zur Kultivierung der Bakterien wurde neben Columbia-Agarplatten mit Schafsblut der Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, Deutschland) zudem eine flüssige Nährbouillon verwendet. Jene (*BBL Enterococcosel Broth* der Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)) wurde in der Nährbodenküche des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg angesetzt: 43g *BBL Enterococcosel Broth*, 8 µg/ml Vancomycin, 1000 ml *Aqua bidest.*

2.1.4 Vancomycin-resistente Enterokokken-Stämme

Untersucht wurden für diese Arbeit 95 VRE-Stämme. Neben dem Universitätsklinikum Regensburg beauftragten in den Jahren 2009 und 2010 auch andere Kliniken des (süd-)östlichen Bayerns das Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg, ansässig am UKR, mit der bakteriologischen Untersuchung verschiedenen Materials. VRE-positive Proben wurden anschließend in der Stammsammlung des Instituts bei -80 °C aufbewahrt. Eine genauere Beschreibung der Kohorte findet sich in der Darstellung der eigenen Versuche (3.).

2.1.5 Primer

Tabelle 6: Verwendete Primer

Primer	Ausrichtung	Nukleotidequenz 5' → 3'	Quelle
<i>vanA</i>	forward	GGA GTA GCT ATC CCA GCA TT	Klare <i>et al.</i> [24]
	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>adK</i>	forward	GAA CCT CAT TTT AAT GGG G	Homan <i>et al.</i> [90]
	reverse	TGA TGT TGA TAG CCA GAC G	
<i>atpA</i>	forward	TTC AAA TGG CTC ATA CGG	
	reverse	AGT TCA CGA TAA GCA ACA GC	
<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>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>purK</i>	forward	CAG ATT GGC ACA TTG AAA G	
	reverse	TTC ATT CAC ATA TAG CCC G	
<i>hyl</i>	forward	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG	Vankerck- hoven <i>et al.</i> [30]
	reverse	GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA	
<i>esp</i>	forward	AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G	Leavis <i>et al.</i> [26]
	reverse	AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG	
<i>espA</i>	forward	CGA CCG ATT TAG CAG TAA C	Nallapareddy <i>et al.</i> [96]
	forward	CGA CCG ATT TAG CAG TAA C	
<i>acm</i>	forward	GGC CAG AAA CGT AAC CGA TA	
	reverse	AAC CAG AAG CTG GCT TTG TC	

2.1.6 Laborgeräte

Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Brutschrank (35 °C)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau, Deutschland)
Pipetman (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Inc. (Middleton, USA)
Repetman	Gilson, Inc. (Middleton, USA)
Multipette Plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Research Pro (0,5 - 10 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipet-Lite LTS (2 - 20 µl)	RAININ Instrument LLC (Oakland, USA)
Transferpette -12 (20-200 µl)	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Dispensette S (10 ml)	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Magnetrührer	IKA Works, Inc. (Wilmington, USA)
Vortex-Schüttler	VELP Scientifica (Usamate Velate, Italien)
MS1 Minishaker	IKA Works, Inc. (Wilmington, USA)
Tischzentrifuge	POLY-LABO (Straßburg, Frankreich)
Centrifuge 5804	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research, Inc. (St. Bruno, Kanada)
Digital Graphic Printer	Sony (Tokio, Japan)
Agarose-Gelelektrophoresekammern	PeqLab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)
Alphamager HP	ProteinSimple (San Jose, USA)
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Kühlschrank MediLine (4 °C)	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Gefrierschrank MediLine (-20 °C)	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Gefrierschrank Comfort (-20 °C)	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Gefrierschrank Hera Freeze (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Moulinex Compact Mikrowelle	Krups GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)

NucleoVac 96 Vacuum Manifold	Macherey&Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Waage	Gottl. KERN & Sohn GmbH (Albstadt, Deutschland)
Ziegra Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)
BD-Phoenix-System	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
<i>MALDI-TOF</i> -Massenspektrometer	Bruker Corporation (Billerica, USA)

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Protein LoBind Tube (1,5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikro-Schraubröhre (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
PCR Cups SoftStrips (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)
NucleoFast®96 PRC Plates	Macherey&Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Falcon	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexiko)
Combitips advanced (1 ml; 2,5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Biosphere Filter Tips (0,1-10 µl; 2-20 µl; 2-200 µl; 100-1000 µl)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
SurPhob (100 µl)	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)
BioClean Universal Tips (10 µl)	RAININ Instrument LLC (Oakland, USA)
Einmal-Impfösen	VWR International (Radnor, USA)
Microbank	Pro-Lab Diagnostics (Richmond Hill, Kanada)
Laborglasflasche pressure plus	Schott Duran GmbH (Wertheim, Deutschland)
Messzylinder (100 ml, 200 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Deutschland)
Erlenmeyerkolben (300 ml)	VWR International (Radnor, USA)

Laborflasche mit Schraubverschluss (100 ml, 1000 ml)	VWR International (Radnor, USA)
Neo-Touch Gloves	Ansell Healthcare Europe (Brüssel, Belgien)

2.1.8 Fremdlabor zur DNA-Sequenzierung

Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH (Regensburg, Deutschland)

2.1.9 Software und Datenbanken

Tabelle 9: Verwendete Software und Datenbanken

Software, Datenbank	Hersteller, Entwickler
Alphalmager HP (3.4.0)	ProteinSimple (San Jose, USA)
NanoDrop 1000 (3.8)	Nanodrop Technologies, Inc. (Wilmington, USA)
Gene Runner (4.0.9.63 Beta)	Frank Buquicchio, Michael Spruyt
Chromas Lite (2.1.1)	Technelysium Pty Ltd (Brisbane, Australien)
Excel 2016	Microsoft (Redmond, USA)
PubMLST: http://pubmlst.org/perl/bigfdb/bigfdb.pl?db=pubmlst_efaecium_seqdef (Stand 26.07.2019)	Keith Jolley

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht über die Methodik

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der molekularen Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken, vor allem der Spezies *E. faecium*, am Universitätsklinikum Regensburg in den Jahren 2009 und 2010.

2009 und 2010 gab es zwei Möglichkeiten, mit denen VRE-positive Proben identifiziert werden konnten: den kulturellen Nachweis aus klinischem Material oder das gezielte Screening von Patienten. Genauere Informationen zu jenen Prozessen finden sich unter 2.2.2.1 und 2.2.2.2.

Bei diagnostisch gesichertem VRE wurde dieser in die Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg aufgenommen und bei -80 °C aufbewahrt.

2017 wurden die Proben dann aufgetaut und bezüglich verschiedener Charakteristika wie Bakterienspezies, Resistenz (phänotypisch sowie genetisch) und Virulenzmarker untersucht und typisiert (Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung).

2.2.2 VRE-Diagnostik in den Jahren 2009 und 2010

2.2.2.1 VRE-Nachweis aus klinischem Material

Wird eine Infektion vermutet, so stellt die Kultivierung der im Probenmaterial erhaltenen Bakterien auch bei Enterokokken eine Nachweismöglichkeit dar. Auch 2009 und 2010 wurde diese Methode angewandt. Die Bestimmung der Bakterienpezies erfolgte anschließend durch die *MALDI-TOF*-Massenspektroskopie. Auch die antimikrobielle Empfindlichkeit der einzelnen Erreger gegen verschiedene Antibiotika wurde durch das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren (BD-PHOENIX-System) getestet, wobei sich an den damals gültigen Richtlinien des *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* für Resistenztestung orientiert wurde. Wurde dann ein *E. faecium* identifiziert, der sich gegenüber Vancomycin resistent oder intermediär verhielt, so wurde die MHK für Vancomycin (und in Zuge dessen auch für Teicoplanin) mittels eines Epsilomertests bestimmt. Bei diesem Agardiffusionstest wird ein Teststreifen, der mit Vancomycin von exponentiell steigender Konzentration getränkt ist, auf einer

beimpften Agarplatte für 24 Stunden inkubiert. Die MHK kann dann an der Schnittstelle der bakteriellen Hemmhof-Ellipse mit dem Teststreifen abgelesen werden.

Neben der phänotypischen Antibiotikaresistenz wurde zudem die genotypische Resistenz über Vorliegen der Resistenzgene *vanA* und *vanB*, selten auch *vanC*, untersucht. Hierzu wurden Polymerasekettenreaktionen durchgeführt. Stellte sich ein kultivierter Stamm als VRE heraus, wurde er in der Stammsammlung des Instituts bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 VRE-Nachweis aus Screening

Neben dem kulturellen VRE-Nachweis, der beim Verdacht einer Infektion des Patienten verwendet wurde, wurde zudem noch ein VRE-Screening durchgeführt. Folgende Patientenklientel war Ziel des Screenings: Patienten mit anstehender Knochenmarktransplantation wurden auf Station 21 neben anderen multiresistenten Erregern auch auf VRE untersucht. Wurden auf anderen Stationen Patienten mit bekanntem VRE-Trägerstatus aufgenommen, so wurden auch diese getestet. Zudem wurden Kontaktpatienten gescreent. Im Falle eines VRE-Ausbruchs wurde eine gesamte Station auf den Erreger getestet.

Entsprechendes Probenmaterial wurde durch Anal-, Perianal-, Genital-, Wund-, Ileostomaabstriche sowie einmalig durch Drainage gewonnen. Das Probenmaterial wurde in eine spezielle VRE-Nährbouillon eingerührt, welche 8 µg/ml Vancomycin enthielt, um nur das Wachstum resistenter Erreger zu erreichen. Außerdem enthielt die Bouillon Aesculin sowie Eisen(III)Ionen. Die erfolgreiche Inkubation (über Nacht bei 35 °C) wurde durch einen Farbumschlag von gelb-braun nach grün-schwarz angezeigt. Dieser Farbumschlag beruht auf der Fähigkeit des Enterokokkus mithilfe der von ihm gebildeten β -Glukosidase Aesculin zu hydrolysieren. Als Spaltprodukte entstehen Glukose und Aesculetin, wobei Aesculetin mit Eisen(III)-Ionen schwärzliche Komplexe bildet.

Bei somit phänotypisch positivem VRE-Befund wurden zudem mittels PCR die Enterokokkenspezies (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarium*) sowie die vorhandenen Resistenzgene (*vanA* und *vanB*) analysiert. War in der Bouillon ein

phänotypisch und genotypisch Vancomycin-resistenter *E. faecium* enthalten, wurde die Bouillon der VRE-Stammsammlung hinzugefügt und bei -80 °C verwahrt (siehe Abbildung 7).

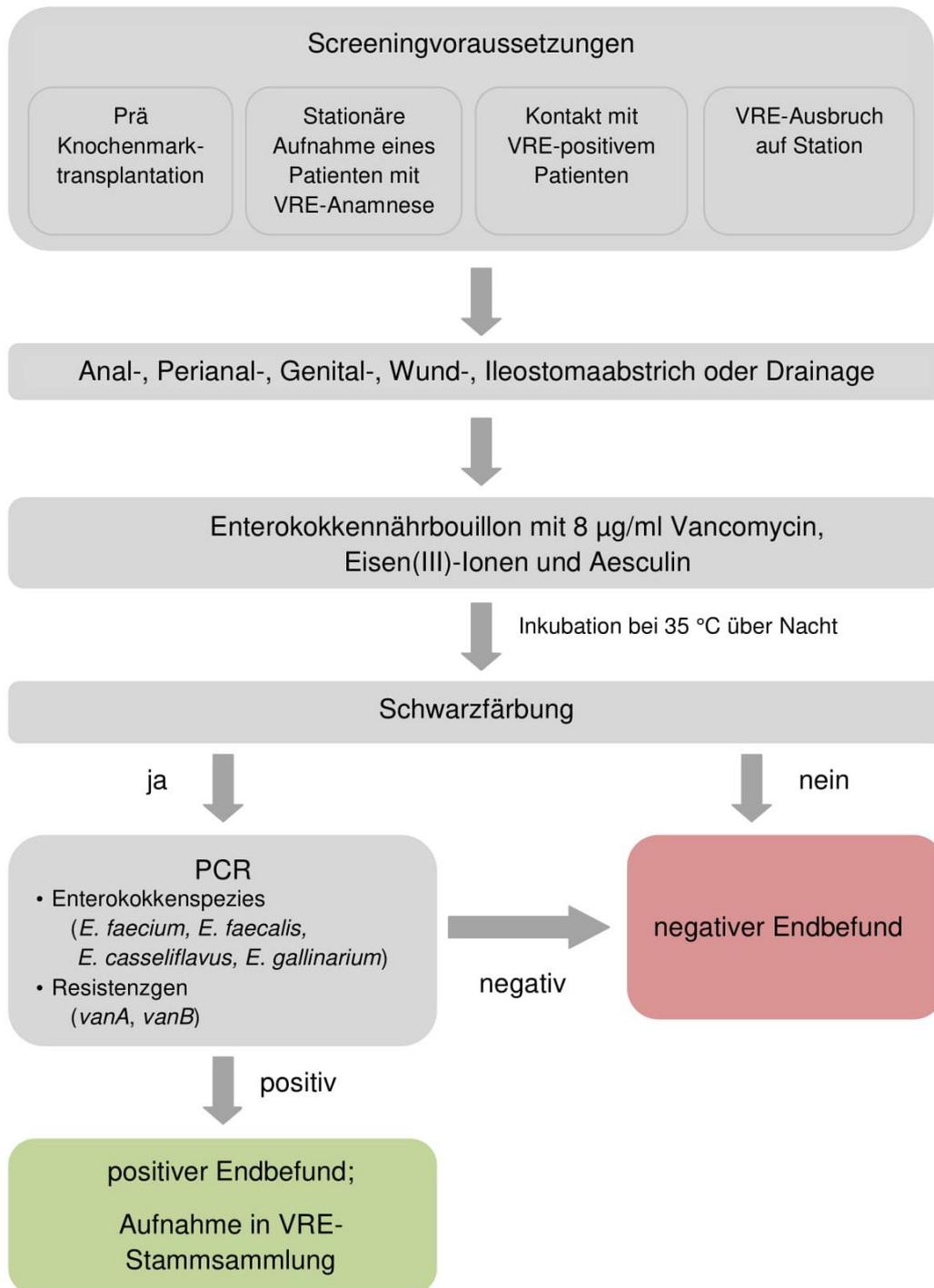


Abbildung 7: Prozesskette VRE-Screening 2009/2010

2.2.3 VRE-Analysen im Jahr 2017

2.2.3.1 Kultivierung der Bakterien

Nachdem 2009 und 2010 die dieser Arbeit zugrunde liegenden Proben untersucht und als VRE bestätigt worden waren, wurden diese in der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg bei -80 °C aufbewahrt. Als Träger dienten dabei Plastikpellets in entsprechenden Sammelröhrchen.

Da zur Versuchsdurchführung 2017 Einzelkolonien notwendig waren, wurde zur Anzucht der Bakterien je ein Plastikpellet in eine spezifische Nährbouillon gegeben und die Bakterien wurden über Nacht bei 35 °C bebrütet. Am darauf folgenden Tag wies ein Farbumschlag von gelb-braun nach grün-schwarz auf die erfolgreiche Kultivierung der Bakterien hin und jene wurden auf Columbia-Blutagarplatten aufgetragen. Es erfolgte eine erneute Inkubation über Nacht bei 35 °C.

Tags darauf wurden die Agarplatten auf spezifisches Wachstum überprüft. Wurden mehrere verschiedene Erreger auf dem Medium erkannt, wurde erneut abgeimpft, ausgestrichen und inkubiert bis erkennbar eine Einzelkolonie vorlag, mit der die nachfolgenden Versuche durchgeführt werden konnten.

2.2.3.2 Keimidentifizierung mittels *MALDI-TOF-MS*

Der Nachweis, dass es sich bei den untersuchten Erregern um die Spezies *E. faecium* handelt, wurde mittels *MALDI-TOF* (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation - Time Of Flight*)-Massenspektroskopie erbracht.

Dabei verdampfen in einer Matrixlösung eingebettete Bakterien mithilfe eines Laserstrahls und zu analysierende Erregerproteine werden ionisiert. Die Ionen werden im Vakuum beschleunigt und ihre Flugzeit wird gemessen, wobei kleinere, leichtere Ionen schneller auf dem Detektor aufkommen. Die eintreffenden Signale werden dann zu einem Massenspektrum umgeschrieben. Jede Bakterienspezies verfügt über ein individuelles Spektrum, einen unikalen "molekularen Fingerabdruck" [97]. Abschließend wird das erhaltene Spektrum mit einer im System integrierten Datenbank verglichen und somit die bakterielle Spezies festgestellt. [97, 98]

2.2.3.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mithilfe des BD-PHOENIX-Systems

Da in den Jahren 2009 und 2010 nur bei kulturellem VRE-Nachweis die MHK-Bestimmung für Vancomycin (und Teicoplanin) erfolgte, wurden 2017 die fehlenden MHK der Screening-Isolate bestimmt, um ein vollständiges MHK-Profil aller VRE-Stämme zu erhalten. Auch Stämme, deren MHK für Vancomycin 2009/2010 als intermediär oder gerade noch resistent bewertet wurde, wurden 2017 ebenfalls mit dem vollautomatischen System BD-Phoenix untersucht.

Der Automat bedient sich dazu des Bouillon-Mikrodilutionsverfahrens, bei welchem Bakterien in einem flüssigen Medium anhand Verdünnungsreihen abnehmenden Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt werden. Durch stete Messung der Indikatoränderung und Trübung des Nährmediums wird das Bakterienwachstum überwacht, wobei die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, bei der kein sichtbares Wachstum mehr auftritt, als minimale Hemmkonzentration bestimmt wird. Der festgestellte MHK-Wert wird anschließend von der Software des Systems interpretiert (resistent, sensibel, intermediär). [99, 100]

Im Rahmen der Interpretation der MHK-Werte wurde sich an den Kriterien der damals aktuellen *CLSI*-Richtlinien für Enterokokken orientiert [101] (s. Tabelle 10). Neben dem positiven *E. faecium*-Nachweis ist die Resistenz des einzelnen Erregers gegen Vancomycin ein maßgebliches Kriterium, um im Rahmen dieser Dissertation ausgewertet werden zu können. Intermediäre Isolate wurden in dieser Studie als resistent gehandhabt.

Tabelle 10: Interpretationskriterien der MKH-Testung nach *CLSI*-Richtlinien (2015) [101]

	MHK [$\mu\text{g/ml}$]		
	resistent	intermediär	sensibel
Vancomycin	≥ 32	8 - 16	≤ 4
Teicoplanin	≥ 32	16	≤ 8

2.2.3.4 Isolierung chromosomaler DNA

Um adäquates Material zur nachfolgenden genetischen Analyse zu erhalten, wurde chromosomale DNA aus den Bakterienisolaten extrahiert. Dies erfolgte mittels des QIAmp® DNA Mini Kit (250) nach Anleitung des Herstellers. Anschließend wurde die VRE-DNA im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3.5 PCR als Grundbaustein der genetischen Analyse der VRE-Proben

Die PCR stellt eine *in vitro*-DNA-Replikation dar und ermöglicht so die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Der zu vermehrende DNA-Abschnitt (*Template*) wird zusammen mit dNTPs, einer thermostabilen DNA-Polymerase (in diesem Fall extrahiert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*: Taq-Polymerase), MgCl₂, PCR-Puffer und *Aqua bidest.* in ein steriles Gefäß gegeben. Hinzugefügt werden des Weiteren zwei Primer, kurze Oligodesoxynukleotide, welche den Startpunkt der DNA-Polymerase darstellen. Jene Primer werden so designed, dass ihre Sequenz komplementär zu jeweils einem Teil der zu amplifizierenden Einzelstränge der Original-DNA ist.

Alle weiteren Schritte erfolgen dann in einem PCR-Cycler. So wird das bisher doppelsträngige *Template* denaturiert und in Einzelstränge getrennt.

Anschließend werden die idealen Anlagerungstemperaturen der Primer eingestellt, damit diese an die nun einzelsträngige DNA binden (= *Annealing*). Durch Regulieren der Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der DNA-Polymerase (hier 72 °C) beginnt jene nun mit der Vervielfältigung der DNA und es entstehen exakte Kopien.

Da die erläuterten Prozesse mehrmals durchlaufen werden, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des *Templates*. [102, 103]

Um die *E. faecium*-Isolate ausreichend genau typisieren zu können, wurden mit jeder einzelnen Isolat-DNA im Rahmen dieser Studie mehrere verschiedene PCR vorgenommen. So wurde eine PCR zur Bestimmung der Resistenzgene *vanA* und *vanB* durchgeführt, sieben PCR zur späteren Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung sowie PCR-Analysen zur Identifizierung der Virulenzgene *esp*, *hyl* und *acm*. Auch zur Amplifizierung der A-Repeat-Region des *esp*-Gens (*espA*) fand eine PCR statt.

Für diese Analysen wurde ein wie in Tabelle 11 beschriebenes PCR-Medium benötigt.

Tabelle 11: PCR-Ansätze. Mengenangaben pro Cup.

Reagenz	Menge	
	Ansatz für <i>vanA/vanB</i> -, MLST-, <i>esp</i> -, <i>espA</i> -, <i>acm</i> -PCR	Ansatz für <i>hyl</i> -PCR
<i>Aqua bidest.</i>	17,8 µl	13,74 µl
10 x PCR Buffer II (ohne MgCl ₂)	2,5 µl	2,0 µl
MgCl ₂ Solution	2,0 µl	1,6 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	0,5 µl
Ampli Taq Gold® DNA Polymerase	0,2 µl	0,16 µl
Forward Primer (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl
DNA	1,0 µl	1,0 µl
gesamt	25 µl	20 µl

Da stets mehrere PCR-Analysen parallel abliefen, wurden die Mengen der einzelnen Ingredienzen während der Vorbereitung entsprechend multipliziert. Demnach wurde erst ein großer Mastermix angesetzt, der alle Bestandteile, ausgenommen der jeweiligen Primer und der DNA, enthielt. Nachdem dieser 5 Sekunden lang gevortext, zentrifugiert und in entsprechende Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt worden war, wurden jedem großen Mastermix die jeweiligen PCR-Primer hinzugefügt. Der somit entstandene kleine Mastermix wurde erneut gevortext, zentrifugiert und auf PCR-Cups verteilt (Fassungsvermögen 0,2 ml). Abschließend wurde jedem Gefäß 1 µl der Isolat-DNA hinzugegeben. Um potentielle, durch Verunreinigung entstandene, falsch-positive Ergebnisse feststellen zu können, wurde jeder PCR eine Negativkontrolle mit 1 µl Wasser statt DNA hinzugefügt.

Nach erneutem Zentrifugieren erfolgte die PCR dann im PTC-200 Thermal Cycler gemäß den in Tabelle 12 angegebenen Zeiten und Temperaturen. Lediglich die Amplifizierung von *espA* fand mithilfe eines alternativen Programms (siehe Tabelle 13) statt.

Tabelle 12: Cyclerprogramm für *vanA/vanB*-, MLST-, *esp*-, *hyl*-, *acm*-PCR

Reaktionsschritte	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung der Primerbindungen	95 °C	5 min
2. DNA-Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Primer- <i>Annealing</i>	55 °C	30 sec
4. Extension	72 °C	30 sec
5. Wiederholung 2.-4.		36 Wiederholungen
6. Synthese von Doppelsträngen	72 °C	5 min
7. Aufbewahrung	4 °C	endlos

Tabelle 13: Cyclerprogramm für *espA*-Amplifizierung

Reaktionsschritte	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung der Primerbindungen	95 °C	9 min
2. DNA-Denaturierung	94 °C	50 sec
3. Primer- <i>Annealing</i>	52 °C	50 sec
4. Extension	72 °C	60 sec
5. Wiederholung 2.-4.		35 Wiederholungen
6. Synthese von Doppelsträngen	72 °C	5 min
7. Aufbewahrung	4 °C	endlos

2.2.3.5.1 *vanA*- und *vanB*-PCR

Am Anfang der Versuchsreihe wurden die Glykopeptidresistenzgene *vanA* und *vanB* amplifiziert, wobei hierzu eine Multiplex-PCR durchgeführt wurde. Auf diesem Weg konnte das Vorhandensein eines der beiden Resistenzgene mit nur einer PCR überprüft werden. Neben einer Negativkontrolle wurde im Rahmen dieser PCR eine doppelt-positive DNA als Positivkontrolle hinzugefügt.

2.2.3.5.2 MLST-PCR: Amplifizierung der Haushaltsgene

Um eine Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung der einzelnen Isolate vornehmen zu können, mussten primär Fragmente folgender sieben Haushaltsgene (nach Homan *et al.* [90]) mittels PCR vervielfältigt werden:

- Adenylatkinase (*adK*)
- ATP-Synthase (α -Untereinheit) (*atpA*)
- D-Alanin-D-Alanin-Ligase (*ddl*)

- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*gdh*)
- Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gyd*)
- *Phosphat ATP-binding cassette Transporter (pstS)*
- ATPase-Untereinheit der Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase (*purK*)

Informationen zu Aufreinigung der MLST-Amplifikate, DNA-Sequenzierung und Auswertung sind in 2.2.3.8 bis 2.2.3.10 enthalten.

2.2.3.5.3 PCR zum Nachweis der Virulenzmarker *hyl* und *esp* sowie *espA*- und *acm*-PCR

Die Hyaluronidase, das *enterococcal surface protein* und das Kollagenbindende Adhäsın können als Virulenzmarker - neben des Sequenztyps - zur weiteren Unterscheidung von Bakterienstämmen herangezogen werden.

So wurde mit den hier beschriebenen Polymerasekettenreaktionen das Vorhandensein der Virulenzgene *hyl*, *esp* und *acm* überprüft. Bei einem negativen Ergebniss für *hyl* und *esp* wurde die PCR wiederholt, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Die *esp*-PCR diene lediglich dem Nachweis des *esp*-Gens. Wurde ein Isolat als *esp*-positiv identifiziert, erfolgte im Anschluss an die *esp*-PCR die *espA*-PCR zur Amplifizierung der A-Repeat-Region, da anschließend zur weiteren Differenzierung der VRE-Stämme die Anzahl der Tandemrepeats der A-Region untersucht werden sollte.

2.2.3.6 Gelelektrophorese

Um die erfolgreiche Amplifizierung der DNA-Sequenzen nachzuweisen, wurde die Gelelektrophorese verwendet. Diese stellt eine Methode zur Auftrennung geladener Moleküle nach deren Größe und Ladung dar.

Die Trennung beruht auf der Wanderung der Moleküle durch ein elektrisches Feld. In diesem Fall laufen negativ geladene DNA-Fragmente zur positiv geladenen Anode. Die Agarosegelmatrix, in der dieses Verfahren stattfindet, variiert je nach Konzentration in ihrer Porengröße, sodass die DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt werden. Die Wandergeschwindigkeit jener Fragmente nimmt mit steigender Molekülgröße und Gelkonzentration ab. Soll mit der Gelelektrophorese die unbekannte Länge eines DNA-Fragments ermittelt werden, wird des Weiteren ein Größenstandard hinzugegeben. Dieser Standard enthält Fragmente bekannter Länge und dient somit als Maß. [102]

Zur Herstellung eines 1 % (2 %) - Agarosegels wurden 0,6 g (1,2 g) Universalagarose zusammen mit 60 ml 1xTBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle zu einem flüssigem Gel erhitzt. Um die DNA später im Geldokumentationssystem sichtbar machen zu können, wurde das Gel zudem mit 200 µl Ethidiumbromidlösung (Fluoreszenzfarbstoff) versetzt. Das Gel wurde anschließend in Elektrophoresekammern gefüllt und mit 1xTBE-Puffer bedeckt, nachdem es erkaltet war.

Um das Absinken der PCR-Produkte in die Gelkammern sicherzustellen, wurden jene (je 5 µl der einzelnen MLST-PCR-Produkte, je 12 µl aller anderen einzelnen PCR-Produkte) mit je 2 µl Loading Dye auf einer Kunststoffplatte vermengt. Das entstandene Gemisch wurde anschließend jeweils in je eine Geltasche pipettiert. Zudem wurde jedem Gel eine Negativkontrolle hinzugefügt. Enthielten die Taschen Produkte aus der *vanA/vanB*- oder *espA*-PCR, wurde jeweils eine Tasche je Gel außerdem mit einer spezifischen Positivkontrolle beladen.

Natürlich wurden als Referenz der DNA-Fragmentlängen auch entsprechende Größenstandards verwendet: 100 bp DNA Ladder (*vanA/vanB*) und 1 kb Plus DNA Ladder (MLST, *hyl*, *esp*, *espA* und *acm*), je 10 µl.

Die Elektrophorese erfolgte bei 1 %-Gel mit 80 V über ca. 45 min, bei 2 %-Gel über 60-75 min.

2.2.3.7 Fotodokumentation und Gelauswertung

Visualisiert und dokumentiert wurden die Gelläufe mithilfe von UV-Licht, mit dem Geldokumentationssystem Alphamager HP.

Als erfolgreiches PCR-Ergebnis wurden vorhandene DNA-Banden der erwarteten Länge sowie korrekte Negativ-/Positivkontrollen gewertet.

Während das Vorhandensein einer Bande bei den MLST-PCR lediglich als Amplifizierungsnachweis interpretiert werden konnte und deren Produkte vor der endgültigen Auswertung erst noch sequenziert werden mussten, war die Auswertung der Gele mit den *vanA/vanB*-, *hyl*-, *esp*-, *espA*- und *acm*-Produkten sofort möglich.

Eine gesamte Auflistung der Gene, Cyclerprogramme, Prozentangaben der Elektrophoresegele, Elektrophoresedauer, verwendeter Größenstandards, Sequenzlängen sowie die Anzahl der internen Repeats in der Region A des *esp*-Gens ist in Tabelle 14 dargestellt.

2.2.3.8 Aufreinigung der MLST-Amplifikate

Die nachfolgende Sequenzierung der erhaltenen DNA-Fragmente erforderte die Beseitigung aller Reagenzien, die nach der PCR noch mit dem *Template* vermischt waren.

Dazu wurde jeweils das vollständige PCR-Produkt zusammen mit je 80 µl *Aqua bidest.* in ein Well der NucleoFast®96 PRC-Platte gegeben und 12 min mithilfe des NucleoVac 96 Vacuum Manifold filtriert. So wurden überschüssige Primer, Nukleotide, *Taq*-Polymerase, Puffersubstanzen und sonstige Reagenzien von der DNA getrennt.

Um die DNA von der Filtermembran zu lösen, wurden 40 µl *Aqua bidest.* hinzugefügt. Nachdem die gesamte Platte nach einer dreiminütigen Ruhezeit gevortext worden war, wurde die aufgereinigte DNA aus den Wells in neue PCR-Cups überführt.

Tabelle 14: Auflistung aller amplifizierten Gene mit Cyclerprogramm, Elektrophoresegel [%], Elektrophoresedauer, Größenstandard, Sequenzlänge sowie die Anzahl der internen Repeats des *espA*-Gens.

Gen	Cyclerprogramm	Gel [%]	Elektrophoresedauer [min]	Größenstandard	Sequenzlänge [bp]	
<i>vanA</i>	s. Tabelle 12	2	60 - 75	100 bp DNA Ladder	377	
<i>vanB</i>	s. Tabelle 12	2	60 - 75	100 bp DNA Ladder	298	
<i>adK</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	437	
<i>atpA</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	556	
<i>ddl</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	456 - 465	
<i>gdh</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	530	
<i>gyd</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	395 - 398	
<i>pstS</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	583	
<i>purK</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	492	
<i>hyl</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	276	
<i>acm</i>	s. Tabelle 12	2	60 - 75	1 kb Plus DNA Ladder	ca. 120	
<i>esp</i>	s. Tabelle 12	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder	510	
<i>espA</i>	s. Tabelle 13	1	~ 45	1 kb Plus DNA Ladder		Repeatanzahl
					185	0
					437	1
					689	2
					941	3
					1193	4
					1445	5
1697	6					

2.2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der MLST-PCR-Produkte erfolgte durch die Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH (Regensburg, Deutschland).

Um optimale Sequenzen zu erhalten, sollten laut dem beauftragten Labor zwischen 40 und 80 ng DNA in jedem Sequenzieransatz enthalten sein. Um dies garantieren zu können, wurde deshalb vor Herstellung des Ansatzes die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer gemessen.

Der Sequenzieransatz bestand demnach pro Cup aus 40 bis 80 ng DNA sowie 1 μ l des entsprechenden Reverse Primers (6 μ M) und einer so großen Menge Wasser bis ein Gesamtvolumen von 8 μ l erreicht wurde.

Erfahrungsgemäß wurden Reverse Primer verwendet, da jene bessere Ergebnisse lieferten. Um auch für das etwas längere *pstS*-Gen eine vollständige Nukleotidabfolge zu erhalten, war es erforderlich, zum bereits beschriebenen Sequenzieransatz noch zusätzlich einen zweiten Ansatz mit Forward Primer (6 μ M) anstelle des Reverse Primers herzustellen.

Anschließend wurden die Sequenzieransätze zur Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH gesendet.

2.2.3.10 Auswertung der Sequenzierungen mithilfe der Datenbank PubMLST

Die von der Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH erhaltenen Datensätze wurden mit dem Programm Chromas Lite geöffnet und analysiert.

Wie im Punkt 2.2.3.9 erwähnt, wurden zwei Sequenzieransätze zur Analyse des *pstS*-Gens zum Labor geschickt. Ein Ansatz enthielt den Forward Primer, der andere den Reverse Primer. So wurden pro *pstS*-Gen zwei Sequenzteile erhalten, welche jeweils von den „entgegengesetzten Genenden“ analysiert worden waren. Um auch das *pstS*-Gen einem Allel zuordnen zu können, war es deshalb notwendig aus beiden Sequenzteilen eine vollständige Sequenz zu generieren. Dieser Schritt wurde mit dem Analyseprogramm Gene Runner vollzogen.

Die Zuordnung der Sequenzen zu den entsprechenden Allelen fand mithilfe der kuratierten Datenbank PubMLST (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_efaecium_seqdef&page=sequenceQuery, Stand 26.07.2019) statt.

Für eine Aufstellung der Anzahl der verschiedenen Allelvarianten siehe Tabelle 15.

Letztendlich entstand dann für jede Probe ein siebenstelliges Allelprofil, bestehend aus den einzelnen Allelen der Genloki *adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS* und *purK*.

Anhand dieses Allelprofils erfolgte abschließend die Definierung des Sequenztyps ebenfalls über PubMLST (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_efaecium_seqdef&page=profiles&scheme_id=1, Stand 26.07.2019).

Tabelle 15: Haushaltsgene und die Anzahl ihrer verschiedenen Allelvarianten. Stand 26.07.2019. [104]

Gen	Produkt	Anzahl der Allelvarianten
<i>adK</i>	Adenylatkinase	59
<i>atpA</i>	ATP-Synthase (α -Untereinheit)	117
<i>ddl</i>	D-Alanin-D-Alanin-Ligase	109
<i>gdh</i>	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	91
<i>gyd</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	68
<i>pstS</i>	<i>Phosphat ATP-binding cassette Transporter</i>	147
<i>purK</i>	ATPase-Untereinheit der Phosphoribosyl-aminoimidazol-Carboxylase	111

2.2.4 Datenerhebung

2.2.4.1 Patientendatenerhebung und Pseudonymisierung

Die für diese Studie notwendigen Anforderungsscheine samt Patientendaten und Originalbefunde aus den Jahren 2009 und 2010 stammen aus dem Laborinformationssystem des Universitätsklinikums Regensburg.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die gewonnenen sensiblen Patientendaten folgendermaßen pseudonymisiert: der dritte Buchstabe des Nachnamens und die Buchstabenanzahl des Nachnamens wurden mit dem dritten Buchstaben des Vornamen und der Länge des Vornamen kombiniert, sodass sich ein vierstelliger Code aus zwei Buchstaben sowie zwei Zahlen ergab. Bestand ein Name aus mehr als neun Buchstaben, so wurde die Zahl 0 vermerkt. Umlaute wurden wie zwei Buchstaben gezählt, bei Doppelnamen wurde stets nur der erste Namensteil gewertet. Etwaige Titel oder Namenszusätze wurden nicht berücksichtigt.

2.2.4.2 Auswertungsmodul und Auswertungsparameter

Alle gewonnenen Ergebnisse, sei es die der Laboranalysen oder die der Anforderungsscheine bzw. Originalbefunde, wurden in einer Excel-Tabelle gesammelt.

Folgende Parameter waren in der Tabelle als Spalten erhalten: eine innerhalb dieser Dissertation erstellte Nummerierung der Proben, die Stammmnummer der Proben, das Pseudonym, Geburtsmonat und -jahr sowie Alter des Patienten bei positivem VRE-Befund in den Jahren 2009/2010 und das Geschlecht (männlich, weiblich, unbekannt).

Von den Originalbefunden wurden in die Tabelle die Parameter Bakteriengattung (*E. faecium*, *E. faecalis*), vorhandenes Resistenzgen (*vanA*, *vanB*, *vanC*), MHK-Werte für Vancomycin sowie für Teicoplanin, Resistenzbewertung für Vancomycin und Teicoplanin (resistent, intermediär, sensibel) sowie Befunddatum (Tag, Monat, Jahr) übernommen.

Die Herkunft der 2009/2010 untersuchten Proben wurde mithilfe der Spalten einsendendes Krankenhaus, Abteilung, Station, Stationsnummer sowie Art der Station (Intensiv- oder Normalstation) spezifiziert. Zudem wurde die Art der Materialgewinnung (Screening oder invasiv-klinisch) festgehalten. Auch das gewonnene Material wurde genauer klassifiziert: Material, Materialgruppe, Organ.

Ebenso integrierte man die Laborergebnisse aus dem Jahr 2017 in die Tabelle: Kultivierungserfolg, kultivierte Spezies (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarium*, *E. casseliflavus*), Resistenzgen *vanA/vanB*, MHK-Werte für Vancomycin/Teicoplanin, Resistenzbewertung für Vancomycin/Teicoplanin (resistent, intermediär, sensibel), die Allele der Haushaltsgene *adK*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS* und *purK* einschließlich des damit einhergehenden Sequenztyps, Vorhandensein der Virulenzgene *hyl*, *acm* und *esp* sowie die *espA*-Repeatanzahl. Ob es sich bei der Probe um ein Mehrfachisolat (für Erläuterung siehe nachfolgendes Kapitel) handelt, wurde auch in Spalten eingetragen.

Zudem wurden noch Spalten eingerichtet, in denen die Übereinstimmung der Analyseergebnisse aus dem Jahr 2017 mit denen der Untersuchungen von 2009/2010 festgehalten werden konnte (Übereinstimmung Spezies/Resistenzgen/Resistenzbewertung).

Zur Auswertung aller Daten wurde ebenso das Programm Microsoft Office Excel (2007) verwendet, indem je nach Bedarf entsprechende Filter an den einzelnen Spalten angewandt wurden. Auch die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des genannten Programms sowie mit Microsoft Office Word (2007).

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl der VRE-Proben

Die in dieser Studie untersuchten VRE-Proben stammen aus den Jahren 2009 und 2010 und sind zwischenzeitlich in der VRE-Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg bei -80 °C aufbewahrt worden. In den beiden betrachteten Jahren wurden insgesamt 95 VRE-positive Proben eingefroren. Neben dem UKR selbst schickten sieben weitere Krankenhäuser im Umkreis Regensburgs Probenmaterial in das Institut am UKR. Da einer der recherchierten Anforderungsscheine weder Patienten- noch Klinikdaten enthielt und daraufhin nicht sicher zugeordnet werden konnte, ging man im Rahmen der Auswertung davon aus, dass es sich zwar um eine Probe aus einem der acht Krankenhäuser handeln müsste, jedoch zu großer Wahrscheinlichkeit um einen unbekanntem Patienten. Somit legte man fest, dass die 95 Proben von 63 Personen stammen.

In Abbildung 8 ist folgendes dargestellt: aus 88 der 95 eingefrorenen Proben konnten im Jahr 2017 Enterokokken kultiviert werden, 85 davon konnten als *E. faecium* identifiziert werden. 84 Isolate konnten weiter typisiert werden (MLSTypisierung). Von manchen Patienten waren während ihres Krankenhausaufenthaltes 2009/2010 mehrere Proben untersucht worden. Stellte man im Rahmen der Typisierung bei einem Patienten verschiedene MLSTypen fest, zählte man jeden Sequenztyp (ST) des Patienten einzeln. Handelte es sich im Untersuchungsverlauf aber immer um den selben ST, so zählte man jeweils nur das Erstisolat des ST. Alle weiteren Proben des selben ST wurden nicht gewertet, da eine Mehrfachnennung die Statistik verfälscht hätte.

Vom UKR wurden 44 Erstisolate von 42 Patienten gezählt und von den externen Krankenhäusern stammten 18 Erstisolate von 16 verschiedenen Personen.

Da in dieser Dissertation vor allem die Epidemiologie der Vancomycin-resistenten *E. faecium* (VRE_{fm}) am UKR untersucht werden soll, wird meist eine Gegenüberstellung folgender Ergebnisse stattfinden: einerseits die der Auswertung aller Proben von allen Krankenhäusern, andererseits die Auswertungsergebnisse der VRE_{fm}-Erstisolate aus dem UKR.

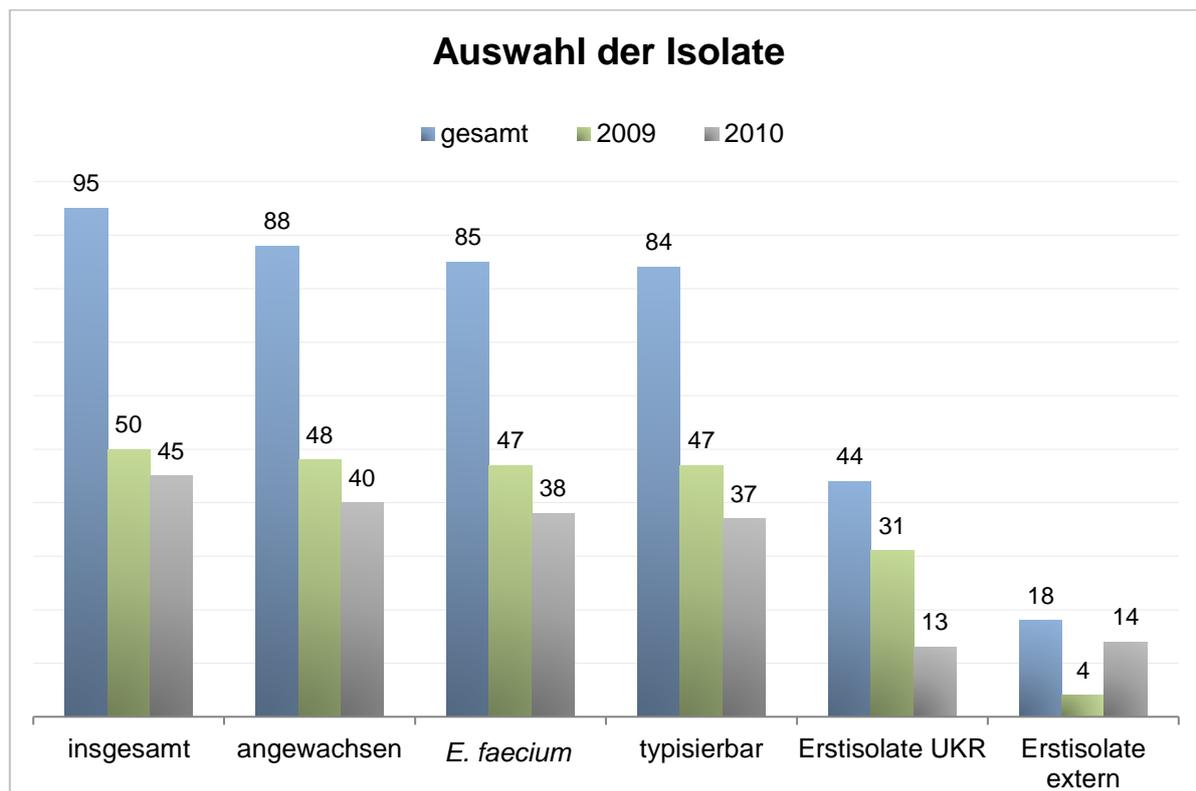


Abbildung 8: Für die Studie verfügbare Isolate. 2009/2010 waren 95 Proben eingefroren worden. Davon konnten 88 im Jahr 2017 kultiviert werden. 85 hiervon wurden als *E. faecium* identifiziert und 84 konnten typisiert werden. Aus dem UKR wurden 44 Erstisolate registriert, aus externen Krankenhäusern 18. Die Probenanzahl ist jeweils im Gesamten dargestellt sowie für die beiden Jahre 2009 und 2010.

3.2 Monatsverlauf der VRE-Fälle

Insgesamt wurden 2009 und 2010 95 VRE-positive Proben eingefroren. In die Auswertung des Jahres- bzw. Monatsverlaufs nahm man nur Proben auf, die 2017 als Vancomycin-resistenter *E. faecium* bestätigt werden konnten. Es wurde stets das Befundausgangsdatum betrachtet.

In den Jahren 2009 und 2010 wurden insgesamt 62 verschiedene Erstisolate registriert, 2009 36 und 2010 26. Jeden Monat wurden mehrere VRE nachgewiesen, lediglich im Juni 2009 und Januar 2010 nicht. Im Gesamten wurden 85 VREfm-Proben untersucht: 47 davon 2009, im Jahr 2010 38 (siehe Abbildung 9).

Vom UKR allein wurden insgesamt 63 VRE-Proben untersucht. Im Jahr 2009 mit 43 Proben mehr als doppelt so viele Proben als im Jahr 2010 (n=20). In diesen 63 Proben sind Mehrfachisolate mit inbegriffen. Auch abzüglich der Mehrfachisolate, also nur die Erstisolate betrachtend, stellt man einen Rückgang an VREfm-Proben am UKR von 31 (2009) auf 13 (2010) fest (siehe Abbildung 10).

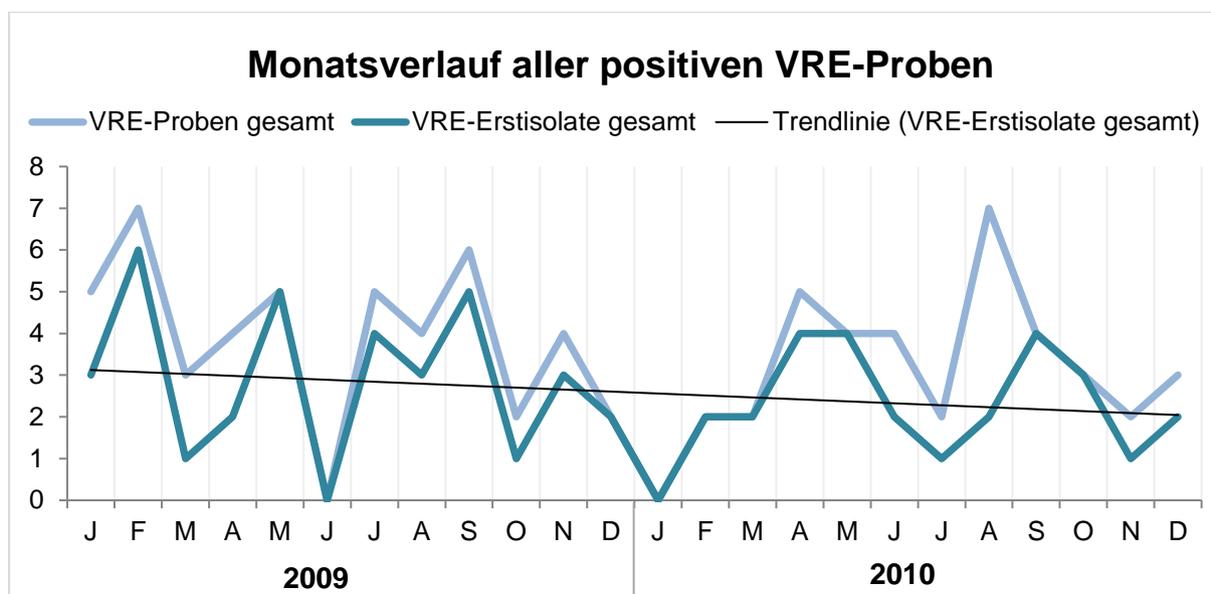


Abbildung 9: Monatsverlauf aller positiven VRE-Proben in den Jahren 2009 und 2010. Anzahl VREfm-Proben gesamt (2009: n=47; 2010: n=38; $\Sigma = 85$). Anzahl VRE-Erstisolate (2009: n=36; 2010: n=26; $\Sigma = 62$).

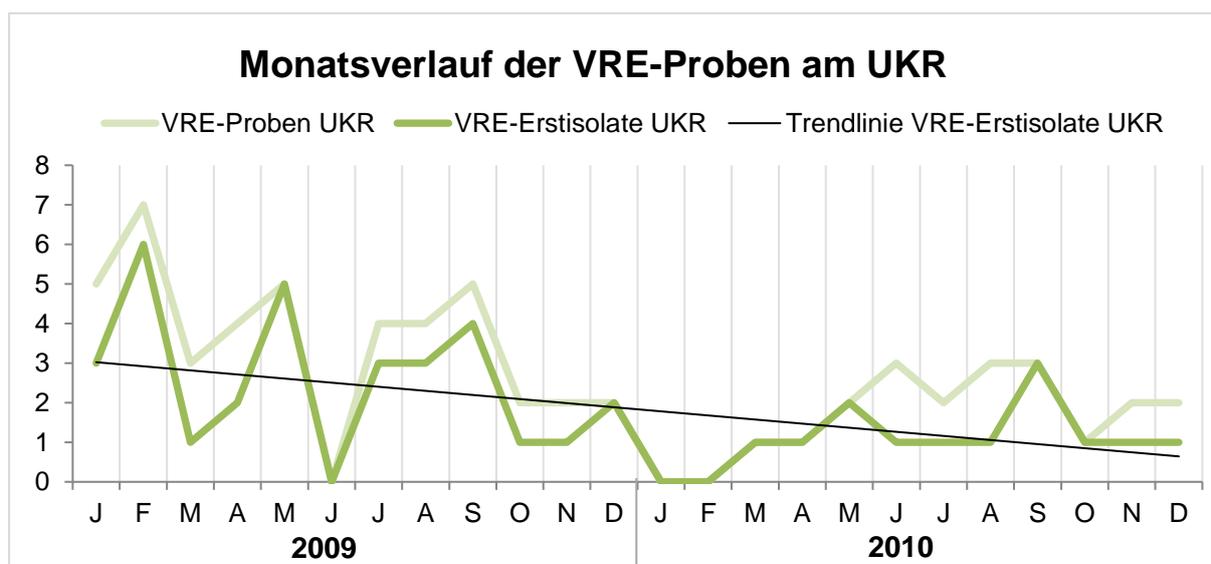


Abbildung 10: Monatsverlauf der VRE-Proben am UKR. Gesamtzahl VRE am UKR (2009: n=43; 2010: n=20; $\Sigma = 63$). Anzahl VRE-Erstisolate (2009: n=31; 2010: n=13; $\Sigma = 44$).

3.3 Geschlecht und Alter der Kohorte

Für die Auswertung von Alter und Geschlecht der Kohorte wurde jeder Patient nur einmal gezählt. Es wurden nur die Patienten gewertet, deren Isolate 2017 als VREfm identifiziert werden konnten. Für eine Untersuchung waren die erforderlichen Daten auf dem Auftragsblatt nicht angegeben worden, sodass dieses nicht in die Auswertung des Geschlechts und des Alters der Kohorte mit einfluss.

Insgesamt wurden 2009 und 2010 VRE-Nachweise von 57 verschiedenen Patienten durchgeführt. Davon waren 31 männlich und 26 weiblich (Abbildung 11).

Auch am UKR überwogen Nachweise von männlichen Patienten (23 versus 19) nur knapp (siehe Abbildung 12).

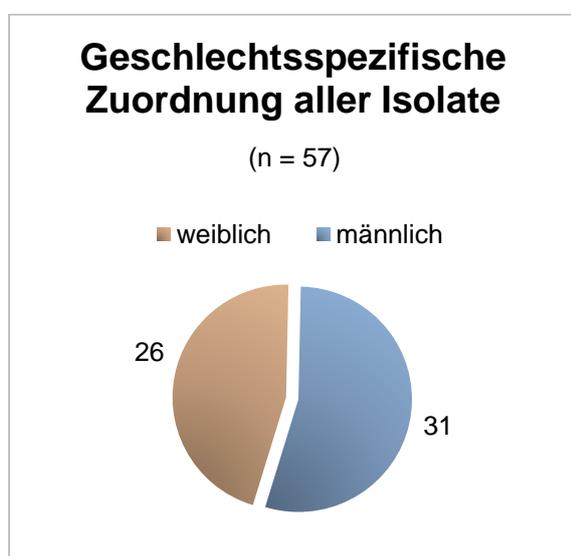


Abbildung 11: Geschlechtsverteilung aller VREfm-positiven Patienten.

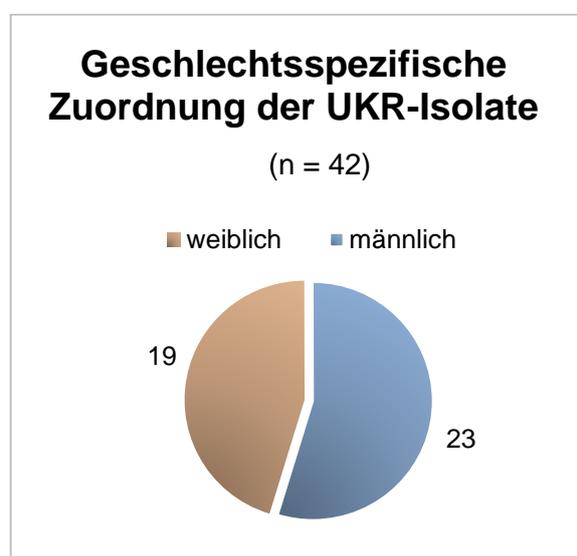


Abbildung 12: Geschlechtsverteilung der VREfm-positiven Patienten am UKR.

Wie alt die Patienten am Befundtag waren, ist Abbildung 13 zu entnehmen. Es wurde auch hier zwischen dem gesamten Patientenkollektiv (n=57) und den Patienten, deren Proben aus dem UKR selbst stammten (n=42), unterschieden. Dazu erfolgte eine Einteilung in acht verschiedene Altersgruppen. Mit steigendem Patientenalter kann grundsätzlich eine Zunahme der VREfm-Fälle bis zur Gruppe der 50 - 59 Jährigen verzeichnet werden. Lediglich in den Gruppen der 0 - 10 Jährigen sowie der 18 - 29 Jährigen sind vereinzelt infizierte Patienten enthalten. Bis zur Gruppe der 70 - 79 Jährigen bleiben die VRE-Probenzahlen auf relativ hohem Niveau, bis sie

anschließend sinken.

Das durchschnittliche Patientenalter der gesamten Kohorte liegt bei 54,12 Jahren. Die UKR-Patienten waren zum Befundzeitpunkt im Schnitt etwas jünger (51,69 Jahre).

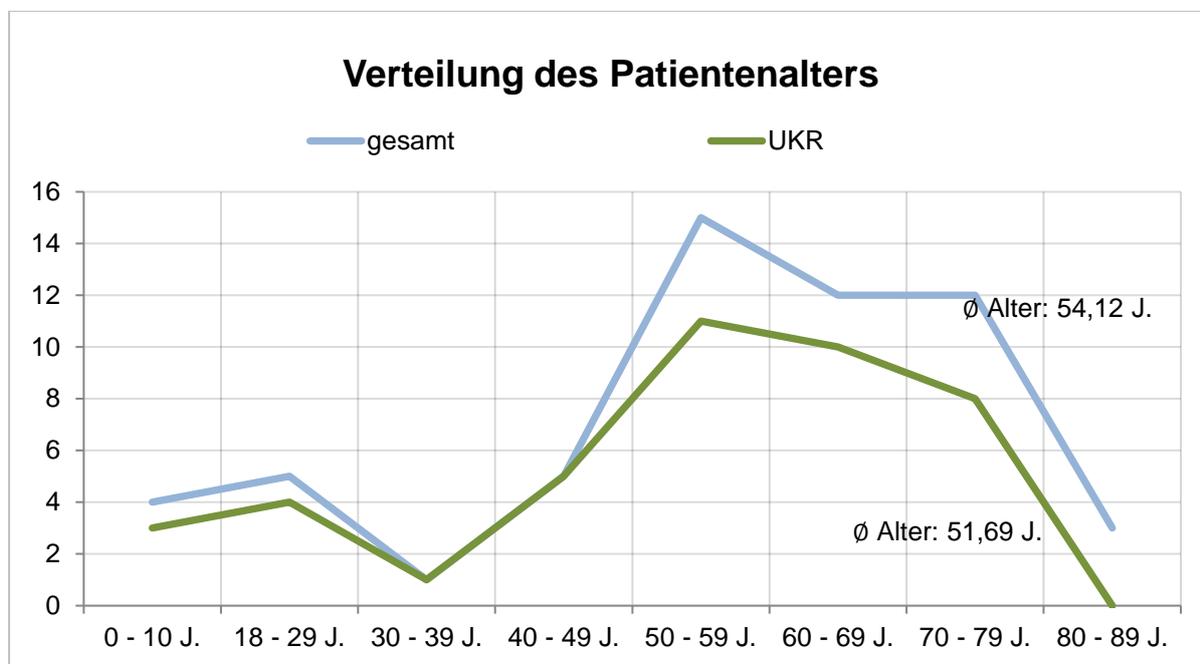


Abbildung 13: Altersverteilung aller VREfm-positiven Patienten und der UKR-Patienten sowie durchschnittliches Patientenalter. gesamt: 57 Patienten; UKR: 42 Patienten; J.= Jahre.

3.4 Gegenüberstellung der Enterokokkenanalysen

2009/2010 und 2017

2009 und 2010 wurden insgesamt 95 VRE-Proben aus verschiedenen Kliniken identifiziert. 94 der Isolate gehörten der Bakterienspezies *E. faecium* an, 1 Probe erwies sich als *E. faecalis*. Dieser *E. faecalis* befand sich unter den UKR-Proben. 70 der 94 *E. faecium*-Proben stammten aus dem UKR (siehe Abbildung 14).

Wie bereits in 2.2.2. erläutert, gab es in den Jahren 2009 und 2010 zwei verschiedene Methoden der VRE-Diagnostik. Bei Infektionsverdacht wurde ein kultureller Erregernachweis durchgeführt. Wurde dabei ein phänotypisch und genotypisch Vancomycin-resistenter *E. faecium* identifiziert, wurde eine Probe

aus einer angezüchteten, distinkten VREfm-Einzelkolonie in der Stammsammlung verwahrt.

Bei der anderen Methode, dem VRE-Screening, wurde hingegen bei Nachweis eines phänotypisch und genotypisch VREfm die Enterokokkennährbouillon in der Stammsammlung eingefroren. Da in die Bouillon das gesamte Probenmaterial eingerührt worden war, konnte trotz Enterokokkennährmedium nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich neben Enterokokken auch andere Bakterienspezies in der Bouillon vermehrt hatten. Die Analysen im Jahr 2017 stellten so eine Methode zur Überprüfung der 2009/2010 erhaltenen Ursprungsbefunde dar.

2017 wurden die insgesamt 95 Proben aufgetaut. Davon gelang es aus 88 Proben Vancomycin-resistente Enterokokken anzuzüchten. Bei der Speziesbestimmung wurden davon 85 Proben als *E. faecium*, 2 Proben als *E. gallinarium* und 1 Probe als *E. casseliflavus* identifiziert. Der 2009 ermittelte *E. faecalis* konnte im Jahr 2017 nicht mehr nachgewiesen werden.

Aus den 71 vom UKR stammenden Proben konnten im Jahr 2017 65 erneut als Enterokokken kultiviert werden. Mittels *MALDI-TOF-MS* wurden davon 63 als *E. faecium* und jeweils 1 als *E. gallinarium* beziehungsweise (bzw.) *E. casseliflavus* identifiziert (siehe Abbildung 15).

Die Diskrepanz bezüglich der 2009/2010 und 2017 durchgeführten Speziesnachweise kann verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist eine Verwechslung der Proben beim Hinzufügen zur Stammsammlung des UKR in den Jahren 2009/2010.

Es ist jedoch auch denkbar, dass 2009/2010 entweder innerhalb der VRE-Nährbouillon oder bei der Kultivierung des Probenmaterials mehrere Enterokokkenspezies angewachsen waren und keine *E. faecium*-Einzelkolonie vorlag. Identifizierte der Speziesnachweis 2009/2010 dennoch einen *E. faecium*, wurde die Probe, welche neben *E. faecium* zudem *E. gallinarium* oder *E. casseliflavus* enthielt, der Stammsammlung hinzugefügt. So ist es möglich, dass auch nach dem Auftauen 2017 nicht nur *E. faecium*, sondern auch andere Enterokokkenspezies auf einer Blutagarplatte angewachsen waren. Wurde 2017 dann (im Gegensatz zu 2009/2010) mehrmals kein *E. faecium* vom Blutagar gepickt, sondern eine andere Spezies, konnten für diese Probe keine weiterführenden Analysen (Glykopeptidresistenzgen-

Nachweis, MLSTypisierung, Nachweis der Virulenzmarker) durchgeführt werden. Zudem ist als weitere mögliche Erklärung in Betracht zu ziehen, dass der 2009/2010 identifizierte *E. faecium* in der eingefrorenen Nährbouillon/Probe nicht bis zum Jahr 2017 überlebte, andere Enterokokkenspezies hingegen schon.

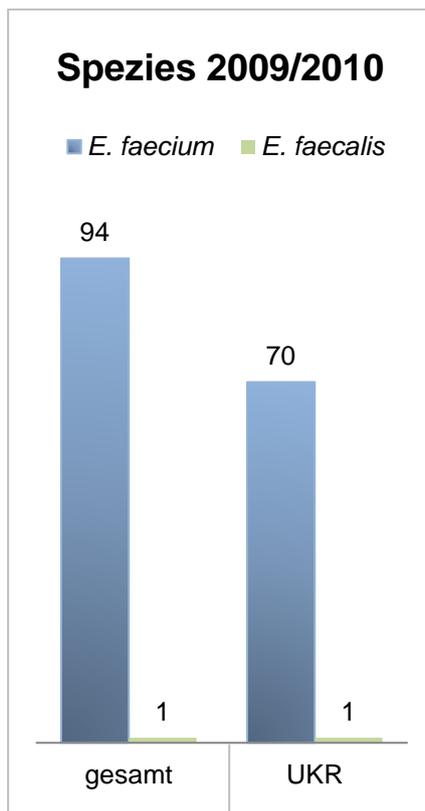


Abbildung 14:
Enterokokkenspezies, analysiert
2009/2010. gesamt: n=95;
UKR: n=71.

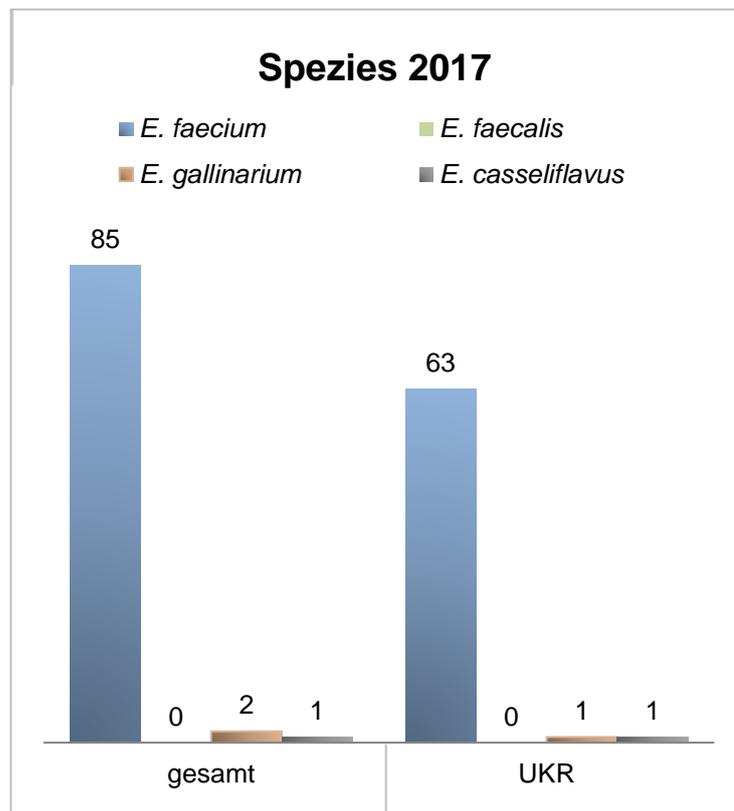


Abbildung 15: Enterokokkenspezies, analysiert 2017.
gesamt: n=88; UKR: n=65.

3.5 Glykopeptidresistenz

3.5.1 Genotypischer Nachweis der Glykopeptidresistenz

Nachdem 2017 von den insgesamt 95 aufgetauten Proben 85 als *E. faecium* identifiziert werden konnten, wurde als Nächstes ein genotypischer Nachweis der Glykopeptidresistenz angestrebt. Alle 85 Proben wurden mittels PCR auf das Vorliegen der Glykopeptidresistenzgene *vanA* und/oder *vanB* überprüft.

Ein beispielhaftes Gel, anhand dessen die Auswertung durchgeführt wurde, stellt Abbildung 16 dar. Für *vanA* (enthalten im Transposon Tn1546) war eine Bande bei 377 bp zu erwarten, für *vanB* (Tn1549/Tn5382) bei 298 bp.

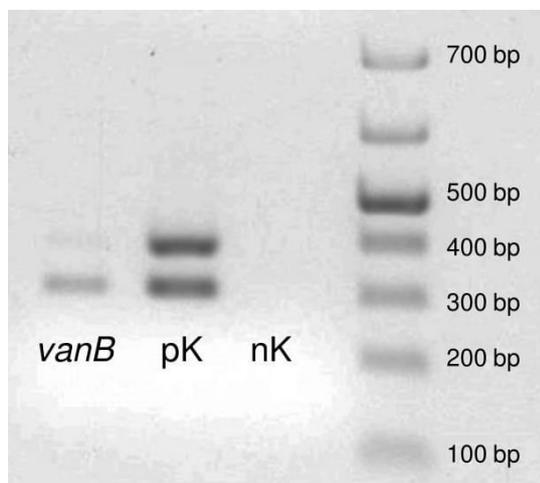


Abbildung 16: Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung der Glykopeptidresistenzgene *vanA* und *vanB*. Aufgetragen ist das PCR-Produkt einer analysierten *vanB*-positiven Probe. Verwendeter Größenstandard: 100 bp DNA Ladder. pK: doppelt positive Kontrolle. nK: Negativkontrolle.

In die Auswertung der genotypischen Glykopeptidresistenz (siehe Abbildung 17) wurden nur Proben aufgenommen, die als *E. faecium* identifiziert worden waren. Zur Auswertung aller VRE-Proben wurde jedes vorhandene *E. faecium*-Isolat herangezogen (also auch Mehrfachisolate). Zudem erfolgte eine Auswertung aller UKR-Erstisolate sowie aller externen Erstisolate, um einen statistisch unverfälschten Eindruck bezüglich (bzgl.) der genotypischen Glykopeptidresistenz der VREfm im Großraum Regensburg zu erhalten.

Aus den Antibiogrammen der Originalbefunde geht hervor, dass in den Jahren 2009 und 2010 insgesamt 94 als *E. faecium* bestätigte Proben geprüft worden waren (2009: 49; 2010: 45).

Davon waren 11 *vanA*-positiv (2009: 6; 2010: 5), 83 *vanB*-positiv (2009: 43; 2010: 40). Vom UKR stammten 7 *vanA*-positive (2009: 6; 2010: 1) und 39 *vanB*-positive Proben (2009: 26; 2010: 13). Aus externen Krankenhäusern wurden 16 *vanB*-positive (2009: 4; 2010: 12) und 3 *vanA*-positive Proben (alle 2010) registriert.

2017 konnten 85 Stämme als *E. faecium* identifiziert werden. Davon wiesen 11 das *vanA*-Gen und 74 das *vanB*-Gen auf. Von den 44 vom UKR stammenden Erstisolaten wiesen 7 das *vanA*-Gen auf, 37 das *vanB*-Gen. Aus externen Krankenhäusern wurden 15 *vanB*-positive und 3 *vanA*-positive Erstisolate registriert.

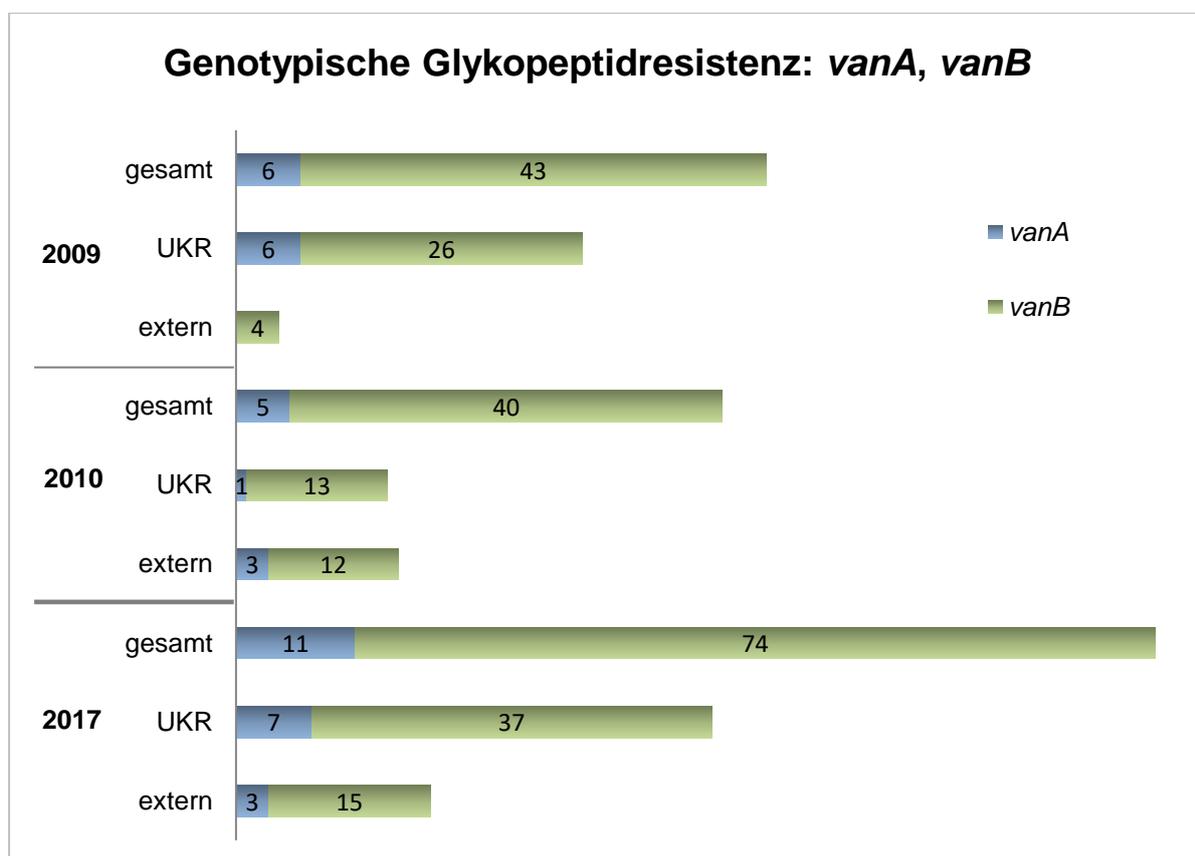


Abbildung 17: Genotypische Glykopeptidresistenz: Anzahl der *vanA*- oder *vanB*-positiven Proben im Vergleich zwischen 2009/2010 und 2017. Hier wurden jeweils nur als *E. faecium* bestätigte Isolate berücksichtigt.

2009: gesamt: n=49; UKR: n=32; extern: n=4;

2010: gesamt: n=45; UKR: n=14; extern: n=15;

2017: gesamt: n=85; UKR: n=44; extern: n=18.

Wie bereits im vorherigen Punkt erwähnt, gab es in den Jahren 2009 und 2010 zwei verschiedene Methoden der VRE-Diagnostik (kultureller Erregernachweis und VRE-Screening) und die im Jahr 2017 durchgeführten Analysen stellten dabei eine Methode zur Überprüfung der 2009/2010 erhaltenen Ursprungsbefunde dar. Neben der Enterokokkenspezies (siehe 3.4) konnten auch die analysierten Glykopeptidresistenzgenotypen überprüft werden.

In allen Fällen, die 2017 kultiviert und als *E. faecium* identifiziert werden konnten, wurden die selben Glykopeptidresistenzgene wie in den Jahren 2009 und 2010 festgestellt (siehe Abbildung 18). Es konnte also eine hundertprozentige Übereinstimmung der Ursprungsbefunde mit den reproduzierten Befunden bezüglich der *vanA*- oder *vanB*-Genotypen registriert werden.

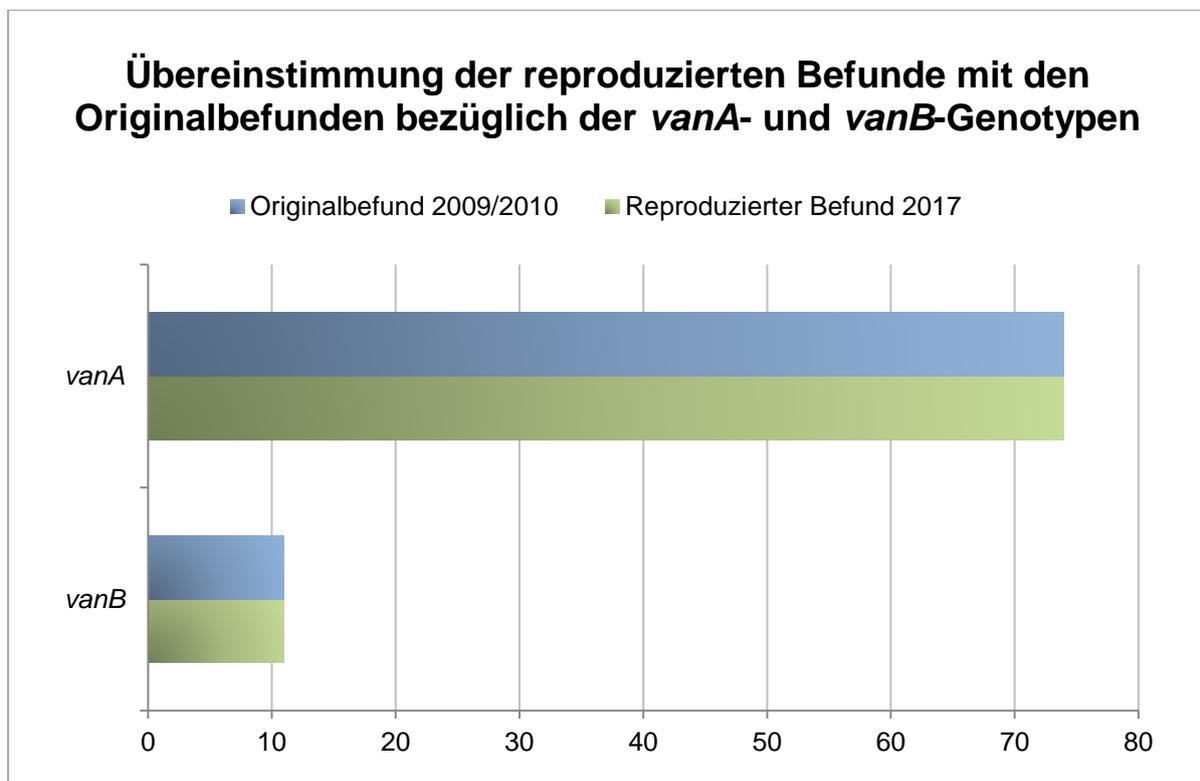


Abbildung 18: *vanA*- und *vanB*-Genotypen: Übereinstimmung der 2017 reproduzierten Befunde mit den Ursprungsbefunden von 2009/2010. n = 85.

3.5.2 Phänotypische Glykopeptidresistenz

Neben der genotypischen Resistenz wurde auch die phänotypische Resistenz beurteilt. Hierzu wurden die jeweiligen MHK-Werte für Vancomycin und Teicoplanin bestimmt. Dabei wurden Isolate, die nach den damals gültigen *CLSI*-Richtlinien (Stand 2015) als intermediär galten, als resistent bewertet. Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurden in die Auswertung aller Isolate nur diejenigen eingeschlossen, die 2017 als *E. faecium* identifiziert werden konnten (n=85). Für die Auswertung der UKR-Proben und der Proben aus externen Kliniken zählte man jeweils nur die Erstisolate (n=44 bzw. n=18).

Da 2009/2010 nicht von allen Isolaten die MHK-Werte bestimmt worden waren, erfolgte die Bestimmung der fehlenden Werte im Jahr 2017. Auch die MHK-Bestimmung von Isolaten, die 2009/2010 als intermediär bewertet worden waren, wurde wiederholt. Dabei stimmten die Ergebnisse der wiederholten Analyse mit der Primäranalyse hinsichtlich der Bewertung zu 100 % überein.

Die phänotypischen Resistenzen und deren Feststellungs- bzw. Analysejahr sind in Abbildung 19 dargelegt. Dabei fällt eine Diskrepanz bzgl. der Resistenzbewertung zwischen 2009/2010 und 2017 auf. So wurden am UKR beispielsweise 2009/2010 19 Isolate als Vancomycin-resistent bewertet, 2017 23 Isolate. Ursächlich dafür ist, dass 2009/2010 nur die Proben aus der klinischen Diagnostik kultiviert und einer MHK-Bestimmung unterzogen worden waren. Die im Rahmen des Screenings gewonnenen Proben wurden in einer VRE-Nährbouillon angezüchtet, eine Bestimmung der MHK erfolgte 2009/2010 nicht. Erst 2017, als alle Proben als Bakterienkultur vorlagen, wurden (wie oben bereits erwähnt) die fehlenden MHK-Werte der Screening-Proben bestimmt.

Von allen Proben waren 95 % der Stämme gegen Vancomycin resistent, 5 % sensibel. Diese 4 gegen Vancomycin phänotypisch sensiblen Isolate wiesen alle das *vanB*-Resistenzgen auf. Dieser auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinende Sachverhalt kann jedoch als Merkmal der *vanB*-vermittelten Vancomycinresistenz betrachtet werden und wird mit der unterschiedlich stark ausgeprägten Expressierung des *vanB*-Genclusters begründet. Wie in 1.5.2.1.2 bereits erwähnt, liegen bei *vanB*-positiven VREfm die MHK-Werte zwischen 4-1000 µg/ml, teilweise sind sie sogar

noch geringer. Die in dieser Arbeit untersuchten sensiblen Isolate wiesen beispielsweise MHK-Werte zwischen 1,5 und 2 µg/ml auf und bewirkten so die phänotypische Sensibilität bei genotypischer Resistenz (durch vorhandenes *vanB*-Gencluster).

Gegen Teicoplanin waren nur 16 % der 85 Isolate resistent, 84 % waren sensibel.

Eine sehr ähnliche Verteilung konnte auch für die allein vom UKR stammenden *E. faecium*-Proben festgestellt werden: 95 % der Stämme wiesen eine Vancomycin-resistenz auf, 5 % waren Vancomycin-sensibel. 82 % waren gegenüber Teicoplanin sensibel, 18 % resistent.

Auch die aus externen Häusern stammenden Proben wiesen eine ähnliche Verteilung der phänotypischen Resistenzen auf: 94 % der 18 Stämme waren Vancomycin-resistent, 1 Vancomycin-sensibel. 22 % waren gegenüber Teicoplanin resistent, 78 % sensibel.

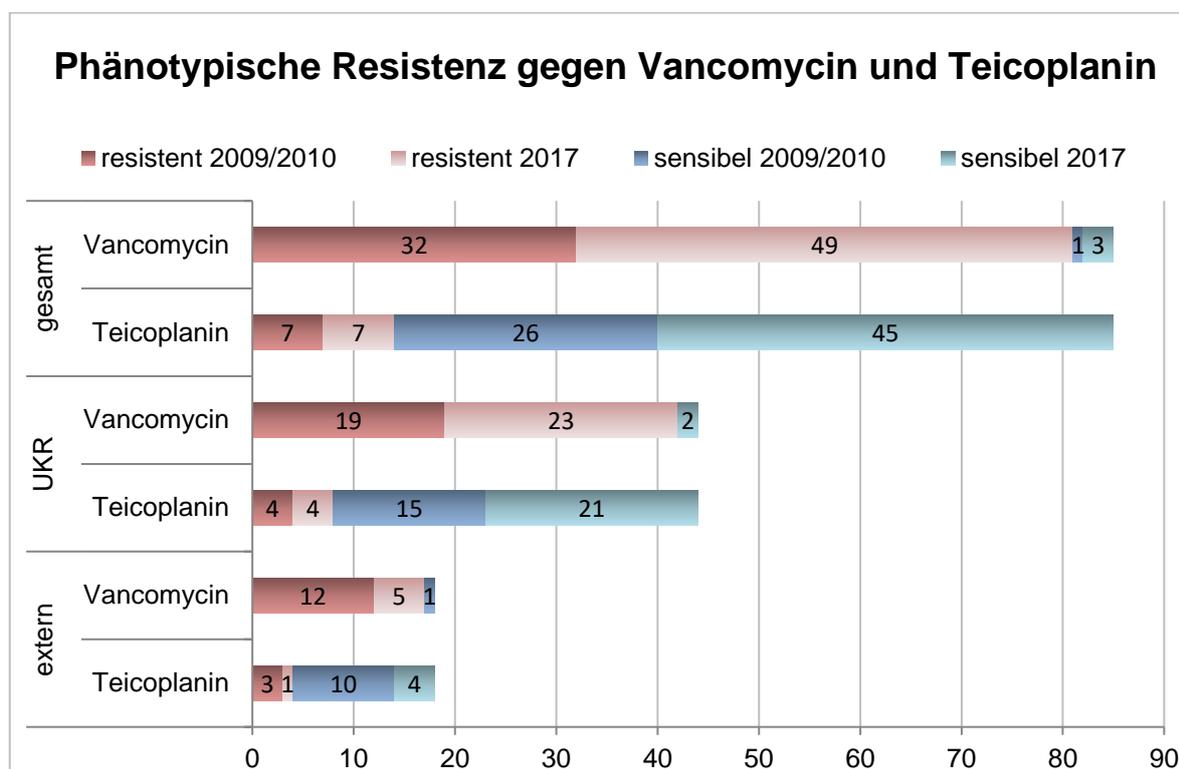


Abbildung 19: Phänotypische Resistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin. Unterteilt in gesamt bzw. UKR-Isolate sowie externe Isolate. Für jedes Antibiotikum ist die Bewertung (resistent/sensibel) sowie das Analysejahr der Bewertung (2009/2010 oder 2017) aufgezeigt.
gesamt: n=85; UKR: n=44; extern: n=18.

3.5.3 Phänotypische und genotypische Glykopeptidresistenz

Der Zusammenhang zwischen *vanA*- oder *vanB*-Genotyp und phänotypischer Resistenz bzw. Sensibilität gegenüber Vancomycin und Teicoplanin wird in Abbildung 20 dargestellt.

Von allen Proben (n=85) waren ca. 79 % lediglich gegen Vancomycin resistent, etwa 16 % aller Proben zeigten eine Kreuzresistenz Vancomycin/Teicoplanin und 5 % waren auf beide Glykopeptidantibiotika sensibel.

Von den insgesamt 11 *vanA*-positiven Proben wiesen 10 eine Kreuzresistenz Vancomycin/Teicoplanin auf, das sind etwa 91 %. Von den 74 *vanB*-positiven Isolaten waren lediglich 4 zugleich gegen Vancomycin und Teicoplanin resistent, das sind ca. 5 %. Weitere 5 % waren gegenüber beiden Glykopeptidantibiotika sensibel. Der Großteil (ca. 90 %) aller *vanB*-positiven Proben war nur gegen Vancomycin resistent, von den *vanA*-positiven ca. 9 %. Jedoch verhielt sich keine *vanA*-positive Probe sensibel gegenüber irgendeines der beiden Glykopeptidantibiotika.

Für die 44 aus dem UKR stammenden Proben ließ sich in etwa die gleiche Verteilung der phänotypischen Resistenzen feststellen: 77 % waren Vancomycin-resistent, 18 % wiesen eine Kreuzresistenz auf und 5 % waren gegen keines der untersuchten Glykopeptidantibiotika resistent (alle *vanB*-positiv). Ca. 85 % der *vanA*-positiven Stämme und etwa 5 % der *vanB*-positiven Isolate zeigten eine Kreuzresistenz. 89 % der *vanB*-positiven und 15 % der *vanA*-positiven Stämme waren nur gegen Vancomycin resistent.

Von den externen Isolaten verfügten alle (100 %) *vanA*-Positiven über eine Kreuzresistenz, von den 15 *vanB*-Positiven nur etwa 7 %. Weitere 7 % waren gegenüber beiden Glykopeptidantibiotika sensibel und der Großteil (86 %) nur Vancomycin-resistent.

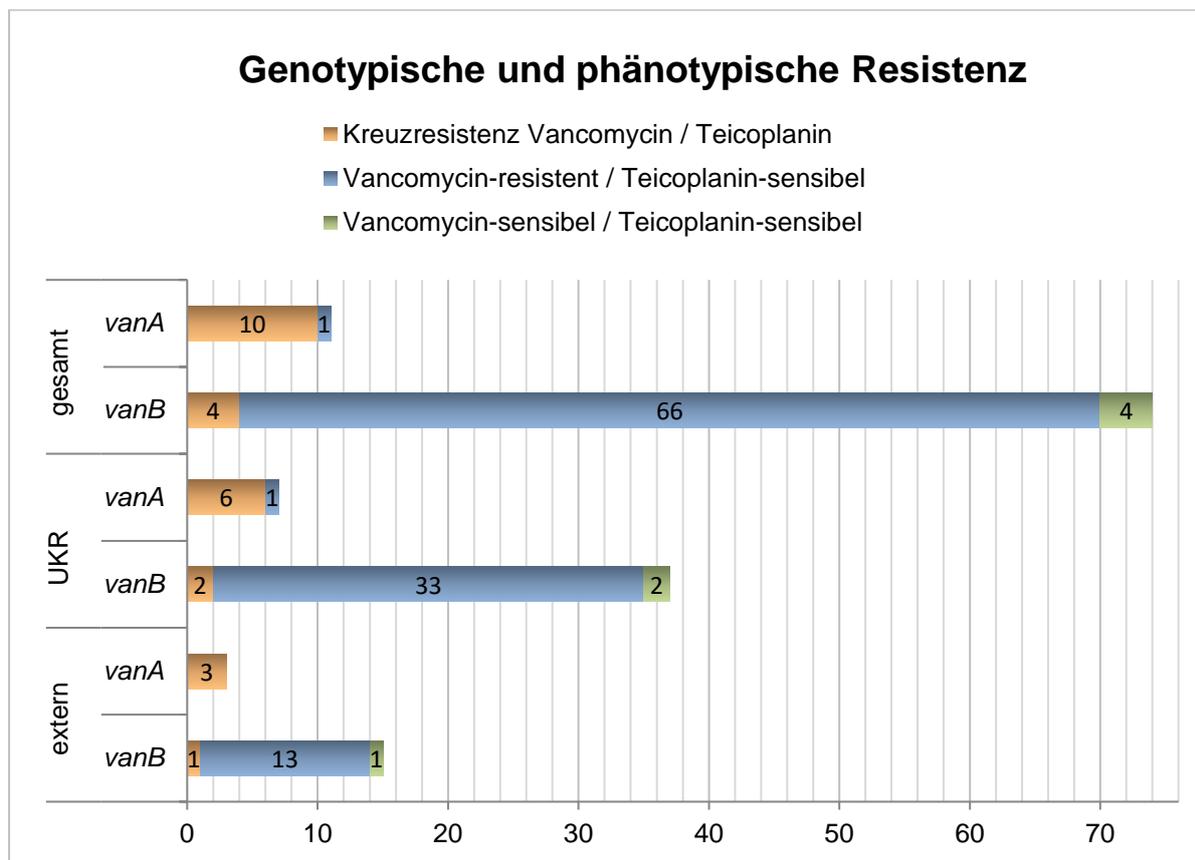


Abbildung 20: Verteilung der phänotypischen Resistenzen gegen Vancomycin und Teicoplanin auf *vanA*- und *vanB*-Genotypen. gesamt: n=85; UKR: n=44; extern: n=18.

Bei etwa 88 % aller Proben (n=85) lagen die MHK-Werte für Vancomycin bei 8-24 µg/ml. Davon waren 88 % *vanB*-positiv, 12 % *vanA*-positiv (siehe Abbildung 21). Etwa 3,5 % wiesen eine MHK >256 µg/ml auf und waren somit hochresistent. Bei 5 % lag die MHK bei ≤ 4 µg/ml und jene ausschließlich *vanB*-positiven Stämme waren so Vancomycin-sensibel. Die übrigen VREfm-Stämme (3,5 %) wiesen eine MHK von 32 oder 48 µg/ml auf und waren alle *vanB*-positiv.

Auch am UKR (n=44) überwog die Anzahl der Stämme mit einer MHK von 8-24 µg/ml weit (89 %). Hiervon waren 87 % *vanB*-positiv und 13 % *vanA*-positiv. Alle hochresistenten Stämme (MHK >256 µg/ml; n=3) wurden am UKR registriert, wobei jene 7 % aller UKR-Stämme bilden. 1 Stamm war dabei *vanB*-positiv und 2 waren *vanA*-positiv. Dies ist deshalb interessant, weil lediglich 16 % der 2017 erfolgreich kultivierten UKR-Proben *vanA*-positiv waren und davon waren etwa 29 % hochresistent. Neben hochresistenten Stämmen konnten am UKR jedoch auch

Vancomycin-sensible *E. faecium* mit einer MHK $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ registriert werden. So stammten 2 der insgesamt 4 sensiblen Stämme aus dem UKR, welche wie zu erwarten alle das *vanB*-Gencluster trugen.

Und auch in den externen Proben (n=18) überwogen die Stämme mit einer MHK von 8-24 $\mu\text{g/ml}$ mit 83 %. Hiervon waren 80 % *vanB*-positiv, 20 % *vanA*-positiv. 6 % der Stämme waren Vancomycin-sensibel mit einer MHK $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ und 11 % hatten eine MHK von 48 $\mu\text{g/ml}$. Hochresistente Stämme befanden sich nicht unter den externen Proben.

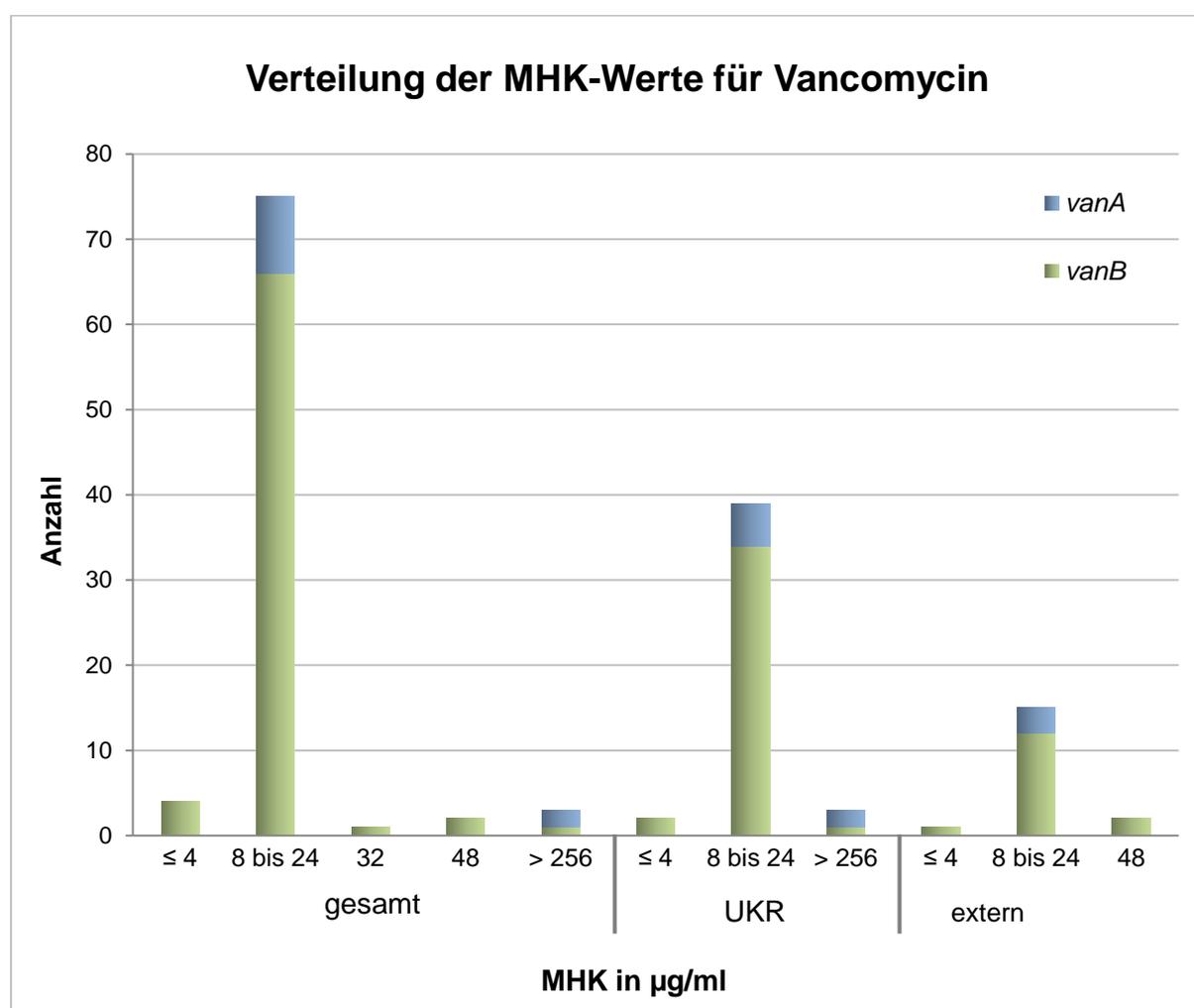


Abbildung 21: Verteilung der MHK-Werte für Vancomycin in Zusammenhang mit den Glykopeptidresistenzgenen *vanA* und *vanB*. Vancomycinsensibilität bei MHK $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, Vancomycinresistenz bei MHK $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ [101]. gesamt: n=85; UKR: n=44; extern: n=18.

3.6 MLST: Haushaltsgene und ihre Allelvarianten

Nachdem der Speziesnachweis *E. faecium* erbracht worden war und nachdem die Isolate auf eine genotypische (*vanA/vanB*) sowie phänotypische (MHK: resistent/intermediär/sensibel) Glykopeptidresistenz untersucht worden waren, wurden die Proben anschließend molekular-epidemiologisch analysiert. Als Untersuchungsmethode diente dabei die Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) nach Homan *et al.* [90]. Das *E. faecium*-Typisierungsschema nach Homan *et al.* umfasst 7 Haushaltsgene. Da jene von essentieller Bedeutung für den Stoffwechsel des *E. faecium* sind, wird bei Haushaltsgenen von einer niedrigen Mutationsrate und einer deshalb vergleichsweise konstanten Basensequenz ausgegangen. Die Basensequenz kann deshalb zur Typisierung herangezogen werden. Dennoch treten die Haushaltsgene in verschiedenen Varianten auf. Jene unterschiedlichen Varianten eines Gens werden Allele genannt.

Im Rahmen der Typisierung wurden folgende Haushaltsgene untersucht:

- Adenylatkinase (*adK*)
- ATP-Synthase (α -Untereinheit) (*atpA*)
- D-Alanin-D-Alanin-Ligase (*ddl*)
- Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*gdh*)
- Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gyd*)
- *Phosphat ATP-binding cassette Transporter* (*pstS*)
- ATPase-Untereinheit der Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase (*purK*)

Zur Typisierung war es erforderlich, diese Haushaltsgene mittels PCR zu vervielfältigen. Nach jeder PCR wurde der Erfolg der Amplifikation überprüft. Ein Beispielelektrophoresegele, auf dem Amplifikate erfolgreicher MLST-PCR aufgetragen sind, stellt Abbildung 22 dar.

Anschließend wurden die Amplifikate aufbereitet und sequenziert. Den erhaltenen Basensequenzen der Haushaltsgene wurden dann mithilfe der kuratierten Datenbank PubMLST ihre entsprechenden Allelvarianten zugeordnet. Für jedes Isolat ergab sich

so ein siebenstelliges Haushaltsgen-Allelprofil, welches dann einem MLSTyp zugeordnet werden konnte (siehe 3.7).

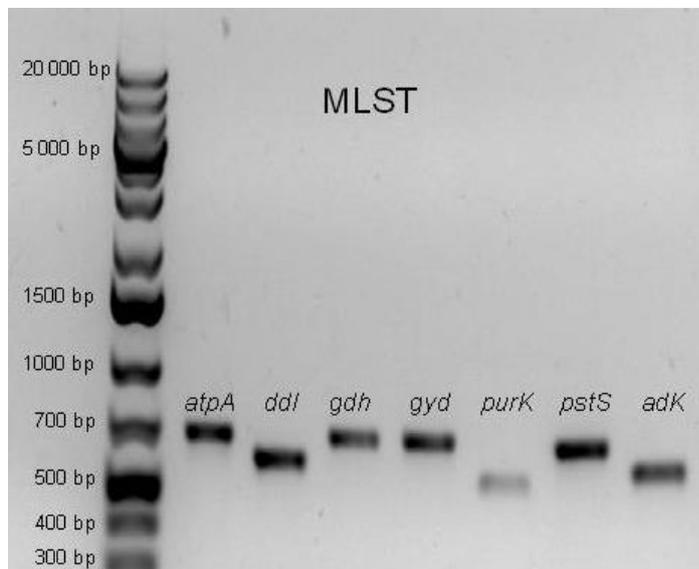


Abbildung 22: Mustergel mit MLST-PCR-Produkten. Verwendeter Größenstandard: 1 kb Plus DNA Ladder.

Da für jede epidemiologische Arbeit eine genaue Typisierung der einzelnen Isolate unerlässlich ist, stellt die MLST jeder Probe einen Hauptbestandteil dieser Dissertation dar.

Die Auswertung aller Proben schloss nur jene ein, die 2017 als *E. faecium* kultiviert und identifiziert werden konnten (n=85).

In die Auswertung der aus dem UKR stammenden Proben wurden nur die Erstisolate (n=44) einbezogen, um die UKR-Statistik nicht zu verfälschen.

Für das *atpA*-Gen wurden 4 verschiedene Allelvarianten festgestellt. Gesamt (am UKR) trat die Variante 1 26 (13) mal auf, Variante 7 4 mal (1 mal), Variante 9 23 (13) mal. Der Alleltyp 15 kam mit 32 (17) mal am häufigsten vor (siehe Abbildung 23).

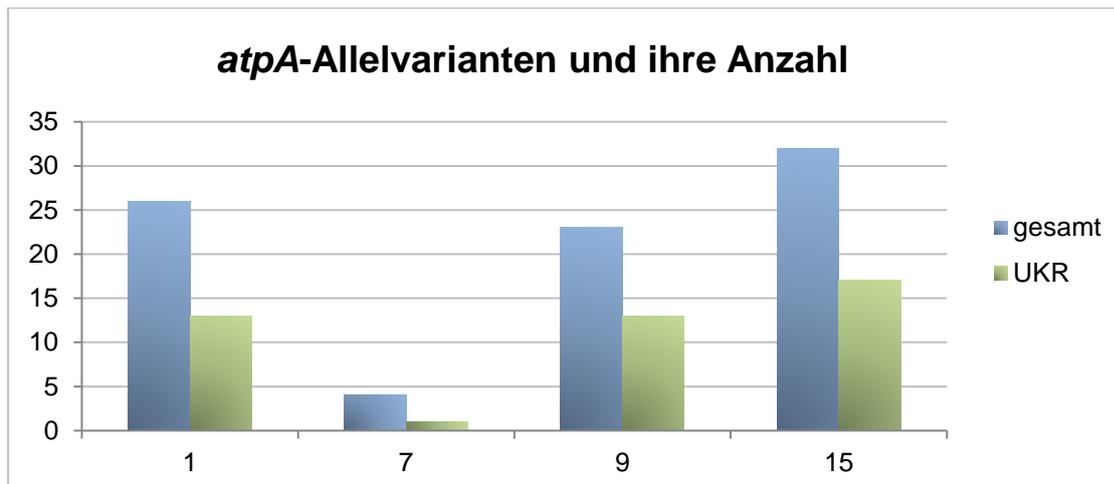


Abbildung 23: Anzahl der Allelvarianten des *atpA*-Gens. gesamt: n=85; UKR: n=44.

Das *ddl*-Gen (siehe Abbildung 24) war gesamt mit 3 Alleltypen vertreten. 81 mal trat Variante 1 auf, 3 mal Variante 2, 1 mal Variante 8. Letztere war in den UKR-Proben nicht zu finden, lediglich die Varianten 1 (43 mal) und 2 (1 mal).

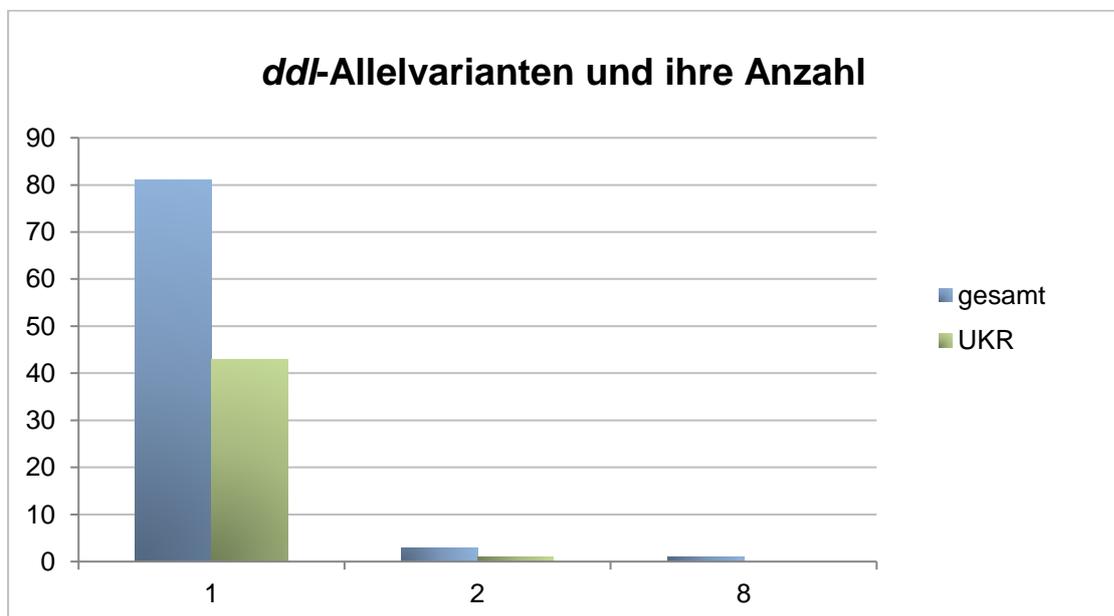


Abbildung 24: Anzahl der *ddl*-Allelvarianten. gesamt: n=85; UKR: n=44.

Die Allelvariante 1 wurde bei der Analyse des *gyd*-Gens am häufigsten festgestellt, 82 mal gesamt und 43 mal innerhalb der UKR-Isolate. Variante 5 wurde gesamt 3 mal registriert, am UKR 1 mal (siehe Abbildung 25).

Für das Gen *purK* wurden in allen Proben 2 Subtypen erfasst: Variante 1 trat 84 mal auf, Variante 20 1 mal. Innerhalb der UKR-Proben wurde lediglich Allelvariante 1 festgestellt (siehe Abbildung 26).

Dem *pstS*-Gen wurde größtenteils der Alleltyp 1 zugeordnet: insgesamt 54 mal, den UKR-Isolaten 27 mal. Variante 7 kam am zweithäufigsten vor: insgesamt 22 mal und am UKR 13 mal. Subtyp 20 war insgesamt 9 mal vertreten, am UKR 4 mal (siehe Abbildung 27).

Bei den Analysen des *adK*- und des *gdh*-Gens wurde jeweils nur 1 Allelvariante festgestellt und zwar Variante 1.

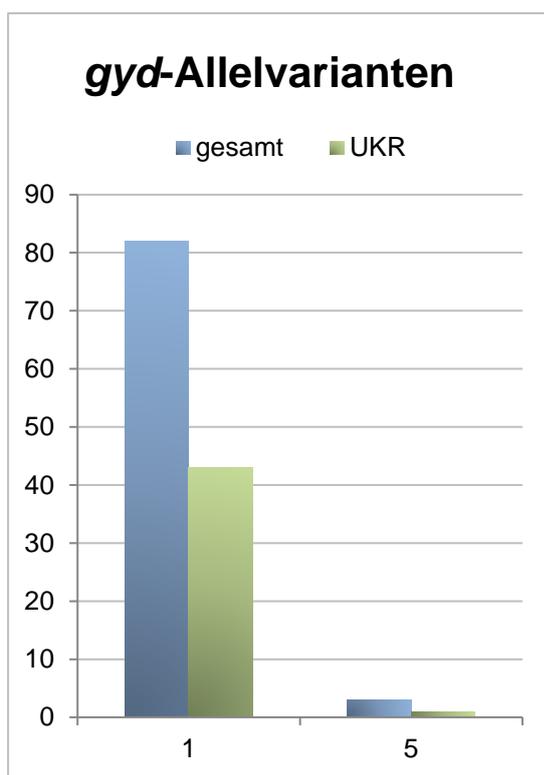


Abbildung 25: Anzahl der *gyd*-Allelvarianten. gesamt: n=85; UKR: n=44.

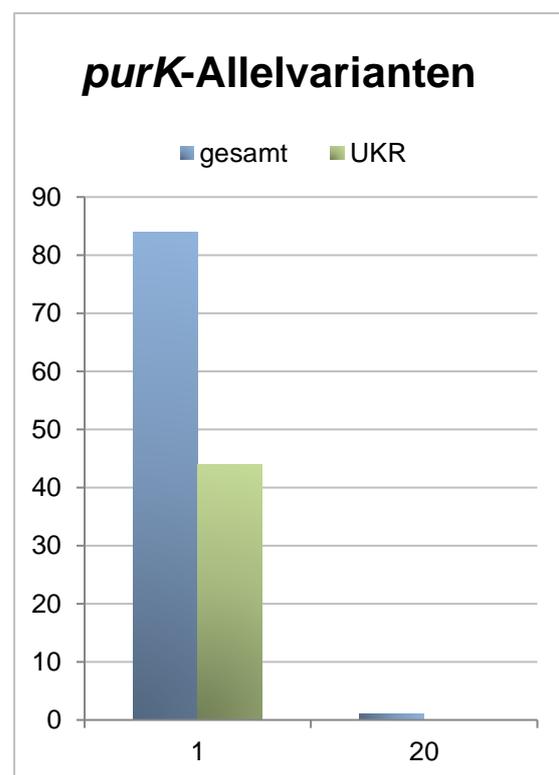


Abbildung 26: Anzahl der *purK*-Allelvarianten. gesamt: n=85; UKR: n=44.

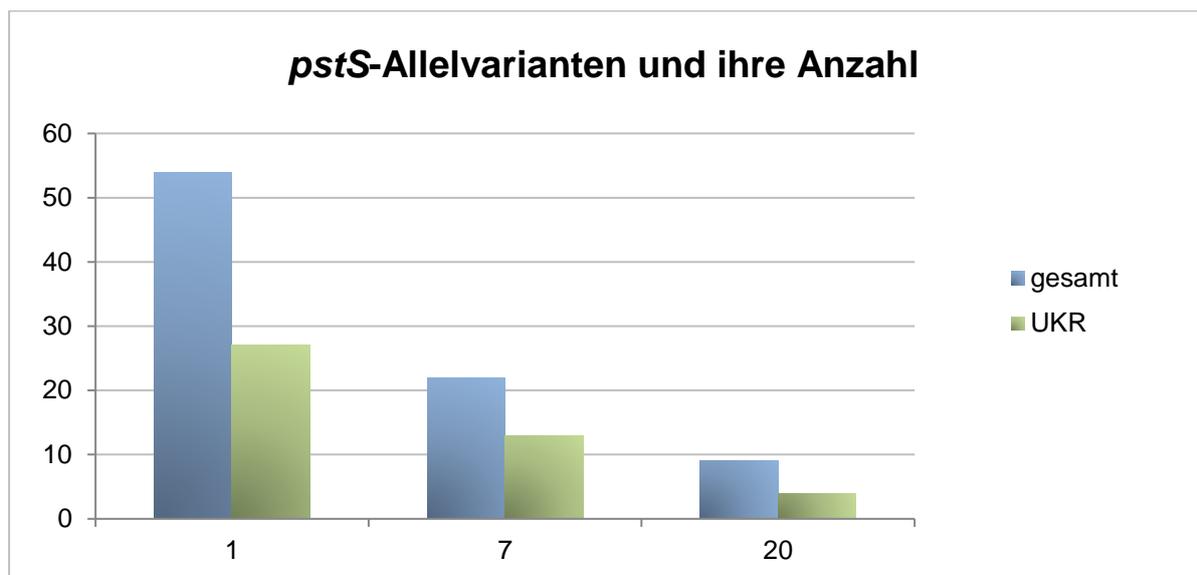


Abbildung 27: Anzahl der Allelvarianten des *pstS*-Gens. gesamt: n=85; UKR: n=44.

3.7 MLSTypen

3.7.1 Übersicht

Da für jede epidemiologische Arbeit eine genaue Typisierung der einzelnen Isolate unerlässlich ist, stellt die MLSTypisierung jeder Probe einen Hauptbestandteil dieser Dissertation dar.

Wie bereits erwähnt, wurden im Rahmen der Typisierung pro Isolat-DNA 7 Haushaltsgene (*adK*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS*, *purK*) erst mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen (pro Isolat 7 Haushaltsgensequenzen) wurden dann mithilfe der kuratierten Datenbank PubMLST einzelnen Allelen zugeordnet (siehe 3.6).

Somit ergab sich für jedes Isolat ein siebenstelliges Allelprofil. Dieser siebenstellige Code konnte dann ebenfalls über PubMLST einem MLSTyp zugeordnet werden.

Eine Auflistung aller im Zuge dieser Arbeit identifizierten Allelprofile samt dazugehörigen ST stellt Tabelle 16 dar.

Tabelle 16: Sequenztypen mit zugehörigem Allelprofil. Gesamtanzahl und Anzahl am UKR. ST=Sequenztyp.

ST	<i>adK</i>	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>purK</i>	gesamt	UKR
17	1	1	1	1	1	1	1	27	11
64	1	7	1	1	1	1	1	1	0
78	1	15	1	1	1	1	1	6	4
117	1	9	1	1	1	1	1	20	11
186	1	7	2	1	5	1	1	3	1
192	1	15	1	1	1	7	1	18	11
203	1	15	1	1	1	20	1	6	2
233	1	1	1	1	1	20	1	2	2
737	1	15	8	1	1	7	1	1	0
780	1	9	1	1	1	7	1	3	2
unbekannt	1	15	1	1	1	20	20	1	0

Innerhalb aller *E. faecium*-Proben (n=85) wurden insgesamt 10 verschiedene ST (siehe Abbildung 28 und Tabelle 16) festgestellt.

Am häufigsten wurde ST17 (29 %) nachgewiesen, gefolgt von ST117 (24 %) und ST192 (21 %). Die verbleibenden 26 % verteilen sich auf ST78 und ST203 (je 7 %), ST186 und ST780 (je 4 %), ST233 (2 %) sowie ST64 und ST737 (je 1 %).

Einem Isolat konnte trotz vollständigen Allelprofils kein ST zugewiesen werden, da in der kuratierten Datenbank für jenes Allelprofil noch kein MLSTyp verzeichnet worden war (in Abbildungen/Tabellen als „unbekannt“ bezeichnet).

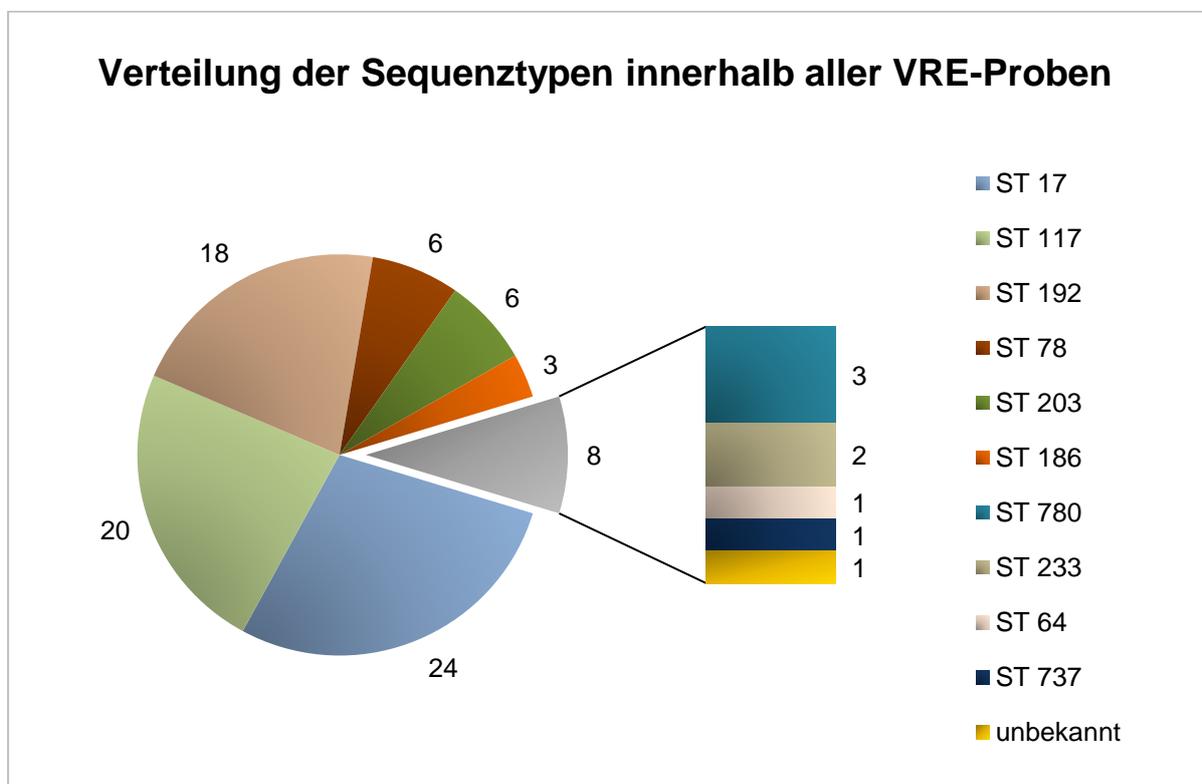


Abbildung 28: Verteilung der unterschiedlichen MLSTypen innerhalb aller VRE-Eingänge.
ST = Sequenztyp. n=85.

3.7.2 Sequenztypen am Universitätsklinikum Regensburg und an externen Krankenhäusern

Da im Rahmen dieser Dissertation nicht nur VRE-Proben aus dem UKR untersucht, sondern auch die VRE im Großraum Regensburg molekularepidemiologisch analysiert werden sollten, wird in diesem Kapitel strikt zwischen UKR-Proben (n=44) und aus externen Krankenhäusern stammenden Proben (n=18) unterschieden. Um die Statistik nicht zu verfälschen, wurden jeweils nur die Erstisolate gewertet.

Die *E. faecium*-Erstisolate stammten neben dem UKR von sieben weiteren Krankenhäusern im Großraum Regensburg.

Innerhalb der externen Erstisolate konnten 7 verschiedene ST festgestellt werden sowie ein bisher unbekannter ST (siehe Abbildung 30).

Unter den *E. faecium*-Erstisolaten aus dem UKR waren 8 verschiedene ST (siehe Abbildung 29).

Den ST17, ST117 und ST192 konnten jeweils 25 % der UKR-Stämme zugeordnet werden. Mit jeweils 5 % wurden ST780 und ST203 am UKR nachgewiesen.

In den externen Proben waren ST203 und ST117 mit jeweils 22 % die am häufigsten vorkommenden ST. ST17 und ST192 folgten mit jeweils 16 % und ST780 wurde in 6 % aller externen Proben nachgewiesen.

Jedoch gab es auch ST, die nur entweder in externen Krankenhäusern oder nur am UKR nachgewiesen werden konnten. ST64, ST737 und der unbekannte ST (jeweils 6 %) waren nur in externen Proben zu finden. ST78 (9 %), ST186 (2 %) sowie ST233 (5 %) nur in UKR-Proben.

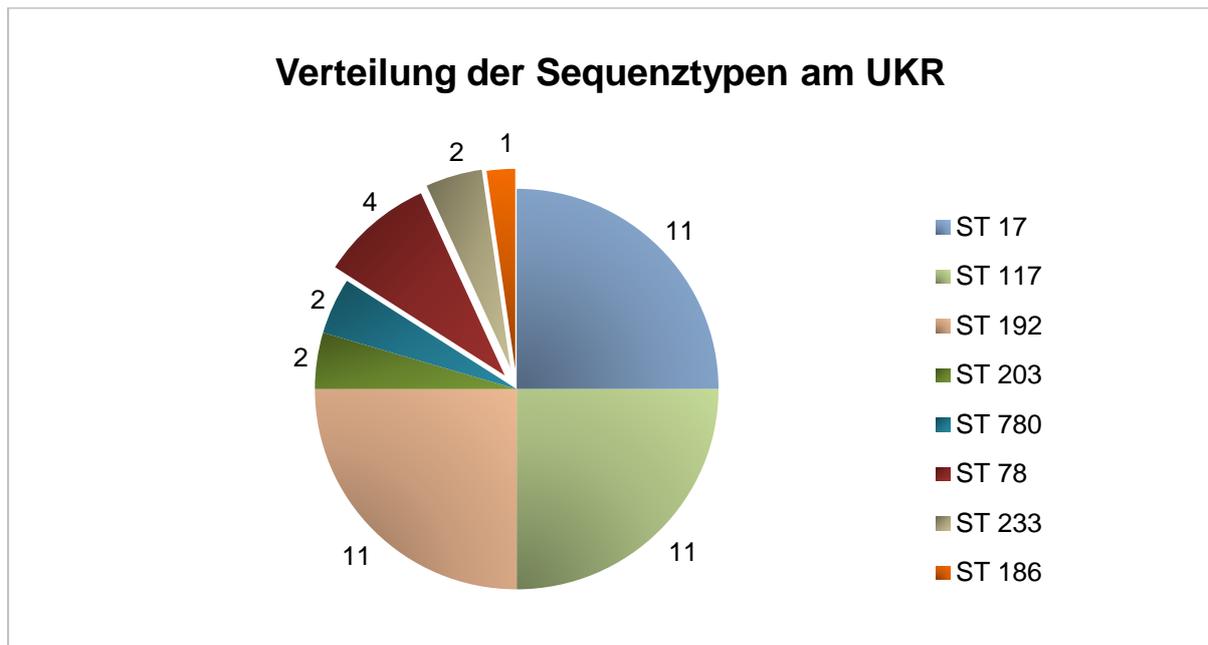


Abbildung 29: Verteilung der MLSTypen der *E. faecium*-Proben aus dem UKR. Nur am UKR vorkommende Sequenztypen hervorgehoben. ST = Sequenztyp. n=44.

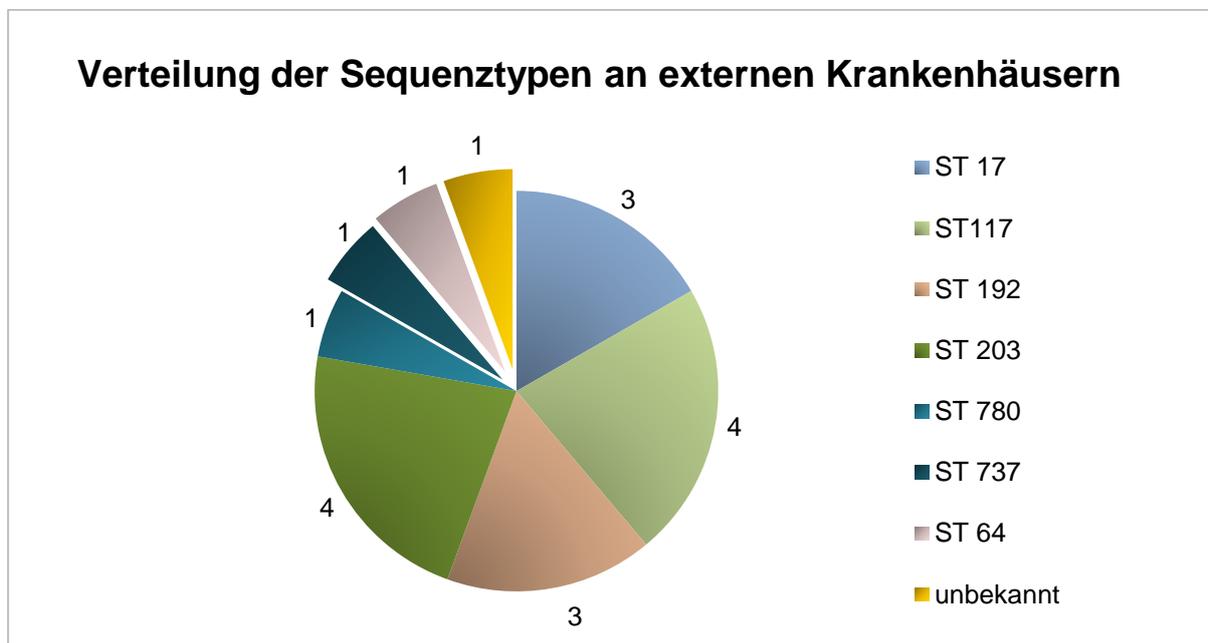


Abbildung 30: Verteilung der MLSTypen der *E. faecium*-Proben von externen Krankenhäusern. Nur an externen Kliniken vorkommende Sequenztypen hervorgehoben. ST = Sequenztyp. n=18.

3.7.3 Sequenztypen im Untersuchungszeitraum

Wie aus 3.7.2 hervorgeht, waren ST17, ST117 und ST192 mit insgesamt 69 % die am häufigsten vorkommenden Sequenztypen der Erstisolate aller Krankenhäuser (Erstisolate gesamt: n=62). Deshalb wurde speziell das Auftreten dieser ST im Verlauf der Jahre 2009 und 2010 betrachtet.

Dabei wurde festgestellt, dass die Anzahl des ST192 (n=14) während des analysierten Zeitraums sank (von 6 auf 4 auf 2).

Auch die zum ST17 gehörenden Proben (n=14) wurden zuerst immer weniger, bis in der zweiten Hälfte des Jahres 2010 wieder ein leichter Anstieg von 2 auf 3 Erstisolate zu verzeichnen war.

ST117 (n=15) war vor allem in der Mitte des untersuchten Zeitraums stark vertreten mit je 6 Erstisolaten. Zu Beginn und am Ende des Analysezeitraums waren lediglich 1 bzw. 2 ST117-Erstisolate nachgewiesen worden (siehe Abbildung 31).

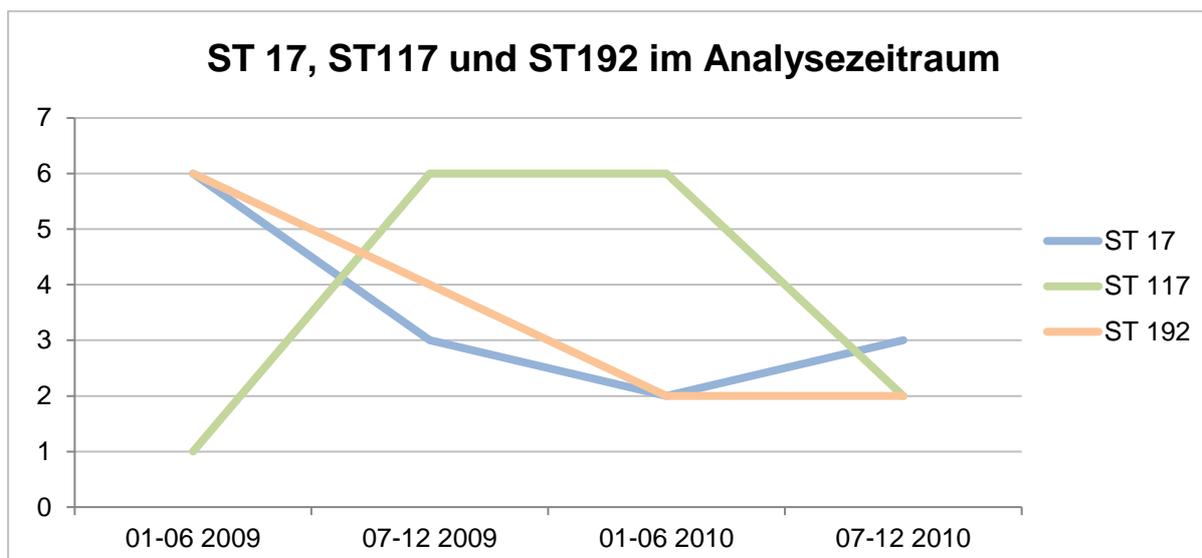


Abbildung 31: Die häufigsten MLSTypen der Erstisolate aller Krankenhäuser im Jahresverlauf 2009/2010. Unterteilt in Halbjahre. ST = Sequenztyp. ST17: n=14; ST117: n=15; ST192: n=14.

Auch im Jahresverlauf der ST am UKR ist eine Häufung des ST117 in der Mitte des analysierten Zeitraums zu beobachten. ST17 und ST192 scheinen dabei von ST117 verdrängt zu werden. Auch die anderen nachgewiesenen ST traten vermehrt zu Beginn oder am Ende des Zeitraums auf. Lediglich ST233 wurde wie ST117 mittig im untersuchten Abschnitt nachgewiesen (siehe Abbildung 32).

In der ersten Jahreshälfte von 2009 wurde kein externes Erstisolat verzeichnet und so stammen all jene Erstisolate aus dem Zeitraum von Juli 2009 bis Dezember 2010. ST117 stellt auch unter den externen Erstisolaten den vermehrt nachgewiesenen ST dar. Neben diesem ST traten noch vier weitere ST im ersten Halbjahr 2010 auf, in der zweiten Jahreshälfte wurden erneut nur vereinzelt verschiedene ST nachgewiesen (siehe Abbildung 33).

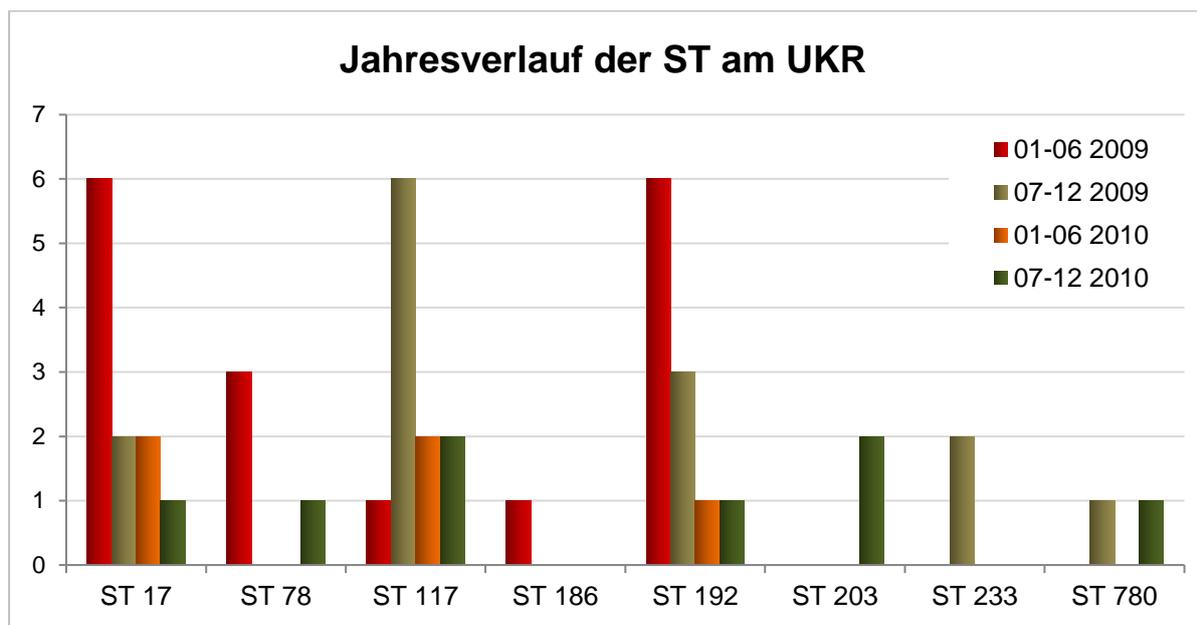


Abbildung 32: MLSTypen am UKR im Verlauf der Jahre 2009 und 2010. Unterteilt in Halbjahre. ST = Sequenztyp. n=44.

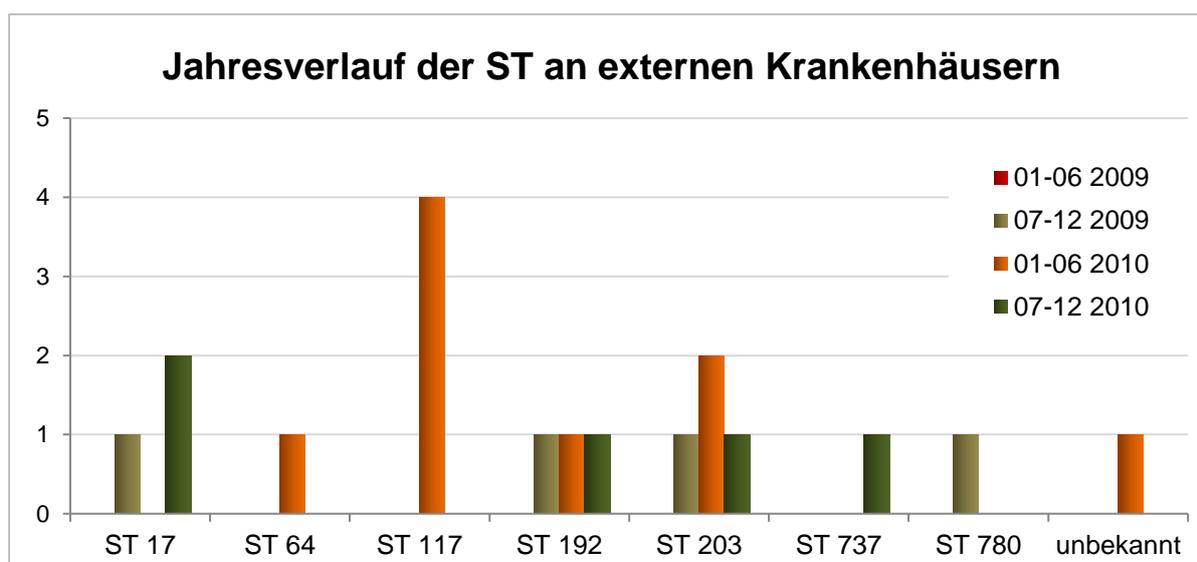


Abbildung 33: MLSTypen an externen Krankenhäusern im Verlauf der Jahre 2009 und 2010. Unterteilt in Halbjahre. ST = Sequenztyp. n=18.

3.8 Virulenzfaktoren: *enterococcal surface protein*, Hyaluronidase und Kollagenbindendes Adhäsin

Zur molekularepidemiologischen Einordnung der VREfm stellt die MLSTypisierung ein geeignetes Werkzeug dar. Die VREfm können jedoch darüber hinaus noch weiter differenziert werden. In der Literatur sind dazu folgende Virulenzfaktoren beschrieben: das *enterococcal surface protein*, die Hyaluronidase und das Kollagenbindende Adhäsin.

In die Auswertung der Virulenzfaktoren wurden nur Proben aufgenommen, die 2017 als *E. faecium* identifiziert werden konnten (gesamt: n=85; UKR: n=44).

Im Rahmen der Untersuchung jedes Isolats auf *esp* wurde das Gen zuerst mittels PCR amplifiziert. Konnte das *esp*-Gen erfolgreich vervielfältigt werden (das Isolat war also *esp*-positiv), wurde zusätzlich die A-Repeat-Region des Gens amplifiziert und nach erfolgter Gelelektrophorese die Anzahl der Tandemrepeats in der A-Region des *esp*-Gens festgestellt. Ein im Zuge dieser Dissertation hergestelltes und ausgewertetes Elektrophoresegel ist in Abbildung 34 dargestellt, in Abbildung 35 die Verteilung der Repeatanzahl.

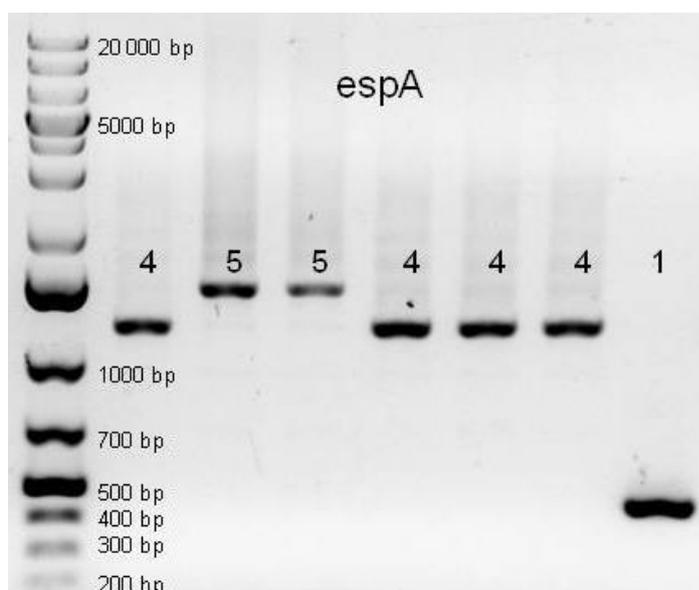


Abbildung 34: Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung der A-Repeat-Anzahl innerhalb des *esp*-Gens. Aufgetragen sind Produkte der *espA*-PCR. Verwendeter Größenstandard: 1 kb Plus DNA Ladder. bp = Basenpaare. 1,4,5 \triangleq Anzahl der Tandem-Repeats.

Die meisten der insgesamt 85 im Jahr 2017 ausgewerteten Isolate hatten 4 Tandemrepeats zu verzeichnen: 62 insgesamt und 31 allein im UKR. 5 Repeats wurden insgesamt bei 18 Proben registriert, innerhalb des UKR 10 mal. 1 Isolat wies 1 Repeat auf, wobei dieses Isolat nicht aus dem UKR stammte. Bei 4 Proben konnte das *esp*-Gen nicht nachgewiesen werden und somit waren jene *espA*-negativ. 3 dieser 4 Proben stammten aus dem UKR und waren von unterschiedlichen Patienten, 1 mal ST117 (*vanB*), 2 mal ST233 (*vanA*).

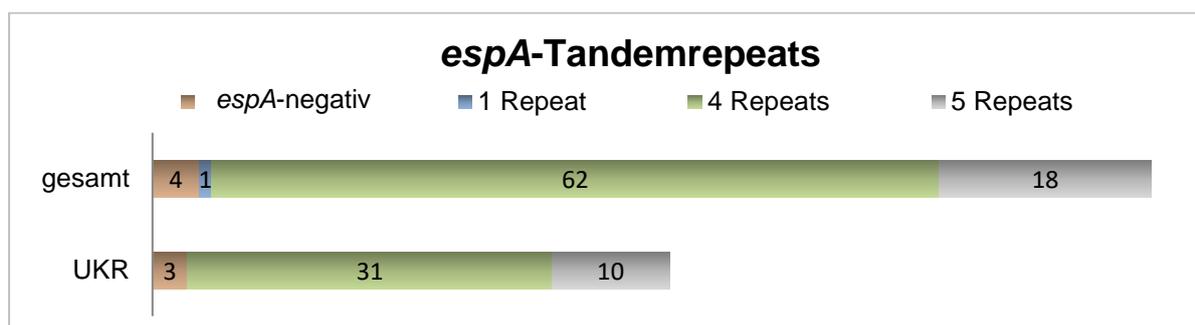


Abbildung 35: Anzahl der *espA*-Tandemrepeats. gesamt: n=85; UKR: n=44.

Auch zur Detektion des *hyl*-Gens wurden entsprechende PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden dann ebenso mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Auswertungsergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt, ein Beispielfeld eines verwendeten Gels findet sich in Abbildung 37.

Hyl-positiv waren insgesamt 88 % aller Proben, *hyl*-negativ ca. 12 %. Eine ähnliche Verteilung ließ sich auch für die UKR-Proben feststellen. Davon waren 84 % *hyl*-positiv und 16 % *hyl*-negativ.

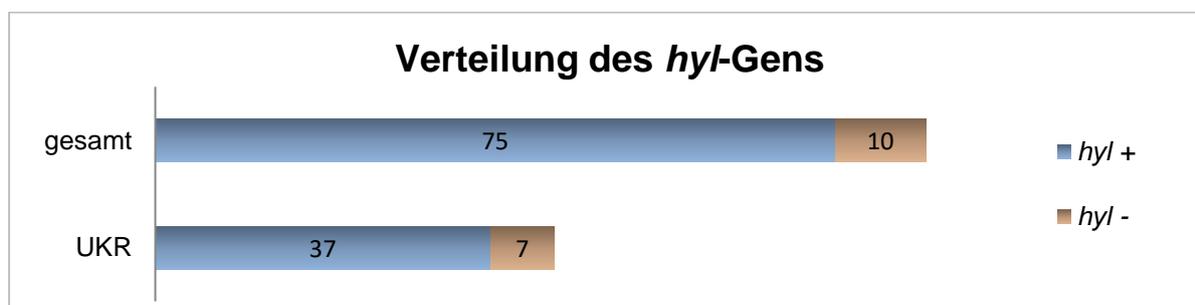


Abbildung 36: Verteilung der Ergebnisse des *hyl*-Nachweises. gesamt: n=85; UKR: n=44.

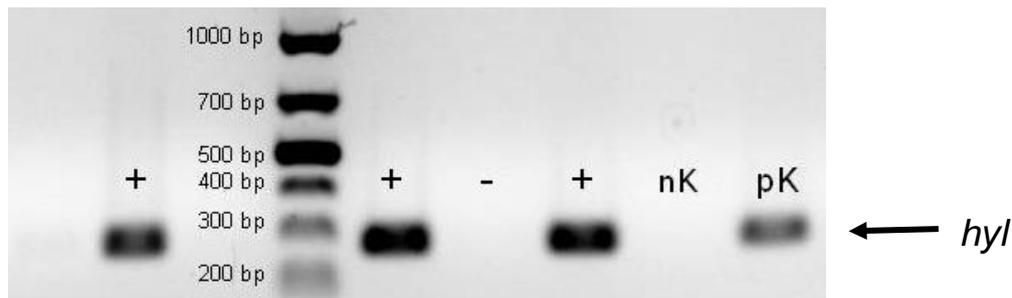


Abbildung 37: Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung des *hyl*-Gens. Aufgetragen sind Produkte der *hyl*-PCR. Verwendeter Größenstandard: 1 kb Plus DNA Ladder. nK = Negativkontrolle. pK = Positivkontrolle. bp = Basenpaare. + : *hyl*-positiv. - : *hyl*-negativ.

Zusätzlich zu *esp* und *hyl* kann auch das Kollagenbindende Adhäsिन (*Acm*; *adhesin of collagen of E. faecium*) zusätzlich zur molekularepidemiologischen Differenzierung von *E. faecium* herangezogen werden. *Acm* ist größtenteils im Genom Hospital-assoziiertes *E. faecium* festzustellen, bei Kommensalen des Menschen oder aus dem Tierreich stammenden *E. faecium* seltener.

Der Nachweis des *acm*-Gens wurde ebenso wie bei *esp* und *hyl* mittels PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ein Beispielbild eines verwendeten Gels findet sich in Abbildung 38, die Auswertungsergebnisse sind in den Abbildungen 39 und 40 dargestellt.

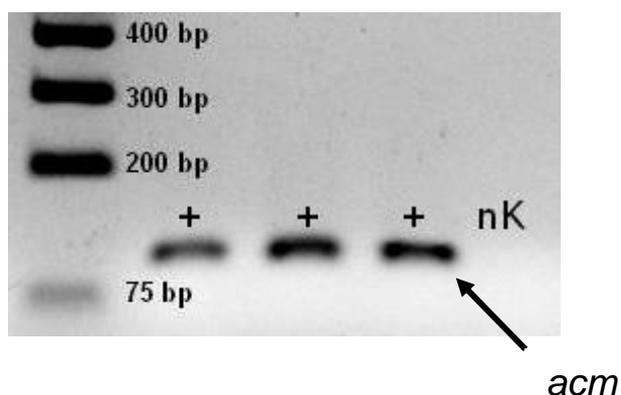


Abbildung 38: Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung der Anwesenheit des *acm*-Gens. Aufgetragen sind Produkte der *acm*-PCR. Verwendeter Größenstandard: 1 kb Plus DNA Ladder. nK = Negativkontrolle. bp = Basenpaare. + : *acm*-positiv.

Der Großteil der Isolate war *acm*-positiv: 96 % aller und 95 % der UKR-Erstisolate. Die beiden UKR-Erstisolate, die *acm*-negativ waren, sind ST117 und ST78 zuzurechnen.

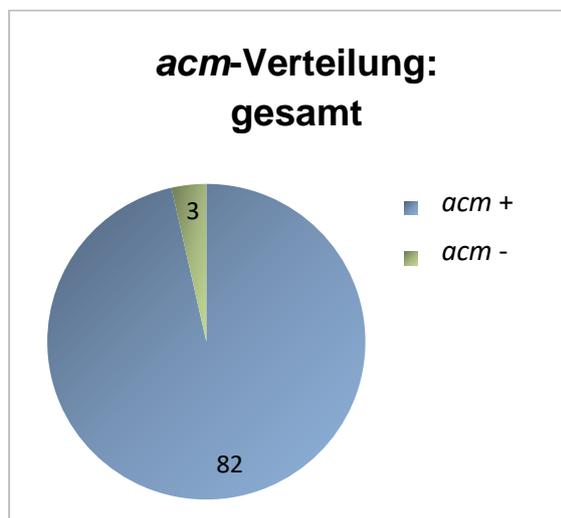


Abbildung 39: *acm*-Verteilung innerhalb aller VRE-Eingänge. n=85.

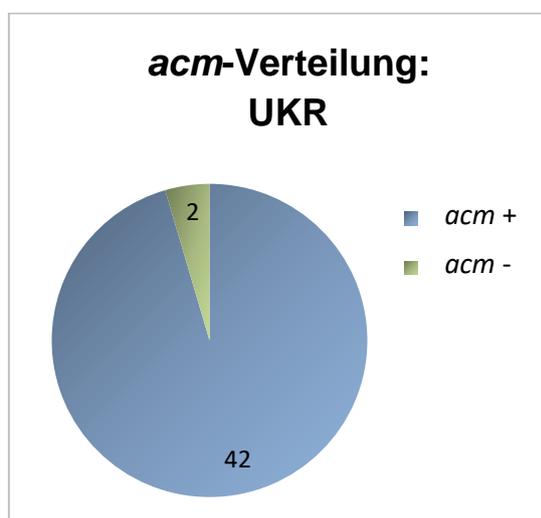


Abbildung 40: *acm*-Verteilung innerhalb der UKR-Erstisolate. n=44.

3.9 Sequenztypen in Verbindung mit Glykopeptidresistenzgenen und Virulenzfaktoren

Je mehr Unterscheidungskriterien bzw. Marker im Rahmen einer molekular-epidemiologischen Analyse untersucht werden, desto genauer können die Isolate differenziert werden. So wurden auch im Rahmen dieser Dissertation neben dem MLSTyp und dem Glykopeptidresistenzgen *vanA/vanB* noch zusätzliche Marker wie die Repeatanzahl in der A-Region des *esp*-Gens sowie das Vorhandensein der Gene *hyl* und *acm* betrachtet (siehe Abbildung 41).

Wie bereits erläutert, waren die an externen Krankenhäusern sowie innerhalb des UKR vorherrschenden MLSTypen aller Erstisolate ST17, ST117 und ST192. Wurde die Kombination aus ST, Glykopeptidresistenzgen, *espA*-Repeatanzahl sowie *hyl* und *acm* betrachtet, so wurde festgestellt, dass es sich teilweise zwischen Stämmen gleichen MLSTyps zwar um verwandte, jedoch keineswegs um identische Bakterien handeln musste.

So waren beispielsweise alle 14 ST17-Erstisolate zwar *vanB*-positiv, *acm*-positiv und wiesen 4 *espA*-Repeats auf, jedoch war 1 Stamm *hyl*-negativ, während alle anderen *hyl*-positiv waren.

Wurde ST117 betrachtet, so wurde eine noch größere Variabilität festgestellt: 7 der insgesamt 15 Erstisolate waren *vanA*-positiv und zählten 5 Repeats. 3 waren jedoch *hyl*- und *acm*-positiv. 4 waren *hyl*-negativ und 1 Isolat davon war *acm*-negativ. Die 8 anderen Isolate waren *vanB*-positiv. 1 davon war *esp*- und *hyl*-negativ und *acm*-positiv. Die 7 übrigen *vanB*-positiven Stämme wiesen 5 Repeats auf und waren ebenso *acm*-positiv. Jedoch waren sie erneut zum Teil *hyl*-positiv (5) und zum Teil *hyl*-negativ (2).

Wurde anschließend untersucht, welche Markerkombination besonders oft vorkam, so wurden für das UKR folgende gefunden:

am häufigsten waren ST17/*vanB*/*espA4*/*hyl*+/*acm*+ und ST192/*vanB*/*espA4*/*hyl*+/*acm*+ (je 11), dann folgten aufgrund der erwähnten hohen Variabilität ST117-Kombinationen mit einer maximalen Anzahl von 4.

Innerhalb der externen Erstisolate waren die Kombinationen ST117/*vanA*/*espA*5/*hyl*+/*acm*+, ST192/*vanB*/*espA*4/*hyl*+/*acm*+ und ST203/*vanB*/*espA*4/*hyl*+/*acm*+ (jeweils 3) am häufigsten.

Auch für ST78 und ST203 lagen verschiedene Kombinationen vor, wohingegen alle weiteren Sequenztypen (ST64, ST186, ST192, ST233, ST737, ST780) stets mit den selben weiteren Markern verknüpft waren.

ST	<i>vanA/B</i>	<i>espA</i> -Repeats	<i>hyl</i>	<i>acm</i>	Anzahl extern	Anzahl UKR
17	B	4	+ / -	+ / +	2 / 1	11 / 0
64	B	4	+	+	1	0
78	B	4	+	+ / -	0 / 0	3 / 1
117	A	5	+ / -	+ / +	3 / 0	0 / 3
			- / -	+ / -	0 / 0	1 / 1
	B	5	neg. / +	- / +	0 / 1	1 / 4
			+ / -	+ / +	1 / 0	4 / 2
186	B	4	+	+	0	1
192	B	4	+	+	3	11
203	A	4	+	+	0	1
	B	4	+ / -	+ / +	3 / 1	1 / 0
233	A	neg.	+	+	0	2
737	B	1	+	+	1	0
780	B	4	+	+	1	2

Abbildung 41: Vorkommende MLSTypen kombiniert mit Glykopeptidresistenzgen (*vanA/B*), *espA*-Repeatanzahl, *hyl*-Gen und *acm*-Gen. Inklusive deren Anzahl in externen Erstisolaten und UKR-Erstisolaten. neg. = negativ.

3.10 Zusammenstellung der analysierten Patientenproben

Im vorherigen Kapitel wurden alle Erstisolate hinsichtlich ihrer Kombination aus MLSTyp, Glykopeptidresistenzgen, *espA*-Repeatanzahl sowie *hyl* und *acm* betrachtet.

Wie erläutert, wurden im analysierten Zeitraum von mehreren Patienten jeweils mehrere Proben untersucht und in der Stammsammlung des UKR verwahrt. Während der Untersuchungen im Jahr 2017 stellte sich dann heraus, dass der darin enthaltene *E. faecium* oft die gleiche Kombination aus Glykopeptidresistenzgen, *espA*-Repeatanzahl, *hyl*, *acm* und ST aufwies. In einem solchen Fall der immer gleichen Kombination musste davon ausgegangen werden, dass es sich in allen Proben dieses Patienten stets um den selben *E. faecium*-Stamm handelt (=Mehrfachisolat).

Die 2017 erfolgreich kultivierten 85 *E. faecium*-Proben stammten von 58 verschiedenen Patienten. Insgesamt wurden 23 Proben gezählt, die mit dem jeweiligen Erstisolat identisch waren.

Tabelle 17 zeigt eine Übersicht über diese Mehrfachisolate. Damit die Mehrfachisolate die Statistik der VREfm-Fälle in der Region Regensburg und am UKR nicht verfälschen, wurden für die meisten folgenden Auswertungen nur die Anzahl der Erstisolate (gesamt: n=62; UKR: n=44; extern: n=18) verwendet.

Die Mehrfachisolate waren meist vom ST17 (7), doch auch ST117 (3), ST78 und ST192 (jeweils 2) sowie ST186 (1) befanden sich unter den Proben.

14 waren *vanB*-positiv und 1 *vanA*-positiv. *Hyl*- und *acm*-positiv waren alle Isolate. 12 mal wurden 4 *espA*-Repeats festgestellt, 3 mal 5 Repeats. Zwischen den einzelnen Proben lagen 1 Tag (Patient 9) bis zu 9 Monate (Patient 12). Von den Patienten 5 und 14 wurden sogar 2 Proben an einem Tag entnommen. Manche Patienten (z.B. Patient 1) blieben während ihres stationären Aufenthalts in einer Abteilung, andere Patientenproben stammen wiederum aus verschiedenen Abteilungen (z.B. Patient 3).

Tabelle 17: Übersicht über Mehrfachisolate innerhalb aller Proben.

Pat. = Patient. ST = Sequenztyp. KMT = Knochenmarktransplantation. ITS = intensiv.

OP = Operationssaal. Asklepios BA = Asklepios Klinikum Bad Abbach. HÄMA = Hämatologie.

Pat.	ST	van	espA- Repeats	hyl	acm	Anzahl gleicher Stämme pro Patient	Befund- datum	Abteilung
1	192	B	4	+	+	2	12.01.09 20.04.09	Innere Innere
2	17	B	4	+	+	3	26.05.09 24.06.09 05.08.09	21 KMT 21 KMT 21 KMT
3	117	B	5	+	+	2	29.06.10 14.08.10	Chirurgie Innere
4	78	B	4	+	+	2	27.10.10 21.12.10	21 KMT 21 KMT
5	192	B	4	+	+	4	03.02.09 27.02.09 05.03.09 05.03.09	Chirurgie ITS Chirurgie ITS Chirurgie Chirurgie
6	17	B	4	+	+	2	05.04.09 28.04.09	Chirurgie ITS Innere
7	78	B	4	+	+	2	02.03.09 21.07.09	Notaufnahme Innere
8	17	B	4	+	+	2	01.09.09 10.09.09	Chirurgie OP Chirurgie OP
9	17	B	4	+	+	3	03.01.09 04.01.09 23.01.09	Chirurgie ITS Chirurgie ITS Chirurgie
10	17	B	4	+	+	3	01.05.10 02.06.10 30.07.10	21 KMT 21 KMT 21 KMT
11	186	B	4	+	+	3	16.02.09 27.08.09 03.11.10	21 KMT 21 KMT Chirurgie
12	17	B	4	+	+	2	05.02.09 16.11.09	Innere Chirurgie
13	117	A	5	+	+	2	11.04.10 30.04.10	St. Josef St. Josef

14	117	B	5	+	+	3	02.07.10	Innere UKR
							30.08.10	Asklepios BA HÄMA
							30.08.10	Asklepios BA HÄMA
15	17	B	4	+	+	2	18.08.10	Asklepios BA HÄMA
							09.09.10	21 KMT

Neben Mehrfachisolaten (alle Proben eines Patienten enthielten den gleichen VREfm-Stamm) wurden jedoch auch verschiedene Stämme in mehreren Proben eines Patienten festgestellt. Wie erwähnt, wurden diese unterschiedlichen Stämme nicht zu den Mehrfachisolaten gezählt, sondern gesondert. Insgesamt wurden bei drei Patienten jeweils verschiedene VREfm registriert.

Bei einer UKR-Patientin konnten drei verschiedene ST innerhalb eines knappen Monats festgestellt werden:

- In der Probe vom 06.08.09 wurde ein VREfm der Kombination *ST192/vanB/espA4/hyl+/acm+* erfasst.
- Zwei Wochen später (20.08.09) wurde ein VREfm eines anderen ST festgestellt (ST780). Glykopeptidresistenzgen, *espA*-Repeat-Anzahl, *hyl* und *acm* blieben jedoch identisch.
- Dann, lediglich eine Woche später (27.08.09), wurde *ST117/vanB/esp-/hyl-/acm+* registriert. Bei der erneuten und letzten Analyse (15.10.09) wurde jedoch keine Veränderung zum 27.08.09 mehr festgestellt (siehe Abbildung 42). Während der Probenentnahmen befand sich die Patientin durchgängig auf Station 21 KMT (Knochenmarktransplantation).

06.08.09		20.08.09		27.08.09		15.10.09
21 KMT		21 KMT		21 KMT		21 KMT
ST 192	→	ST 780	→	ST 117	→	ST 117
<i>vanB</i>		<i>vanB</i>		<i>vanB</i>		<i>vanB</i>
<i>espA</i> 4		<i>espA</i> 4		<i>esp</i> -		<i>esp</i> -
<i>hyl</i> +		<i>hyl</i> +		<i>hyl</i> -		<i>hyl</i> -
<i>acm</i> +		<i>acm</i> +		<i>acm</i> +		<i>acm</i> +

Abbildung 42: VREfm-Proben einer UKR-Patientin unterschiedlicher ST und Virulenzmarker.

Die anderen beiden Patientenwiederholungen (selber Patient mit unterschiedlichen VREfm-Stämmen in Proben) traten bei Proben aus externen Häusern auf.

In der Probe des ersten externen Patienten wurde am 25.05.09 am UKR ein VREfm mit folgenden Markern festgestellt: ST17/*vanB*/*espA*4/*hyl*+/*acm*+.

Genau zwei Monate später befand sich jener Patient im Bezirkskrankenhaus Regensburg und es wurde erneut ein VREfm registriert. Dieser war dem ST192 zuzuordnen, die anderen Marker blieben hingegen unverändert (siehe Abbildung 43).

25.05.09		25.07.09
UKR, Innere		BZK Rgbg, Neurologie
ST 17	→	ST 192
<i>vanB</i>		<i>vanB</i>
<i>espA</i> 4		<i>espA</i> 4
<i>hyl</i> +		<i>hyl</i> +
<i>acm</i> +		<i>acm</i> +

Abbildung 43: VREfm-Proben eines externen Patienten unterschiedlicher ST.
BZK Rgbg = Bezirkskrankenhaus Regensburg.

Der zweite externe Patient war am 10.12.09 ebenso am UKR stationiert, es wurde ST117/*vanB*/*espA5*/*hyl*-/*acm*+ festgestellt. In der Probe, die am 12.05.10 in der Klinik St. Hedwig entnommen worden war, konnten beinahe die gleichen Marker festgestellt werden. Lediglich bezüglich der Hyaluronidase ergab sich eine Veränderung. In der später analysierten Probe war der VREfm *hyl*-positiv (siehe Abbildung 44).

10.12.09		12.05.10
UKR, Chirurgie		St. Hedwig, Pädiatrie
ST 117		ST 117
<i>vanB</i>		<i>vanB</i>
<i>espA 5</i>		<i>espA 5</i>
<i>hyl</i> -		<i>hyl</i> +
<i>acm</i> +		<i>acm</i> +

Abbildung 44: VREfm-Proben eines externen Patienten mit unterschiedlichem Vorkommen des *hyl*-Gens.

3.11 Herkunft der Proben

3.11.1 Sequenztypen am UKR und an externen Häusern

Im Rahmen der epidemiologischen Analyse der VREfm am UKR und im Großraum Regensburg war es nicht nur von Bedeutung die ST, Glykopeptidresistenzgene sowie Virulenzmarker der jeweiligen Stämme zu ermitteln. Auch die Herkunft der Proben und das Vorkommen der einzelnen ST in den einsendenden Krankenhäusern war Teil der Analyse.

In Abbildung 45 ist die Verteilung der ST auf alle einsendenden Krankenhäuser dargestellt. Um die Statistik nicht zu verfälschen, wurden nur Erstisolate gewertet (n=62). Insgesamt sendeten 8 verschiedene Krankenhäuser ihr Material zur Analyse in das Institut für Mikrobiologie und Hygiene am UKR. Auf einem Originalbefund war kein Absender vermerkt, sodass jene Probe in dieser Auswertung unter „unbekannt“ geführt wird.

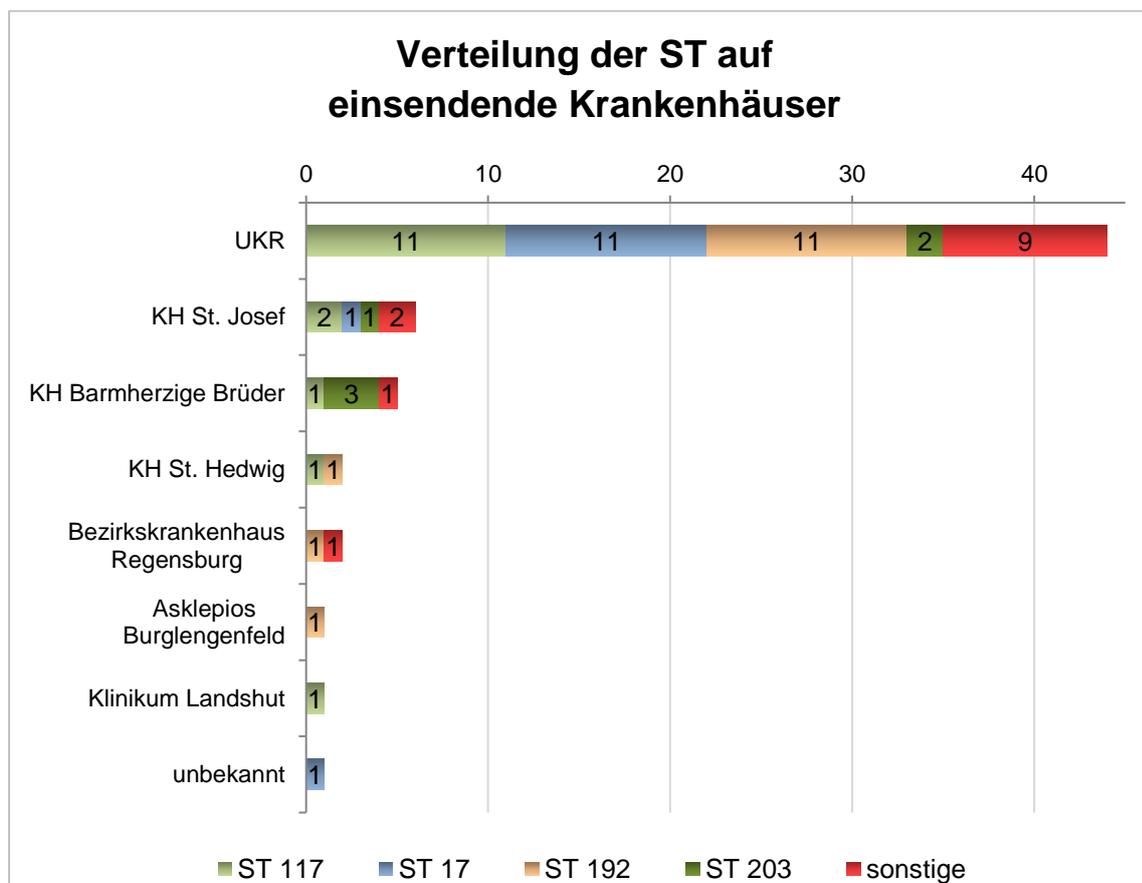


Abbildung 45: Verteilung der ST aus allen Erstisolaten auf alle einsendenden Krankenhäuser. n=62. KH=Krankenhaus.

Am UKR bildeten ST17, ST117 und ST192 mit 75 % die Mehrheit aller ST und auch an externen Krankenhäusern wurden überwiegend jene ST neben ST203 registriert. Lediglich am Krankenhaus St. Josef und am Krankenhaus Barmherzige Brüder stellte man andere MLSTypen fest (Krankenhaus St. Josef: ST737 und ST780; Krankenhaus Barmherzige Brüder: ST64). Jene Krankenhäuser waren zudem nach dem UKR am häufigsten Einsender (6 bzw. 5 von insgesamt 18 externen Eingängen).

Der bisher unbekannte ST wurde neben ST192 in einer Probe aus dem Bezirkskrankenhaus Regensburg registriert.

Von allen anderen Krankenhäusern stammte jeweils 1 Probe.

3.11.2 Verteilung der Vancomycin-resistenter *Enterococcus faecium*-Proben innerhalb des UKR

Da diese Dissertation vor allem die Verteilung der Vancomycin-resistenten *E. faecium* am UKR aufzeigen soll, wird in diesem Gliederungspunkt ausschließlich auf aus dem UKR stammende VREfm-Proben eingegangen. Dabei wurden Mehrfachisolate des selben ST nur einfach gezählt (n=44). Im Folgenden werden die Proben bzw. ST verteilt auf die Abteilungen/Kliniken, die Stationen und die Stationsarten (normal/intensiv) dargestellt.

3.11.2.1 Verteilung auf die Kliniken und Abteilungen des UKR

Wurden die Abteilungen und Kliniken des UKR betrachtet, welche 2009/2010 Proben in die Diagnostik gesendet hatten, so konzentrierten sich die Proben auf vier Abteilungen. Die Mehrheit aller Isolate stammte von Patienten der Hämato-Onkologie (ca. 38 %). Der Anteil in der Kohorte betrug für die Innere sowie für die Chirurgie jeweils etwa 30 %. Eine Probe gehörte keiner der drei bisher genannten Abteilungen an. Jene wurde ambulant in der Notaufnahme gewonnen (siehe Abbildung 46).

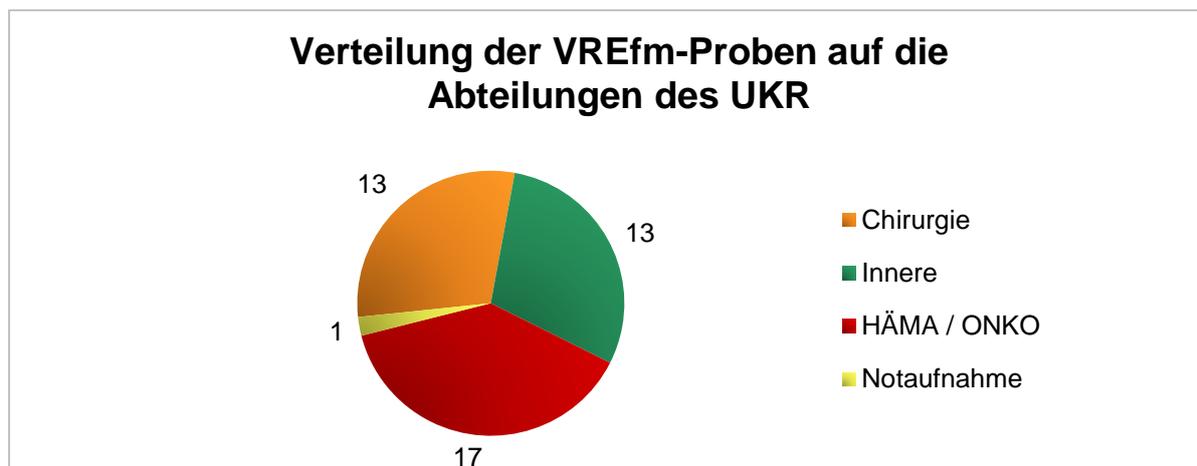


Abbildung 46: Abteilungen/Kliniken am UKR und ihre VREfm-Anzahl. n=44.
HÄMA/ONKO = Hämato-Onkologie.

Wurde die Verteilung der VREfm-Proben auf die Kliniken und Abteilungen externer Krankenhäuser betrachtet, konnten einige Unterschiede zu den UKR-Proben festgestellt werden. Lediglich 43 % aller Proben stammten aus den drei großen Abteilungen Chirurgie (19 %), Hämato-Onkologie (14 %) und Innere (10 %). Der Großteil (53 %) wurde aus anderen Abteilungen eingeschickt, wie etwa Neurologie, Pädiatrie und Urologie.

Abbildung 47 zeigt die Verteilung der einzelnen ST auf die Abteilungen/Kliniken am UKR. In allen vier Abteilungen war ST78 vertreten, wenngleich mit geringer Anzahl (jeweils 1 mal). In den drei großen Abteilungen Innere, Chirurgie und Hämato-Onkologie wurde die Mehrheit aller Proben wie zu erwarten von ST17, ST117 und ST192 gebildet.

Insgesamt glich das ST-Profil der Inneren dem der Chirurgie. Neben ST78, ST17, ST117 und ST192 wurden auch noch ST203 und ST233 registriert (je 1 pro ST und Abteilung).

In den Proben der Hämato-Onkologie wurde zwar kein Stamm vom ST203 oder ST233 festgestellt, jedoch Stämme vom ST186 (1) und ST780 (2). Jene beiden ST kamen somit ausschließlich in Proben der Hämato-Onkologie vor, ST203 und ST233 in der Inneren und der Chirurgie.

Für eine genauere Verteilung der ST auf die UKR-Stationen siehe 3.11.2.2, Abbildung 49.

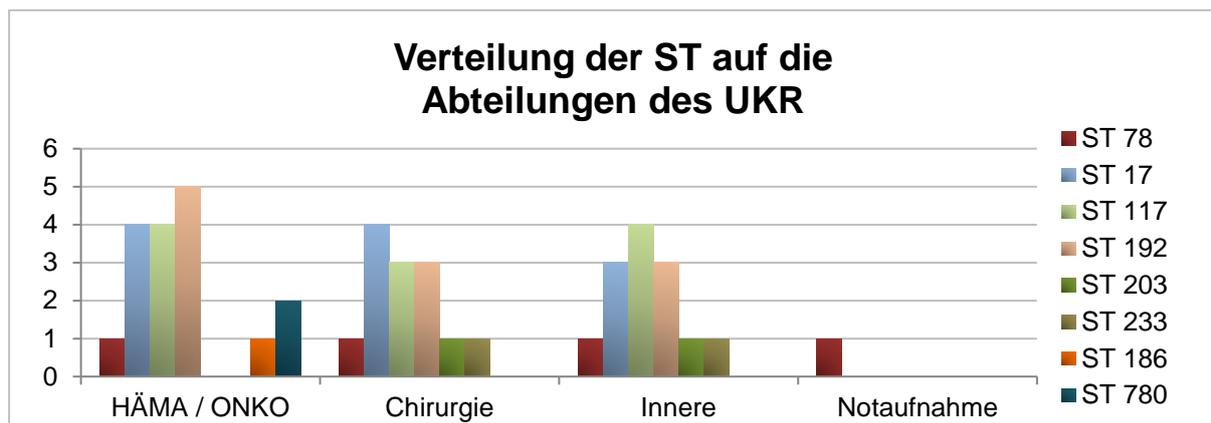


Abbildung 47: Abteilungen/Kliniken des UKR und die dort vorherrschenden ST. Samt Anzahl. n=44. HÄMA/ONKO = Hämato-Onkologie.

3.11.2.2 Verteilung auf die Stationen des UKR

Wurden die VREfm-Einsendungen nach Stationsart betrachtet, wurde eine Verteilung zugunsten der Normalstation festgestellt (65 %). 15 Proben (35 %) wurden von Patienten auf Intensivstationen entnommen.

ST17, ST192 und ST117 wurden hauptsächlich auf normalen Stationen nachgewiesen. Nur ST117 wurde auf Normalstation und Intensivstation (6 bzw. 5) beinahe gleich oft registriert. Neben den drei häufigsten ST (ST17, ST117 und ST192) wurde nur ST203 auf einer Intensivstation registriert. Dieser ST203 kam ausschließlich auf Intensiv vor. Alle weiteren ST wurden aus Patientenproben von Normalstation gewonnen (siehe Abbildung 48).

Für Proben aus externen Kliniken ergab sich eine ähnliche Verteilung zwischen Intensivstation (41 %) und Normalstation (59 %).

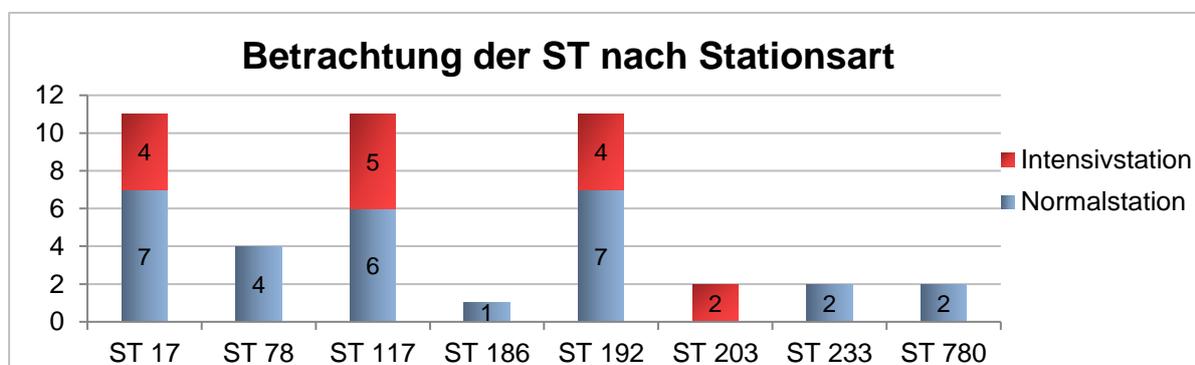


Abbildung 48: Verteilung der VREfm-Proben auf Stationsart. n=44.

Die Verteilung der ST auf die einzelnen Stationen des UKR ist in Abbildung 49 dargestellt. Eine Auflistung aller UKR-Stationen mit VREfm-Fällen, welcher Abteilung diese zuzuordnen sind und ob es sich dabei um normale oder Intensivstationen handelt, stellt Tabelle 18 dar.

Tabelle 18: Stationen des UKR, die VREfm-Proben einsendeten.
KMT = Knochenmarktransplantation.

UKR-Stationen		
10	Innere	Normalstation
15		
20		
21 KMT	Hämato-Onkologie	
48	Chirurgie	
56		
57		
90	Chirurgie	Intensivstation
92	Innere	
93		
97	Chirurgie	

36 % aller UKR-Proben wurden allein von Station 21 KMT (Knochenmarktransplantation) eingesendet. Dabei wurden 6 verschiedene ST registriert: ST17, ST117 und ST192 mit je 4 Proben sowie ST78 mit 1 Probe. Auch ST186 und ST780 befanden sich unter den 21KMT-Proben, wobei diese beiden ST nur dort registriert wurden.

Die Intensivstationen 90 und 92 folgten dann mit 7 bzw. 6 VREfm-Proben, wobei die vorkommenden ST auf beiden Stationen identisch waren: ST17, ST117, ST192 und ST203. ST203 konnte nur auf diesen beiden Intensivstationen festgestellt werden, doch da ein Stamm *vanA*-positiv und der andere *vanB*-positiv war, konnte hier nicht in erster Linie von einer Übertragung von einem auf den anderen Patienten ausgegangen werden.

Station 10 sendete insgesamt 4 Proben ein, wobei alle Bakterienstämme den drei häufigsten Sequenztypen (ST17, ST117, ST192) zugeordnet werden konnten. Andere Stationen hatten jeweils nur eine Probe in die Diagnostik geschickt (Station 20/56/97: ST192; Station 48/Notaufnahme: ST78; Station 57/93: ST17).

ST233, der im analysierten Zeitraum nur am UKR registriert worden war, entstammte einer Probe von Station 15. Hierbei handelt es sich um eine Normalstation der Inneren Medizin. Doch auch in einer im Operationssaal entnommenen Probe wurde ein Stamm vom ST233 diagnostiziert. Ein unmittelbarer Zusammenhang beider Proben des selben ST konnte jedoch aufgrund der Originalbefunde nicht festgestellt werden.

Insgesamt kann man sagen, dass keiner der ST auf jeder Station aufzufinden war. Auf den meisten Stationen wurde ST192 (7 Stationen) registriert. ST17 wurde auf 6 Stationen und in einer aus dem Operationssaal stammenden Probe identifiziert, ST117 und ST78 auf 4 Stationen.

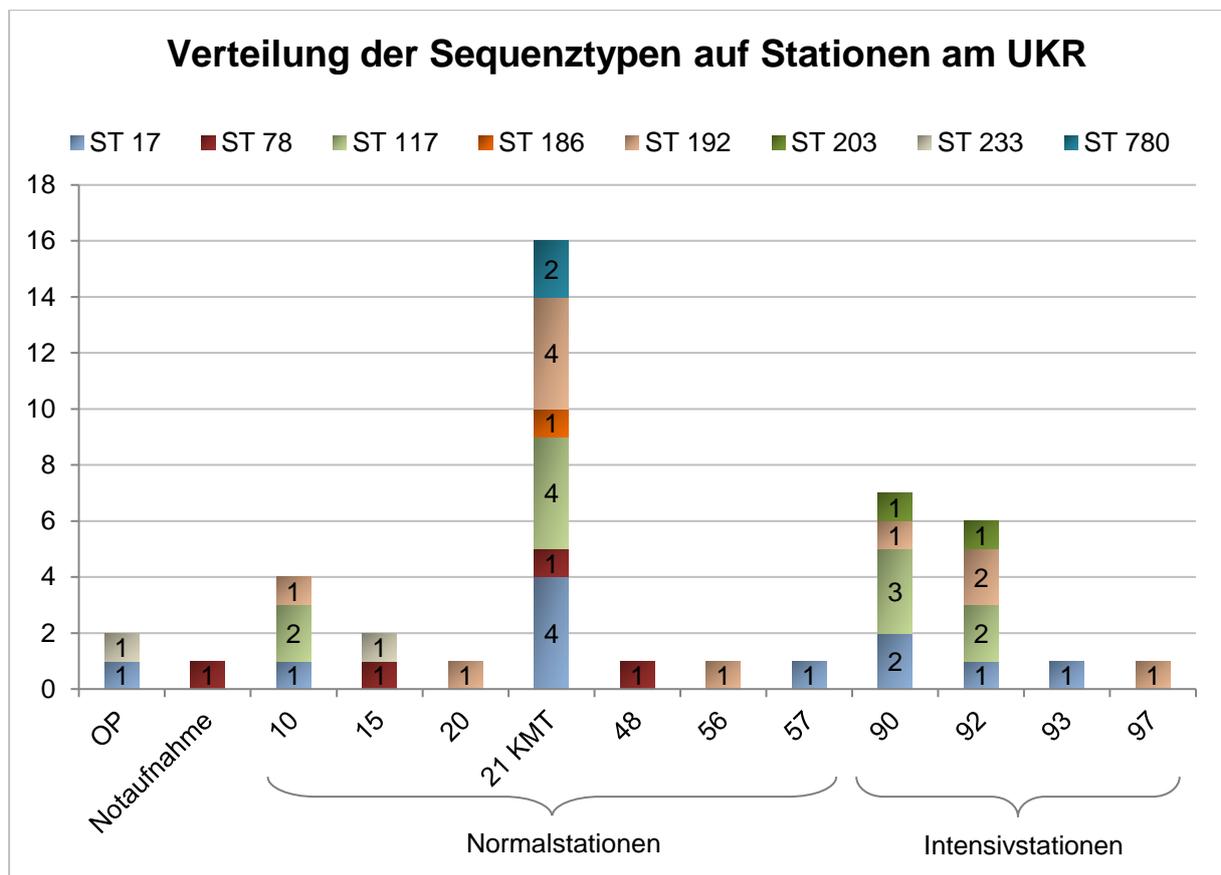


Abbildung 49: Verteilung der ST auf die Stationen des UKR. n=44.
KMT = Knochenmarktransplantation. OP = Operationssaal.

3.12 Probenmaterial

Nachdem in den vorherigen Kapiteln die festgestellten ST sowie die Herkunft der Proben (bezogen auf einsendendes Krankenhaus, Abteilung, Stationsart, Station) behandelt wurde, soll nun auf das Probenmaterial eingegangen werden.

3.12.1 Herkunft: Kultureller Nachweis und VRE-Screening

Das zu analysierende Material aus dem UKR entstammte zu 43 % dem kulturellen VRE-Nachweis und zu 57 % dem durchgeführten VRE-Screening (siehe Abbildung 50). Vor allem die Hämato-Onkologie führte viele Screenings durch (Multiresistente-Erreger-Screening vor einer Knochenmarktransplantation) und stellte somit 60 % aller screenenden Abteilungen dar (siehe Abbildung 51). Auch in den Abteilungen Chirurgie (24 %) und Innere (12 %) sowie in der Notaufnahme (4 %) wurde ein VRE-Screening durchgeführt.

Wurden die Nachweismethoden betrachtet, mit denen an externen Kliniken die VRE-Erstisolate gewonnen worden waren, so wurde festgestellt, dass hier der kulturelle Nachweis mit 83 % (UKR: 43 %) weit überwog (siehe Abbildung 52). An externen Kliniken fanden also prozentual weniger Screenings statt als am UKR und auch die screenenden Abteilungen unterschieden sich: Neurologie, Pädiatrie und Chirurgie (jeweils 1).

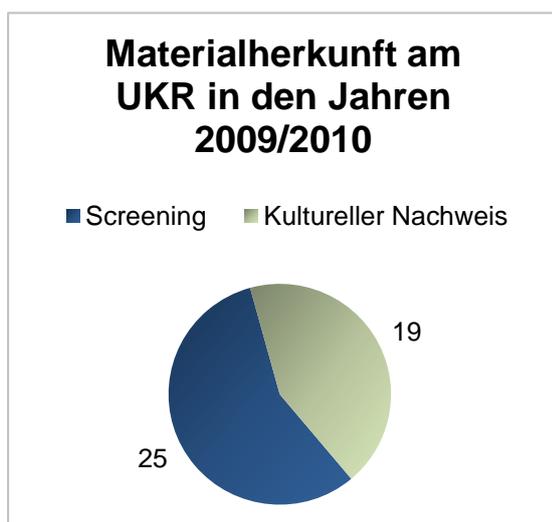


Abbildung 50: Materialherkunft am UKR in den Jahren 2009/2010. n=44. Mehrfachisolate des selben ST wurden einfach gezählt.

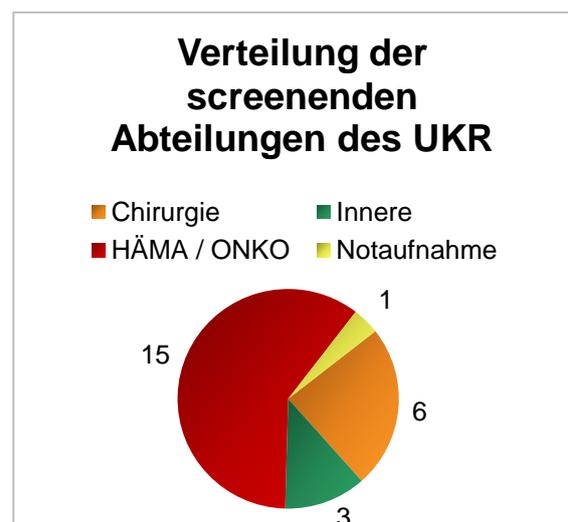


Abbildung 51: Verteilung der Screeningfälle auf die Abteilungen des UKR. n=25. HÄMA/ONKO = Hämato-Onkologie.



Abbildung 52: Materialherkunft in externen Krankenhäusern in den Jahren 2009/2010. n=18.

3.12.2 VRE-Screening am UKR: Sequenztypen

In diesem Punkt soll speziell auf das VRE-Screening am UKR und die dadurch erfassten Sequenztypen eingegangen werden. Wie Abbildung 53 entnommen werden kann und wie in 3.12.1 bereits geschildert worden ist, wurde am UKR insgesamt mehr gescreent. Dies führte unweigerlich dazu, dass die einzelnen ST mehr durch Screening als durch kulturellen Nachweis erfasst wurden (siehe ST17, ST117, ST192). Nur durch das Screening konnten jedoch noch drei weitere ST registriert werden: ST186, ST203 und ST780. Die VREfm-positiven Patienten mit jenen ST - immerhin etwa 12 % - wären ohne das durchgeführte Screening nicht als solche erfasst worden.

ST233 hingegen wurde nur durch kulturellen Nachweis erfasst.

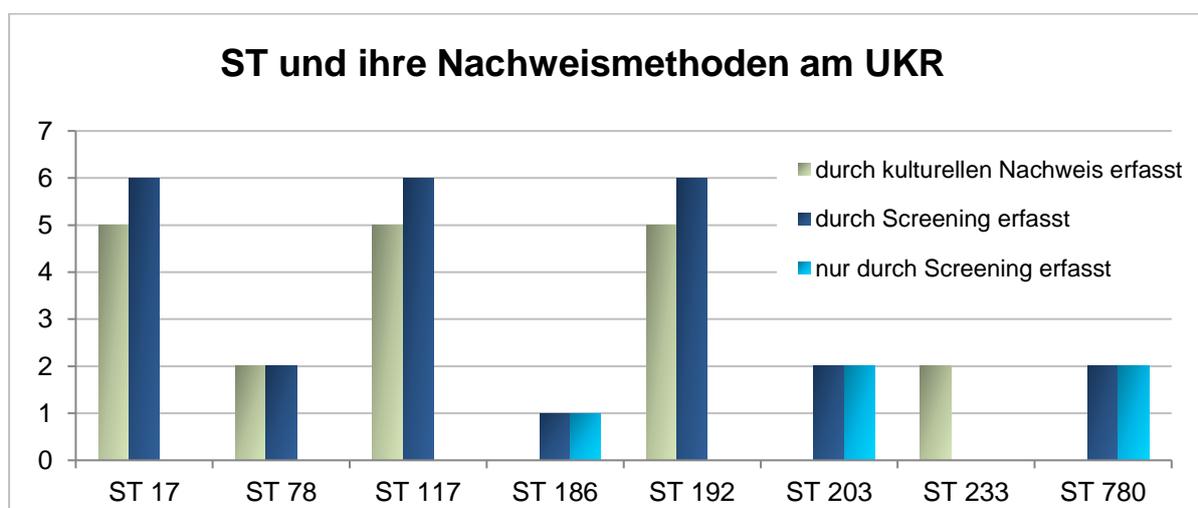


Abbildung 53: ST verteilt auf die Nachweismethoden am UKR. n=44.

3.12.3 Materialgruppen

Für die Auswertung aller VREfm-enthaltenden Materialien wurden jene in folgende Gruppen unterteilt: „Anal-/Perianalabstriche“, „Sekret/Drainage“, „Blutkultur“, „Urinkultur“ und „Katheterspitze“. Zu der Gruppe „Wundabstrich“ wurden Abstriche von Wunden am Abdomen, Wade und (Ileo-)Stoma sowie von einem Gallengang zusammengefasst. Punktate aus der Bauchhöhle, der Galle, des Kniegelenks, aus einer Wunde und aus Abszessen wurde unter „Punktat“ geführt.

„Sputum/Trachealsekret“ enthält endotracheales, tracheales und bronchiales Sekret sowie Sputum. Unter „Abstriche“ wurden Genital-, Hautabstriche (Leiste) und Abstriche ohne genaue Klassifizierung zusammengefasst. Um die Auswertung im Rahmen der Diskussion besser vergleichen zu können, wurde sich bezüglich dieser Einteilung an der Materialgruppen-Einteilung des Epidemiologischen Bulletins [105] orientiert.

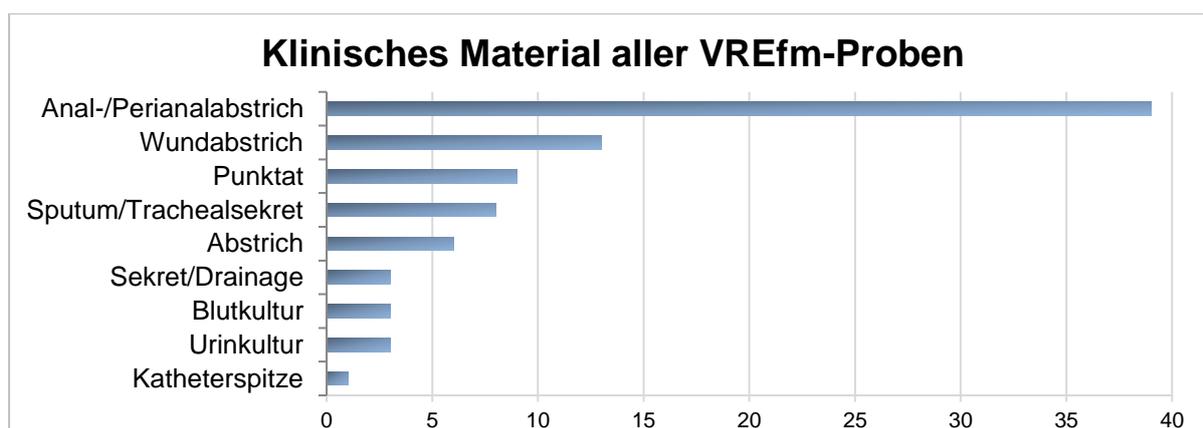


Abbildung 54: Klinisches Material aller VREfm-Proben. n=85.

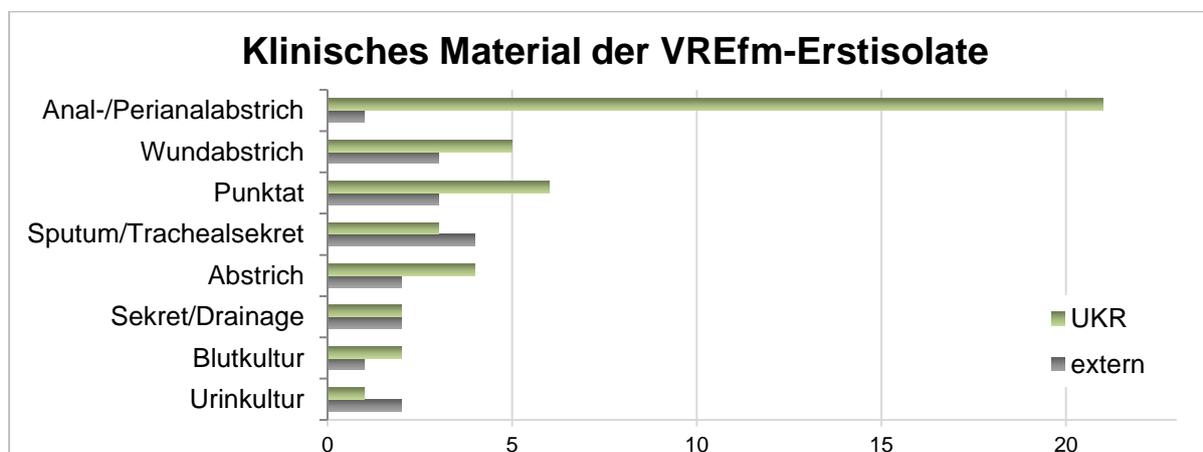


Abbildung 55: Klinisches Material der VREfm-Erstisolate. UKR: n=44; extern: n=18.

Den größten Anteil am klinischen Material nahmen die Anal-/Perianalabstriche (46 %) ein. 15 % wurden von Wundabstrichen dargestellt. Auch Punktate (11 %) und Sputum/Trachealsekret (10 %) wurden vermehrt festgestellt.

Auch innerhalb der UKR-Erstisolate überwogen Anal-/Perianalabstriche (48 %), gefolgt von Punktaten (14 %) und Wundabstrichen (11 %).

Die externen Erstisolate entstammten zumeist Sputum/Trachealsekret (22 %), Punktaten oder Wundabstrichen (je 17 %). Anal-/Perianalabstriche nahmen nur etwa 6 % des Probenmaterials ein (siehe Abbildung 54 und Abbildung 55).

3.12.4 Analyse des VRE-Status

Der VRE-Besiedlungsstatus eines Patienten mit dem jeweiligen VREfm konnte anhand der zugehörigen Materialgruppe geklärt werden. Wurde der VRE in einem Abstrich, Sputum/Trachealsekret, Anal-/Perianalabstrich oder im Urin (Keimzahl < 100 000/ml) festgestellt, wurde von einer Kolonisierung des Patienten durch die Erreger ausgegangen. Die Materialgruppen „Wundabstrich“, „Punktat“, „Blutkultur“, „Sekret/Drainage“ und Urin mit einer darin enthaltenen Keimzahl von > 100 000/ml wurden als Infektion des Patienten gedeutet.

Von allen Erstisolaten (n=62) konnten 60 % einer Kolonisierung zugeordnet werden, 40 % einer Infektion. Eine ähnliche Verteilung konnte innerhalb der UKR-Erstisolate (n=44) festgestellt werden: 66 % VRE-Kolonisierung, 34 % VRE-Infektion (siehe Abbildung 56 und 57).

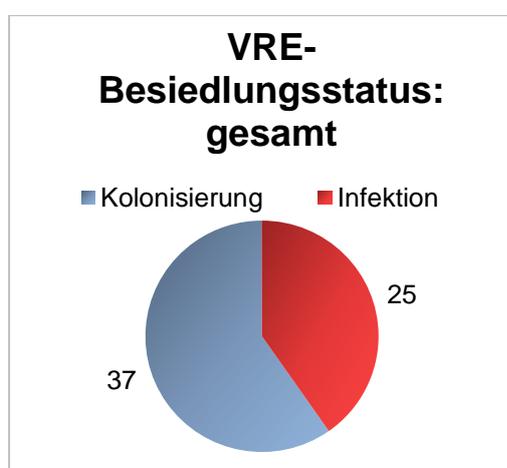


Abbildung 56: Verteilung des Besiedlungsstatus (Kolonisierung/Infektion) innerhalb aller VREfm-Erstisolate. n=62.

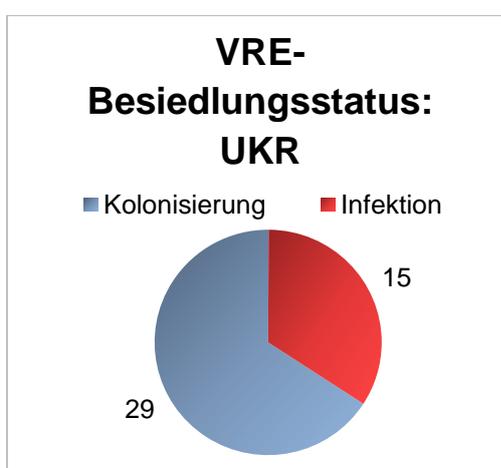


Abbildung 57: Verteilung des Besiedlungsstatus (Kolonisierung/Infektion) innerhalb der UKR-Erstisolate. n=44.

Wurde die Verteilung des VRE-Besiedlungsstatus auf die Erstisolate bzw. deren ST betrachtet, so wurde festgestellt, dass ST64 und ST186 sowie der unbekannte ST nur bei VRE-Kolonisierung nachgewiesen worden waren.

ST203 und ST737 traten hingegen nur im Rahmen einer Infektion auf.

Alle anderen ST konnten beiden Besiedlungsstatus zugerechnet werden, wobei vor allem bei ST192 die Kolonisierung weit überwog.

Der einzige ST, bei dem mehr Infektionen als Kolonisierungen festgestellt werden konnten, war ST78 (siehe Abbildung 58).

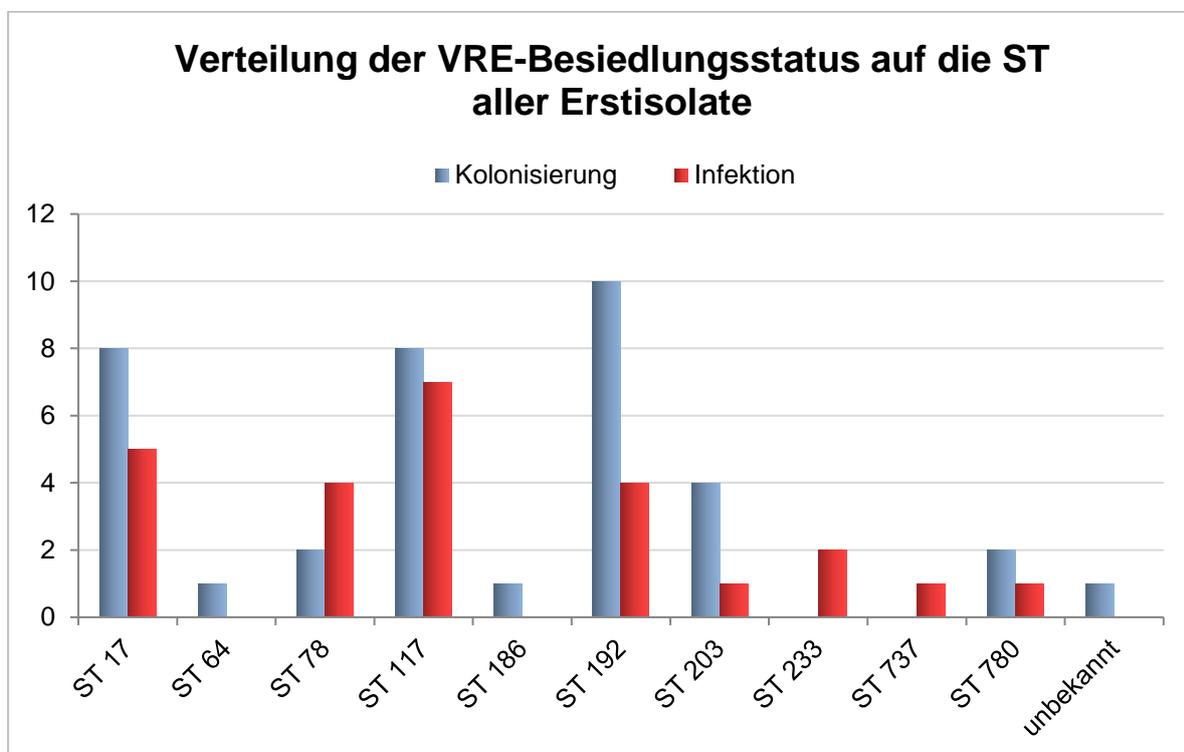


Abbildung 58: Verteilung der VRE-Besiedlungsstatus auf die ST innerhalb aller Erstisolate. n=62.

4 Diskussion

4.1 Hinführung

Sowohl in der Umwelt als auch im menschlichen Intestinaltrakt gehören Enterokokken zu den natürlicherweise vorkommenden Bakteriengattungen. Obwohl Enterokokken lange als harmlose Besiedler der Darmflora galten (bis zu 1 % der intestinalen Mikroflora wird von Enterokokken gebildet [106]), zählen sie seit einigen Jahren weltweit zu den wichtigsten Auslösern nosokomialer Infektionen. [44] Vor allem die Spezies *E. faecalis* und *E. faecium* können Harnwegsinfekte, Peritonitiden, selten auch Endokarditiden und Bakteriämien/Sepsen verursachen. [7, 16] Die antimikrobielle Therapie einer Enterokokkeninfektion kann Schwierigkeiten in sich bergen, denn neben vielen natürlichen Resistenzen können *E. faecalis* und *E. faecium* auch Resistenzen erwerben. Da das Glykopeptidantibiotikum Vancomycin bei immer häufiger auftretenden nosokomialen *E. faecium*-Infektionen [7, 44] als Therapeutikum der Wahl gilt, stellt vor allem die erworbene Unempfindlichkeit gegen Vancomycin die Medizin seit den 1990ern vor eine Herausforderung.

In Deutschland ist laut ARS, der Antibiotika-Resistenz-Surveillance des Robert Koch-Instituts, die Unempfindlichkeit von *E. faecium* gegenüber Vancomycin von 7,3 % (2008) auf 24,4 % (2018) gestiegen. [53] In nur zehn Jahren ist das fast eine Vervierfachung.

Auch europaweit konnte ein Anstieg der Resistenzraten beobachtet werden. Dem *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* nach nahm die Vancomycinresistenz bei *E. faecium* von 10,5 % (2015) auf 17,3 % (2018) zu. [107] Abbildung 59 verdeutlicht diesen europaweiten Anstieg der Vancomycinresistenzraten bei (aus Blut oder Zerebrospinalflüssigkeit gewonnenen) *E. faecium* von 2008 bis 2018 ebenso.

Zudem soll sich laut dem *ECDC* die Zahl der durch VRE-bedingten Infektionen und Todesfälle zwischen 2007 und 2015 beinahe verdoppelt haben. [108]

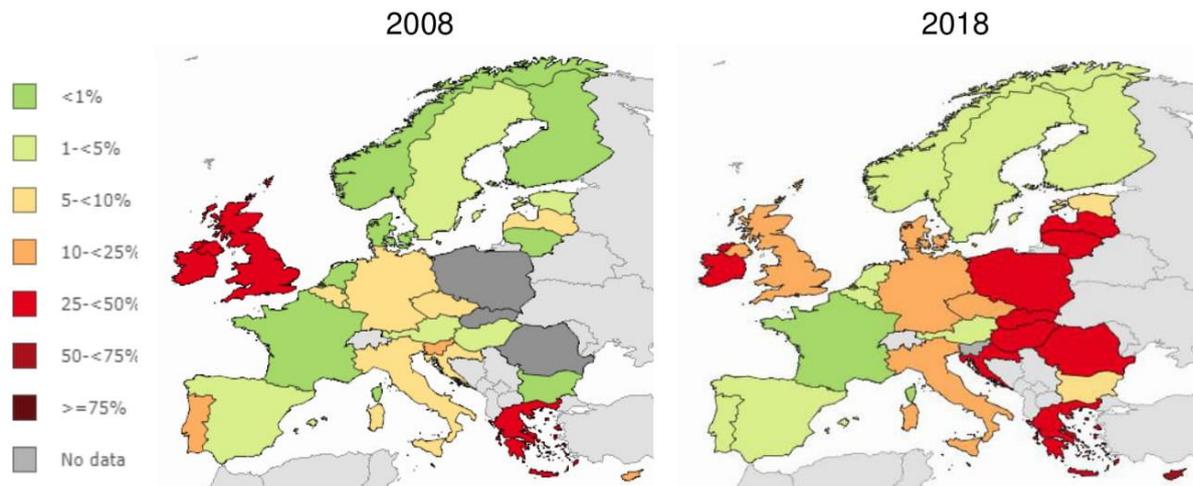


Abbildung 59: Prozentualer Anteil der (aus Blut oder Zerebrospinalflüssigkeit gewonnenen) Vancomycin-resistenten *E. faecium* in europäischen Ländern in den Jahren 2008 und 2018. Die Grafiken stammen aus dem *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* des ECDC. (<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>. Stand 28.01.2020)

Vancomycin-resistente Enterokokken, speziell *E. faecium*, gewinnen also sowohl in Deutschland als auch europa- bzw. weltweit immer mehr an medizinischer Relevanz. Um eine weitere Verbreitung der VRE zu verhindern und geeignete Präventionsmaßnahmen zu entwickeln, ist es unerlässlich die (molekulare) Epidemiologie der VRE zu begreifen.

Aus diesem Grund befasst sich diese Dissertation mit der molekularen Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken. Am Universitätsklinikum Regensburg werden seit dem erstmaligen Auftreten klinikinterner VRE-Fälle im Jahr 2004 alle als VRE identifizierten Proben in einer Stammsammlung verwahrt. Diese Sammlung stellt damit eine umfassende und weitreichende Schnittmenge durch verschiedene VREfm-Stämme dar und kann stellvertretend für die Verbreitung distinkter MLSTypen im süddeutschen Raum betrachtet werden.

Als Teil einer retrospektiven Studie behandelt diese Arbeit die molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken am UKR in den Jahren 2009 und 2010.

4.2 Zeitliche Entwicklung der VRE-Fälle

Wurde der zeitliche Verlauf der untersuchten VRE-Fälle betrachtet, so wurde festgestellt, dass 2010 insgesamt weniger Fälle aus dem UKR und dem Großraum Regensburg untersucht worden waren als im Jahr 2009 (2009: n=47, 2010: n=38). Auch bei den UKR-internen VRE-Fällen konnte ein Rückgang verzeichnet werden. 2010 reduzierte sich die Fallzahl sogar um mehr als die Hälfte (2009: n=43, 2010: n=20).

Insgesamt konnte keine Fallhäufung bezüglich Monat oder Jahreszeit festgestellt werden. Die VRE-Fallzahlen schwankten über den untersuchten Zeitraum von monatlich keinem bzw. 7 Fälle.

Unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am UKR zeigen die Entwicklung der VRE-Fälle am UKR vom Jahr 2004 bis zum Jahr 2017 (siehe Abbildung 60) und ermöglichten so eine hausinterne Einordnung der in dieser Dissertation analysierten Jahre. Über den gesamten Zeitraum hinweg konnte ein zweigipfliger Verlauf der VRE-Fallanzahlen beobachtet werden. Seit 2004 stiegen die Fallzahlen bis 2006 leicht an bis 2008 das erste Maximum erreicht wurde (2008: n=126). Nach diesem ersten Gipfel waren die Zahlen 2009 und 2010 sowohl für mitgebrachte als auch für nosokomiale VRE-Fälle rückläufig. Ab 2011 stieg die Anzahl der VRE-Fälle zum bisherigen Maximum im Jahr 2013 (n=557) stark an. Von 2014 bis 2017 wurden leicht schwankende, aber dennoch hohe Fallzahlen verzeichnet. Auffällig ist hierbei, dass die Anzahl der mitgebrachten VRE-Fälle weit über der der nosokomialen Fälle lag.

Die insgesamt steigende Anzahl der VRE-Fälle am UKR resultiert zum einen aus der allgemein zunehmenden Verbreitung der VRE sowie zum anderen aus der konsequenten Durchführung des VRE-Screenings. Anfangs (2004) wurde am UKR seltener gescreent, doch mit wachsender VRE-Problematik wurden Präventionsmaßnahmen wie das erregerspezifische Screening verstärkt. In den Jahren 2009 und 2010 wurde das Screening konsequent durchgeführt (57 % der UKR-Erstisolate wurden via Screening im Vorfeld registriert, 43 % durch kulturellen Nachweis bei bereits bestehender Infektion). Mangelhafte Erfassung scheint also kein Grund für

den Rückgang der VRE-Fälle zu sein. Diesbezüglich bedarf es also weiterer Untersuchungen.

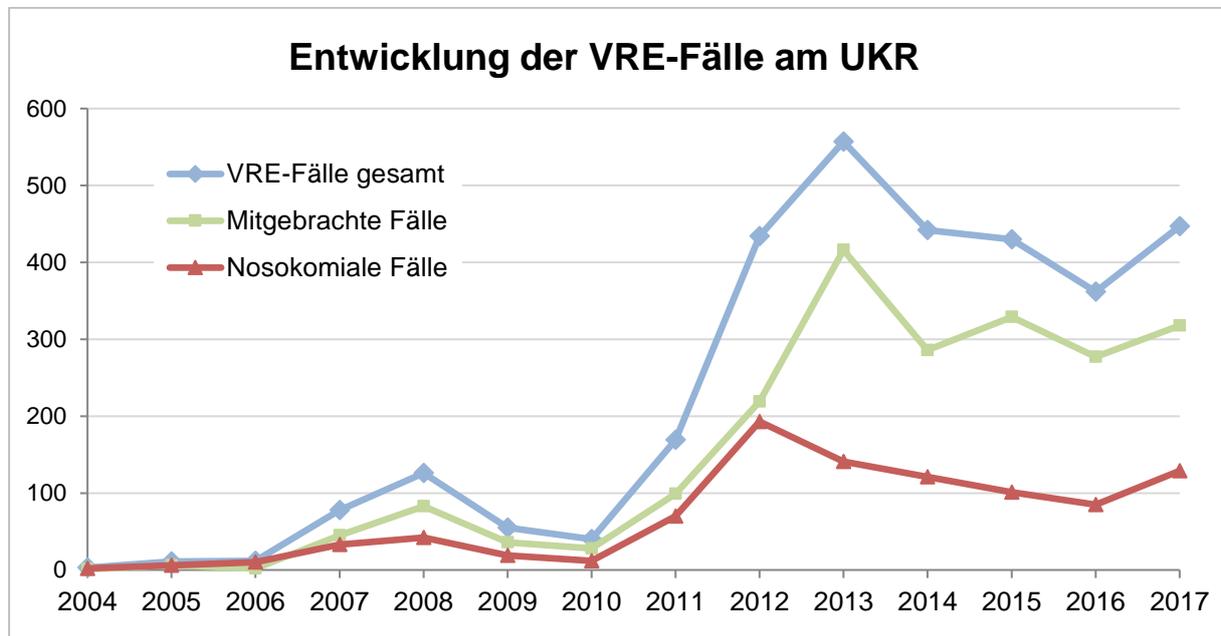


Abbildung 60: Entwicklung der VRE-Fälle am UKR von 2004 bis 2017.
Unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am UKR.

Bei der Auswertung der Stammeinsendungen an das Nationale Referenzzentrum (NRZ) am RKI in Wernigerode konnten von 2006 bis 2010 in etwa gleichbleibende VRE_{fm}-Isolatanzahlen beobachtet werden, bevor die Fallzahlen 2011, ebenso wie am UKR, stark anstiegen (siehe Abbildung 61).

Zu beachten ist dabei, dass es sich bei den durch das NRZ erhobenen Daten um bei VRE-Ausbrüchen zur Typisierung an das NRZ gesendete Proben handelt. Anders als am UKR ist deshalb keine Auswertung aller VRE-Fälle einer Region (oder ganz Deutschlands) gegeben, sondern lediglich ein Querschnitt durch die bei Ausbruchssituationen eingesendeten Proben. Die Daten des NRZ sind somit nur partiell für Deutschland repräsentativ und stellen keine sichere Referenz dar.

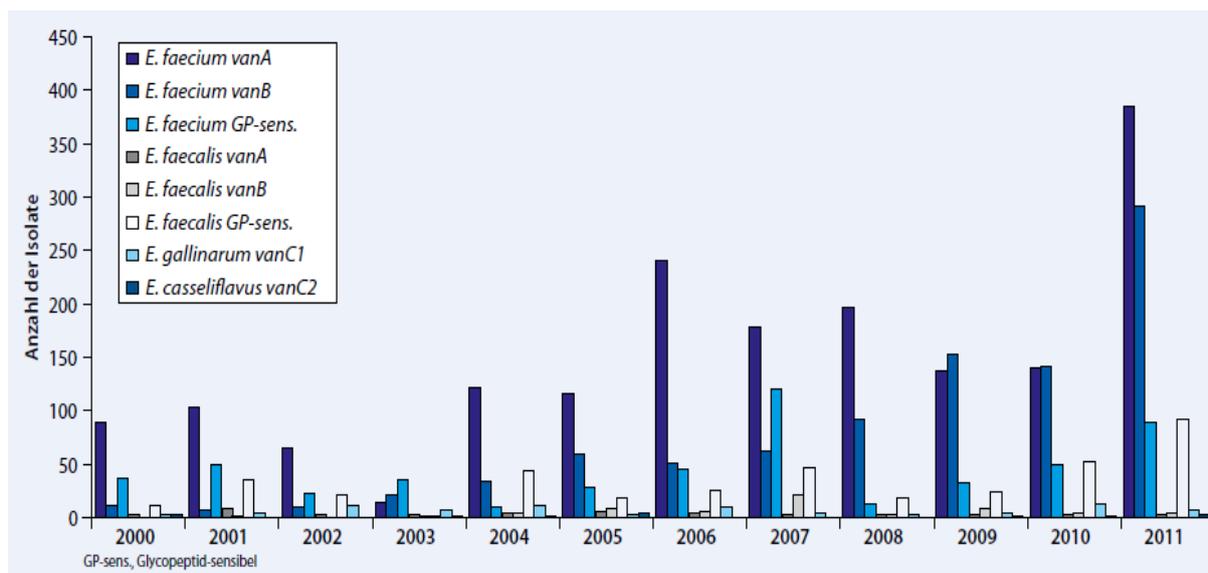


Abbildung 61: Enterokokkenstammeinsendungen an das RKI (Bereich Wernigerode) von 2000 bis 2011. Anzahl von Isolaten verschiedener Spezies und Vancomycin-Resistenztypen von Patienten in Krankenhäusern. [7]

4.3 Alter und Geschlecht der Kohorte

Von den 2009 und 2010 eingefrorenen VRE-Proben konnten 2017 85 als *E. faecium* identifiziert und weiter analysiert werden. Diese 85 VREfm stammten von 58 verschiedenen Patienten. 42 Patienten waren dem UKR zuzuordnen, 16 den externen Krankenhäusern. Für eine Probe war weder das Geschlecht noch das Alter des Patienten angegeben worden, sodass letztlich nur 57 Patienten bzgl. ihres Alters und Geschlechts analysiert werden konnten.

Sowohl für alle Nachweise gesamt als auch für die UKR-Nachweise ließ sich eine annähernd gleiche Geschlechterverteilung feststellen.

Mit steigendem Patientenalter konnte grundsätzlich eine geschlechtsunabhängige Zunahme der VREfm-Fälle bis zur Gruppe der 50 - 59 Jährigen verzeichnet werden. Bis zur Gruppe der 70 - 79 Jährigen blieben die VRE-Fallzahlen auf relativ hohem Niveau, bis sie anschließend sanken.

Diese Alterstendenz lässt sich durch mehrere Aspekte begründen. Zum einen betreffen Risikofaktoren für eine VRE-Infektion meist ältere Menschen. Oft sind die in

schlechterer körperlicher Verfassung, weisen Immundefizite auf und leiden an schweren Grunderkrankungen. Ein deshalb längerer Aufenthalt in Krankenhäusern sowie die Zuhilfenahme spezieller medizinischer Mittel wie Harnwegskatheter oder Dialyse können eine VRE-Infektion begünstigen. [7, 17]

Zum anderen wird die Bevölkerung Deutschlands aufgrund des demografischen Wandels immer älter, was die Anzahl der Risikopatienten somit erhöht. Neben älteren Menschen gelten jedoch auch Kleinkinder oder immunsupprimierte Personen als Risikopatienten [7].

4.4 Enterokokkenspezies

2009 und 2010 wurden insgesamt 95 VRE-Fälle aus verschiedenen Kliniken dokumentiert. 94 Proben gehörten der Bakterienspezies *E. faecium* an, 1 Probe erwies sich als *E. faecalis*. Die Speziesbestimmung erfolgte entweder anhand der MALDI-TOF-Massenspektroskopie beim kulturellen Nachweis oder mittels PCR im Rahmen des Screenings. Die Unempfindlichkeit gegen Vancomycin wurde mit dem BD-PHOENIX-System (bei kulturellem Nachweis) oder mittels PCR zum Nachweis der Glykopeptidresistenzgene *vanA* und *vanB* (Screening) untersucht.

Im Jahr 2017 konnten aus 88 der ursprünglich 95 Proben Vancomycin-resistente Enterokokken angezüchtet und analysiert werden. Bei der Speziesbestimmung wurden davon 85 Proben als *E. faecium*, 2 Proben als *E. gallinarium* und 1 Probe als *E. casseliflavus* identifiziert. Der 2009 identifizierte *E. faecalis* konnte im Jahr 2017 nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Diskrepanz bezüglich der 2009/2010 und 2017 durchgeführten Speziesnachweise kann verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist eine Verwechslung der Proben beim Hinzufügen zur Stammsammlung des UKR in den Jahren 2009/2010.

Es ist jedoch auch denkbar, dass 2009/2010 entweder innerhalb der VRE-Nährbouillon oder bei der Kultivierung des Probenmaterials mehrere Enterokokkenspezies angewachsen waren und keine *E. faecium*-Einzelkolonie vorlag. Identifizierte

der Speziesnachweis 2009/2010 dennoch einen *E. faecium*, wurde die Probe, welche neben *E. faecium* zudem *E. gallinarium* oder *E. casseliflavus* enthielt, der Stammsammlung hinzugefügt. So ist es möglich, dass auch nach dem Auftauen im Jahr 2017 nicht nur *E. faecium*, sondern auch andere Enterokokkenspezies auf einer Blutagarplatte angewachsen waren. Wurde 2017 dann (im Gegensatz zu 2009/2010) mehrmals kein *E. faecium* vom Blutagar gepickt, sondern eine andere Spezies, konnten für diese Probe keine weiterführenden Analysen (Glykopeptidresistenzgen-Nachweis, MLSTypisierung, Nachweis der Virulenzmarker) durchgeführt werden. Zudem ist als weitere mögliche Erklärung in Betracht zu ziehen, dass der 2009/2010 identifizierte *E. faecium* in der eingefrorenen Nährbouillon/Probe nicht bis zum Jahr 2017 überlebte, andere Enterokokkenspezies hingegen schon.

4.5 Glykopeptidresistenzen

Viele Enterokokkenspezies weisen mehrere natürliche Antibiotikaresistenzen auf. Zusätzlich können sie noch weitere Resistenzen erwerben. Die erworbenen Resistenzen sind auf Veränderungen der Bakterien-DNA zurückzuführen. Vor allem die erworbene Unempfindlichkeit gegen die Glykopeptidantibiotika Teicoplanin und Vancomycin spielt seit geraumer Zeit eine große Rolle. [44] Die Unempfindlichkeit gegen Vancomycin wird durch die Resistenzgene *vanA* und *vanB* vermittelt, die gegen Teicoplanin durch *vanA*.

In den Jahren 2009 und 2010 wurden an einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Südwestdeutschland in 87 % der VREfm-Fälle der *vanB*-Genotyp festgestellt, in 13 % der Fälle der *vanA*-Genotyp. [109]

Eine ähnliche Verteilung konnte für das UKR und den Großraum Regensburg in diesen beiden Jahren beobachtet werden. Auch dort dominierte der *vanB*-Genotyp. Von insgesamt 62 Erstisolaten wiesen 52 das *vanB*-Cluster auf. Lediglich 16 % konnten dem *vanA*-Genotyp zugeordnet werden. Das gleiche Verhältnis konnte auch innerhalb des UKR beobachtet werden (37 von 44 waren *vanB*-positiv). Doch nicht nur 2009/2010 überwog am UKR und Umgebung der *vanB*-Typ.

Seit Beginn der Studie der AG Prof. Dr. Schneider (zu der auch diese Dissertation gehört) im Jahr 2004 kann eine Verteilung deutlich zugunsten des *vanB*-Genotyps festgestellt werden. Zwischen 2004 und 2010 waren sogar 96 % der 248 verfügbaren Erstisolate *vanB*-positiv und nur 4 % waren dem *vanA*-Genotypen zuzurechnen. In einer zweiten retrospektiven Studie der AG Prof. Dr. Schneider von April 2017 bis März 2018 haben sich die Verhältnisse jedoch verschoben: es wurde eine beinahe gleiche Verteilung der Glykopeptidresistenzgene festgestellt (*vanA*: 47 %, *vanB*: 53 %; unveröffentlichte Daten der AG Prof. Dr. Schneider).

Daten aus dem Labor Dr. Limbach (siehe Abbildung 62) zufolge wurden in südwestdeutschen Krankenhäusern seit 2000 stets steigende Raten an Glykopeptid-resistenten *E. faecium* erfasst, wobei der Anteil der Vancomycin-resistenten *E. faecium* bis 2011 um mehr als das Fünffache zunahm (2000: 7 %, 2011: 40 %). Im Vergleich dazu blieb die Häufigkeit einer Teicoplaninresistenz über den gesamten Zeitraum in etwa gleich bei 10 % ± 3-4 %. Dieser Sachverhalt zeigt, dass es (ebenso wie am UKR) im südwestdeutschen Raum zu einem stark gehäuften Auftreten *vanB*-positiver *E. faecium* kam. [7]

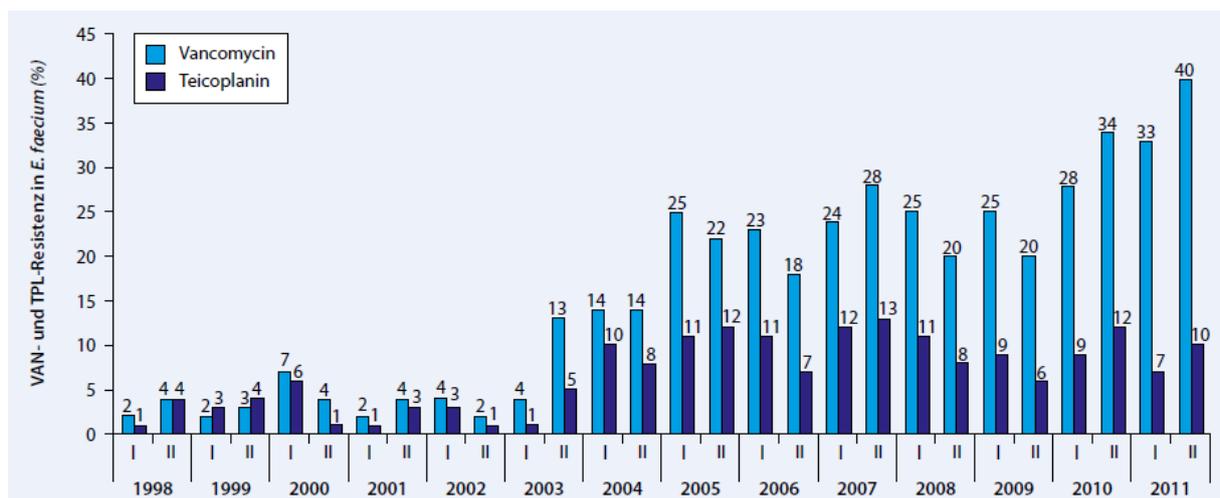


Abbildung 62: Häufigkeiten von Vancomycin- und Teicoplaninresistenzen (%) bei *E. faecium*-Isolaten aus südwestdeutschen Krankenhäusern von 1998 bis 2011. Daten aus dem Labor Dr. Limbach, Heidelberg. VAN = Vancomycin; TPL = Teicoplanin. [7]

Deutschlandweite Daten des NRZ zeigten für die an das RKI gesendeten VRE-Proben jedoch eine andere Verteilung der Resistenzgene. Von 2004 bis 2008 überwog der *vanA*-Typ, 2009 überwog erstmals die Anzahl der *vanB*-positiven Fälle leicht. [7] In den Jahren 2010 bis 2014 lagen die beiden Resistenzgene in etwa gleichem Maße vor [7, 110, 111], bis 2016 erstmals deutlich mehr *vanB*- als *vanA*-Genotypen registriert wurden [112]. Seitdem steigt die Zahl der *vanB*-positiven VREfm immer weiter. Im Jahr 2018 lag eine Verteilung von 68 % (*vanB*) zu 19 % (*vanA*) vor [5].

Innerhalb Deutschlands lag also in den Jahren 2009 und 2010 eine unterschiedliche Verbreitung der genotypischen Glykopeptidresistenz vor. Während im süddeutschen Raum schon früh der *vanB*-Genotyp dominierte (auch 2009/2010), lagen im restlichen Teil Deutschlands in etwa gleich viele *vanA*- bzw. *vanB*-positive Stämme vor (früher war sogar eher der *vanA*-Typ vertreten). Weshalb dieser deutschlandweite Unterschied bestand, konnte aktuell noch nicht geklärt werden.

Eine potentielle Ursache könnte in der klonalen bzw. polyklonalen Ausbreitung (=vertikale Ausbreitung durch Zellteilung) einzelner *vanB*-positiver *E. faecium* im Großraum Regensburg liegen. Gegen eine alleinige klonale bzw. polyklonale Ausbreitung einzelner Stämme spricht, dass neben den 3 Haupt-MLSTypen zudem noch 5 weitere ST am UKR und 3 weitere an externen Krankenhäusern registriert worden waren.

So könnte neben der vertikalen Ausbreitung auch der horizontale Gentransfer über die Weitergabe mobiler genetischer Elemente eine Rolle in der Ausbreitung der *vanB*-positiven VREfm am UKR spielen. Die horizontale Weitergabe der Vancomycinresistenz wurde sowohl für *vanA* auch für *vanB* in der Literatur schon mehrfach beschrieben. So könnten primär Vancomycin-sensible *E. faecium*-Stämme, die bereits in der Klinik verbreitet waren, sukzessiv das *vanB*-Resistenzgen unabhängig voneinander erworben haben. [22, 113, 114] Vor allem für eine genetische Linie der *E. faecium*, dem Hospital-adaptierten klonalen Komplex 17 (CC17), ist diese Möglichkeit denkbar. Gestützt wird die Theorie des unabhängigen horizontalen Erwerbs der Vancomycinunempfindlichkeit durch Studien, welche auf einen Glykopeptidresistenz-Genpool außerhalb der Enterokokken weisen [8, 61].

Eine andere Hypothese zum horizontalen Gentransfer von Bender *et al.* [78] befasst sich mit der menschlichen Darmflora. Dort könnte das *vanB*-Resistenzgen unter anaeroben Bakterienspezies auf natürliche Weise verbreitet sein. Vor allem nach einer Therapie mit Vancomycin könnte das *vanB*-Operon dann leicht auf sensible *E. faecium* übertragen werden. Mit den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Analysen ließ sich eine Übertragung der Resistenzgene nicht endgültig bestimmen. Dazu müssten die *vanA*- und *vanB*-Operons hinsichtlich ihrer genauen Basenfolgen untersucht werden.

Es ist jedoch auch möglich, dass eine Mischung aus (poly-)klonaler und horizontaler Verbreitung des *vanB*-Operons, wie bereits 2001 von Kawalec *et al.* [115] beschrieben, im Großraum Regensburg zum Anstieg der *vanB*-VREfm geführt haben könnte. Warum dieser Anstieg nicht in ganz Deutschland eintrat, ist noch Gegenstand aktueller Forschungen.

Eventuell spielt auch der hausinterne Antibiotikaverbrauch eine Rolle in der deutschlandweit unterschiedlichen Verteilung der Vancomycinresistenzgene. Wurde am UKR und im Großraum Regensburg möglicherweise seit jeher eher mit Vancomycin therapiert, hätte es zu einer Selektion *vanA*- und *vanB*-positiver Enterokokken kommen können. Wurde in anderen Teilen Deutschlands vorwiegend Teicoplanin eingesetzt, so hätte eher eine Selektion der *vanA*-positiven VRE aufgrund der *vanA*-vermittelten Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz stattgefunden. Eine solche Selektion des *vanA*-Genotyps aufgrund vermehrtem Teicoplanineinsatz konnte in den USA beobachtet werden. [24] Andererseits wäre auch die Möglichkeit bisher unbekannter Selektionsmechanismen des *vanB*-Genotyps aufgrund der Verwendung bestimmter anderer Antibiotika denkbar. Um dies zu klären, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Neben dem Verbrauch bestimmter antimikrobieller Substanzen könnten auch die gesenkten MHK-Grenzwerte der Vancomycinresistenztestung und die somit verbesserte Detektion von *vanB*-VREfm mit vergleichsweise niedriger Vancomycinresistenzexpression eine entscheidende Rolle spielen. *VanB*-positive *E. faecium*, welche eine sehr niedrige MHK für Vancomycin aufwiesen, wurden so vor der Senkung der Grenzwerte bei Verwendung einer zu hohen Vancomycinkonzentration

nicht als Vancomycin-resistent erkannt, weil das Diagnoseverfahren nicht sensitiv genug war. Die Reduzierung der MHK-Grenzwerte verbesserte die Diagnostik jedoch, sodass mehr *vanB*-Genotypen detektiert wurden. Zudem finden immer häufiger genotypbasierte Nachweisverfahren wie *vanB*-PCR Verwendung, sodass auch so die Problematik einer recht schwachen Resistenzexpression umgangen werden kann. [7]

Wie bereits erwähnt, vermitteln die beiden Gencluster *vanA* und *vanB* verschiedene phänotypische Resistenzen. Der *vanA*-Typ weist fast ausschließlich eine Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz auf, selten eine Vancomycinresistenz bei gleichzeitiger Teicoplaninsensibilität. Der *vanB*-Typ hingegen geht meist mit einer Vancomycinresistenz bei gleichzeitiger Teicoplaninsensibilität einher, sehr selten mit einer Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Dissertation auch der Zusammenhang der genotypischen mit der phänotypischen Glykopeptidresistenz untersucht.

10 der insgesamt 62 Erstisolate waren *vanA*-positiv. Davon wiesen 90 % eine für dieses Gencluster typische Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz auf, 10 % waren gegenüber Teicoplanin sensibel und nur gegen Vancomycin resistent. Von den *vanA*-positiven UKR-Erstisolaten wurde bei 86 % eine Kreuzresistenz festgestellt, bei 14 % eine alleinige Vancomycinresistenz. Diese seltenen, *vanA*-positiven und Teicoplanin-sensiblen Stämme sollten gemäß der Literatur sicherheitshalber immer als potenziell Teicoplanin-resistent behandelt werden.

Zum Vergleich wurden vom NRZ, dem RKI, veröffentlichte Daten herangezogen. Anders als im Großraum Regensburg wiesen in den Jahren 2008 bis 2010 100 % der *vanA*-positiven Einsendungen an das NRZ eine Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz auf, keiner der Stämme war Teicoplanin-sensibel. [7, 116]

Eine mögliche Ursache dieses unterschiedlich hohen Anteils einer Teicoplaninresistenz bzw. -sensibilität (am UKR waren 14 % Teicoplanin-sensibel) könnten die unterschiedlichen MHK-Grenzwerte sein, anhand derer die Resistenzbewertungen durchgeführt worden sind. Im Rahmen dieser Studie wurden Grenzwerte gemäß der *CLSI*-Richtlinien (2015) verwendet und auch als intermediär bewertete Stämme

wurden als resistent gehandhabt. Alle Stämme mit einer MHK für Teicoplanin von $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ galten dabei als resistent. Das NRZ bewertete jedoch Stämme bereits ab $\text{MHK} > 2 \mu\text{g/ml}$ als resistent. Dies hatte zur Folge, dass im Rahmen dieser Arbeit Stämme als Teicoplanin-sensibel eingestuft wurden, welche durch das NRZ als resistent eingestuft worden wären. So geschah dies auch bei dem *vanA*-positiven Stamm, welcher in dieser Dissertation mit $\text{MHK} = 4 \mu\text{g/ml}$ als Teicoplanin-sensibel bewertet wurde. Nach der Resistenzbewertung des NRZ wäre dieser Stamm als Teicoplanin-resistent eingestuft worden.

Wurden dann die *vanB*-positiven Erstisolate (gesamt: $n=52$, UKR: $n=37$) betrachtet, wurde zu 94 % (sowohl bei allen Erstisolaten als auch den UKR-Erstisolaten) eine Vancomycinresistenz festgestellt. Zum besseren Vergleich mit Literatur wurden in diesem Wert zwei Gruppen zusammengefasst: zum einen die Gruppe der Stämme mit einer Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz (etwa 6 % der Erstisolate) und zum anderen die der Vancomycin-resistenten und Teicoplanin-sensiblen Stämme (etwa 88 % der Erstisolate). 6 % der Stämme waren Vancomycin-sensibel.

Es mag auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen, dass ein *vanB*-positiver Stamm sich phänotypisch Vancomycin-sensibel verhält. Jedoch kann dieser Sachverhalt als Merkmal der *vanB*-vermittelten Vancomycinresistenz betrachtet werden und mit der unterschiedlich stark ausgeprägten Expressierung des *vanB*-Genclusters [7, 117] begründet werden. Wie in 1.5.2.1.2 bereits erwähnt, liegen bei *vanB*-positiven VREfm die MHK-Werte zwischen 4-1000 $\mu\text{g/ml}$, teilweise sind sie sogar noch geringer. Die in dieser Arbeit untersuchten sensiblen Stämme wiesen MHK-Werte zwischen 1,5 und 2 $\mu\text{g/ml}$ auf und bewirkten so die phänotypische Sensibilität bei genotypischer Resistenz. Für solche Stämme wird in der Literatur allgemein empfohlen, jene sicherheitshalber immer als potenziell Vancomycin-resistent zu handhaben.

Kreuzresistenzbildungen werden allgemein bei *vanB*-positiven Stämmen im Vergleich zu *vanA*-positiven in stark reduziertem Umfang registriert, wie bereits oben erwähnt. Dies wird durch die Referenzdaten aus dem NRZ bestätigt. Bei den 2008/2009 [116] sowie 2010 [7] dort analysierten Stämmen konnte keine Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz festgestellt werden (Großraum Regensburg: 6 %).

Auch hinsichtlich der Vancomycinresistenzrate innerhalb der *vanB*-Stämme unterscheiden sich die Daten des NRZ von den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten. Trotz eines niedrigeren MHK-Grenzwerts für Vancomycin am NRZ (Vancomycin-resistent bei MHK > 4 µg/ml) waren 2008/2009 nur 79 % der Stämme phänotypisch Vancomycin-resistent, 2010 jedoch deutlich mehr mit 96 %.

Wurden diese zwei Werte zur besseren Vergleichbarkeit zusammengefasst (*vanB* gesamt: n=398; 2008/2009 resistent: n=198 [116] ; 2010 resistent: n=140 [7]), so wurde eine mittlere Vancomycinresistenzrate innerhalb der *vanB*-positiven Stämme in den Jahren 2008 bis 2010 von etwa 85 % ermittelt. Dieser Wert ist jedoch nur bedingt vergleichbar mit dem für diese Studie erhobenen, da er die Jahre 2008 bis 2010 umfasst, während diese Studie nur 2009 und 2010 darstellen soll.

Im Großraum Regensburg waren 94 % phänotypisch Vancomycin-resistent, obwohl ein höherer Vancomycin-Grenzwert zur Resistenzbewertung verwendet wurde (Vancomycin-resistent bei MHK ≥ 8 µg/ml).

Als mögliche Erklärung für die höhere Vancomycinresistenzrate innerhalb *vanB*-positiver Stämme im Großraum Regensburg kann die Verwendung unterschiedlicher MHK-Grenzwerte ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung eines niedrigeren Grenzwerts am NRZ darf von einer besseren Erkennung Vancomycin-resistenter Stämme am NRZ ausgegangen werden. Demnach hätte der Anteil der *vanB*-positiven und phänotypisch Vancomycin-resistenten Stämme im Großraum Regensburg deutlich geringer sein müssen als am NRZ. Da das *vanB*-Cluster grundsätzlich eine Vancomycinresistenz vermittelt und da am NRZ mit so niedrigen MHK-Grenzwerten für Vancomycin gearbeitet worden war, um selbst gering exprimierte Resistenzen zu detektieren, erscheint der Anteil der *vanB*-positiven, aber dennoch phänotypisch Vancomycin-sensiblen Stämme mit 21 % im Gegensatz zu 8 % im Großraum Regensburg etwas überhöht. Die Ursache dieses Sachverhalts ist derzeit nicht bekannt. Eventuell könnte dabei der bereits erwähnte horizontale Gentransfer des *vanB*-Operons (durch CC17 oder im Darm von Anaerobiern) auf bis dato Vancomycin-sensible *E. faecium* eine Rolle spielen. Wahrscheinlich ist jedoch ein multifaktorielles Geschehen.

Insgesamt kann bezüglich der Glykopeptidresistenz festgehalten werden, dass zum einen die VRE-Fallzahlen deutschlandweit trotz durchgeführter Screenings, Hygiene- und Präventionsmaßnahmen stetig ansteigen und dass zum anderen seit mehreren Jahren vermehrt *vanB*-positive VREfm auftreten. Der allgemeine VRE-Anstieg kann also mit einem erhöhten Vorkommen des *vanB*-Genotyps begründet werden. [112] So wie die Ursache dieses erhöhten Vorkommens wahrscheinlich multifaktoriell bedingt ist, ist auch die Verlangsamung bzw. die Verringerung des VRE-Anstiegs nur mit mehreren verschiedenen Maßnahmen zu bewältigen. So sollte eine Therapie mit antimikrobiellen Substanzen nur nach rechtfertigender Indikation und Keimbestimmung erfolgen. Reserveantibiotika, wie auch Vancomycin einst eines war, sollten nur bei nachgewiesener Vancomycinresistenz oder Vancomycin-Teicoplanin-Kreuzresistenz verabreicht werden. Doch nicht nur im Krankenhaus, sondern auch in der Landwirtschaft und in der Tiermedizin sollte bedächtig mit antimikrobiellen Substanzen gearbeitet werden. Auch entsprechende Hygiene- und Präventionsmaßnahmen sind nach wie vor korrekt umzusetzen.

4.6 Virulenzfaktoren: *enterococcal surface protein*, Hyaluronidase und Kollagenbindendes Adhäsin

Doch nicht nur die Vancomycinresistenz, sondern auch andere Faktoren bewirken die zunehmende Verbreitung der *E. faecium*. Da sich auch Vancomycin-sensible Stämme (vor allem im hospitalen Umfeld) immer mehr verbreiten, wird die Rolle der Virulenzfaktoren dabei stets diskutiert. Für die Enterokokkenspezies *E. faecium* wurden in der Literatur mehrere Virulenzfaktoren beschrieben, wie das Kollagenbindende Adhäsin (Acm), die Hyaluronidase (Hyl) und das *enterococcal surface protein* (Esp). [26]

Willems *et al.* untersuchten das *esp*-Gen und stellten dabei eine starke Assoziation des *esp*-Gens zu Stämmen, die im Rahmen einer VREfm-Ausbruchssituation an Krankenhäusern gewonnen worden waren, fest. Es wurden Stämme von verschiedenen Teilen der Welt (USA, Europa sowie Australien) sowie verschiedenen

Wirten (Mensch und Tier) und aus unterschiedlichen Situationen (epidemisch und nicht-epidemisch) untersucht, wobei *esp* nur in epidemischen *E. faecium*-Stämmen detektiert werden konnte. [21]

Dies wird durch die Ergebnisse von Mannu *et al.* unterstützt, welche in nicht-epidemischen, aus Milchprodukten stammenden Proben kein *esp*-Gen feststellen konnten. [118] Borgmann *et al.* hingegen konnten bei etwa zwei Drittel aller Stämme aus nicht-epidemischen Proben das *esp*-Gen nachweisen. [119]

Obwohl es bisher nicht genug experimentelle Beweise gibt, spricht die hohe Prävalenz des *esp*-Gens in *E. faecium*-Isolaten aus Kliniken [30, 31] für einen Zusammenhang des Proteins mit einer erhöhten Pathogenität der VREfm. Die Annahme, dass nur Vancomycin-resistente *E. faecium esp* enthalten, darf jedoch nicht getroffen werden. Auch in Vancomycin-sensiblen *E. faecium*-Proben wurde das Gen nachgewiesen, wenn auch in geringerem Umfang. [30, 31, 120] Baldassarri *et al.* halten es sogar für möglich, dass *esp*-positive *E. faecium* schon lange vor dem Ampicillinresistenzwerb durch die Spezies existierten. [120] Billström *et al.* zeigten mit ihren Untersuchungen jedoch, dass *esp*-positive *E. faecium*-Stämme eine stärker ausgeprägte Resistenz gegen manche Antibiotika, wie beispielsweise Ampicillin, aufweisen als *esp*-negative. [121]

Von Vankerckhoven *et al.* [30] und Rice *et al.* [32] wurde festgestellt, dass *esp* meist jedoch nicht als alleiniges Virulenzgen bei VREfm-Stämmen vorliegt, sondern dass *esp* oft in Kombination mit dem *hyl*-Gen auftritt (zu 76 % bzw. > 90 %). Coque *et al.* [122] hingegen konnten diese Kombination bei lediglich 4 % ermitteln.

Anfangs wurde *hyl* die Kodierung einer Hyaluronidase und damit eine virulenzsteigernde Eigenschaft zugeschrieben. Da jedoch weder der Einfluss des *hyl*-Gens auf Virulenz [25] noch eine Hyaluronidase-Aktivität [35] nachgewiesen werden konnten, ist der Anteil des *hyl*-Gens an bakterieller Virulenz noch nicht abschließend geklärt.

In der Literatur werden bzgl. der Virulenzfaktoren *esp* und *hyl* keine vergleichbaren Daten für das Jahr 2010 beschrieben, sondern nur für 2009. Diese Daten liefert das NRZ [116], wobei dort die Verteilung der Virulenzfaktoren auf *vanA*- und *vanB*-positive VREfm dargestellt wurde. Diese Unterteilung in *vanA*- und *vanB*-VREfm ist im Rahmen dieser Dissertation von untergeordneter Relevanz, sodass zur besseren

Vergleichbarkeit die vom NRZ beschriebenen VREfm mit *vanA*- oder *vanB*-Gen zu einer Gesamtheit zusammengefasst wurden (2009: *vanA*-VREfm: n=142; *vanB*-VREfm: n=157; VREfm gesamt: n=299; *vanA-esp*: n=72; *vanB-esp*: n=142; *esp* gesamt: n=214; *vanA-hyl*: n=47; *vanB-hyl*: n=96; *hyl* gesamt: n=143; *vanA-esp/hyl*: n=23; *vanB-esp/hyl*: n=96; *esp/hyl* gesamt: n=119).

Von den 2009 und 2010 nachgewiesenen VREfm-Stämmen (n=62) wiesen 97 % das *esp*-Gen auf, bei den Stämmen aus dem Jahr 2009 (n=35) wurde das *esp*-Gen bei 91 % nachgewiesen. Die Vergleichsdaten des NRZ beschreiben hingegen nur bei 72 % der VREfm in diesem Jahr das *esp*-Gen [116].

Da speziell die A-Region des *esp*-Gens bzw. deren innergenischen Tandemwiederholungen zur (weiteren) Differenzierung bzw. zur Feststellung von Verwandtschaftsgraden bei *E. faecium* herangezogen werden kann, wurden jene Wiederholungen auch im Rahmen dieser Dissertation bestimmt. 71 % der 2009 und 2010 registrierten Stämme (n=62) wiesen 4 Tandemwiederholungen auf, 22 % 5 Wiederholungen und 2 % 1 Wiederholung. 3 % waren *esp*-negativ.

Unveröffentlichten Daten der AG Prof. Dr. Schneider zufolge wurden auch in den Jahren vor bzw. nach dem hier analysierten Zeitraum überwiegend 4 *espA*-Wiederholungen registriert. Dies kann auf einen molekularen Abstammungszusammenhang der einzelnen Stämme im Großraum Regensburg hinweisen. Denkbar wäre neben der (poly)klonalen Vermehrung *esp*-positiver Stämme jedoch auch ein bereits 2004 beschriebener horizontaler Gentransfer des Gens [123]. Auch Leavis *et al.* stellten 2004 beim Großteil der untersuchten Stämme 4 Wiederholungen fest (42 %) und 5 Wiederholungen bei 8 %. Zudem wurden bei 17 % 3 Wiederholungen und bei 23 % 6 Wiederholungen registriert. 11 % waren *esp*-negativ. [26] Für den in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum lagen leider keine direkten Referenzdaten bzgl. der innergenischen Tandemwiederholungen in der A-Region des *esp*-Gens vor.

Wurde dann analysiert wie viele Stämme aus den Jahren 2009 und 2010 (n=62) sowohl das *esp*- als auch das *hyl*-Gen aufwiesen, so wurde dies bei 82 % der Stämme festgestellt. Die Stämme nur aus dem Jahr 2009 (n=35) waren zu 74 % *esp*- und *hyl*-positiv. Die Referenzdaten für 2009 des NRZ [116] zeigen im Vergleich dazu lediglich bei 40 % das Vorliegen beider Virulenzfaktoren. Vergleichsdaten für 2010 lagen wie oben bereits erwähnt nicht vor.

Nallapareddy *et al.* [40] identifizierten einen weiteren potentiellen Virulenzfaktor der *E. faecium*, das Kollagenbindende Adhäsion. Von den im Rahmen dieser Dissertation analysierten VREfm-Stämmen (n=62) wiesen 97 % das *acm*-Gen auf. Diese starke Anhäufung des *acm* in den Proben könnte als Beweis, dass es sich hierbei um Hospital-assoziierte Stämme handelt, gesehen werden. Das Gen sollte jedoch im Moment nicht als echte Virulenzdeterminante bezeichnet werden, weil es nicht nur in Proben, die im Rahmen einer Infektion mit Antibiotika-resistenten *E. faecium* gewonnen worden waren, festgestellt, sondern in diversen *E. faecium*-Proben nachgewiesen werden kann [124]. Vergleichsdaten zu *acm*-positiven VRE-Stämmen beim Menschen lagen in der Literatur leider nicht vor.

Da die Gene *esp* und *hyl* jedoch, sowohl in dieser Studie als auch in weiteren, gehäuft in VREfm-Stämmen aus Kliniken nachgewiesen wurden, scheint eine Begünstigung der Ausbreitung der Enterokokken im hospitalen Umfeld durch *esp* und *hyl* wahrscheinlich. Als alleinige Marker zur Beurteilung der bakteriellen Virulenz eines Stammes sollten die Gene jedoch nicht herangezogen werden, da ihre Rolle im Rahmen der Pathogenität der VREfm bisher nicht abschließend geklärt ist. Dazu bedarf es weiterer genetisch-epidemiologischer Untersuchungen.

4.7 Molekularepidemiologische Typisierung

4.7.1 Methodik: MLST

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte die molekular-epidemiologische Analyse der VREfm-Stämme mithilfe der Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (für verschiedene Typisierungsverfahren siehe 1.6). Die MLST stellt derzeit den Goldstandard zur epidemiologischen Typisierung vieler bakterieller Pathogene dar. Dazu werden im Falle einer *E. faecium*-Typisierung die Allelvarianten von 7 Haushaltsgenen untersucht, welche dann über eine im Internet öffentlich zugängliche kuratierte Datenbank einem MLSTyp zugeordnet werden. So wird eine globale Anwendung, Datenaustausch sowie Datenvergleich ermöglicht. Außerdem ist jenes Verfahren, im Vergleich zu den Typisierungsverfahren *AFLP* und *PFGE*, hoch reproduzierbar.

Zudem liefert es (anders als *MLVA*) eine ausreichende Diskrimination, sodass es der Problematik in Krankenhäusern sowie den Anforderungen dieser Dissertation gerecht wird. Mit der MLST lässt sich nicht nur die Verteilung bestimmter ST innerhalb eines Krankenhauses auf Abteilungen, Stationen und Stationsarten gut abbilden, sondern es können auch Schlussfolgerungen auf VREfm-Übertragungsmuster innerhalb eines Krankenhauses gezogen werden: Werden bei zwei VREfm-infizierten Patienten zwei VREfm unterschiedlicher ST identifiziert, ist es unwahrscheinlich, dass eine direkte VREfm-Übertragung zwischen den beiden Patienten stattgefunden hat. Als Umkehrschluss darf jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass eine direkte VREfm-Übertragung zwischen zwei Patienten stattgefunden hat, wenn bei beiden Infizierten VREfm des selben ST nachgewiesen worden waren, da Vancomycin-sensible *E. faecium* wie bereits erwähnt Resistenzen erwerben können [115, 125]. Jedoch sind solche Resistenzübertragungen eher seltener Natur. Es ist also nicht wahrscheinlich, dass in einem Krankenhaus mehrere Vancomycin-sensible *E. faecium* zeitgleich eine Vancomycinresistenz erwerben. Auch dass mehrere resistente Stämme zeitgleich zum selben MLSTyp mutieren, erscheint durch die unzähligen Allelkombinationen unwahrscheinlich. Deshalb kann bei gehäuftem Auftreten eines bestimmten MLSTyps in einem kurzem Zeitraum von einer klonalen Ausbreitung dieses ST ausgegangen werden.

Langfristig wird sich jedoch wahrscheinlich das WSG als Goldstandard der molekular-epidemiologischen Analyse vieler Bakterienarten durchsetzen. Bei diesem Typisierungsverfahren ist die diskriminative Leistung am höchsten, da das gesamte bakterielle Genom sequenziert wird.

Howden *et al.* [114] führten bei 61 *E. faecium*, darunter 36 VREfm, WGS durch, um die Populationsstruktur von *E. faecium* besser zu verstehen. Dabei wurde festgestellt, dass 44 % des bakteriellen Chromosoms von Rekombination, also von Allel-Austausch, betroffen sind. Bereits vor diesem Ergebnis war das Genom der *E. faecium* für eine vergleichsweise hohe Rekombinationsrate bekannt. Howden *et al.* stellten bei ihren Analysen des Weiteren fest, dass 5 der 7 MLST-Genloki von Rekombination betroffen sind. Wird durch Rekombination das Allel eines der 7 Haushaltsgene ausgetauscht, so kann es sein, dass dieser *E. faecium* dann einem anderen, neuen MLSTypen zugeordnet wird. Da die Haushaltsgene im Vergleich zum gesamten Genom nur einen sehr kleinen DNA-Abschnitt darstellen und der

Großteil des Genoms eher dem MLSTyp vor der Rekombination entspricht, kann es sein, dass MLST irreführende Resultate bzgl. der Populationsstruktur liefert. Howden *et al.* [114] führten dazu als Beispiel zwei Isolate an, welche im Rahmen der MLST (also bei der Analyse der 7 kurzen Haushaltsgene) dem ST252, im Rahmen des WGS (also das gesamte Genom betrachtend) jedoch dem Cluster des ST203 zugeordnet wurden.

Diese Tatsache beweist, dass WGS im Vergleich zu MLST eine bessere Diskriminierung leisten kann. Jedoch ist WGS hinsichtlich der Kosten und des Arbeitsaufwands bedeutend intensiver. Da die diskriminative Fähigkeit der MLST für eine erste Typisierung der VREfm-Stämme im Großraum Regensburg wie bereits erwähnt ausreichend ist, entschied man sich für die MLST. *E. faecium*-Analysen mittels WGS sind mittlerweile jedoch Bestandteil aktueller Untersuchungen der AG Prof. Dr. Schneider.

4.7.2 Epidemiologie der MLSTypen und deren Verteilung am UKR

Um der Verbreitung der VRE Einhalt gebieten zu können, bedarf es genauer Kenntnisse über deren Resistenzausbreitungsmechanismen. Daher ist es entscheidend, ob 1) ein häufiger epidemiologischer Wandel resistenter Stämme stattfand, 2) vermehrt Resistenzgene auf bis dato sensible Enterokokken übertragen wurden (horizontaler Gentransfer) oder 3) ob der Anstieg der VRE-Infektionen eher aus einer klonalen bzw. polyklonalen Ausbreitung einzelner Stämme resultiert (vertikaler Gentransfer).

Insgesamt deuten die Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten MLST-Analysen auf eine polyklonale Ausbreitung der VREfm im Großraum Regensburg in den Jahren 2009 und 2010 hin. Es wurden zehn verschiedene bekannte ST identifiziert und zudem ein bisher unbekannter ST, der zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Datenbank pubmlst.org verzeichnet war. Jedoch dominierten im untersuchten Zeitraum ganz klar ST17, ST117 und ST192 (zusammen bildeten sie 69 % aller MLSTypen). Wurden nur die ST von VREfm-Stämmen aus externen Krankenhäusern betrachtet, so gehörte auch ST203 zu den

dominierenden. Am UKR hingegen bildeten ST17, ST117 und ST192 die Mehrheit. Dabei ist auffällig, dass unter diesen häufigsten ST in den Jahren 2009 und 2010 ST117 ein dominantes Ausbreitungsprofil aufwies: in der zweiten Hälfte des Jahres 2009 und in der ersten Hälfte 2010 breitete sich ST117 zuungunsten der bisher dominanten ST17 und ST192 stark aus (siehe Abbildung 31).

Aus unpublizierten Daten der AG Prof. Dr. Schneider (siehe Abbildung 63) geht hervor, dass ST117 am UKR seit Beginn der Studie 2004 erstmalig im Jahr 2008 auftrat und zwar nur einmal. 2004 bis 2006 dominierte am UKR ST208, 2007 und 2008 bildeten ST17 und ST192 die Mehrheit. Diese beiden ST dominierten auch 2009 und 2010 bis die Ausbreitung des ST117 wie erwähnt überwog. Im Jahr 2011 stellte ST117 dann zusammen mit ST203 und ST737 die Mehrheit dar.

Interessanterweise wurde ST737 in diesem Jahr zum ersten Mal am UKR nachgewiesen, im September 2010 wurde er jedoch bereits in einem externen Krankenhaus registriert. Insgesamt erkennt man zwischen 2004 und 2011 am UKR eine starke Dynamik hinsichtlich der vorherrschenden MLSTypen. Doch auch im in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum (2009/2010) ist eine Dynamik sichtbar und es stellt sich die Frage, was zu dieser Verschiebung der dominanten ST in den Jahren 2009/2010 führte.

Denkbar sind zwei Ursachen: entweder fand im untersuchten Zeitraum eine vermehrte Einschleppung des ST durch extern infizierte Patienten statt oder ein ST117-Stamm mit überdurchschnittlich hoher Pathogenität verbreitete sich. Wurden alle VREfm-Stämme, die dem ST117 zugeordnet werden konnten, hinsichtlich ihrer Kombinationen aus Resistenzgen *vanA/vanB* und Virulenzmarker *esp*, *hyl*, *acm* sowie *espA*-Tandemrepeatanzahl verglichen, so wurden sechs verschiedene Kombinationen ermittelt. Eine Kombination wurde nur in einem externen Stamm festgestellt, vier Kombinationen nur am UKR und eine Kombination sowohl am UKR als auch in einem externen Krankenhaus (siehe Abbildung 41). Insgesamt gilt, je weniger Kombinationen es gibt, desto wahrscheinlicher ist die klonale Ausbreitung eines VREfm-Stammes. ST17 und ST192 lagen in zwei bzw. einer Kombination vor, ST117 ist mit sechs verschiedenen Kombinationen in überdurchschnittlicher Diversität vertreten. Eine rein klonale Verbreitung scheint also für ST117 unwahrscheinlich, für ST17 und ST192 jedoch wahrscheinlich.

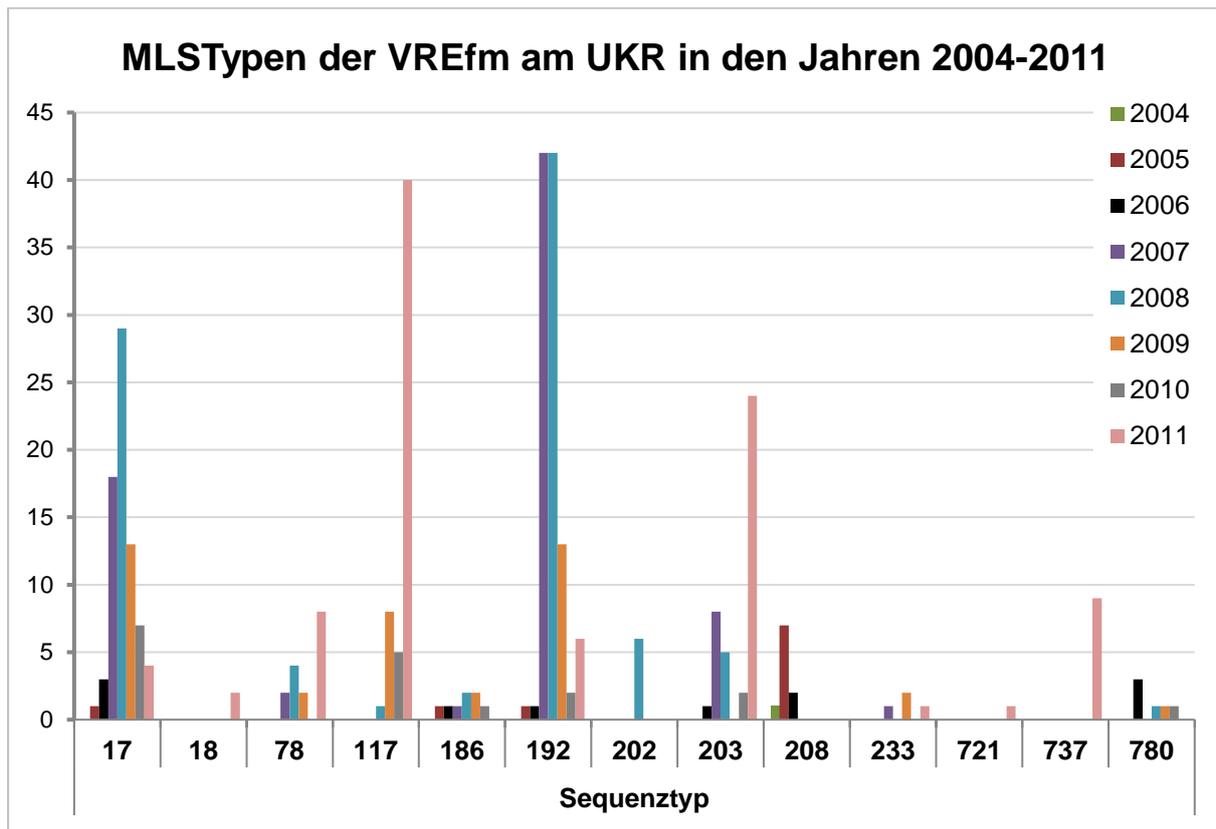


Abbildung 63: Verteilung der MLSTypen der VREfm am UKR in den Jahren 2004 bis 2011. Unveröffentlichte Daten der AG Prof. Dr. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am UKR.

Doch nicht nur innerhalb des in dieser Arbeit untersuchten Zeitraums ist eine Dynamik erkennbar, auch regionale Unterschiede bestehen bzgl. der MLSTypen. Einige ST konnten nur am UKR nachgewiesen werden (ST78, ST186 und ST233), andere nur in externen Krankenhäusern (ST64, ST737 sowie der unbekannte ST). Der bisher unbekannte ST glich hinsichtlich der Allelvarianten seiner Haushaltsgene am ehesten dem in externen Krankenhäusern häufig vorkommenden ST203. Lediglich im Allel des Gens *purK* unterschieden sich die beiden ST. Ob der neue, unbekannte ST das Ergebnis einer Rekombination, wie von Howden *et al.* [114] beschrieben, ist, könnte möglicherweise durch WSG ermittelt werden.

Um eine Einordnung der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse treffen zu können, ist neben der Verteilung der MLSTypen am UKR und im Großraum Regensburg auch die Verteilung der MLSTypen in anderen Teilen Deutschlands von Interesse. Die Jahre 2009 und 2010 stellen allgemein einen Transit-Zeitraum dar,

in dem scheinbar wenig VRE-Ausbrüche statt und somit wenig bis kaum (MLS)Typisierungen Anwendung fanden. Aus diesem Grund liegen in der Literatur wenig Daten zum deutschlandweiten Vergleich der Jahre 2009/2010 vor. An dieser Stelle muss zudem angemerkt werden, dass bis zum Jahr 2008 überwiegend *vanA*-positive VREfm in Deutschland nachgewiesen wurden [7]. Da der MHK-Grenzwert für eine Vancomycinresistenz bei *vanA*-Stämmen etwas höher als bei *vanB*-Stämmen angesetzt wurde, ist es möglich, dass manche *vanB*-Stämme mit niedrigerer MHK in den früheren Studien nicht registriert worden sind. Dies könnte aufgrund der unterschiedlichen Einschlusskriterien eine abgewandelte Verteilung der MLSTypen nach sich gezogen haben, sodass ein Vergleich der in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse mit früheren Studien nur bedingt möglich ist.

In den Jahren 2003 und 2004 waren 39 % der MLS-typisierten VREfm-Isolate aus süd- bzw. südwestdeutschen Krankenhäusern ST203 zuzuordnen. Die zweit- bzw. dritthäufigsten ST waren ST192 (17 %) und ST279 (13 %). ST117 wurde nicht registriert. [24]

In einem baden-württembergischen Krankenhaus dominierte 2004 und 2005 weiterhin ST203 neben ST208 [119]. Die deutschlandweiten Unterschiede in den Jahren 2006 und 2007 [117] werden vor allem in Abbildung 64 deutlich: insgesamt gab es in Deutschland zwei Regionen, aus denen vermehrt VRE stammten. Eine davon war Baden-Württemberg und eine Berlin. Dort wurden verschiedene MLSTypen mit unterschiedlichen Resistenzgenen und Virulenzfaktoren nachgewiesen. Es scheint, als hätte in diesen beiden Bundesländern im Vergleich zu anderen Bundesländern in den Jahren 2006/2007 bereits eine verstärkte VRE-Problemik vorgelegen. Aus Bayern sowie nördlichen bzw. nordwestlichen Ländern wurden nur vereinzelt Proben zur MLSTypisierung an das NRZ gesendet. Aus dem Saarland, Thüringen und Sachsen-Anhalt wurden gar keine Proben eingesandt. Auffällig ist hierbei zudem, dass die aus Bayern eingesandten VREfm-Stämme alle *vanA*-positiv waren. Da in Regensburg seit Beginn der systematischen Asservierung aller VRE im Jahr 2004 überwiegend *vanB*-positive Stämme nachgewiesen wurden, sind also neben deutschlandweiten auch regionale Unterschiede bzgl. der Ausbreitung der VRE-Klone festzustellen. Auffallend ist des Weiteren, dass im süd- bzw. südwestdeutschen Raum 2006/2007 kein ST117-Stamm registriert wurde und in anderen Teilen Deutschlands auch nur in geringem Maße, wohingegen ST117

mit 26 % in den Jahren 2011 und 2012 der am häufigsten nachgewiesene ST in ganz Deutschland war. Ebenso wie die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ST117-Stämme waren auch die 2011/2012 nachgewiesenen ST117-VREfm hinsichtlich ihrer Kombinationen aus Resistenzgenen und Virulenzfaktoren sehr divers. Die zweit- bzw. dritthäufigsten ST waren 2011/2012 ST192 (17 %) und ST203 (9 %). [111]

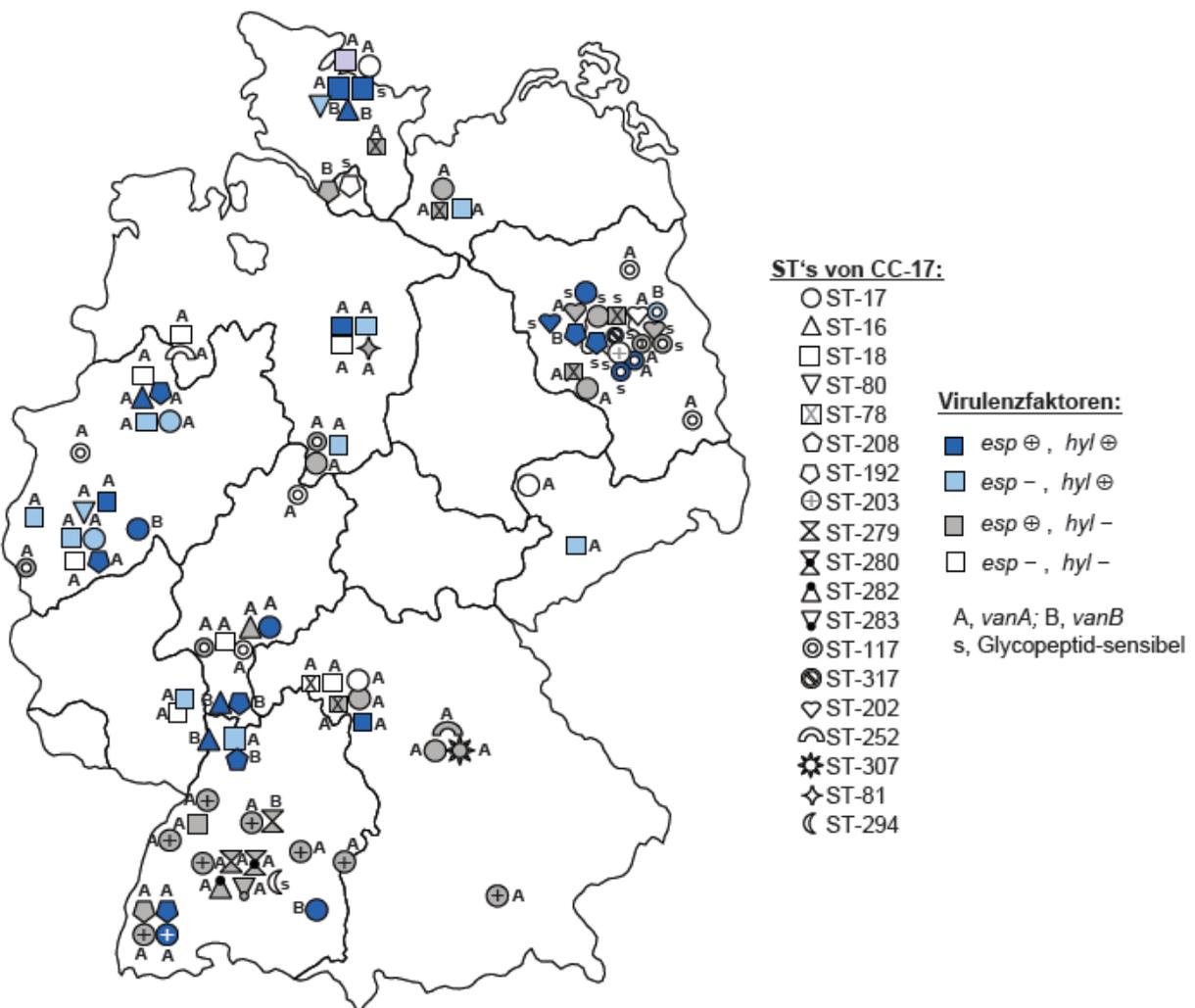


Abbildung 64: Auftreten Glykopeptid-resistenter (*vanA/vanB*) und -sensibler CC17 *E. faecium*-Isolate verschiedener ST und Virulenzmarker. Daten aus Einsendungen an das NRZ/RKI, Bereich Wernigerode.

Im Zuge dieser Dissertation wurden von mehreren Patienten Doppel- bzw. Mehrfachisolate untersucht (siehe 3.10). Alle Mehrfachisolate eines Patienten zeichneten sich durch eine bei allen VRE-Nachweisen identische Kombination aus MLSTyp, Resistenzgenen und Virulenzmarker aus und wurden so als doppelte bzw. mehrfache Nachweise desselben *E. faecium*-Stammes gehandhabt. Insgesamt wurden von 15 Patienten 23 Proben gezählt, die mit dem jeweiligen Erstisolat identisch waren. Die Mehrfachisolate waren dabei verschiedenen ST zuzuordnen und sie wiesen verschiedene Resistenzgene und *espA*-Tandemrepeatanzahlen auf. Jedoch waren alle Mehrfachisolate *hyl*- und *acm*-positiv. Zwischen den einzelnen Proben lagen wenige Stunden bis hin zu 9 Monaten. Einige Patienten befanden sich während ihres stationären Aufenthalts stets in einer Abteilung und andere Patienten wurden während ihres stationären Aufenthalts in verschiedene Abteilungen verlegt.

Neben Mehrfachisolaten wurden jedoch auch verschiedene Stämme in mehreren unterschiedlichen Proben eines Patienten nachgewiesen. Insgesamt wurden bei drei Patienten jeweils verschiedene VREfm festgestellt.

3 verschiedene ST innerhalb eines knappen Monats wurden bei einer UKR-Patientin in 4 Nachweisen registriert: aus der ersten Probe, einer Urinprobe, wurde ein VREfm der Kombination ST192/*vanB/espA4/hyl+/acm+* angezüchtet. In der Probe (Analabstrich) des nächsten Nachweises wurde ein anderer ST festgestellt (ST780), während das Glykopeptidresistenzgen, *espA*-Wiederholungsanzahl, *hyl* und *acm* jedoch bestehen blieben. Nur eine Woche später wurde bei einem erneuten Analabstrich ST117/*vanB/esp-/hyl-/acm+* nachgewiesen, wobei beim vierten Nachweis erneut jene Kombination festgestellt worden war. Interessanterweise befand sich die Patientin während ihres gesamten stationären Aufenthalts auf Station 21 KMT (Knochenmarktransplantation). Zwischen den ersten beiden Nachweisen fand möglicherweise eine Rekombination von ST192 auf ST780 statt, da zum einen alle anderen Marker unverändert blieben und zum anderen beide MLSTypen nur im *atpA*-Genlocus (ST192: Allel 15; ST780: Allel 9) variieren.

Auch beim zweiten Patienten, bei dem verschiedene VREfm-Stämme nachgewiesen worden waren, änderte sich der ST (von ST17 zu ST192), während alle anderen Marker identisch blieben. Zwischen beiden Nachweisen wurde der Patient vom UKR

in das Bezirkskrankenhaus Regensburg verlegt. Zwar könnte auch hier eine Rekombination von ST17 auf ST192 stattgefunden haben, jedoch erscheint dies unwahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass sich jene beiden ST an zwei Genloki unterscheiden (*atpA* und *pstS*). Zudem wurden die beiden Proben von unterschiedlichen Körperregionen entnommen (Aszites-Punktat und Hautabstrich). Deshalb kann bei diesem Patienten entweder von einer simultanen Infektion mit zwei verschiedenen VREfm-Stämmen oder von zwei kurz aufeinanderfolgenden VRE-Infektionen mit verschiedenen Stämmen ausgegangen werden.

Beim dritten Patienten ergab sich nur bzgl. des *hyl*-Gens eine Veränderung zwischen beiden VRE-Nachweisen. Beim ersten Nachweis war der Stamm *hyl*-negativ, beim zweiten Nachweis wurde ein *hyl*-positiver VREfm registriert. Möglicherweise handelt es sich bei beiden Nachweisen um den selben Stamm, der in der Zeit zwischen den Nachweisen das *hyl*-Gen erworben hat. Denn eine Assoziation zum *hyl*-Gen [25] ist typisch für Stämme des CC17, der vor allem mit Ausbrüchen in Krankenhäusern [22] in Zusammenhang gebracht wird. Zur endgültigen Aufklärung wäre eine Typisierung mittels WGS hilfreich.

Wurde die Verteilung der VREfm auf die Abteilungen des UKR betrachtet, so wurde ein Stamm (2 %) in der Notaufnahme erfasst. Alle anderen Stämme wurden wie erwartet in den Abteilungen Hämato-Onkologie (ca. 38 %), Innere Medizin sowie Chirurgie (jeweils ca. 30 %) nachgewiesen. Da Enterokokken vor allem bei sehr jungen oder alten Patienten, bei immunsupprimierten Personen oder bei Menschen mit schweren Grunderkrankungen schwere Infektionen verursachen können und diese Risikopatienten überwiegend in der Hämato-Onkologie bzw. Inneren Medizin oder Chirurgie behandelt werden, ist eine solche VREfm-Verteilung naheliegend. In jeder dieser drei Abteilungen wurden ST17, ST117, ST192 und ST78 nachgewiesen. In der Inneren Medizin und der Chirurgie wurden zudem noch ST203 und ST233 registriert und in der Hämato-Onkologie ST186 und ST780. Jene beiden ST kamen somit ausschließlich in Stämmen aus der Hämato-Onkologie vor, ST203 und ST233 nur in Stämmen aus der Inneren Medizin und der Chirurgie. Hinsichtlich der Stationsart verteilten sich die VREfm etwas zugunsten der Normalstationen (65 %), 35 % der Stämme stammten aus Intensivstationen. Interessanterweise wurde ST203 nur auf

Intensivstationen und ST78, ST186, ST233 sowie ST780 nur auf Normalstationen nachgewiesen.

Vergleichsdaten des NRZ zeigen für die Jahre 2011 und 2012 [105] jedoch eine andere Verteilung der VREfm-Stämme auf die klinischen Disziplinen bzw.

Abteilungen: nur knapp 6 % der Stämme stammten aus der Hämato-Onkologie, 21 % aus der Inneren Medizin bzw. der internistischen ITS und 26 % aus der Chirurgie.

25 % der Stämme wurden einer unbekanntem Abteilung zugeordnet, 7 % der Intensivtherapie sowie alle weiteren Isolate mit je unter 5 % verschiedenen Abteilungen.

Die Verteilung der VREfm-Stämme auf klinisches Material erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit analog zur Materialgruppen-Einteilung des Epidemiologischen Bulletins Nr.33 aus dem Jahr 2013 (siehe 3.12.3). Das NRZ ermittelte, dass in den Jahren 2011 und 2012 die nachgewiesenen Enterokokken-Stämme größtenteils Rektalabstrichen/Stuhlproben (27 %), Urinproben (25 %), unbekanntem klinischen Material (15 %) und Wundabstrichen sowie anderen Abstrichen (jeweils 9 %) entstammten. Weitere Materialgruppen waren mit maximal 5 % vertreten, darunter auch Punktate mit 3 %. [105] Am UKR wurde der Großteil der VREfm-Stämme in Anal-/Perianalabstrichen (48 %) nachgewiesen, gefolgt von Punktaten (14 %) und Wundabstrichen (11 %). Die Materialgruppe „Urin“ stellte am UKR nur einen Anteil von 2 % dar. Wurden nur die externen Stämme betrachtet, stellte man auch hier eine abweichende Verteilung in Bezug auf die Materialgruppen fest: die externen Stämme entstammten zumeist Sputum/Trachealsekret (22 %), Punktaten oder Wundabstrichen (je 17 %). Anal-/Perianalabstriche nahmen nur etwa 6 % des klinischen Materials ein. Der hohe Anteil der Anal-/Perianalabstriche am UKR (verglichen mit dem Anteil aus externen Krankenhäusern oder dem des vom NRZ ermittelten) lässt sich mit dem am UKR durchgeführten VRE-Screening erklären. Zur Durchführung des VRE-Screenings sind Anal-/Perianalabstriche das Mittel der Wahl, Genital-, Haut- oder Wundabstriche werden seltener genommen. Seit Beginn der systematischen Asservierung aller nachgewiesenen VRE am UKR im Jahr 2004 wurde das Screening kontinuierlich verstärkt, um der Ausbreitung der VRE im UKR durch entsprechende Maßnahmen entgegen zu wirken. Es ist daher nachvollziehbar, dass 57 % der am UKR nachgewiesenen VREfm durch Screening identifiziert

wurden. Vor allem in der Hämato-Onkologie konnten so viele VREfm-Stämme (im Rahmen des Multiresistente-Erreger-Screenings vor einer Knochenmarktransplantation) nachgewiesen werden. Drei MLSTypen wurden sogar nur mittels Screening erfasst: ST186, ST203 und ST780. Die VREfm-positiven Patienten mit jenen ST - immerhin etwa 12 % - wären ohne das durchgeführte Screening nicht als solche erfasst worden. Dies verdeutlicht die Relevanz geeigneter Screeningmaßnahmen.

Die Frage, ob die am UKR allgemein nachgewiesenen VREfm nun vermehrt von extern eingeschleppt wurden oder ob VREfm-Übertragungen innerhalb des UKR stattfanden, lässt sich an dieser Stelle nicht endgültig beantworten. In der AG Prof. Dr. Schneider sind diesbezüglich bereits weitere Studien geplant, die neben dem Zeitpunkt des VRE-Nachweises während des Krankenhausaufenthalts auch die individuelle Aufenthaltsdauer sowie mögliche Stationswechsel währenddessen berücksichtigen sollen. Eventuelle VRE-Übertragungswege können so ermittelt und nachvollzogen werden, denn trotz hoher Hygienestandards am UKR und Unterbringung in Einzelzimmern unmittelbar nach VRE-Nachweis kann man nicht ausschließen, dass die zunehmende Verbreitung der VREfm aus einer Übertragung innerhalb der Klinik resultiert. Welche Präventionsmaßnahmen allgemein empfohlen werden, soll im folgenden Kapitel erläutert werden.

4.8 Präventionsmaßnahmen

Eine der wichtigsten Maßnahmen zur Prävention der Ausbreitung Antibiotikaresistenter Erreger ist der bedachte Umgang mit antimikrobiellen Substanzen. Insgesamt ist der Verbrauch verschiedener Antibiotika seit 2001 stark gestiegen, seit 2008 vor allem der von Vancomycin. Doch nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der Veterinärmedizin und der Landwirtschaft (Stichwort Avoparcin) sollten Antibiotika nur gezielt eingesetzt werden. Breiten sich (multi)resistente Erreger jedoch bereits in Krankenhäusern aus, sind spezielle Hygienemaßnahmen und Infektionspräventionsvorkehrungen korrekt durchzuführen.

Die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut veröffentlichte 2018 im Bundesgesundheitsblatt Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen [44]. Darin werden viele Maßnahmen und Empfehlungen aufgeführt. Da VRE überwiegend über direkten Kontakt durch die Hände oder über indirekten Kontakt über kontaminierte Gegenstände oder Flächen, auf denen die Erreger aufgrund ihrer hohen Tenazität lange überleben können, übertragen werden, ist „die Einhaltung der Basishygiene [ist] die wichtigste Präventionsmaßnahme“[44]. Insbesondere die Händehygiene sollte nicht nur vom Personal, sondern auch vom Patienten konsequent durchgeführt werden. So sollte der VRE-Patient darüber aufgeklärt werden, nach dem Toilettengang, vor der Nahrungsauf- oder Medikamenteneinnahme eine ausreichende Reinigung und Desinfektion der Hände anzuwenden. Zusätzlich zur Umsetzung der Basishygienemaßnahmen sollte das Personal bei jedem VRE-Patientenkontakt Einmalhandschuhe und Schutzkittel tragen. Auch antiseptische Waschungen der Patienten werden als Präventionsmaßnahme gegen VRE-Infektionen diskutiert. Derzeit sollten sie beschränkt auf Patientenkollektive mit erhöhter ZVK-Anwendungsrate durchgeführt werden. Chlorhexidindigluconat ($\geq 2\%$) sollte dabei unter Beachtung der Nebenwirkungen als Antiseptikum verwendet werden.

Um die Ausbreitung der VRE im Krankenhaus zu verhindern, sollten VRE-positive Patienten in einem Einzelzimmer mit eigenen Sanitäreinrichtungen untergebracht werden. Die Unterbringung in einer Kohorte kann auch in Erwägung gezogen werden, jedoch ist es bisher ungeklärt, ob *vanA*- und *vanB*-Träger in einer gemeinsamen Kohorte untergebracht werden können. Eine gemeinsame Unterbringung von VRE-Patienten und Patienten mit anderen (multi)resistenten Erregern sollte nicht erfolgen. Auch die Reinigung und Desinfektion der Umgebung von VRE-Patienten sollte intensiviert werden: mindestens täglich soll die Patientenumgebung mit Flächendesinfektionsmittel nachgewiesener Wirksamkeit desinfiziert werden. Und durch regelmäßige Schulungen sollte das Pflege-, aber auch das Reinigungspersonal, zur Einhaltung der Maßnahmen motiviert werden.

Doch nicht nur für die Zeit nach dem positiven VRE-Nachweis eines Patienten gab die KRINKO Empfehlungen heraus. Aktives VRE-Screening (Untersuchung von Proben, welche gezielt für eine VRE-Diagnostik entnommen wurden) sollte auf

Risikogruppen fokussiert werden, jedoch kann gegebenenfalls (ggf.) auf passives VRE-Screening (Untersuchung von Proben, die dem Patienten ohnehin aus klinischer Indikation entnommen wurden, z.B. zur *Clostridioides difficile*-Diagnostik) durchgeführt werden. Als Untersuchungsmaterial werden Rektalabstriche oder Stuhlproben empfohlen. Als Labornachweismethoden werden Kultur und Nukleinsäureamplifikationstechniken in gleichem Maße empfohlen. [44]

Bei VRE-Nachweisen wurden und werden auch am UKR entsprechende Hygienemaßnahmen und Konzepte durchgeführt. Viele Hygienevorschriften sollen einer Ausbreitung der VRE in der Klinik entgegenwirken. Doch auch die Sammlung und molekular-epidemiologische Typisierung der VRE-Stämme ist Teil des am UKR verfolgten Konzepts. Besonders virulente und sich schnell verbreitende MLSTypen, deren Isolation zwingend erforderlich ist, können so aufgrund genauer Kenntnisse über deren Ausbreitungswege möglicherweise schneller erkannt und therapiert werden. Bei weniger pathogenen MLSTypen könnte so zukünftig eventuell auf eine bisher zwingend notwendige Isolation des Patienten verzichtet werden. Langfristig könnten so die Kosten und der Arbeitsaufwand der Klinik verringert und letztendlich die Effizienz im Gesamten erhöht werden.

4.9 Ausblick

Nicht nur wegen steigender Resistenzraten und ihrer zunehmenden Ausbreitung werden Vancomycin-resistente Enterokokken auch in der Zukunft für die moderne Medizin von Relevanz sein. Es ist auch denkbar, dass Enterokokken zukünftig vermehrt Resistenzen gegen derzeit angewandte Reserveantibiotika wie Linezolid, Tigecyclin oder Daptomycin erwerben könnten, so wie sie bereits die Vancomycin-resistenz erworben haben. Flächendeckende, schwer therapierbare Infektionen mit multiresistenten Erregern wären das Resultat. Des Weiteren könnte die Übertragung der Glykopeptid- bzw. Vancomycinresistenzgene *vanA* und *vanB* auf andere Bakterienspezies die Medizin vor eine Herausforderung stellen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde der horizontale Gentransfer eines Resistenzgens auf Methicillin-

resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) bereits beobachtet [62, 126–130]. Zwar scheint dieser Gentransfer selten stattzufinden, doch da Vancomycin bei den meisten MRSA-Infektionen als das Therapeutikum der Wahl gilt, sind zukünftige Ausbrüche Vancomycin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme möglich. Anhand dieser zukünftig möglichen Ereignisse erkennt man, wie relevant die Einschränkung der VRE-Ausbreitung ist. Neben Basishygiene, erweiterten Hygiene- und Präventionsmaßnahmen sowie einer hohen Compliance ist dazu auch die frühe Erkennung und Typisierung Vancomycin-resistenter Enterokokken notwendig. Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, kann das Verständnis der Epidemiologie der VREfm die Schaffung und Durchführung erfolgreicher Präventionsmaßnahmen unterstützen. Bisher liefert die MLSTypisierung für einen ersten Überblick ausreichende Ergebnisse, doch das Feld der Typisierungsverfahren entwickelt sich kontinuierlich weiter. Das WSG ersetzt bereits sukzessive die MLSTypisierung und wird sich, sobald der bioinformatische Aufwand und die Kosten gesunken sind, wahrscheinlich zum Goldstandard der Typisierung etablieren. Eine solche molekular-genetisch hochauflösende Typisierung der VRE-Stämme und die Zusammenführung der Ergebnisse in überregionalen Datenbanken könnten eine genombasierte Erreger-Surveillance schaffen, durch die nicht nur Übertragungsketten aufgedeckt, sondern auch die komplexe Epidemiologie der VRE besser verstanden werden könnte [131]. Ziel dieser Arbeit war, historische VRE-Isolate aus den Jahren 2009 und 2010 mittels MLST zu analysieren und deren Verbreitung im Großraum Regensburg zu untersuchen. Damit trägt diese Arbeit zum Verständnis der Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken, genauer *E. faecium*, im Großraum Regensburg bei und unterstützt so die Prävention gegen diese Krankheitserreger und gegen deren Ausbreitung.

5 Zusammenfassung

Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) gehören mittlerweile weltweit sowie speziell auch in Deutschland zu den wichtigsten multiresistenten nosokomialen Pathogenen. Vor allem die Spezies *E. faecium* gewann seit den 2000er Jahren aufgrund zunehmender Resistenz gegen das Glykopeptidantibiotikum Vancomycin an Relevanz. Die Glykopeptidresistenz kann nicht nur über horizontalen Gentransfer auf bis dato Vancomycin-sensible *E. faecium*, sondern auch auf andere Bakterien-spezies wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, übertragen werden. Zudem könnten Enterokokken zukünftig weitere Resistenzen, beispielsweise gegen aktuell wirksame Reserveantibiotika, erwerben. In solchen Szenarien sind die Therapieoptionen stark eingeschränkt, sodass eine weitere Ausbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken unbedingt zu vermeiden ist. Neben Basishygiene sowie erweiterten Hygiene- und Präventionsmaßnahmen ist dazu auch die frühe Erkennung und Typisierung Vancomycin-resistenter Enterokokken notwendig.

Seit dem Auftreten der ersten VRE-Fälle am Universitätsklinikum Regensburg (UKR) im Jahr 2004 wurden alle VRE-Nachweise systematisch in einer Stammsammlung asserviert. Als Teil einer retrospektiven Studie befasste sich diese Dissertation mit den VRE-Nachweisen aus den Jahren 2009 und 2010. In diesen beiden Jahren wurden insgesamt 95 VRE-Nachweise von 63 verschiedenen Personen asserviert. 2017 konnten davon 85 Stämme als Vancomycin-resistente *E. faecium* (VREfm) identifiziert werden. Diese Stämme wurden daraufhin mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) hinsichtlich ihrer Glykopeptidresistenzgene (*vanA/vanB*) und dem Vorliegen der Virulenzfaktoren *esp*, *hyl* und *acm* untersucht. Zur weiteren Typisierung wurden zudem die Tandemrepeats in der A-Region des *esp*-Gens analysiert. Einen Hauptbestandteil dieser Dissertation stellte die Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) der Stämme dar. Durch die Analyse verschiedener Gene und Marker wurden letztendlich 62 distinkte VREfm-Stämme von 58 Patienten identifiziert. Davon waren 84 % *vanB*-positiv und 16 % *vanA*-positiv. Bei 71 % der Stämme wurden 4 *espA*-Tandemwiederholungen nachgewiesen und nur 3 % wiesen das *esp*-Gen nicht auf. *Hyl*-positiv waren 85 % und 82 % waren sowohl *esp*- als auch *hyl*-positiv. Das *acm*-Gen wiesen 97 % der Stämme auf.

Insgesamt wurden im Großraum Regensburg zehn bekannte Sequenztypen (ST) sowie ein bisher nicht verzeichneter MLSTyp nachgewiesen. ST117 (24 %), ST17 und ST192 (je 23 %) bildeten dabei die Mehrheit. Die weiteren MLSTypen wurden deutlich seltener nachgewiesen: ST203 (10 %), ST78 (6 %), ST780 (5 %), ST233 (3 %) und ST64, ST186, ST737 sowie der nicht verzeichnete MLSTyp (je 1,5 %). Insgesamt scheint eine polyklonale Ausbreitung der MLSTypen am UKR und im Großraum Regensburg vorgelegen zu haben.

Der bisher unbekannte MLSTyp glich am ehesten ST203, lediglich im Allel des Gens *purK* unterschieden sich die beiden ST. Unter den UKR-Stämmen wies ST117 ein sehr dominantes Ausbreitungsprofil auf, zuungunsten von ST17 und ST192. ST117 dominierte daraufhin ab dem Jahr 2011 am UKR neben ST203 und ST737. Auffällig war des Weiteren, dass bei drei Patienten jeweils mehrere verschiedene VREfm-Stämme nachgewiesen wurden. Dabei unterschieden sich die Stämme jeweils im MLSTyp und/oder in einem der Virulenzmarker.

Darüber hinaus wurde auch die Herkunft der UKR-Stämme hinsichtlich der einsendenden Abteilungen untersucht. Etwa 38 % entstammten der Hämato-Onkologie und jeweils ca. 30 % der Inneren Medizin bzw. der Chirurgie. Das Verhältnis von Normal- zu Intensivstation fiel zugunsten der Normalstation aus (65 %). 48 % des klinischen Materials stellten Anal-/Perianalabstriche dar, gefolgt von Punktaten (14 %) und Wundabstrichen (11 %). Durch Screening wurden am UKR 57 % der nachgewiesenen VREfm identifiziert, wobei ohne Screening 12 % der VREfm-positiven Patienten nicht als solche erkannt worden wären.

Die retrospektive Studie, zu der diese Arbeit gehört, untersucht die ab dem Jahr 2004 asservierten VRE-Stämme des UKR und des Großraums Regensburg und bietet so einen wertvollen Einblick in die Epidemiologie der Enterokokken und deren Verbreitung bzw. der Verbreitung distinkter MLSTypen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse können stellvertretend für den süd- bzw. südwestdeutschen Raum betrachtet werden und können neben weiteren Studien der Schaffung effektiver Präventionsmaßnahmen und damit der Verhinderung einer weiteren VRE-Ausbreitung dienen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

<i>adK</i>	Adenylatkinase
<i>Acm / acm</i>	Kollagenbindendes Adhäsın
<i>AFLP</i>	<i>Amplified Fragment-Length Polymorphism</i>
AG	Arbeitsgruppe
<i>aqua bidest.</i>	<i>aqua bidestillata</i>
ARS	Antibiotika-Resistenz-Surveillance
<i>atpA</i>	ATP-Synthase (α -Untereinheit)
BA	Bad Abbach
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
BZK	Bezirkskrankenhaus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC17	Klonaler Komplex 17
<i>CLSI</i>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
<i>ddl</i>	D-Alanin-D-Alanin-Ligase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>ECDC</i>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<i>Esp / esp</i>	<i>enterococcal surface protein</i>
<i>espA</i>	A-Region des <i>esp</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
<i>gdh</i>	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
<i>gyd</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

HA	Hospital-assoziiert
HÄMA	Hämatologie
HÄMA/ONKO	Hämato-Onkologie
Hyl / <i>hyl</i>	Hyaluronidase
ITS	Intensivstation
kb	Kilobasen
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KH	Krankenhaus
KMT	Knochenmarktransplantation
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
<i>MALDI-TOF-MS</i>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight - Massenspektroskopie</i>
MDR	multiresistent
MgCl ₂	Natriumchlorid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung
MLSTyp	Multi-Lokus-Sequenz-Typ
MLSTypisierung	Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung
<i>MLVA</i>	<i>Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
Na ₂ EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat
neg.	negativ
nK	Negativkontrolle
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OP	Operationssaal
Pat.	Patient
PBP5	Penicillin-bindendes Protein 5
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Puls-Feld-Gelelektrophorese
pK	Positivkontrolle
pos.	positiv
<i>pstS</i>	<i>Phosphat ATP-binding cassette Transporter</i>

<i>purK</i>	ATPase-Untereinheit der Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase
Rgbg	Regensburg
RKI	Robert Koch-Institut
s.	siehe
S.	<i>Streptococcus</i>
sog.	sogenannt
St.	Sankt
ST	Sequenztyp
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Trihydroxyaminomethan
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
UV	ultraviolett
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VREfm	Vancomycin-resistente(r) <i>E. faecium</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
ya	years ago
z.B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Evolution der Enterokokken.	Seite 8
Abbildung 2:	Entstehung des CC17.	Seite 11
Abbildung 3:	Schematische Darstellung zweier verschiedener Varianten eines <i>esp</i> -Gens.	Seite 14
Abbildung 4:	Verteilung der VRE-Infektionen in deutschen Bundesländern.	Seite 19
Abbildung 5:	Abstammungslinien des multiresistenten <i>E. faecium</i> .	Seite 21
Abbildung 6:	Schematische Darstellung eines <i>vanA</i> -, <i>vanB</i> - und <i>vanC</i> -Operons, eingeteilt in drei funktionelle Gruppen.	Seite 26
Abbildung 7:	Prozesskette VRE-Screening 2009/2010.	Seite 44
Abbildung 8:	Für die Studie verfügbare Isolate.	Seite 59
Abbildung 9:	Monatsverlauf aller positiven VRE-Proben in den Jahren 2009 und 2010.	Seite 60
Abbildung 10:	Monatsverlauf der VRE-Proben am UKR.	Seite 60
Abbildung 11:	Geschlechtsverteilung aller VREfm-positiven Patienten.	Seite 61
Abbildung 12:	Geschlechtsverteilung der VREfm-positiven Patienten am UKR.	Seite 61

Abbildung 13:	Altersverteilung aller VREfm-positiven Patienten und der UKR-Patienten sowie durchschnittliches Patientenalter.	Seite 62
Abbildung 14:	Enterokokkenspezies, analysiert 2009/2010.	Seite 64
Abbildung 15:	Enterokokkenspezies, analysiert 2017.	Seite 64
Abbildung 16:	Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung der Glykopeptidresistenzgene <i>vanA</i> und <i>vanB</i> .	Seite 65
Abbildung 17:	Genotypische Glykopeptidresistenz: Anzahl der <i>vanA</i> - oder <i>vanB</i> -positiven Proben im Vergleich zwischen 2009/2010 und 2017.	Seite 66
Abbildung 18:	<i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -Genotypen: Übereinstimmung der 2017 reproduzierten Befunde mit den Ursprungsbefunden von 2009/2010.	Seite 67
Abbildung 19:	Phänotypische Resistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin.	Seite 69
Abbildung 20:	Verteilung der phänotypischen Resistenzen gegen Vancomycin und Teicoplanin auf <i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -Genotypen.	Seite 71
Abbildung 21:	Verteilung der MHK-Werte für Vancomycin in Zusammenhang mit den Glykopeptidresistenzgenen <i>vanA</i> und <i>vanB</i> .	Seite 72
Abbildung 22:	Mustergel mit MLST-PCR-Produkten.	Seite 74

Abbildung 23:	Anzahl der Allelvarianten des <i>atpA</i> -Gens.	Seite 75
Abbildung 24:	Anzahl der <i>ddl</i> -Allelvarianten.	Seite 75
Abbildung 25:	Anzahl der <i>gyd</i> -Allelvarianten.	Seite 76
Abbildung 26:	Anzahl der <i>purK</i> -Allelvarianten.	Seite 76
Abbildung 27:	Anzahl der Allelvarianten des <i>pstS</i> -Gens.	Seite 77
Abbildung 28:	Verteilung der unterschiedlichen MLSTypen innerhalb aller VRE-Eingänge.	Seite 79
Abbildung 29:	Verteilung der MLSTypen der <i>E. faecium</i> -Proben aus dem UKR.	Seite 81
Abbildung 30:	Verteilung der MLSTypen der <i>E. faecium</i> -Proben von externen Krankenhäusern.	Seite 81
Abbildung 31:	Die häufigsten MLSTypen der Erstisolate aller Krankenhäuser im Jahresverlauf 2009/2010.	Seite 82
Abbildung 32:	MLSTypen am UKR im Verlauf der Jahre 2009 und 2010.	Seite 83
Abbildung 33:	MLSTypen an externen Krankenhäusern im Verlauf der Jahre 2009 und 2010.	Seite 83
Abbildung 34:	Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung der A-Repeat-Anzahl innerhalb des <i>esp</i> -Gens.	Seite 84

Abbildung 35:	Anzahl der <i>espA</i> -Tandemrepeats.	Seite 85
Abbildung 36:	Verteilung der Ergebnisse des <i>hyl</i> -Nachweises.	Seite 85
Abbildung 37:	Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung des <i>hyl</i> -Gens.	Seite 86
Abbildung 38:	Beispiel eines verwendeten Elektrophoresegels zur Auswertung der Anwesenheit des <i>acm</i> -Gens.	Seite 86
Abbildung 39:	<i>acm</i> -Verteilung innerhalb aller VRE-Eingänge.	Seite 87
Abbildung 40:	<i>acm</i> -Verteilung innerhalb der UKR-Erstisolate.	Seite 87
Abbildung 41:	Vorkommende MLSTypen kombiniert mit Glykopeptid-resistenzgen (<i>vanA/B</i>), <i>espA</i> -Repeatanzahl, <i>hyl</i> -Gen und <i>acm</i> -Gen.	Seite 89
Abbildung 42:	VREfm-Proben einer UKR-Patientin unterschiedlicher ST und Virulenzmarker.	Seite 93
Abbildung 43:	VREfm-Proben eines externen Patienten unterschiedlicher ST.	Seite 93
Abbildung 44:	VREfm-Proben eines externen Patienten mit unterschiedlichem Vorkommen des <i>hyl</i> -Gens.	Seite 94
Abbildung 45:	Verteilung der ST aus allen Erstisolaten auf alle einsendenden Krankenhäuser.	Seite 95
Abbildung 46:	Abteilungen/Kliniken am UKR und ihre VREfm-Anzahl.	Seite 97

Abbildung 47:	Abteilungen/Kliniken des UKR und die dort vorherrschenden ST.	Seite 98
Abbildung 48:	Verteilung der VREfm-Proben auf Stationsart.	Seite 98
Abbildung 49:	Verteilung der ST auf die Stationen des UKR.	Seite 100
Abbildung 50:	Materialherkunft am UKR in den Jahren 2009/2010.	Seite 101
Abbildung 51:	Verteilung der Screeningfälle auf die Abteilungen des UKR.	Seite 101
Abbildung 52:	Materialherkunft in externen Krankenhäusern in den Jahren 2009/2010.	Seite 102
Abbildung 53:	ST verteilt auf die Nachweismethoden am UKR.	Seite 102
Abbildung 54:	Klinisches Material aller VREfm-Proben.	Seite 103
Abbildung 55:	Klinisches Material der VREfm-Erstisolate.	Seite 103
Abbildung 56:	Verteilung des Besiedlungsstatus (Kolonisierung/ Infektion) innerhalb aller VREfm-Erstisolate.	Seite 104
Abbildung 57:	Verteilung des Besiedlungsstatus (Kolonisierung/ Infektion) innerhalb der UKR-Erstisolate.	Seite 104
Abbildung 58:	Verteilung der VRE-Besiedlungsstatus auf die ST innerhalb aller Erstisolate.	Seite 105

Abbildung 59:	Prozentualer Anteil der (aus Blut oder Zerebrospinalflüssigkeit gewonnenen) Vancomycin-resistenten <i>E. faecium</i> in europäischen Ländern in den Jahren 2008 und 2018.	Seite 107
Abbildung 60:	Entwicklung der VRE-Fälle am UKR von 2004 bis 2017.	Seite 109
Abbildung 61:	Enterokokkenstammeinsendungen an das RKI (Bereich Wernigerode) von 2000 bis 2011.	Seite 110
Abbildung 62:	Häufigkeiten von Vancomycin- und Teicoplanin-resistenzen (%) bei <i>E. faecium</i> -Isolaten aus südwestdeutschen Krankenhäusern von 1998 bis 2011.	Seite 113
Abbildung 63:	Verteilung der MLSTypen der VREfm am UKR in den Jahren 2004 bis 2011.	Seite 126
Abbildung 64:	Auftreten Glykopeptid-resistenter (<i>vanA/vanB</i>) und -sensibler CC17 <i>E. faecium</i> -Isolate verschiedener ST und Virulenzmarker.	Seite 128

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Risikofaktoren für Infektion oder Kolonisierung von Patienten durch Enterokokken/VRE.	Seite 10
Tabelle 2:	Antibiotikaresistenzen von Enterokokken.	Seite 18
Tabelle 3:	Varianten der Vancomycinresistenz bei Enterokokken.	Seite 27
Tabelle 4:	Verwendete Chemikalien und Kits.	Seite 36
Tabelle 5:	Puffer und Lösungen.	Seite 37
Tabelle 6:	Verwendete Primer.	Seite 38
Tabelle 7:	Verwendete Laborgeräte.	Seite 39
Tabelle 8:	Verwendete Verbrauchsmaterialien.	Seite 40
Tabelle 9:	Verwendete Software und Datenbanken.	Seite 41
Tabelle 10:	Interpretationskriterien der MKH-Testung nach <i>CLSI</i> -Richtlinien (2015).	Seite 46
Tabelle 11:	PCR-Ansätze.	Seite 48
Tabelle 12:	Cyclerprogramm für <i>vanA/vanB</i> -, MLST-, <i>esp</i> -, <i>hyl</i> -, <i>acm</i> -PCR.	Seite 49
Tabelle 13:	Cyclerprogramm für <i>espA</i> -Amplifizierung.	Seite 49

Tabelle 14:	Auflistung aller amplifizierten Gene mit Cycloerprogramm, Elektrophoresegegel [%], Elektrophoresedauer, Größenstandard, Sequenzlänge sowie die Anzahl der internen Repeats des <i>espA</i> -Gens.	Seite 53
Tabelle 15:	Haushaltsgene und die Anzahl ihrer verschiedenen Allelvarianten.	Seite 55
Tabelle 16:	Sequenztypen mit zugehörigem Allelprofil.	Seite 78
Tabelle 17:	Übersicht über Mehrfachisolate innerhalb aller Proben.	Seite 91
Tabelle 18:	Stationen des UKR, die VREfm-Proben einsendeten.	Seite 99

7 Literaturverzeichnis

1. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*. 1992;257:1050–5. doi:10.1126/science.257.5073.1050.
2. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance - the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:1057–98. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
3. Levy SB. *The antibiotic paradox: How miracle drugs are destroying the miracle*. New York, NY: Plenum Press; 1992.
4. Remschmidt C, Schröder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. Continuous increase of vancomycin resistance in Enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:54. doi:10.1186/s13756-018-0353-x.
5. Robert Koch-Institut. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland – Update 2017/2018. *Epidemiologisches Bulletin*; 2019.
6. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in Enterococci. *Clin Infect Dis*. 1997;24:545-54; quiz 555-6. doi:10.1093/clind/24.4.545.
7. Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2012;55:1387–400. doi:10.1007/s00103-012-1564-6.
8. Bonten MJM, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant Enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis*. 2001;1:314–25. doi:10.1016/S1473-3099(01)00145-1.
9. Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26:163–71. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x.
10. Lebreton F, Manson AL, Saavedra JT, Straub TJ, Earl AM, Gilmore MS. Tracing the Enterococci from paleozoic origins to the hospital. *Cell*. 2017;169:849-861.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.04.027.
11. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. *J Exp Med*. 1933;57:571–95. doi:10.1084/jem.57.4.571.

12. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34:31–4. doi:10.1099/00207713-34-1-31.
13. Köhler W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int J Med Microbiol.* 2007;297:133–50. doi:10.1016/j.ijmm.2006.11.008.
14. Leibniz Institute. DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Prokaryotic nomenclature. 2019. <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date>.
15. van den Berghe E, Winter T de, Vuyst L de. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology.* 2006;107:159–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.027.
16. Poh CH, Oh HML, Tan AL. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *J Infect.* 2006;52:383–6. doi:10.1016/j.jinf.2005.07.011.
17. Simon A, Gröger N, Engelhart S, Molitor G, Exner M, Bode U, Fleischhack G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) - Übersicht zu Bedeutung, Prävention und Management in der Pädiatrie; 2004.
18. Nationales Referenzzentrum für nosokomiale Infektionen. Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2016: Abschlussbericht; 2017.
19. Behnke M, Hansen S, Leistner R, Diaz LAP, Gropmann A, Sohr D, et al. Nosocomial infection and antibiotic use: a second national prevalence study in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110:627–33. doi:10.3238/arztebl.2013.0627.
20. Orsi GB, Ciorba V. Vancomycin resistant *Enterococci* healthcare associated infections. *Ann Ig.* 2013;25:485–92. doi:10.7416/ai.2013.1948.
21. Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheувel M, Tribe D, Manzioros X, et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-

- resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*. 2001;357:853–5. doi:10.1016/S0140-6736(00)04205-7.
22. Willems RJL, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:821–8. doi:10.3201/1106.041204.
23. Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:454–60. doi:10.1016/j.mib.2006.07.001.
24. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:815–25. doi:10.1007/s10096-005-0056-0.
25. Panesso D, Montealegre MC, Rincón S, Mojica MF, Rice LB, Singh KV, et al. The *hylEfm* gene in *pHylEfm* of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. *BMC Microbiol*. 2011;11:20. doi:10.1186/1471-2180-11-20.
26. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, Willems RJL. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol*. 2004;186:672–82. doi:10.1128/jb.186.3.672-682.2004.
27. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. 1999;67:193–200.
28. Shankar N, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*. 2001;69:4366–72. doi:10.1128/IAI.69.7.4366-4372.2001.
29. Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein *Esp* is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol*. 2007;189:8233–40. doi:10.1128/JB.01205-07.

30. Vankerckhoven V, van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4473–9. doi:10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004.
31. Coque TM, Willems R, Cantón R, Del Campo R, Baquero F. High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:1035–8. doi:10.1093/jac/dkf229.
32. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis.* 2003;187:508–12. doi:10.1086/367711.
33. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;183:201–7. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb08958.x.
34. Berry AM, Paton JC. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun.* 2000;68:133–40. doi:10.1128/iai.68.1.133-140.2000.
35. Laverde Gomez JA, van Schaik W, Freitas AR, Coque TM, Weaver KE, Francia MV, et al. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hylEfm* genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *Int J Med Microbiol.* 2011;301:165–75. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.015.
36. Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1562–9. doi:10.1128/JCM.02526-09.
37. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Werner G, Laverde-Gomez JA, et al. Global spread of the *hyl(Efm)* colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010;54:2660–5. doi:10.1128/AAC.00134-10.

38. Arias CA, Panesso D, Singh KV, Rice LB, Murray BE. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53:4240–6. doi:10.1128/AAC.00242-09.
39. Rice LB, Lakticová V, Carias LL, Rudin S, Hutton R, Marshall SH. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *J Infect Dis*. 2009;199:342–9. doi:10.1086/595986.
40. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol*. 2003;47:1733–47. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03417.x.
41. Welsch U, Deller T, Kummer W. *Lehrbuch Histologie*. 4th ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2014.
42. Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun*. 2008;76:4110–9. doi:10.1128/IAI.00375-08.
43. Sillanpää J, Nallapareddy SR, Prakash VP, Qin X, Höök M, Weinstock GM, Murray BE. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology*. 2008;154:3199–211. doi:10.1099/mic.0.2008/017319-0.
44. Robert Koch-Institut. Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen : Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2018;61:1310–61. doi:10.1007/s00103-018-2811-2.
45. Schwarzkopf A. Multiresistente Erreger im Gesundheitswesen: Hygienemaßnahmen in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen. 2nd ed. Wiesbaden: mhp Verlag GmbH; 2016.
46. Moon TM, D'Andréa ÉD, Lee CW, Soares A, Jakoncic J, Desbonnet C, et al. The structures of penicillin-binding protein 4 (PBP4) and PBP5 from *Enterococci*

- provide structural insights into β -lactam resistance. *J Biol Chem.* 2018;293:18574–84. doi:10.1074/jbc.RA118.006052.
47. Hof H, Dörries R, Geginat G. *Medizinische Mikrobiologie*. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2014.
48. Weaver KE, Rice LB, Churchward G. Plasmids and transposons. In: Gilmore, Clewell, Courvalin, Dunny, Murray, Rice, editors. *The Enterococci: American Society of Microbiology*; 2002. p. 219–263. doi:10.1128/9781555817923.ch6.
49. Kayser FH. *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 12th ed. Stuttgart: Thieme; 2010.
50. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988;319:157–61. doi:10.1056/NEJM198807213190307.
51. Uttley AC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant Enterococci. *Lancet.* 1988;331:57–8. doi:10.1016/s0140-6736(88)91037-9.
52. Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U. Control of the spread of vancomycin-resistant Enterococci in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110:725–31. doi:10.3238/arztebl.2013.0725.
53. Robert Koch-Institut. ARS. Antibiotika-Resistenz-Surveillance.
54. Remschmidt C, Schneider S, Meyer E, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P, Schwab F. Surveillance of Antibiotic Use and Resistance in Intensive Care Units (SARI). *Deutsches Ärzteblatt Online* 2017. doi:10.3238/arztebl.2017.0858.
55. Remschmidt C, Behnke M, Kola A, Peña Diaz LA, Rohde AM, Gastmeier P, Schwab F. The effect of antibiotic use on prevalence of nosocomial vancomycin-resistant Enterococci- an ecologic study. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017;6:95. doi:10.1186/s13756-017-0253-5.
56. World Health Organisation (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics; 2017.
57. Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio* 2013. doi:10.1128/mBio.00534-13.

58. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10:266–78.
doi:10.1038/nrmicro2761.
59. Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42:1303–4.
60. Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, Girolami PC de, Ferraro MJ, Moellering RC. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991;35:2180–4.
doi:10.1128/aac.35.11.2180.
61. Guardabassi L, Perichon B, van Heijenoort J, Blanot D, Courvalin P. Glycopeptide resistance vanA operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49:4227–33.
doi:10.1128/AAC.49.10.4227-4233.2005.
62. Arias CA, Murray BE. Mechanisms of antibiotic resistance in *Enterococci*.
63. Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989;8:943–50.
doi:10.1007/bf01967563.
64. Kang H-K, Park Y. Glycopeptide antibiotics: structure and mechanisms of action. *J Bacteriol Virol*. 2015;45:67. doi:10.4167/jbv.2015.45.2.67.
65. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in *Enterococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37:1563–71.
66. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Enterococci*. *Expert Rev Anti-Infect Ther*. 2014;12:1221–36.
doi:10.1586/14787210.2014.956092.
67. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol*. 1993;175:117–27.
68. Bugg TD, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance

- proteins vanH and vanA. *Biochemistry*. 1991;30:10408–15.
doi:10.1021/bi00107a007.
69. Bugg TD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Identification of vancomycin resistance protein vanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry*. 1991;30:2017–21. doi:10.1021/bi00222a002.
70. Reynolds PE, Depardieu F, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of vanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol Microbiol*. 1994;13:1065–70. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00497.x.
71. Arthur M, Depardieu F, Snaith HA, Reynolds PE, Courvalin P. Contribution of vanY D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994;38:1899–903. doi:10.1128/aac.38.9.1899.
72. Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P. The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*. 1995;154:87–92. doi:10.1016/0378-1119(94)00851-i.
73. Pfaller MA, Cormican M, Flamm RK, Mendes RE, Jones RN. Temporal and geographic variation in antimicrobial susceptibility and resistance patterns of Enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6:S54-S62. doi:10.1093/ofid/ofy344.
74. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (PEG). S2k Leitlinie 082-006: Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2018. 2. aktualisierte Version, erstellt am 25. Juli 2019. AWMF online.
75. Billot-Klein D, Gutmann L, Sablé S, Guittet E, van Heijenoort J. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J Bacteriol*. 1994;176:2398–405. doi:10.1128/jb.176.8.2398-2405.1994.
76. Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43:1105–10.

77. Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Werner G, Sundsfjord A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:541–54. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03226.x.
78. Bender JK, Kalmbach A, Fleige C, Klare I, Fuchs S, Werner G. Population structure and acquisition of the vanB resistance determinant in German clinical isolates of *Enterococcus faecium* ST192. *Sci Rep.* 2016;6:21847. doi:10.1038/srep21847.
79. Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev.* 2005;105:425–48. doi:10.1021/cr030103a.
80. Binda E, Marinelli F, Marcone GL. Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics (Basel).* 2014;3:572–94. doi:10.3390/antibiotics3040572.
81. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (PEG). GERMAP 2015: Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence; 2016.
82. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4407–14. doi:10.1093/nar/23.21.4407.
83. Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJL. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4503–11. doi:10.1128/JCM.42.10.4503-4511.2004.
84. Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJL. Global emergence and dissemination of *Enterococci* as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front Microbiol.* 2016;7:788. doi:10.3389/fmicb.2016.00788.
85. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Maryland Heights, Missouri: Saunders/Elsevier; 2011.

86. Dechert U. Gelelektrophoresen. In: Jansohn M, Rothhämel S, editors. *Gentechnische Methoden*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012. p. 37–93. doi:10.1007/978-3-8274-2430-3_2.
87. 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 Evolut*. 2017;54:74–80. doi:10.1016/j.meegid.2017.06.010.
88. Werner G. Molecular typing of Enterococci/Vre. *J Bacteriol Parasitol* 2013. doi:10.4172/2155-9597.S5-001.
89. Gulla S, Mohammad SN, Colquhoun DJ. Multi-locus variable-number tandem-repeat analysis of the fish-pathogenic bacterium *Yersinia ruckeri* by multiplex PCR and capillary electrophoresis. *J Vis Exp* 2019. doi:10.3791/59455.
90. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1963–71. doi:10.1128/JCM.40.6.1963–1971.2002.
91. Werner G, Klare I, Witte W. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol*. 2007;7:28. doi:10.1186/1471-2180-7-28.
92. Elberse KEM, Nunes S, Sá-Leão R, van der Heide HGJ, Schouls LM. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. *PLOS ONE*. 2011;6:e19668. doi:10.1371/journal.pone.0019668.
93. Bouchouicha R, Boulouis H-J, Berrich M, Monteil M, Chomel B, Haddad N. Comparison of the performances of MLVA vs. the main other typing techniques for *Bartonella henselae*. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 2:104–5. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02183.x.
94. Krawczyk B, Kur J. Molecular identification and genotyping of Staphylococci: genus, species, strains, clones, lineages, and interspecies exchanges. In: *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*: Elsevier; 2018. p. 199–223. doi:10.1016/B978-0-12-813547-1.00016-9.

95. Cavalleri GL, Delanty N. Opportunities and challenges for genome sequencing in the clinic. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2012;89:65–83. doi:10.1016/B978-0-12-394287-6.00003-3.
96. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect Immun.* 2008;76:4120–8. doi:10.1128/IAI.00376-08.
97. Schubert S, Wieser A. MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum.* 2010;16. Jahrgang:760–2.
98. Engelmann E, Kugler F. MALDI-TOF Massenspektrometrie. *TechnoPharm.* 2012:18–23.
99. Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P, editors. *Mikrobiologische Diagnostik.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
100. Wikipedia. *Antibiogramm.* 02.10.2018.
<https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=181427403>. Accessed 4 Oct 2018.
101. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fifth informational supplement.* Wayne, PA: Committee for Clinical Laboratory Standards; 2015.
102. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie.* 3rd ed. Stuttgart: Thieme; 2012.
103. Buddecke E. *Molekulare Medizin: Eine systematische Einführung.* Landsberg/Lech: Ecomed; 2002.
104. pubMLST. *Enterococcus faecium locus/sequence definitions database.*
https://pubmlst.org/bigddb?db=pubmlst_efaecium_seqdef&page=downloadAlleles
105. Robert Koch-Institut. *Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung aus dem NRZ für Staphylokokken und Enterokokken, 2011 – 2012.* *Epidemiologisches Bulletin;* 2013.
106. Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:2263–6. doi:10.1128/aem.66.5.2263-2266.2000.
107. European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).* Stockholm; 2019.

108. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19:56–66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
109. Englert K. Molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter *E. faecium*-Isolate an einem südwestdeutschen Krankenhaus der Maximalversorgung. Gießen, Lahn: VVB Laufersweiler Verlag; 2013.
110. Robert Koch-Institut. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) in Deutschland. Update 2013/2014. *Epidemiologisches Bulletin*; 2015.
111. Robert Koch-Institut. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung aus dem NRZ für Staphylokokken und Enterokokken, 2011-2012. *Epidemiologisches Bulletin*; 2013.
112. Robert Koch-Institut. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland. Update 2015/2016. *Epidemiologisches Bulletin*; 2017.
113. Willems RJL, Bonten MJM. Glycopeptide-resistant Enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20:384–90. doi:10.1097/QCO.0b013e32818be63d.
114. Howden BP, Holt KE, Lam MMC, Seemann T, Ballard S, Coombs GW, et al. Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant Enterococci. *MBio* 2013. doi:10.1128/mBio.00412-13.
115. Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype vanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1781–7. doi:10.1128/JCM.39.5.1781–1787.2001.
116. Robert Koch-Institut. Enterokokken mit Vancomycin-Resistenz in deutschen Krankenhäusern 2008/2009. Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. *Epidemiologisches Bulletin*; 2010.

117. Robert Koch-Institut. Vancomycin-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern 2006/2007. Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. *Epidemiologisches Bulletin*; 2008.
118. Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, Sechi LA. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;88:291–304. doi:10.1016/s0168-1605(03)00191-0.
119. Borgmann S, Schulte B, Wolz C, Gruber H, Werner G, Goerke C, et al. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect*. 2007;67:49–55. doi:10.1016/j.jhin.2007.06.002.
120. Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Gherardi G, Creti R. Variant *esp* gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet*. 2001;357:1802. doi:10.1016/s0140-6736(00)04919-9.
121. Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:374–7. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.04.026.
122. Coque TM, Willems RJL, Fortún J, Top J, Diz S, Loza E, et al. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49:2693–700. doi:10.1128/AAC.49.7.2693-2700.2005.
123. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:232–5. doi:10.1093/jac/dkh249.
124. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, Coque TM, Peixe L. Distribution of putative virulence markers in *Enterococcus faecium*: towards a safety profile review. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:306–19. doi:10.1093/jac/dkx387.
125. Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. *vanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-

- sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3934–9.
126. Faron ML, Ledebner NA, Buchan BW. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2436–47. doi:10.1128/JCM.00211-16.
127. Niederhäusern S de, Bondi M, Messi P, Iseppi R, Sabia C, Manicardi G, Anacarso I. Vancomycin-resistance transferability from *vanA* *Enterococci* to *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol.* 2011;62:1363–7. doi:10.1007/s00284-011-9868-6.
128. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet.* 2013;382:205. doi:10.1016/S0140-6736(13)61219-2.
129. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin -United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51:565–7.
130. Walters MS, Eggers P, Albrecht V, Travis T, Lonsway D, Hovan G, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - Delaware, 2015. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64:1056. doi:10.15585/mmwr.mm6437a6.
131. Robert Koch-Institut. Verbreitung, Krankheitslast, Therapieoptionen und Prävention von Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken. *Epidemiologisches Bulletin*; 2019.

8 Danksagung

Frau Doreen Möbius, der netten Stimme am Telefon, möchte ich für ihre freundliche und stets positive Art danken, mit der sie alle organisatorischen Hürden bewältigte.

Bei Frau Maria Kurz möchte ich mich für die umfassende Unterstützung bei all den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Laborarbeiten herzlich bedanken. Auch Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg möchte ich für die Bereitstellung von Materialien und Geräten sowie Hilfestellungen jeglicher Art danken. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Johannes Meier, der mir nicht nur stets geduldig Fragen beantwortete, sondern mir ein sehr guter Freund wurde.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Salzberger, Bereichsleiter Infektiologie innerhalb der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie des UKR, für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Vor allem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wulf Schneider, dem Leiter der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie am UKR, gilt ein herzliches „Danke“. Er hat es mir ermöglicht, diese Dissertation unter seiner wissenschaftlichen Leitung und Betreuung zu verwirklichen und half stets, wenn „der rote Faden“ drohte verloren zu gehen.

Besonderer, nicht angemessen bekundbarer Dank gilt meiner Familie. Kleiner John, Herr und Frau Su: Eure Unterstützung und der Rückhalt, den ich schon während des ganzen Studiums und auch während der Promotion von Euch erfahren habe, haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin.

Zuletzt möchte ich noch meinem Freund Michael danken. Für den Beistand und die Motivation an schleppend verlaufenden Tagen, für sein stetes Verständnis, für die bisherige gemeinsame Zeit und für all die Zeit, die noch kommen wird.