

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor: Prof. Dr. Martin Aepfelbacher

Vancomycin-resistente Enterokokken im klinischen Alltag: Nachweisverfahren und Populationsheterogenität

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Nadine Sarah Mirwald

aus Kiel

Hamburg 2018

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.07.2018

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Holger Rohde

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Moritz Hentschke

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Gattung <i>Enterococcus</i>	5
1.1.1	Taxonomie.....	5
1.1.2	Eigenschaften und Vorkommen	6
1.1.3	Virulenzfaktoren und klonale Struktur von Enterokokken	7
1.2	Enterokokken als Verursacher von Infektionen beim Menschen	9
1.2.1	Kolonisation und Infektionen durch Enterokokken beim Menschen.....	9
1.2.2	Enterokokken als Erreger nosokomialer Infektionen	10
1.2.3	Empfindlichkeit von Enterokokken gegenüber von Antibiotika	11
1.2.4	Molekulare Grundlagen der Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken.....	16
1.2.5	Kolonisation und Übertragung Vancomycin-resistenter Enterokokken beim Menschen	20
1.2.6	Infektionen durch Vancomycin-resistente Enterokokken im Kollektiv stammzelltransplanterter Patienten.....	22
1.3	Diagnostik von VRE	23
1.3.1	Kultur-basierte Screeningverfahren	23
1.3.2	Molekulargenetische Screeningmethoden	25
1.4	Typisierung von Enterokokken mittels Pulsfeldgelelektrophorese.....	26
1.5	Therapie von Enterokokkeninfektionen	28
1.5.1	Glykopeptidantibiotika.....	29
1.5.2	Linezolid	30
1.5.3	Daptomycin	30
1.6	Ziel der Arbeit	31
2	Material und Methoden.....	34
2.1	Material	34
2.1.1	Geräte	34
2.1.2	Chemikalien.....	37
2.1.3	Reagenzien und Enzyme.....	38
2.1.4	Lösungen.....	39
2.1.5	Primer.....	40
2.1.6	Medien.....	40
2.1.7	Patientenkollektiv, Gewinnung des Probenmaterials.....	41
2.2	Methoden	44
2.2.1	Anzucht von Bakterien im Rahmen der VRE-Surveillance	44
2.2.2	Anzucht von VRE für die Populationsanalyse	47
2.2.3	Empfindlichkeitstestung	48
2.2.4	Polymerasekettenreaktion	50
2.2.4.1	Anzucht der Bakterien für PCR	51
2.2.4.2	DNA-Extraktion	51
2.2.4.3	Van-Polymerasekettenreaktion	51
2.2.4.4	Multiplex-PCR für <i>ptsD</i>	51
2.2.4.5	Agarosegelelektrophorese	53

2.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese.....	54
2.2.5.1	Herstellung der Agaroseblöckchen.....	54
2.2.5.2	Lyse I	55
2.2.5.3	Lyse II	55
2.2.5.4	Waschen.....	55
2.2.5.5	Restriktionsverdau	56
2.2.5.6	Herstellung des Gels.....	56
3	Ergebnisse	59
3.1	Vergleich der Qualität von Selektiv-Indikatormedien und PCR zum Nachweis von VRE in Rektalabstrichen	59
3.1.1	Beschreibung des Untersuchungsmaterials.....	59
3.1.2	Prävalenz <i>vanA</i> - und <i>vanB</i> -tragender <i>E. faecium</i> und <i>E. faecalis</i> im Untersuchungsgut	60
3.2	Validation der PCR gegenüber dem Kulturbefund der Anreicherungsbrühe	61
3.2.1	Kulturelle VRE- Anzucht aus der Anreicherungsbrühe.....	62
3.2.2	Einfluss der Inkubationszeit auf die diagnostische Güte unterschiedlicher VRE-Screeningmedien.....	66
3.2.3	Vergleich der diagnostischen Güte unterschiedlicher VRE Screeningmedien nach 48-stündiger Inkubation	68
3.3	Verteilung der Minimalen Hemmkonzentrationen für Vancomycin und Teicoplanin in der Population	68
3.4	Untersuchung der Populationsstruktur von kolonisierenden VRE	69
3.4.1	Prävalenz der <i>vanA</i> -/ <i>vanB</i> -Typen bei <i>E. faecium</i> im Untersuchungskollektiv.....	71
3.5	Analyse der klonalen VRE-Struktur mittels PFGE	72
3.5.1	Bestimmung des <i>van</i> -Genotyps in unabhängigen PFGE-Pulsotypen.....	87
3.5.2	Beschreibung der genetischen Verwandtschaft von VRE unterschiedlicher Patienten.....	88
3.6	PCR-basierter Nachweises des Invasivitätsmarkers <i>ptsD</i>	90
3.7	Analyse der Empfindlichkeit von VRE-Isolaten gegenüber Glykopeptiden, Daptomycin und Linezolid im Verlauf	90
3.7.1	Untersuchung der Empfindlichkeit von VRE-Isolaten gegenüber Vancomycin und Teicoplanin	91
3.7.2	Untersuchung der Empfindlichkeit von VRE gegenüber Daptomycin	93
3.7.3	Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber Linezolid.....	96
4	Diskussion.....	97
5	Zusammenfassung	120
6	Abstract	122
A	Abbildungsverzeichnis.....	123
B	Tabellenverzeichnis.....	124
C	Literaturverzeichnis.....	126

D	Danksagung	146
E	Lebenslauf	147
F	Eidesstattliche Versicherung.....	149

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Enterococcus*

1.1.1 Taxonomie

Enterokokken gehören zur Ordnung der *Lactobacillales* und Familie der *Enterococcaceae*, zu welchen auch die Genera *Melissococcus*, *Tetragenococcus* und *Vagococcus* gezählt werden (Ludwig et al., 2009) (vergleiche Abbildung 1). Erstmals im Jahre 1899 von Thiercelin beschrieben, wurden sie aufgrund des Vorkommens von Lipoteichonsäure in der Zellwand zunächst der Gruppe D der Streptokokken nach Lancefield zugeordnet (Thiercelin, 1899; Teixeira et al., 2011). Unter dem Namen *Micrococcus zymogenes* beschrieben MacCallum und Hastings 1898 erstmals eine Enterokokken-Endokarditis (MacCallum und Hastings, 1899). 1984 konnte durch Schleifer und Kilpper-Bälz gezeigt werden, dass es sich bei den Enterokokken um ein eigenständiges Genus handelt. Analysen der 16sRNA bestätigten, dass die als *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus faecium* bezeichneten Bakterien genetisch von den Streptokokken verschieden waren (Schleifer und Kilpper-Bälz, 1984; Devriese et al., 2006; Ludwig et al., 2009). Heute ist bekannt, dass nur etwa 80 % der Enterokokken das D-Antigen nach Lancefield besitzen (Teixeira et al., 2011).

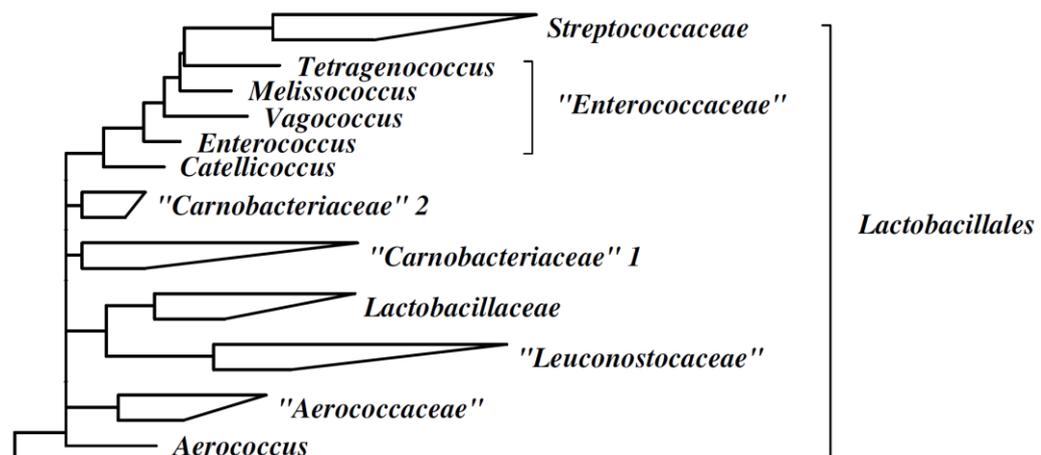


Abbildung 1: Phylogenetische Eingruppierung der Gattung *Enterococcus* (Ludwig et al., 2009).

1.1.2 Eigenschaften und Vorkommen

Enterokokken sind Gram-positive Kokken, die einzeln, als Diplokokken oder Kettenkokken auftreten können. Nach 24-stündiger Bebrütung auf Blutagar weisen die Kolonien einen Durchmesser von 1–2 mm auf. Ihr Wachstum ist fakultativ anaerob. Sie setzen Glucose zu Lactat um. Die optimale Wachstumstemperatur von Enterokokken liegt bei 35 °C–37 °C, sie können jedoch bei Temperaturen zwischen 10 °C und 45 °C überleben. Auch können sie sich in einem breiten pH-Bereich von pH 4,6–9,6 (Optimum pH 7,5) vermehren. Enterokokken sind äußerst widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel hohen Salz- oder Gallekonzentrationen. Sie können in 6,5-prozentiger NaCl- oder 40-prozentiger Galle-Lösung überdauern und unterscheiden sich unter anderem dadurch von den Streptokokken. In Anwesenheit von Galle können sie Äskulin hydrolysieren (Sherman-Kriterien (Sherman, 1937)) (Teixeira et al., 2011). Die meisten Enterokokken sind nicht beweglich sowie Katalase- und Cytochromoxidase-negativ. Auf Blutagar zeigen sie α -, β - oder gar keine Hämolyse (Schleifer und Kilpper-Bälz, 1984; Murray, 1990; Teixeira et al., 2011).

Enterokokken treten in der Umwelt in Erde, Wasser, auf Pflanzen, Tieren und Lebensmitteln auf (Murray, 1990; Devriese et al., 2006). Unter anderem stellen Geflügel, Schweine, Pferde, Rinder, Ziegen und Wild ein Reservoir für Enterokokken dar (Bates et al., 1993; Bonten et al., 2001; Mallon et al., 2002). Im Trinkwasser gelten Enterokokken als Indikatorkeim für fäkale Kontamination und dürfen dort nicht nachgewiesen werden (TrinkwV §5, 2001).

Enterokokken gehören zur Besiedlungsflora des menschlichen Darms, sie können aber auch auf der Haut, in den Gallenwegen oder im Urogenitaltrakt vorkommen (Murray, 1990; Devriese et al., 2006). Aktuell sind mehr als 35 verschiedene Enterokokkenspezies bekannt (Klare et al., 2012a). Wichtige Vertreter sind *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* und *E. avium*. Die Prävalenz der verschiedenen Enterokokkenspezies scheint von Patient zu Patient zu variieren und Einflüssen wie zum Beispiel dem Alter (Bonten et al.,

1996; Wendt et al., 1999) oder der Ernährung (Teixeira et al., 2011) zu unterliegen. Am häufigsten werden *E. faecalis* und *E. faecium* nachgewiesen und spielen damit im klinischen Alltag die größte Rolle (Teixeira et al., 2011).

1.1.3 Virulenzfaktoren und klonale Struktur von Enterokokken

Enterokokken besitzen zwar nur eine geringe Virulenz (Kayser und Böttger, 2005; Arias und Murray, 2012), haben jedoch die Fähigkeit zur Adhärenz an Nierenepithelien und Herzklappen (Schlievert et al., 1997; Arias und Murray, 2012). So verursachen sie meist endogene Infektionen wie Sepsis, Meningitis, Peritonitis und Endokarditis, am häufigsten jedoch (katheterassoziierte) Harnwegsinfektionen (Murray, 1990). Das Virulenzpotential von *E. faecalis* ist dabei größer als das von *E. faecium* (Werner et al., 2008). Da *E. faecium* jedoch vermehrt über erworbene Resistenzen verfügt, wird seine Ausbreitung durch den Einsatz von Antibiotika zunehmend begünstigt (Klare et al., 2003; Werner et al., 2008). Zu den typischen Virulenzfaktoren von Enterokokken zählen Adhäsine, Zytolysine, Proteasen und Hyaluronidasen (Kayser und Böttger, 2005)

Mittels *amplified fragment polymorphism (AFLP)* konnten Enterokokken erstmals auf phylogenetische Verwandtschaft untersucht werden. Dabei fand man, dass *E. faecium*-Stämme von hospitalisierten Patienten eine eigene Subpopulation gegenüber Stämmen aus der Allgemeinbevölkerung und jenen von Nutztieren bildeten. Heute stellt das *multilocus sequence typing (MLST)* eine etablierte Methode für Populationsanalysen dar. Das *MLST* identifiziert Allele von DNA-Sequenzen von housekeeping-Genen. Über den Nachweis spezifischer Allelkombinationen konnten sogenannte „Sequenztypen“ ermittelt werden, die dann wiederum klonalen Komplexen zugeordnet werden konnten. Die meisten in Deutschland auftretenden hospital-assoziierten *E. faecium*-Stämme gehören dem klonalen Komplex CC17 an. Der Sequenztyp ST17 ist dabei „primärer Gründer“ (Willems et al., 2000; Feil et al., 2004; Ruiz-Garbajosa et al., 2006; Werner et al., 2008). Der klonale Komplex CC17 zeichnet sich durch einige wiederkehrende Eigenschaften aus. So besitzen Stämme dieses Komplexes neben dem charakteristischen *MLST*-Profil häufig eine Resistenz gegenüber Ampicillin, eine *high-level*-Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und die Virulenzmarker *esp*

(*enterococcal surface protein*) und *hyl_{Efm}* (Hyaluronidase) (Rice et al., 2003; Werner et al., 2008). Während Hyaluronidase zur Gewebsinvasion beiträgt, spielt *esp* unter anderem eine Rolle in der Biofilmbildung (Heikens et al., 2007).

Mittels moderner Software gelang die Darstellung phylogenetischer Verwandtschaft zwischen einzelnen klonalen Typen. Es konnten die Cluster A und B voneinander abgegrenzt werden. Während *E. faecium*-Stämme des Clusters B in der Regel von nicht-hospitalisierten Patienten stammten, gehören zum Cluster A vorwiegend Isolate hospital-assoziiierter Stämme und solche von Nutztieren. Durch weitere Subgruppierung konnten die meisten epidemischen Isolate hospital-assoziiierter Stämme dem Cluster A1 zugeordnet werden. Das Cluster A2 enthält in gemischter Form *E. faecium*-Stämme von Nutztieren und solche von sporadisch auftretenden Infektionen beim Menschen (Werner et al., 2008; Lebreton et al., 2013; Prieto et al., 2016) (vergleiche Abbildung 2).

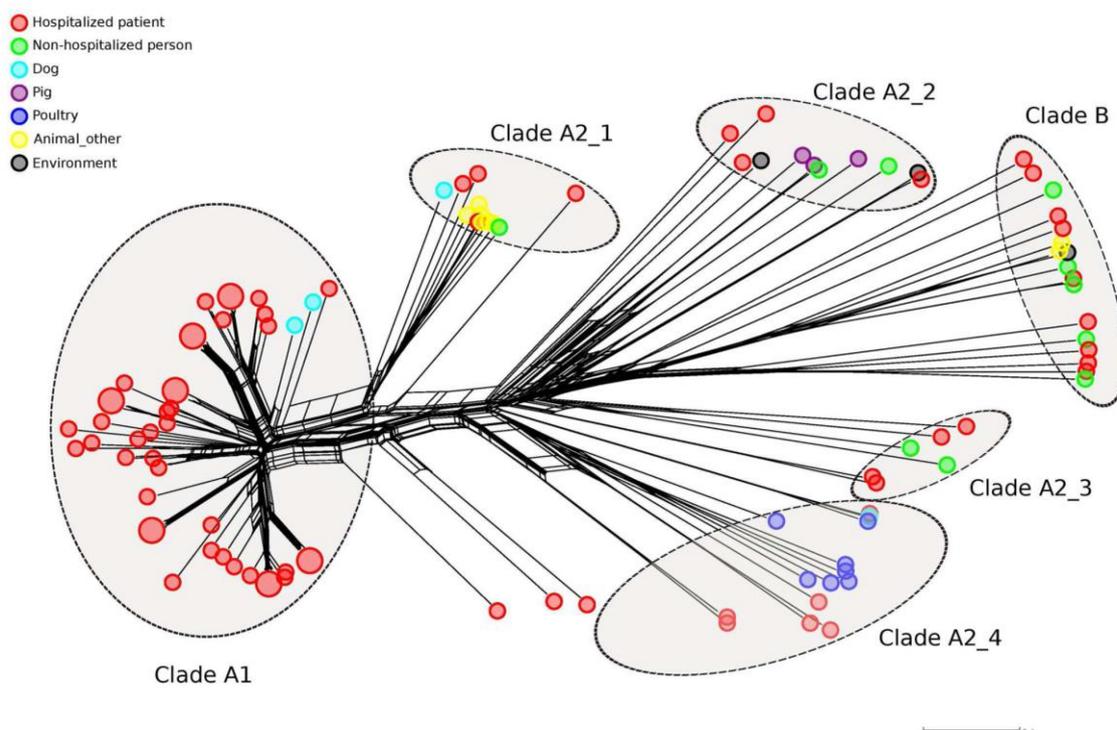


Abbildung 2: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen *E. faecium*-Isolaten (Prieto et al., 2016).

Für *E. faecalis* werden am häufigsten die klonalen Komplexe CC2 und CC9 beschrieben (Ruiz-Garbajosa et al., 2006; European Center for Disease Prevention Control, 2015). Etwa ein Drittel der *E. faecalis*-Stämme sezerniert das Toxin Hämolysin-Cytolysin (*cy*), welches zur Lyse von Erythrozyten beiträgt (Arias und Murray, 2012). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass *cy*-positive Stämme eine höhere Virulenz besitzen, als *cy*-negative Mutanten (Ike et al., 1984).

1.2 Enterokokken als Verursacher von Infektionen beim Menschen

1.2.1 Kolonisation und Infektionen durch Enterokokken beim Menschen

Enterokokken können beim Menschen als opportunistische Erreger eine Vielzahl an Infektionen hervorrufen. Infektionen durch Enterokokken entstehen dabei meist als endogene Infektionen aus einer intestinalen Besiedlung mit dem Erreger. Am häufigsten verursachen Enterokokken komplizierte oder nosokomiale Harnwegsinfekte. Weitere häufige Infektionsformen sind postoperative Wundinfektionen, Katheter-assoziierte Infektionen (zum Beispiel Venenkatheter), Endokarditis, abdominale Infektionen (zum Beispiel Peritonitis nach operativen Eingriffen), Infektionen der Gallenwege und Fremdkörper-assoziierte Infektionen nach Implantation. Über diese Eintrittspforten kann es schließlich zur Bakteriämie und Sepsis kommen (Murray, 1990).

Enterokokken werden für etwa 20 % der Endokarditiden nativer Herzklappen und 6–7 % solcher nach prothetischem Klappenersatz verantwortlich gemacht (Teixeira et al., 2011). Meist ist dabei das linke Herz befallen (Murray, 1990). In Krankenhäusern der USA stellen Enterokokken den zweithäufigsten Erreger von Katheter-assoziierten Blutstrom-, Haut- und Weichteil- und Harnwegsinfektionen dar (Hidron et al., 2008).

Enterale *E. faecalis*-Besiedlungen und -Infektionen treten mit 60–95 % im Allgemeinen häufiger auf als solche mit *E. faecium* (5–40 %). Die Resistenzbildung scheint jedoch bei *E. faecium* eine größere Rolle zu spielen als bei *E. faecalis*. Während mehr als 50 % der *E. faecalis*-Isolate noch empfindlich gegenüber den

wichtigsten Antibiotikaklassen sind, weisen *E. faecium*-Isolate wesentlich häufiger Multiresistenzen (mit Beteiligung von mehr als fünf Antibiotika) auf, darunter auch häufiger Resistenzen vom *van*-Typ (Tendenz steigend) (Klare et al., 2012a). Trotz geringerer Virulenz führt *E. faecium* damit häufiger zu nosokomialen Ausbrüchen als *E. faecalis* (DiazGranados et al., 2005a; McNeil et al., 2006; Hidron et al., 2008; Klare et al., 2012a). Weiterhin gehen durch *E. faecium* verursachte Bakteriämien mit einer höheren Mortalität einher als durch *E. faecalis* verursachte, und führen zu längeren Verweildauern im Krankenhaus (Billington et al., 2014).

Insgesamt ist der Anteil der *E. faecium*-Isolate im Vergleich zu *E. faecalis* in den letzten Jahren in mitteleuropäischen Krankenhäusern bedeutsam angestiegen: 9,3 % (1998) → 15,7 % (2001) → 24,4 % (2004) → 33,9 % (2007) → 41,4 % (2010) (Klare et al., 2012a). Die bessere Adaptation von *E. faecium* im nosokomialen Umfeld scheint erklärbar durch seine Fähigkeit, besser auf oxidativen Stress reagieren zu können als *E. faecalis*. So verfügt *E. faecium* über einen auf oxidativen Stress und Antibiotika reagierenden Regulator (AsrR), der ihm besseres Überleben ermöglicht (Lebreton et al., 2012). Als weiteren *E. faecium*-spezifischen Faktor, welcher ebenfalls die erhöhte Virulenz einiger Stämme erklären könnte, wurde *ptsD* beschrieben. Dieses Gen kodiert für einen Teil des Phosphotransferasesystem der Mannose-Familie und wurde fast ausschließlich in invasiven *E. faecium*-Isolaten nachgewiesen. In kolonisierenden Stämme kam das Gen jedoch nicht vor. Untersuchungen isogener *ptsD* Mutanten im Mausmodell zeigten, dass die Mutanten deutlich schlechter den Darm kolonisieren konnten als die korrespondierenden Wildtyp-Stämme (Zhang et al., 2013).

1.2.2 Enterokokken als Erreger nosokomialer Infektionen

Etwa 500.000 nosokomiale Infektionen werden pro Jahr in Deutschland gezählt (Gastmeier und Fätkenheuer, 2015). Die höchste Inzidenz solcher nosokomialen Infektionen findet sich auf Intensivstationen (NRZ, 2016). In den letzten drei Jahrzehnten traten Enterokokken immer häufiger als Erreger nosokomialer Infektionen auf. Nach *E. coli* (18 %) stellen Enterokokken (13,2 %) aktuell den zweithäu-

figsten Erreger nosokomialer Infektionen in Deutschland dar, gefolgt von *S. aureus* (13,1 %) und *C. difficile* (8,1 %) (Behnke et al., 2013; NRZ, 2016). Bärwolff und Grundmann beschrieben Enterokokken als die Erreger mit dem höchsten Übertragungspotential im nosokomialen Bereich (Grundmann et al., 2005).

Multiresistente Erreger stellen einen wesentlichen Anteil der Erreger nosokomialer Infektionen. Im Jahr 2013 gingen etwa 30.000 (6 %) von ihnen auf MRSA, VRE und multiresistente Formen von *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* zurück (Gastmeier und Fätkenheuer, 2015). Eine wesentliche Ursache für die wachsende Zahl nosokomialer Infektionen durch multiresistente Erreger ist der stetig steigende Einsatz von Antibiotika. Am häufigsten werden Zweitgenerations-Cephalosporine (15,1 %), Fluorchinolone (13,8 %), Penicillin + β -Laktamase-Inhibitor (12,5 %), Drittgenerations-Cephalosporine (10,4 %) und Carbapeneme (5,9 %) verwendet. Eine der Hauptursachen für den Einsatz von Zweitgenerations-Cephalosporinen spielt dabei die perioperative Prophylaxe (Behnke et al., 2013).

Heute werden rund 4.000 (14 %) aller erfassten nosokomialen Infektionen durch Vancomycin-resistente Enterokokken verursacht (Gastmeier und Fätkenheuer, 2015; NRZ, 2016). Laut Daten des RKI ist der Anteil nosokomialer Enterokokken-Infektionen inklusive VRE in Deutschland in den letzten Jahren von 3,9 % (2007/08), über 4,2 % (2009/10) und 6,6 % (2011/12), bis 7,2 % (2013/14) angestiegen (Robert-Koch-Institut, 2016). Infektionen durch Vancomycin-resistente Enterokokken gehen dabei verglichen mit Infektionen durch Vancomycin-sensible Enterokokken mit einer Zunahme der Mortalität (DiazGranados et al., 2005a; McNeil et al., 2006; Prematunge et al., 2016) und der Verlängerung von Krankenhausaufenthalten (McNeil et al., 2006; Butler et al., 2010; Almyroudis et al., 2011) einher.

1.2.3 Empfindlichkeit von Enterokokken gegenüber von Antibiotika

Von Resistenz gegenüber einem Antibiotikum spricht man, wenn die Minimale Hemmkonzentration (MHK) eines Erregers oberhalb eines Schwellenwerts liegt, ab welchem trotz ausreichend hoher Dosierung ein klinischer Effekt nicht sicher

erzielt wird. Hierbei werden intrinsische (natürliche) und extrinsische (erworbene) Resistenzen unterschieden. Von intrinsischer Resistenz spricht man, wenn diese als stabile genetische, häufig chromosomal kodierte Eigenschaft vorliegt, die alle Vertreter einer Spezies gemeinsam haben (zum Beispiel Cephalosporinresistenz bei *Listeria monocytogenes*). Extrinsische Resistenzen werden von Bakterien durch Veränderungen (Mutation) (zum Beispiel Resistenz gegenüber Chinolonen bei *E. coli* durch Mutationen im Gyrase-kodierenden Gen *gyr*) oder Aufnahme von neuem genetischen Material erworben (zum Beispiel Aufnahme plasmidkodierter Resistenzmarker) (Rice et al., 1998).

Virulente Enterokokken zeichnen sich gegenüber einfachen kommensalen Isolatent häufig durch erworbene Resistenzen aus. Diese ermöglichen es ihnen, länger als gewöhnlich in der Umwelt oder im Wirtsorganismus zu überleben (Shankar et al., 2002). Allen Enterokokken ist eine intrinsische Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika (alle Cephalosporine, semisynthetische Penicilline wie Oxacillin, Flucloxacillin, Monobactame wie Aztreonam) gemein, da sie nur eine geringe Affinität für das Penicillin-bindende Protein, insbesondere PBP5, besitzen. Dieses liegt meist überproduziert und in modifizierter Form vor (Fontana et al., 1996). In seltenen Fällen sind Enterokokken auch in der Lage, β -Laktamasen zu produzieren. Die Ampicillin-Resistenz von *E. faecium* hat aufgrund der Verbreitung von CC17-Stämmen in den letzten Jahren stark zugenommen. So sind nahezu alle klinischen *E. faecium*-Isolate Ampicillin-resistent. Die PEG-Studie von 2007 wies unter *E. faecium*-Isolaten eine Ampicillin-Resistenzrate von 87,6 % nach, während diese bei *E. faecalis* nur 1,6 % betrug (Klare et al., 2012a; European Center for Disease Prevention Control, 2015).

Extrinsische Resistenzen können bei Enterokokken gegen Ampicillin, Makrolide, Fluorchinolone, Tetrazykline, Chloramphenicol, Streptogramine, Glykopeptide und Oxazolidonone vorliegen. Des Weiteren sind *high-level*-Resistenzen gegen Aminoglykoside beschrieben. Resistenzen gegenüber Streptograminen und Glykopeptiden werden häufiger bei *E. faecium* beobachtet (Werner, 2003; Werner et al., 2008) (vergleiche Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über natürliche und erworbene Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken (Werner et al., 2008).

Natürliche (intrinsische) Resistenzen	Erworbene (extrinsische) Resistenzen
Cephalosporine	Ampicillin (meist <i>E. faecium</i>)
Semisynthetische Penicilline	Makrolide
Monobactame	Aminoglykoside (<i>high-level</i>)
Polymixine	Chloramphenicol
Lincosamide (<i>E. faecalis</i>)	Fluorchinolone
Streptogramine (z. B. Quinupristin/Dalfopristin ; nur <i>E. faecalis</i>)	Streptogramine (z. B. Quinupristin/Dalfopristin ; bei <i>E. faecium</i>)
Aminoglykoside (<i>low level</i>)	Tetracycline
Mupirocin (nur <i>E. faecalis</i>)	Glykopeptide (meist <i>E. faecium</i>)
Vancomycin (<i>low-level</i> -Resistenzen in <i>E. gallinarum</i> und <i>E. casseliflavus</i>)	Oxazolidinone (Linezolid)
	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
	Lipopeptide (Daptomycin)

Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) wurden erstmals 1986 bei Patienten in Frankreich und England beschrieben (Leclercq et al., 1988; Uttley et al., 1988). Seitdem sind die Zahlen positiver VRE-Nachweise weltweit angestiegen. Bei der Betrachtung dieses Anstieges muss jedoch auch die allgemeine Zunahme der Screeninguntersuchungen berücksichtigt werden (Mutters und Frank, 2013). Besonders schnell verbreiteten sich VRE in Krankenhäusern in den USA. Dort wurden sie erstmals 1989 beobachtet (Centers for Disease Prevention Control, 1993). Der Anteil von VRE an allen Enterokokkenisolaten in der Mitte der 1990er betrug in den USA bereits mehr als 25 % (National Nosocomial Infections Surveillance, 2001), 2010 waren dort 87 % der *E. faecium*-Stämme nosokomialer Infektionen Vancomycin-resistent (Edelsberg et al., 2014). Der erste Ausbruch von VRE in einem deutschen Krankenhaus wurde 1996 beschrieben (Reinhardt

et al., 1996). Heute sind die Resistenzraten von Enterokokken weltweit und auch europaweit stark variabel. Während in Ländern wie Estland, Finnland, Island und Malta im Jahre 2014 keine resistenten *E. faecium*-Isolate auftraten, wiesen im selben Jahr in Irland 45,1 % der *E. faecium*-Isolate eine solche Resistenz auf (European Center for Disease Prevention Control, 2015). In Deutschland waren im Jahr 2015 10,2 % der *E. faecium*-Stämme resistent gegenüber Vancomycin. Im Jahr 2016 betrug die Prävalenz von Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten in Europa 12,2 %, für Vancomycin-resistente *E. faecalis* nur 0,1 % (European Center for Disease Prevention Control, 2015; European Centre for Disease Prevention Control, 2017).

Die europäische EARS-Net-Studie (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) dokumentiert für die Vancomycin-Resistenz bei *E. faecium*-Blutkulturisolaten in Deutschland Häufigkeiten über 10 % (2012: 16,2 %; 2013: 14,5 %) (Robert-Koch-Institut, 2015). 2012 hatte Deutschland im europäischen Vergleich mit 16,2 % eine der höchsten Raten an VRE im Bereich der Blutstrom-Infektionen. Nur Irland und Portugal zeigten mit 44,0 % und 23,3 % höhere Raten, während in Ländern wie Dänemark und den Niederlanden 2012 die Anteile der VRE-Isolate zwischen 0 und 2% lagen (European Centre for Disease Prevention Control, 2016). Von 2007 bis 2012 lässt sich ein Anstieg der VRE-Isolate unter den Blutstrominfektionen von 4,91 % auf 12,99 % verzeichnen, bei den postoperativen Wundinfektionen von 0,87 % auf 4,58 % (Gastmeier et al., 2014).

Die rasante Verbreitung von VRE hängt vor allem mit dem massiven Einsatz von Antibiotika – im Speziellen Vancomycin - in der Tierzucht aber auch in der Humanmedizin zusammen. Als weiterer Faktor spielt die Übertragung von (Haus-) Tieren eine Rolle. Besonders Schweine- und Hühnerfleisch stehen im Verdacht, als Übertragungsreservoir zu dienen (Bates et al., 1994).

Als eine Ursache für die rasante Verbreitung von VRE geriet der Einsatz von Avoparcin in der Tierhaltung in Verdacht (Klare et al., 1995; McDonald, 1997). Avoparcin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum, das in Europa von 1975 bis 1996 als Futterersatzstoff zugelassen war (Hammerum et al., 2010). Es wurde vor allem in der Mast von Geflügel, Schwein, Kälbern und Rind eingesetzt (BgVV, 1996).

Die Substanz ist in der Lage, Glykopeptid-resistente Enterokokken zu selektieren. In Ländern, in denen Avoparcin in der Landwirtschaft eingesetzt wurde, wurden vermehrt VRE in Geflügel- und Schweinefleisch gefunden (Klare et al., 1995). Tatsächlich konnten Bates et al. zeigen, dass in Tierkadavern VRE mit ähnlichen Ribotypen wie beim Menschen nachgewiesen werden können (Bates et al., 1993) und somit das tierische Reservoir vermutlich Ausgangspunkt für die Verbreitung in die menschliche Population darstellt. Die Übertragung von VRE auf den Menschen erfolgt hierbei mutmaßlich über die Nahrungskette (Bates et al., 1994; Klare et al., 1995). Die Verbreitung wurde möglicherweise auch dadurch vorangetrieben, dass VRE in Futtermitteln für die Geflügel- und Schweinemast enthalten waren, und hierdurch die Kolonisation von Masttieren massiv verstärkt wurde (Klare et al., 1995). Nach dem Verbot des Einsatzes von Avoparcin 1996 in Deutschland (BgVV, 1996) und 1997 in ganz Europa sank die Zahl VRE-besiedelter Nutztiere (Bager et al., 1999; Klare et al., 1999). Gleichzeitig konnte auch ein Rückgang der VRE-Rate in der menschlichen Population beobachtet werden (Klare et al., 1999).

Die Ausbreitung von VRE alleine auf die Selektion entsprechender Stämme in der Tiermast zurückzuführen, wird jedoch den komplexen Verbreitungswegen nicht gerecht. So wurde in den USA und in Kanada eine Ausbreitung von VRE beobachtet obwohl kein Avoparcin in der Tiermast verwendet wurde (McDonald, 1997). Dort konnten bis 2008 auch keine mit VRE besiedelten Nutztiere gefunden werden. Ebenso zeigten Studien, dass eine Besiedlungen beim Menschen außerhalb des klinischen Kontextes nicht auftrat (Coque et al., 1996). Donabedian et al. beschrieben 2010 erstmals Vancomycin-resistente Enterokokken vom *high-level*-Typ in Nutztieren in den USA. Das Erregerreservoir scheint hier folglich anderen Ursprungs und auf den hospitalisierten Bereich konzentriert zu sein (Donabedian et al., 2010).

Enterokokken können erworbene Resistenzen an andere Bakterien weitergeben, zum Beispiel an Staphylokokken. So wurde im Jahre 2002 erstmals ein VRSA beschrieben, ein MRSA, der ebenfalls eine Vancomycin-Resistenz erworben hat (Noble et al., 1992; Chang et al., 2003; Miller et al., 2002). Die Prävalenz von

VRSA ist seitdem zunehmend, wenn auch vergleichsweise gering. Betroffene Patienten waren in der Regel schwer chronisch krank und wiesen in der Vorgeschichte bereits positive VRE und MRSA-(Ko-)Besiedlungen oder -Infektionen auf. Außerdem hatten sie Vancomycin und Penicilline erhalten. In der Regel sind VRSA-Resistenzen *vanA*-vermittelt. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Sievert et al., 2008).

Resistenzen von Enterokokken gegenüber Linezolid wurden bisher nur selten beschrieben; das NRZ registriert jedoch eine zunehmende Anzahl an Einsendungen Linezolid-resistenter Stämme, die zumeist Glykopeptid-sensibel sind. 2014 fanden sich bei *vanA*-positiven *E. faecium*-Stämmen Resistenzraten von 10,2 % gegenüber Linezolid und bei *vanB*-positiven *E. faecium* Resistenzraten von 3,8 % gegenüber Quinupristin/Dalfopristin. Die Gesamtresistenzrate gegenüber Linezolid lag bei allen an das NRZ eingesandten *E. faecium*-Isolaten in 2014 bei 12 % (Robert-Koch-Institut, 2015). Als Mechanismus, der zu einer abnehmenden Empfindlichkeit gegenüber Linezolid führt, wird eine Mutation in der 23S sRNA angenommen. Einige *E. faecalis*-Stämme sind in der Lage eine *Cfr*-Methyltransferase zu exprimieren, welche auch die Linezolid-Resistenz von *S. aureus* vermittelt (Toh et al., 2007).

1.2.4 Molekulare Grundlagen der Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken

Vancomycin-resistente Enterokokken unterscheiden sich in phänotypischen und genotypischen Merkmalen. Bisher sind mit *VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE* und *VanG* sechs verschiedene *van*-Phänotypen und acht verschiedene -Genotypen (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*) bekannt (Courvalin, 2006). Von diesen besitzen jedoch nur *vanA* und *vanB* klinische Relevanz (Courvalin, 2006; Werner et al., 2012). Der *vanA*-Phänotyp ist der zuerst beschriebene und gleichzeitig der häufigste Phänotyp. Er verursacht eine *high-level*-Kreuzresistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin. Es konnte beobachtet werden, dass die Häufigkeit der Vancomycin-Resistenz bei *E. faecium* stärker zugenommen hat als die der Teicoplanin-Resistenz. Dies steht möglicherweise in Zusammenhang mit dem zunehmenden Auftreten *vanB*-positiver Stämme (Klare et al., 2012b).

Die intrinsisch-resistenten *vanC*-Genotypen, die bei *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* vorkommen, scheinen in der Regel kaum mit Ausbrüchen assoziiert zu sein und bedürfen somit keiner Isolation kolonisierter Patienten (Sutter et al., 2010).

Die *van*-Gene kodieren für Ligasen, die die Zellwandbiosynthese von Enterokokken verändern und damit zur Vancomycin-Resistenz führen. Im Rahmen der Zellwandbiosynthese von Enterokokken werden durch Ligasen zwei Moleküle D-Alanin zu einem Dipeptid verbunden. Dieses wird in einem weiteren Schritt an ein Uracil-Diphosphat-N-Acetylmuramin-Tripetid geknüpft, sodass ein Pentapeptid entsteht. Das Pentapeptid wird in weiteren Zwischenschritten modifiziert und mithilfe eines Lipidcarriers an die äußere Oberfläche der Zellwand transportiert. Dort kann die Transglykosylierung erfolgen und es entstehen über Transpeptidation Brücken zu benachbarten Seitenketten. Dieser Prozess sorgt für Stabilität der Zellwand (Reynolds, 1989).

Vancomycin bindet an die zur Quervernetzung benötigten C-terminalen D-Alanin-D-Alanin-Enden der Pentapeptidseitenketten. Durch das Ausbleiben der Transpeptidation wird die Zellwand instabil und es kommt zur Lyse des Bakteriums (Stahlmann und Lode, 2013)

Die *van*-Gene Vancomycin-resistenter Enterokokken kodieren nun verschiedene Ligasen, die zur Entstehung modifizierter Peptidseitenketten im Rahmen der Zellwandbiosynthese führen (Werner et al., 2008). Die Expression von *vanA*, *vanB* und *vanD* vermittelt hierbei die Synthese eines Pentapeptids, welches am freien Ende nicht durch D-Alanin-D-Alanin sondern durch D-Lactat-D-Alanin gekennzeichnet ist. Bei *vanC*, *vanE* und *vanG* werden anstelle der D-Alanin-D-Alanin D-Alanin-D-Serin-Enden synthetisiert. Diese Modifikation verhindert, dass Vancomycin und Teicoplanin binden können (vergleiche Abbildung 3).

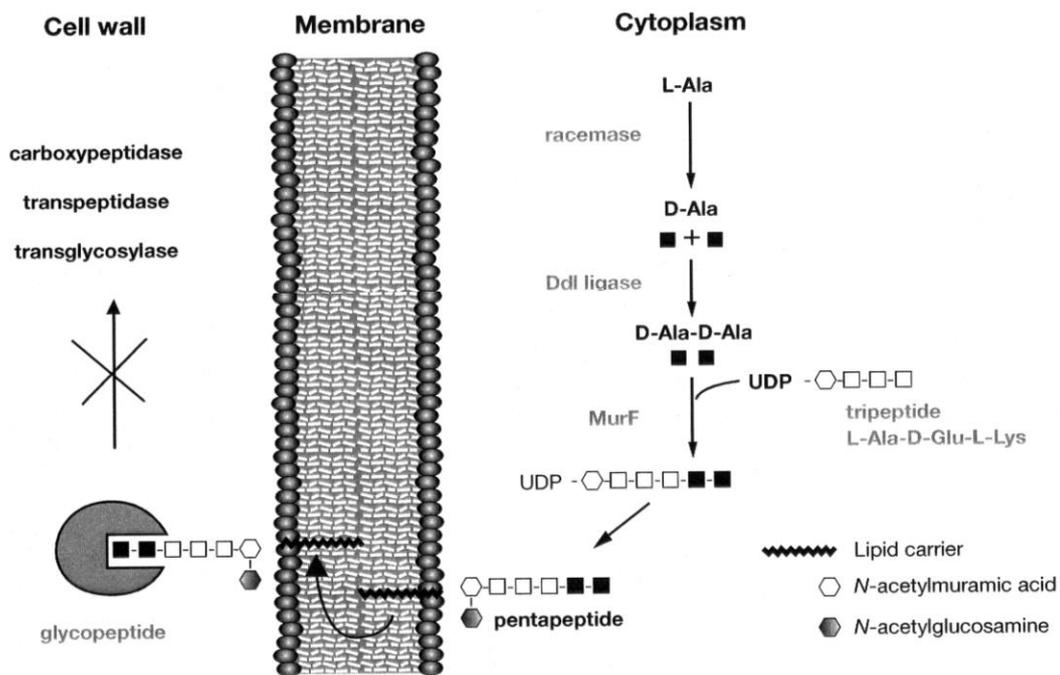


Abbildung 3: Peptidoglykan-Biosynthese und Mechanismus der Vancomycin-Resistenz (Courvalin, 2006).

Bei *vanC*, *vanE* und *vanG* kommt es durch die Modifikation der Seitenketten zur Entstehung von *low-level*-Resistenzen. Für D-Alanin-D-Lactat-Enden sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Seitenkette und dem Rest des Moleküls noch schwächer ausgeprägt. Daher kommt es bei *vanA*, *vanB* und *vanD* zur Ausbildung von *high-level*-Resistenzen. Die *high-level*-Resistenzen vom *vanA*-Phänotyp stellen sich in der Regel durch $MHK_{VA} > 64$ mg/l dar, während die MHK_{VA} für *vanB*-Phänotypen stark variieren und auch durchaus im niedrigen Bereich von 16–32 mg/l liegen können (Arthur et al., 1996; Courvalin, 2006; Cattoir und Leclercq, 2012). Es treten sogar *E. faecium*-Stämme auf, die das *vanB*-Gen aufweisen, jedoch MHK_{VA} im Bereich von nur 1–2 mg/l aufweisen und somit im empfindlichen Bereich anzusiedeln sind (Klare et al., 2012b). *vanB*-Phänotypen weisen ausschließlich eine Resistenz gegenüber Vancomycin auf, ebenso *vanE*-Phänotypen, bei denen die Resistenz jedoch schwächer ausgeprägt ist. Der *vanD*-Phänotyp zeichnet sich durch eine mäßige Resistenz gegenüber Vancomycin und Teicoplanin aus (Depardieu et al., 2003b). Der *vanC*-Phänotyp, der sich bei den Spezies *E. gallinarum* und *E. flavescens* / *E. casseliflavus* finden

lässt, zeichnet sich durch eine intrinsische, ausschließlich chromosomal kodierte Resistenz gegenüber Vancomycin und Teicoplanin aus, die schwächer ausgeprägt ist als jene vom *vanA/B*-Phänotyp ($MHK_{VA} = 2\text{--}32 \mu\text{g/ml}$) (Leclercq et al., 1992). *vanA*- und *vanB*- Typen können chromosomal oder plasmid-kodiert vorliegen. Beim *vanA*-Typ liegt jedoch meist eine Plasmid-Kodierung auf dem Transposon Tn1546 vor (Arthur et al., 1996; Quintiliani und Courvalin, 1996; Werner et al., 1997). Der *vanB*-Typ ist häufiger chromosomal-kodiert und liegt auf den Transposons Tn1547, Tn1549, Tn5382 (Arthur et al., 1993; Quintiliani und Courvalin, 1996; Rice, 2008). Plasmid-kodierte Resistenzen können durch Konjugation übertragen werden (Rice et al., 1998; Courvalin, 2006).

vanD (Depardieu et al., 2003b), *vanC* (Leclercq et al., 1992), *vanE* (Patino et al., 2002) und *vanG* (Depardieu et al., 2003a) liegen chromosomal kodiert vor. Sie werden nicht durch Konjugation übertragen (Depardieu et al., 2004). Die Resistenzgene werden in Anwesenheit von Glykopeptidantibiotika nach ATP-abhängiger Phosphorylierung mittels des VanS/VanR-Signaltransduktionssystems exprimiert. VanS fungiert dabei als membranständiger Sensor für N-Termini von Glykopeptiden. Es leitet als Histidin-Kinase in deren Anwesenheit die Autophosphorylierung ein und überträgt einen Phosphatrest auf VanR. In Abwesenheit von Glykopeptiden dephosphoryliert es dieses. VanR wiederum fungiert als zytoplasmatischer Aktivator der Transkription der Resistenzgene (Arthur et al., 1992; Arthur et al., 1997).

Tabelle 2: Übersicht über Genotypen und Charakteristika der Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken (Robert-Koch-Institut, 2010).

Phäno- typ	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanC
Resis- tenz	erworben					natürlich
MHK _{VA} (mg/ml)	8–1000	4–1000	64–128	8–32	16	2–32
MHK _{TP} (mg/ml)	4–512	0,5–1	0,25–64	0,5	0,5	0,5–1
Lokalisa- tion	Plasmid/ Chromo- som	Plasmid/ Chromo- som	Chromo- som	Chromo- som	Chromo- som	Chromo- som
Mobiles Element	Tn1546	Tn1547, Tn1549, Tn5382	(?)*	(?)*	(?)*	(?)*
Ligase- Gen	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>	<i>vanC</i>
Ligase- Produkt	D-Ala-D- Lac	D-Ala-D- Lac	D-Ala-D- Lac	D-Ala-D- Ser	D-Ala-D- Ser	D-Ala-D- Ser
Entero- kokken- spezies	<i>E. fae- cium</i> <i>E. faeca- lis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallina- rum</i> <i>E. cas- seli- flavus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffino- sus</i>	<i>E. fae- cium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallina- rum</i> <i>E. casse- liflavus</i>	<i>E. fae- cium</i> <i>E. fae- calis</i> <i>E. raffi- nosus</i>	<i>E. fae- calis</i>	<i>E. fae- calis</i>	<i>E. gallina- rum</i> <i>E. cas- seliflavus</i>

* nicht bekannt

1.2.5 Kolonisation und Übertragung Vancomycin-resistenter Enterokokken beim Menschen

Beim gesunden Individuum ist die Enterokokken-Konzentration im Darm in der Regel gering. Ein wesentlicher Risikofaktor für die Besiedlung mit VRE ist die Gabe von Antibiotika mit einer Enterokokken-Lücke (zum Beispiel Cephalosporine, Fluorchinolone) (Montecalvo et al., 1994; Bonten et al., 1996; Almyroudis et al., 2011). Aber auch die Gabe anderer Antibiotika wie zum Beispiel Meropenem kann die Kolonisation durch VRE begünstigen: Ist die physiologische Darmflora

sensibel gegen die eingesetzten Antibiotika, wird sie durch diese abgetötet (Donskey et al., 2000; Taur et al., 2012). Es entstehen Nischen, in denen sich beispielsweise VRE ansiedeln können. Dies führt zu einer Überwucherung des Darms durch (multiresistente) Enterokokken (McDonald, 1997). Brandl et al. beschrieben in diesem Zusammenhang im Mausmodell RegIIIg, ein C-Typ-Lektin, das Gram-positive Bakterien, eingeschlossen VRE, abtötet. Stimuliert wird seine Expression durch Lipopolysaccharide und Flagellin Gram-negativer Bakterien. Antibiotika senken durch Reduktion der Konzentration Gram-negativer Bakterien die Expression von RegIIIg. Dies führt zu erhöhten Konzentrationen Gram-positiver Erreger in der Darmflora und begünstigt VRE-Besiedlungen (Brandl et al., 2008; Kinnebrew et al., 2010). Des Weiteren können auch Medikamente mit immunsuppressiver Wirkung und Chemotherapeutika die Besiedlung des Darmes mit VRE begünstigen (Montecalvo et al., 1994; Weinstock et al., 2007).

Ein relevanter Anteil von Patienten weist schon bei Krankenhausaufnahme eine Besiedlung mit VRE auf (Wendt et al., 1999). Solche Besiedlungen persistieren meist Wochen bis Monate (Sohn et al., 2013; Haverkate et al., 2014). Daher stellen unerkannte, enteral besiedelte Patienten im Krankenhaus ein Haupterregerreservoir für VRE-Besiedlungen und -Infektionen dar (Teixeira et al., 2011). Risikofaktoren für eine schon zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme bestehende VRE-Besiedlung sind neben der vorangegangenen Antibiotikatherapie (Montecalvo et al., 1994) vorangegangene Krankenhausaufenthalte (Tacconelli et al., 2004), Heimunterbringung (Elizaga et al., 2002), chronische Hämodialyse, Alter >60 Jahre und vorherige Besiedlung mit MRSA (Tacconelli et al., 2004).

VRE können im Rahmen der Hospitalisation von Patient zu Patient übertragen werden. Eine Übertragung wird begünstigt durch die Fähigkeit von Enterokokken, auf Händen, Handschuhen und Oberflächen wie zum Beispiel Betten und Stethoskopen mindestens 60 Minuten, jedoch auch bis zu mehreren Tagen zu überleben (Noskin et al., 1995). Die Übertragung geschieht meist durch medizinisches Personal, kontaminierte Oberflächen oder direkten Kontakt (Bonten et al., 1996; Teixeira et al., 2011). Das Risiko einer VRE-Übertragung bei Kontakt ist derzeit

nicht klar abzuschätzen. Mutters et al. zeigten 2013, dass die VRE-Übertragungsrates von besiedelten Patienten auf Mitpatienten gering ist. Die Länge der Kontaktzeit korreliert hierbei positiv mit der Übertragungsrates (Mutters et al., 2013a). Nichtsdestotrotz konnten klare Risikofaktoren für eine VRE-Übertragung gefunden werden. Hierzu zählen lange Krankenhausaufenthalte, schwere Grunderkrankungen, große chirurgische Eingriffe besonders im Abdominal- oder Thorakalbereich oder hohe Prävalenzen von VRE in räumlicher und pflegerischer Nähe des Patienten (Wendt et al., 1998; Klare et al., 2012a).

1.2.6 Infektionen durch Vancomycin-resistente Enterokokken im Kollektiv stammzelltransplantierter Patienten

Die Häufigkeit des Auftretens von VRE-Infektionen variiert stark mit der Art des Krankenhauses, den unterschiedlichen Abteilungen, sowie der Höhe des Selektionsdruckes durch den Einsatz von Antibiotika. Dieser ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen (Behnke et al., 2013). Ältere Patienten (vor allem solche >60 Jahre), Patienten unter Immunsuppression, Patienten mit schweren Grunderkrankungen, Neu- und Frühgeborene sind wesentliche Risikogruppen für Infektionen durch VRE (Murray, 1990; Werner et al., 2008). Weitere Risikogruppen sind Patienten nach Transplantation solider Organe, zum Beispiel Lebertransplantation (McNeil et al., 2006; Russell et al., 2008), intensivmedizinisch betreute Patienten und hämatologisch-onkologische Patienten, besonders nach allogener Stammzelltransplantation (Avery et al., 2005). Die Neutropenie stellt in dieser Patientengruppe einen signifikanten Risikofaktor für Infektionen mit VRE dar (DiazGranados und Jernigan, 2005b).

Eine bestehende Besiedlung mit VRE ist der Hauptrisikofaktor für eine Infektion (McNeil et al., 2006). Bis zu 34 % der besiedelten Patienten entwickeln nach allogener Stammzelltransplantation eine Blutstrominfektion mit VRE. Bei nicht-besiedelten Patienten wird dieser Erreger nur bei bis zu 2 % der Blutstrominfektionen gefunden (Weinstock et al., 2007). In einer Studie fand sich bei einem Drittel der allogenen Stammzelltransplantierten eine VRE-Besiedlung. Ein Drittel dieser Patienten entwickelte eine VRE-Sepsis und wiederum ein Drittel starb im Verlauf

an einer Enterokokkenseptikämie (Weinstock et al., 2007). Inwiefern VRE-Infektionen die direkte Todesursache oder vielmehr einen negativen prognostischen Marker darstellen, ist aktuell unklar (Avery et al., 2005). Jeder sechste Patient unter allogener Stammzelltransplantation entwickelt im Laufe eines Jahres eine Bakteriämie mit VRE. Satlin et al. wiesen VRE mit 19 % als den häufigsten Erreger von Blutstrominfektionen bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (HSCT) nach. Bei Patienten nach autologer HSCT stellten sie nach *S. viridans*, *K. pneumoniae* und *E. coli* (je 17%) den vierthäufigsten Erreger (10 %) (Weinstock et al., 2007; Satlin et al., 2014).

Blutstrominfektionen durch VRE treten in der Regel nur bei solchen Patienten auf, die im Vorfeld Breitspektrum- β -Laktam-Antibiotika wie Meropenem oder Piperacillin/Tazobactam erhalten haben. Eine Studie konnte bei 32 (55 %) von 58 Blutstrominfektionen unter neutropenen Patienten mit antibiotischer Vorbehandlung VRE als Erreger nachweisen. Zudem gehen durch VRE verursachte Blutstrominfektionen bei neutropenen Patienten mit einem schlechten Outcome einher. So erlitten in derselben Studie 12 % der Patienten in der Folge einen septischen Schock. Die Mortalität lag mit 18 % weitaus höher als jene bei Patienten mit Staphylokokken-Bakteriämie (0 %). Patienten unter VRE-wirksamer antibiotischer Therapie erlitten keine Blutstrominfektionen durch VRE (Satlin et al., 2014).

1.3 Diagnostik von VRE

1.3.1 Kultur-basierte Screeningverfahren

In der Diagnostik von Vancomycin-resistenten Enterokokken werden Selektivnährmedien eingesetzt. Diese enthalten in der Regel unterschiedliche Konzentrationen spezifischer Antibiotika und weitere Bestandteile, die das Wachstum unerwünschter Bakterienspezies hemmen. Zusätzlich machen sie sich Eigenschaften von Enterokokken zunutze, die eine morphologische Detektion ermöglichen. Dies geschieht zum Beispiel durch eine spezifische Färbung der Bakterienkolonien. Bei diesen Selektiv-Indikatormedien nutzt man die Fähigkeit von

Enterokokken, Äskulin zu hydrolysieren, sowie die Expression von Glucosidasen und Galaktosidasen.

In dieser Arbeit wurde der Äskulin-basierte VRE-Selektivnährboden der Firma Oxoid evaluiert. Dieser wird aktuell als Routine-Screening-Medium in der Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene eingesetzt. Als weitere Screeningmedien wurden die beiden neueren chromogenen Selektiv-Indikatormedien chromID VRE Agar und Brilliance VRE Agar untersucht.

Der VRE-Selektivnährboden enthält 6 mg/l Vancomycin und nutzt zur Detektion von Enterokokken deren Fähigkeit, das Glucosid Äskulin in Glucose und Äskuletin umzusetzen. Dieses Hydrolyse-Produkt bildet Komplexe mit ebenfalls im Agar enthaltenen Eisenionen und führt so zu einer schwarzen Färbung der Agars. Vancomycin-resistente Enterokokken erscheinen als runde, grau-bräunliche Kolonien mit circa 1 mm Durchmesser und umgebender schwarzer Zone. Eine farbliche Differenzierung der Spezies *E. faecium* und *E. faecalis* ist auf diesem Agar nicht möglich.

Der Brilliance VRE Agar macht sich zur Detektion von VRE deren Besitz von Phosphatase und α -Galactosidase zu Nutze. Treten diese Enzyme in Kontakt mit den im Agar enthaltenen Farbstoff-Vorstufen, entstehen je nach Spezies verschiedenfarbige Kolonien. Die in beiden Enterokokkenspezies enthaltene Phosphatase sorgt für eine blau-türkise Koloniefärbung. *E. faecium* exprimiert zusätzlich die α -Galactosidase, welche ihnen auf dem Agar eine violette Färbung verleiht. Über die enthaltene Vancomycin-Konzentration wird vom Hersteller keine Angaben gemacht.

Der chromID VRE Agar enthält zwei Farbstoff-bildende Substrate, die durch die von Enterokokken exprimierte α -Glucosidase und β -Galaktosidase gespalten werden. *E. faecalis* erscheint dabei als bläulich-türkise Kolonie, *E. faecium* nimmt eine violette Farbe an. Zusätzlich zu 8 mg/l Vancomycin enthält der Agar weitere Stoffe, die neben den meisten Gram-positiven und Gram-negativen Erregern, Hefen und Schimmelpilzen auch das Wachstum natürlich resistenter Enterokokken wie *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* unterdrücken.

1.3.2 Molekulargenetische Screeningmethoden

Der beschriebene kulturelle Nachweis von VRE ist zeit- und arbeitsaufwändig. Deshalb kommen in der Diagnostik von VRE zusätzlich molekulargenetische Methoden zum Einsatz, zum Beispiel die Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Die PCR ist eine enzymatische in-vitro-Replikation, die den Nachweis bestimmter Gensequenzen, so zum Beispiel der Resistenzgene *vanA*- oder *vanB*, ermöglicht. Die PCR wurde 1993 durch Kary Mullis entwickelt (Mullis und Faloona, 1987). Die Amplifikations-Zyklen dauern nur wenige Minuten, sodass bereits nach bis zu drei Stunden ein Ergebnis vorliegen kann. Beim kulturellen Nachweis sind es 24–72 Stunden. Lee et al. entwickelten die herkömmliche PCR weiter zur *real-time-PCR*, welche es neben dem Vorteil der Zeitersparnis ermöglicht, eine Aussage über die Anzahl der Gen-Kopien in einer Probe zu treffen (Lee und Bloch, 1993).

Zum Einsatz der *real-time-PCR* in der Diagnostik von VRE ist in der Literatur Unterschiedliches beschrieben: PCR-basierte Tests können die Detektionszeit von VRE deutlich verkürzen (Fang et al., 2011). Es konnten Übereinstimmungen zwischen PCR und Kulturbefund von bis zu 90,2 % gezeigt werden. Geringe Abweichungen werden häufig zugunsten der deutlichen Zeitersparnis in Kauf genommen. Bisher wird der Einsatz der *van*-PCR allerdings meist zusätzlich zum kulturellen Nachweis oder als sogenanntes Prä-Screening empfohlen. Die Sensitivität der PCR unterliegt meist der des kulturellen Nachweises. Zudem werden durch die PCR mehr falsch-positive Proben detektiert. Dies spielt besonders bei *vanB*-positiven Enterokokken eine Rolle. Hier sind sehr niedrige *Positive Predictive Values (PPV)* beschrieben, da *van*-Gene nicht ausschließlich in Enterokokken vorkommen. Besonders Anaerobier wie Clostridien stellen ein Reservoir für *vanB*-Gene dar und können diese auch auf intestinale Enterokokken übertragen. Dies hat zur Konsequenz, dass die Spezifität der *vanB*-PCR in der Regel geringer ausfällt als die der *vanA*-PCR. Für diesen Genotyp ist ein kultureller Nachweis somit nach wie vor unerlässlich, um nicht fälschlicherweise zu viele Patienten zu isolieren oder zu therapieren. Aktuell bestehen weitere Bestrebungen, die PCR so zu optimieren, dass sie den Kulturbefund ablösen kann (Roger et al., 1999; Mak et al., 2009; d’Azevedo et al., 2009).

1.4 Typisierung von Enterokokken mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse von bakteriellen Isolaten wird in der klinischen Diagnostik die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese verwendet. Die PFGE trennt die bakterielle DNA in Fragmente auf. Anhand des entstandenen Bandenmusters kann auf Verwandtschaft verschiedener Isolate geschlossen werden. Dies spielt besonders in der Ausbruchsdagnostik eine Rolle.

Zum Restriktionsverdau von Enterokokken wird das Enzym *Sma*I verwendet, das die DNA in durchschnittlich 15-20 Fragmente der Größe 5-400 kb aufspaltet. Je mehr Veränderungen im Genom vorliegen, desto unterschiedlicher sind dabei die Bandenmuster und eine klonale Verwandtschaft zweier Isolate wird unwahrscheinlicher.

Eine gängige Empfehlung zur Interpretation der Bandenmuster stellen die Tenover-Kriterien dar. Sie gelten als vereinheitlichter Bewertungsmaßstab, der ohne zusätzliche digitale Hilfsmittel eine optische Auswertung ermöglicht. Tenover unterscheidet dabei vier Kategorien, die die Beziehung eines Isolates zu einem Ausgangsisolat beschreiben. Vergleicht man die Bandenmuster zweier Isolate miteinander und zeigen sich dabei keine Unterschiede in der Anzahl und Größe der Banden, ist davon auszugehen, dass die Isolate genetisch nicht voneinander verschieden sind. Unterscheiden sich die Bandenmuster zweier Isolate um zwei oder drei Banden, ist von einer einzelnen genomischen Veränderung auszugehen. In diesem Fall sind die Isolate nah miteinander verwandt. Liegen vier bis sechs Bandenunterschiede vor, ist es zu zwei genomischen Veränderungen gekommen. Eine Verwandtschaft ist noch möglich. Bei einer Differenz >6 in der Anzahl der Bandenunterschiede gelten die Isolate als nicht verwandt; hier sind >2 genomische Veränderungen anzunehmen (vergleiche Tabelle 3).

Mögliche molekulargenetische Veränderungen stellen die Punktmutation, Insertion und Deletion dar. Bei einer Punktmutation wird eine Base der DNA gegen eine andere ausgetauscht. Dies kann über Entstehung zusätzlicher oder Wegfall vorhandener Restriktionsschnittstellen zur Verlängerung oder Verkürzung von DNA-Fragmenten führen und somit schmalere oder breitere Banden erzeugen.

Entsteht durch Punktmutation eine neue Schnittstelle, findet sich im Isolat des mutierten Stammes eine zusätzliche Bande. Eine Insertion stellt das Einfügen einer zusätzlichen Base in die DNA dar, bei einer Deletion geht eine solche verloren. Insertion führt bei gleicher Zahl von Fragmenten im Bandenmuster zum Verlust eines kleinen Fragmentes bei gleichzeitiger Schaffung eines neuen, größeren Fragmentes. Deletion in der DNA zeigt sich im Bandenmuster verglichen mit dem Ausgangsisolat hingegen durch ein neu entstandenes kleineres Fragment und den Verlust eines größeren Fragmentes.

Tenover et al. empfehlen für eine auswertbare PFGE ein Bandenmuster mit mindestens 10 unterschiedlichen DNA-Fragmenten (Tenover et al., 1995).

Tabelle 3: Tenover-Kriterien zur Interpretation von PFGE-Bandenmustern (Tenover et al., 1995).

Kategorie	Anzahl Bandenunterschiede verglichen mit dem Ausgangsisolat	Anzahl genetischer Unterschiede verglichen mit dem Ausgangsisolat	Interpretation des Verwandtschaftsgrades
identisch	0	0	Isolat ist Teil des Ausbruchs
nahe Verwandtschaft	2–3	1	Isolat ist wahrscheinlich Teil des Ausbruchs
mögliche Verwandtschaft	4–6	2	Isolat ist möglicherweise Teil des Ausbruchs
Verwandtschaft unwahrscheinlich	>7	>3	Isolat ist nicht Teil des Ausbruchs

1.5 Therapie von Enterokokkeninfektionen

Die Infectious Disease Society of America zählt *E. faecium* zu den sogenannten ESKAPE-Pathogenen (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* und Enterobakterien), die neuer Formen antibiotischer Therapie bedürfen (Rice, 2008). Therapiert werden ausschließlich Infektionen mit VRE. Für die flächendeckende antibiotische Sanierung intestinaler Kolonisation gibt es bisher keine Evidenz (Mutters et al., 2013b; Cheng et al., 2014).

Enterokokken-Infektionen werden häufig mit einer Kombinationstherapie aus Aminopenicillin (Ampicillin, Amoxicillin) und einem Aminoglykosid-Antibiotikum (Gentamicin, Streptomycin) behandelt und dabei deren synergistische Wirkung genutzt. Das β -Laktam-Antibiotikum schädigt die Zellwand der Kokken, sodass das Aminoglykosid eindringen, an der 30S-Untereinheit des Ribosoms ansetzen und dort die Translation behindern kann. Liegen Resistenzen gegen eine dieser Antibiotikaklassen vor, kommt es zum Versagen des synergistischen Effektes der Kombinationstherapie. Als Alternative werden dann in der Regel Glykopeptidantibiotika eingesetzt. Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse stellen Vancomycin und Teicoplanin dar. Sie greifen in die Zellwandbiosynthese von Bakterien ein, indem sie die Peptidoglykanquervernetzung hemmen (vergleiche Kapitel 1.2.4). Beide galten lange als Reserveantibiotika, sodass das Auftreten dieser Resistenzen eine große Gefahr für die erfolgreiche Therapie der Erreger darstellt.

Seit den Neunzigerjahren konnten nur zwei neue Antibiotika gegen VRE entwickelt werden: 1999 Quinupristin/Dalfopristin und 2000 das Oxazolidinon Linezolid. Quinupristin/Dalfopristin, welche die Proteinbiosynthese durch Blockade der 50S-Untereinheit inhibieren, sind dabei ausschließlich gegen *E. faecium* wirksam. Seit 2007 sind sie in Deutschland nicht mehr zur Therapie verfügbar. Linezolid inhibiert die Bildung des 70S-Initiationskomplexes am Ribosom und verhindert dadurch die Translation (Stahlmann und Lode, 2013).

Auch das Tetracyclinderivat Tigecyclin und das Lipopeptid Daptomycin werden in der VRE-Therapie als Reserveantibiotika eingesetzt. Daptomycin hat eine bakterizide Wirkweise, indem es Kalium-Kanäle in die Zellmembran der Bakterien

einbaut. Der vermehrte Kalium-Ausstrom führt dann zum Absterben der Zellen (Arias und Murray, 2012).

Zurzeit sind Linezolid und Daptomycin die am häufigsten gegen Blutstrom-Infektionen mit VRE eingesetzten Antibiotika. Aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils, wie zum Beispiel der myelosuppressiven Wirkung von Linezolid, werden sie jedoch nicht zur Prophylaxe empfohlen (Weinstock et al., 2007).

1.5.1 Glykopeptidantibiotika

Vancomycin gehört zur Gruppe der Glykopeptidantibiotika und wird aus *Streptomyces orientalis* gewonnen. Seit 1980 wird es in der antiinfektiösen Therapie von Gram-positiven Erregern verwendet. Gegen Gram-negative Erreger sind Glykopeptide nicht wirksam, da sie aufgrund ihrer Molekülgröße die äußere Bakterienmembran nicht durchdringen können. Vancomycin wird vor allem zur Therapie von MRSA, Ampicillin-resistenten Enterokokken und bei durch *C. difficile* verursachter pseudomembranöser Enterokolitis eingesetzt. Es ist außerdem wirksam gegen Streptokokken und Gram-positive anaerobe Kokken, Listerien und Corynebakterien.

Vancomycin hemmt den Zellwandaufbau und wirkt damit bakterizid. Es bindet an die C-terminalen D-Ala-D-Ala-Enden der Pentapeptidseitenketten, die zur Quervernetzung des Peptidoglykangerüsts benötigt werden. Durch den Verlust dieser Bausteine wird die Zellwand instabil und es kommt zur Lyse des Bakteriums (Stahlmann und Lode, 2013).

EUCAST definiert eine Vancomycin-Resistenz bei Vorliegen einer MHK_{VA} von >4 mg/l. CLSI beschreibt zusätzlich einen intermediären Bereich (8–16 mg/l). Eine Unempfindlichkeit liegt laut CLSI erst bei einer $MHK_{VA} >32$ mg/l vor.

Teicoplanin stellt einen weiteren wichtigen Vertreter der Glykopeptidantibiotika dar. 1988 wurde es in Deutschland zur antibiotischen Therapie zugelassen. Es wird aus *Actinoplanes teichomyceticus* gewonnen und hemmt den Zellwandaufbau auf gleiche Weise wie Vancomycin. Es gelten die gleichen Therapieindikationen wie beim Vancomycin. Durch stärkere Proteinbindung besitzt Teicoplanin

jedoch eine etwa zehnfach höhere Halbwertszeit. Teicoplanin wird ebenso wie Vancomycin mit Ausnahme zur Therapie der pseudomembranösen Enterokolitis intravenös verabreicht. Es besitzt ein günstigeres Nebenwirkungsprofil als Vancomycin. Für die Teicoplanin-Empfindlichkeit gelten Minimale Hemmkonzentrationen <2 mg/l nach EUCAST (Trautmann et al., 1994; Stahlmann und Lode, 2013).

1.5.2 Linezolid

Das Antibiotikum Linezolid gehört zur Gruppe der Oxazolidinone und wurde erstmals 1987 beschrieben. Linezolid hat eine bakteriostatische Wirkweise. Es bindet an die A-Position der Peptidyltransferasestelle der 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms und verhindert damit die Bildung des Initiationskomplexes der Translation.

Linezolid wird zur Therapie von durch Gram-positive Erreger verursachten Pneumonien eingesetzt, ebenso wie bei Haut- und Weichteilinfektionen durch Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken. Die Therapie erfolgt oral oder intravenös. *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden weisen natürliche Resistenzen gegen Linezolid auf. Für die Linezolid-Empfindlichkeit sind durch EUCAST Grenzwerte von $MHK_{LZ} <4$ mg/l beschrieben (Stahlmann und Lode, 2013).

1.5.3 Daptomycin

Daptomycin gehört zur Gruppe der zyklischen Lipopeptide und wird aus *Streptomyces roseosporus* gewonnen (Baltz, 2010). Es hat eine bakterizide Wirkweise, indem es an die Zytoplasmamembran der Bakterien bindet und Kaliumionenkanäle in diese einbaut. Der resultierende Kaliumefflux führt zur Membrandepolarisation und Dysfunktion der Protein-, DNA-, und RNA-Synthese. Schließlich tritt der Zelltod ein.

Daptomycin wird in der Therapie Gram-positiver Erreger eingesetzt und ist auch gegen solche Bakterien wirksam, die Resistenzen gegenüber β -Laktam-Antibiotika, Vancomycin und Linezolid aufweisen. Seit 2006 ist es in Deutschland zuge-

lassen. Übliche Therapieindikationen sind komplizierte Haut- und Weichteilinfektionen und durch *S. aureus* verursachte Endokarditiden (Rybak, 2006; Dohmen et al., 2012; Hoen und Duval, 2013). In der Lunge wird Daptomycin durch Surfactant inaktiviert, was zu einer unzureichenden Wirkung bei der Behandlung respiratorischer Erkrankungen führt.

In der Therapie von Enterokokkeninfektionen spielt der Einsatz von Daptomycin eine zunehmende Rolle. Retrospektive Studien konnten eine Erfolgsrate von 87–90% in der Therapie von VRE-Bakteriämien zeigen (Mohr et al., 2009). Aufgrund der unzureichenden Datenlage liegen jedoch zahlreiche Anwendungsbeschränkungen für Daptomycin vor (Rote Liste, 2016). In der Literatur sind bereits Fälle beschrieben, in denen eine Abnahme der Sensibilität gegenüber Daptomycin - meist unter einer Therapie mit diesem - beobachtet wurde (Munoz-Price et al., 2005; Lellek et al., 2015). Es wurde beschrieben, dass solche Resistenzen unter anderem durch Mutationen im Membranproteinkomplex LiaFSR entstehen oder in Genen, die für die Cardiolipin-Synthetase kodieren, welche für die Synthese von Phospholipiden verantwortlich ist (Arias et al., 2011). Derzeit gibt es keine klaren Grenzwerte für eine Daptomycin-Resistenz. Als cut-off-Werte werden $MHK_{DPC} >4$ mg/l angenommen.

1.6 Ziel der Arbeit

Zur Detektion der enteralen Besiedlung von Patienten mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) dienen Selektivnährmedien, die das Wachstum anderer Bakterienspezies unterdrücken und lediglich einen Nährboden für Vancomycin-/Teicoplanin-resistente *E. faecium* und *E. faecalis* darstellen sollen. Erreger, die auf Selektivmedien für VRE Wachstum zeigen, obwohl sie anderen Bakterienspezies zuzuordnen sind, stellen ein Problem für die rasche Detektion von VRE dar. Sie verlängern den diagnostischen Prozess, was wiederum zu verspäteter Isolation oder verzögertem Therapiebeginn führt und letztendlich für ein schlechteres Outcome der Patienten sorgt. Zusätzlich entstehen Folgekosten durch aufwändige Anschlussuntersuchungen. In dieser Arbeit sollten daher drei VRE-Se-

lektivnährböden hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität, ihrem *NPV* und *PPV* miteinander verglichen werden. Ziel war es, herauszufinden, ob andere Screeningmedien dem derzeit in der Routine-Diagnostik des Instituts für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) verwendeten VRE-Selektivagar der Fa. Oxoid überlegen sind. Es sollte ein hochspezifisches Nährmedium, das gleichzeitig einen hohen *Negative Predictive Value (NPV)* aufweist, gefunden werden, um den diagnostischen Prozess zu optimieren.

Um in der Diagnostik Ausbrüche auf Stationen, die durch denselben Erreger verursacht werden, zu erkennen, wird die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese (PGFE) angewendet. Routinemäßig wird hierbei eine einzelne Bakterienkolonie eines jeden Patienten aus einer Kultur mit einer einzelnen Kolonie der anderen Patienten verglichen. Im Laboralltag wurde beobachtet, dass die VRE-Besiedlungstypen einzelner Patienten sich im Verlauf veränderten, ein Patient also in einer Folge-Screening-Probe einen anderen VRE-Pulsotyp aufwies als in der vorigen Probe.

Inwiefern die VRE-Besiedlung des Darmes sich im Verlauf eines stationären Aufenthaltes verändert, ist bisher wenig bekannt und Gegenstand dieser Untersuchung. Hierbei sollen unter anderem die Fragen beantwortet werden,

- ob Patienten mit einem oder mehreren VRE-Klonen besiedelt sind,
- ob sich die Kolonisationstypen im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes verändern,
- ob bei einer variierenden Besiedlung ein dominanter PFGE-Typ existiert, der im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes und unter Antibiotika-Therapie andere PFGE-Typen verdrängt, oder ob hingegen die Besiedlung mit unterschiedlichen PFGE-Typen quantitativ zunimmt.
- Zusätzlich soll vor diesem Hintergrund überprüft werden, inwiefern die PFGE eine sichere Methode in der Diagnostik klinischer Ausbrüche darstellt.

Durch Bestimmung der Empfindlichkeiten gegenüber den üblicherweise verwendeten Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin und den Reserveantibiotika Linezolid und Daptomycin soll in dieser Untersuchung weiterhin überprüft werden, in welchen Eigenschaften sich die verschiedenen PFGE-Typen voneinander unterscheiden und ob es im Rahmen einer Antibiotikatherapie zu einer Abnahme der jeweiligen Antibiotika-Empfindlichkeiten kommt. Zur gleichen Fragestellung soll auch überprüft werden, welchen *van*-Typen die unterschiedlichen PFGE-Typen zuzuordnen sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden wird eine Übersicht über die verwendeten Laborgeräte, Chemikalien und Reagenzien gegeben.

2.1.1 Geräte

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Geräte.

Laborgerät	Bezeichnung, Hersteller
Brutschränke/-räume	23 °C Brutschrank, Thermo Scientific Heraeus Incubator (Waltham, USA) 37 °C Brutschrank, Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland) 42 °C Brutschrank, Heraeus Kendro Laboratory Products (Hannau, Deutschland) 56 ° C Brutschrank, Heraeus Kendro Laboratory Products (Hannau, Deutschland)
Cryobank TM Mast Diagnostica gelb	Mast Group (Bootle, UK)
Einmal-Spatel weiß	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Eppendorf Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf research (Hamburg, Deutschland)
Eppendorfreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf research (Hamburg, Deutschland)
Falcon-Tube	Sarstedt (Nürtingen, Deutschland)
Feinwaage BP 301 S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer, horizontal	Owl Separation Sytems, Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)

Laborgerät	Bezeichnung, Hersteller
Gießvorrichtung für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Gießvorrichtung für Agaroseblöcke, CHEF Mapper [®] XA Systems, 50 well Plug Mold	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Heizblock	Blockthermostat BT 100 Kleinfeld Labortechnik (Germany)
Inoculation loop, blau	greiner bio-one (Mosonmagyaróvár, Ungarn)
Kühlpumpe, Cooling Module	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Kühlpumpe, Mini Chiller 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Kühl-/Gefrierschränke	<p>Liebherr Premium -17 °C / + 6 °C, Biberach an der Riß (Deutschland)</p> <p>Liebherr profi line 8 °C, Biberach an der Riß (Deutschland)</p> <p>Liebherr Komfort -25 °C, Biberach an der Riß (Deutschland)</p> <p>Viessmann Kühlraum 5 °C, Institut für Mikrobiologie (Hamburg, Deutschland)</p> <p>Forma 88000 series -80 °C , Thermo Scientific (Massachusetts, USA)</p>
MALDI Biotyper TM microflex	Bruker Daltonics, Bremen (Deutschland)
Magnetrührer RCT basic	IKA [®] -Labortechnik Werke GmbH & CO. KG (Staufen, Deutschland)
MC-Farland Messgerät DensiCheck plus	Biomérieux Deutschland GmbH (Nürtingen, Deutschland)
MSP 96 target polish steel BC	Bruker Daltonics (Massachusetts, USA)

Laborgerät	Bezeichnung, Hersteller
Photodokumentationssystem: ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Photodokumentationssystem Vision Capt Quantum	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH (Eberhardzell, Deutschland)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Plastikkamm, CHEF systems comb 15 well, 21 cm x 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Plattendrehsteller	Biomérieux Deutschland GmbH (Nürtingen, Deutschland)
Plattierungsspatel	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Pulsfeldgelelektrophoresekammer: CheF – DR III System, Gene Path™ System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Pulsfeldgelelektrophorese-Pumpe variable speed pump	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Schüttler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Deutschland)
sterile Pipettenspitzen Biosphere filter tips, (für 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Pipetten)	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Vortexer	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waage	Kern 572, Kern & Sohn GmbH (Ballingen, Deutschland)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Bezeichnung, Hersteller
C ₂ H ₄ O ₂ S	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co- KG (Karlsruhe, Deutschland)
KCl	
KH ₂ PO ₄	
MgCl ₂	
NaCl	
Na-EDTA	
Na ₂ HPO ₄	
Glycerol 85 %	
LMP-Agarose (INCERT) TM	
Na-Desoxycholat ≥ 97%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Na-Lauroyl-Sarkosin ≥ 94%	Sigma life Science (Darmstadt, Deutschland)
NaOH (fest)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
SeaKem® Gold Agarose	Lonza (Rockland, USA)
TBE-Puffer, Rotiphorese Buffer 10x	Carl Roth GmbH + Co- KG (Karlsruhe, Deutschland)
TE-Puffer, pH 8,0	PanReacAppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Trihydroxyaminomethane (Tris), Trizma base Primary Standard and Buffer	Sigma life Science (Darmstadt, Deutschland)

2.1.3 Reagenzien und Enzyme

Tabelle 6: Übersicht über verwendete Reagenzien und Enzyme.

Reagenz, Enzym	Hersteller
E-Teste, MIC test Strip, Daptomycin	Biomérieux, Marcy l'Étoile (Frankreich)
E-Teste, MIC test Strip, Linezolid	
E-Teste, MIC test Strip, Teicoplanin	
E-Teste, MIC test Strip, Vancomycin	
Lysozym from chicken egg white	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
DNA-Marker	Lambda ladder, Bio-Rad CHEF DNA, size Standard (USA) MidRange PFG Marker, New England Biolabs (Ipswich, USA)
dNTP Mix, DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Proteinase K-Lösung P 4850-1	Roche (Basel, Schweiz)
Red Safe, Nuclid Acid Staining, 20.000x	Intron Biotechnology (Korea)
Restriktionsenzym SmaI 5000 U (10 U/μl)	Roche (Basel, Schweiz)
Restriktionspuffer SuRe/Cut Buffer A 10x for restriction enzymes	Roche (Basel, Schweiz)

2.1.4 Lösungen

Für die PFGE und PCR wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Lösungen verwendet. Falls nicht anders gekennzeichnet, wurde als Lösungsmittel Aqua bidest. verwendet und auf das angegebene Volumen aufgefüllt.

Tabelle 7: Übersicht über verwendete Lösungen für PFGE und PCR.

Bezeichnung	Inhaltstoffe	Ansatzvolumen	pH
NaCl, 5 M	146,10 g NaCl	500 ml	-
Tris-HCl, 2M	24,24 g Tris Titration mit HCl	100 ml	7,5
Na-EDTA, 0,5 M	93,06 g Na-EDTA	500 ml	7,5
SE- Puffer	15 ml NaCl, 5 M 50 ml Na-EDTA, 0,5 M	1000 ml	7,5
1,6-prozentige LMP-Agarose (low-melting-point)	0,8 g LMP-Agarose 50 ml SE-Puffer	-	-
Basislösung (zur Herstellung der Lysislösung I)	80 ml NaCl, 5 M 80 ml Na-EDTA, 0,5 M 1,2 ml Tris-HCl, 2 M 800 mg Na-Desoxycholat 4 g Na-Lauryl-Sarkosin	400 ml	7,5
ES-Lösung (zur Herstellung der Lysislösung II)	10 g Lauryl-Sarkosin 186,12 g Na-EDTA Titration mit NaOH-Plättchen	1000 ml	9,0
TE-Puffer	5 ml Tris-HCl, 2 M 20 ml Na-EDTA, 0,5 M	1000 ml	7,5
10 x TBE-Puffer	109,0 g Tris 55,6 g Borsäure 7,4 g Na-EDTA	1000 ml	8,0

Ausgewählte Herstellungsverfahren

LMP-Agarose: Im Wasserbad erhitzen, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat, dann je 1 ml aliquotieren und bei -8 °C verwahren. LMP-Agarose vor Gebrauch kurz bei circa 80 °C im Wasserbad oder im Heizblock erhitzen.

2.1.5 Primer

Tabelle 8: Übersicht über für die PCR verwendete Primer.

Primerbezeichnung	Sequenz
<i>vanA_for</i>	5'-AGTCAATACTCTGCCCGGTTT-3'
<i>vanA_rev</i>	5'-GCAGCGGCCATCATACG -3'
<i>vanB_for</i>	5'-TCCGGTCGAGGAACGAAA -3'
<i>vanB_rev</i>	5'-GCCCTCTGCATCCAAGCA -3'
<i>Ddl_for</i>	5'-AAAAAGAAATCGCACCG-3'
<i>Ddl_rev</i>	5'-GAGACATTGAATATGCCTTATG-3'
<i>ptsD_for</i>	5'-TATCAACGCGATCAAACGA-3'
<i>ptsD_rev</i>	5'-CGTTCGCATACAGCTTTTCA-3'

2.1.6 Medien

Zum Vergleich standen der Äskulin-haltige VRE-Selektivnährboden (Oxoid; Wesel, Deutschland) und die beiden chromogenen Screeningagarplatten chromID VRE Agar (Biomérieux; Marcy l'Etoile, Frankreich) und Brilliance VRE Agar (Oxoid; Wesel, Deutschland).

Für die Subkultivierung wurden Blutagarplatten (Columbia Agar with sheep blood plus; Oxoid) verwendet, außerdem eine flüssige Nährbouillon (VRE-Brühe; Zubereitung: Nährbodenküche, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Eppendorf). E-Teste wurden auf Müller-Hinton-Agar (Oxoid) durchgeführt.

Für die Anzucht der Isolate für die PFGE-Analyse wurden zunächst der chromogene Selektivagar chromID VRE Agar und Blutagar für die Subkultivierung verwendet. Als Flüssigmedium wurde VRE-Brühe genutzt. Für die Verdünnung des Originalmaterials wurde das ebenfalls in den eSwab-Tupfersystemen befindliche Amies-Medium verwendet:

Tabelle 9: Inhaltsstoffe des Amies-Mediums.

Inhaltstoffe	Lösungsmittel
3,0 g NaCl	1000 ml Aqua dest.
0,2 g KCl	
0,1 g CaCl ₂	
0,1 g MgCl ₂	
0,2 g KH ₂ PO ₄	
1,15 g Na ₂ HPO ₄	
1,0 g C ₂ H ₄ O ₂ S (Natrium-Thioglykolat)	

2.1.7 Patientenkollektiv, Gewinnung des Probenmaterials

Patienten nach Stammzelltransplantation stellen eine Hochrisikogruppe für Besiedlungen und Infektionen mit multiresistenten Erregern, unter anderem VRE dar, da sie einer starken Immunsuppression unterliegen und in der Regel zahlreiche Antibiotika erhalten. Aus diesem Grund werden sie einem wöchentlichen Routine-Screening auf multiresistente Erreger, unter anderem VRE, unterzogen. Zusätzlich werden die Patienten bei Neu- oder Wiederaufnahme in die Klinik einem Routine-Screening auf multiresistente Erreger unterzogen. Im Zeitraum zwischen Mai 2014 und März 2015 wurde systematisch das VRE-Screening-Material volljähriger Patienten der Klinik für Intensivmedizin und Stationen, die zur Klinik für Stammzelltransplantationen des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gehören, in Form des eSwab-Tupfersystems (eSwab collection and preservation for Aerobic, Anaerobic and Fastidious Bacteria; Copan, Italien) als Rektalabstrich gesammelt.

Insgesamt 584 Proben von 246 Patienten wurden für diese Arbeit im Zeitraum zwischen dem 21.05.2014 und 24.03.2015 gewonnen. 365 Proben von 155 Patienten flossen in die Validation der Screeningmedien ein, die weiteren 219 lediglich in die PFGE-Analyse. Alle Patienten, von denen während der stationären Aufenthalte mehr als ein positiver VRE-Befund erhoben werden konnte, wurden in die PFGE-Untersuchung eingeschlossen.

Die Abnahme des Probenmaterials wurde vom zuständigen Personal der Stationen durchgeführt. Für die Materialgewinnung wird der Abstrichtupfer einige Zentimeter weit in den Analkanal eingeführt, gedreht und wieder herausgezogen. Dann wird er in das im Tupferröhrchen befindliche Amies-Medium gegeben und das Röhrchen verschraubt. Um eine effektive Materialgewinnung zu gewährleisten, müssen sich erkennbare Stuhlaufagerungen am Tupfer befinden. Die Abstrichtupfer wurden im Anschluss an die Probengewinnung zur weiteren Analyse in das Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKE gebracht.

Die Daten der Patienten (Name, Alter, Geschlecht, Abnahmezeitpunkt, einsendende Station und Ergebnis der mikrobiologischen Routineuntersuchung) wurden gesammelt und archiviert. Die Proben wurden mit einer durch das Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie vergebenen Laborkreis-Nummer und einer laufenden Studiennummer versehen.

Es wurden 437 Proben von Patienten der Klinik für Stammzelltransplantationen gewonnen, 147 von Patienten der Klinik für Intensivmedizin. Von den 365 Proben, die in die Analyse der Screeningmedien eingeschlossen wurden, stammten 305 Proben von Patienten der Klinik für Stammzelltransplantationen, 60 von Patienten der Klinik für Intensivmedizin.

Beobachtet wurden unter allen gesammelten Proben insgesamt 29 Patienten mit positivem VRE-Befund. Von 20 dieser Patienten konnte während des stationären Aufenthaltes mehr als eine Probe gewonnen werden; diese wurden in die Populations-Analyse eingeschlossen.

Insgesamt wurden für diesen Teil der Arbeit 63 Proben mit VRE-positivem eSwab-Material verwendet. Das eSwab-Material wurde zu gleichen Teilen mit

Glycerol versetzt und bis zur Verwendung bei einer Temperatur von -80 °C im Institut für Medizinische Mikrobiologie aufbewahrt.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterien im Rahmen der VRE-Surveillance

Als diagnostisches Primärmaterial diente ein Rektalabstrich (eSwab-Tupfersystem), der zur Konservierung der Bakterien Amies-Medium enthält.

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie des UKE wurden die Abstrichtupfer in die Routinediagnostik eingeschleust und anhand des folgenden Arbeitsstandards bearbeitet: Eine VRE-Anreicherungsbrühe wurde mit Amies-Medium beimpft, indem der Abstrichtupfer in der Brühe geschwenkt wurde, und im Anschluss bei 42 °C über Nacht bebrütet. Nach dem Mischen der Lösung wurden 10 µl auf eine VRE-Selektivagarplatte aufgebracht und mit einem 3-Ösenausstrich auf der Plattenoberfläche verteilt. Angezüchtete Erreger wurden nach 48 Stunden mittels MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight) massenspektrometrisch bis auf Speziesebene differenziert. Bei verdächtigen Erregern wurde eine Resistenztestung durchgeführt.

Für die Evaluation der Screeningmedien wurden zusätzlich zu den routinemäßig bearbeiteten Proben je 50 µl der Anreicherungsbrühe auf den drei unterschiedlichen Nährböden mithilfe eines Einmalspatels und eines Platten-Drehtellers ausplattiert. Nach Anweisung des Herstellers erfolgte jeweils eine 48-stündige Inkubation bei 37 °C.

Für die spätere PFGE-Analyse wurden neben der Routinediagnostik 600 µl Amies-Medium eines eSwab-Abstrichs zu gleichen Teilen mit 85-prozentigem Glycerol versetzt, der Tupfer im Glycerol ausgedrückt und die Probe anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Auch 600 µl der in der Routinediagnostik hergestellten Anreicherungsbouillon wurden mit 600 µl 85-prozentigem Glycerol versetzt und ebenfalls bis zur erneuten Verwendung bei -80 °C konserviert.

Nach 48 Stunden Bebrütungszeit wurden die Agarplatten begutachtet und die gewachsenen Kolonien gezählt. Hierbei wurde jede Platte, auf der Bakterienkolonien morphologisch erkennbar waren, ohne Berücksichtigung der vom Hersteller für Enterokokken spezifischen angegebenen Farben als positives Wachstum gewertet. Von diesen positiven Kulturen wurde mittels 3-Ösen-Ausstrich eine Iso-

lation auf Blutagar angelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass von jeder Kolonie, die mit bloßem Auge als phänotypisch distinkt bewertet wurde, eine eigene Isolation angelegt wurde, um möglichst keine unterschiedlichen, der auf den Agarplatten wachsenden Bakterienspezies zu übersehen. Die Isolationen wurden über 24 Stunden bei 37 °C bebrütet und anschließend mithilfe massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF) anhand der charakteristischen Spektren eine Identifikation der Spezies durchgeführt. Ergab die Identifizierung ein positives Ergebnis für *E. faecium* oder *E. faecalis*, wurde verglichen, ob die *vanA/vanB*-PCR der Routine-Diagnostik ebenfalls ein positives Ergebnis geliefert hatte. War dies der Fall, wurde die *van*-PCR mit einem Isolat vom VRE-Selektivagar Agar wiederholt, um sicherzustellen, dass das in der Routine-Diagnostik gefundene VRE-Isolat identisch mit jenem auf den Studien-Screeningmedien war. Fiel die PCR erneut positiv für *vanA/B* aus, wurde der VRE als bestätigt angesehen und ein Isolat in einem Cryobank-Tube bei -80 °C verwahrt.

Wuchsen auf mindestens einem der Selektivnährböden Enterokokken, die mittels MALDI-TOF als solche identifiziert wurden, konnte in der PCR für dieselbe Probe jedoch kein Amplifikat des *vanA*- oder *vanB*-Genes nachgewiesen werden, wurden E-Teste für Vancomycin und Teicoplanin auf Müller-Hinton-Agar durchgeführt. Zeigte sich im E-Test eine Resistenz gegenüber den Glykopeptidantibiotika, wurde ein Isolat bei -80 °C eingefroren.

Um die Performance der Selektivnährmedien zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu vergleichen, wurde bei 127 der insgesamt 365 ausplattierten Anreicherungsbrühen das Wachstum bereits nach 24 Stunden und dann erneut nach 48 Stunden ermittelt, indem die Kolonien gezählt wurden. (Der Hersteller Biomérieux empfiehlt eine Bebrütungszeit von 24 Stunden. Weist das Medium nach dieser Zeit kein relevantes Wachstum auf, soll die Bebrütung erneut um 24 Stunden verlängert werden.)

In der Abbildung 4 ist exemplarisch der Ablauf der Arbeitsschritte für einen positiven Kulturbefund auf einem der Selektivmedien dargestellt.

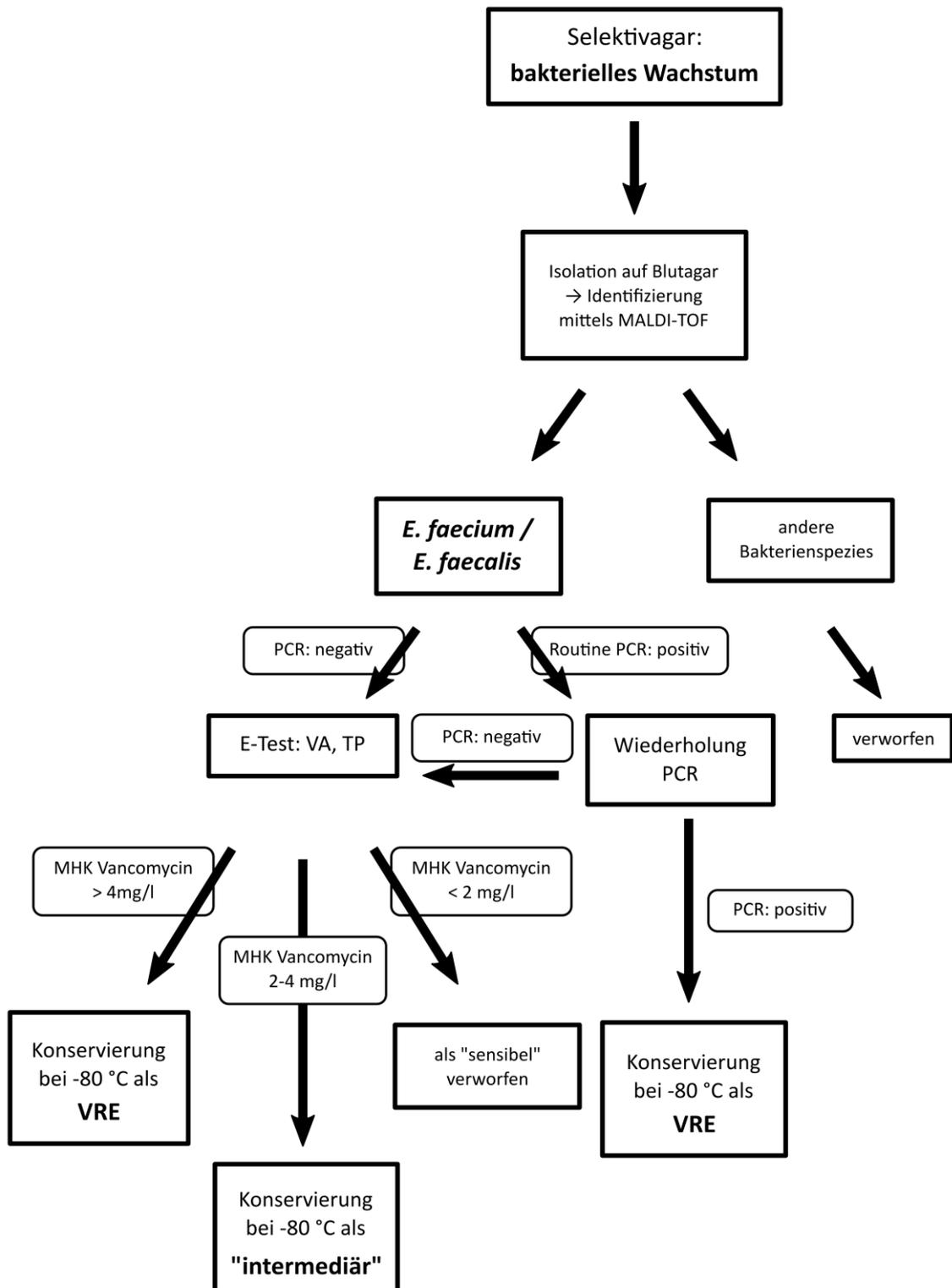


Abbildung 4: Studienablauf: Materialgewinnung und Analyse: Ausgehend von einem positiven Kulturbefund wurde nach dem abgebildeten Schema der Resistenzgrad der Bakterienstämme festgestellt.

2.2.2 Anzucht von VRE für die Populationsanalyse

Für die Wiederanzucht der Bakterien für die PFGE-Analyse wurden zunächst ein chromogener Selektivagar und für die Subkultivierung Blutagar verwendet. Der chromID VRE Agar wurde ausgewählt, da dieser in der Plattentestung die höchste Spezifität und den höchsten *Positive Predictive Value* gezeigt hatten. Somit war davon auszugehen, dass dieser Agar die Begleitflora am zuverlässigsten unterdrückt. Da für die Populationsanalyse nur die Anzucht der VRE relevant war, wurde dieser Agar verwendet.

600 µl Amies-Medium aus dem eSwab-Tupfersystem waren im Rahmen der Probensammlung mit 600 µl 85-prozentigem Glycerol versetzt und bei -80 °C eingelagert worden. Diese Proben wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem Vortex gut durchmischt. 50 µl des verdünnten eSwab-Mediums wurden auf dem chromID VRE Agar mithilfe eines sterilen Einmalspatels und einem Plattendreh-teller ausplattiert und nach Empfehlung des Herstellers für 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Auf dem chromID VRE Agar färben sich Enterokokken violett (*E. faecium*) beziehungsweise türkis (*E. faecalis*) an.

Aus dem Bakterienrasen wurden insgesamt 14 Kolonien für die PFGE-Analyse der DNA-Bandenmuster mithilfe einer sterilen Öse gepickt. Diese 14 Kolonien wurden über Nacht auf Blutagar in einem Drei-Ösen-Ausstrich subkultiviert. Soweit möglich wurde darauf geachtet, Kolonien auszuwählen, die phänotypisch unterschiedlicher Morphologie waren, um zu prüfen, ob Unterschiede in der Morphologie sich ebenfalls im DNA-Bandenmuster niederschlagen. Bakterienkolonien, die durch die Färbung nicht eindeutig als Enterokokken zu erkennen waren, wurden mittels MALDI-TOF auf Speziesebene identifiziert. In einigen Proben war nur eine sehr geringe Bakterienkonzentration vorhanden, sodass pro Patientenprobe mitunter mehrere chromID VRE Agarplatten beimpft werden mussten, um die Anzahl von 14 Bakterienkolonien zu erreichen.

Bei einer Probe (Lfd. Nr.: 159, VA 28995) war eine Wiederanzucht des VRE aus dem eSwab-Medium nach 48 Stunden Bebrütung weder auf dem Selektivme-

dium noch auf Blutagar möglich. Es wurden 70 µl des verdünnten eSwab-Mediums in eine Anreicherungsbrühe gegeben, die über 8 Stunden bei 37 °C bebrütet wurde. Anschließend wurden 50 µl der Anreicherungsbrühe erneut ausplattiert. Auch hier konnte keine Anzucht des Erregers erzielt werden, sodass die Probe von der PFGE-Analyse ausgeschlossen werden musste. In anderen Proben war die Konzentration der Bakterien so hoch, dass eine Subkultivierung einzelner Bakterienkolonien mit einer Öse nicht möglich war. Von diesen Proben wurden 12,5 µl des Ausgangsmediums 1:1000 mit Amies-Medium verdünnt, mit dem Vortexer gut durchmischt und 50 µl dieser verdünnten Lösung auf dem chromID VRE-Agar ausplattiert. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C war der Bakterienrasen durch die Verdünnung soweit ausgedünnt, dass mithilfe eines Zahnstochers 14 Kolonien zur Subkultivierung gepickt werden konnten.

Alle 14 für die PFGE-Analyse verwendeten VRE-Klone wurden einzeln bei -80 °C in Cryobank-Tubes eingefroren, um die Typen für nachfolgende Analysen verfügbar zu machen.

2.2.3 Empfindlichkeitstestung

Empfindlichkeitstestungen gegenüber verschiedenen Antibiotika wurden in dieser Studie mithilfe der E-Test-Methode (Biomérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich) durchgeführt. Der E-Test (Epsilometertest) wurde im Jahre 1988 entwickelt (AB BIODISK) und stellt eine Variante des Agardiffusionstests dar. Er umfasst einen Antibiotikateststreifen, auf dessen Oberseite in einer logarithmischen Skala von 0,016 mg/l bis 256 mg/l die spezifischen Minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) abzulesen sind. Die Unterseite des Teststreifens ist mit der jeweils an der Oberseite angegebenen Antibiotikakonzentration beschichtet. Das Antibiotikum diffundiert aus dem Streifen in den Agar und hemmt dort das Bakterienwachstum. Bakterien können sich also nur in den umliegenden Bereichen des Streifens vermehren, in denen die Antibiotikakonzentration unterhalb ihrer Empfindlichkeit liegt. So entsteht eine bakterienfreie Ellipse, die den Teststreifen im Punkt der bakterienstamm-spezifischen MHK schneidet. Dieser Wert kann abgelesen werden.

Für zu testende Bakterienstämme wurde auf Blutagar eine frische Subkultur angelegt, welche für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet wurde. Dann wurden die Bakterienkolonien mithilfe einer sterilen Öse in steriler 0,85-prozentiger-NaCl-Lösung suspendiert, bis eine Lösung von 0,5 McFarland erreicht war. Diese Lösung wurde mittels eines sterilen Tupfers gleichmäßig in drei zueinander um jeweils 60 ° versetzten Schichten auf Müller-Hinton-Agar aufgetragen. Der E-Teststreifen wurde mittig, beziehungsweise bei zwei Teststreifen um 180 ° nebeneinander verdreht, aufgelegt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurde die MHK abgelesen. Zur Beurteilung der Empfindlichkeit, wurden die Grenzwerte nach EUCAST verwendet. Eine Minimale Hemmkonzentration für Vancomycin kleiner/gleich 4 mg/l wird nach EUCAST als sensibel (S), eine MHK_{VA} von >4 mg/l als resistent (R) eingestuft. Die Grenzwerte für Teicoplanin lauten $S \leq 2$ mg/l, $R > 2$ mg/l. Für Linezolid sind EUCAST-Grenzwerte von $S \leq 4$ mg/l, $R > 4$ mg/l definiert. Für Daptomycin wurden von EUCAST bisher keine klinischen Breakpoints für die Resistenzbestimmung von Enterokokken festgelegt. Als epidemiologischer cut-off-Wert gilt derzeit eine MHK_{DPC} von >4 mg/l (vergleiche Tabelle 10).

Tabelle 10: Clinical breakpoints beziehungsweise epidemiologische cut-off-Werte nach EUCAST: Dargestellt sind die Grenzwerte für Sensibilität (S) und Resistenz (R).

Antibiotikum	S (in mg/l)	R (in mg/l)
Vancomycin	≤ 4	> 4
Teicoplanin	≤ 2	> 2
Linezolid	≤ 4	> 4
Daptomycin	≤ 4	> 4

Für die weitere Analyse der Population war von Interesse, inwiefern sich Unterschiede bezüglich der Sensibilität gegenüber spezifischen Antibiotika bei den einzelnen PFGE-Typen finden. Um zu untersuchen, ob MHK-Abweichungen zwi-

schen den PFGE-Typen innerhalb einer Patientenprobe bestehen, wurde für jeweils einen der VRE-Typen ein E-Test durchgeführt. Es wurden die MHK für Vancomycin, Teicoplanin, Linezolid und Daptomycin erhoben. Um weiterhin zu untersuchen, ob sich die Empfindlichkeit gegenüber diesen Antibiotika im Rahmen des stationären Aufenthaltes und unter Antibiotika-Therapie veränderte, wurde zusätzlich eine Empfindlichkeitstestung für jeden PFGE-Typ in der jeweils letzten Probe des Patienten, die im Beobachtungszeitraum gewonnen werden konnte, durchgeführt. Die E-Teste wurden wie oben beschrieben angelegt.

Um zu beurteilen, inwiefern eine Antibiotikatherapie die Empfindlichkeiten beeinflusst, wurde aus der klinischen Dokumentation erhoben, welche Antibiotika die Patienten im Beobachtungszeitraum erhalten hatten.

Eine Abweichung der MHK um eine Zweierpotenz wurde als allgemeine Streuung oder Ableseunsicherheit gewertet.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und stellt eine Methode zur Amplifizierung von Nucleinsäurefragmenten dar (Mullis und Faloona, 1987). Sie eignet sich vor allem für DNA-Fragmente von einigen 100 bis mehreren 1000 Basenpaaren. Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird zunächst durch Erhitzen auf bis zu 90 °C denaturiert, sodass es zur Trennung der Doppelstränge kommt. Nach dem Wiederabkühlen auf 50 °C werden sogenannte Primer hinzugegeben. Dies sind Oligonucleotide, die der gesuchten Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind und an diese binden (Annealing). Durch Zusatz einer thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxyribonucleotiden (dNTP) kann den beiden Einzelstränge nun unter erneuter Temperaturerhöhung auf 60 °C bis 70 °C der jeweilige komplementäre Doppelstrang ergänzt werden (Extension). Dieser Reaktionszyklus wird in der Regel 20–30 Mal wiederholt, bis die gewünschte Zahl an DNA-Amplifikaten vorhanden ist (Montenarh, 2006).

2.2.4.1 Anzucht der Bakterien für PCR

Die in Cryobank-Tubes eingefrorenen *E. faecium*-(VRE)-Isolate wurden aufgetaut, indem ein Plastik-Kügelchen mit einer sterilen Öse in einem Drei-Ösen-Ausstrich auf Blutagar aufgebracht wurde. Die Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37 ° C. Am nächsten Tag wurde Bakterienmaterial in VRE-Brühe in Lösung gegeben und ebenfalls über Nacht bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extraktion der Bakterien-DNA durchgeführt.

2.2.4.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde durch das Personal der Routine-Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie unter Anwendung eines Standardprotokolls durchgeführt.

2.2.4.3 Van-Polymerasekettenreaktion

Für die *van*-PCR wurden der *vanA-forward*- und *vanA-reverse*-Primer, sowie der *vanB-forward*- und der *vanB-reverse*-Primer verwendet. Die Reaktion lief wie in Tabelle 11 dargestellt ab.

Tabelle 11: Van-PCR von *E. faecium* (Fang et al., 2011).

PCR- Reaktion	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung der DNA	95 °C	10 min
2. Denaturierung	95 °C	15 sec
3. Annealing + Extension + signal detection (FAM)	60 °C	1 min
4. Zyklen (Wiederholung Schritt 2.-4.)		45 x
5. Kühlung (storage)	40 °C	30 sec

2.2.4.4 Multiplex-PCR für *ptsD*

Die PCR wurde entsprechend der von Zhang et al. beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt (Zhang et al., 2013). Für einen 50 µl-Ansatz wurden die in Tabelle 12 zusammengefassten Mengen verwendet. Für die PCR wurden der

ddl-forward- und *ddl-reverse*-Primer für das *E. faecium*-Housekeeping-Gen, so wie der *ptsD-forward*- und der *ptsD-reverse*-Primer verwendet. Um eine Konkurrenz der Primer um die Didesoxynukleotide zu verhindern, wurden die Primerpaare jeweils in zwei unterschiedliche Ansätze gegeben. Die Reaktion lief wie in Tabelle 13 dargestellt ab.

Tabelle 12: Mengenangaben für *ptsD*-PCR.

Substanz	Menge
Primer <i>for</i>	1,5 µl
Primer <i>rev</i>	1,5 µl
dNTP	1,0 µl
HI-Puffer	10,0 µl
H ₂ O	34,5 µl
Polymerase	0,5 µl
Template	1,0 µl

Tabelle 13: Multiplex-PCR – Screening von *ptsD* und *Genotypic clustering* von *E. faecium* (Zhang et al., 2013).

PCR- Reaktion	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
2. Denaturierung der DNA	94 °C	30 sec
3. Annealing (Bindung der Primer an DNA)	55 °C	30 sec
4. Extension (Verlängerung) 1000 bp/min	72 °C	30 sec
5. Zyklen (Wiederholung Schritt 2.-4.)		30 x
6. Synthese	72 °C	60 sec
7. Kühlung (storage)	4 °C	nach Bedarf

2.2.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von PCR-Amplifikaten, welches sich die negative Ladung der DNA-Fragmente und deren Wanderungsverhalten im elektrischen Feld zu Nutze macht. Die Auftrennung der Nucleinsäuren erfolgt dabei entsprechend ihrer Größe: Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zur molaren Masse der DNA; kleine Fragmente wandern aufgrund der geringeren Reibung also schneller im elektrischen Feld als große Fragmente mit hoher molarer Masse. Die einzelnen DNA-Banden können durch Farbstoffzugabe unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Montenarh, 2006).

Da die gesuchten PCR-Produkte *ddl* und *ptsD* mit 560 bp und 242 bp recht kleine Fragmente darstellen, wurde ein 1,5-prozentiges Agarose-Gel in 0,5 x TBE Puffer zur Auftrennung verwendet. 1,5 g Agarose wurden mit 100 ml 0,5 x TBE-Puffer in einer Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlung im Wasserbad wurden 5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Red Safe zugegeben und durch Schütteln gut vermischt. Die flüssige Agarose wurde in die Gelkammer gegeben und ein Plastikkamm zur Bildung der DNA-Taschen eingebracht. Nach 30-minütigem Erkalten des Gels bei Raumtemperatur wurde der Kamm entfernt und das Gel vollständig mit 0,5 x TBE-Puffer bedeckt. In die Taschen wurden je 8 µl der PCR-Produkte, die mit circa 1 µl fluoreszenzfarbenem DNA-Ladepuffer vermischt worden waren, mit einer Pipette eingebracht. In die jeweils erste Geltasche wurden 5 µl DNA-Marker zur Beurteilung der Fragmentgrößen gegeben. Eine Spannung wurde angelegt. Nach circa 40 min wurde das Gel aus der Kammer entfernt und vom TBE-Puffer befreit. Die entstandenen Banden wurden mittels UV-Licht im Photodokumentationssystem Vision Capt Quantum (Vilber Lourmat) abgebildet.

2.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA in einzelne Fragmente. Hierbei macht man sich die negativen Ladungen der Phosphodiestergruppe der Nucleotide zu Nutze, die in einem elektrischen Feld von der Kathode angezogen werden. Aufgrund geringerer Reibungskräfte bewegen sich kleine DNA-Fragmente schneller als größere und legen somit eine weitere Laufstrecke zurück.

Im Unterschied zu herkömmlichen Gelelektrophorese-Verfahren ist bei der Pulsfeldgelelektrophorese, die 1984 von David C. Schwartz und Charles Cantor entwickelt wurde (Schwartz und Cantor, 1984), das elektrische Feld nicht statisch angelegt, sondern ändert durch immer wieder wechselnde elektrische Impulse fortlaufend seine Richtung. Dies birgt den Vorteil, dass DNA-Moleküle bis zu 10^3 kb aufgetrennt werden können, die damit deutlich größer sind, als es die herkömmliche Elektrophorese mit 30-50 kb vermag. Durch die pulshaften Richtungsänderungen des elektrischen Feldes müssen sich die DNA-Fragmente immer wieder neu gemäß ihrer Ladung ausrichten. Für diesen Prozess benötigen große Fragmente mehr Zeit.

2.2.5.1 Herstellung der Agaroseblöckchen

Um die DNA der Enterokokken vor äußeren Einflüssen und Scherkräften zu schützen, wurde diese in Agarosegelblöckchen fixiert. In die Agarose können Lyse- und Restriktionslösung ungehindert hineindiffundieren und die DNA so für die Fragmentauftrennung vorbereiten.

Zur Herstellung der Blöckchen wurden die Bakterienstämme über 14–18 Stunden bei 37 ° C auf Blutagar angezüchtet und dann mithilfe eines Einmaltupfers in 2 ml SE-Puffer in Lösung gegeben, bis eine optische Dichte von 3,5 McFarland erreicht war. 120 µl dieser Bakteriensuspension wurden in Eppendorftubes vorgelegt. Inzwischen wurden 2 ml der aliquotierten 1,6-prozentigen LMP-Agarose im Heizblock / Wasserbad auf 80 °C erhitzt und anschließend im Brutschrank auf 56 °C abgekühlt, um eine Denaturierung des zuzugebenden Lysozyms zu verhindern. Dieses wurde dann kurz vor Zugabe zur Bakteriensuspension in Form einer kleinen Spatelspitze zur Agarose hinzugefügt und mit dieser vermischt, bis

sich das Lysozym vollständig gelöst hatte. 120 µl der mit Lysozym versetzten Agarose wurden dann in die Bakteriensuspension hineingegeben und durch Vortexen gut vermischt. Um die Bakterien-DNA durch die Scherkräfte nicht zu beschädigen, wurde das Vortexen möglichst kurz gehalten. Circa 100 µl der mit der Agarose vermischten Bakteriensuspension wurden in eine Gießvorrichtung eingefüllt und für 15–30 min bei -8 °C im Kühlschrank erstarren lassen.

Es wurde stets ein Doppelansatz an Agarosegelblöckchen für jede der 14 Bakterienkolonien hergestellt.

2.2.5.2 Lyse I

Für die Lyse I der Bakterien-DNA in den Agaroseblöckchen wurde eine Lysislösung I hergestellt, indem je 1 ml Basislösung pro Agaroseblöckchen mit je 5 mg Lysozym pro Agaroseblöckchen vermischt wurde. Diese Lösung wurde bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt, bis sich das Lysozym vollständig gelöst hatte.

Je 1 ml der Lysislösung I wurde in eine Eppendorftube gegeben und das ausgehärtete Agaroseblöckchen aus der Gießvorrichtung in die Lösung gleiten lassen. Anschließend wurde die Probe im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.5.3 Lyse II

Für die Lyse II der Bakterien-DNA in den Agaroseblöckchen wurde eine Lysislösung II (ESP-Lösung) hergestellt. Dazu wurde je 1 ml ES-Lösung pro Agaroseblöckchen mit je 2 µl Proteinase K pro Agaroseblöckchen vermischt.

Je 1 ml Lysislösung I wurde in eine saubere Eppendorftube gegeben und das Agaroseblöckchen aus der Lysislösung I in die ESP-Lösung überführt. Anschließend wurde die Probe im Brutschrank bei 56 °C über Nacht inkubiert.

2.2.5.4 Waschen

Um die Enzyme und Elektrolyte der Lysislösungen I und II aus den Agaroseblöckchen zu entfernen, wurden diese nun gereinigt. Dazu wurden die einzelnen Blöckchen zunächst in 10 ml steriles Aqua bidest. überführt, welches bei 56 °C vorgewärmt worden war. Die Proben wurden dann für 15 min auf dem Schüttler

bei einer Frequenz von 100 / min gewaschen. Nach 15 min wurde das Aqua bidest. gegen neues steriles, ebenfalls 56 °C warmes Aqua bidest. ausgetauscht und erneut 15 min geschüttelt. Anschließend wurden die Blöckchen in 10 ml 56 °C warmen TE-Puffer überführt und wiederum 15 min geschüttelt. Dieser Vorgang wurde mit jeweils frischem TE-Puffer insgesamt viermal wiederholt.

Die Blöckchen konnten nun direkt der Äquilibration zugeführt oder bis zur weiteren Verwendung bei -4 °C im Kühlschrank verwahrt werden.

2.2.5.5 Restriktionsverdau

Um die Blöckchen an das Milieu des Restriktionsenzymes zu gewöhnen, erfolgt zunächst eine Äquilibration: Dazu wurde der Restriktionspuffer A 1:10 mit sterilem Aqua bidest. verdünnt, und die Agaroseblöckchen anschließend nach Entfernung des TE-Puffers in je 600 µl dieser Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Pufferlösung entfernt und die Blöckchen in eine Restriktionslösung aus je 120 µl 1:10-verdünntem Puffer A, versetzt mit 5 µl *Sma I*, gegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, die Blöckchen vollständig mit der Restriktionslösung zu bedecken, um zu gewährleisten, dass das Enzym ungehindert in das Blöckchen diffundieren konnte. Das Enzym wurde erst kurz vor Start der Restriktion zum Puffer hinzugegeben, um einer Denaturierung vorzubeugen.

Die Proben wurden über Nacht bei 25 °C inkubiert.

2.2.5.6 Herstellung des Gels

Für die Elektrophorese wurden 2 l 0,5 x TBE-Puffer hergestellt, indem zu 100 ml des 10 x konzentrierten TBE-Puffers 1,9 l Aqua bidest. hinzugegeben wurden. Da die Elektrophoresekammer bei einer Temperatur von 14 °C arbeitet, wurde der TBE-Puffer auf dieser Temperatur im Kühlschrank vorgekühlt. Ein 1-prozentiges Gel wurde hergestellt, indem 1,4 g SEAKEM Gold Agarose in 140 ml 0,5 x TBE-Puffer gelöst und bei 100 °C aufgeköcht wurden. Die Agarose wurde anschließend im Wasserbad auf 60 °C abgekühlt, mit 14 µl RED Safe-Farbstoff versetzt und gut vermischt. Eine dünne Plastikplatte als Unterlage für das Gel

und der Kamm zur Platzierung der Geltaschen wurden in die Gelkammer eingesetzt und die flüssige Agarose luftblasenfrei in die Kammer gegossen. Um zu verhindern, dass sich Staubpartikel auf dem Gel sammelten, wurde dieses abgedeckt und bei Raumtemperatur für 30 min lang erkalten lassen. 2 ml flüssiger Agarose wurden zum späteren Verschließen der Geltaschen im Brutschrank bei 56 °C aufbewahrt.

Inzwischen wurde der Restriktionsverdau gestoppt, indem das Enzym von den Blöckchen entfernt und 0,5 x TBE-Puffer hinzugegeben wurde.

Nach 30 min wurde der Kamm aus dem erkalteten Gel entfernt. Die entstandenen Geltaschen wurden mithilfe einer Pipette vollständig mit 0,5 x TBE- Puffer befüllt, sodass die Agaroseblöckchen leichter hineingleiten können und keine Luftblasen entstehen. Dann wurden die Gelblöckchen mithilfe eines Spatels in die Taschen überführt. An die erste Position des Gels wurde stets ein Marker gesetzt, der die Beurteilung der Größenverhältnisse der Banden ermöglichte. Mithilfe eines saugfähigen Papiers wurde überschüssiger TBE-Puffer entfernt und die Taschen mit der restlichen 1-prozentigen SEAKEM-Gold-Agarose verschlossen, um die Blöckchen vor Scherkräften zu schützen.

Das erkaltete Gel wurde nun in die PGFE-Kammer eingebracht, indem die Unterlegplatte in den Rahmen eingesetzt wurde. Dann wurde das Gel mit 2 l TBE-Puffer vollständig bedeckt und die Elektrophorese konnte gestartet werden.

Für die Elektrophorese wurden folgende Programmeinstellungen verwendet:

Tabelle 14: PFGE-Einstellungen für Enterokokken-DNA.

Block 1	5-35 s
Block 2	-
Spannung	6,0 V/cm
Winkel	120 °
Umwälzrate der Pumpe	100 %
Kühltemperatur im Mini-Chiller	14 °C
Laufzeit	20 h

Nach 20 Stunden Laufzeit wurde das Gel aus der PFGE-Kammer entnommen, vom TBE-Puffer befreit und unter UV-Licht fotografiert. Hierfür wurde das Photodokumentationssystem Vision Capt (Vilber Lourmat) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Qualität von Selektiv-Indikatormedien und PCR zum Nachweis von VRE in Rektalabstrichen

3.1.1 Beschreibung des Untersuchungsmaterials

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die diagnostische Güte von drei unterschiedlichen Selektiv-Indikatormedien sowie einer PCR-basierten Strategie für den Nachweis von VRE in Rektalabstrichen vergleichend zu untersuchen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden insgesamt 365 Rektalabstriche von 155 Patienten der Klinik für Intensivmedizin oder Stationen, die zur Klinik für Stammzelltransplantationen des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gehören, im Zeitraum Juli bis Dezember 2014 prospektiv untersucht. Insgesamt wurden 305 Proben von Patienten der Klinik für Stammzelltransplantationen gewonnen, 60 von Patienten der Klinik für Intensivmedizin. Bei den Proben handelte es sich sowohl um Material des routinemäßigen Patientenscreenings auf multiresistente Erreger, einschließlich VRE, bei Neu-/Wiederaufnahme als auch um die Proben des wöchentlichen Routine-Screenings (nur auf den Stationen der Klinik für Stammzelltransplantation).

Aus dem eSwab-Medium der Rektalabstriche erfolgte zunächst eine Anreicherungskultur in VRE-Bouillon. Diese wurde nach Übernachtkultur auf drei unterschiedlichen Selektiv-Indikatormedien ausgestrichen: VRE-Selektivagar, Brilliance VRE Agar und chromID VRE Agar. Bei VRE-verdächtigem Wachstum auf einer dieser Platten wurden entsprechende Kolonien gepickt, auf Blutagar subkultiviert und anschließend weiter charakterisiert. Diese Charakterisierung umfasste Spezies-Identifikation mittels MALDI-TOF, sowie Vancomycin- und Teicoplanin-Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test.

Eine *vanAB*-PCR wurde durch Mitarbeiter der Routine-Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene auf Basis der Anreicherungsbrühe durchgeführt. Diese erfolgte stets im Rahmen der Routine-Diagnostik sofort nach Bebrütung der VRE-Anreicherungs-Bouillon.

3.1.2 Prävalenz *vanA*- und *vanB*-tragender *E. faecium* und *E. faecalis* im Untersuchungsgut

In die Untersuchung wurden 365 Proben eingeschlossen. Bei allen Proben wurde die Anwesenheit *vanA*- und *vanB*-tragender Enterokokken in der Anreicherungsbrühe mittels einer *vanA*- und *vanB*-real-time-PCR bestimmt (Fang et al., 2011). Als Referenz wurde der kulturelle Nachweis von VRE auf mindestens einem der drei verwendeten Selektiv-Indikatormedien gewertet.

35 von 365 Proben waren *vanAB*-PCR positiv (9,59 %). Der positive PCR-Befund konnte in 30 von 35 Fällen kulturell bestätigt werden. Die VRE-Prävalenz betrug somit 30/365 (8,22 %). In 26 der 35 *vanAB*-positiven Proben konnte *vanA* nachgewiesen werden (74,29 %). Von diesen ließ sich in einer Probe kulturell die Anwesenheit von VRE nicht bestätigen. Damit betrug die tatsächliche *vanA*-Prävalenz im untersuchten Kollektiv 25/365 (6,85 %). Neun der 35 *vanAB*-positiven Proben (25,71 %) lieferten in der PCR ein *vanB*-positives Ergebnis. Von diesen ließen sich jedoch nur in fünf Proben die Anwesenheit von VRE kulturell bestätigen, sodass die tatsächliche *vanB*-Prävalenz 5/365 (1,37 %) betrug. Alle in dieser Untersuchung *van*-positiv getesteten Enterokokken waren der Spezies *E. faecium* zuzuordnen.

3.2 Validation der PCR gegenüber dem Kulturbefund der Anreicherungsbrühe

Sowohl die *vanA*- als auch die *vanB*-PCR besaßen eine Sensitivität und ebenso einen *NPV* von 100 %. Enterokokken, die ein *van*-Resistenzgen aufwiesen, konnten also in jedem Fall mit dieser molekulargenetischen Methode detektiert werden. Es zeigte sich, dass beide PCR-Formen jeweils eine Spezifität nahe 100 % aufwiesen, die *vanA*-PCR jedoch eine um 0,82 % höhere Spezifität besaß als die *vanB*-PCR (vergleiche Tabelle 15). Der *PPV* betrug für *vanA* 96,12 %, für *vanB* nur 55,56 %. Insgesamt ergaben sich für die *vanAB*-PCR eine Spezifität von 98,51 % und ein *PPV* von 85,71 %.

Tabelle 15: Validierung *vanAB*-PCR im Vergleich zur Routine-Kultur aus der Anreicherungsbrühe: Darstellung von Sensitivität, Spezifität, *PPV* und *NPV* der *vanAB*-PCR. Insgesamt wurden 365 unabhängige Proben analysiert.

	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	<i>PPV</i> (%)	<i>NPV</i> (%)
<i>vanA</i> -PCR	100 (95% KI 100)	99,71 (95% KI 99,2–100)	96,12 (95% KI 94,2–98,1)	100 (95% KI 100)
<i>vanB</i> -PCR	100 (95% KI 100)	98,89 (95% KI 97,8–100)	55,56 (95% KI 50,5–60,6)	100 (95% KI 100)
<i>vanAB</i> -PCR gesamt	100 (95% KI 100)	98,51 (95% KI 97,3–99,7)	85,71 (95% 82,1–89,3)	100 (95% KI 100)

3.2.1 Kulturelle VRE- Anzucht aus der Anreicherungsbrühe

Als positives Wachstum auf den Selektivnährmedien wurde jede Form der Koloniebildung gewertet. Auf die Möglichkeit, anhand der charakteristischen Färbung auf das Vorliegen von *E. faecalis* und *E. faecium* rückzuschließen, wurde verzichtet. Eine Übersicht ist in Tabelle 16 dargestellt.

Der VRE-Selektivagar zeigte in 175 Fällen (47,95 %) bakterielles Wachstum aus der ausplattierten Anreicherungsbrühe an. Bei 97 (26,6 %) der 365 Proben konnten Enterokokken identifiziert werden, von denen sich nur 30 in der Speziesidentifikation als VRE bestätigten. Der Anteil an VRE lag unter den Enterokokken somit bei 30,9 %, der Anteil an jeglichem bakteriellen Wachstum lag bei 17,14 % (30 / 175). Unter den nachgewiesenen Enterokokkenspezies waren *E. faecium* (n=51; 30 x VRE, 21 x Non-VRE), *E. faecalis* (n=38 Non-VRE), *E. gallinarum* (n=7 Non-VRE), *E. casseliflavus* (n=1 Non-VRE).

Beim Brilliance VRE Agar zeigte sich bei 84 von 365 Proben (23,01 %) bakterielles Wachstum. Insgesamt 108-mal wurden dabei Enterokokkenspezies detektiert, darunter *E. faecium* (n=52), *E. faecalis* (n=55) und *E. gallinarum* (n=1). Bei Betrachtung dieser Zahlen ist zu berücksichtigen, dass auf zahlreichen Nährböden mehrere Enterokokkenspezies zu finden waren. In sieben Proben fanden sich sowohl *E. faecium* als auch *E. faecalis*. In 30 Proben (27,78 %) waren die nachgewiesenen Enterokokken Vancomycin-resistent.

Auf dem chromID VRE Agar konnte bei 45 von 365 Proben (12,33%) bakterielles Wachstum nachgewiesen werden. 37-mal wurden Enterokokken detektiert. Wesentlich häufiger wurde dabei die Spezies *E. faecium* (n=31) als *E. faecalis* (n=6) gefunden. Wie bei den anderen Nährmedien waren unter den Enterokokken 30 (81,08 %) Vancomycin-resistent; dies entsprach einem Anteil von 66,67 % am gesamten bakteriellen Wachstum (vergleiche Abbildung 5 und Abbildung 6). Insgesamt betrug der Anteil Vancomycin-resistenter Isolate unter allen 365 Proben 8,22 %.

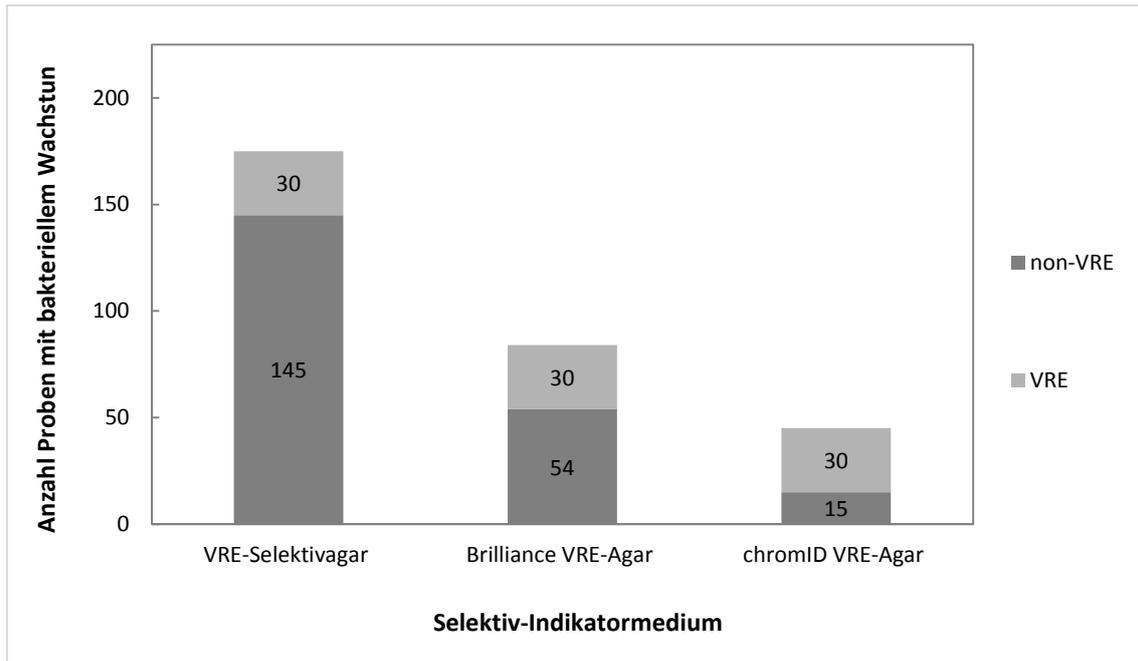


Abbildung 5: Darstellung des Nachweises von bakteriellem Wachstum auf VRE-Selektiv-Indikatormedien: Nach Anreicherung wurden VRE-Selektivagar, Brilliance VRE Agar und chromID VRE Agar inokuliert und nach 48 Stunden Inkubation das Wachstum von Bakterien dokumentiert. Insgesamt wurden 365 unabhängige Proben analysiert.

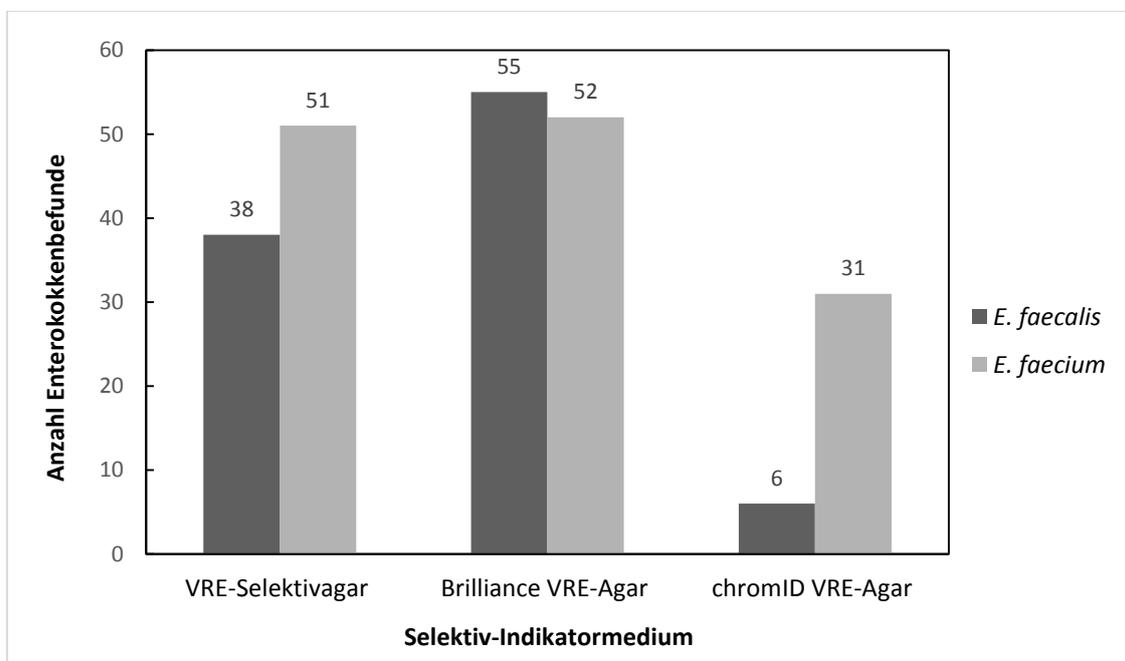


Abbildung 6: Darstellung des Nachweises von *E. faecium* und *E. faecalis* auf VRE Selektiv-Indikatormedien: Nach Anreicherung wurden VRE-Selektivagar, Brilliance VRE Agar und chromID VRE Agar inokuliert und nach 48 Stunden

Inkubation des Wachstums *E. faecium* und *E. faecalis* dokumentiert. Insgesamt wurden 365 unabhängige Proben analysiert.

Auf den bewachsenen Platten war bei einigen Kolonien bereits durch Beurteilung der Morphologie zu vermuten, dass es sich nicht um Enterokokken handeln würde. So zeigten sich zum Beispiel einige Kolonien auf dem chromID VRE Agar in grüner Farbe oder als weiße Kolonien. Diese Kolonien konnten im Nachgang mittels MALDI-TOF als *Candida spp.* diskriminiert werden.

Auf dem VRE-Selektivagar ließ sich eine morphologische Voreinschätzung häufig nicht vornehmen, da auch Enterokokken mit intrinsischer Vancomycin-Resistenz und einige Vertreter der Spezies *Lactobacillus* zur typischen Schwarzfärbung des Agars führen. In der Tat konnten auf diesem Medium die meisten unterschiedlichen Non-VRE-Bakterienspezies identifiziert werden. Besonders häufig traten auf diesem Nährmedium *Pediococcus spp.* (n=22) und *Lactobacillus spp.* (n=66), weiterhin auch verschiedene *Candida*-Spezies (n=22), andere Gram-positive Kokken wie *Leuconostoc lactis* (n= 5), *S. haemolyticus* (n=7), *S. epidermidis* (n=1) und *S. hominis* (n=3) und vereinzelt Gram-negative Erreger wie *P. aeruginosa* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1) und *Morganella morganii* (n=2) auf.

Beim Brilliance VRE Agar zeigte sich eine deutlich geringere Variabilität in der Begleitflora als beim Äskulin-basierten VRE-Selektivagar: Enterokokken mit intrinsischer Vancomycin-Resistenz konnten nur in einem Fall nachgewiesen werden (*E. gallinarum*). *Pediococcus spp.* wurden sechsmal, *Lactobacillus spp.* dreimal detektiert. Als weitere Gram-positive Erreger traten *S. haemolyticus* (n=14) und *S. epidermidis* (n=1) auf. Gram-negative Keime und Hefen wurden nur in je einem Fall nachgewiesen (*C. glabrata*, *Morganella morganii*).

Die geringste Variabilität der Begleitflora zeigte der chromID VRE Agar. Hier traten in 13 Proben verschiedene *Candida*-Spezies auf (*C. albicans* (n=7), *C. glabrata* (n=1), *C. krusei* (n=2), *C. parapsilos* (n=2), *C. tropicalis* (n=1)). In elf Fällen konnten andere Gram-positive Spezies, darunter *S. haemolyticus* (n=4), *Pediococcus spp.* (n=6) und *Lactobacillus sp.* (n=1) angezüchtet werden.

Tabelle 16: Diversität der Kultur aus der Anreicherungsbrühe: Darstellung aller detektierten Bakterienspezies auf VRE-Selektivagar, Brilliance VRE-Agar und chromID VRE Agar. Insgesamt wurden 365 unabhängige Proben analysiert.

Spezies	VRE-Selektivagar	in %	Brilliance VRE Agar	in %	chromID VRE Agar	in %
Wachstum	175	47,9%	84	23,0%	45	12,3%
<i>Enterococcus</i> sp. gesamt	97	26,6%	108	29,6%	37	10,1%
<i>E. casseliflavus</i>	1	0,3%	0		0	-
<i>E. faecalis</i>	38	10,4%	55	15,1%	6	1,6%
<i>E. faecium</i>	51	14,0%	52	14,2%	31	8,5%
<i>E. gallinarum</i>	7	1,9%	1	0,3%	0	-
VRE	30	8,2%	30	8,2%	30	8,2%
<i>Candida</i> sp. gesamt	22	6,0%	1	0,3%	13	3,6%
<i>C. albicans</i>	15	4,1%	0	-	7	1,9%
<i>C. glabrata</i>	1	0,3%	1	0,3%	1	0,3%
<i>C. krusei</i>	2	0,5%	0	-	2	0,5%
<i>C. parapsilos</i>	3	0,8%	0	-	2	0,5%
<i>C. tropicalis</i>	1	0,3%	0	-	1	0,3%
Gram-negative Erreger						
<i>Morganella morganii</i>	2	0,5%	1	0,3%	2	0,5%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,3%	0	-	0	1,0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,3%	0	-	0	-
weitere Gram-positive Erreger						
<i>S. epidermidis</i>	1	0,3%	1	0,3%	0	-
<i>S. haemolyticus</i>	7	1,9%	14	3,8%	4	1,1%
<i>S. hominis</i>	3	0,8%	0	-	0	-
<i>Pediococcus</i> sp. (gesamt)	22	6,0%	6	1,6%	6	1,6%
<i>Pediococcus acidilactici</i>	15	4,1%	5	1,4%	4	1,1%
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	7	1,9%	1	0,3%	2	0,5%
<i>Lactobacillus</i> spp.	66	18,1%	3	0,8%	1	0,3%
<i>Leuconostoc lactis</i>	5	1,4%	0	-	0	-

3.2.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die diagnostische Güte unterschiedlicher VRE-Screeningmedien

Bakterienwachstum ist abhängig von der Dauer der Bebrütungszeit. So benötigen die zu detektierenden Enterokokken zwischen 24 und 48 Stunden, um auf den Nährmedien zu wachsen. Längere Bebrütungszeiten fördern in der Regel das Wachstum zusätzlicher Bakterienspezies, können aber grundsätzlich auch zu einer Erhöhung der diagnostischen Sensitivität beitragen. Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die Sensitivität und Spezifität zu messen, wurde bei 127 von 365 Proben nach jeweils 24 und 48 Stunden das Bakterienwachstum auf den drei Selektiv-Indikatormedien begutachtet.

Die Sensitivität aller drei Medien betrug nach 48 Stunden 100 %. Befand sich also in der Probe des Patienten ein VRE, der sich über die PCR und die Routine-Kultur bestätigen ließ, konnte dieser in jedem Fall nach 48 Stunden Bebrütungszeit auf allen drei Selektiv-Indikatormedien angezüchtet werden. Somit lag bei jedem der Screening-Medien der *Negative Predictive Value (NPV)* ebenfalls bei 100 %.

Nach 24 Stunden Bebrütungszeit wies der VRE-Selektivagar bereits eine 100-prozentige Sensitivität für den VRE-Nachweis auf. Mittels Brilliance VRE- und chromID VRE Agar gelang die Anzucht des VRE-Isolats bei jeweils einer Probe erst nach 48 Stunden Inkubation. Damit lag die Sensitivität nach 24 Stunden hier für beide Medien bei 92,3 % (95 % KI 87,7–96,9 %). Der chromID VRE Agar und Brilliance VRE Agar zeigten mit 99,02 % (95 % KI 97,3–100 %) und 98,98 % (95 % KI 97,2–100 %) nach 24 Stunden ähnliche *NPV*.

Die Spezifität betrug nach 24 Stunden für den VRE-Selektivagar 59,13 % (95 % KI 50,6–67,6 %), für den Brilliance VRE Agar 85,1 % (95 % KI 78,9–91,3 %) und für den chromID VRE Agar 88,6 % (95 % KI 83,1–94,1 %). Für alle drei Selektiv-Indikatormedien sanken die Spezifitäten nach 48 Stunden Inkubationszeit, beim VRE-Selektivagar auf 36,52 % (95 % KI 28,2–44,9 %), beim Brilliance VRE Agar auf 66,96 % (95 % KI 58,8–75,1 %) und beim chromID VRE Agar auf 81,7 % (95 % KI 75,1–88,4 %).

Die größte Differenz in der Spezifität bei 24 oder 48 Stunden Inkubation wies mit 22,6 % Abweichung der VRE-Agar auf, gefolgt vom Brilliance VRE Agar mit 18,1 %. Beim chromID VRE Agar betrug die Differenz nur 6,9 % (vergleiche Tabelle 17).

Der *Positive Predictive Value* des VRE-Selektivagars betrug nach 24 Stunden Bebrütungszeit 20,3 % (95 % KI 13,4–27,3 %), der des Brilliance VRE Agars 41,4 % (95 % KI 32,9–49,9 %) und der des chromID VRE Agars 48,0 % (95 % KI 39,4–56,6 %). Nach 48 Stunden Bebrütungszeit ergaben sich folgende Werte: VRE-Selektivagar 14,1 % (95 % KI 8,1–20,1 %), Brilliance VRE Agar 24,0 % (95 % KI 16,6–31,4 %), chromID VRE Agar 36,4 % (95 % KI 28,04–44,7 %).

Damit betragen die Differenzen für den *PPV* bei 24 oder 48 Stunden Inkubationszeit für den VRE-Selektivagar 6,22 %, für den Brilliance VRE-Agar 17,38 % und für den chromID VRE-Agar 11,64 %.

Tabelle 17: Analytische Performance von VRE-Screeningmedien nach 24- und 48-stündiger Inkubation.

	VRE-Selektivagar ^a		Brilliance VRE Agar ^a		chromID VRE Agar ^a	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Sensitivität (%)	100 (95% KI 100)	100 (95% KI 100)	92,31 (95%KI 87,7–96,2)	100 (95% KI 100)	92,31 (95%KI 87,7–96,2)	100 (95% KI 100)
Spezifität (%)	59,13 (95%KI 50,6–67,6)	36,52 (95%KI 28,2–44,9)	85,09 (95%KI 78,92–91,25)	66,96 (95%KI 58,8–75,1)	88,60 (95%KI 83,1–94,1)	81,74 (95%KI 75,1–88,4)
PPV (%)	20,34 (95%KI 13,4–27,3)	14,12 (95%KI 8,1–20,41)	41,38 (95%KI 32,86–49,9)	24,00 (95%KI 16,6–31,4)	48,00 (95%KI 39,4–56,6)	36,36 (95%KI 28,0–44,7)
NPV (%)	100 (95% KI 100)	100 (95% KI 100)	98,98 (95%KI 97,2–100)	100 (95% KI 100)	99,02 (95%KI 97,3–100)	100 (95% KI 100)

^a Nach Anreicherung wurden VRE-Selektivagar, Brilliance VRE Agar und chromID VRE Agar inkuliert und nach 24 und 48 Stunden Inkubation das Wachstum dokumentiert. Insgesamt wurden 127 unabhängige Proben analysiert.

3.2.3 Vergleich der diagnostischen Güte unterschiedlicher VRE Screeningmedien nach 48-stündiger Inkubation

Die Auswertung aller 365 Proben, die in die Untersuchung eingeschlossen wurde, ergab für den Ablesezeitpunkt 48 Stunden die höchste Spezifität für den chromID VRE Agar mit 95,3 % (95 % KI 93,1–97,4 %), gefolgt vom Brilliance VRE-Agar mit 82,1 % (95 % KI 78,2–86,3 %). Die geringste Spezifität wies der aktuell in der Routine-Diagnostik verwendete VRE-Selektivagar mit 56,7 % (95 % KI 51,6–61,7 %) auf. Für den *Positive Predictive Value (PPV)* ergaben sich folgende Werte: VRE-Selektivagar: 17,1 % (95 % KI 13,3–21,0 %), Brilliance VRE-Agar: 35,7 % (95 % KI 30,8–40,6 %) und chromID VRE Agar: 66,7 % (95 % KI 61,9–71,5 %). Sensitivität und *NPV* betragen bei allen drei Screeningmedien 100 %. Alle Ergebnisse dieses Abschnittes waren statistisch signifikant (vergleiche Tabelle 18).

Tabelle 18: Validierung der Selektiv-Indikatormedien im Vergleich zur Kombination von Routine-Kultur und *van*-PCR aus der Anreicherungsbrühe nach 48 Stunden Inkubationszeit.

	VRE-Selektiv- agar	Brilliance VRE Agar	chromID VRE Agar
Sensitivität (%)	100 (95% KI 100)	100 (95% KI 100)	100 (95% KI 100)
Spezifität (%)	56,72 (95% KI 51,6–61,7)	82,12 (95% KI 78,2–86,3)	95,28 (95% KI 93,1–97,4)
PPV (%)	17,14 (95% KI 13,3–21,0)	35,71 (95% KI 30,8–40,6)	66,67 (95% KI 61,9–71,5)
NPV (%)	100 (95% KI 100)	100 (95% KI 100)	100 (95% KI 100)

3.3 Verteilung der Minimalen Hemmkonzentrationen für Vancomycin und Teicoplanin in der Population

Für alle Enterokokken-Isolate aus den 365 Proben, die auf den Screeningmedien angezüchtet werden konnten, wurden Empfindlichkeitstestungen für Vancomycin

und Teicoplanin durchgeführt. Dabei wurden einige *E. faecalis*-Isolate als intermediär empfindlich gegenüber Vancomycin getestet (MHK_{VA} 4 mg/l). Intermediäre *E. faecium*-Isolate traten nicht auf. Auf dem chromID VRE Agar traten vier solcher *E. faecalis*-Isolate auf, auf dem VRE-Selektivagar waren es zehn und auf dem Brilliance VRE Agar sechzehn (vergleiche Tabelle 19).

Tabelle 19: Darstellung des Nachweises von intermediär-getesteten *E. faecalis* Isolaten auf VRE Selektiv-Indikator-Medien.

	Anzahl intermediär-getesteter <i>E. faecalis</i> -Isolate
VRE-Selektivagar	10
Brilliance VRE Agar	16
chromID VRE Agar	4

Es lässt sich beobachten, dass Enterokokken-Isolate mit intermediärem Vancomycin-Resistenzphänotyp am häufigsten durch den Brilliance VRE Agar detektiert wurden.

Bei zwei Empfindlichkeitstestungen zeigten die E-Teste für *E. faecium*-Isolate vom VRE-Selektivagar $MHK_{VA} >256$ mg/l an. Bei diesen Isolaten konnte jedoch kein *van*-Gen in der PCR nachgewiesen werden.

3.4 Untersuchung der Populationsstruktur von kolonisierenden VRE

In diesem Teil der Arbeit sollte die Populationsstruktur kolonisierender Vancomycin-resistenter Enterokokken mittels Pulsfeldgelelektrophorese untersucht werden. Es sollte hierbei geprüft werden, ob und inwiefern die VRE-Kolonisation des menschlichen Darmes sich im Verlauf eines stationären Aufenthaltes verändert. Hierzu wurden im Zeitraum 09.06.2014–24.03.2015 584 rektale Abstriche von 248 Patienten auf VRE untersucht.

In 73 der 584 Proben (12,5 %) wurden VRE nachgewiesen. Diese 73 VRE-positiven Proben konnten 29 Patienten zugewiesen werden. Während von 9 Patienten nur ein VRE-positiver Abstrich vorlag, konnte bei 20 Patienten mehr als ein VRE-positiver Abstrich gewonnen werden. Hierbei konnten von sieben Patienten zwei, von acht Patienten drei VRE-positive Proben, von je zwei Patienten vier und fünf VRE-positive Proben und von einem Patienten sieben VRE-positive Proben gewonnen werden (vergleiche Abbildung 7). Somit konnten insgesamt 63 VRE-positive Proben in die Untersuchung eingeschlossen werden. Die durchschnittliche Anzahl VRE-positiver Proben pro Patient betrug 3,15. Alle Proben stammten aus dem Kollektiv der Patienten der Klinik für Stammzelltransplantation. Bei 62 von 63 Proben gelang die Anzucht von VRE aus den bei -80 °C archivierte Rektalabstrichen. Diese VRE konnten alle der Spezies *E. faecium* zugewiesen werden. Der Zeitraum zwischen Gewinnung der jeweils ersten und letzten Probe der einzelnen Patienten betrug im Mittel 32 Tage. Dabei lag der kürzeste Zeitraum bei vier Tagen, der längste bei 141 Tagen. Der Abstand zwischen der Gewinnung der Abstriche betrug in der Regel sieben Tage, im Minimum einen, im Maximum 105 Tage.

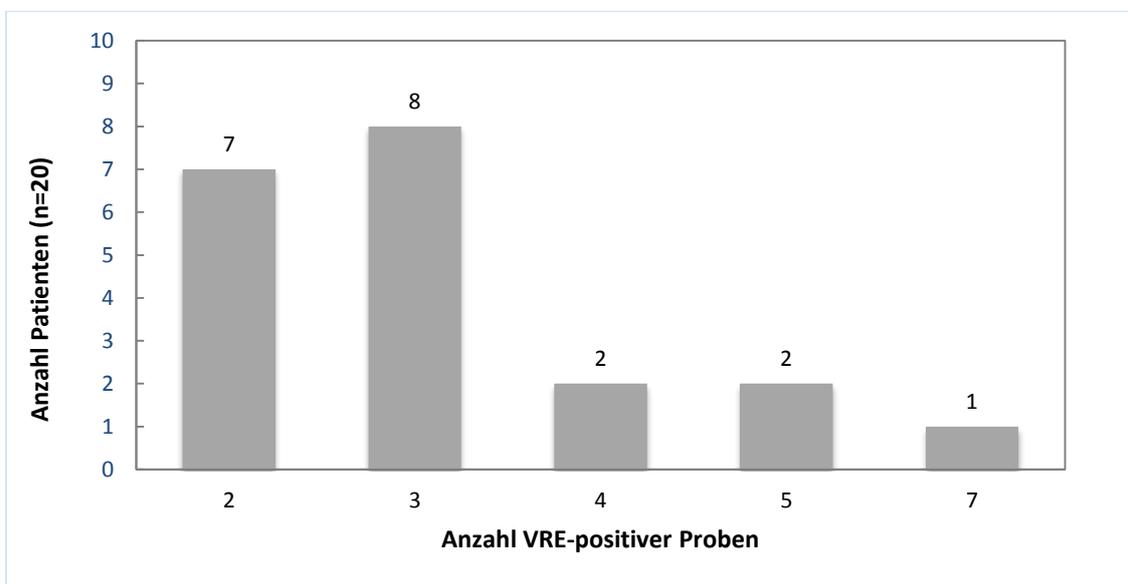


Abbildung 7: Verteilung der Anzahl VRE-positiver Proben im Kollektiv VRE-positiver Patienten mit Verlaufsisolaten: Darstellung der Zahl von Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl gewonnener VRE-positiver Proben.

3.4.1 Prävalenz der *vanA* -/ *vanB*-Typen bei *E. faecium* im Untersuchungskollektiv

Bei allen eingeschlossenen Proben wurde der *van*-Typ mithilfe der *vanA*- und *vanB*-*real-time-PCR* bestimmt. 41 der insgesamt 63 Isolate (65,1 %) waren *vanA*-positiv, bei 22 (34,9 %) konnte *vanB* nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 8).

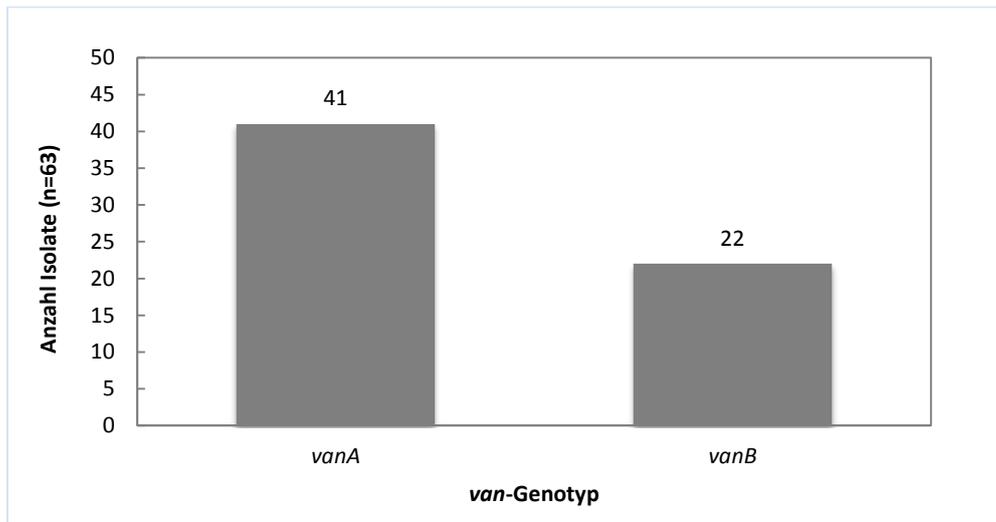


Abbildung 8: Analyse der VRE-Population anhand von *vanAB*-PCR: Darstellung der Verteilung der *van*-Typen unter allen VRE-positiven Proben (n=63) der Patienten mit VRE Verlaufsisolaten (n=20).

Insgesamt waren 12 der 20 eingeschlossenen Patienten (60 %) mit *vanA*-tragenden Enterokokken kolonisiert, 8 (40 %) mit *vanB*-tragenden (vergleiche Abbildung 9). Bei einem Patienten traten sowohl *vanA*- als auch *vanB*-positive-Klone auf.

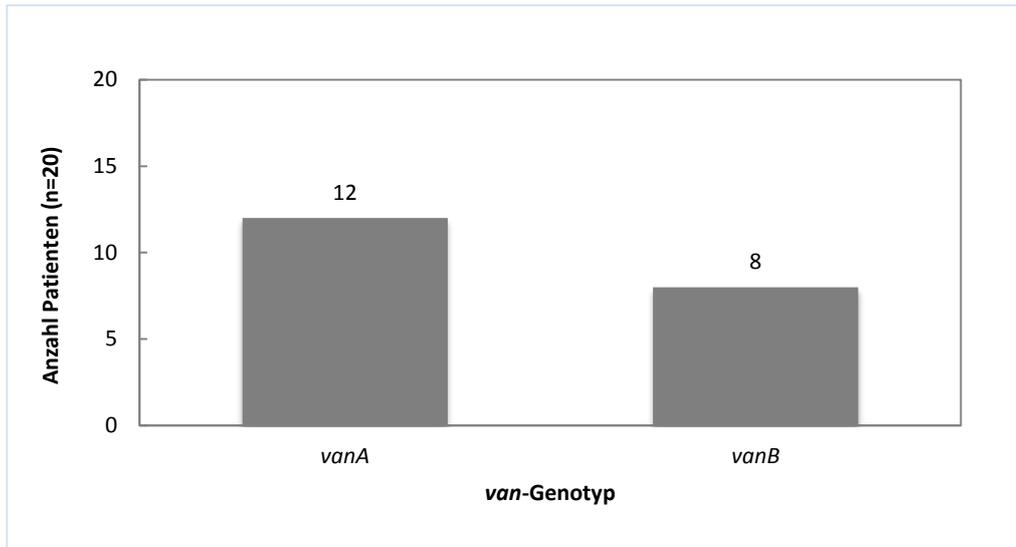


Abbildung 9: Analyse der VRE-Population anhand von *vanAB*-PCR: Darstellung der Verteilung der *van*-Typen unter allen VRE-positiven Patienten mit VRE Verlaufsisolaten (n=20).

3.5 Analyse der klonalen VRE-Struktur mittels PFGE

Es sollte untersucht werden, ob ein Patient über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich mit einem oder möglicherweise mehreren unabhängigen VRE-Pulso-
typen besiedelt war. Durch die longitudinale Analyse sollte zudem untersucht
werden, ob es im zeitlichen Verlauf zu einer Änderung der klonalen Populations-
struktur kommt. Um die parallele Kolonisation mit unterschiedlichen VRE-Pulso-
typen zu analysieren, wurden aus der Kultur eines Abstrichmaterials vierzehn un-
abhängige Kolonien ausgewählt und mittels PFGE analysiert. Bei der Bewertung
der genetischen Verwandtschaft wurden die von Tenover beschriebenen Krite-
rien für die Analyse von PFGE-Mustern zur Anwendung gebracht (Tenover et al.,
1995). Hierbei wird die Zahl differenter Banden bestimmt und als Maß für die
genetische Nähe oder Entfernung verwendet.

Um zu beurteilen, ob die Bandenunterschiede tatsächliche Relevanz bezüglich
des Verwandtschaftsgrades besaßen, wurden weiche und strikte Kriterien zur
Beurteilung der genetischen Verwandtschaft angelegt. Als weiches Kriterium

wurden dabei zwei bis drei Bandenunterschiede als Grenzwert für unterschiedliche VRE-Pulsotypen festgelegt, als strikteres Kriterium eine Anzahl von >7 Bandenunterschieden.

Indem die vierzehn entstandenen Bandenmuster der einzelnen Patientenproben mit denen aus den folgenden Screening-Proben desselben Patienten verglichen wurden, wurde außerdem das Besiedlungsverhalten über den Beobachtungszeitraum beurteilt. Außerdem wurde verglichen, ob zwischen den VRE-Pulsotypen verschiedener Patienten genetische Verwandtschaften bestanden.

62 der 63 VRE-positiven Proben konnten in die Untersuchung eingeschlossen werden. Bei einer Probe gelang keine Anzucht des Erregers aus dem eingefrorenen Material. In 22 von 62 Fällen (35,48 %) konnte bei Anlage weicher Kriterien zur Bewertung der PFGE-Muster mehr als ein PFGE-Typ nachgewiesen werden. Bei Anlage des strikteren Bewertungsmaßstabes von >7 Bandenunterschieden zur Definition genetisch unabhängiger Klone, konnten 11 Proben (17,74 %) identifiziert werden, in denen verschiedene VRE-Pulsotypen auftraten. In den jeweils 40 beziehungsweise 51 weiteren VRE-positiven Proben waren die Bandenmuster der 14 ausgewählten Kolonien jeweils identisch (vergleiche Abbildung 10).

Unter Betrachtung aller VRE-positiven Folgeproben jedes einzelnen der 20 in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten, zeigten unter Anlage der weichen Kriterien elf (55 %), beziehungsweise unter Anlage der strikteren Kriterien fünf Patienten (25 %) eine heterogene Besiedlung mit mehreren VRE-Pulsotypen. Bei den anderen neun (45 %) beziehungsweise 15 Patienten (75 %) wurden keine Veränderungen der VRE-Pulsotypen beobachtet (vergleiche Abbildung 11).

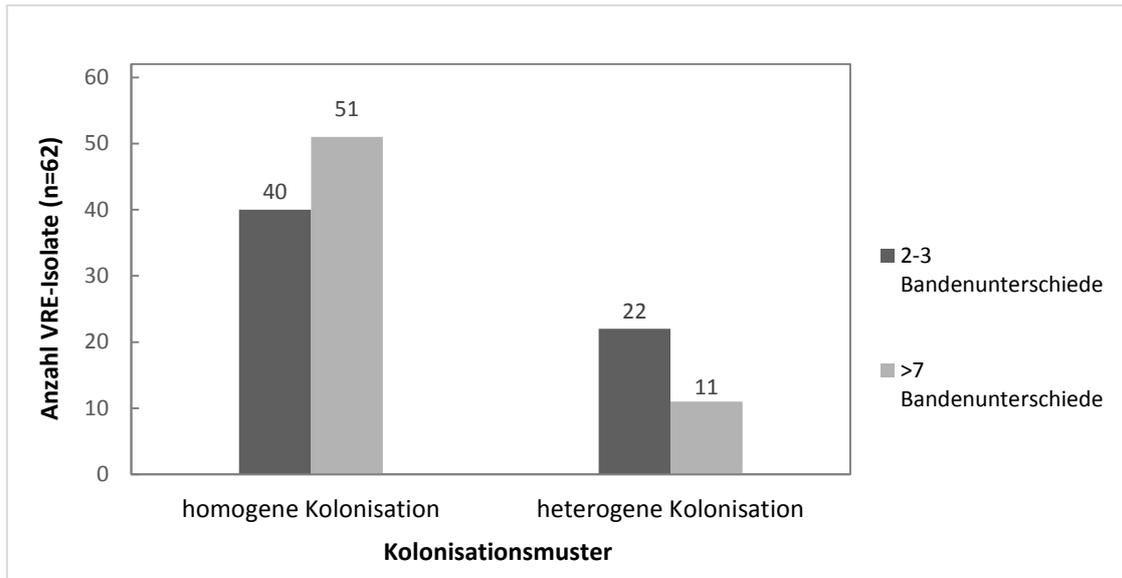


Abbildung 10: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Darstellung der Zahl von Proben, in welchen nur ein Pulsotyp (homogene Kolonisation) oder aber die Präsenz unabhängiger Pulsotypen (heterogene Kolonisation) nachgewiesen werden konnte. Differenzierte Darstellung der Situation bei Anlage weicher (2–3 Bandenunterschiede) sowie strikter (>7 Bandenunterschiede) Kriterien zur Definition genetischer Unabhängigkeit anhand von PFGE-Analysen.

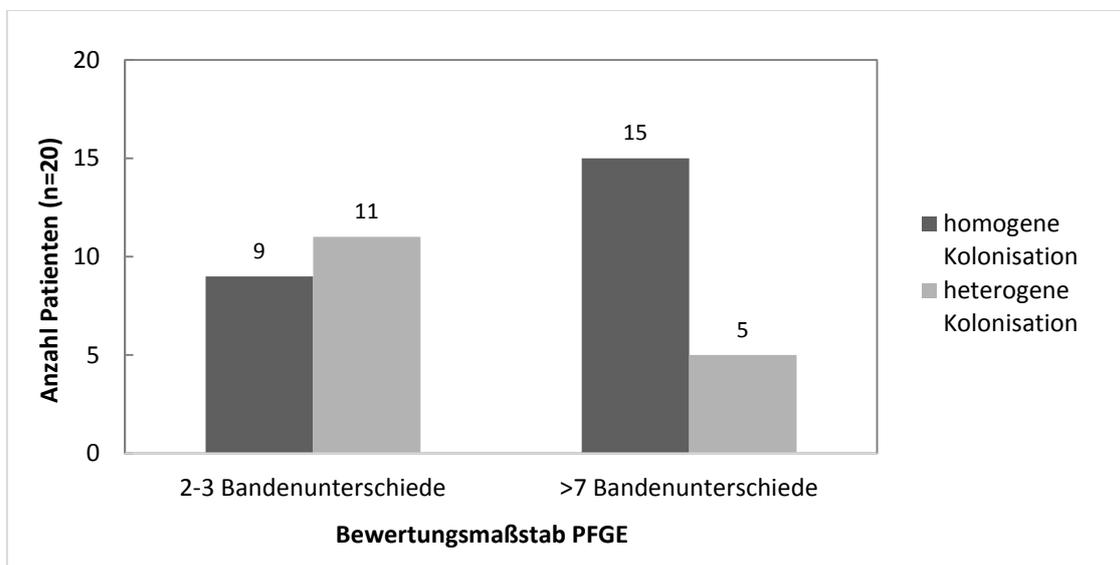


Abbildung 11: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Darstellung der Zahl von Patienten, bei welchen nur ein Pulsotyp (homogene Kolonisation) oder aber die Präsenz unabhängiger Pulsotypen (heterogene Kolonisation) nachgewiesen werden konnte. Differenzierte Darstellung der Situation bei Anlage weicher (2–3 Bandenunterschiede) sowie strikter (>7 Bandenunterschiede) Kriterien zur Definition genetischer Unabhängigkeit anhand von PFGE-Analysen.

Unter Anlage der weichen Kriterien wiesen drei Patienten (15 %) jeweils zwei unterschiedliche VRE-Pulsotypen auf, fünf Patienten (25 %) drei Pulsotypen, und drei Patienten (15 %) sechs Pulsotypen. Wurden als Kriterium für Verwandtschaft >7 Bandenunterschiede zugrunde gelegt, traten bei je einem Patienten zwei, drei und vier unterschiedliche Pulsotypen auf, bei zwei Patienten sechs unterschiedliche Pulsotypen (vergleiche Abbildung 12).

Die Anzahl der verschiedenen PFGE-Typen variierte unter den Patienten mit heterogenem Kolonisationsmuster stark, nämlich von zwei (vergleiche Patient VRE-05-UF) bis zu sechs unterschiedlichen Pulsotypen (vergleiche Patient VRE-14-RL) innerhalb der Folgeisolate (vergleiche Abbildung 13 und Abbildung 14).

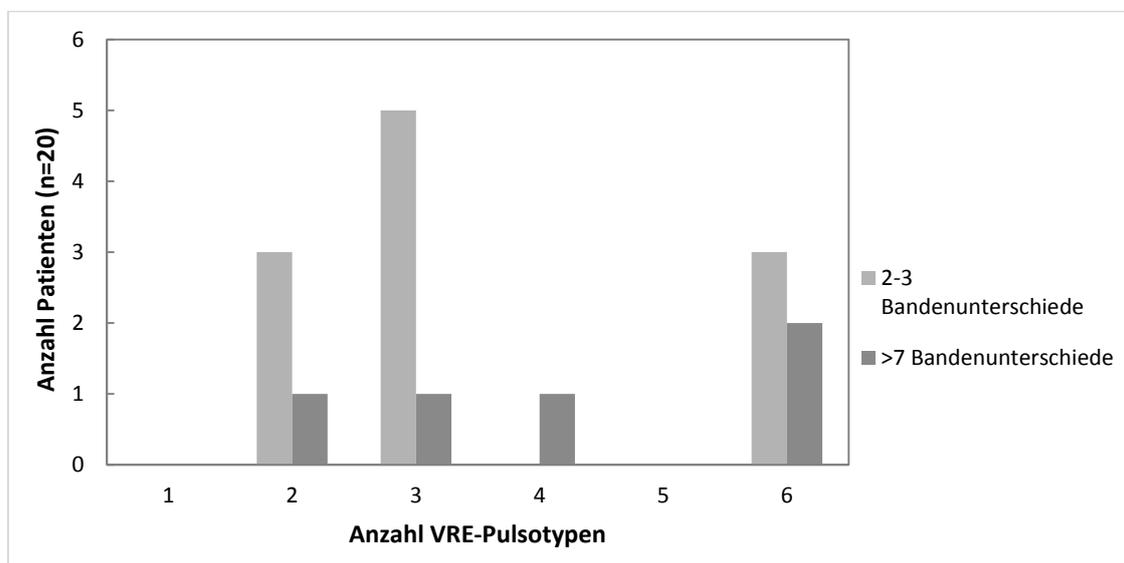


Abbildung 12: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Darstellung der Zahl von Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl unterschiedlicher VRE-Pulsotypen. Differenzierte Darstellung der Situation bei Anlage weicher (2–3 Bandenunterschiede) sowie strikter (>7 Bandenunterschiede) Kriterien zur Definition genetischer Unabhängigkeit anhand von PFGE-Analysen.

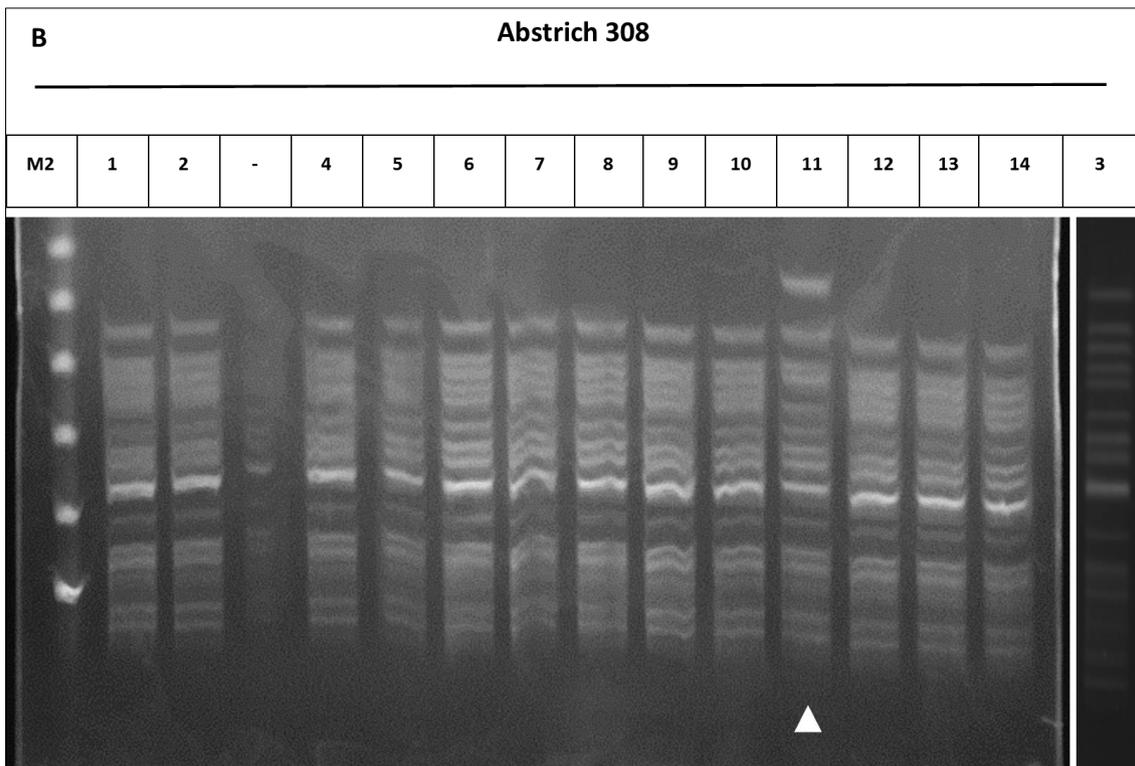
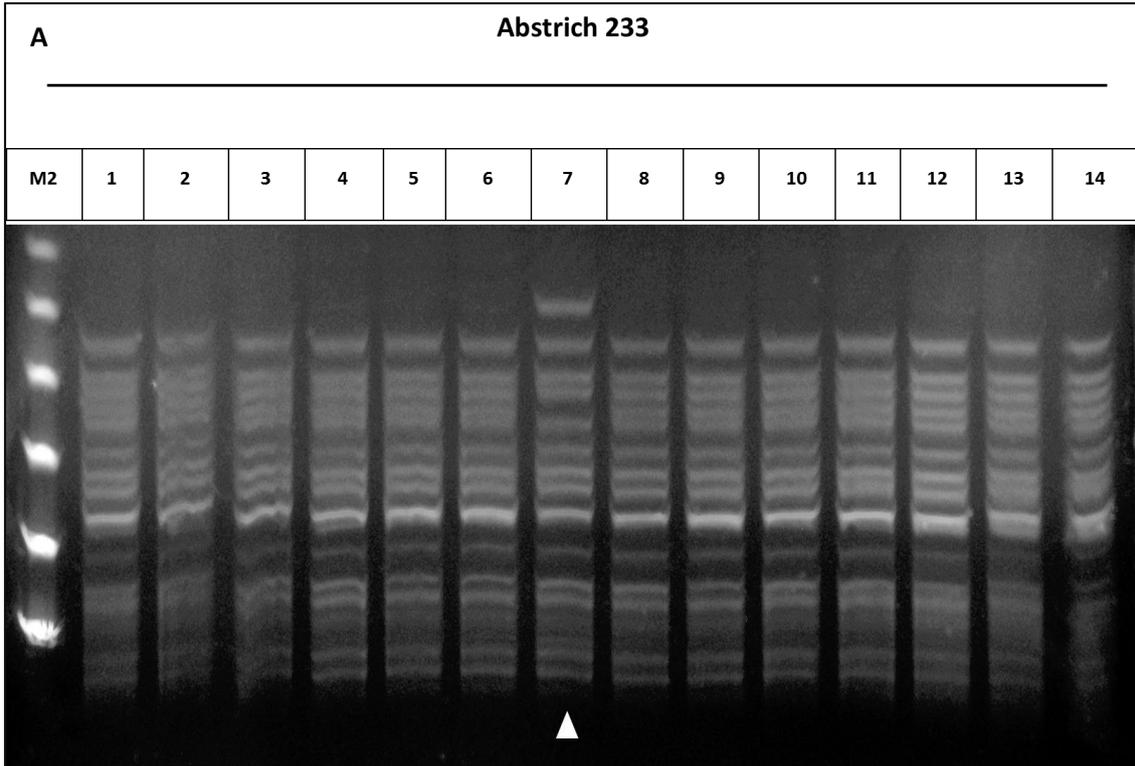
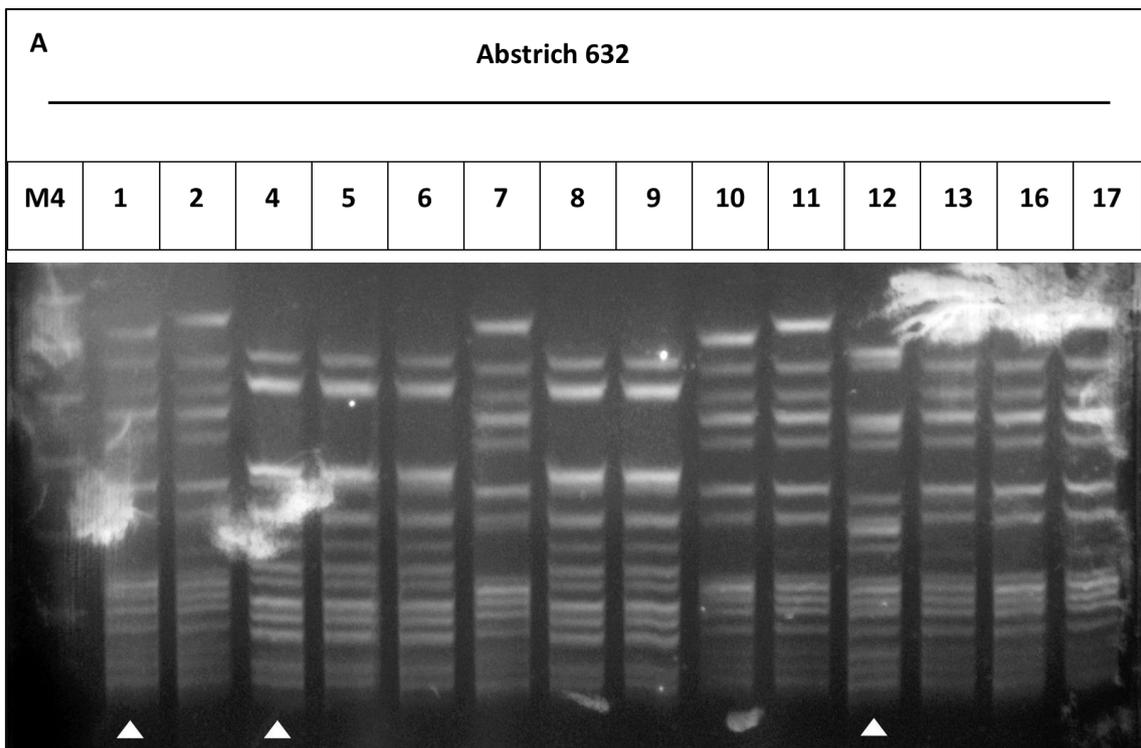


Abbildung 13 A-B: Nachweis von zwei distinkten VRE-Pulsotypen in unabhängig gewonnenen Rektalabstrichen: Je 14 VRE-Isolate (1–14) aus zwei Rektalabstriche desselben Patienten (VRE-05-UF_233 und VRE-05-UF_308)

wurden mittels PFGE analysiert. In beiden Proben konnten je zwei unterschiedliche VRE-Pulsotypen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich ein dominanter PFGE-Typ (jeweils 13/14 Isolaten) sowie ein abweichender PFGE Typ (gekennzeichnet durch weiße Pfeilköpfe). Die PFGE-Muster der dominanten Variante und der sporadischen Variante unterschieden sich zwischen beiden Proben nicht. Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M2: MidRange PFG Marker.



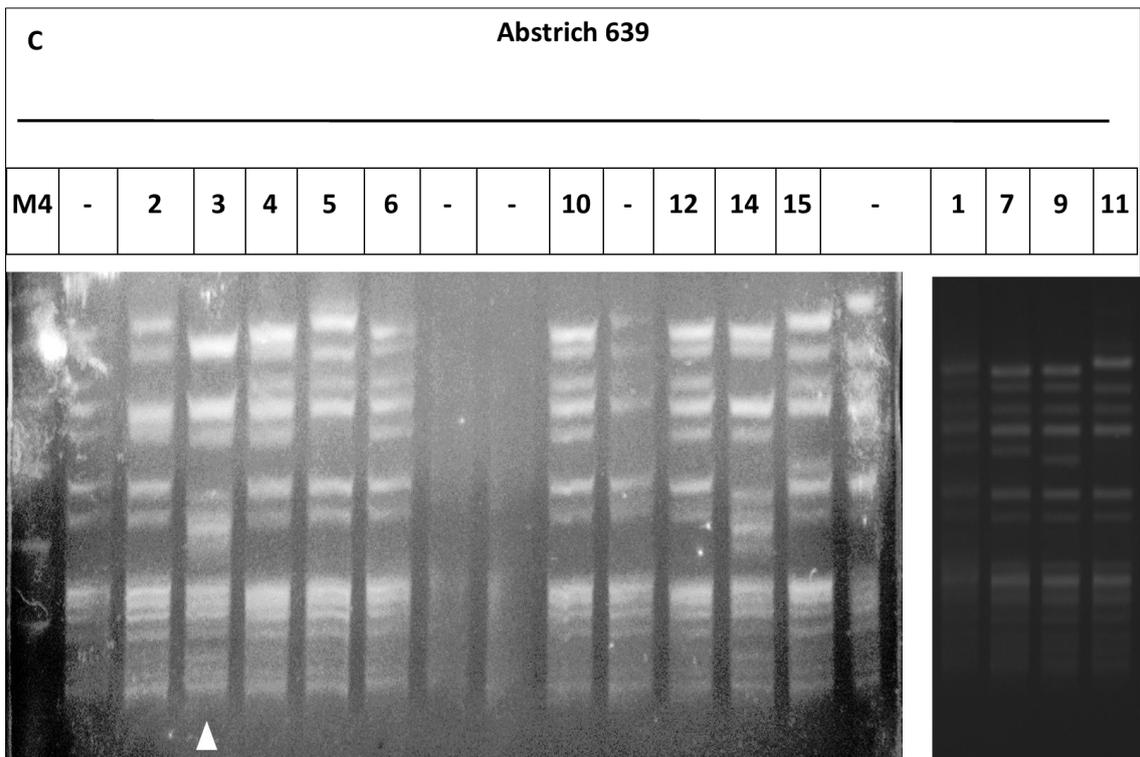
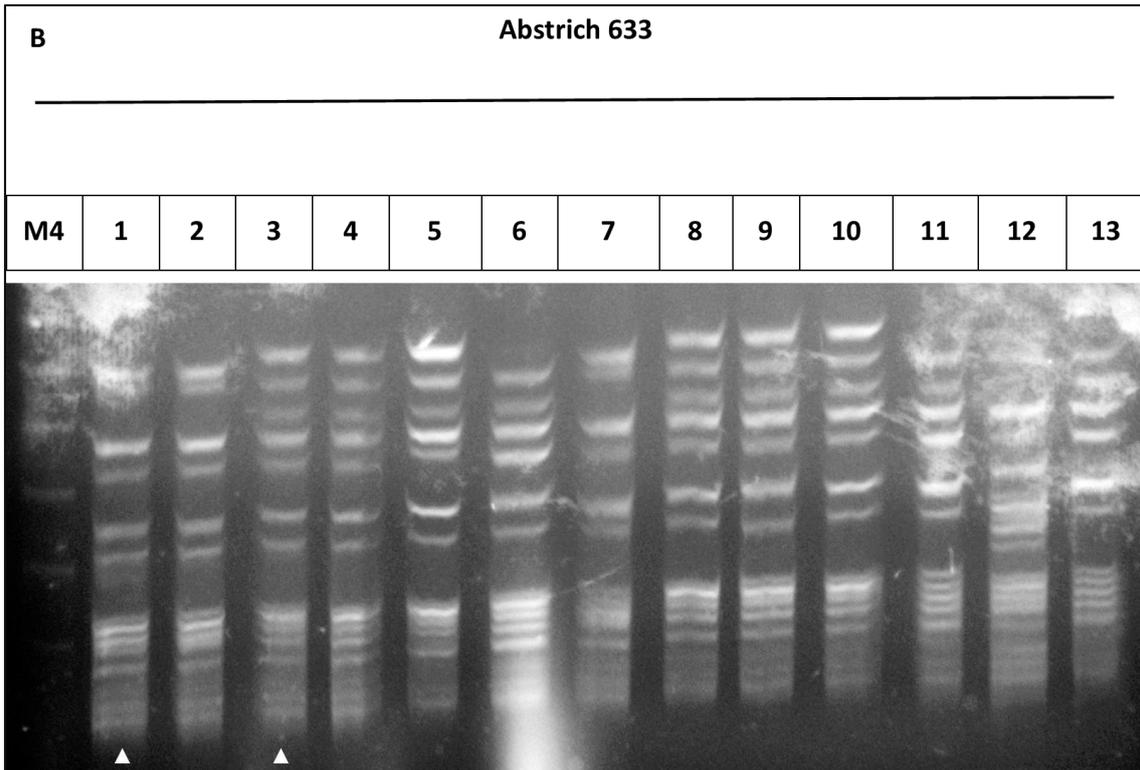


Abbildung 14 A-C: Nachweis von sechs VRE-Pulsotypen in unabhängig gewonnenen Rektalabstrichen: Je 14 VRE Isolate (1–14) aus drei Rektalabstrichen (VRE-14-RL_632, VRE-14-RL_633 und VRE-14-RL_639) desselben Pati-

enten wurden mittels PFGE analysiert. Insgesamt konnten sechs unterschiedliche VRE-Pulsotypen (weiche Kriterien) nachgewiesen werden (markiert durch weiße Pfeilspitzen). Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M4: lamda ladder.

Eine der Ausgangsfragestellungen bestand darin, ob es bei einem Patienten, der mit einer heterogenen VRE-Pulsotyp-Population kolonisiert ist, im Laufe des stationären Aufenthaltes zur Dominanz eines dieser Pulsotypen kommt, welche die Verdrängung anderer Typen zur Folge hat, oder ob hingegen eine quantitative Zunahme der VRE-Pulsotypen innerhalb der VRE-Population eines Patienten über die Dauer des stationären Aufenthaltes stattfindet. Dazu wurde jeweils die Anzahl aller unterschiedlichen VRE-Pulsotypen in jeder Probe eines VRE-positiven Verlaufspatienten ermittelt: Bei zwei Patienten (18,2 %) veränderte sich die Anzahl der Pulsotypen im Beobachtungszeitraum nicht, bei fünf Patienten (45,45 %) stieg die Anzahl der Typen, bei einem Patienten (9,1 %) sank sie und bei drei Patienten (27,3 %) konnte kein Trend ausgemacht werden, da die Anzahl unter Berücksichtigung aller Folgeisolate erst zu-, dann jedoch wieder abnahm oder andersherum (vergleiche Tabelle 20).

Exemplarisch sind hier jeweils ein Patient mit unveränderter, mit steigender und mit abnehmender Anzahl an Pulsotypen gezeigt (Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17).

Tabelle 20: Verlauf der Anzahl der VRE-Pulsotypen innerhalb der Verlaufsproben VRE-positiver Patienten.

Patient	Anzahl Pulsotypen			
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
VRE-01-AP	1	2	1	n.a.
VRE-02-AK	1	3	n.a.	n.a.
VRE-03-IN	3	1	4	n.a.
VRE-04-SS	2	4	4	n.a.
VRE-05-UF	2	2	n.a.	n.a.
VRE-07-IR	1	2	n.a.	n.a.
VRE-10-CB	1	3	n.a.	n.a.
VRE-14-RL	3	2	4	n.a.
VRE-16-HJB	1	1	1	2
VRE-19-HB	3	2	n.a.	n.a.
VRE-20-TN	2	2	2	n.a.

n.a.: nicht anwendbar, da kein Material vorhanden

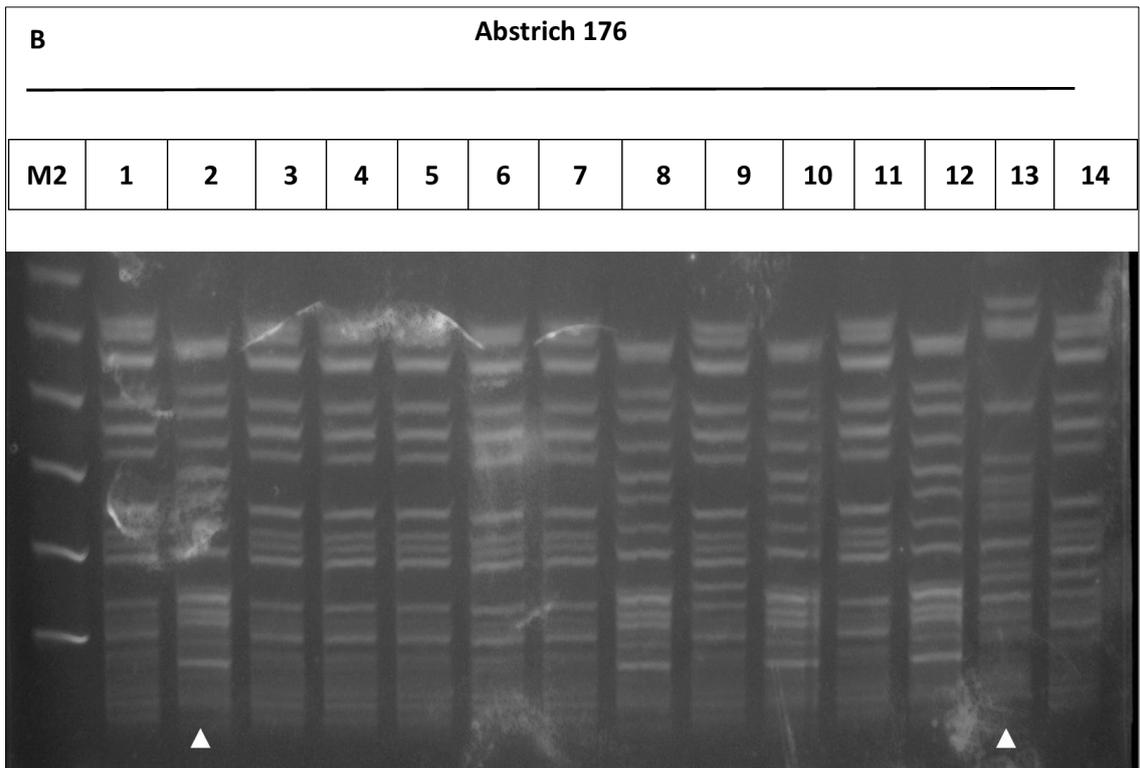
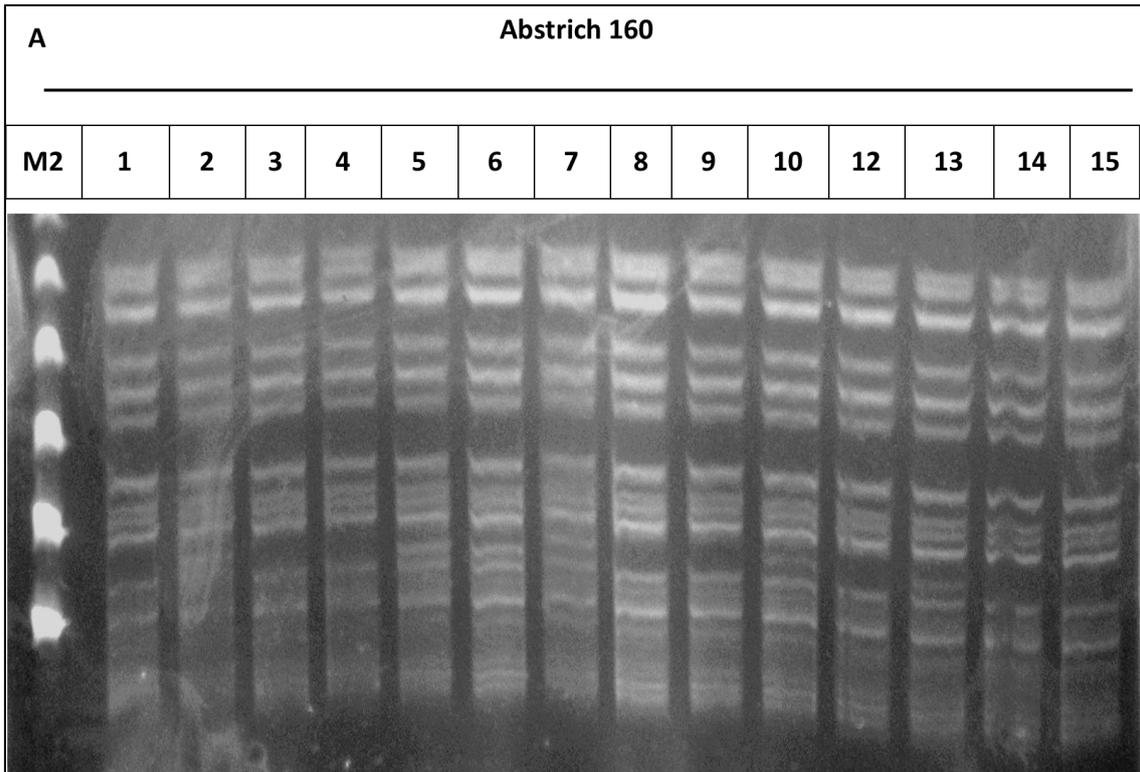
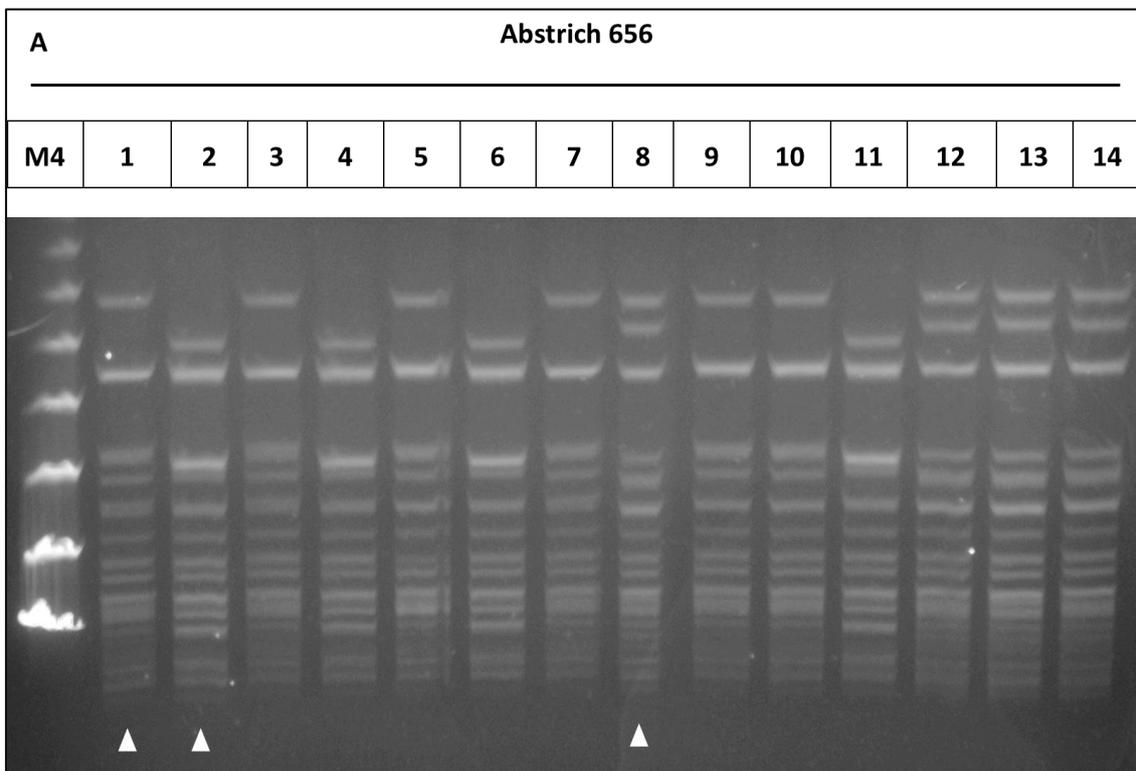


Abbildung 15 A-B: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE-Analysen: Darstellung der Zunahme der Anzahl von VRE-Pulsotypen innerhalb von zwei Proben eines Patienten (VRE-02-AK_160 und VRE-02-

AK_176). In der zuerst gewonnenen Probe VRE-02-AK_160 zeigte sich ein einziger PFGE-Typ (14/14 Isolaten). In der zweiten Probe zeigten sich zwei weitere, abweichende PFGE-Typen (gekennzeichnet durch weiße Pfeilspitzen). Die PFGE-Muster der dominanten und der beiden sporadischen Varianten unterschieden sich um >7 Banden. Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M2, MidRange PFG Marker.



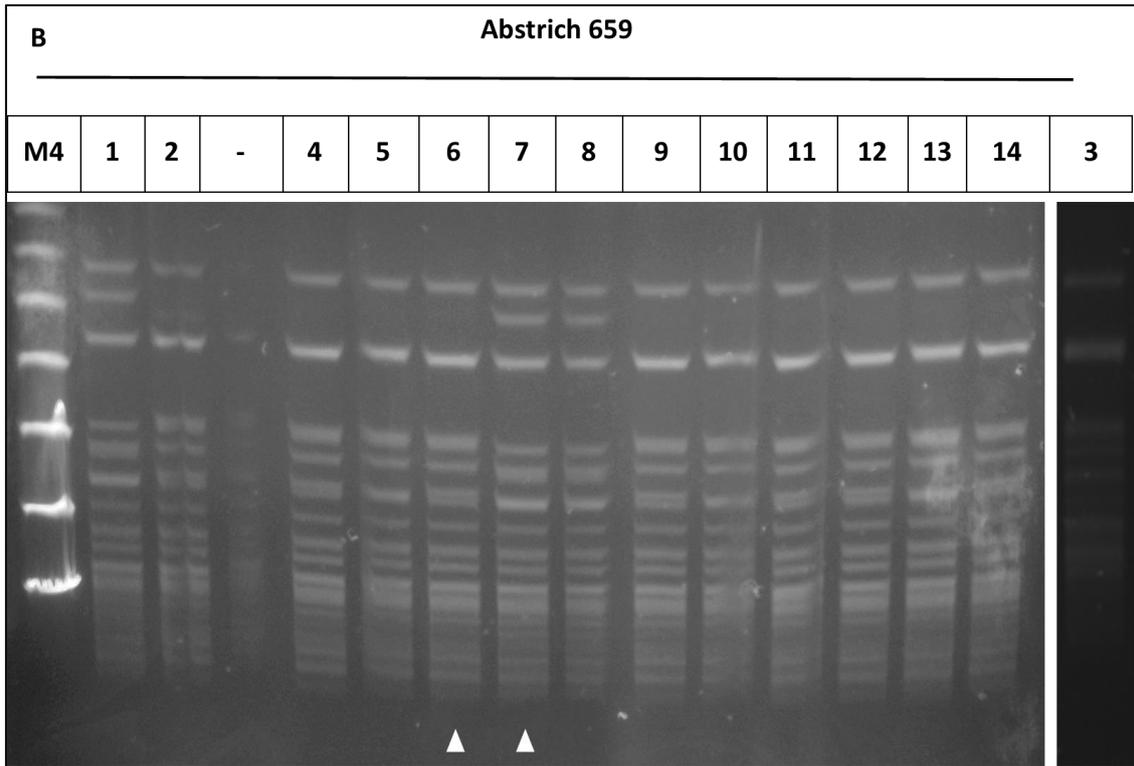
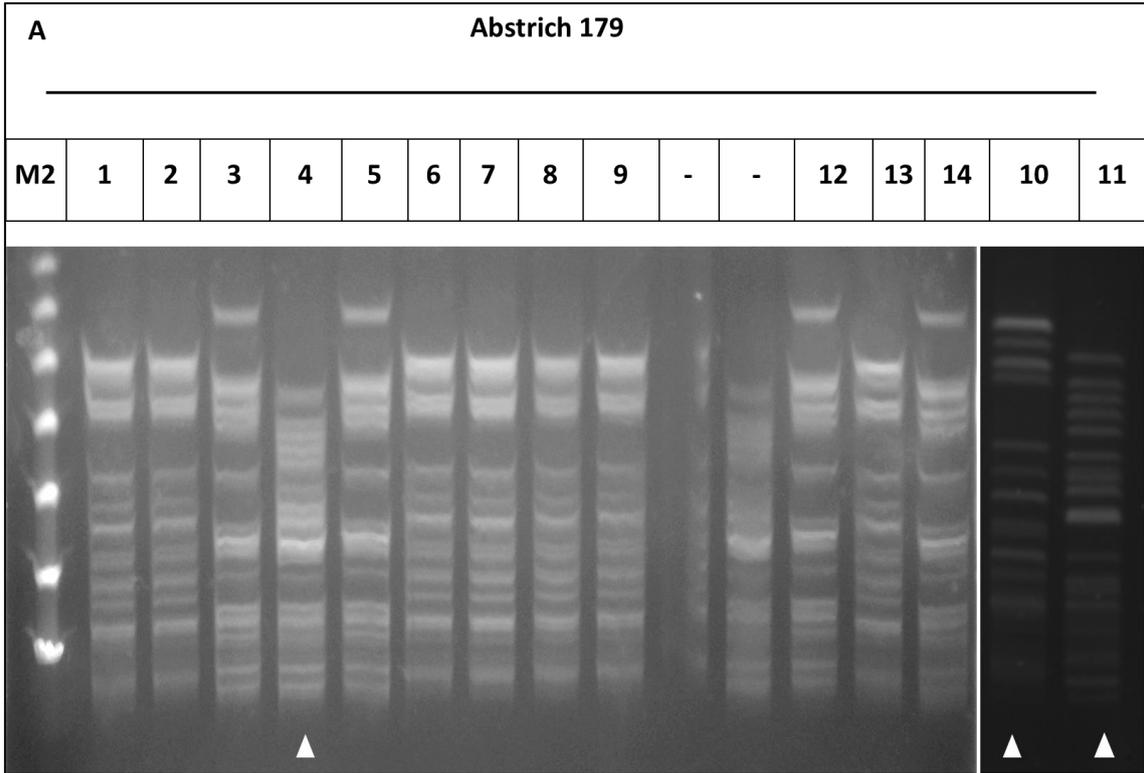


Abbildung 16 A-B: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Darstellung der Abnahme der Anzahl von VRE-Pulsotypen innerhalb von zwei Proben eines Patienten (VRE-19-HB_656 und VRE-19-HB_659). In der zuerst gewonnenen Probe VRE-19-HB_656 zeigten sich drei distinkte PFGE-Typen (gekennzeichnet durch weiße Pfeilspitzen). In der zweiten Probe zeigten sich nur noch zwei dieser PFGE-Typen. Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M4: lambda ladder.



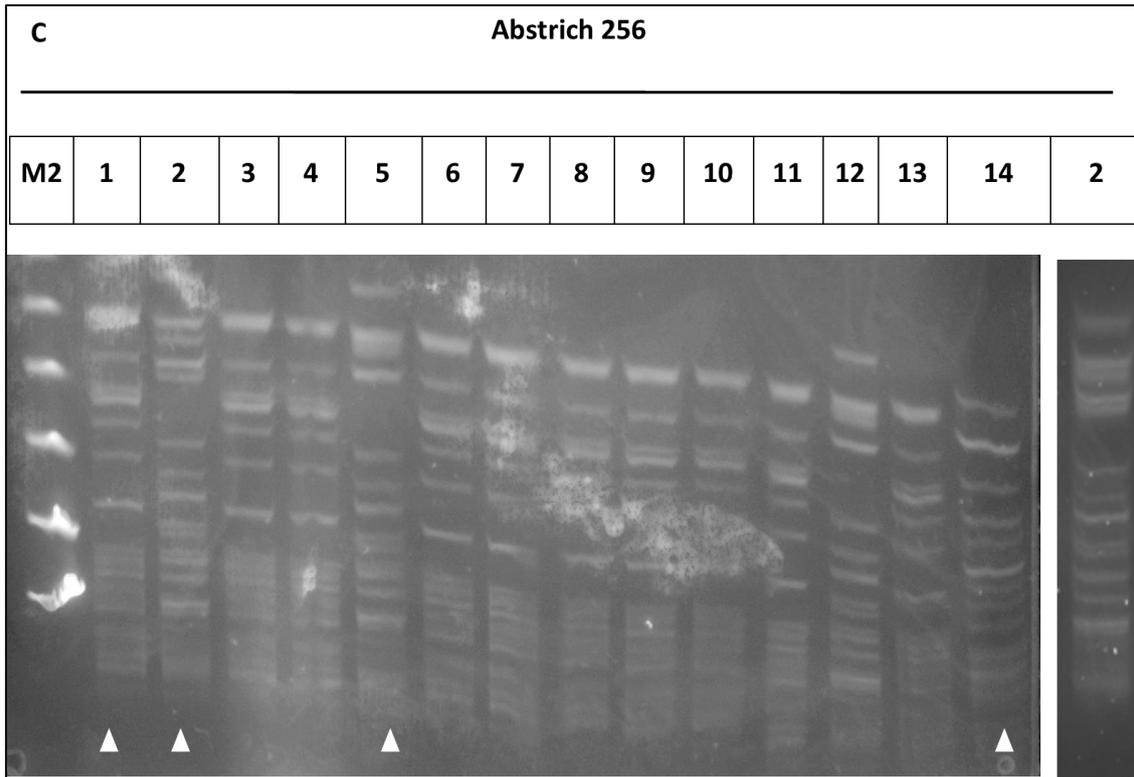


Abbildung 17 A-C: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Darstellung der Veränderung der Anzahl von VRE-Pulsotypen innerhalb von zwei Proben eines Patienten ohne erkennbaren Trend (VRE-03-IN_179, VRE-03-IN_226 und VRE-03-IN_256). In der zuerst gewonnenen Probe VRE-03-IN_179 zeigten sich drei distinkte PFGE-Typen. In der zweiten Probe zeigte sich nur noch einer dieser PFGE Typen, in der dritten Probe zeigten sich vier distinkte Pulsotypen. Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M2: MidRange PFG Marker.

Große Unterschiede gab es außerdem in der Ähnlichkeit der PFGE-Muster. So war bei einigen Patienten durch die geringe Anzahl an Bandenunterschieden zu vermuten, dass die Pulsotypen auf einen gemeinsamen Ursprungsclon zurückzuführen waren (vergleiche Abbildung 18). Wieder andere Pulsfeldmuster von Isolaten aus einer Probe unterschieden sich stark um >7 Banden und waren nicht dem in der Probe prädominanten Pulsotyp zuzuordnen (vergleiche Abbildung 19).

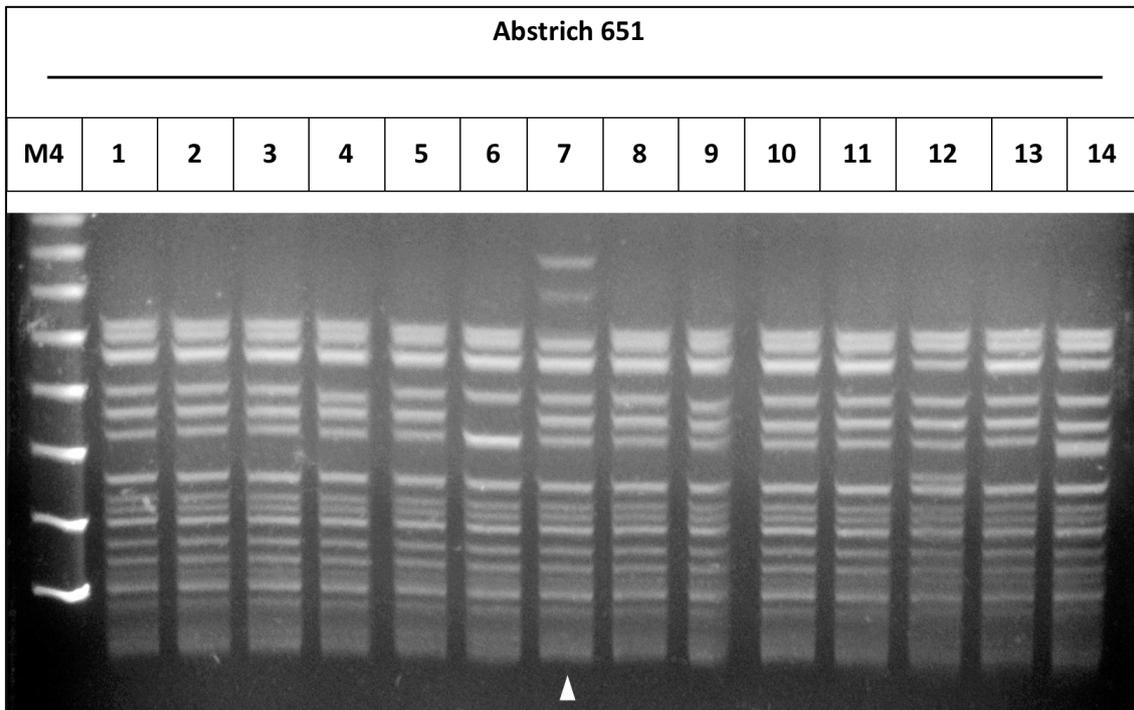


Abbildung 18: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Darstellung von zwei VRE-Pulsotypen innerhalb einer Probe eines Patienten (VRE-16-HJB_651) mit identischem Ursprungstyp. Es zeigte sich ein dominanter PFGE-Typ (13/14 Isolaten) sowie ein abweichender Pulsotyp (gekennzeichnet durch weiße Pfeilspitze), der vermutlich aus dem dominanten Pulsotyp hervorgegangen ist. Die PFGE-Muster der dominanten Variante unterschieden sich um maximal eine Bande. Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M4: lambda ladder.

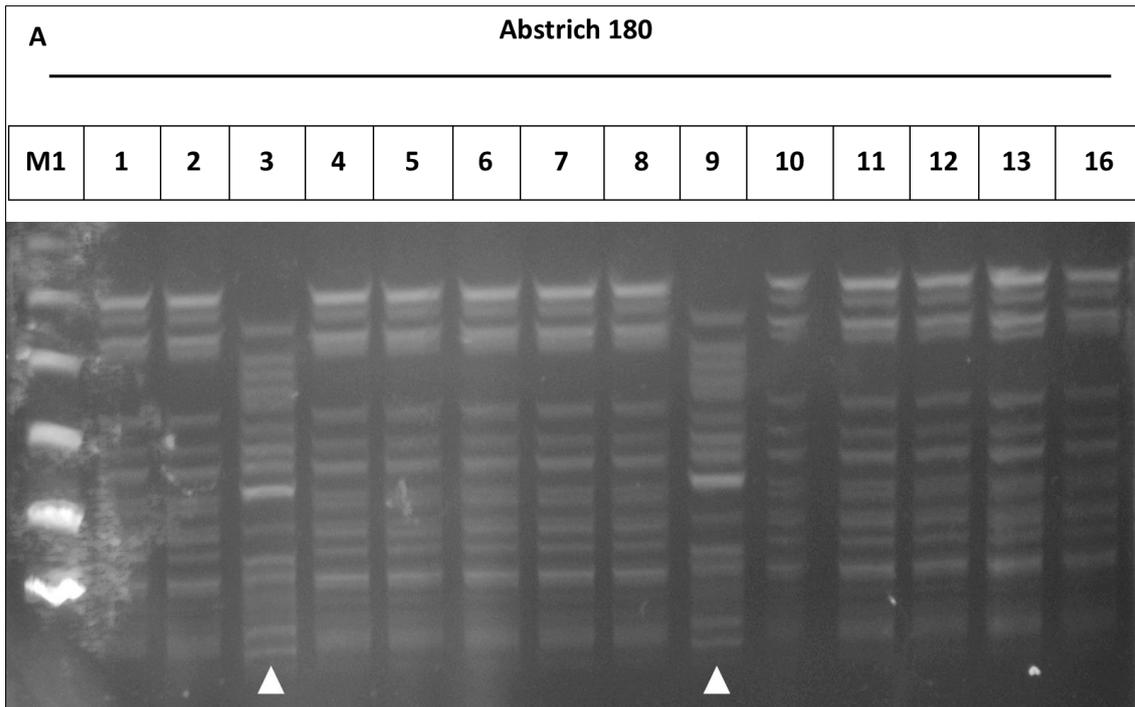


Abbildung 19 A: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Darstellung von zwei VRE-Pulsotypen innerhalb einer Probe eines Patienten (VRE-04-SS_180) mit unterschiedlichem Ursprungstyp. Es zeigte sich ein dominanter PFGE Typ (12/14 Isolaten) sowie ein abweichender PFGE-Typ (gekennzeichnet durch weiße Pfeilspitzen (2/14 Isolaten)). Die PFGE-Muster der dominanten und der sporadischen Variante unterschieden sich um >7 Banden, sodass distinkte Ursprungstypen anzunehmen sind. Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M1: MidRange PFG Marker.

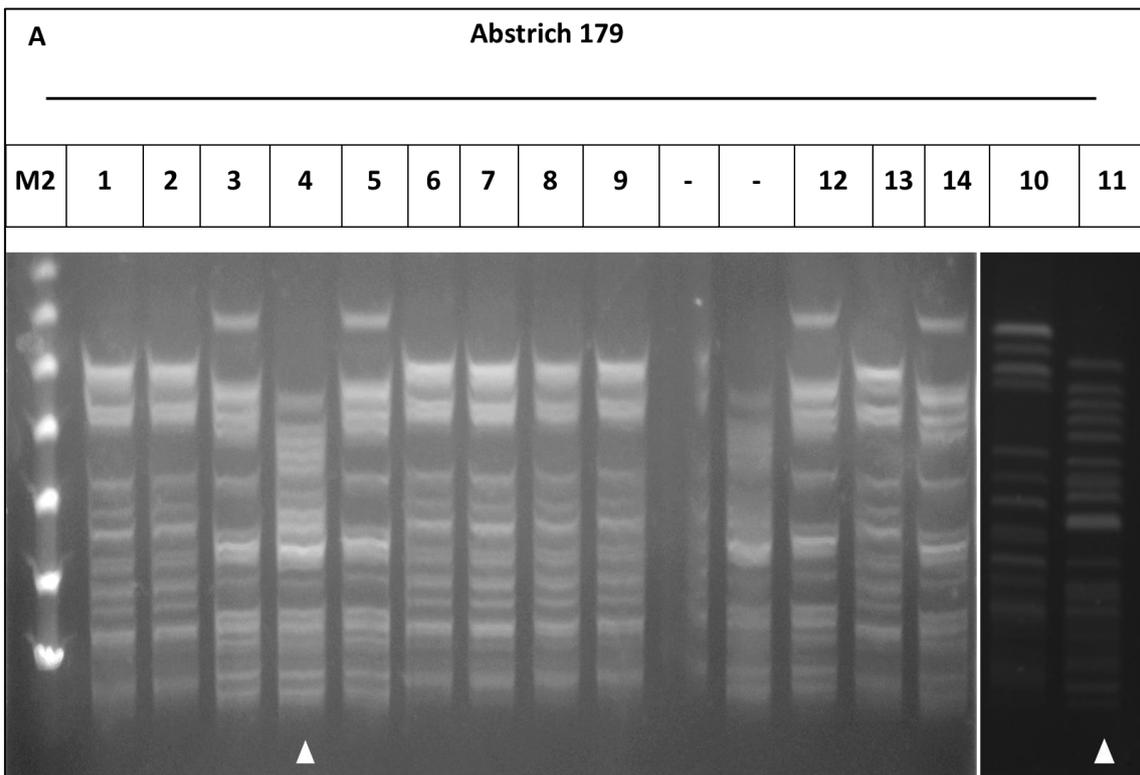
3.5.1 Bestimmung des *van*-Genotyps in unabhängigen PFGE-Pulsotypen

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen PFGE-Typen hinsichtlich ihres *van*-Genotyps eine homogene Gruppe darstellen, wurde für jeden erstmalig aufgetretenen abweichenden VRE-Pulsotyp mittels *van*-PCR der *van*-Genotyp bestimmt. Bei einem Patienten (VRE-02-AK) konnte innerhalb des zweiten Folgeisolates neben den bekannten *vanA*-tragenden VRE-Pulsotypen auch ein *vanB*-tragender Pulsotyp beobachtet werden. Dies spiegelte sich auch in der MHK_{VA} wieder, die bei diesem Pulsotyp mit 64 mg/l wesentlich niedriger lag, als die der übrigen *vanA*-tragenden Pulsotypen desselben Patienten mit $MHK_{VA} >256$ mg/l.

Bei allen anderen Patienten mit wechselnden Pulsotypen blieb der *van*-Genotyp innerhalb der Proben und über den Beobachtungszeitraum konstant.

3.5.2 Beschreibung der genetischen Verwandtschaft von VRE unterschiedlicher Patienten

Bei einigen Patienten waren einzelne oder alle identifizierten VRE-Pulsotypen identisch mit Pulsotypen anderer Patienten, deren stationärer Aufenthalt meist zeitgleich lag (zum Beispiel VRE-04-SS-A, VRE-05-UF-A, VRE-03-IN-C). Es handelte sich hier somit um Besiedlungen durch denselben VRE-Stamm. Die Transmission der VRE während des stationären Aufenthaltes ist wahrscheinlich.



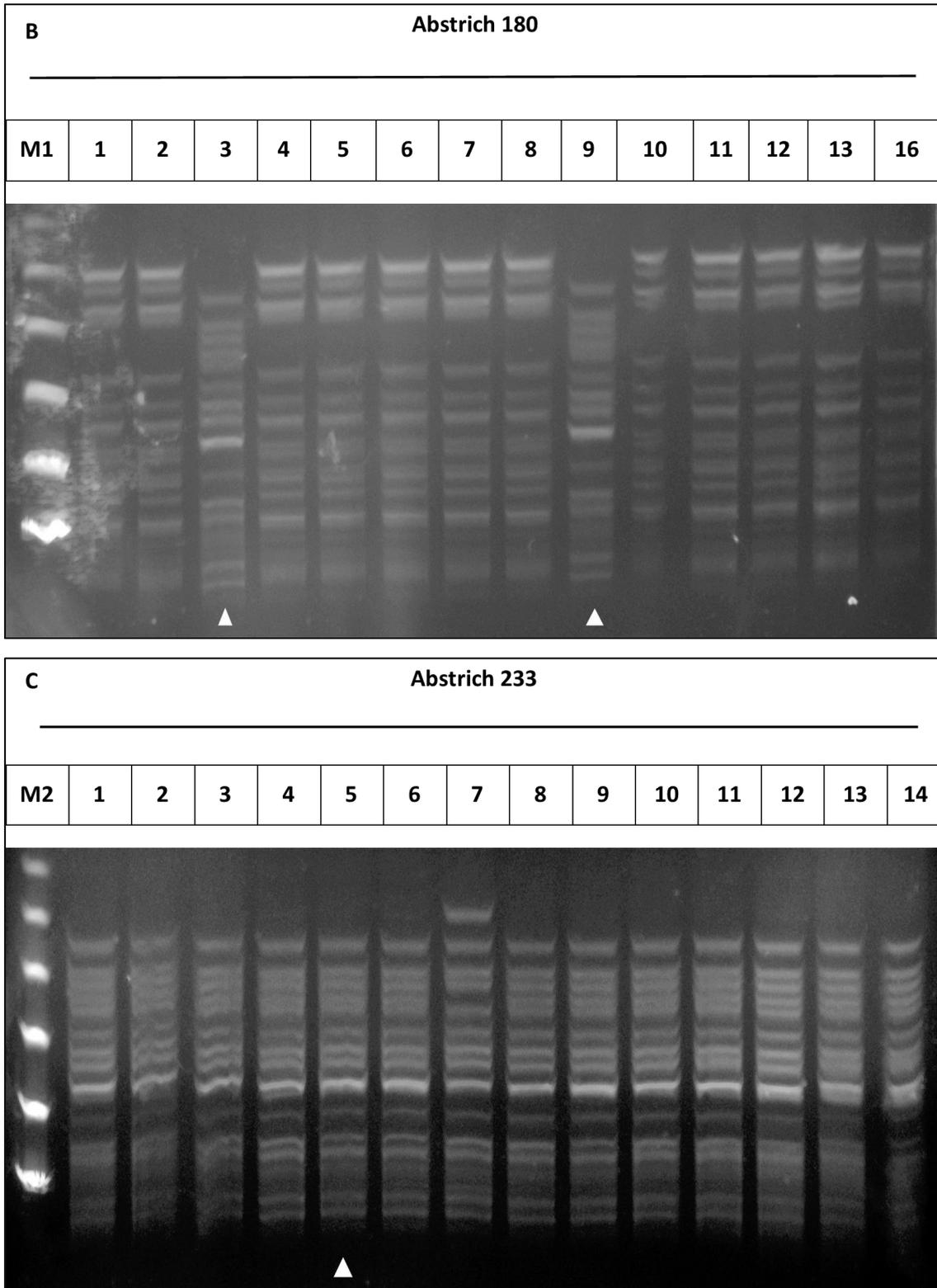


Abbildung 20 A-C: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE: Exemplarische Darstellung identischer VRE-Pulsotypen bei unterschiedlichen Patienten (VRE-03-IN, VRE-04-SS und VRE-05-UF). Es zeigte sich ein

PFGE-Typ, der in allen drei Patienten auftrat (gekennzeichnet durch weiße Pfeilspitzen). Die Darstellung der Banden erfolgte durch Färbung mittels Red Safe; M1/M2: MidRange PFG Marker.

3.6 PCR-basierter Nachweises des Invasivitätsmarkers *ptsD*

Zhang et al. konnten zeigen, dass das Gen *ptsD*, welches für ein Phosphotransferase-System kodiert, präferentiell bei invasiven *E. faecium*-Isolaten nachgewiesen werden kann. Kolonisierende *E. faecium*-Isolate hingegen waren in dieser Studie vornehmlich *ptsD*-negativ (Zhang et al., 2013). Durch den PCR-basierten Nachweis von *ptsD* in der hier untersuchten Stammsammlung sollte geprüft werden, ob die Isolate dieser Population von *E. faecium* mit einer möglicherweise höheren Pathogenität zugeordnet werden können. Es wurde jeweils ein Isolat jedes der 67 distinkten Pulsotypen untersucht. *ptsD* konnte bei allen diesen Stämmen nachgewiesen werden. Der Hypothese von Zhang et al. folgend handelt es sich somit bei den hier untersuchten VRE um Isolate mit einem potentiell höheren pathogenen Potential.

3.7 Analyse der Empfindlichkeit von VRE-Isolaten gegenüber Glykopeptiden, Daptomycin und Linezolid im Verlauf

Der Nachweis einer genetischen Heterogenität von VRE-Stämmen im Darmmikrobiom zu einem Zeitpunkt sowie im zeitlichen Verlauf ließ es möglich erscheinen, dass hieraus auch eine Heterogenität hinsichtlich der Empfindlichkeit von VRE-Isolaten resultieren könnte. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde an jedem Zeitpunkt der Isolierung die Empfindlichkeit jedes VRE-Pulsotyps geprüft (zugrunde gelegt wurde die strikte Definition eines PFGE-Typs, das heißt, die untersuchten VRE unterschieden sich in der PFGE um mehr als 7 Banden). Wurden in einer Probe mehrere Isolate eines Pulsotyps gefunden, so wurde ein repräsentatives Isolat zufällig für die Empfindlichkeitsprüfung ausgewählt. Alle VRE-Isolate wurden einer Empfindlichkeitsprüfung für Vancomycin, Teicoplanin, Linezolid und Daptomycin unterzogen. Um eine mögliche Resistenzentwicklung

in den klinischen Kontext zu setzen, wurde auch erhoben, welche Antibiotika die jeweiligen Patienten im Beobachtungszeitraum erhalten hatten.

3.7.1 Untersuchung der Empfindlichkeit von VRE-Isolaten gegenüber Vancomycin und Teicoplanin

Innerhalb der Gruppe *vanA*- oder *vanB*-positiver *E. faecium* kann es zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen der Glykopeptidresistenz kommen (Almyroudis et al., 2011; Werner et al., 2012). Um eine mögliche Heterogenität der Glykopeptidempfindlichkeit innerhalb der Gruppe von Isolaten eines Patienten zu dokumentieren, wurden alle Isolate jedes Patienten mittels E-Test untersucht. Zunächst wurden die MHK der distinkten Pulsotypen innerhalb einer Probe miteinander verglichen. Bei fünf Patienten konnten Unterschiede der $MHK_{VA/TP}$ gemessen werden. Bei sechs von elf Patienten wiesen alle VRE-Pulsotypen innerhalb der einzelnen Proben (unter Tolerierung von MHK-Streuungen um den Faktor 2) die gleiche MHK auf.

Als Beispiel sei der Patient VRE-02-AK genannt. Hier zeigte der Pulsotyp VRE-02-AK-176-D mit der MHK_{VA} 64 mg/l und der MHK_{TP} 0,5 mg/l deutlich abweichende Werte zu den anderen beiden Pulsotypen VRE-02-AK-176-A/B (MHK_{VA} >256 mg/l und MHK_{TP} 16–32 mg/l) aus derselben Probe. Der Pulsotyp D war im Gegensatz zu allen anderen VRE-Pulsotypen dieses Patienten, die das *vanA*-Gen trugen, *vanB*-positiv (vergleiche 3.5.1). Heterogene Vancomycin-MHK bezogen auf definierte Pulsotypen zeigen Tabelle 21 und Tabelle 22.

Tabelle 21: heterogene $MHK_{VA/TP}$ bei verschiedenen Pulsotypen (Probe 176 von Patient VRE-02-AK).

VRE-02-AK	Pulsotypen (n)	MHK_{VA} in mg/l	MHK_{TP} in mg/l
PFGE-Typ A	7	>256	16
PFGE-Typ B	4	>256	32
PFGE-Typ D	1	64	0,5

In einem zweiten Schritt wurden die MHK in der longitudinalen Analyse verglichen, um mögliche MHK-Änderungen innerhalb eines Pulsotyps über die Zeit zu

erfassen. Hier wurde eine Veränderung der MHK_{VA} nur bei einem einzigen Pulsotyp beobachtet. So fand sich beim Pulsotyp B des Patienten VRE-14-RL in der ersten gewonnenen Probe eine $MHK_{VA} > 256$ mg/l, in der zweiten nur 64 mg/l. In der dritten Probe wurde wieder eine $MHK_{VA} > 256$ mg/l gemessen (vergleiche Tabelle 23).

Bei allen anderen Patienten fanden sich innerhalb eines Pulsotyps keine Veränderung der Vancomycin-MHK.

Tabelle 22: Übersicht über heterogene $MHK_{VA/TP}$ innerhalb von Pulsotypen aus einer Patientenprobe.

Bezeichnung VRE-Pulsotyp	MHK_{VA} in mg/l	MHK_{TP} in mg/l
VRE-02-AK-A	>256	16
VRE-02-AK-B	>256	32
VRE-02-AK-C	64	0,5
VRE-03-IN-D	>256	16
VRE-03-IN-E	>256	64
VRE-03-IN-F	>256	16
VRE-14-RL-A	>256	0,5
VRE-14-RL-B	>256	0,5–2
VRE-14-RL-D	16	1–2
VRE-14-RL-E	>256	1
VRE-14-RL-F	32	2
VRE-19-HB-A	16	0,5
VRE-19-HB-B	>256	0,5
VRE-19-HB-C	8	0,5
VRE-20-TN-A	64	0,5
VRE-20-TN-B	4	1
VRE-20-TN-C	64	0,5

Tabelle 23: Veränderung $MHK_{VA/TP}$ eines Pulsotyps über die Zeit (Proben 632, 633 und 639 von Patient VRE-14-RL).

VRE-14-RL	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
	Pulso- typen (n)	MHK_{VA} in mg/l	MHK_{TP} in mg/l	Pulso- typen (n)	MHK_{VA} in mg/l	MHK_{TP} in mg/l	Pulso- typen (n)	MHK_{VA} in mg/l	MHK_{TP} in mg/l
PFGE- Typ B	2	>256	0,5	6	64	1	3	>256	2

3.7.2 Untersuchung der Empfindlichkeit von VRE gegenüber Daptomycin

Am häufigsten konnten Veränderungen der Antibiotika-Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin beobachtet werden. Innerhalb der einzelnen Proben konnten bei vier Patienten MHK -Unterschiede innerhalb der Pulsotypen festgestellt werden (vergleiche Tabelle 25). Bei acht dieser Pulsotypen bedeutet dies einen Wechsel von sensibel auf resistent innerhalb einer Probe.

Beispielsweise zeigte sich beim Patienten VRE-01-AP in Probe 117 vier verschiedene Pulsotypen mit einer MHK_{DPC} von 4–16 mg/l (vergleiche Tabelle 24). Ein Pulsotyp wurde damit als Daptomycin-sensibel eingestuft, während bei den anderen dreien als resistent einzustufende Werte vorlagen.

Tabelle 24: heterogene MHK_{DPC} bei verschiedenen Pulsotypen (Probe 117 von Patient VRE-01-AP).

VRE-01-AP	Pulsotypen (n)	MHK_{DPC}
PFGE-Typ A	8	4
PFGE-Typ B	1	16
PFGE-Typ C	4	16
PFGE-Typ D	1	8

Tabelle 25: Übersicht über heterogene MHK_{DPC} innerhalb Pulsotypen aus einer Patientenprobe.

Bezeichnung VRE-Pulsotyp	MHK_{DPC} in mg/l
VRE-01-AP-A	4
VRE-01-AP-B	16
VRE-01-AP-C	16
VRE-01-AP-D	8
VRE-03-IN-A	4
VRE-03-IN-B	4
VRE-03-IN-C	4
VRE-03-IN-D	16
VRE-03-IN-E	32
VRE-03-IN-F	16
VRE-04-SS-A	8
VRE-04-SS-B	2
VRE-04-SS-C	16
VRE-04-SS-E	4
VRE-14-RL-B	16
VRE-14-RL-D	32
VRE-14-RL-E	64
VRE-14-RL-F	32

Hinsichtlich der longitudinalen Analyse kam es bei drei Patienten im Laufe des stationären Aufenthaltes zu einer Zunahme der MHK_{DPC} bei konstanten Pulsotypen (vergleiche Tabelle 27). Alle drei Patienten waren während eines stationären Aufenthaltes zwischen sieben und vierzehn Tagen mit Daptomycin behandelt worden. Bei allen fünf Pulsotypen dieser Patienten fand ein Wechsel von sensibel auf resistent statt.

Beispielsweise fand beim Patienten VRE-14-RL beim Pulsotyp B eine Zunahme von 4 auf 16 mg/l statt, beim Pulsotyp D von 4 auf 32 mg/l (vergleiche Tabelle

26). Diese innerhalb des stationären Aufenthaltes des Patienten erworbene Daptomycin-Resistenz kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass der Patient über einen einwöchigen Zeitraum (15.01.2015–22.01.2015) mit Daptomycin behandelt wurde.

Tabelle 26: Veränderung MHK_{DPC} eines Pulsotyps über die Zeit (Proben 632, 633 und 639 von Patient VRE-14-RL).

VRE-14-RL	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
	Pulsotypen (n)	MHK_{DPC} in mg/l	Pulsotypen (n)	MHK_{DPC} in mg/l	Pulsotypen (n)	MHK_{DPC} in mg/l
PFGE-Typ B	2	4	6	4	3	16
PFGE-Typ D	1	4	0	n.a.	1	32

n.a.= nicht anwendbar, da kein Material vorliegend

Tabelle 27: Übersicht über die Veränderung der MHK_{DPC} eines Pulsotyps über die Zeit.

Bezeichnung Pulsotyp	MHK_{DPC} in mg/l		
	Probe 1	Probe 2	Probe 3
VRE-04-SS-C	4	16	n.a.
VRE-05-UF-A	4	16	n.a.
VRE-05-UF-B	4	16	n.a.
VRE-14-RL-B	4	4	16
VRE-14-RL-D	4	n.a.	32

n.a.=nicht anwendbar, da kein Material vorliegend

Insgesamt erhielten zwölf (60 %) der 20 Verlaufspatienten während ihres stationären Aufenthaltes Daptomycin. Bei sieben der insgesamt 20 eingeschlossenen Patienten (35 %) konnte unter allen Folgeabstrichen in der Gesamtschau aller Pulsotypen eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin im Verlauf des Beobachtungszeitraumes gemessen werden. Diese sieben Patienten hatten im Verlauf des stationären Aufenthaltes alle Daptomycin erhalten. Außerdem waren sie mit weiteren Antibiotika wie Cephalosporinen, Carbapenemen, Cotrimo-

xazol, Metronidazol, Vancomycin, Linezolid und Gyrasehemmern behandelt worden. Der Anteil von Patienten mit Zunahme der MHK_{DPC} an den mit Daptomycin therapierten Patienten betrug damit 58,3 %.

3.7.3 Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber Linezolid

Eine signifikante Veränderung der MHK_{LZ} konnte in dieser Untersuchungskollektiv weder innerhalb der Pulsotypen einer Probe noch in der longitudinalen Analyse beobachtet werden.

4 Diskussion

Detektion von VRE im klinischen Kontext

Das zunehmende Auftreten multiresistenter Erreger wie beispielsweise Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) stellt besonders für stark Immunsupprimierte ein hohes Risiko dar. Zu dieser Patientengruppen gehören auch Stammzelltransplantierte und intensivmedizinisch betreute Patienten. Gerade bei diesen Patienten sind Infektionen mit VRE oftmals nur schwer beherrschbar, da diese Erreger neben der Resistenz gegen Glykopeptide zahlreiche weitere Antibiotikaresistenzen besitzen.

Um einer Verbreitung von VRE in Krankenhäusern vorzubeugen, ist die konsequente Einhaltung von Hygieneregeln eine der wichtigsten Maßnahmen. Dazu ist es notwendig, VRE-kolonisierte Patienten rechtzeitig – möglichst sofort bei Aufnahme in die Klinik – zu identifizieren. Hierdurch können dann umgehend krankenhaushygienische Maßnahmen eingeleitet werden, um so die Übertragung auf andere Patienten zu verhindern (Kampmeier et al., 2017).

Daten, die im Kontext der Ausbreitung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) gewonnen wurden, zeigen, dass das aktive Screening von Patienten bei Aufnahme die Ausbreitung von Erregern mit endemischem Potential bereits erfolgreich eindämmen kann (Köck et al., 2014; Faron et al., 2016). Vor dem Hintergrund eines zielgerichteten Ressourceneinsatzes gilt jedoch, dass dieser Effekt nicht für alle multiresistenten Erreger beobachtet wird, für die ein Screening etabliert ist. Dies liegt unter anderem daran, dass die Sensitivität einzelner Screeningmethoden erheblich variiert und der Erfolg einer Screeningmaßnahme von Faktoren wie zum Beispiel der Prävalenz eines Erregers im Untersuchungsumfeld abhängig ist. In Bereichen mit hoher VRE-Prävalenz stellt das Routine-Screening bei Aufnahme eine besonders effektive Maßnahme dar. In Bereichen mit niedrigen Prävalenzen oder solchen ohne Hochrisikopopulation sind die Kosten umfassender Screeningmaßnahmen gegenüber dem nur geringen Benefit in der Regel nicht zu rechtfertigen. Nach aktueller Datenlage scheint aktives Screening kosteneffizient zu sein, wenn pro Jahr ein bis zwei VRE-Blutstrominfektionen verhindert werden können (Faron et al., 2016). Der Benefit von

passivem Screening für reduzierte VRE-Prävalenzen und geringe Infektionsraten ist nach aktueller Datenlage bisher kaum effizient (Perencevich et al., 2004).

Eine Studie konnte zeigen, dass aktives Aufnahmescreening von Patienten einer Intensivstation die Inzidenz von VRE-Infektionen um 39 % reduzieren konnte (Perencevich et al., 2004). Eine retrospektive Studie zeigte, dass in einem Krankenhaus der USA mit wöchentlichem Screening aller stationären Patienten eine 2,1-fach niedrigere Rate an VRE-Bakteriämien vorlag als im Vergleichskrankenhaus ohne wöchentliches Screening (Price et al., 2003). In Krankenhäusern, in denen der Kolonisationsstatus von Patienten nicht bekannt ist, kommt es vermehrt zu Übertragungsereignissen (Faron et al., 2016). Darüber hinaus gibt es Belege dafür, dass das Routinescreening von Stuhlkulturen in Kombination mit Handhygiene und Isolation kolonisierter Patienten die Rate der Besiedlungen in nur drei Jahren um bis zu 80 % reduzieren kann (Matsushima et al., 2011).

Derzeit stellt der kulturelle Nachweis mittels Selektiv-Indikatormedien den Goldstandard des Nachweises oder Ausschlusses einer enteralen VRE-Kolonisation dar. Diagnostisches Prinzip ist hierbei die Hemmung des Wachstums anderer Bakterienspezies und Förderung des Wachstums von VRE. Zur Materialgewinnung dienen in der Regel Rektalabstriche oder Stuhlkulturen (Klare et al., 2012a). Die diagnostische Güte solcher Screeningmedien variiert allerdings erheblich mit der Zusammensetzung des Agars. So ermöglichen einige Medien auch das Wachstum von Non-VRE-Spezies, darunter vor allem Hefen und Enterokokken mit einer intrinsisch herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber Glykopeptidantibiotika (*vanC*) (Delmas et al., 2007; Cuzon et al., 2008; Suwantararat et al., 2014). Dieses Non-VRE-spezifische Wachstum interferiert mit einer raschen VRE-Diagnostik, denn in der Regel ist für den definitiven Nachweis oder Ausschluss eine VRE-Zusatzdiagnostik notwendig. Diese umfasst nicht nur die Speziesidentifikation, sondern auch eine Empfindlichkeitsprüfung. Die hieraus resultierende Verzögerung des Diagnostikprozesses erhöht die Wahrscheinlichkeit der Verbreitung von VRE in der Patientenumgebung und damit der Übertragung auf andere Patienten. Auch ein rascher kalkulierter Therapiebeginn bei Infektionen durch VRE wird verzögert und das Outcome der Patienten verschlechtert (DiazGranados und Jernigan, 2005b; Cheah et al., 2013).

Um die Detektionszeit und -kosten von Vancomycin-resistenten Enterokokken möglichst niedrig zu halten, sind hochspezifische Indikatormedien, die gleichzeitig einen hohen *Negative Predictive Value* aufweisen, notwendig. Als traditionelle Screeningmedien werden Galle-Äskulin-haltige Nährböden eingesetzt. Gallensalze unterdrücken hierbei das Wachstum Gram-negativer Erreger, während Enterokokken durch Äskulinspaltung und nachfolgende Schwarzfärbung der Kolonie diskriminiert werden können. Die Zeit bis zur Bestätigung eines VRE auf einem solchen Agar beträgt in der Regel 72 Stunden. In den letzten Jahren wurden zunehmend chromogene Nährböden entwickelt, um die VRE-Detektionszeit zu verkürzen. Diese sind in der Lage, durch spezifische Farbreaktionen *E. faecalis* und *E. faecium* von anderen Spezies zu unterscheiden. Werden solche Medien direkt mit Patientenmaterial inokuliert, kann ein positives Ergebnis innerhalb von 24 Stunden vorliegen.

In der Literatur sind Untersuchungen dokumentiert, die einzelne Nährmedien bezüglich ihrer Performance miteinander vergleichen (Asir et al., 2009; Grabsch et al., 2008; Peltroche-Llacsahuanga et al., 2009; Ongut et al., 2013; Suwantararat et al., 2014; Gouliouris et al., 2016). Diese Untersuchungen zeigen die diagnostische Überlegenheit chromogener Selektivnährböden gegenüber Galle-Äskulin-basierten. So liegt die Sensitivität chromogener Selektivnährböden zwischen 90 und 99 %, während für Galle-Äskulin-basierte Medien durchschnittliche Sensitivitäten von 85 % angegeben werden. Für die Spezifität chromogener Medien sind Werte bis zu 99 % beschrieben, für Galle-Äskulin-haltige Medien oft nur Werte von 70–75 % (Anderson et al., 2013; Suwantararat et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden der Galle-Äskulin-basierte VRE-Selektivagar mit den neueren chromogenen Medien chromID VRE Agar und Brilliance VRE Agar hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität, ihres *NPV* und *PPV* verglichen. Ziel war es, das Selektiv-Indikatormedium mit der besten diagnostischen Performance zu identifizieren. Hierzu wurden prospektiv Abstrichmaterialien des Routinescreenings in einem Risikokollektiv (VRE Prävalenz 8,22%) mittels dieser drei Medien parallel untersucht. Verglichen mit den anderen beiden Nährmedien wies der VRE-Selektivagar nach 48-stündiger Bebrütungszeit deutliche Defizite in

Spezifität und *Positive Predictive Value*. So lag die Spezifität des VRE-Selektivagars 25,4 Prozentpunkte unter der des Brilliance VRE-Agars und 38,56 Prozentpunkte unter der des chromID VRE Agars. Bezogen auf den *PPV* war der VRE-Selektivagar dem Brilliance VRE-Agar um 18,75 Prozentpunkte unterlegen, dem chromID VRE Agar um 49,53 %. Diese Tendenz ließ sich bereits nach 24-stündiger Inkubation erkennen. Der VRE-Selektivagar war dabei jedoch der einzige, der bereits nach 24-stündiger Bebrütung eine 100-prozentige Sensitivität erzielte. Bei beiden anderen Nährmedien war eine Inkubationszeit von 48 Stunden erforderlich, um alle VRE zu detektieren. Als Selektivagar mit der größten diagnostischen Güte konnte der chromID VRE Agar identifiziert werden, gefolgt vom Brilliance VRE Agar. Der chromID VRE Agar zeigte nach 48 Stunden Inkubationszeit eine Sensitivität und einen *Negative Predictive Value* von 100 %. Die Spezifität lag bei 95,28 %, der *Positive Predictive Value* bei 66,67%. Im Gegensatz zu Suwantararat et al. konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die Überlegenheit des chromID VRE Agar gegenüber anderen Medien statistisch signifikant ist (Suwantararat et al., 2014).

Mit den hier erzielten Ergebnissen vergleichbare Befunde wurden für den chromID VRE Agar auch im Zuge eines Krankenhausausbruchs mit dem *vanA*-positiven *E. faecium*-Stamm BCT-1 erzielt (Besiedlungsprävalenz im Untersuchungskollektiv: 6,6 %). Die Sensitivität des chromID VRE Agars wurde hierbei mit 96,9 % berechnet. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden betrug die Spezifität 99,4 % für den chromID VRE Agar, der *PPV* 91,4 %. Dabei betrugen die getrennt ermittelten *PPV* 96,8 % für VRE_{Efm} und 50,0 % für VRE_{Efs} (Cuzon et al., 2008). Peltroche-Llacsahuanga et al. konnten für den chromID VRE Agar eine Sensitivität von 98,2 % und eine Spezifität von 97,5 % zeigen. In einer anderen Studie konnte für den chromID VRE Agar eine Spezifität von 99,7 % (95 % KI 98,3–100 %) bei einer Sensitivität von 94,9 % (95 % KI 91,0–95,9 %) und einem *PPV* von 98,9 % (95 % KI 94,8–99,9 %) sowie einem *NPV* von 98,3 % (95% KI 97,0–98,7%) nachgewiesen werden (Peltroche-Llacsahuanga et al., 2009; Suwantararat et al., 2014). Die hier vorgelegte Studie zeigt, dass die Spezifität des chromID VRE Agar um 13,16 Prozentpunkte höher lag als die des Brilliance VRE Agars, welcher wiederum dem VRE-Selektivagar um 25,4 % überlegen war.

Eine Studie verglich den chromID VRE Agar mit dem VRE-Selektivagar. Hierbei konnte nach 48 Stunden Inkubation und nach Anreicherung eine Sensitivität von 83,3 % für den chromID VRE Agar nachgewiesen werden, wohingegen diese für den VRE-Selektivagar nur bei 77,8 % lag (Asir et al., 2009).

Grabsch et al. verglichen einen anderen Galle-Äskulin-basierten Agar ebenfalls mit dem chromID VRE Agar. Sie fanden eine ähnliche Performance nach 48-stündiger Bebrütungszeit. Dabei lag die Sensitivität des chromID VRE Agar bei 90,2 %, die des Galle-Äskulin-haltigen bei 86,8 %. Entgegen den Beobachtungen der hier vorgelegten Studie lag die Sensitivität des chromID VRE Agars nach 24 Stunden Inkubationszeit um 18 % höher als die des Galle-Äskulin-basierten Agars (Grabsch et al., 2008).

Im Rahmen von Untersuchungen, die die Performance des Brilliance VRE Agars der des chromID VRE Agars gegenüberstellen, konnte für den Brilliance VRE Agar eine Sensitivität von 95 % nach 24 Stunden und 100 % nach 48 Stunden ermittelt werden. Die Spezifität lag bei 80,4 % (87,1 % nach 24 Stunden), der *PPV* bei 38,5 % (47,5 % nach 24 Stunden) und der *NPV* bei 100 % (99,3 % nach 24 Stunden) (Ongut et al., 2013). Auch Gouliouris et al. verglichen die Performance von Brilliance VRE- und chromID VRE Agar. Sie fanden eine vollständige Unterdrückung *vanC*-tragender Spezies. Bezüglich der Sensitivität fanden sie ähnliche Werte für beide Medien. Die volle Sensitivität wurde in dieser Studie erst nach 48-stündiger Bebrütungszeit erreicht: Sie betrug beim chromID VRE Agar 29 % nach 24 Stunden Inkubation und 82 % nach 48 Stunden sowie beim Brilliance VRE Agar 41 % nach 24 Stunden und 85 % nach 48 Stunden Inkubation. In dieser Studie wies der Brilliance VRE Agar somit abweichend zu den Ergebnissen der hier vorgelegten Studie nach 48-stündiger Bebrütung mit Anreicherung eine höhere Spezifität auf als der chromID VRE Agar (Gouliouris et al., 2016). Wijesuriya et al. wiesen übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer Studie für den chromID VRE Agar nach 48-stündiger Inkubationszeit eine höhere Sensitivität (94 %) als für Brilliance VRE (83 %) nach (Wijesuriya et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wuchsen auf allen drei Selektiv-Indikatormedien Non-VRE Spezies, deren Nachweis die Spezifität des Screenings negativ beeinflusste. Die chromogenen Nährböden Brilliance VRE Agar und chromID VRE Agar zeigten dabei eine deutlich bessere Performance in der Unterdrückung von Non-VRE als der VRE-Selektivagar.

Suwantarat et al. verglichen fünf chromogene Nährböden und einen Galle-Äskulin-haltigen Agar. Dabei fanden sich auf dem Galle-Äskulin-basierten Agar in 16,5 % aller Proben Non-VRE-Spezies, während es auf den chromogenen Medien nur 0,9 bis 5,6% waren (Suwantarat et al., 2014). Diese Unterschiede sind neben der Äskulin-Positivität anderer Bakterienspezies erklärbar durch die meist höhere Konzentration von Vancomycin in chromogenen Medien (8–10 µg/ml).

Pediococcus spp. stellten in unserer Studie eine der häufigsten Ursachen für ein falsch-positives Ergebnis da. Besonders betroffen war dabei der VRE-Selektivagar. *Pediococcus spp.* gelten als opportunistische Erreger bei immunsupprimierten Patienten, besitzen eine intrinsische Resistenz gegenüber Vancomycin und werden vermutlich durch eine antibiotische Vancomycin-Therapie selektiert. Auch in anderen Studien traten sie als falsch-positive Erreger auf dem chromID VRE Agar auf (Peltroche-Llacsahuanga et al., 2009). Neben *Pediococcus spp.* sind *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* und *Leuconostoc spp.* Spezies mit *low-level*-Vancomycin-Resistenz, die Äskulin-positiv und auf entsprechenden Nährmedien morphologisch kaum von *E. faecium* und *E. faecalis* abgrenzbar sind. Ähnlich zu unseren Ergebnissen konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass sowohl der Brilliance VRE- als auch der chromID VRE-Agar Enterokokken mit intrinsischer Vancomycin-Resistenz wie *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* nahezu vollständig unterdrücken (Wijesuriya et al., 2014; Gouliouris et al., 2016). Galle-Äskulin-basierte Medien weisen hingegen häufiger positive Ergebnisse für *vanC*-tragende Enterokokken auf (Suwantarat et al., 2014). Gleichermäßen konnte in anderen Studien die zuverlässigere Unterdrückung von *Lactobacillus spp.* durch den chromID VRE Agar gezeigt werden (Asir et al., 2009).

Zu den Bakterienspezies, deren Wachstum offenbar nur in geringem Maße durch den chromID VRE Agar unterdrückt wird, zählen die Hefen. Auch in anderen Studien wurde das vermehrte Auftreten von Hefewachstum bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden auf dem chromID VRE Agar beobachtet. In einer Studie waren 46,5 % der Non-VRE, die ebenfalls in Enterokokken-typischer Farbe gewachsen waren, *Candida*-Spezies (Delmas et al., 2007; Grabsch et al., 2008). *Candida* spp. wurden in unserer Studie am zuverlässigsten durch den Brilliance VRE Agar unterdrückt. Gleiches galt für die Unterdrückung des Wachstums Gram-negativer Erreger. Vancomycin-sensible Enterokokken sowie weitere Gram-positive Erreger wurden am zuverlässigsten durch den chromID VRE Agar unterdrückt. Auf dem Brilliance VRE Agar wurde die größte Anzahl Vancomycin-sensibler Enterokokken detektiert. Da über die tatsächliche Vancomycin-Konzentration in diesem Nährmedium vom Hersteller keine Angaben gemacht werden, vermuteten wir, dass die Konzentration im Brilliance VRE Agar deutlich geringer ist als im chromID VRE Agar. In Populationen mit hoher Prävalenz an VSE eignet sich dieser Agar somit weniger zur Detektion von VRE als der chromID VRE Agar.

Übereinstimmend mit anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Spezifität und der *Positive Predictive Value* aller drei Selektiv-Indikatormedien nach 48 Stunden Bebrütung geringer waren als nach 24 Stunden. Dies ist auf die Förderung des Wachstums zusätzlicher Bakterien durch verlängerte Bebrütungs-dauer zurückzuführen. Delmas et al. beschrieben bereits, dass der chromID VRE Agar nach Inokulation mit Anreicherungsbrühe nach 24 Stunden Inkubation eine Spezifität von 95,13 %, nach 48 Stunden von nur noch 89,04 % aufwies. Der *PPV* sank von 31,43 % auf 16,92 % (Delmas et al., 2007; Grabsch et al., 2008; Wijesuriya et al., 2014; Gouliouris et al., 2016).

Für die Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass in der hier vorliegenden Studie die *vanA*-Prävalenz (6,85 %) deutlich höher lag als die Prävalenz *vanB*-tragender VRE (1,37 %). Wie in der Literatur beschrieben, wiesen auch in unserer Studie *vanB*-positive Enterokokken niedrigere MHK_{VA} auf als *vanA*-positive Isolate. VRE mit MHK zwischen 4 und 8 mg/l sind auf Selektivmedien kulturell in der Regel nur schwer nachzuweisen (Courvalin, 2006; Adler et al., 2010). So beschrieben einige Studien, dass Screening-Medien für *vanB*-

positive Stämme mit niedriger MHK für Vancomycin (<16 mg/l) im Vergleich zu *vanA*-positiven Stämmen mit höherer MHK deutlich herabgesetzte Sensitivität aufweisen (Adler et al., 2010; Wijesuriya et al., 2014). Der geringe *PPV* für *vanB*-tragende VRE in Screening-Untersuchungen hängt vermutlich mit der recht hohen Prävalenz von *vanB*-Genen in anderen intestinalen Mikroorganismen zusammen (Rathe et al., 2010). Außerdem enthalten die chromogenen Nährmedien meist Vancomycin-Konzentrationen um 8 mg/l und können somit das Wachstum von *low-level*-resistenten VRE unterdrücken. Erstaunlicherweise wurden in unserer Studie alle durch die PCR identifizierten *vanB*-positiven VRE-Isolate auch kulturell nachgewiesen – auch jene, deren MHK_{VA} unter 16 mg/l lag, obwohl der chromID VRE Agar eine Vancomycin-Konzentration von 8 mg/l enthält. Daraus schlossen wir, dass, anders als von Adler et al. beschrieben, durch den chromID VRE Agar auch *vanB*-tragende Enterokokken recht zuverlässig detektiert werden können (Adler et al., 2010). Dies deckt sich mit Befunden von Klare et al., die zeigten, dass *vanB*-Isolate durch chromID VRE Agar (124/129) und Brilliance VRE Agar (121/129) ähnlich zuverlässig nachgewiesen werden konnten (Klare et al., 2012b).

Die charakteristische Einfärbung von *E. faecium*- und *E. faecalis*-Kolonien ist im Hinblick auf die Spezifität von beachtlicher Bedeutung. Es zeigte sich hier, dass eine Speziesnachtestung bei den chromogenen Medien in den wenigsten Fällen notwendig war, wenn die Kolonien die Enterokokken-typischen Farben Türkis oder Lila aufwiesen. In diesen Fällen handelte es sich tatsächlich meist um die entsprechende Spezies *E. faecalis* oder *E. faecium*. Lediglich einzelne *Candida*-Spezies zeigten auf dem chromID VRE Agar eine Enterokokken-ähnliche Färbung. Durch MALDI-TOF ist jedoch eine rasche Differenzierung ohne relevanten Zeitverlust möglich.

Eine Limitation dieser Studien stellt das alleinige Auftreten von VRE_{Efm} dar. Im gesamten Untersuchungskollektiv traten keine VRE_{Efs} auf, sodass keine Vergleiche bezüglich des Wachstums dieser beiden Spezies untereinander angestellt werden konnten. Das überwiegende Auftreten von VRE_{Efm} deckt sich mit der allgemeinen Verteilung von VRE_{Efm} und VRE_{Efs} in der Bevölkerung (Song et al., 2009).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass kulturelle Screeningmethoden unverzichtbar sind, um im stationären Bereich mit Hochrisikopopulationen VRE-Besiedlungen zu erkennen und die Ausbreitung von VRE eindämmen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass chromogene Screeningmedien (Brilliance VRE- und chromID VRE Agar) dem Galle-Äskulin-basierten VRE-Selektivagar in der Detektion von VRE signifikant überlegen sind. chromID VRE Agar stellt eine sichere Methode zur Detektion dieser Bakterienspezies dar und ermöglicht die Diskriminierung von *E. faecium* und *E. faecalis*. Gleichzeitig werden das Wachstum von Non-VRE und damit teure Anschlussdiagnostik durch aufwändige Speziesidentifikation gering gehalten. Chromogene Screeningmedien, insbesondere chromID VRE Agar, können die Dauer der Identifikation eines Keimes deutlich reduzieren. In den meisten Fällen kann durch ihren Einsatz bei positivem kulturellen Befund mit Identifikation von Enterokokken auf die nachfolgende Empfindlichkeitstestung gegenüber Vancomycin mittels E-Test verzichtet werden, da die meisten VSE von vornherein im Wachstum gehemmt werden. Klare et al. zeigten in diesem Zusammenhang sogar, dass die Performance chromogener Screening-Medien besser ist, als die der E-Test-Methode (Klare et al., 2012b).

Analyse der Populationsstruktur von VRE beim Menschen

Zur Diagnostik von Ausbrüchen und Transmissionsprozessen im stationären Bereich, welche durch denselben Keim verursacht werden, wird im klinischen Alltag die Pulsfeldgelelektrophorese (PGFE) eingesetzt. Bei Häufungen von Infektionen mit demselben Erreger innerhalb einer Station wird sie standardmäßig verwendet, um DNA-Muster verschiedener VRE-Isolate miteinander zu vergleichen. Dazu wird eine Kultur des Erregers angelegt und aus dem Bakterienrasen eine einzelne der als VRE identifizierten Kolonien ausgewählt. Diese wird mittels PFGE analysiert und mit einer anderen in der Regel ebenso zufällig ausgewählten Kolonie aus der Probe eines anderen Patienten verglichen.

Im Laboralltag dieser Routine-Diagnostik konnte im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE beobachtet werden, dass die VRE-Besiedlungstypen einzelner Patienten im Verlauf der Untersuchungen nicht konstant waren. So wiesen VRE-Isolate von Patienten in Folge-Abstrich-Untersuchungen mitunter andere PFGE-Bandenmuster auf als im ursprünglichen Abstrich.

Didelot et al. beschrieben ausführlich, dass eine genetische Variabilität für bakterielle Pathogene innerhalb eines Wirtsorganismus existiert. Dies bedeutet, dass unterschiedliche Klone desselben Erregers mit variablen Eigenschaften in einem Individuum auftreten (sogenannte *within-host-diversity*) (Didelot et al., 2016).

Zum Nachweis solcher genetischen Variabilität innerhalb eines Wirtsorganismus dienen bisher vorwiegend molekulare Methoden wie Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Analyse von Mikrosatelliten-DNA (*variable-number tandem repeats – VNTR*), Multi-locus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) und *Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST)*. Beispielsweise konnte mittels PFGE gezeigt werden, dass Mischkolonisationen aus unterschiedlichen genetischen Linien bei *S. aureus* eine Rolle spielen (Cespedes et al., 2005). Andere Studien konnten *within-host-diversity* unter anderem für *K. pneumoniae* (Mathers et al., 2015) und *B. dolosa* (Lieberman et al., 2013), nachweisen. Für VRE liegen bisher keine Untersuchungen zu *within-host-diversity* vor, sodass diese Arbeit einen Beitrag zur Aufschlüsselung klonaler Strukturen von Enterokokken leistet.

Auf Grundlage der oben genannten Beobachtungen stellten wir uns die Frage, ob auch für VRE eine *within-host-diversity* beschrieben werden kann. Dabei galt es zu klären, ob Patienten tatsächlich nur mit einem VRE-Klon besiedelt sind, oder ob im Rahmen von genetischer Variabilität zu einem bestimmten Zeitpunkt das Auftreten unterschiedlicher VRE-Klone im menschlichen Darm möglich ist. Zu diesem Zweck wurden VRE-kolonisierte KMT-Patienten (knochenmarkstransplantiert) über die Dauer ihres stationären Aufenthaltes beobachtet. Mittels PFGE wurden die VRE-Isolate derjenigen Patienten, von denen im Verlauf des Aufenthaltes mehrere VRE-positive Proben gewonnen werden konnten, analysiert. Dabei wurde für die PFGE-Analyse nicht – wie in der Routinediagnostik üblich – nur eine Kolonie ausgewählt, sondern es wurden vierzehn VRE-Kolonien jeder einzelnen Patientenprobe miteinander verglichen.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass bei 20 Patienten, bei denen Folge-materialien gewonnen werden konnten, 35,48 % (weiche Diversitätskriterien) der Proben VRE mit heterogenen PFGE-Mustern enthielten. Auch unter Anlage der strengeren Kriterien war dies immerhin bei 17,74 % der Proben der Fall. In den anderen Proben wurden homogene Kolonisationsmuster durch identische Pulso-typen beobachtet. Nichtsdestotrotz zeigen die hier erhobenen Befunde, dass Pa-tienten mit unterschiedlichen VRE-Pulsotypen kolonisiert sind.

Within-host-diversity entsteht durch eine Vielfalt an Mechanismen. Innerhalb ei-nes Wirtsorganismus kann es zu unterschiedlichsten genetischen Veränderun-gen in Populationen von Pathogenen kommen. Dazu gehören zum Beispiel ein-fache Punkt-Mutationen, homologe Rekombination von Genabschnitten, Ge-nomdegradation, genetische Drift, horizontaler Gentransfer oder auch Hypermu-tation. Hypermutanten entstehen, wenn *DNA-mismatch-repair*-Systeme in ihrer Funktion gestört werden. Sie zeichnen sich durch eine besonders hohe Rate an Punktmutationen aus. Für die Entstehung von *within-host-diversity* ist dann zum einen die Mutationsrate für Mutationen, die dem Pathogen einen Selektionsvorteil verschaffen, relevant, zum anderen die Qualität des Überlebensvorteils. Mutati-onen, die dem Erreger einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mutanten oder

dem Wildtyp verleihen, ermöglichen ihm, sich in passenden Nischen innerhalb des Wirtes anzusiedeln (Taddei et al., 1997).

Einen anderen wichtigen Faktor in der Entstehung von *within-host-diversity* stellt die Transmission dar. Erreger können durch simultane Übertragung multipler genetischer Linien durch denselben Donor in einen Wirtsorganismus gelangen und dort ein neues Reservoir für *within-host-diversity* bilden. Möglich ist jedoch ebenso, dass *within-host-diversity* das Ergebnis zweier oder mehrerer separater Übertragungsereignisse durch unterschiedliche Donoren abbildet (Worby et al., 2014) (vergleiche Abbildung 21). Dieser Mechanismus könnte auch bei den hier untersuchten Patienten eine Rolle spielen und würde erklären, warum es innerhalb kurzer Zeit zu dramatischen Änderungen der VRE-Populationsstruktur kommt. In der Tat konnten auch eindeutige Belege für VRE-Übertragungsereignisse zwischen einzelnen Patienten innerhalb der hier untersuchten Population gefunden werden.

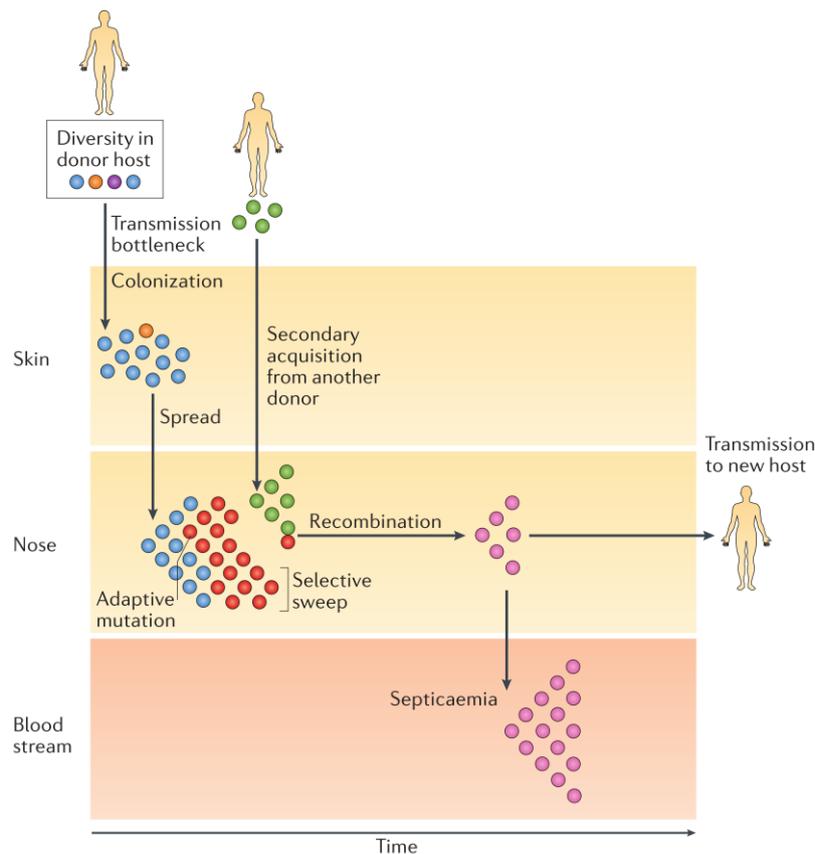


Abbildung 21: within-host-evolution eines Bakteriums: Oben links im Bild ist ein Wirt mit einer heterogenen Kolonisation durch einen Erreger dargestellt. Er überträgt einen oder mehrere Klone aus seinem Kolonisations-Pool (blau) auf einen anderen Patienten. Der Transmissionsprozess stellt dabei eine Art „Flaschenhals“ dar, da nur eine Teilmenge der Klone übertragen wird. Innerhalb des neuen Wirtes kommt es zu Mutationen (orange, rot). Die Population wächst. Durch einen Selektionsprozess kann es zur Dominanz mutierter Klone kommen (rot). Erfolgt eine zweite Übertragung eines anderen Klons durch einen weiteren Wirt (grün), kann es zur Rekombination von Klonen kommen, die zur Ausbildung neuer Klone führt (lila). Diese können dann wiederum auf andere Patienten übertragen werden oder bei erhöhter Virulenz verglichen mit dem Ausgangsklon zu schweren Infektionen führen, hier Septikämie (Didelot et al., 2016).

Aus der Beobachtung heterogener Kolonisationstypen ergab sich die Frage, ob und inwiefern sich diese innerhalb eines Individuums im Verlauf des stationären Aufenthaltes veränderten. Aus diesem Grund wurden die vierzehn VRE-Pulsotypen einer Patientenprobe mit allen je vierzehn VRE-Pulsotypen der folgenden und vorangegangenen Abstrich-Untersuchungen desselben Patienten verglichen. Dabei zeigten 55 %, beziehungsweise 25 % unter Anlage des strengen Bewertungsmaßstabes, eine heterogene Besiedlung mit unterschiedlichen VRE-

Pulsotypen. Bei 45 % der Patienten, beziehungsweise 75 %, wurden konstante Populationen der VRE-Pulsotypen beobachtet. Diese Patienten boten in der PFGE-Analyse über die gesamte Dauer des stationären Aufenthaltes denselben VRE-Pulsotyp dar.

Die Anzahl der verschiedenen VRE-Pulsotypen innerhalb einer Patientenprobe variierte. Der Verwandtschaftsgrad heterogener Typen eines Patienten war ebenfalls von unterschiedlicher Ausprägung.

Weiterführend fragten wir uns, ob bei einer heterogenen VRE-Kolonisation ein dominanter VRE-Pulsotyp existiert, der im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes und unter Antibiotika-Therapie andere VRE-Pulsotypen verdrängt, oder ob hingegen die Besiedlung mit unterschiedlichen VRE-Pulsotypen quantitativ zunimmt. Dazu wurde jeweils die Anzahl aller unterschiedlichen VRE-Pulsotypen jeder Probe eines Verlaufspatienten mit heterogenem Kolonisationsmuster ermittelt. Es fanden sich keine einheitlichen Trends im Besiedlungsverhalten. Auch wenn bei der Mehrheit der beobachteten Patienten eine Zunahme der Anzahl an VRE-Pulsotypen zu beobachten war, lässt sich über das tatsächliche Besiedlungsverhalten anhand dieser Daten nur wenig aussagen, da die Gruppe VRE-positiver Patienten mit Verlaufsanalyse zu klein war und die Veränderungen der Anzahl der VRE-Pulsotypen keinen deutlichen Trend erkennen lassen. Es ist auf der Basis unserer Beobachtungen jedoch nicht anzunehmen, dass es durch quantitativ dominierende Typen zu einer Verdrängung anderer VRE-Pulsotypen kommt. Wahrscheinlicher ist, dass die Fluktuation der Besiedlung durch VRE an die individuelle Darmflora und multiple äußere Faktoren gebunden ist.

Aus der Beobachtung des Auftretens heterogener VRE-Populationen innerhalb eines Individuums ergab sich die Frage, in welchen Eigenschaften sich die VRE-Pulsotypen voneinander unterscheiden. Im Rahmen dieser Fragestellung wurde zunächst mittels *van*-PCR für jeden erstmalig aufgetretenen abweichenden VRE-Pulsotyp überprüft, welchem *van*-Genotypen dieser VRE-Pulsotyp zuzuordnen war. Hier zeigte sich, dass auch bei heterogenen Kolonisationsmustern der *van*-Genotyp innerhalb einer Probe über den Beobachtungszeitraum konstant blieb. Bei einem einzigen Patienten konnte innerhalb eines Folgeabstrichs neben den

bekannten *vanA*-tragenden VRE-Pulsotypen auch ein *vanB*-tragender VRE-Pulsotyp beobachtet werden. Dieser *vanB*-tragende VRE-Pulsotyp wies dabei in der Empfindlichkeitstestung eine wesentlich geringere MHK_{VA} als die übrigen *vanA*-tragenden VRE-Pulsotypen. Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass ein *van*-Genotypen-Switch oder das Hinzutreten von VRE-Pulsotypen anderer *van*-Genotypen im Mikrobiom nicht üblich zu sein scheint. Dass eine parallele Kolonisation durch unterschiedliche *van*-Typen möglich ist, lässt sich jedoch nicht ausschließen.

Zur weiteren Analyse, in welchen Eigenschaften sich die Klone voneinander unterscheiden, wurde geprüft, ob für die verschiedenen VRE-Klone auch unterschiedliche Resistenzmuster vorlagen. Es wurden die Empfindlichkeiten der beobachteten VRE-Pulsotypen gegenüber den Antibiotika Vancomycin, Teicoplanin, Linezolid und Daptomycin ermittelt. Dazu wurden die MHK aller VRE-Pulsotypen aus den Proben bestimmt, in denen sie das erste und das letzte Mal aufgetreten waren.

Bei den meisten Patienten konnte unter Berücksichtigung geringer Streuungen innerhalb einer Probe eine konstante Verteilung der MHK der verschiedenen VRE-Pulsotypen gegenüber den vier Antibiotika gezeigt werden. Bei 20 % der Patienten kam es zu relevanten Veränderungen der MHK_{VA} , bei allen anderen blieben die MHK_{VA} konstant. Am häufigsten konnten Veränderungen in der MHK für Daptomycin nachgewiesen werden. Bei 35 % der 20 VRE-positiven Verlaufspatienten wurde eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin beobachtet. Diese betraf sowohl die VRE-Pulsotypen innerhalb einer Probe als auch homogene Klone im Zeitverlauf. Die *within-host-diversity* von VRE stellt somit eine Herausforderung für die korrekte Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit und folglich die Einleitung gezielter antibiotischer Therapien dar. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb eines Wirtes VRE-Klone mit unterschiedlichen Resistenzmustern für Antibiotika auftreten. Wird in der Diagnostik nur ein einzelner VRE-Klon identifiziert und seine Antibiotika-Sensibilität getestet, besteht folglich die Möglichkeit, VRE-Klone mit abweichenden MHK zu übersehen.

Dies kann dazu führen, dass die eingeleitete antibiotische Therapie nicht ausreicht, um alle VRE-Klone zu erfassen. Auch besteht die Möglichkeit, dass ein Patient a priori sowohl mit sensiblen, als auch mit bereits resistenten Enterokokken-Stämmen kolonisiert ist. In diesem Fall wäre bei reiner Testung des sensiblen Stammes die eingesetzte antibiotische Therapie möglicherweise ebenfalls unzureichend.

In der vorliegenden Studie konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass es in heterogenen VRE-Populationen zur Dominanz jener VRE-Klone kam, die sich in ihrem Resistenzmuster von dem der anderen Klone unterschieden. Es ist jedoch anzunehmen, dass VRE-Klone mit hohen MHK bei Selektionsdruck unter antibiotischer Therapie einen Überlebensvorteil haben und es im Verlauf zur Dominanz dieser Typen kommt. Ebenso ist anzunehmen, dass in Bereichen, in denen wenig Antibiotika eingesetzt werden, resistente Klone eher zugunsten des Wildtyps verdrängt werden, da Resistenzbildung mit hohen Kosten für Bakterien einhergeht. So wird davon ausgegangen, dass Resistenz-tragende Elemente in Enzymen die Effizienz von Replikation und Transkription reduzieren, da sie aufwändiger herzustellende Stoffwechselprodukte darstellen (Comas et al., 2011; Didelot et al., 2016).

Wir stellten uns die Frage, ob die Abnahme der Empfindlichkeit einzelner VRE-Klone bei den untersuchten Patienten durch eine Therapie mit dem entsprechenden Antibiotikum zustande gekommen war. Aus diesem Grund wurde erfasst, welche Antibiotika die Patienten während ihres stationären Aufenthaltes erhalten hatten. Es zeigte sich, dass alle Patienten, bei denen eine Zunahme der MHK_{DPC} beobachtet wurde, im Verlauf des stationären Aufenthaltes mit Daptomycin behandelt worden waren. Insgesamt fand sich bei 58,3 % der Verlaufspatienten eine Zunahme der MHK_{DPC} . Damit ist deutlich erkennbar, dass der Einsatz von Daptomycin in der Therapie von VRE zu einer zunehmenden Resistenzbildung dieses Erregers führt. Da es sich bei Daptomycin um ein Reserveantibiotikum in der Therapie von VRE handelt, sollte die Verwendung von Daptomycin somit stets restriktiv erfolgen. Im Falle eines zu großzügigen Einsatzes besteht hier die

große Gefahr der Selektion von Daptomycin-resistenten VRE mit einem Wirkverlust dieses Antibiotikums. Eine Abnahme der Sensibilität von VRE gegenüber Daptomycin unter entsprechender antibiotischer Therapie konnte bereits in anderen Studien beobachtet werden (Ruckert, 2015).

Auf Basis der Zusammenschau unserer Beobachtungen stellten wir uns die Frage, inwiefern die PFGE eine zuverlässige Methode in der Diagnostik klinischer Ausbrüche darstellt. Es lässt sich festhalten, dass *within-host-diversity* dazu führen kann, dass Transmissionsereignisse zwischen Patienten falsch gedeutet und Übertragungsketten verkannt werden. Diese Gefahr besteht vor allem dann, wenn nur ein einzelnes Genom eines pathogenen Erregers in einem Wirt untersucht wird. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass dieses Risiko für Kolonisation und Infektionen mit VRE besteht. So konnte bei einigen Patienten, deren stationärer Aufenthalt zeitgleich lag, das Auftreten identischer VRE-Pulsotypen beobachtet werden. Es ist hochwahrscheinlich, dass eine Transmission einzelner Klone innerhalb dieser Patientengruppe stattgefunden hat. Bei den betroffenen Patienten konnten neben dem patientenübergreifend isolierten VRE-Pulsotyp noch weitere heterogene Pulsotypen isoliert werden. Diese unterscheiden sich in >7 Banden von dem VRE-Pulsotyp, den alle Patienten gemeinsam hatten, sodass eine genetische Verwandtschaft unwahrscheinlich ist.

Für die Diagnostik birgt diese Beobachtung folgende Problematik: Bei alleiniger Auswahl eines einzelnen VRE-Klons kolonisierter Patienten, besteht das Risiko rein zufällig jene auszuwählen, deren Anzahl an Bandenunterschieden >7 Banden beträgt. Eine genetische Verwandtschaft würde somit abgelehnt und die identischen VRE-Pulsotypen würden übersehen. Zum anderen besteht die Schwierigkeit der zeitlichen Zuordnung der Übertragungsprozesse beziehungsweise ihrer Ausbreitungsrichtung. Anhand der PFGE-Diagnostik ist es nicht möglich, Donor und Akzeptor eines VRE-Klons auszumachen. Ebenso bleibt spekulativ, ob in den kolonisierten Patienten bereits eine *within-host-diversity* vorlag oder ob ihr heterogenes Kolonisationsmuster allein durch Transmission und Neumutationen zustande gekommen ist (vergleiche auch Abbildung 22).

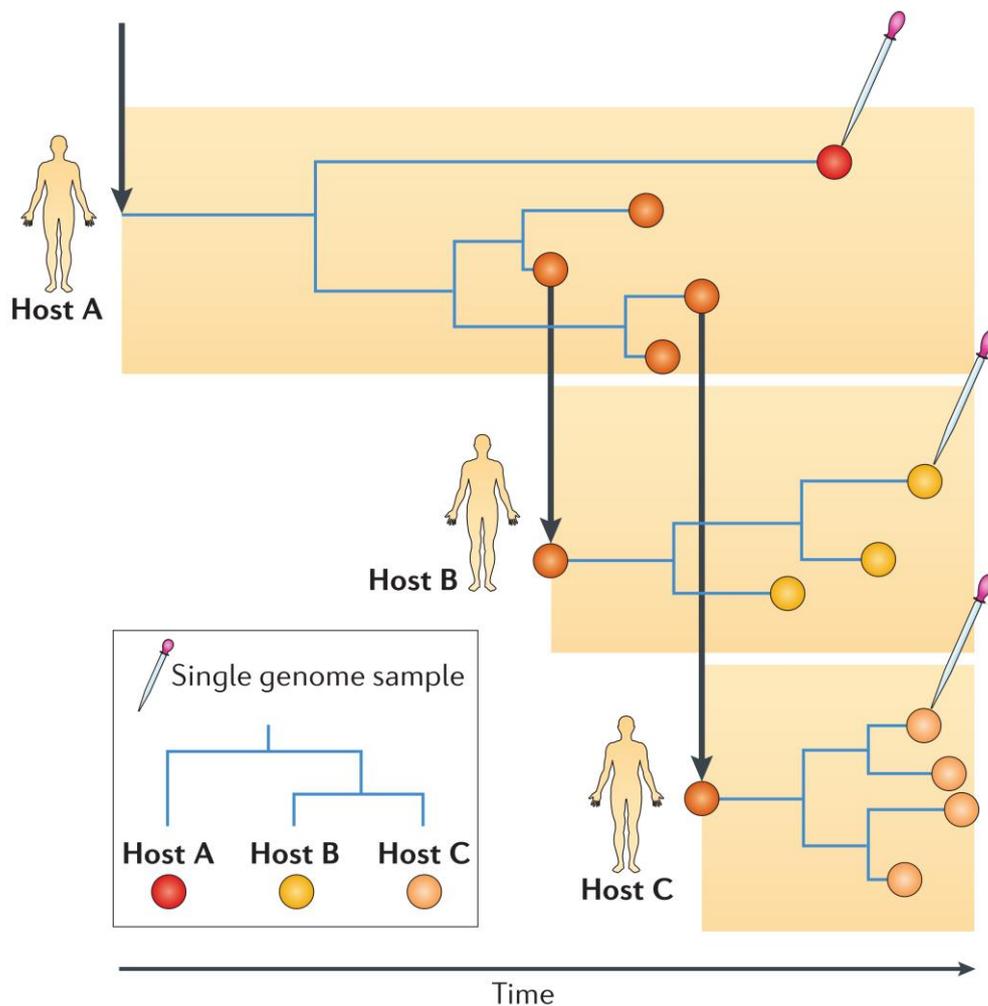


Abbildung 22: Darstellung des Effektes von within-host-diversity auf die Diagnostik von Transmissionsprozessen und Ausbrüchen: Gegeben seien die Patienten A, B und C, die jeweils durch VRE besiedelt sind. Durch PFGE kann gezeigt werden, dass Patient A eine heterogene Kolonisation aus zwei verschiedenen VRE-Klonen (orange, rot) aufweist. Einen dieser Klone überträgt er auf die Patienten B und C (vertikale Pfeile). Durch Mutationsprozesse kommt es nun innerhalb der Patienten B und C wiederum zur Ausbildung einer within-host-diversity (gelb, beige). Wird für die Ausbruchsdagnostik nur ein einzelner VRE-Klon herangezogen (in diesem Beispiel A: rot, B: gelb, C: beige), ist es möglich, bei niedrigem Verwandtschaftsgrad der Klone den gemeinsamen Ursprung der Kolonisation der Patienten B und C durch den Patienten A zu verkennen (Didelot et al., 2016).

So kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob beispielsweise Patient VRE-05-UF zunächst den Patienten VRE-03-IN infiziert hat und dieser dann wiederum zufällig denselben VRE-Pulsotyp auf den Patienten VRE-04-SS übertragen hat. Da der Patient VRE-05-UF ein homogenes Kolonisationsmuster auf-

weist, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass er in zwei unabhängigen Transmissionsereignissen seinen VRE-Pulsotyp an die Patienten VRE-03-IN und VRE-04-SS weitergegeben hat. Ob in diesen Patienten bereits eine *within-host-diversity* vorlag oder ob ihr heterogenes Kolonisationsmuster durch Neu-Mutationen zustande gekommen ist, bleibt spekulativ (vergleiche auch Abbildung 20, Abbildung 22).

Die Variation der VRE-Pulsotypen von VRE-besiedelten Patienten stellt folglich eine Problematik für die Erkennung stationärer Ausbrüche mittels PFGE dar, beziehungsweise erschwert die Zuordnung einzelner Patienten zu einem solchen. Um die Ausbruchsdagnostik mittels PFGE sicher beurteilen zu können, müsste man die Typisierung also für mehrere VRE-Kolonien durchführen. Im klinischen Alltag würde dies bedeuten, dass eine höhere Zahl an VRE-Kolonien in die PFGE eingeschlossen und mit denen anderer Patienten verglichen werden müsste. Dies stellt einen kaum tragbaren technischen und zeitlichen Aufwand dar. Es empfiehlt sich somit, über den Einsatz alternativer Methoden nachzudenken beispielsweise der Sequenzierung.

In den letzten Jahren gewann das *whole-genome-sequencing* (WGS) durch zunehmende Reduktion von Kosten und Bearbeitungszeit stark an Bedeutung für die Typisierung bakterieller Pathogene (Loman et al., 2012). Durch WGS-basierte Studien konnte gezeigt werden, dass Bakterien in der Lage sind, sich mittels *within-host-diversity* an sehr spezifische Bedingungen innerhalb eines Wirtes anzupassen (Didelot et al., 2016). Die Ausprägung der *within-host-diversity* variiert dabei von Erreger zu Erreger stark. Hohe Ausprägungsgrade sind zum Beispiel für *H. pylori* (~ 30 Mutationen pro Jahr pro Genom) (Didelot et al., 2013) niedrige für *S. aureus* (Young et al., 2012), *C. difficile* (Didelot et al., 2012; Eyre et al., 2013; He et al., 2012) und *M. tuberculosis* (~ 0,5–8 Mutationen pro Jahr pro Genom) (Ford et al., 2011; Walker et al., 2013) beschrieben. Einzelne Studien legen nahe, dass *within-host*-Adaption das Potential besitzt, Krankheitsverläufe unterschiedlich zu beeinflussen. In einer Studie an *M. tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass eine genetische Linie eher für Reinfektionen prädisponierte, während eine andere Linie vermehrt Rückfälle bei den Patienten verursachte

(Guerra-Assunção et al., 2015). Inwiefern Re-Kolonisation durch einzelne VRE-Pulsotypen eine Rolle spielt, ist schwierig zu beurteilen, da ein negativer VRE-Screening-Befund nicht automatisch bedeutet, dass ein Patient seinen VRE vollständig verloren hat. Bei Verdrängung resistenter Enterokokken-Stämme durch den Wildtyp bei ausbleibendem Selektionsdruck kann VRE unter die Nachweisgrenze sinken. Vorübergehend negative Befunde werden dann wieder positiv, wenn sich die VRE-Dichte der gastrointestinalen Besiedlung bei erneuter Antibiotikatherapie wieder erhöht (bei KMT-Patienten häufig durch wiederholte Chemotherapie-Zyklen mit Antibiotika-Gabe) (Simon et al., 2004). Ob ein Befund aufgrund dieses Mechanismus wieder positiv geworden ist, oder ob es sich um eine Neu-/Reinfektion mit demselben VRE-Pulsotyp handelt, kann anhand von PFGE-Diagnostik nicht beurteilt werden.

Um Therapien besser anpassen zu können und Übertragungsprozesse verstehen und eindämmen zu können, ist es unabdingbar, mehr Einblicke in Mutationen innerhalb von VRE-Populationen, ihre Adaptationsprozesse, ihr evolutionäres Potential und ihre Übertragung zu gewinnen. Dazu stellt das WGS eine unverzichtbare Methode dar, denn molekulare Techniken wie PFGE können immer nur eine kleine Menge des genetischen Materials untersuchen. Berücksichtigt man die *within-host-diversity* in diagnostischen Prozessen, zum Beispiel durch die Sequenzierung mehrerer bakterieller Isolate innerhalb eines Wirtes, die entweder gleichzeitig oder in der longitudinalen Analyse gesammelt wurden, können Transmissionsprozesse zuverlässiger rekonstruiert werden. Einschränkend muss jedoch beachtet werden, dass durch hohe genetische Variabilität die Anzahl der Optionen für stattgehabte Transmissionsprozesse steigt.

Aus der Beobachtung unserer Studie, dass einzelne Patienten mit heterogenen VRE-Klonen mit unterschiedlichen Resistenzmustern besiedelt sein können, ergab sich die Frage, welche Konsequenzen sich für den klinischen Alltag ergeben. Zur Unterbrechung der Transmission von VRE und von Infektionsketten sind Hygienemaßnahmen zwingend erforderlich. Derzeit werden zwischen Standardhygienemaßnahmen (Stufe I) und Isolierungsmaßnahmen (Stufe II) unterschieden. Bei mit VRE kolonisierten Patienten, die nicht zur Risikopopulation gehören,

sind die Standardhygienemaßnahmen in der Regel ausreichend. Zu diesen Maßnahmen gehören das Tragen von Handschuhen, die hygienische Händedesinfektion, das Tragen von Schutzkitteln bei Umgang mit kontaminiertem Material und die Flächendesinfektion von sanitären Anlagen und der nahen Patientenumgebung. Bei Nicht-Risikopatienten wird eine organisatorische oder räumliche Isolierung gemäß Stufe II derzeit nur bei Ausbrüchen empfohlen.

Als Risikogruppen für VRE-Infektionen sind derzeit hämatologisch-onkologische Patienten, Lebertransplantationsstationen, Dialysestationen und die Neonatologie klassifiziert. Mit Patienten in diesen Bereichen sollte stets nach den Hygienemaßnahmen der Stufe II verfahren werden, um das Transmissionsrisiko zu minimieren. Die Stufe II sieht neben den Standardhygienemaßnahmen der Stufe I eine organisatorische oder räumliche Isolierung mit Kittelpflege vor (Mutters et al., 2013b).

Zu den Hygiene-Empfehlungen gehört auch die Kohortenisolation (Mutters et al., 2013b). Kohortenisolation sieht die gemeinsame Unterbringung von Patienten mit identischem Krankheitserreger vor. Basierend auf den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit stellten wir uns die Frage, ob Kohortenisolation tatsächlich eine geeignete Maßnahme zur Eindämmung der Transmission von VRE darstellt, wenn bei Patienten innerhalb einer Ausbruchskohorte heterogene VRE-Klone vorliegen. So ist es im Rahmen eines Ausbruchs möglich, dass Patienten mit dem Ausbruchsklon besiedelt sind, jedoch weitere VRE-Klone in ihrer Darmflora tragen, die keinen oder einen niedrigeren Verwandtschaftsgrad mit dem für den Ausbruch verantwortlichen Klon besitzen. Auf Grundlage unserer Beobachtungen ist auch die Möglichkeit anzunehmen, dass im Verlauf des Ausbruchs weitere VRE-Klone hinzutreten. Diese können dann auf andere Patienten in der Ausbruchskohorte übertragen werden, was wiederum bei unterschiedlichen Resistenzmustern die Sanierung beziehungsweise die erfolgreiche antibiotische Therapie für einzelne Patienten erschweren kann und somit für ein schlechteres Outcome sorgt.

Patienten mit VRE-Infektionen sollten aufgrund der wechselhaften Resistenzmuster von VRE-Klonen also nur dann in einer Kohortenisolation untergebracht

werden, wenn ausgeschlossen werden kann, dass sie neben dem für den Ausbruch verantwortlichen VRE-Klon auch mit weiteren VRE-Klonen besiedelt sind. Andernfalls kann eine wechselseitige Transmission mit unterschiedlich resistenten Stämmen unterschiedlicher Virulenz und weiteren, den Krankheitsverlauf beeinflussenden Faktoren nicht ausgeschlossen werden. Um eine Kolonisation mit weiteren VRE-Klonen vollständig auszuschließen, müsste aber eine enorm hohe Zahl an VRE-Klonen aus einer Patientenprobe untersucht werden. Inwiefern dies im klinischen Alltag realisierbar ist, bleibt zu diskutieren.

Zu diskutieren wären anschließend an die vorliegende Studie unter anderem folgende Fragen:

- Was sind die Bedingungen für das Auftreten von *within-host-diversity* bei VRE? Welche endogenen und exogenen Faktoren begünstigen eine heterogene VRE-Kolonisation aus verschiedenen Pulsotypen innerhalb eines Individuums? Und welche Faktoren sind dafür verantwortlich, dass eine homogene Besiedlung durch einen einzelnen VRE-Pulsotyp über lange Zeit persistieren kann, ohne dass neue Klone hinzutreten?
- Welche Rolle spielen *within-host*-Adaptationsprozesse von VRE in der Beeinflussung des Verlaufs von Infektionen? Lassen sich Aussagen über unterschiedliche Virulenzgrade bei VRE-Kolonisation mit homogenem oder heterogenem Besiedlungsmuster treffen? Gibt es unterschiedliche Virulenzausprägungen innerhalb heterogener VRE-Pulsotypen eines Wirtes?
- Welche Bedingungen fördern die Zunahme von Virulenz einzelner VRE-Pulsotypen innerhalb eines Wirtes, welche die Abschwächung?
- Welche Methoden können dazu beitragen, Transmissionsprozesse zuverlässig zu rekonstruieren?

Limitierend für diese Studie ist sicherlich, dass nur eine begrenzte Anzahl an Kolonien einer VRE-Kultur ausgewählt werden konnten. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass im Darm der Patienten mit heterogener Population weitere VRE-Klone vorkamen, die durch die zufällige Auswahl von vierzehn Kolonien nicht erfasst wurden.

Limitierend sind außerdem die kurze Dauer des Beobachtungszeitraums und die teils nur geringe Anzahl an Verlaufspuren, die miteinander verglichen werden konnten. Bei einer Prävalenz von VRE von circa 10 % in Deutschland (European Centre for Disease Prevention Control, 2017) müssten an dieser Stelle noch größere Kollektive untersucht werden, um belastbarere Ergebnisse zu erhalten. Es lässt sich jedoch festhalten, dass bereits in diesem kleinen Untersuchungskollektiv eine ausgeprägte Heterogenität der VRE-Klone beobachtet werden konnte.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Studie ist weiterhin zu berücksichtigen, dass das ausgewählte Patientenkollektiv aus Stammzelltransplantierten und Immunsupprimierten eine Patientengruppe darstellt, bei der – verglichen mit anderen Patienten – ein größerer Einsatz von Antibiotika besteht. Dies erhöht den Selektionsdruck, was vermuten lässt, dass in diesem Kollektiv vermehrt zu Resistenzen neigende Erreger zu finden sind. In der vorliegenden Studie bei KMT-Patienten deckte sich jedoch die Prävalenz von VRE-Kolonisation mit der bundesweiten.

5 Zusammenfassung

Immunsupprimierte Patienten gehören zum Risikokollektiv für Kolonisation und konsekutive Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken. Über intestinale Kolonisationsmuster von VRE beim Menschen ist bisher nur wenig beschrieben. Daher galt es in der vorliegenden Arbeit zu klären, wie sich das VRE-Kolonisationsmuster bei Stammzelltransplantierten darstellt, inwiefern es sich im Laufe eines stationären Aufenthaltes verändert und in welchen Eigenschaften sich heterogene Kolonisationstypen unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten sowohl mit klonal identischen als auch mit klonal unterschiedlichen VRE-Pulsotypen besiedelt sein können. Die Anzahl heterogener Kolonisationstypen ist hier variabel. Kolonisationstypen können unterschiedliche Empfindlichkeitsgrade gegenüber den Antibiotika Vancomycin, Teicoplanin, Daptomycin und Linezolid aufweisen und diese im Verlauf eines stationären Aufenthaltes, vor allem unter Selektionsdruck durch Antibiotika-Therapie, auch verändern. Zudem sind heterogene Kolonisationsmuster durch unterschiedliche *van*-Genotypen innerhalb eines Individuums möglich.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, kultur-basierte Screening-Indikatormedien zur Detektion von VRE für den klinischen Alltag mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität zu identifizieren. Dies soll den Anteil falsch-negativer Screening-Ergebnisse und aufwändige Anschlussdiagnostik zur Speziesidentifikation minimieren und damit eine rasche Isolation VRE-kolonisierter Risiko-Patienten sowie einen zügigen Therapiebeginn ermöglichen und so das Outcome verbessern. Im Vergleich dreier VRE-Selektivnährböden hinsichtlich ihrer diagnostischen Güte zeigte sich in dieser Arbeit eine deutliche Überlegenheit chromogener Screening-Medien gegenüber Äskulin-basierten Nährböden. Chromogene Screening-Medien sind zudem in der Lage, aufgrund des Färbeverhaltens eine zuverlässige Spezieszuordnung zwischen *E. faecium* und *E. faecalis* zu ermöglichen. Die höchste diagnostische Güte konnte für den chromID VRE Agar nachgewiesen werden.

Das Verkennen von Transmissions- und Ausbruchereignissen, welches durch heterogene Kolonisationsmuster begünstigt wird, stellt insbesondere für Immunsupprimierte wie zum Beispiel stammzelltransplantierte Patienten eine Gefahr dar. Es ist weitere Forschung nötig, um molekulargenetische Methoden zur selektiven und zuverlässigen Detektion von VRE zu etablieren, welche die PFGE in der Diagnostik von Transmissions- und Ausbruchereignissen künftig ablösen werden. Diese Arbeit stellt nur einen Anfangsbaustein in der Analyse intestinaler VRE-Kolonisation dar. Für ein umfassendes Verständnis sowie die optimale Diagnostik und Therapie sind dagegen weiterführende Untersuchungen von VRE-Kolonisationsmustern und den genetischen und phänotypischen Unterschieden heterogener Klone unabdinglich.

6 Abstract

Colonization and subsequent infection with VRE especially occur in immunocompromised patients and other high-risk populations. Little is known as of yet about the colonization patterns of VRE in the human intestine. In this study the variation of the colonization pattern of VRE in stem-cell-transplanted patients during hospitalization was investigated by pulsed-field-gel-electrophoresis and the characteristics of heterogeneous colonization types were examined. Patients were colonized with both clonal homogenous and heterogeneous types of VRE, showing a various amount of PFGE-types. These types presented various levels of antibiotic susceptibility to vancomycin, teicoplanin, daptomycin and linezolid. The level of antibiotic susceptibility changed in an individual during the hospitalization. Colonization by heterogenous *van*-genotypes in an individual was also observed in this study.

This study also aims to identify a cultured-based screening-method for detection of VRE in clinical practice. Therefore the performance of esculin-based VRE-Selektiv-Agar, Brilliance VRE Agar and chrom ID VRE agar were systematically compared with special regard to selectivity, specificity, positive and negative predictive value. The rate of false negative results as well as expensive identification of species are to be minimized in order to enable the rapid isolation of VRE-colonized high-risk-patients as well as the rapid start of antibiotic treatment for a better outcome. The chromogenic media performed better than the esculin-based medium in detection of VRE in stool specimens after an overnight enrichment step and a 24 to 48-h incubation period. Chrom ID Agar performed better than Brilliance VRE agar.

In this investigation evidence is presented that the PFGE represents an insecure method for the detection of transmission and outbreak events. Further research is necessary to establish molecular genetic methods for the detection of VRE, which may replace PFGE in diagnostics. Further investigation of VRE colonization patterns and the genetic and phenotypic characteristics of heterogeneous clones are necessary for optimal diagnosis and treatment.

A Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Eingruppierung der Gattung <i>Enterococcus</i>	5
Abbildung 2: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen <i>E. faecium</i> -Isolaten ...	8
Abbildung 3: Peptidoglykan-Biosynthese und Mechanismus der Vancomycin-Resistenz	18
Abbildung 4: Studienablauf: Materialgewinnung und Analyse	46
Abbildung 5: Darstellung des Nachweises von bakteriellem Wachstum auf VRE-Selektiv-Indikatormedien.....	63
Abbildung 6: Darstellung des Nachweises von <i>E. faecium</i> und <i>E. faecalis</i> auf VRE Selektiv-Indikatormedien	63
Abbildung 7: Verteilung der Anzahl VRE-positiver Proben im Kollektiv VRE-positiver Patienten mit Verlaufsisolaten	70
Abbildung 8: Analyse der VRE-Population anhand von <i>vanAB</i> -PCR	71
Abbildung 9: Analyse der VRE-Population anhand von <i>vanAB</i> -PCR	72
Abbildung 10: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE	74
Abbildung 11: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE	74
Abbildung 12: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE	75
Abbildung 13 A-B: Nachweis von zwei distinkten VRE-Pulsotypen in unabhängig gewonnenen Rektalabstrichen:	76
Abbildung 14 A-C: Nachweis von sechs VRE-Pulsotypen in unabhängig gewonnenen Rektalabstrichen.....	78
Abbildung 15 A-B: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE-Analysen	81
Abbildung 16 A-B: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE ..	83
Abbildung 17 A-C: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE ..	85
Abbildung 18: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE	86
Abbildung 19 A: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE.....	87
Abbildung 20 A-C: Analyse der VRE-Populationsstruktur anhand von PFGE ..	89
Abbildung 21: <i>within-host-evolution</i> eines Bakteriums	109
Abbildung 22: Darstellung des Effektes von within-host-diversity auf die Diagnostik von Transmissionsprozessen und Ausbrüchen.....	114

B Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über natürliche und erworbene Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken	13
Tabelle 2: Übersicht über Genotypen und Charakteristika der Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken	20
Tabelle 3: Tenover-Kriterien zur Interpretation von PFGE-Bandenmustern	27
Tabelle 4: Übersicht über verwendete Geräte.	34
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Chemikalien.	37
Tabelle 6: Übersicht über verwendete Reagenzien und Enzyme.	38
Tabelle 7: Übersicht über verwendete Lösungen für PFGE und PCR.	39
Tabelle 8: Übersicht über für die PCR verwendete Primer.	40
Tabelle 9: Inhaltsstoffe des Amies-Mediums.	41
Tabelle 10: <i>Clinical breakpoints</i> beziehungsweise epidemiologische <i>cut-off</i> -Werte nach EUCAST	49
Tabelle 11: <i>Van</i> -PCR von <i>E. faecium</i>	51
Tabelle 12: Mengenangaben für <i>ptsD</i> -PCR.....	52
Tabelle 13: Multiplex-PCR – Screening von <i>ptsD</i> und <i>Genotypic clustering</i> von <i>E. faecium</i>	52
Tabelle 14: PFGE-Einstellungen für Enterokokken-DNA.	58
Tabelle 15: Validierung <i>vanAB</i> -PCR im Vergleich zur Routine-Kultur aus der Anreicherungsbrühe	61
Tabelle 16: Diversität der Kultur aus der Anreicherungsbrühe	65
Tabelle 17: Analytische Performance von VRE Screeningmedien nach 24- und 48-stündiger Inkubation.	67
Tabelle 18: Validierung der Selektiv-Indikatormedien im Vergleich zur Kombination von Routine-Kultur und <i>van</i> -PCR aus der Anreicherungsbrühe nach 48 Stunden Inkubationszeit.....	68
Tabelle 19: Darstellung des Nachweises von intermediär-getesteten <i>E. faecalis</i> Isolaten auf VRE Selektiv-Indikator-Medien.....	69
Tabelle 20: Verlauf der Anzahl der VRE-Pulsotypen innerhalb der Verlaufsproben VRE-positiver Patienten.....	80

Tabelle 21: heterogene $MHK_{VA/TP}$ bei verschiedenen Pulsotypen (Probe 176 von Patient VRE-02-AK).	91
Tabelle 22: Übersicht über heterogene $MHK_{VA/TP}$ innerhalb von Pulsotypen aus einer Patientenprobe.....	92
Tabelle 23: Veränderung $MHK_{VA/TP}$ eines Pulsotyps über die Zeit (Proben 632, 633 und 639 von Patient VRE-14-RL).	93
Tabelle 24: heterogene MHK_{DPC} bei verschiedenen Pulsotypen (Probe 117 von Patient VRE-01-AP).....	93
Tabelle 25: Übersicht über heterogene MHK_{DPC} innerhalb Pulsotypen aus einer Patientenprobe.	94
Tabelle 26: Veränderung MHK_{DPC} eines Pulsotyps über die Zeit (Proben 632, 633 und 639 von Patient VRE-14-RL).	95
Tabelle 27: Übersicht über die Veränderung der MHK_{DPC} eines Pulsotyps über die Zeit.....	95

C Literaturverzeichnis

- Adler, H.; Oezcan, S.; Frei, R., Vancomycin-Resistant Enterococci of vanB Genotype May Pose Problems for Screening with Highly Selective Media. *Journal of Clinical Microbiology*, (6) 2010, 2323. DOI: 10.1128/JCM.00631-10.
- Almyroudis, N. G.; Lesse, A. J.; Hahn, T.; Samonis, G.; Hazamy, P. A.; Wongkittiroch, K.; Wang, E. S.; McCarthy, P. L.; Wetzler, M.; Segal, B. H., Molecular Epidemiology and Risk Factors for Colonization by Vancomycin-Resistant Enterococcus in Patients with Hematologic Malignancies. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, (05) 2011, 490–496. DOI: 10.1086/659408.
- Anderson, N. W.; Buchan, B. W.; Young, C. L.; Newton, D. W.; Brenke, C.; Lapsley, L.; Granato, P. A.; Ledebor, N. A., Multicenter Clinical Evaluation of VRESelect Agar for Identification of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. *Journal of Clinical Microbiology*, (8) 2013, 2758–2760. DOI: 10.1128/JCM.00979-13.
- Arias, C. A. und Murray, B. E., The rise of the Enterococcus. Beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, (4) 2012, 266–278. DOI: 10.1038/nrmicro2761.
- Arias, C. A.; Panesso, D.; McGrath, D. M.; Qin, X.; Mojica, M. F.; Miller, C.; Diaz, L.; Tran, T. T.; Rincon, S.; Barbu, E. M.; Reyes, J.; Roh, J. H.; Lobos, E.; Sodergren, E.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Quinn, J. P.; Shamoo, Y.; Murray, B. E.; Weinstock, G. M., Genetic Basis for In Vivo Daptomycin Resistance in Enterococci. *New England Journal of Medicine*, (10) 2011, 892–900. DOI: 10.1056/NEJMoa1011138.
- Arthur, M.; Depardieu, F.; Gerbaud, G.; Galimand, M.; Leclercq, R.; Courvalin, P., The VanS-sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *Journal of Bacteriology*, (1) 1997, 97–106. DOI: 10.1128/jb.179.1.97-106.1997.
- Arthur, M.; Molinas, C.; Courvalin, P., The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. *Journal of Bacteriology*, (8) 1992, 2582–2591. DOI: 10.1128/jb.174.8.2582-2591.1992.
- 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. *Journal of Bacteriology*, (1) 1993, 117–127. DOI: 10.1128/jb.175.1.117-127.1993.
- Arthur, M.; Reynolds, P.; Courvalin, P., Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiology*, (10) 1996, 401–407. DOI: 10.1016/0966-842X(96)10063-9.
- Asir, K.; Wilkinson, K.; Perry, J. D.; Reed, R. H.; Gould, F. K., Evaluation of chromogenic media for the isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool samples. *Letters in Applied Microbiology*, (2) 2009, 230–233. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02517.x.
- Avery, R.; Kalaycio, M.; Pohlman, B.; Sobecks, R.; Kuczkowski, E.; Andresen, S.; Mossad, S.; Shamp, J.; Curtis, J.; Kosar, J.; Sands, K.; Serafin, M.; Bolwell, B., Early vancomycin-resistant enterococcus (VRE) bacteremia after allogeneic bone marrow transplantation is associated with a rapidly deteriorating clinical course. *Bone Marrow Transplantation*, (5) 2005, 497–499. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704821.
- Bager, F.; Aarestrup, F. M.; Madsen, M.; Wegener, H. C., Glycopeptide Resistance in *Enterococcus faecium* from Broilers and Pigs Following Discontinued Use of Avoparcin. *Microbial Drug Resistance*, (1) 1999, 53–56. DOI: 10.1089/mdr.1999.5.53.
- Baltz, R. H., Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster. *The Journal of Antibiotics*, (8) 2010, 506–511. DOI: 10.1038/ja.2010.82.
- Bates, J.; Jordens, J. Z.; Griffiths, D. T., Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (4) 1994, 507–514. DOI: 10.1093/jac/34.4.507.
- Bates, J.; Jordens, Z.; Selkon, J. B., Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet*, (8869) 1993, 490–491. DOI: 10.1016/0140-6736(93)91613-Q.
- Behnke, M.; Hansen, S.; Leistner, R.; Peña Diaz L. A.; Gropmann, A.; Sohr, D.; Gastmeier, P.; Piening, B., Nosocomial infection and antibiotic use — a second national prevalence study in Germany. *Dtsch Arztebl Int*, (110) 2013, 627–633. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0627.
- BgVV, 1996, Avoparcin als Futterzusatzstoff in der Tierernährung vorläufig verboten. URL: http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/1996/01/avoparcin_als_futterzusatzstoff_in_der_tierernaehrung_vorlaeufig_verboten-780.html, zuletzt abgerufen am 31.01.2018, 17:45.

- Billington, E. O.; Phang, S. H.; Gregson, D. B.; Pitout, J. D. D.; Ross, T.; Church, D. L.; Laupland, K.; Parkins, M. D., Incidence, Risk Factors, and Outcomes for Enterococcus spp. Blood Stream Infections. A Population-Based Study. *International Journal of Infectious Diseases*) 2014, 76–82.
- Bonten, M. J.; K, H. M.; C, N.; van J, V.; M, M.; S, S.; T, R.; A, W. R., Epidemiology of colonization of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*) 1996, 1615–1619.
- Bonten, M. J.; Willems, R.; Weinstein, R. A., Vancomycin-resistant enterococci. Why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect. Dis.* (5) 2001, 314–325. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00145-1.
- Brandl, K.; Plitas, G.; Mihu, C. N.; Ubeda, C.; Jia, T.; Fleisher, M.; Schnabl, B.; DeMatteo, R. P.; Pamer, E. G., Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*, (7214) 2008, 804–807. DOI: 10.1038/nature07250.
- Butler, A. M.; Olsen, M. A.; Merz, L. R.; Guth, R. M.; Woeltje, K. F.; Camins, B. C.; Fraser, V. J., Attributable Costs of Enterococcal Bloodstream Infections in a Nonsurgical Hospital Cohort. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, (01) 2010, 28–35. DOI: 10.1086/649020.
- Cattoir, V. und Leclercq, R., Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci. Is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (4) 2012, 731–742. DOI: 10.1093/jac/dks469.
- Centers for Disease Prevention Control, 1993, Nosocomial enterococci resistant to vancomycin—United States, 1989–1993. URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021331.htm>, zuletzt abgerufen am 31.01.2018, 18:49.
- Cespedes, C.; Said-Salim B.; Miller M; Lo, S. H.; Kreiswirth, B. N.; Gordon, R. J.; Vavagiakis, P.; Klein, R. S.; Lowy, F., The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J Infect Dis*) 2005, 444–452. DOI: 10.1086/427240.
- Chang, S.; Sievert, D. M.; Hageman, J. C.; Boulton, M. L.; Tenover, F. C.; Downes, F. P.; Shah, S.; Rudrik, J. T.; Pupp, G. R.; Brown, W. J.; Cardo, D.; Fridkin, S. K., Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *New England Journal of Medicine*, (14) 2003, 1342–1347. DOI: 10.1056/NEJMoa025025.

- Cheah, A. L.; Spelman, T.; Liew, D.; Peel, T.; Howden, B. P.; Spelman, D.; Grayson, M. L.; Nation, R. L.; Kong, D., Enterococcal bacteraemia. Factors influencing mortality, length of stay and costs of hospitalization. *Clin Microbiol Infect*) 2013. DOI: 10.1111/1469-0691.12132.
- Cheng, V. C. C.; Chen, J. H. K.; Tai, J. W. M.; Wong, S. C. Y.; Poon, R. W. S.; Hung, I. F. N.; To, K. K. W.; Chan, J. F. W.; Ho, P.-L.; Lo Chung-Mau; Yuen, K.-Y., Decolonization of gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Case series and review of literature. *BMC Infectious Diseases*, (1) 2014. DOI: 10.1186/1471-2334-14-514.
- Comas, I.; Borrell, S.; Roetzer, A.; Rose, G.; Malla, B.; Kato-Maeda, M.; Galagan, J.; Niemann, S.; Gagneux, S., Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nature Genetics*, (1) 2011, 106–110. DOI: 10.1038/ng.1038.
- Coque, T. M.; Tomayko JF; Ricke, S. C.; Okhyusen PC; Murray BE, Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*) 1996, 2605–2609.
- Courvalin, P., Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*, (Supplement 1) 2006, S25-S34. DOI: 10.1086/491711.
- Cuzon, G.; Naas, T.; Fortineau, N.; Nordmann, P., Novel Chromogenic Medium for Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, (7) 2008, 2442–2444. DOI: 10.1128/JCM.00492-08.
- d’Azevedo, P. A.; Santiago, K. A. d. S.; Furtado, G. H. C.; Xavier, D. B.; Pignatari, A. C. C.; Titze-de-Almeida, R., Rapid detection of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in rectal samples from patients admitted to intensive care units. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, (4) 2009, 289–293. DOI: 10.1590/S1413-86702009000400010.
- Delmas, J.; Robin, F.; Schweitzer, C.; Lesens, O.; Bonnet, R., Evaluation of a New Chromogenic Medium, chromID VRE, for Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci in Stool Samples and Rectal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, (8) 2007, 2731–2733. DOI: 10.1128/JCM.00448-07.

- Depardieu, F.; Bonora, M. G.; Reynolds, P. E.; Courvalin, P., The vanG glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Molecular Microbiology*, (3) 2003a, 931–948. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03737.x.
- Depardieu, F.; Reynolds, P. E.; Courvalin, P., VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother* 2003b, 7–18.
- Depardieu, F.; Reynolds, P. E.; Courvalin, P., VanD-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemother* 2004, 3892–3904.
- Devriese, L.; Baele, M.; Butaye, P., The genus *Enterococcus*, In: *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, E. Stackebrandt (Hg.), (3) 2006, Springer, New York, 163–174.
- DiazGranados, C. A. und Jernigan, J. A., Impact of Vancomycin Resistance on Mortality among Patients with Neutropenia and Enterococcal Bloodstream Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, (4) 2005b, 588–595. DOI: 10.1086/427512.
- DiazGranados, C. A.; Zimmer, S. M.; Mitchel, K.; Jernigan, J. A., Comparison of Mortality Associated with Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible Enterococcal Bloodstream Infections. A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, (3) 2005a, 327–333. DOI: 10.1086/430909.
- Didelot, X.; Eyre, D. W.; Cule, M.; Ip, C. L. C.; Ansari, M.; Griffiths, D.; Vaughan, A.; O’Connell, L.; Golubchik, T.; Batty, E. M.; Piazza, P.; Wilson, D. J.; Bowden, R.; Donnelly, P. J.; Dingle, K. E.; Wilcox, M.; Walker, A.; Crook, D. W.; Peto, T. E. A.; Harding, R. M., Microevolutionary analysis of *Clostridium difficile* genomes to investigate transmission. *Genome Biology*, (12) 2012, R118. DOI: 10.1186/gb-2012-13-12-r118.
- Didelot, X.; Nell, S.; Yang, I.; Woltemate, S.; van der Merwe, S.; Suerbaum, S., Genomic evolution and transmission of *Helicobacter pylori* in two South African families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (34) 2013, 13880–13885. DOI: 10.1073/pnas.1304681110.
- Didelot, X.; Walker, A. S.; Peto, T. E.; Crook, D. W.; Wilson, D. J., Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, (3) 2016, 150–162. DOI: 10.1038/nrmicro.2015.13.
- Dohmen, P. M.; Guleri, A.; Capone, A.; Utili, R.; Seaton, R. A.; Gonzalez-Ramallo, V. J.; Pathan, R.; Heep, M.; Chaves, R. L., Daptomycin for the treatment of infective endocarditis. Results from a European registry.

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy, (4) 2012, 936–942. DOI: 10.1093/jac/dks467.
- Donabedian, S. M.; Perri, M. B.; Abdujamilova, N.; Gordoncillo, M. J.; Naqvi, A.; Reyes, K. C.; Zervos, M. J.; Bartlett, P., Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Swine in Three Michigan Counties. *Journal of Clinical Microbiology*, (11) 2010, 4156–4160. DOI: 10.1128/JCM.02346-09.
- Donskey, C. J.; Chowdhry, T. K.; Hecker, M. T.; Hoyen, C. K.; Hanrahan, J. A.; Hujer, A. M.; Hutton-Thomas, R. A.; Whalen, C. C.; Bonomo, R. A.; Rice, L. B., Effect of Antibiotic Therapy on the Density of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in the Stool of Colonized Patients. *New England Journal of Medicine*, (26) 2000, 1925–1932. DOI: 10.1056/NEJM200012283432604.
- Edelsberg, J.; Weycker, D.; Barron, R.; Li, X.; Wu, H.; Oster, G.; Badre, S.; Langeberg, W. J.; Weber, D. J., Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, (3) 2014, 255–262. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.011.
- Elizaga, M. L.; Weinstein, R. A.; Hayden, M. K., Patients in Long-Term Care Facilities. A Reservoir for Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Clinical Infectious Diseases*, (4) 2002, 441–446. DOI: 10.1086/338461.
- European Center for Disease Prevention Control, 2015, Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm. ECDC. URL: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>, zuletzt abgerufen am 19.02.2018, 17:32.
- European Centre for Disease Prevention Control, 2016, Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-resistance-eu-2016>, zuletzt abgerufen am 06.02.2018, 17:49.
- European Centre for Disease Prevention Control, 2017, Surveillance Atlas of Infectious Diseases. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>, zuletzt abgerufen am 31.01.2018, 17:42.
- Eyre, D. W.; Cule, M. L.; Wilson, D. J.; Griffiths, D.; Vaughan, A.; O'Connell, L.; Ip, C. L. C.; Golubchik, T.; Batty, E. M.; Finney, J. M.; Wyllie, D. H.; Didelot, X.; Piazza, P.; Bowden, R.; Dingle, K. E.; Harding, R. M.; Crook, D. W.; Wilcox, M. H.; Peto, T. E. A.; Walker, A.

- S., Diverse Sources of *C. difficile* Infection Identified on Whole-Genome Sequencing. *New England Journal of Medicine*, (13) 2013, 1195–1205. DOI: 10.1056/NEJMoa1216064.
- Fang, H.; Ohlsson, A. -K.; Jiang, G. -X.; Ullberg, M., Screening for vancomycin-resistant enterococci. An efficient and economical laboratory-developed test. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, (3) 2011, 261–265. DOI: 10.1007/s10096-011-1304-0.
- Faron, M. L.; Ledebøer, N. A.; Buchan, B. W.; Kraft, C. S., Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting. *Journal of Clinical Microbiology*, (10) 2016, 2436–2447. DOI: 10.1128/JCM.00211-16.
- Feil, E. J.; Li, B. C.; Aanensen, D. M.; Hanage, W. P.; Spratt, B. G., eBURST. Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, (5) 2004, 1518–1530. DOI: 10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004.
- Fontana, R.; Ligozzo, M.; Pittaluga, F.; Satta, G., Intrinsic Penicillin Resistance in Enterococci. *Microbial Drug Resistance*, (2) 1996, 209–213. DOI: 10.1089/mdr.1996.2.209.
- Ford, C. B.; Lin, P. L.; Chase, M. R.; Shah, R. R.; Iartchouk, O.; Galagan, J.; Mohaideen, N.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J. C.; Lipsitch, M.; Flynn, J. L.; Fortune, S. M., Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nature Genetics*, (5) 2011, 482–486. DOI: 10.1038/ng.811.
- Gastmeier, P. und Fätkenheuer, G., Dilemma mit Begriffen und Zahlen. *Deutsches Ärzteblatt*, (15) 2015, 674–675.
- Gastmeier, P.; Schroder, C.; Behnke, M.; Meyer, E.; Geffers, C., Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (6) 2014, 1660–1664. DOI: 10.1093/jac/dku035.
- Gouliouris, T.; Blane, B.; Brodrick, H. J.; Raven, K. E.; Ambridge, K. E.; Kidney, A. D.; Hadjirin, N. F.; Török, M. E.; Limmathurotsakul, D.; Peacock, S. J., Comparison of two chromogenic media for the detection of vancomycin-resistant enterococcal carriage by nursing home residents. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, (4) 2016, 409–412. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.026.

- Grabsch, E. A.; Ghaly-Derias, S.; Gao, W.; Howden, B. P., Comparative Study of Selective Chromogenic (chromID VRE) and Bile Esculin Agars for Isolation and Identification of vanB-Containing Vancomycin-Resistant Enterococci from Feces and Rectal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, (12) 2008, 4034–4036. DOI: 10.1128/JCM.00944-08.
- Grundmann, H.; Bärwolff, S.; Tami, A.; Behnke, M.; Schwab, F.; Geffers, C.; Halle, E.; Göbel, U. B.; Schiller, R.; Jonas, D.; Klare, I.; Weist, K.; Witte, W.; Beck-Beilecke, K.; Schumacher, M.; Rüden, H.; Gastmeier, P., How many infections are caused by patient-to-patient transmission in intensive care units? *Critical Care Medicine*, (5) 2005, 946–951. DOI: 10.1097/01.CCM.0000163223.26234.56.
- Guerra-Assunção, J. A.; Crampin, A. C.; Houben, R.; Mzembe, T.; Mallard, K.; Coll, F.; Khan, P.; Banda, L.; Chiwaya, A.; Pereira, R. P.A.; McNerney, R.; Fine, P. E.M.; Parkhill, J.; Clark, T. G.; Glynn, JR, Large-scale whole genome sequencing of *M. tuberculosis* provides insights into transmission in a high prevalence area. *eLife*) 2015. DOI: 10.7554/eLife.05166.
- Hammerum, A. M.; Lester, C. H.; Heuer, O. E., Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Meat. A Human Health Hazard? *Foodborne Pathogens and Disease*, (10) 2010, 1137–1146. DOI: 10.1089/fpd.2010.0552.
- Haverkate, M. R.; Derde, L. P. G.; Brun-Buisson, C.; Bonten, M. J. M.; Bootsma, M. C. J., Duration of colonization with antimicrobial-resistant bacteria after ICU discharge. *Intensive Care Medicine*, (4) 2014, 564–571. DOI: 10.1007/s00134-014-3225-8.
- He, M.; Miyajima, F.; Roberts, P.; Ellison, L.; Pickard, D. J.; Martin, M. J.; Connor, T. R.; Harris, S. R.; Fairley, D.; Bamford, K. B.; D’Arc, S.; Brazier, J.; Brown, D.; Coia, J. E.; Douce, G.; Gerding, D.; Kim, H. J.; Koh, T. H.; Kato, H.; Senoh, M.; Louie, T.; Michell, S.; Butt, E.; Peacock, S. J.; Brown, N. M.; Riley, T.; Songer, G.; Wilcox, M.; Pirmohamed, M.; Kuijper, E.; Hawkey, P.; Wren, B. W.; Dougan, G.; Parkhill, J.; Lawley, T. D., Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nature Genetics*, (1) 2012, 109–113. DOI: 10.1038/ng.2478.
- Heikens, E.; Bonten, M. J. M.; Willems, R. J. L., Enterococcal Surface Protein Esp Is Important for Biofilm Formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of Bacteriology*, (22) 2007, 8233–8240. DOI: 10.1128/JB.01205-07.
- Hidron, A. I.; Edwards, J. R.; Patel, J.; Horan, T. C.; Sievert, D. M.; Pollock, D. A.; and, S. K. F., Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With

- Healthcare-Associated Infections. Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006 - 2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, (11) 2008, 996–1011. DOI: 10.1086/591861.
- Hoehn, B. und Duval, X., Infective Endocarditis. *New England Journal of Medicine*, (15) 2013, 1425–1433. DOI: 10.1056/NEJMcp1206782.
- Ike, Y.; Hashimoto, H.; Clewell, D. B., Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect. Immun.* 1984, 528–530.
- Kampmeier, S.; Knaack, D.; Kossow, A.; Willems, S.; Schliemann, C.; Berdel, W. E.; Kipp, F.; Mellmann, A., Weekly screening supports terminating nosocomial transmissions of vancomycin-resistant enterococci on an oncologic ward – a retrospective analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, (1) 2017. DOI: 10.1186/s13756-017-0206-z.
- Kayser, F. H. und Böttger, E. C., Bakterien als Krankheitserreger, In: *Medizinische Mikrobiologie*, F. H. Kayser (Hg.), (10) 2005, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 245–262.
- Kinnebrew, M. A.; Ubeda, C.; Zenewicz, L. A.; Smith, N.; Flavell, R. A.; Pamer, E. G., Bacterial Flagellin Stimulates Toll-Like Receptor 5 - Dependent Defense against Vancomycin-Resistant Enterococcus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, (4) 2010, 534–543. DOI: 10.1086/650203.
- Klare, I.; Badstübner, D.; Konstabel, C.; Böhme, G.; Claus, H.; Witte, W., Decreased Incidence of VanA-type Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Poultry Meat and from Fecal Samples of Humans in the Community after Discontinuation of Avoparcin Usage in Animal Husbandry. *Microbial Drug Resistance*, (1) 1999, 45–52. DOI: 10.1089/mdr.1999.5.45.
- Klare, I.; Fleige, C.; Geringer, U.; Witte, W.; Werner, G., Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting vanB genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, (2) 2012b, 171–176. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.020.
- Klare, I.; Heier, H.; Claus, H.; Reissbrodt, R.; Witte, W., vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiology Letters*, (2-3) 1995, 165–172. DOI: 10.1016/0378-1097(94)00493-B.

- Klare, I.; Konstabel, C.; Badstübner, D.; Werner, G.; Witte, W., Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, (2-3) 2003, 269–290. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00190-9.
- Klare, I.; Witte, W.; Wendt, C.; Werner, G., Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, (11-12) 2012a, 1387–1400. DOI: 10.1007/s00103-012-1564-6.
- Köck, R.; Becker, K.; Cookson, B.; van Gemert-Pijnen, J.; Harbarth, S.; Kluytmans, J.; Mielke, M.; Peters, G.; Skov, R.; Struelens, M.; Tacconelli, E.; Witte, W.; Friedrich, A., Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eurosurveillance*, (29) 2014, 20860. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.29.20860.
- Lebreton, F.; van Schaik, W.; McGuire, A. M.; Godfrey, P.; Griggs, A.; Mazumdar, V.; Corander, J.; Cheng, L.; Saif, S.; Young, S.; Zeng, Q.; Wortman, J.; Birren, B.; Willems, R. J. L.; Earl, A. M.; Gilmore, M. S., Emergence of Epidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* from Animal and Commensal Strains. *mBio*, (4) 2013, e00534-13-e00534-13. DOI: 10.1128/mBio.00534-13.
- Lebreton, F.; van Schaik, W.; Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; Torelli, R.; Le Bras, F.; Verneuil, N.; Zhang, X.; Giard, J.-C.; Dhalluin, A.; Willems, R. J. L.; Leclercq, R.; Cattoir, V.; Sullam, P. M., AsrR Is an Oxidative Stress Sensing Regulator Modulating *Enterococcus faecium* Opportunistic Traits, Antimicrobial Resistance, and Pathogenicity. *PLoS Pathogens*, (8) 2012, e1002834. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002834.
- Leclercq, R.; Derlot, E.; Duval, J.; Courvalin, P., Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. *New England Journal of Medicine*, (3) 1988, 157–161. DOI: 10.1056/NEJM198807213190307.
- Leclercq, R.; Dutka-Malen, S.; Duval J, C. P., Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 2005–2008.
- Lee, L. C. R. C. und Bloch, W., Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993, 3761–3766.
- Lellek, H.; Franke, G. C.; Ruckert, C.; Wolters, M.; Wolschke, C.; Christner, M.; Büttner, H.; Alawi, M.; Kröger, N.; Rohde, H., Emergence of daptomycin

- non-susceptibility in colonizing vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates during daptomycin therapy. *International Journal of Medical Microbiology*, (8) 2015, 902–909. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.09.005.
- Lieberman, T. D.; Flett, K. B.; Yelin, I.; Martin, T. R.; McAdam, A. J.; Priebe, G. P.; Kishony, R., Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis provides a record of selective pressures. *Nature Genetics*, (1) 2013, 82–87. DOI: 10.1038/ng.2848.
- Loman, N. J.; Constantinidou, C.; Chan, J. Z. M.; Halachev, M.; Sergeant, M.; Penn, C. W.; Robinson, E. R.; Pallen, M. J., High-throughput bacterial genome sequencing. An embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews Microbiology*, (9) 2012, 599–606. DOI: 10.1038/nrmicro2850.
- Ludwig, W.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. B., Taxonomic outline of the phylum Firmicutes, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, W. B. Whitman (Hg.), (2) 2009, Springer Verlag. Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 15–18.
- MacCallum, W. und Hastings, T., The first clinical and pathological description of enterococcal disease 1898. *J Exp Med*, (4(5-6)) 1899, 521–534.
- Mak, A.; Miller, M. A.; Chong, G.; Monczak, Y., Comparison of PCR and Culture for Screening of Vancomycin-Resistant Enterococci. Highly Disparate Results for *vanA* and *vanB*. *Journal of Clinical Microbiology*, (12) 2009, 4136–4137. DOI: 10.1128/JCM.01547-09.
- Mallon, D. J. P.; Corkill, J. E.; Hazel, S. M.; Wilson, J. S.; French, N. P.; Bennett, M.; Hart, C. A., Excretion of Vancomycin-Resistant Enterococci by Wild Mammals. *Emerging Infectious Diseases*, (6) 2002, 636–638. DOI: 10.3201/eid0806.010247.
- Mathers, A. J.; Stoesser, N.; Sheppard, A. E.; Pankhurst, L.; Giess, A.; Yeh, A. J.; Didelot, X.; Turner, S. D.; Sebra, R.; Kasarskis, A.; Peto, T.; Crook, D.; Sifri, C. D., *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* at a Single Institution. Insights into Endemicity from Whole-Genome Sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (3) 2015, 1656–1663. DOI: 10.1128/AAC.04292-14.
- Matsushima, A.; Takakura, S.; Yamamoto, M.; Matsumura, Y.; Shirano, M.; Nagao, M.; Ito, Y.; Iinuma, Y.; Shimizu, T.; Fujita, N.; Ichiyama, S., Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and

- Enterococcus faecalis in Kyoto, Japan. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, (6) 2011, 1095–1100. DOI: 10.1007/s10096-011-1412-x.
- McDonald, L. C., Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting. Prevalence, Sources, and Public Health Implications. *Emerging Infectious Diseases*, (3) 1997, 311–317. DOI: 10.3201/eid0303.970307.
- McNeil, S. A.; Malani, P. N.; Chenoweth, C. E.; Fontana, R. J.; Magee, J. C.; Punch, J. D.; Mackin, M. L.; Kauffman, C. A., Vancomycin-Resistant Enterococcal Colonization and Infection in Liver Transplant Candidates and Recipients. A Prospective Surveillance Study. *Clinical Infectious Diseases*, (2) 2006, 195–203. DOI: 10.1086/498903.
- Mohr, J. F.; Friedrich, L. V.; Yankelev, S.; Lamp, K. C., Daptomycin for the treatment of enterococcal bacteraemia. Results from the Cubicin Outcomes Registry and Experience (CORE). *International Journal of Antimicrobial Agents*, (6) 2009, 543–548. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.12.007.
- Montecalvo, M. A.; Horowitz, H.; Gedris, C.; Carbonaro, C.; Tenover, F. C.; Issah, A.; Cook, P.; Wormser, G. P., Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (6) 1994, 1363–1367. DOI: 10.1128/AAC.38.6.1363.
- Montenarh, M., Replikation und Gentechnik, In: *Biochemie und Pathobiochemie*, Georg Löffler; Petro E. Petrides; Peter C. Heinrich (Hg.), (8) 2006, Springer. Berlin, Heidelberg, 220–253.
- Morbidity and Mortality Weekly Report Miller, D.; Urdaneta, V.; Weltman, A., 2002, *Public Health Dispatch*. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5140a3.htm>, zuletzt abgerufen am 31.01.2018, 17:45.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction) 1987, 335–350. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.
- Munoz-Price, L. S.; Lolans, K.; Quinn, J. P., Emergence of Resistance to Daptomycin during Treatment of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, (4) 2005, 565–566. DOI: 10.1086/432121.
- Murray, B. E., The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, (1) 1990, 46–65. DOI: 10.1128/CMR.3.1.46.

- Mutters, N. T.; Brooke, R. J.; Frank, U.; Heeg, K., Low risk of apparent transmission of vancomycin-resistant Enterococci from bacteraemic patients to hospitalized contacts. *American Journal of Infection Control*, (9) 2013a, 778–781. DOI: 10.1016/j.ajic.2012.11.019.
- Mutters, N. T. und Frank, U., Sources of systematic errors in the epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Infection*, (2) 2013, 305–310. DOI: 10.1007/s15010-013-0410-6.
- Mutters, N. T.; 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*, (43) 2013b, 725–731. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0725.
- National Nosocomial Infections Surveillance, System Report, Data Summary from January 1992 - June 2001. *American Journal of Infection Control*, (6) 2001, 404–421. DOI: 10.1067/mic.2001.119952.
- Noble, W. C.; Virani, Z.; Cree, R. G. A., Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, (2) 1992, 195–198. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05089.x.
- Noskin, G. A.; Stosor, V.; Cooper, I.; Peterson, L. R., Recovery of Vancomycin-Resistant Enterococci on Fingertips and Environmental Surfaces. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, (10) 1995, 577–581. DOI: 10.2307/30141097.
- NRZ, Deutsche Nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung. Abschlussbericht) 2016.
- Ongut, G.; Kilinckaya, H.; Baysan, B. O.; Ogunc, D.; Colak, D.; Inan, D.; Kasaroglu, K.; Gunseren, F., Evaluation of Brilliance VRE agar for the detection of vancomycin-resistant enterococci in rectal swab specimens. *Journal of Medical Microbiology*, (Pt_4) 2013, 661–662. DOI: 10.1099/jmm.0.052845-0.
- Patino, L. A.; Courvalin, P.; Perichon, B., vanE Gene Cluster of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. *Journal of Bacteriology*, (23) 2002, 6457–6464. DOI: 10.1128/JB.184.23.6457-6464.2002.
- Peltroche-Llacsahuanga, H.; Top, J.; Weber-Heynemann, J.; Luticken, R.; Haase, G., Comparison of Two Chromogenic Media for Selective Isolation of Vancomycin-Resistant Enterococci from Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, (12) 2009, 4113–4116. DOI: 10.1128/JCM.00882-09.

- Perencevich, E. N.; Fisman, D. N.; Lipsitch, M.; Harris, A. D.; J. Glenn Morris, JR.; Smith, D. L., Projected Benefits of Active Surveillance for Vancomycin-Resistant Enterococci in Intensive Care Units. *Clinical Infectious Diseases*, (8) 2004, 1108–1115. DOI: 10.1086/382886.
- Prematunge, C.; Colin MacDougall, J. J. K. A. F. L. J. R.; Garber, G., VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy. A Systematic Review and Meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016, 26–35. DOI: 10.1017/ice.2015.228.
- Price, C. S.; Paule, S.; Noskin, G. A.; Peterson, L. R., Active Surveillance Reduces the Incidence of Vancomycin-Resistant Enterococcal Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, (7) 2003, 921–928. DOI: 10.1086/377733.
- Prieto, A. M. G.; van Schaik, W.; Rogers, M. R. C.; Coque, T. M.; Baquero, F.; Corander, J.; Willems, R. J. L., Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens. Attack of the Clones? *Frontiers in Microbiology* 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00788.
- Quintiliani, R. und Courvalin, P., Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4281. *Gene* 1996, 1–8.
- Rathe, M.; Kristensen, L.; Ellermann-Eriksen, S.; Thomsen, M. K.; Schumacher, H., Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. *APMIS*, (1) 2010, 66–73. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02559.x.
- Reinhardt, A.; Klare, I.; Just, H. M.; Witte, W., First reported outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) of VanA-type in Germany. *ICAAC New Orleans* 1996.
- Reynolds, P. E., Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, (11) 1989, 943–950.
- Rice, L. B., Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens. No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, (8) 2008, 1079–1081. DOI: 10.1086/533452.
- Rice, L. B.; Carias, L.; Rudin, S.; Vael, C.; Goossens, H.; Konstabel, C.; Klare, I.; Nallapareddy, S. R.; Huang, W.; Murray, B. E., A Potential Virulence Gene, *hylEfm*, Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin. *The Journal of Infectious Diseases*, (3) 2003, 508–512. DOI: 10.1086/367711.

- Rice, L. B.; Carias, L. L.; Donskey, C. L.; Rudin, S. D., Transferable, Plasmid-Mediated VanB-Type Glycopeptide Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*) 1998, 963–964.
- Robert-Koch-Institut, Enterokokken mit Vancomycin-Resistenz in deutschen Krankenhäusern 2008/2009. *Epidemiologisches Bulletin*) 2010.
- Robert-Koch-Institut, Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) in Deutschland – Update 2013/14. *Epidemiologisches Bulletin*) 2015, 429–435. DOI: 10.17886/EpiBull-2015-010.
- Robert-Koch-Institut, Regionale Verteilung des Anteils von MRSA und VRE bei nosokomialen Infektionen mit *S. aureus* und Enterokokken – Untersuchung auf Intensivstationen sowie bei postoperativen Wundinfektionen. *Epidemiologisches Bulletin*) 2016, 191–196. DOI: 10.17886/EpiBull-2016-037.
- Roger, M.; Faucher, M. C.; Forrest, P.; St-Antoine, P.; Coutlée, F., Evaluation of a vanA-Specific PCR Assay for Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* during a Hospital Outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*) 1999, 3348–3349.
- Rote Liste, 2016, Cubicin® 350 mg/-500 mg Pulver zur Herstellung einer Injektions- bzw. Infusionslösung. URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/021089>, zuletzt abgerufen am 31.01.2018, 17:36.
- Ruiz-Garbajosa, P.; Bonten, M. J. M.; Robinson, D. A.; Top, J.; Nallapareddy, S. R.; Torres, C.; Coque, T. M.; Canton, R.; Baquero, F.; Murray, B. E.; Campo, R. d.; Willems, R. J. L., Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecalis* Reveals Hospital-Adapted Genetic Complexes in a Background of High Rates of Recombination. *Journal of Clinical Microbiology*, (6) 2006, 2220–2228. DOI: 10.1128/JCM.02596-05.
- Russell, D. L.; Flood, A.; Zaroda, T. E.; Acosta, C.; Riley, M. M. S.; Busuttill, R. W.; Pegues, D. A., Outcomes of Colonization with MRSA and VRE Among Liver Transplant Candidates and Recipients. *American Journal of Transplantation*, (8) 2008, 1737–1743. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02304.x.
- Rybak, M. J., The efficacy and safety of daptomycin. First in a new class of antibiotics for Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*) 2006, 24–32. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01342.x.
- Satlin, M. J.; Soave, R.; Racanelli, A. C.; Shore, T. B.; van Besien, K.; Jenkins, S. G.; Walsh, T. J., The emergence of vancomycin-resistant enterococcal

- bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Leukemia & Lymphoma*, (12) 2014, 2858–2865. DOI: 10.3109/10428194.2014.896007.
- Schleifer, K. H. und Kilpper-Bälz, R., Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, (1) 1984, 31–34. DOI: 10.1099/00207713-34-1-31.
- Schlievert, P. M.; Dunny, G. M.; Stoehr, J. A.; Assimacopoulos, A. P., Aggregation and Binding Substances Enhance Pathogenicity in a Rabbit Model of *Enterococcus faecalis* Endocarditis, (1) 1997, 789–791. DOI: 10.1007/978-1-4899-1825-3_186.
- Schwartz, D. C. und Cantor, C. R., Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, (1) 1984, 67–75. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90301-5.
- Shankar, N.; Baghdayan, A. S.; Gilmore, M. S., Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, (6890) 2002, 746–750. DOI: 10.1038/nature00802.
- Sherman, J., The Streptococci. *Bacteriol Rev*, (1) 1937, 3–97.
- Sievert, D. M.; Rudrik, J. T.; Patel, J. B.; McDonald, L. C.; Wilkins, M. J.; Hageman, J. C., Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clinical Infectious Diseases*, (5) 2008, 668–674. DOI: 10.1086/527392.
- Simon, A.; N. Gröger, S. E. G. M. M. E. U. B.; Fleischhack, G., Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) – Übersicht zu Bedeutung, Prävention und Management in der Pädiatrie, (7/8) 2004, 259–275.
- Sohn, K. M.; Peck, K. R.; Joo, E.-J.; Ha, Y. E.; Kang, C.-I.; Chung, D. R.; Lee, N. Y.; Song, J.-H., Duration of colonization and risk factors for prolonged carriage of vancomycin-resistant enterococci after discharge from the hospital. *International Journal of Infectious Diseases*, (4) 2013, e240-e246. DOI: 10.1016/j.ijid.2012.09.019.
- Song, J. Y.; Cheong, H. J.; Jo, Y. M.; Choi, W. S.; Noh, J. Y.; Heo, J. Y.; Kim, W. J., Vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization before admission to the intensive care unit. A clinico-epidemiologic analysis. *American Journal of Infection Control*, (9) 2009, 734–740. DOI: 10.1016/j.ajic.2008.09.025.

- Stahlmann und Lode, Antibiotika und Chemotherapeutika – antiinfektiöse Therapie, In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, K. Aktories (Hg.), (11) 2013, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. München, 745–882.
- Sutter, S. T.; Frei, R.; Dangel, M.; Gratwohl, A.; Bonten, M.; Widmer, A. F., Not All Patients with Vancomycin-Resistant Enterococci Need To Be Isolated. *Clinical Infectious Diseases*, (6) 2010, 678–683. DOI: 10.1086/655824.
- Suwantarat, N.; Roberts, A.; Prestridge, J.; Seeley, R.; Speser, S.; Harmon, C.; Zhang, C.; Henciak, S.; Stamper, P. D.; Ross, T.; Carroll, K. C., Comparison of Five Chromogenic Media for Recovery of Vancomycin-Resistant Enterococci from Fecal Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, (11) 2014, 4039–4042. DOI: 10.1128/JCM.00151-14.
- Tacconelli, E.; Karchmer, A. W.; Yokoe, D.; D’Agata, E. M. C., Preventing the Influx of Vancomycin-Resistant Enterococci into Health Care Institutions, by Use of a Simple Validated Prediction Rule. *Clinical Infectious Diseases*, (7) 2004, 964–970. DOI: 10.1086/423961.
- Taddei, F.; Radman, M.; Maynard-Smith, J.; Toupance, B.; Gouyon, P. H.; Godelle, B., Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature*, (6634) 1997, 700–702. DOI: 10.1038/42696.
- Taur, Y.; Xavier, J. B.; Lipuma, L.; Ubeda, C.; Goldberg, J.; Gobourne, A.; Lee, Y. J.; Dubin, K. A.; Socci, N. D.; Viale, A.; Perales, M. -A.; Jenq, R. R.; van den Brink, M. R. M.; Pamer, E. G., Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, (7) 2012, 905–914. DOI: 10.1093/cid/cis580.
- Teixeira, L. M.; Shewmaker, P. L.; Carvalho, M. d. G. S.; Facklam, R. R., Enterococcus, In: *Manual of Clinical Microbiology*, (Hg.), (10) 2011, American Society for Microbiology, 350–364.
- Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, (9) 1995, 2233–2239.
- Thiercelin, M. E., Sur un diplocoque saprophyte de l’intestin susceptible de devenir pathogen. *C. R. Soc. Biol.*) 1899, 269–271.
- Toh, S.-M.; Xiong, L.; Arias, C. A.; Villegas, M. V.; Lolans, K.; Quinn, J.; Mankin, A. S., Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular Microbiology*, (6) 2007, 1506–1514. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05744.x.
- Trautmann, M.; Oethinger, M.; Marre, R.; Wiedeck, H.; Ruhnke, M., Teicoplanin. 10 years of clinical experience. *Infection*, (6) 1994, 430–436. DOI: 10.1007/BF01715507.
- TrinkwV §5, 2001, Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung). URL: https://www.gesetze-im-internet.de/trinkwv_2001/BJNR095910001.html, zuletzt abgerufen am 31.01.2018, 17:58.
- Ruckert, C., Untersuchung zur Daptomycinresistenz bei *Enterococcus faecium*-Isolaten von Patienten nach Stammzelltransplantation. Medizinische Dissertation. URL: <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2015/7300/>.
- Uttley, A. C.; Collins, C. H.; Naidoo, J.; George, R. C., VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI. *The Lancet*, (8575-8576) 1988, 57–58. DOI: 10.1016/S0140-6736(88)91037-9.
- Walker, T. M.; Ip, C. L. C.; Harrell, R. H.; Evans, J. T.; Kapatai, G.; Dedicoat, M. J.; Eyre, D. W.; Wilson, D. J.; Hawkey, P. M.; Crook, D. W.; Parkhill, J.; Harris, D.; Walker, A. S.; Bowden, R.; Monk, P.; Smith, E. G.; Peto, T. E. A., Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks. A retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, (2) 2013, 137–146. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70277-3.
- Weinstock, D. M.; Conlon, M.; Iovino, C.; Aubrey, T.; Gudiol, C.; Riedel, E.; Young, J. W.; Kiehn, T. E.; Zuccotti, G., Colonization, Bloodstream Infection, and Mortality Caused by Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Early after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, (5) 2007, 615–621. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.01.078.
- Wendt, C.; Krause, C.; Xander, L. U.; Löffler, D.; Floss, H., Prevalence of colonization with vancomycin-resistant enterococci in various population groups in Berlin, Germany. *Journal of Hospital Infection*, (3) 1999, 193–200. DOI: 10.1053/jhin.1999.0597.
- Wendt, C.; Rüden, H.; Edmond, M., Vancomycin-resistente Enterokokke, Epidemiologie, Risikofaktoren und Prävention. *Deutsches Ärzteblatt* 1998, 1604–1611.
- Werner, G., Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric ward of a German

- hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (1) 2003, 113–115. DOI: 10.1093/jac/dkg305.
- Werner, G.; Klare, I.; Fleige, C.; Geringer, U.; Witte, W.; Just, H.-M.; Ziegler, R., Vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, (1) 2012, 21. DOI: 10.1186/2047-2994-1-21.
- Werner, G.; Klare, I.; Hübner, J.; Kern, W. V.; Witte, W., Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemotherapie Journal*) 2008, 183–193.
- Werner, G.; Klare, I.; Witte, W., Arrangement of the vanA gene cluster in enterococci of different ecological origin. *FEMS Microbiology Letters*, (1) 1997, 55–61. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12685.x.
- Wijesuriya, T. M.; Perry, P.; Pryce, T.; Boehm, J.; Kay, I.; Flexman, J.; Coombs, G. W.; Ingram, P. R., Low Vancomycin MICs and Fecal Densities Reduce the Sensitivity of Screening Methods for Vancomycin Resistance in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, (8) 2014, 2829–2833. DOI: 10.1128/JCM.00021-14.
- Willems, R. J. L.; Top, J.; van den Braak, N.; van Belkum, A.; Endtz, H.; Mevius, D.; Stobberingh, E.; van den Bogaard, A.; van Embden, J. D. A., Host Specificity of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *The Journal of Infectious Diseases*, (3) 2000, 816–823. DOI: 10.1086/315752.
- Worby, C. J.; Lipsitch, M.; Hanage, W. P.; Koelle, K., Within-Host Bacterial Diversity Hinders Accurate Reconstruction of Transmission Networks from Genomic Distance Data. *PLoS Computational Biology*, (3) 2014, e1003549. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003549.
- Young, B. C.; Golubchik, T.; Batty, E. M.; Fung, R.; Larner-Svensson, H.; Votintseva, A. A.; Miller, R. R.; Godwin, H.; Knox, K.; Everitt, R. G.; Iqbal, Z.; Rimmer, A. J.; Cule, M.; Ip, C. L. C.; Didelot, X.; Harding, R. M.; Donnelly, P.; Peto, T. E.; Crook, D. W.; Bowden, R.; Wilson, D. J., Evolutionary dynamics of *Staphylococcus aureus* during progression from carriage to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (12) 2012, 4550–4555. DOI: 10.1073/pnas.1113219109.
- Zhang, X.; Top, J.; Been, M. d.; Bierschenk, D.; Rogers, M.; Leendertse, M.; Bonten, M. J. M.; van der Poll, T.; Willems, R. J. L.; van Schaik, W., Identification of a Genetic Determinant in Clinical *Enterococcus faecium*

Strains That Contributes to Intestinal Colonization During Antibiotic Treatment. *Journal of Infectious Diseases*, (11) 2013, 1780–1786. DOI: 10.1093/infdis/jit076.

D Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte im Institut.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Holger Rohde für die hervorragende Betreuung. Ich bedanke mich für die Auswahl eines spannenden Themas, bei dem ich die Arbeit im Labor kennenlernen, aber auch ein Thema mit einem hohen Maß an klinischer Relevanz bearbeiten durfte. Danke für allen inhaltlichen Austausch, konstruktive Verbesserungen, schnelle Unterstützung bei Fragen und Problemen und die stets aufbauenden, humorvollen und ermutigenden Worte.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Lena Biehl, mit der ich mir den Arbeitsplatz teilen durfte. Danke für deine Kompetenz, deine Lehre, die gute Zusammenarbeit an der PFGE, die manchmal ein Ringen mit der Technik war, für die Stelle als studentische Hilfskraft im Rahmen der EMERGE-Studie und im Besonderen für alle guten Gespräche während der Forschungsarbeit.

Herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene für ihre Mitarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere möchte ich hierbei Tim für die angenehme und lustige Arbeitsatmosphäre im Hygiene-Labor, seine Hilfsbereitschaft und alle fachliche Beratung danken, sowie Sabine für die gegenseitige Unterstützung in der Arbeit mit der PFGE, die es mir ermöglicht hat, die Geräte oft zu Unzeiten in Betrieb zu nehmen. Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. med. Gefion Franke für die gute Einarbeitung in die Studie, bei Dr. Eva-Maria Klupp für die Betreuung, bei Dr. med. M. Lütgehetmann für die Unterstützung in der PCR und bei Dr. med. Martin Christner für alle Hilfe mit dem MALDI-TOF.

Ein letzter Dank gilt Clara, Lukas und Niklas für aufmerksames Korrekturlesen sowie Beratung zu Zitierweise und Layout.

E Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Mirwald, Nadine Sarah
Geburtstag, -ort: 15. September 1992, Kiel

AUSBILDUNG

seit 05/2017 Praktisches Jahr (Innere Medizin: Regio Klinikum Pinneberg, Pädiatrie: Städtisches Klinikum Lüneburg, Chirurgie: Albertinen-Krankenhaus, Hamburg)

02/2017 Famulatur Gynäkologie & Geburtshilfe, Albertinen-Krankenhaus, Hamburg

05/2016 Famulatur Hämato-Onkologie, Asklepios Klinik Altona, Hamburg

04/2016 Famulatur Innere Medizin, Albertinen-Krankenhaus, Hamburg

10/2015 – 02/2016 Studium der altgriechischen Sprache, Universität Hamburg

09/2015 Famulatur Allgemeinarztpraxis Dr. Szillat und Dr. Hug, Marne

01/2015 – 05/2015 Studentische Hilfskraft am Klinischen Studienzentrum II für Infektiologie der Uniklinik Köln mit Tätigkeit in Hamburg

seit 05/2014 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Uniklinikum Hamburg-Eppendorf

seit 10/2011 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg

09/2010 – 08/2011 Freiwilliges Soziales Jahr im Albertinen-Krankenhaus, Hamburg; Träger: Gemeindejugendwerk

09/2007 - 12/2007 Auslandsaufenthalt: Angers, Frankreich

2002 - 2010 Heinrich-Heine-Schule, Gymnasium Heikendorf; Abschluss: Abitur (Note: 1,3)

1999 - 2002

Grundschule-an-der-Bake, Mönkeberg

Hamburg, 26.02.2018

VERÖFFENTLICHUNG

Both, Anna; Franke, Gefion C.; Mirwald, Nadine; Lütgehetmann, Marc; Christner, Martin; Klupp, Eva-Maria; Belmar Campos, Cristina; Büttner, Henning; Aepfelbacher, Martin; Rohde, Holger. 2017, Two-tier approach combining molecular and culture-based techniques for optimized detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 89, Issue 4, 253 - 257

F Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: