

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik,
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Analyse der Populationsdynamik kolonisierender Vancomycin- resistenter *Enterococcus faecium* Isolate aus immunsupprimierten Patienten

Dissertation

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

vorgelegt von:

Florian Kruse
aus Leer (Ostfriesland)

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: **01.02.2023**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: **PD Dr. Johannes Kluwe**

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: **Prof. Dr. Holger Rohde**

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	3
2 Originalartikel	4
3 Zusammenfassende Darstellung der Publikation	11
3.1 Vorwort	11
3.2 Einleitung	11
3.2.1 Die Gattung <i>Enterococcus</i> – Eigenschaften und Taxonomie	11
3.2.2 Bedeutung als humanpathogene Erreger	12
3.2.3 Ziel dieser Arbeit	14
3.3 Material und Methoden	15
3.3.1 Gewinnung von Patientenproben	15
3.3.2 Mikrobiologische Analyse der Isolate	15
3.3.3 Vollgenomsequenzierung	15
3.3.4 Phylogenetische Analyse	16
3.3.5 Analyse der <i>van</i> -Elemente	17
3.4 Ergebnisse	17
3.4.1 Populationsstruktur von VRE bei hämatologischen Patienten	17
3.4.2 Einfluss von Patient-zu-Patient Transmissionen auf die VRE-Heterogenität	18
3.4.3 Horizontaler Gentransfer von <i>van</i> -Elementen	19
3.4.4 VRE Populationen bei Patienten mit nicht-hämatologischen Erkrankungen	20
3.5 Diskussion	21
4 Zusammenfassung deutsch	24
5 Zusammenfassung englisch	25
6 Abkürzungsverzeichnis	26
7 Abbildungsverzeichnis	26
8 Literaturverzeichnis:	27
9 Erklärung des Eigenanteils	31
10 Danksagung	32
11 Lebenslauf	33
12 Publikationsliste	34
13 Eidesstattliche Erklärung	35



Population dynamics in colonizing vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from immunosuppressed patients

Anna Both^{a,1}, Florian Kruse^{a,1}, Nadine Mirwald^a, Gefion Franke^a, Martin Christner^a,
Jiabin Huang^a, Jan Lennart Hansen^a, Nicolaus Kröger^b, Laura Berneking^a, Heinrich Lellek^b,
Martin Aepfelbacher^a, Holger Rohde^{a,*}

^a Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

^b Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2021

Revised 23 December 2021

Accepted 31 January 2022

Available online 5 February 2022

Editor: Dr Teresa Coque

Keywords:

Vancomycin resistant enterococci

Bone marrow transplantation

Population dynamics

Whole genome sequencing

Phylogeny

Hospital hygiene

Infection prevention and control

ABSTRACT

Objectives: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* (VRE) are a common cause of healthcare-associated infections. Whole genome sequencing-based typing methods yield the highest discriminatory power for outbreak surveillance in the hospital. We analysed the clonal composition of enteric VRE populations of at-risk patients over several weeks to characterise VRE population diversity and dynamics.

Methods: Five bone marrow transplant recipients (three colonised with *vanA*-positive isolates, two colonised with *vanB*-positive isolates) contributed three rectal swabs over a course of several weeks. Fourteen VRE colonies per swab were analysed by core genome multi locus sequence typing (cgMLST) and typing of the *van*-element.

Results: VRE populations were clonally diverse in three of five patients, and population composition changed dynamically over the time of observation. Besides new acquisition of VRE isolates, shared *van*-elements localised on nearly identical plasmids between clonally different isolates indicate horizontal gene transfer as a mechanism behind VRE population diversity within single patients.

Conclusion: Outbreak detection relies on typing of isolates, usually by analysing one isolate per patient. We here show that this approach is insufficient for outbreak surveillance of VRE in highly vulnerable patients, as it does not take into account VRE population heterogeneity and horizontal gene transfer of the resistance element.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Antimicrobial Chemotherapy.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introduction

Enterococcus faecium and *Enterococcus faecalis* are commensals of the human gut but also constitute major nosocomial pathogens especially in vulnerable patient groups. Haematology and intensive care patients belong to the most at-risk group for enterococcal infection, and bloodstream and intra-abdominal infection are the predominant sites [1].

Antibiotic therapy of *E. faecium* and *E. faecalis* is complicated by their wide range of intrinsic resistance against cephalosporins,

clindamycin and cotrimoxazol. Especially in hospital-adapted isolates of *E. faecium*, acquired resistance to penicillin and ampicillin is widespread, making glycopeptides the agents of choice in antibiotic therapy. Unfortunately, in recent years an increase in infections caused by vancomycin-resistant enterococci, mostly *E. faecium* (VRE_{fm}), has been noted. In Europe the percentage of vancomycin resistance in invasive *E. faecium* isolates increased from 10.5% in 2015 to 17.3% in 2018. However, important regional differences apply, with percentages ranging from under 2% in Scandinavian and Benelux countries to 59% in Cyprus [2,3].

vanA and *vanB* are the two most common determinants of glycopeptide resistance in *E. faecium* and *E. faecalis*. Glycopeptides act by binding to the terminal D-Ala-D-Ala pentapeptide chain of the peptidoglycan precursor, thereby blocking cell wall synthesis. *vanA* and *vanB* are ligases encoded on larger transposable elements that

* Corresponding author. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Martinistraße 52, D-20246 Hamburg, Germany.

E-mail address: rohde@uke.de (H. Rohde).

¹ These two authors contributed equally to this work.

confer vancomycin resistance by modifying the pentapeptide chain to a terminal D-Ala-D-Lac with decreased affinity to the drug. *vanA* is carried on Tn1546-type transposons and mostly encoded on plasmids [4,5]. It confers high-level resistance to vancomycin and additionally to teicoplanin. *vanB* is mostly encoded on Tn1549 and is usually inserted in the chromosome, but it can also be carried on plasmids [6].

Infection with VRE is usually preceded by intestinal colonisation. Reduced microbial diversity in the gut caused by preventive or therapeutic administration of antibiotics may facilitate an overrepresentation of certain species, such as enterococci, which in turn can increase the risk of sepsis [7,8]. At present, nosocomial spread appears to be the most relevant mode of VRE transmission and subsequent gut colonization [9,10]. Horizontal gene transfer (HGT) of the glycopeptide resistance determinant from VRE or other Gram-positive enteric anaerobes, such as *Eggerthella sp.*, *Clostridium sp.* or *Ruminococcus sp.*, to vancomycin-susceptible enterococci is another possible mode of resistance acquisition, which may play an underestimated role in VRE outbreaks [11–13]. Antibiotic pressure is known to increase the frequency of HGT, which may complicate the identification of VRE outbreaks, especially in high-risk settings where antibiotic consumption is high [14]. We here set out to investigate VRE populations in enterically colonised high-risk patients. We hypothesised that high antibiotic pressure, as in prophylactic regimen employed in the stem cell transplant unit, may regularly lead to HGT between *van*-element-carrying bacteria and VSE, limiting the practicality of outbreak analysis based on core genome comparisons of single VRE clones in these settings.

2. Material and methods

2.1. Patient sample collection

The study was approved by the Hamburg Ethics Committee (PV4460). Five bone marrow transplant (BMT) patients were included in the study between July 2014 and February 2015. Patients provided written informed consent for study participation. Three rectal swabs were collected in one- to two-week intervals during patients' hospitalisation. Basic patient data and data on antibiotic therapy were collected from the electronic patient management system Soarian (Siemens AG Medical Solutions, Erlangen, Germany).

Rectal swabs from five patients admitted to cardiac intensive care unit (ICU) were also included into the study. Rectal swabs were collected as routine admittance screening in September and October 2018. No patient data were collected, and specimens were treated anonymously.

2.2. Microbiological analysis

Rectal swab specimens were directly inoculated onto VRE screening agar (ChromID, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Plates were incubated for 48 h at 37°C in ambient air. Fourteen colonies displaying typical morphology for VRE were picked and identified as *E. faecium* by Maldi-TOF (Bruker, Billerica, MA, USA) in BMT patients. This number was initially chosen for practical reasons, as PFGE was initially conducted to quickly test if any heterogeneity occurred in these patients (14 isolates per PFGE gel). Ten isolates were analysed in ICU patients. Isolates were then subjected to automated susceptibility testing (Vitek2, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) and *vanAB* realtime PCR [15]. Confirmed VRE f m strains were conserved at –80°C until further use.

2.3. Whole genome sequencing

Illumina short read sequencing was performed for 14 VRE f m isolates per BMT patient per time point and 10 VRE f m isolates per ICU patient. DNA extraction and library preparation were conducted as described previously [16].

Libraries were sequenced on an Illumina NextSeq 500 system with a mid-output 2 × 150 flow cell. Bases less than Q30 as well as adapter sequences were trimmed, and any reads shorter than 35 nt were removed using Trimmomatic v0.39 [17]. Retained high-quality NextSeq reads were used as input for the SPAdes assembler v3.13.1 [18], resulting in a mean depth of 123.6 (max: 264, min: 17) and an N50 contig length of 39.4 kb.

Long-read Nanopore sequencing (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) was performed for one isolate per clonal type (CT) per patient ($n = 19$). High-molecular weight DNA was extracted with the QIAamp Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Native barcoding for multiplexing and polymerase chain reaction (PCR)-free ligation based Oxford Nanopore Technologies (ONT) library preparation were conducted according to manufacturer's instructions (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Sequencing was performed on ONT GridION X5 R9.4.1 flow cells. Base-calling was done with guppy v3.3.0 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Adapter sequences and sequences with a score of less than Q30 of the short-reads were trimmed, as described earlier. The resulting high-quality paired-end short-reads together with Nanopore long-reads were *de novo* assembled with the hybrid assembler Unicycler v0.4.7 [19]. All chromosomes and 82 of 101 plasmid candidates were confirmed as circular by manual inspection of Nanopore read mapping and NextSeq mate-pair read mapping. In addition, the tool BRIG [20] was used for visualization and for comparing the plasmids that carry the identical *van*-elements. In BRIG, genome alignments were performed by the BLAST program [21]. All genomes were submitted to National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank (accession numbers Supplementary Table S1). Annotation of all genomes was conducted with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) [22,23]. Isolates from BMT patients are named according to patient pseudonym, time point of sampling and isolate number (1–14); for example, isolate BMT-1-2-3 was isolated from a rectal swab of patient BMT-1 at the second sampling time point, and the isolate is number 3 of 14. In ICU patients only one rectal swab was analysed; thus isolate names consist of patient pseudonym and isolate number (1–10).

2.4. Phylogenetic analysis

For core genome multilocus sequence typing (cgMLST), genome assemblies were analysed with Ridom SeqSphere⁺ v7.2.3 (Ridom GmbH, Münster, Germany) [24]. When isolates had ≥95% extracted cgMLST targets (96.5% of strains), clonal types (CT) were assigned. Previously, a threshold of ≤20 alleles for clonal relatedness has been suggested [25]. Based on the allele distance matrix, assigned CTs differing by less than 20 alleles were grouped together (CT 1485/CT 3335 3-5 alleles difference; CT 1529/CT 3329 2-6 alleles difference; CT 2419/CT 3330 3-9 alleles difference; CT 420/CT 1007 2-4 alleles difference).

2.5. Analysis of *van*-elements

For the analysis of *van*-elements, long-read and short-read hybrid assemblies were aligned to references Tn1546 (Genbank Accession number M97297) for *vanA* and Tn1549 (Genbank Accession number AF192329) for *vanB* in CLC main workbench v8.1 (Qiagen, Hilden, Germany). Sequences that did not align to the

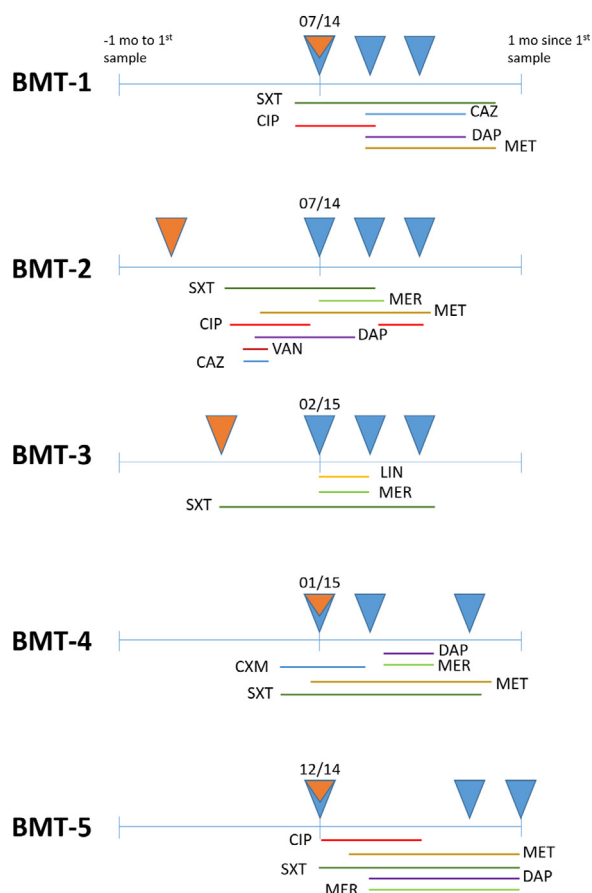


Fig. 1. Timeline of patients one month before to one month after study inclusion. Time points of specimen collection are marked with blue triangles. First vancomycin-resistant enterococci (VRE) positive rectal swab is marked with an orange triangle. Antibiotic therapy over the time course marked below. CIP, ciprofloxacin; SXT, co-trimoxazole biweekly; DAP, daptomycin; MET, metronidazole; MER, meropenem; LIN, linezolid; CAZ, ceftazidime; CXM, cefuroxime; VAN, vancomycin.

references were annotated with NCBI BLAST [21]. *Van*-element-carrying plasmids were checked for circularity. Plasmids carrying the same *van*-element were then aligned to test for identity and thus to provide indication for inter-strain transfer of the whole plasmid.

3. Results

Between June 2014 and February 2015, five patients who were positive for VRE in their rectal screening at admission to the BMT unit were recruited. Four were male, and the mean age was 61.6 years (range 59–64). All patients received prophylactic and therapeutic antibiotic regimens during the study period (Fig. 1). Three rectal swabs were collected from each patient over 3 to 5 weeks with a minimum distance of 1 week. Swabs were cultured on VRE selective media, and 14 VRE colonies per specimen were selected for VRE population analysis.

3.1. VRE population structure in haematology patients

All VRE isolates were identified as *E. faecium* (VRE_{fm}). Three patients were colonised with *vanA*-VRE_{fm}, and two were colonised with *vanB*-VRE_{fm}. All isolates were subjected to short-read sequencing (sequencing failed in 1, total $n = 209$). Multi-locus sequence types (MLST) and core genome MLST clonal types (CT)

were assigned. According to published recommendations [25], a threshold for genetic relatedness of 20 alleles was employed; thus isolates with less than 20 alleles difference were grouped together.

In three out of five patients, VRE populations sampled at any time-point consisted of more than one strain as determined by cgMLST with a minimum distance of 20 alleles. Interestingly, the composition of these populations also changed over time in three patients (BMT-1, -2 and -4), whereas clonal composition was stable in two remaining individuals BMT-3 and BMT-5 (Fig. 2). In patient BMT-1, *vanB*-VRE belonging to four different STs were identified (ST78 [CT 3328], ST117 [CT 1485], ST192 [CT 3329] and ST280 [CT 16]) and were isolated over the course of three weeks. In patient BMT-2 three different *vanB*-VRE_{fm} strains were isolated over the course of three weeks (ST78 [CT 3328], ST117 [CT 2419] and ST192 [CT 1529/3329, allele difference below threshold]). Patient BMT-4 was colonised with *vanA*-VRE_{fm} belonging to two STs (ST78 [CT 3332] and ST262 [CT 420 and 3331]) over a sampling time of four weeks. In stably colonised patients BMT-3 and -5, a *vanA*-VRE_{fm} ST203 (CT 3334) and a *vanB*-VRE_{fm} ST889 (CT 2419/3330, allele difference below threshold) were identified over a period of four and three weeks, respectively.

3.1.1. Patient-to-patient transmission events

VRE are known to spread by nosocomial transmissions from patient to patient along direct or indirect routes, that is, from fomites or via healthcare personnel. To identify evidence for potential transmission events, isolates were compared based on whole genome analysis. Here, cgMLST-based typing showed that three strains were shared between patients BMT-1 and BMT-2 (ST 117/CT 1485/3335; ST 192/CT 1529/3329; ST78/CT 3328), who were hospitalised at the same time in the bone marrow transplant unit.

Comparison of clonal population structure in patient BMT-2 revealed in-hospital acquisition of a VRE_{fm} that was assigned to CT 2419/3330. A VRE_{fm} belonging to the same CT was also isolated from patient BMT-3, who was hospitalised 5 months earlier. Interestingly these isolates from BMT-2 and BMT-3 were classified into different STs (ST 117 and ST 889, respectively), although they belonged to the same CT and revealed identical PFGE patterns. Thus, an MLST-based approach would have falsely classified these isolates as unrelated. It is possible that those isolates represent descendants from a VRE_{fm} strain continuously circulating on the bone marrow transplant ward.

In summary, genomic analysis of colonising VRE_{fm} populations provides evidence that within-host genetic heterogeneity of colonising populations at least in part emerges from ongoing patient-to-patient transmissions occurring during hospitalisation.

3.2. Horizontal gene transfer of *van*-elements

Apart from patient-to-patient transmissions, population diversity of VRE could also emerge from horizontal gene transfer (HGT) events, resulting in the exchange of *van*-elements between VRE and genetically independent, vancomycin-susceptible *E. faecium* from the host gut microbiota. Typing of the *van*-determinants revealed four *vanA* variants (all plasmid localised) and three *vanB* variants (one chromosome localised, two plasmid localised) (Figs. 3 and 4). Of note, in three of five patients, independent VRE isolates, assigned to different lineages, carried identical *van*-elements (Fig. 2). For example, in patient BMT-1 the plasmid-coded *vanA*-element A2p was identified in isolates assigned to three distinct clonal lineages, whereas the respective element did not occur in any isolate from independent patients. In patient BMT-2 the A4p element was found in two distinct strains, and the plasmid-coded *vanB*-element B2p from patient BMT-4 was also recovered from two distinct VRE strains. All of these shared *van*-elements were

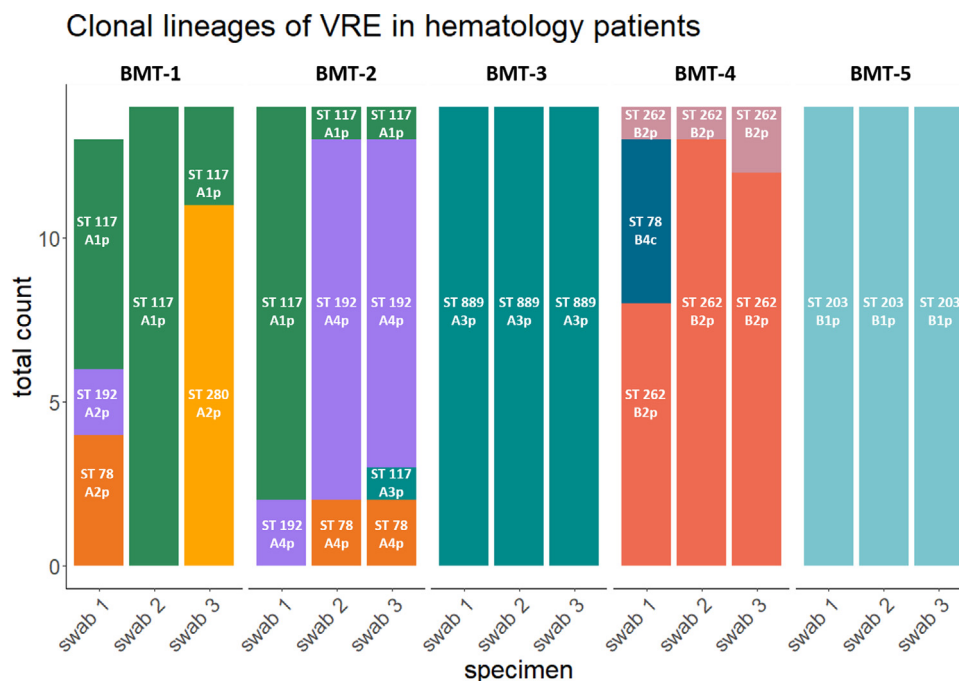


Fig. 2. Clonal lineages of VRE isolated from haematology patients BMT-1, BMT-2, BMT-3, BMT-4 and BMT-5. Three rectal swabs per patient were collected with an interval of 1–2 weeks, which were then directly inoculated on a VRE screening agar. Fourteen VRE*fm* isolates per patient were picked and short-read sequenced. One isolate per CT and patient was long-read sequenced for reconstruction of the van-element. Bar colours denote CT (grass green: CT 1485/3335, purple: CT 1529/3329, orange: CT 3328, yellow: CT 16, turquoise: CT 2419/3330, pink: CT 3331, dark blue: CT 3332, dark orange: CT 420/1007, light blue: CT 3334). Van-elements are abbreviated as follows: vanA: A, vanB: B, numbering according to Figs. 3 and 4, chromosomal localisation: c, plasmid localisation: p.

plasmid coded, so sequences of the plasmids were compared. Plasmids carrying A2p (approximate plasmid size 124.3 kbp), A4p (approximate plasmid size 140.9 kbp) and B2p (approximate plasmid size 308.2 kbp) were nearly identical, but with minor gaps in the alignment of plasmid sequences as circularity of these plasmid sequences could not be confirmed, these sequences are likely not complete (Supplementary Figure S1). These findings collectively provide evidence that within-host HGT events are an additional driving force underlying the rapid appearance and parallel existence of genetically unrelated VRE*fm* strains in individual BMT patients.

3.3. VRE populations in non-haematological patients

In order to test whether the observed heterogeneity within VRE populations apparent in BMT patients also applied to non-immunosuppressed patients, we anonymously analysed enteric VRE populations of five patients admitted to the cardiac ICU from October 2018 to November 2018. Following institutional standards, all patients admitted to this ward received a VRE screening upon admission. From five randomly selected, VRE-colonised patients, 10 VRE*fm* isolates were picked from screening plates and subjected to WGS.

Interestingly, as has been previously described by others [26], vanB-carrying *E. faecium* belonging to ST 117 dominated the population (4/5 cardiac ICU patients; CT 71, $n = 2$, CT 1686, $n = 1$; CT 1473, $n = 1$). One patient exclusively was colonised with vanB-VRE*fm* of ST262 (CT 1016). Only in 1/5 patients, a second colonising vanA-VRE*fm* strain (ST80 (CT 3336)) was identified (Fig. 5). Thus, VRE population heterogeneity was low in patients admitted to cardiac ICU. Of note, the vanB-element as determined by long-read sequencing was identical in all vanB-VRE from cardiac ICU patients (B3c).

4. Discussion

In this study, VRE populations in five individuals with the greatest risk of enterococcal infection were analysed. Remarkably, we found high heterogeneity of VRE populations in three of five analysed patients, and population composition changed significantly over the course of merely weeks. Despite increased hygiene measures in the clinic for bone marrow transplantation, our data demonstrated that repeated acquisition of VRE strains most likely from the hospital environment is an evident reason for the rapidly changing clonal composition of colonising VRE populations. Importantly, VRE colonisation is enhanced by the administration of antibiotics, as has been shown for glycopeptides and agents with broad anaerobic activity [9,27,28].

Moreover, comparative genomic analysis found that within an individual patient, van-elements from different VRE*fm* strains were identical. Comparison of van-carrying plasmids identified in independent patients indicate that HGT between VRE*fm* and VSE*fm* strains within the gut may be a source for VRE population heterogeneity. In fact, HGT has previously been shown to play a role in VRE epidemiology. A recent epidemiological study including VRE isolates from 27 countries collected over the course of three decades show the emergence of chimeric van-coding plasmids [29], indicating HGT and recombination, as well as HGT in smaller outbreaks [12]. In extension to these findings, our data support the idea that at least in high-risk BMT patients, HGT is also of concern for the within-host spread of van-elements and the subsequent emergence of novel VRE clones with potentially novel traits.

In addition to implications for the general understanding of VRE population dynamics, our findings have immediate implications for molecular VRE surveillance as part of infection control programs. With the purpose to assign or exclude patients from potential ongoing outbreak events, VRE typing is conventionally based on the analysis of one single isolate per patient at one time point.

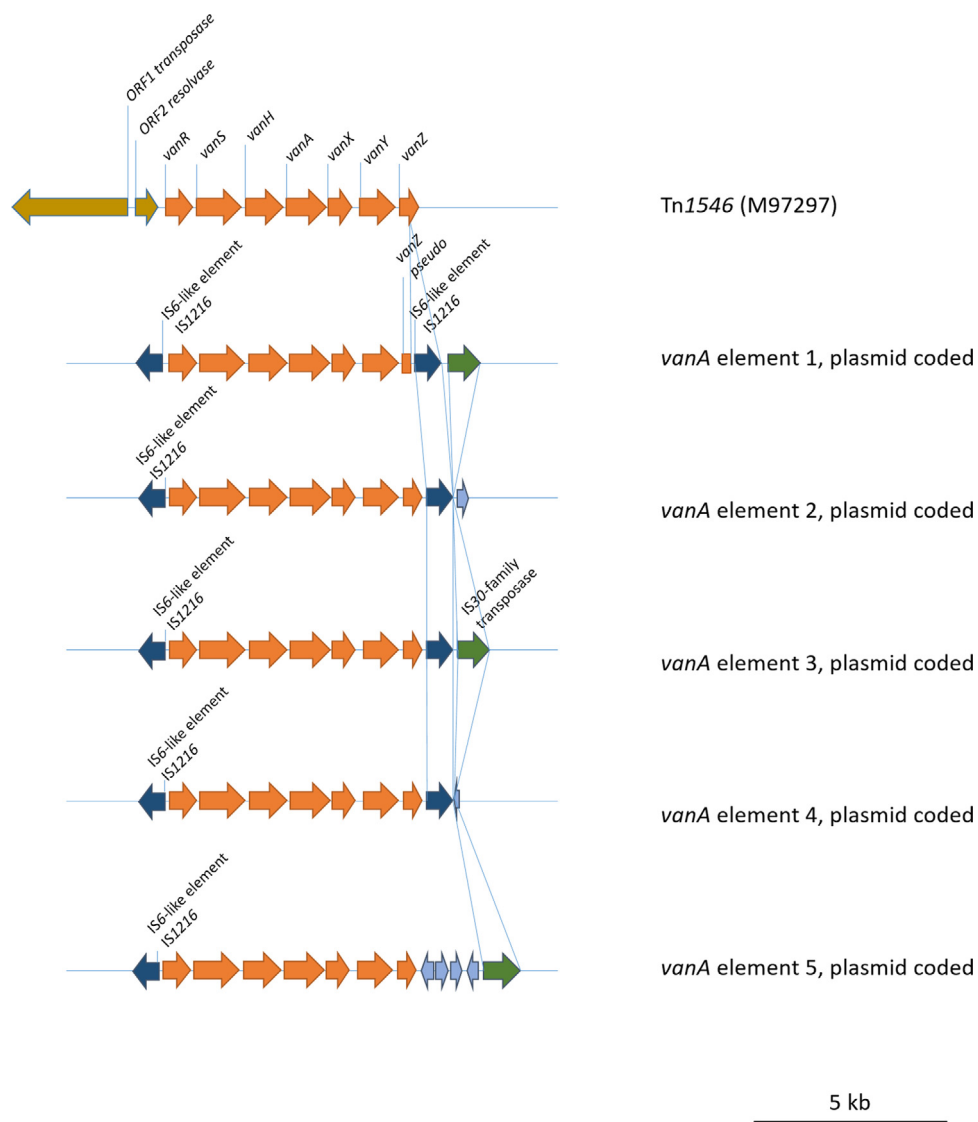


Fig. 3. Gene map of *vanA*-element variants identified in this study. The upper panel represents the reference sequence Tn1546 (Genbank M97297). Elements were typed by performing long-read sequencing on one isolate per CT per patient.

Consequently, given the apparent clonal heterogeneity of VRE populations within individual patients at any given time point, as well as over time, it appears that potentially, by choosing the wrong colony for genomic analysis, outbreaks may remain undetected. This is of obvious concern, as implementation of rigorous infection control measures based on sensitive and specific surveillance data are of major importance to prevent spread of VRE in high-risk patient populations such as BMT recipients.

BMT recipients represent a very small group of patients characterised by significant immune impairment and thus the need for prophylactic and/or therapeutic antibiotic treatment. These characteristics clearly may pave the way for the rapid uptake and successful colonisation with VRE clones from exogenous sources. In addition, it is well described that at subinhibitory concentrations, antibiotics (e.g., betalactams, quinolones and aminoglycosides) induce the bacterial SOS response, which in turn promotes the mobilisation of mobile genetic elements [30]. Thus, the prophylactic antibiotics given during phases of severe leukopenia may also promote HGT and recombination events between *E. faecium* clones from individual host microbiota. Importantly, though widely assumed, the effect of antibiotic treatment on HGT in enterococci has never been experimentally assessed [31].

An additional line of evidence indicating that BMT patients potentially represent an exceptional population regarding VRE colonisation dynamics comes from investigation of VRE populations in five patients admitted to the cardiology ICU. Here, predominance of a single ST was the rule, and colonisation with additional clonal lineages was observed in only one patient. Thus, it is plausible that severe exposure to antibiotics and disruption of commensal microbiota are necessary for rapidly evolving VRE population heterogeneity to occur. Of note, the sample size in ICU patients was lower with only 10 colonies of VRE per patient; thus small minorities might have gone undetected. A significant limitation of our study arises from sampling of BMT recipient VRE isolates in 2014 to 2015. Since then, the epidemiology of VRE*fm* has changed in Germany. Although *vanA* remains the predominant *van*-determinant in many countries, Germany saw a shift towards *vanB*-VRE*fm* [32]. ST192, ST117 and ST17 have been identified by the German reference centre as the predominant clonal lineages in this change in epidemiology [26,33]. At present, it cannot be excluded that the observed changes in VRE*fm* populations are restricted to the clonal lineages observed in 2014 to 2015 or, more likely, to populations carrying plasmid-coded *van*-elements. Also, though the number of sequenced isolates exceeds 250, the

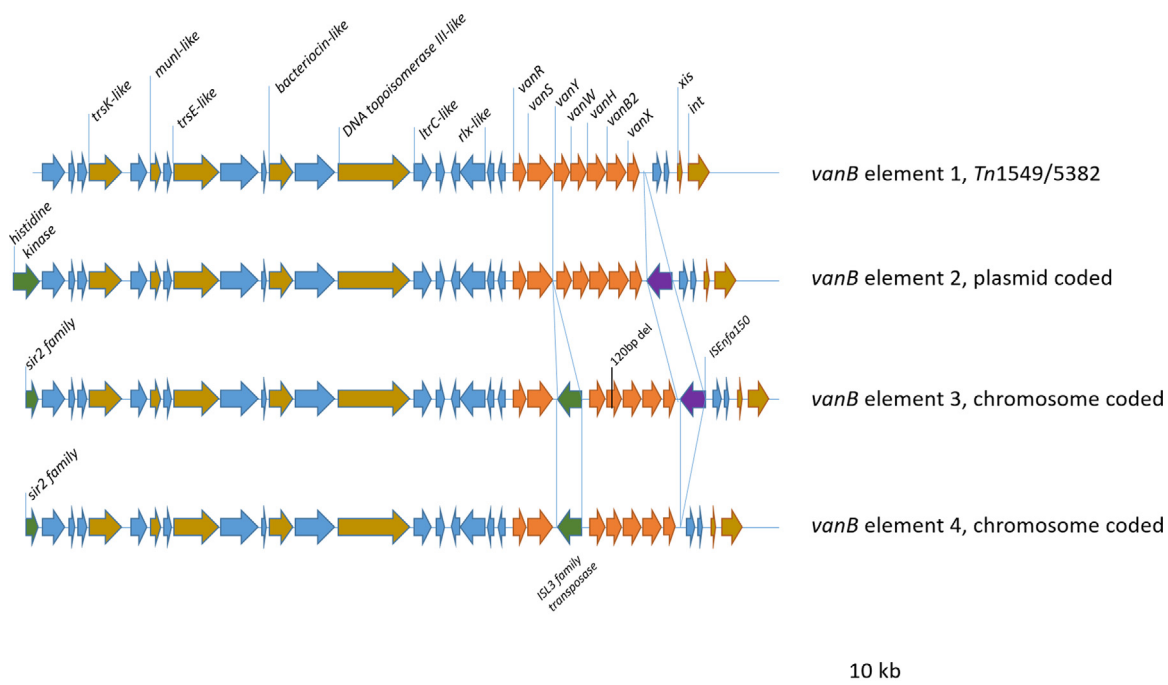


Fig. 4. Gene map of *vanB*-element variants identified in this study. The upper panel represents the reference sequence *Tn1549* (Genbank AF192329).

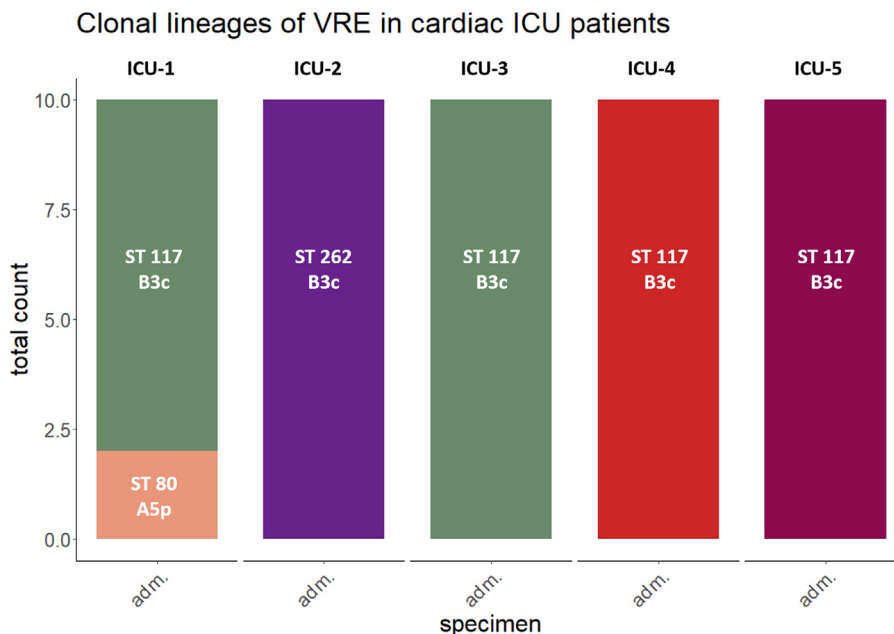


Fig. 5. Clonal lineages of VRE isolated from cardiac intensive care unit (ICU) patients who were screened with a rectal swab upon admission (adm.), which was then directly inoculated on a VRE screening agar. Ten *VREfm* isolates per patient were picked and short-read sequenced. One isolate per CT and patient was long-read sequenced for reconstruction of the *van*-element. Bar colour denote CT (green: CT 71, apricot: CT 3336, purple: CT 1016, red: CT1686, dark red: CT 1473). *Van*-elements are abbreviated as follows: *vanA*: A, *vanB*: B, numbering according to Figs. 3 and 4, chromosomal localisation: c, plasmid localisation: p.

number of patients both in BMT and ICU is rather small, and larger studies need to be conducted to better understand the scale and contributing host and bacterial factors for the here-described phenomenon.

In conclusion, this study shows that the dynamics of vancomycin resistance transmission depend on the epidemiological setting and analysed patient collective. HGT plays a so far underestimated role in VRE epidemiology, and reconstruction of the *van*-element should always be attempted when assessing VRE epidemiology. Importantly, special care should be taken in identifying

patient groups where outbreak surveillance must include multiple enteric isolates.

Funding

None.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing interests.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jgar.2022.01.027.

References

- [1] Vehreschild MJGT, Haverkamp M, Biehl LM, Lemmen S, Fätkenheuer G. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): a reason to isolate? *Infection* 2019;47:7–11.
- [2] European Centre for Disease Prevention and Control Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018; 2019. Stockholm, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>.
- [3] Remschmidt C, Schröder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany: 10 years of surveillance. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;7:54.
- [4] Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 1993;175:117–27.
- [5] Faron ML, Ledebouer NA, Buchan BW. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant enterococcus in the health care setting. *J Clin Microbiol* 2016;54:2436–47.
- [6] Garnier F, Taourit S, Glaser P, Courvalin P, Galimand M. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* 2000;146:1481–9.
- [7] Papadimitriou-Olivigeris M, Drougka E, Fligou F, Kolonitsiou F, Liakopoulos A, Dodou V, et al. Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients. *Infection* 2014;42. doi:10.1007/s15010-014-0678-1.
- [8] Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* 2010;120:4332–41.
- [9] Remschmidt C, Behnke M, Kola A, Peña Diaz LA, Rohde AM, Gastmeier P, et al. The effect of antibiotic use on prevalence of nosocomial vancomycin-resistant enterococci: an ecologic study. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017;6.
- [10] Austin DJ, Bonten MJM, Weinstein RA, Slaughter S, Anderson RM. Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6908–13.
- [11] Ballard SA, Pertile KK, Lim M, Johnson PDR, Grayson ML. Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1688–94.
- [12] Zhou X, Chlebowicz MA, Bathoorn E, Rosema S, Couto N, Lokate M, et al. Elucidating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks: the role of clonal spread and movement of mobile genetic elements. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:3259–67.
- [13] Nijhuis RHT, Chlebowicz-Fliss MA, Smilde AE, Rossen JWA, Weersink AJL, Giegack-Baars ACM. Whole-genome sequencing analysis reveals the spread of a vanB-carrying transposon among different vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates in a non-endemic setting. *J Hosp Infect* 2021;110:52–9.
- [14] Blázquez J, Rodríguez-Beltrán J, Matic I. Antibiotic-induced genetic variation: how it arises and how it can be prevented. *Annu Rev Microbiol* 2018;72:209–30.
- [15] Fang H, Nord CE, Ullberg M. Screening for vancomycin-resistant enterococci: results of a survey in Stockholm. *APMIS* 2010;118:413–17.
- [16] Both A, Huang J, Qi M, Lausmann C, Weißelberg S, Büttner H, et al. Distinct clonal lineages and within-host diversification shape invasive *Staphylococcus epidermidis* populations. *PLOS Pathog* 2021;17:e1009304.
- [17] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–20.
- [18] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–77.
- [19] Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 2017;13.
- [20] Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 2011;12.
- [21] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [22] Li W, O'Neill KR, Haft DH, DiCuccio M, Chetvernin V, Badretdin A, et al. RefSeq: expanding the prokaryotic genome annotation pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D1020–8.
- [23] Haft DH, DiCuccio M, Badretdin A, Brover V, Chetvernin V, O'Neill K, et al. RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Res* 2018;46:D851–60.
- [24] Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, et al. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol* 2013;31:294–6.
- [25] De Been M, Pinholt M, Top J, Bletz S, Mellmann A, Van Schaik W, et al. Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2015;53:3788–97.
- [26] Werner G, Neumann B, Weber RE, Kresken M, Wendt C, Bender JK, et al. Thirty years of VRE in Germany – “expect the unexpected”: the view from the National Reference Centre for *Staphylococci* and *Enterococci*. *Drug Resist Updat* 2020;53.
- [27] Banerjee T, Anupurba S, Filgona J, Singh DK. Vancomycin-resistance *Enterococcal* colonization in hospitalized patients in relation to antibiotic usage in a tertiary care hospital of North India. *J Lab Physicians* 2015;7:108–11.
- [28] Al-Nassir WN, Sethi AK, Li Y, Pultz MJ, Riggs MM, Donskey CJ. Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2403–6.
- [29] Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Jensen LB, Novais C, Peixe L, et al. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *J Antimicrob Chemother* 2016;71:3351–66.
- [30] Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:465–78.
- [31] Lopatkin AJ, Sysoeva TA, You L. Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: analysis suggests a critical role of selection dynamics. *BioEssays* 2016;38:1283–92.
- [32] Werner G, Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Just H-M, et al. Vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. *Antimicrob Resist Infect Control* 2012;1:21.
- [33] Bender JK, Kalmbach A, Fleige C, Klare I, Fuchs S, Werner G. Population structure and acquisition of the vanB resistance determinant in German clinical isolates of *Enterococcus faecium* ST192. *Sci Rep* 2016;6:21847.

3 Zusammenfassende Darstellung der Publikation

3.1 Vorwort

Die vorliegende Arbeit dient der zusammenfassenden Darstellung der im Januar 2022 in „*Journal of Global Antimicrobial Resistance*“ veröffentlichten Publikation mit dem Titel „*Population dynamics in colonizing vancomycin-resistant E. faecium isolated from immunosuppressed patients*“. Die Struktur dieser Dissertation orientiert sich am Aufbau des Originalartikels; detaillierte weiterführende Informationen können der Publikation entnommen werden (Both *et al.*, 2022; DOI: 10.1016/j.jgar.2022.01.027).

3.2 Einleitung

3.2.1 Die Gattung *Enterococcus* – Eigenschaften und Taxonomie

Taxonomisch gehören Enterokokken zur Familie der *Enterococcaceae* in der Ordnung der Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*) (Ludwig *et al.*, 2009). Es handelt sich um grampositive, Katalase-negative und fakultativ anaerobe Diplo- oder Kettenkokken. Ursprünglich wurden sie aufgrund des Vorhandenseins von Lipoteichonsäure beziehungsweise dem Gruppe-D-Antigen nach Lancefield den Streptokokken der Gruppe D zugeordnet. Vergleichende genetische Analysen führten dann jedoch dazu, dass die Enterokokken als eigenständige Gattung anerkannt wurden (Schleifer & Kilpper-Balz, 1984).

Enterokokken sind äußerst resistent gegen extreme äußere Einflüsse; sie widerstehen beispielsweise hohen Temperaturen und können in einem Intervall zwischen 10°C und 45°C überleben. Ihr Wachstumsoptimum entspricht 35°C – 37°C. Ferner tolerieren sie hohe Salz- (6,5% Natriumchlorid-Lösung) und niedrigen Protonenkonzentrationen (pH 9,6) sowie die Gegenwart hoher Gallensäurekonzentrationen, was sie von den Streptokokken abgrenzt.

In der Umwelt kommen Enterokokken weltweit ubiquitär vor. Bei Menschen, Säugetieren und Vögeln sind sie Teil der physiologischen Dickdarmflora (Devriese *et al.*, 2006).

3.2.2 Bedeutung als humanpathogene Erreger

Aktuell sind mehr als 60 verschiedene Enterokokken-Arten beschrieben (Parte, et al., 2020 „Bacterial Nomenclature Up-To-Date“, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Stand: 03/2022).

Zu den primär medizinisch relevanten Spezies gehören jedoch nur *E. faecalis* und *E. faecium* (Murray et al., 1990; Witte et al., 1999). Diese stellen nach *Escherichia coli* den zweithäufigsten Erreger für nosokomiale Infektionen in Deutschland dar (NRZ Abschlussbericht 2016; WHO 2022).

Da Enterokokken eine vergleichsweise geringe Virulenz aufweisen, treten sie hauptsächlich bei immunkompromittierten Patienten als Humanpathogene in Erscheinung (Arias & Murray, 2012). Dieses Patientenkollektiv ist häufig einem hohen prophylaktischen und therapeutischen Gebrauch von Antibiotika ausgesetzt. Hierzu zählen zum einen hämatologische Patienten nach Stammzelltransplantation, aber zum anderen auch Patienten in intensivmedizinischer Behandlung. Klinisch imponieren vor allem endogene Infektionen wie komplizierte Harnwegsinfektionen, Peritonitis (vor allem bei Patienten mit Peritonealdialyse), postoperative Weichteilinfektionen, Sepsis, Meningitis und die Endocarditis lenta (Padadimitriou-Olivgeris et al., 2014; Ubeda et al., 2010).

Infektionen durch *E. faecalis* sind insgesamt deutlich häufiger als Infektionen durch *E. faecium*, höchstwahrscheinlich durch eine höhere Virulenz von *E. faecalis* (Werner et al., 2008). Jedoch besitzen *E. faecium*-Isolate signifikant häufiger Multiresistenzen (Klare et al., 2012).

Enterokokken zeichnen sich durch intrinsische Resistenzen gegenüber Cephalosporinen, Cotrimoxazol und Aminoglykosiden aus. Aus diesem Grund sind Amino- und Ureidopenicilline Mittel der Wahl in empirischen und gezielten therapeutischen Settings. Jedoch haben durch die unkritische Verwendung von Antiinfektiva viele vor allem Krankenhaus-assoziierte Stämme mittlerweile ebenfalls Resistenzmechanismen ausgebildet, so dass aktuell vor allem das bakterizid-wirkende Glykopeptidantibiotikum Vancomycin bei Enterokokkeninfektionen eingesetzt wird. Durch den gesteigerten Einsatz dieser Substanzklasse sind in den letzten Jahren wiederum vermehrt invasive Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) vor allem *E. faecium* (VRE_{fm}) beschrieben worden (RKI, 2015).

Glykopeptide, wie Vancomycin und Teicoplanin binden an C-terminale D-Alanin-D-Alanin-Enden von Pentapeptidseitenketten von Mureinvorstufen. Diese werden bei der Peptidoglykansynthese benötigt und im Verlauf quervernetzt. Durch Bindung von

Vancomycin kann die für die Quervernetzung essentielle Transglykosylierungsreaktion nicht stattfinden. Bei Ausbleiben der Quervernetzung ist die Integrität der Zellwand somit beeinträchtigt und die Zellen lysieren.

Aktuell sind sechs verschiedene Genotypen für eine erworbene Vancomycin-Resistenz charakterisiert worden, wobei *vanA* und *vanB* die mit Abstand häufigsten Resistenzgenotypen darstellen, die gleichzeitig eine klinische Relevanz haben (Courvalin, 2006).

Beide Gene kodieren für eine Ligase, die für eine Veränderung der Zielstruktur sorgen (ein modifiziertes D-Alanin-D-Laktat) und auf diese Weise die Bindungsaffinität von Vancomycin und Teicoplanin um den Faktor 1000 reduziert. *vanA* befindet sich auf einem mobilen genetischen Element, dem Transposon Tn1546, welches auf einem konjugativen Plasmid kodiert ist (Faron *et al.*, 2016; Arthur *et al.*, 1993). *vanB* befindet sich meist auf dem Transposon Tn1549, meist in integrierter Form im bakteriellen Chromosom vorliegend. Jedoch ist auch eine Plasmid-kodierte Variante möglich (Garnier *et al.*, 2000). Eine Kreuzresistenz für Teicoplanin liegt bei *vanB* nicht vor.

Einer Infektion durch Enterokokken liegt meist eine enterale Besiedelung mit dem Erreger zu Grunde. Diese ist bei gesunden Menschen in physiologischem Zustand vergleichsweise gering. Repetitive Therapien mit Antibiotika mit einer Enterokokken-Lücke (zum Beispiel Cephalosporine, Fluorchinolone) können dieses Gleichgewicht einer mikrobiellen Diversität zugunsten von Enterokokken verschieben. Vor allem Menschen mit vorrausgegangen Krankenhausaufenthalten, multiplen Antibiotikatherapien, Hämodialyse und Nachweis anderer multiresistenter Erreger haben ein erhöhtes Risiko für eine VRE-Besiedelung (Vehreschild *et al.*, 2019).

Insgesamt lassen sich seit den späten 1980er Jahren weltweit vermehrt resistente Enterokokken nachweisen. Die ersten Ausbrüche durch VRE in Europa waren 1988 in England und Frankreich zu verzeichnen (Bonten *et al.*, 2001). Seitdem ist eine stetig ansteigende Tendenz auch in Deutschland und vielen anderen Ländern in Europa zu beobachten. Jedoch schwanken die regionalen Resistenzraten bei einem ausgeprägten Nord-Südgefälle in Europa stark, mit teilweise hohen Raten im Mittelmeerraum (WHO, 2022; ECDC, 2019). In Deutschland stieg der Anteil der invasiven VRE beispielsweise zwischen 2016 von 11,9% auf 22,3% im Jahr 2020 (WHO, 2022).

Die nosokomiale Verbreitung von Mensch zu Mensch stellt weiterhin die wichtigste Quelle für die Transmission und nachfolgende Besiedelung durch VRE dar (Klare *et al.*, 2012).

Eine weitere Möglichkeit zur Weitergabe von Resistenzgenen stellt der horizontale Gentransfer zwischen Bakterienspezies dar. VRE oder weitere grampositive Anaerobier können Gene über Plasmide auf VSE übertragen und somit zur Verbreitung beitragen (Ballard *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2018; Nijhuis *et al.*, 2021). Ein hoher antiinfektiver Selektionsdruck kann bei Bakterien Stressantworten auslösen, welche wiederum zu einer Induktion von horizontalem Gentransfer führen können (Blázquez *et al.*, 2018). Inwieweit dieses Phänomen bei VRE-Ausbrüchen eine Relevanz hat, ist bisher nur unzureichend untersucht.

3.2.3 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Populationsanalyse kolonialisierender Vancomycin-resistenter Enterokokken bei enteral besiedelten Hochrisiko-Patienten einer Abteilung für Stammzelltransplantation. Dieses immunsupprimierte Patientenkollektiv ist im Rahmen der Therapie häufig wiederkehrenden prophylaktischen und therapeutischen antiinfektiven Therapien ausgesetzt, so dass auf das Mikrobiom ein hoher antibiotischer Selektionsdruck wirkt.

Wir nehmen an, dass dieser Druck zu einem vermehrten horizontalen Gentransfer von *van*-Element-tragenden Bakterien auf Vancomycin-sensible Enterokokken (VSE) führt, welches wiederum eine hohe intraindividuelle Heterogenität der VRE-Population zur Folge haben würde.

Die standardmäßige Ausbruchdiagnostik basierend auf der Sequenzierungen von Core-Genen bei Einzelklonen könnte somit nicht ausreichend sein und Ausbrüche könnten folglich nicht adäquat diagnostiziert werden.

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Gewinnung von Patientenproben

Die primäre Sammlung der VRE erfolgte aus Rektalabstrichen bei fünf Patienten der Klinik für Stammzelltransplantation zwischen Juli 2014 und Februar 2015 im Rahmen der wöchentlichen Routine-Screenings auf multiresistente Erreger. Bei allen Patienten konnten mindestens drei Abstriche im wöchentlichen Intervall untersucht werden.

Von allen Patienten wurde vorweg eine schriftliche Einverständniserklärung für die Verwendung des diagnostischen Materials zu wissenschaftlichen Zwecken eingeholt. Die Studie wurde von der Hamburger Ethikkommission (PV4460) genehmigt.

Die Sammlung von Rektalabstrichen bei weiteren fünf Patienten einer kardiologischen Intensivstation (ITS) wurde zwischen September und Oktober 2018 durchgeführt. Diese wurden anonymisiert behandelt; Patienten-spezifische Daten wurden nicht erhoben.

3.3.2 Mikrobiologische Analyse der Isolate

Alle Isolate wurden auf VRE-Selektivagar (ChromID, Biomérieux, Frankreich) für maximal 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Jeweils vierzehn Kolonien wurden (beziehungsweise zehn Kolonien bei Patienten der kardiologischen ITS) weiterverwendet und im Verlauf mittels MALDI-TOF auf Spezies-Ebene korrekterweise als *E. faecium* identifiziert. Ferner erfolgte im Rahmen der mikrobiologischen Routinetestung eine Antibiotika-Empfindlichkeitstestung mittels eines semi-automatischen Kartensystems (Vitek 2, Biomérieux, Frankreich) und eine quantitative real-time PCR zum Nachweis eines *vanAB*-Resistenzgenes (Fang *et al.*, 2011). Bestätigte Vancomycin-resistente *E. faecium* (VRE_{fm}) wurden bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3 Vollgenomsequenzierung

Zur Herstellung der Bibliotheken für das *whole genome sequencing* (WGS) der 14 bestätigten VRE_{fm}-Isolate (jeweils 5 Patienten mit je 3 Zeitpunkten) und der 10 VRE_{fm}-Isolate der ITS-Patienten wurde zunächst die DNA der Enterokokken extrahiert. Dafür wurden die Isolate für 4-6h bei 37°C bebrütet und anschließend geerntet. Nach einmaligem Waschen erfolgte eine mechanische Lyse mit Glaskugeln auf einem Gewebshomogenisierer (Precellys 12, Bertin, Frankreich). Die eigentliche DNA Extraktion wurde mittels QIAamp mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) analog der Herstellerangaben durchgeführt.

Die DNA wurde im Anschluss auf einem Bioruptor (Diagenode, Seraing, Belgien) auf eine Fragmentlänge von ca. 300-400 Nukleotide zerkleinert. Die eigentlichen Bibliotheken wurden dann unter Verwendung des NEB Next Ultra DNA library prep kit for Illumina (NEB, Ipswich, USA) hergestellt und auf einem Illumina NextSeq500 System (Illumina, San Diego, USA) mit einer Fließzelle mit mittlerer Leistung (*short read* - Read-Längen von 2x150 bp) *paired-end* sequenziert. Die so gewonnenen Daten wurden mittels Trimmomatic v.0.39 und SPAdes assembler v3.13.1 weiter prozessiert (Bolger *et al.*, 2014; Bankevich *et al.*, 2012).

Zur relativen Zuordnung der Contigs aller *short reads* zueinander wurden von jedem Isolat mit einem eigenständigen klonalen Typen (CT; insgesamt 19 verschiedene) eine *long read* - Nanopore Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurde zunächst erneut DNA mit hoher Konzentration mit Hilfe des QIAamp midi kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) generiert. Die Herstellung der Bibliothek erfolgte anhand der Herstellerangaben des Kits. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf ONT GridION X5 R9.4.1 Fließzellen sequenziert und die Daten wiederum analog derer der *short reads* prozessiert.

Beide Datensätze wurden *de novo* mit Hilfe von Unicycler v.0.4.7 assembliert (Wick *et al.*, 2017). Alle Enterokokken Chromosomen sowie 82 von 101 potenziellen Plasmiden wurden als zirkulär identifiziert. Zur Visualisierung der Plasmide wurde das Programm „BLAST ring image generator“ BRIG verwendet (Altschul *et al.*, 1990; Alikhan *et al.*, 2011). Alle sequenzierten Genome wurden analog der „NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline“ (PGAP) annotiert und an die NCBI Genbank übermittelt (Le *et al.*, 2021; Haft *et al.*, 2018).

3.3.4 Phylogenetische Analyse

Zur Populationsanalyse mittels *core genome multi-locus sequence typing* (cgMLST) wurde die Software Ridom SeqSphere v7.2.3 verwendet (Jünemann *et al.*, 2013). Beim cgMLST werden Allele von *Housekeeping*-Genen analysiert, wobei spezifische Allelkombinationen jeweils für einen sog. Sequenztypen stehen. Dieser Sequenztyp kann wiederum einem klonalen Typen (CT) zugeordnet werden. Per Definition werden Isolate, die sich in weniger als 20 Allelen unterscheiden, zusammen gruppiert (De Been *et al.*, 2015).

3.3.5 Analyse der *van*-Elemente

Zur Charakterisierung der *van*-Elemente wurden die Sequenzdaten der *short read* und *long read*-Sequenzierungen mit dem Referenzdatensatz für das Transposon Tn1546 (Genbank Nr. M97297) für *vanA* und dem für das Transposon Tn1549 (Genbank Nr. AF192329) für *vanB* mit Hilfe der Software CLC main workbench v8.1 verglichen.

Sequenzdaten, die nicht mit dem Referenzdatensatz in Übereinstimmung gebracht werden konnten, wurden mittels NCBI Blast annotiert (Altschul *et al.*, 1990).

van-Element-tragende Plasmide wurden auf Zirkularität geprüft. Weiterhin wurden alle Plasmide mit identischen *van*-Elementen auf Übereinstimmung und möglichem horizontalem Gentransfer zwischen einzelnen Isolaten analysiert.

3.4 Ergebnisse

Im Zeitraum von Juni 2014 und Februar 2015 wurden 5 VRE kolonialisierte Patienten einer Abteilung für Stammzelltransplantation (im Folgenden als BMT-1 – BMT-5 annotiert) für diese Studie rekrutiert. Vier davon waren männlich, das mittlere Alter betrug 61,6 Jahre. Alle Patienten haben sowohl prophylaktische als auch therapeutische Gaben von Antibiotika im Rahmen ihres stationären Aufenthaltes erhalten.

Von jedem Patienten wurden im Verlauf von drei bis fünf Wochen jeweils mindestens drei rektale Abstriche gesammelt. Diese wurden auf VRE-selektierenden Nährmedien bebrütet. Für die Populationsanalyse wurden jeweils 14 VRE Kolonien pro Zeitpunkt gewählt.

3.4.1 Populationsstruktur von VRE bei hämatologischen Patienten

Alle Isolate (n=210) wurden korrekt als VRE *E. faecium* (VRE_{fm}) identifiziert. Drei der fünf Patienten waren mit *vanA*-VRE_{fm} besiedelt, zwei mit *vanB*-VRE_{fm}. Konsekutiv wurden alle Isolate sequenziert, wobei bei einem Isolat die Sequenzierung scheiterte. Mit Hilfe von cgMLST wurde der klonale Typ (CT) bestimmt, wobei der Verwandtschaftsgrad analog vorheriger Analysen auf einen Grenzwert von 20 Allelen festgelegt wurde (De Been *et al.*, 2015). Somit wurden Isolate, die einen Unterschied von weniger als 20 Allelen aufwiesen, als genetisch nah verwandt eingestuft und zusammen gruppiert.

Bei drei von fünf Patienten (BMT-1; -2 und -4) konnte gezeigt werden, dass diese initial mit unterschiedlichen Stämmen besiedelt waren. Interessanterweise änderte sich diese Zusammensetzung im zeitlichen Verlauf. Bei den anderen beiden Patienten (BMT- 3 & BMT - 5) war die Populationszusammensetzung über das beobachtete Intervall hingegen konstant.

Patient BMT-1 war in den beobachteten drei Wochen mit vier verschiedenen *vanB-VRE_{fm}* Sequenztypen (ST78 [CT3328]; ST117 [CT1485]; ST192 [CT3329] und ST280 [CT16]) kolonialisiert.

Für Patient BMT-2 konnten im 3-wöchigen Intervall eine Besiedelung mit folgenden *vanB-VRE_{fm}* Sequenztypen (ST78 [CT3328]; ST117 [CT2419] und ST192 [CT1529/CT3329 Allelunterschied unterhalb des Grenzwertes] nachgewiesen werden.

Patient BMT-4 war im 4-wöchigen Beobachtungsintervall mit *vanA-VRE_{fm}* besiedelt, die zur den beiden Sequenztypen ST78 [CT3332] und ST262 [CT420/CT3331] gehören.

Bei den Patienten BMT-3 und BMT-5 konnte im 3- beziehungsweise 4-wöchigen Intervall eine stabile Besiedelung mit dem *vanA-VRE_{fm}* ST203 (CT3334) beziehungsweise *vanB-VRE_{fm}* ST889 (CT2419/CT3330) gezeigt werden.

3.4.2 Einfluss von Patient-zu-Patient Transmissionen auf die VRE-Heterogenität

VRE können als nosokomiale Infektionen von Patient zu Patient übertragen werden. Dieses geschieht entweder durch direkten Kontakt besiedelter Patienten oder indirekt durch medizinisches Personal (Teixeira *et al.*, 2011). Mittels Vollgenomanalyse der sequenzierten Isolate konnte für die Patienten BMT-1 und BMT-2, deren stationärer Aufenthalt im gleichen zeitlichen Rahmen erfolgte, eine inter-Patienten Transmission gezeigt werden. Die cgMLST-basierte Typisierung offenbarte ein Austausch der Isolate (ST117 [CT1485 / CT3335]; ST192 [CT1529 / CT3329] und ST78 [CT3328] zwischen beiden Individuen.

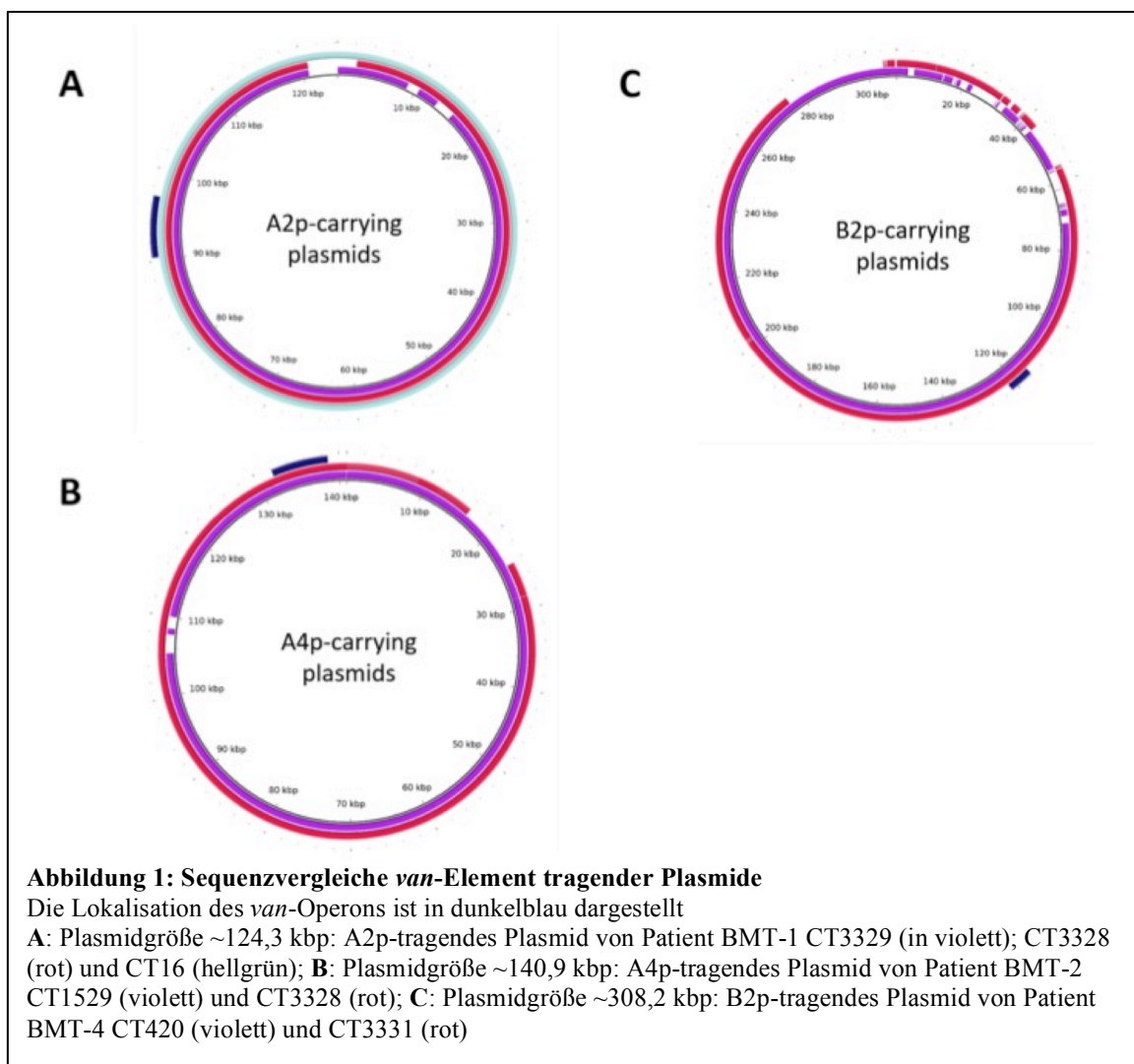
Bei Vergleich der klonalen Populationsstruktur der Isolate von Patient BMT-2 konnte eindeutige Indizien für eine nosokomiale Transmission erhalten werden. Der *VRE_{fm}* mit dem klonalen Typus CT2419 / CT3330 wurde schon bei Patient BMT-3 nachgewiesen. Dieser wurde fünf Monate vor Patient BMT-2 auf der Stammzelltransplantationsabteilung behandelt. Interessanterweise wurden die Isolate von beiden Patienten durch cgMLST in unterschiedliche Sequenztypen (ST117 & ST889) eingeteilt, obwohl beide dem gleichen klonalen Komplex angehören und ebenfalls identische Muster in der Pulsfeldgelelektrophorese aufweisen. Somit könnte ein rein cgMLST-basierter Ansatz zur Verwandtschaftsanalyse bei Ausbrüchen die beiden Isolate fälschlicherweise als unverwandt klassifizieren. Weiterhin ist denkbar, dass beide Isolate Nachfahren eines *VRE_{fm}*-Stammes repräsentieren, der kontinuierlich in der Abteilung für Stammzelltransplantation kursiert.

Zusammenfassend lässt sich durch die genomische Analyse von VRE_{fm} Populationen feststellen, dass die intraindividuelle genetische Heterogenität der kursierenden VRE-Populationen, zumindest in Teilen, durch anhaltende Transmissionsphänomene zwischen Patienten während einer stationären Behandlung auftreten kann.

3.4.3 Horizontaler Gentransfer von *van*-Elementen

Neben Transmissionen von VRE von Patient zu Patient kann eine Populationsheterogenität auch durch horizontalen Gentransfer entstehen. Hierbei können genetisch unabhängige VSE Plasmid-kodierte *van*-Elemente entweder von anderen VRE-Stämmen oder gram-positiven Darmbakterien erhalten.

Die *long read*-Sequenzdaten der jeweiligen Sequenztypen erlaubte eine genaue Typisierung der korrespondierenden *van*-Elemente. In dieser Studie konnten vier



unterschiedliche *vanA*-Varianten (ausschließlich Plasmid-kodiert) und drei *vanB*-Varianten (eine chromosomal lokalisiert; zwei Plasmid-kodiert) identifiziert werden.

Bei drei von fünf Patienten, deren Isolate als genetisch unabhängige klonale Linien identifiziert wurden, zeigten sich jedoch ausschließlich identische *van*-Elemente.

Drei genetisch unabhängige Isolate (ST78; ST192 und ST280) von Patient BMT-1 trugen jeweils das identische Plasmid-kodierte *vanA*-Element A2p; in Isolaten anderer Patienten konnte dieses Element nicht nachgewiesen werden.

Für Patient BMT-2 wurde das Element A4p in zwei verschiedenen Stämmen (ST192 und ST78) nachgewiesen. Ferner wurde bei Patient BMT-4 das Plasmid-kodierte *vanB*-Element B2p in zwei unabhängigen Isolaten gefunden (ST262 [CT3331 und CT420/1007]).

Da sich sämtliche *van*-Elemente auf Plasmiden befinden, wurden die Sequenzen der Plasmide verglichen. Dabei sind die jeweiligen Plasmide auf denen sich A2p, A4p und B2p befinden, genetisch nahezu identisch.

Zusammenfassend lässt sich der horizontale Gentransfer innerhalb eines Wirtes als zusätzlicher Impulsgeber für das rasche und vermehrte Auftreten von parallel existierenden genetisch unabhängigen *VRE_{fm}* Stämme in immunsupprimierten Patienten identifizieren.

3.4.4 VRE Populationen bei Patienten mit nicht-hämatologischen Erkrankungen

Um die Frage näher zu erörtern, ob sich die beobachtete intra-Wirts Heterogenität der VRE Populationen ausschließlich bei Patienten der Stammzelltransplantation auch bei nicht-immunkompromittierten Individuen nachweisen lässt, wurden zusätzlich fünf Patienten einer kardiologischen Intensivstation zwischen Oktober und November 2018 im Rahmen dieser Studie rekrutiert. Diese Patienten erhielten routinemäßige VRE-Testungen bei der Aufnahme. Bei fünf zufällig ausgewählten Individuen (ICU-1 – ICU-5) wurden je zehn *VRE_{fm}* Isolate vom Selektivagar gewonnen und ebenfalls der Vollgenomsequenzierung zugeführt (n=30).

Interessanterweise dominierte bei 4 von 5 Patienten der *vanB*-*VRE_{fm}*, der dem Sequenztyp ST117 (2x CT71; CT 1686 und CT1473) zuzuordnen ist. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit weiteren kürzlich publizierten Daten für Deutschland (Werner *et al.*, 2020). Lediglich der Patient ICU-2 war kolonisiert mit *vanB*-*VRE_{fm}* mit dem Sequenztyp ST262 (CT1016). Ferner konnte für Patient ICU-1 eine zusätzliche Besiedelung mit dem *vanA*-*VRE_{fm}*-Isolat ST80 (CT3336) gezeigt werden.

Zusammenfassend ist die Heterogenität der VRE-Population bei Patienten einer kardiologischen Intensivstation im Vergleich zu hämatologischen Patienten einer Stammzelltransplantation eher gering. Hierbei zeigte sich bei allen 5 Patienten der Intensivstation ein identisches chromosomal kodiertes *vanB*-VRE-Element.

3.5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden VRE Populationen bei fünf Patienten eines Hochrisiko-Kollektivs für eine Enterokokken-Infektion untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine hohe Heterogenität für die VRE Population bei drei der fünf untersuchten Patienten vorlag und sich die Zusammensetzung der Population mit genetisch unterschiedlichen Isolaten signifikant über einen kurzen Zeitraum von 3 bis 4 Wochen änderte. Trotz vermehrter Anstrengungen und gesteigerter Hygienemaßnahmen in einem Hochrisikobereich wie einer Abteilung für Stammzelltransplantation deuten diese Daten auf sich wiederholende Transmissionen von VRE Stämmen im Rahmen einer Hospitalisierung hin und könnten als Erklärung für die sich rasch ändernde klonale Zusammensetzung der kolonialisierenden VRE Populationen dienen. Vor allem die Kolonialisierung mit VRE steht in einem direkten Zusammenhang mit dem vermehrten Gebrauch von Glykopeptid-Antibiotika (Renschmidt *et al.*, 2017; Banerjee *et al.*, 2015; Al-Nassir *et al.*, 2008).

Mit Hilfe von vergleichenden Genomanalysen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die *van*-Elemente von unterschiedlichen VRE_{fm}-Stämmen bei demselben Patienten identisch waren. Ein Grund für die Heterogenität der VRE Population könnte der horizontale Gentransfer von *van*-tragenden Plasmiden innerhalb des Darmtraktes zwischen VRE_{fm} und VSE_{fm} Stämmen sein. Diese Hypothese wird gestützt durch Beobachtungen einer kürzlich publizierten epidemiologischen Studie, die VRE Isolate zwischen 1986 und 2012 in 27 Staaten gesammelt hat. Hierbei konnten chimere *van*-kodierende Plasmide nachgewiesen werden, was auf eine stetige Konjugation und Rekombination dieser Elemente hindeutet (Freitas *et al.*, 2016). Bei kleineren VRE-Ausbruchereignissen konnte dieses für den horizontalen Gentransfer ebenfalls belegt werden (Zhou *et al.*, 2018). Die Beobachtung steht im Einklang mit den vorliegenden Daten, dass zumindest bei Hochrisikopatienten im Rahmen einer Stammzelltransplantation der horizontale Gentransfer grundlegend für die Weitergabe von *van*-Elementen verantwortlich ist. Es kommt dabei zur Ausbildung neuartiger VRE-Klone, die möglicherweise neue mikrobiellen Charakteristika aufweisen.

Zusätzlich zu den neuen Erkenntnissen zur Populationsdynamik bei VRE haben die vorliegenden Daten eine Bedeutung hinsichtlich der molekularen Überwachungsstrategien bei der Infektions- und Ausbruchskontrolle. Zur Bestimmung von VRE-Isotypen eines Patienten in einem potenziellen Ausbruchsgeschehen wird standardmäßig nur ein Einzelisolat pro Patient und korrespondierenden Zeitpunkt analysiert. In Hinblick auf die klonale Heterogenität von VRE Populationen eines enteral besiedelten Patienten an einem bestimmten Zeitpunkt und der dynamischen Zusammensetzung innerhalb eines kurzen Zeitraum, ist es somit durchaus möglich etwaige Ausbrüche durch zufällige falsche Auswahl einer Kolonie zu übersehen. Dies hätte schwerwiegende Folgen, da gerade in einem Hochrisikobereich die Kontrollmechanismen zur Überwachung von VRE-Ausbrüchen sensitiv und spezifisch genug sein müssen, um eine weitere Verbreitung schnellmöglich zu unterbinden und geeignete Maßnahmen einzuleiten.

Patienten, die eine allogene Stammzelltransplantation erhalten haben, sind im Rahmen der Aplasie per se durch eine ausgeprägte Einschränkung ihres Immunsystems gekennzeichnet. Daher ist es essentiell dieses Kollektiv mit prophylaktischen und therapeutischen Gaben mit Antibiotika vor potentiell tödlichen Infektionen zu schützen. Eine erfolgreiche Kolonisation mit VRE ist gerade bei diesen immunsupprimierten Patienten durch exogene Quellen möglich. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen (vor allem bei Betalaktamen, Quinolonen und Aminoglykosiden) die bakterielle SOS-Antwort induzieren kann. Diese bakterielle Anpassungsstrategie auf exone Stressoren führt zur Mobilisation von mobilen genetischen Elementen wie beispielsweise Transposons (Andersson *et al.*, 2014). Eine prophylaktische antiinfektive Therapie im Rahmen einer Neutropenie könnte also ihrerseits zu vermehrtem horizontalem Gentransfer und Rekombination zwischen *E. faecium* und dem jeweiligen individuellen Mikrobiom beitragen. Jedoch konnte der direkte Effekt einer antiinfektiven Behandlung auf den horizontalem Gentransfer bei Enterokokken bisher nicht experimentell nachgewiesen werden (Lopatkin *et al.*, 2016).

Die besondere Stellung von stammzelltransplantierten Patienten hinsichtlich der Populationsdynamik von VRE konnte im Vergleich mit fünf Patienten einer kardiologischen Intensivstation gezeigt werden. Bei diesen ebenfalls mit VRE kolonialisierten Patienten zeigte sich nur eine Besiedelung mit einem Sequenztypen. Lediglich ein Patient war mit einem weiteren klonalen Typen besiedelt.

Daher ist es durchaus möglich, dass die vermehrte therapeutische Verwendung von Antiinfektiva, sowie die dadurch bedingte Reduktion der kommensalen Darmflora, für eine

sich schnell entwickelnde VRE Populationsheterogenität verantwortlich ist. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass für die fünf Patienten der ITS jeweils nur zehn Kolonien pro Patient sequenziert wurden und somit Minderheiten unbemerkt bleiben könnten.

Eine weitere Limitation dieser Studie ist durch die Probensammlung zu erklären, die in der Zeit zwischen von 2014 – 2015 in Abteilung für Stammzelltransplantation erfolgte. Seit diesem Zeitraum hat sich die epidemiologische Zusammensetzung von VRE $_{fm}$ in Deutschland gewandelt. Im Gegensatz zu vielen anderen europäischen Ländern, in denen weiterhin ein prädominantes Auftreten von *vanA*-VRE $_{fm}$ zu verzeichnen ist, konnte für Deutschland eine signifikante Verlagerung zu *vanB*-VRE $_{fm}$ beobachtet werden (Werner *et al.*, 2012). Die vorherrschenden Sequenztypen, die durch das Deutsche Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken identifiziert wurden sind ST192, ST117 und ST17 (Bender *et al.*, 2016; Werner *et al.*, 2020). Daher ist nicht gänzlich auszuschließen, dass die hier beobachteten Veränderungen in den VRE $_{fm}$ -Populationen auf die 2014-2015 vorherrschenden klonalen Typen beschränkt sind. Wahrscheinlicher sind jedoch Populationen, die ein Plasmid-kodiertes *van*-Element aufweisen.

Trotz der hohen Anzahl von mehr als 250 sequenzierten Isolaten ist die Anzahl der beobachteten Patienten vergleichsweise gering. Für ein tiefer gehendes Verständnis der in dieser Studie beschriebenen Phänomene braucht es zukünftig weitere Studien in größerem Ansatz, um das genaue Ausmaß zwischen Umwelt, dem Individuum und den einwirkenden bakteriellen Faktoren zu verstehen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Dynamik der Übertragung von Vancomycin-Resistenzen sowohl vom epidemiologischen Umfeld als auch vom beobachteten Patientenkollektiv abhängt. Dabei spielt vor allem der horizontale Gentransfer eine bisher unterschätzte Rolle in der Epidemiologie von VRE.

Besondere Patientengruppen in Hochrisikobereichen müssen besonders sorgfältig in Hinblick auf ein mögliches Ausbruchsgeschehens überwacht werden. Aufgrund der Populationsheterogenität bei diesen Patienten ist es notwendig zur Ausbruchsüberwachung mehr als nur ein Einzelisolat zu analysieren.

4 Zusammenfassung deutsch

Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* sind von zunehmender klinischer Relevanz als humanpathogene Erreger vor allem im Rahmen nosokomialer Infektionen. Zur Ausbruchsdagnostik und Überwachung im stationären Bereich findet vor allem die Vollgenomsequenzierung zur Stammcharakterisierung und Typisierung Verwendung. Diese hoch sensitive Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der klonalen Zusammensetzung von enteralen VRE Populationen bei Hochrisikopatienten genutzt. Es wurden fünf Patienten einer Abteilung für Knochenmarktransplantation über einen Zeitraum von drei Wochen beobachtet. Dabei wurden zu jedem Zeitpunkt 14 Kolonien sequenziert und die Daten für das *core genome multi locus sequence typing* sowie zur Typisierung des *van*-Elementes genutzt. Es zeigte sich bei 3 der 5 Patienten eine klonale Diversität der VRE Populationen, die über den beobachteten Zeitraum mit einer dynamischen Veränderung einherging. Neben dem Auftauchen von neuen VRE Isolaten konnte gezeigt werden, dass genetisch nahezu identische *van*-tragende Plasmide in klonal unterschiedlichen Isolaten nachzuweisen waren. Diese - höchstwahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer ausgetauscht - tragen somit zu Populationsheterogenität innerhalb eines Individuums bei.

Zur Ausbruchsdagnostik wird standardmäßig jeweils ein Einzelklon eines kolonialisierten Patienten analysiert. Die vorliegenden Daten zeigten jedoch auch eine Unzulänglichkeit dieses Ansatzes, da die gezeigte Populationsheterogenität nicht ausreichend berücksichtigt wird und ein Ausbruchsgeschehen möglicherweise unerkannt bleibt.

5 Zusammenfassung englisch

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* are of increasing clinical relevance as human pathogens, especially in the context of nosocomial infections. Used for outbreak diagnosis and monitoring in the inpatient setting, whole genome sequencing is the main method for strain characterization and typing with high sensitivity. This method was used in this work to analyze the clonal composition of enteric VRE populations in high-risk patients. Five patients from a bone marrow transplant department were followed over a three-week period. This involved sequencing 14 colonies at each point in time and using the data for core genome multi locus sequence typing and *van*-element typing. Clonal diversity of VRE populations was evident in 3 out of 5 patients, with dynamic change over the observed period. In addition to the emergence of new VRE isolates, it was shown that nearly genetically identical *van*-bearing plasmids were detectable in clonally diverse isolates. These - most likely exchanged by horizontal gene transfer - thus contribute to population heterogeneity within an individual.

For outbreak diagnosis, a single clone of each colonized patient is analyzed. However, the present data demonstrated a shortcoming of this approach, as the population heterogeneity shown is not adequately accounted for during analysis and an outbreak event may thus go undetected.

6 Abkürzungsverzeichnis

BMT	engl. „bone marrow transplant“ – Knochenmarktransplantation
cgMLST	engl. „core genome multi-locus sequence typing“
CT	klonaler Typ / klonaler Komplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ITS	Intensivstation
ICU	engl. „intensive care unit“ - Intensivstation
MALDI-TOF	Matrix–assistierte Laser–Desorption–Ionisierung (MALDI) mit Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF)
NGS	engl. „next generation sequencing“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RKI	Robert-Koch-Institut
ST	Sequenztyp
Tn	Transposon
<i>vanA</i>	Genotyp der Vancomycin-Resistenz
<i>vanB</i>	Genotyp der Vancomycin-Resistenz
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VRE _{fm}	Vancomycin-resistente <i>E. faecium</i>
VSE	Vancomycin-sensible Enterokokken
WGS	engl. „whole genome sequencing“ – Vollgenomsequenzierung

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sequenzvergleiche *van*-Element tragender Plasmide

8 Literaturverzeichnis:

- Al-Nassir** WN, Sethi AK, Li Y, Pultz MJ, Riggs MM, Donskey CJ. Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jul;**52**(7):2403-6. doi: 10.1128/AAC.00090-08. Epub 2008 Apr 28. PMID: 18443120; PMCID: PMC2443881.
- Alikhan** NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*. 2011 Aug 8;**12**:402. doi: 10.1186/1471-2164-12-402. PMID: 21824423; PMCID: PMC3163573.
- Altschul** SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;**215**(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
- Andersson** DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jul;**12**(7):465-78. doi: 10.1038/nrmicro3270. Epub 2014 May 27. PMID: 24861036.
- Arias** CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Mar 16;**10**(4):266-78. doi: 10.1038/nrmicro2761. PMID: 22421879; PMCID: PMC3621121.
- Arthur** M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol*. 1993 Jan;**175**(1):117-27. doi: 10.1128/jb.175.1.117-127.1993. PMID: 8380148; PMCID: PMC196104.
- Austin** DJ, Bonten MJ, Weinstein RA, Slaughter S, Anderson RM. Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;**96**(12):6908-13. doi: 10.1073/pnas.96.12.6908. PMID: 10359812; PMCID: PMC22015.
- Ballard** SA, Pertile KK, Lim M, Johnson PD, Grayson ML. Molecular characterization of vanB elements in naturally occurring gut anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May;**49**(5):1688-94. doi: 10.1128/AAC.49.5.1688-1694.2005. PMID: 15855482; PMCID: PMC1087664.
- Banerjee** T, Anupurba S, Filgona J, Singh DK. Vancomycin-resistance Enterococcal Colonization in Hospitalized Patients in Relation to Antibiotic Usage in a Tertiary Care Hospital of North India. *J Lab Physicians*. 2015 Jul-Dec;**7**(2):108-11. doi: 10.4103/0974-2727.163123. PMID: 26417161; PMCID: PMC4559622.
- Bankevich** A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;**19**(5):455-77. doi: 10.1089/cmb.2012.0021. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22506599; PMCID: PMC3342519.
- Behnke** M, Hansen S, Leistner R, Diaz LA, Gropmann A, Sohr D, Gastmeier P, Piening B. Nosocomial infection and antibiotic use: a second national prevalence study in Germany. *Dtsch Arztebl Int*. 2013 Sep;**110**(38):627-33. doi: 10.3238/arztebl.2013.0627. Epub 2013 Sep 20. PMID: 24133543; PMCID: PMC3796357.
- Bender** JK, Kalmbach A, Fleige C, Klare I, Fuchs S, Werner G. Population structure and acquisition of the vanB resistance determinant in German clinical isolates of *Enterococcus faecium* ST192. *Sci Rep*. 2016 Feb 23;**6**:21847. doi: 10.1038/srep21847. PMID: 26902259; PMCID: PMC4763178.
- Blázquez** J, Rodríguez-Beltrán J, Matic I. Antibiotic-Induced Genetic Variation: How It Arises and How It Can Be Prevented. *Annu Rev Microbiol*. 2018 Sep 8;**72**:209-230. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062139. PMID: 30200850.
- Bolger** AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;**30**(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.

- Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA.** Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis.* 2001 Dec;**1**(5):314-25. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00145-1. PMID: 11871804.
- Both A, Huang J, Qi M, Lausmann C, Weißelberg S, Büttner H, Lezius S, Failla AV, Christner M, Stegger M, Gehrke T, Baig S, Citak M, Alawi M, Aepfelbacher M, Rohde H.** Distinct clonal lineages and within-host diversification shape invasive *Staphylococcus epidermidis* populations. *PLoS Pathog.* 2021 Feb 5;**17**(2):e1009304. doi: 10.1371/journal.ppat.1009304. PMID: 33544760; PMCID: PMC7891712.
- Brunke M, Werner G, Arvand M, Mielke M:** Treffen der Moderatoren der MRE-Netzwerke am RKI: Verbreitung, Krankheitslast, Therapieoptionen und Prävention von Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken. *Epid Bull* 2019;**27**:237 – 245. doi 10.25646/6198
- Courvalin P.** Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis.* 2006 Jan 1;**42** Suppl 1:S25-34. doi: 10.1086/491711. PMID: 16323116.
- de Been M, Pinholt M, Top J, Bletz S, Mellmann A, van Schaik W, Brouwer E, Rogers M, Kraat Y, Bonten M, Corander J, Westh H, Harmsen D, Willems RJ.** Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for High- Resolution Typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2015 Dec;**53**(12):3788-97. doi: 10.1128/JCM.01946-15. PMID: 26400782; PMCID: PMC4652124.
- 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.
- Fang H, Nord CE, Ullberg M.** Screening for vancomycin-resistant enterococci: results of a survey in Stockholm. *APMIS.* 2010 May;**118**(5):413-7. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02605.x. PMID: 20477819.
- Faron ML, Ledebner NA, Buchan BW.** Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant *Enterococcus* in the Health Care Setting. *J Clin Microbiol.* 2016 Oct;**54**(10):2436-47. doi: 10.1128/JCM.00211-16. Epub 2016 May 4. PMID: 27147728; PMCID: PMC5035425.
- Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Jensen LB, Novais C, Peixe L, Sánchez-Valenzuela A, Sundsfjord A, Hegstad K, Werner G, Sadowy E, Hammerum AM, Garcia-Migura L, Willems RJ, Baquero F, Coque TM.** Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanB* *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J Antimicrob Chemother.* 2016 Dec;**71**(12):3351-3366. doi: 10.1093/jac/dkw312. Epub 2016 Aug 15. PMID: 27530756.
- Garnier F, Taourit S, Glaser P, Courvalin P, Galimand M.** Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology (Reading).* 2000 Jun;**146** (Pt 6):1481-1489. doi: 10.1099/00221287-146-6-1481. PMID: 10846226.
- Haft DH, DiCuccio M, Badretdin A, Brover V, Chetvernin V, O'Neill K, Li W, Chitsaz F, Derbyshire MK, Gonzales NR, Gwadz M, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zheng C, Thibaud-Nissen F, Geer LY, Marchler-Bauer A, Pruitt KD.** RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;**46**(D1):D851-D860. doi: 10.1093/nar/gkx1068. PMID: 29112715; PMCID: PMC5753331.
- Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, Mellmann A, Goesmann A, von Haeseler A, Stoye J, Harmsen D.** Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol.* 2013 Apr;**31**(4):294-6. doi: 10.1038/nbt.2522. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2013 Dec;**31**(12):1148. PMID: 23563421.
- Li W, O'Neill KR, Haft DH, DiCuccio M, Chetvernin V, Badretdin A, Coulouris G, Chitsaz F, Derbyshire MK, Durkin AS, Gonzales NR, Gwadz M, Lanczycki CJ, Song JS, Thanki N, Wang J, Yamashita RA, Yang M, Zheng C, Marchler-Bauer A, Thibaud-Nissen F.** RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;**49**(D1):D1020-D1028. doi: 10.1093/nar/gkaa1105. PMID: 33270901; PMCID: PMC7779008.

- Lopatkin** AJ, Sysoeva TA, You L. Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: Analysis suggests a critical role of selection dynamics. *Bioessays*. 2016 Dec;**38**(12):1283-1292. doi: 10.1002/bies.201600133. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27699821; PMCID: PMC6541220.
- Ludwig** W, Schleifer K-H, Whitman WB. Family IV. *Enterococcaceae* fam. nov. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, K.-H. S, Whitman WB (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 3 (The *Firmicutes*), Springer, New York, 2009, p. 594.
- Murray** BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev*. 1990 Jan;**3**(1):46-65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46. PMID: 2404568; PMCID: PMC358140.
- Nijhuis** RHT, Chlebowicz-Fliss MA, Smilde AE, Rossen JWA, Weersink AJL, Gigengack-Baars ACM. Whole-genome sequencing analysis reveals the spread of a vanB-carrying transposon among different vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates in a non-endemic setting. *J Hosp Infect*. 2021 Apr;**110**:52-59. doi: 10.1016/j.jhin.2020.12.015. Epub 2021 Jan 5. PMID: 33412230.
- NRZ**, Deutsche Nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung. Abschlussbericht) 2016.
- Papadimitriou-Olivgeris** M, Drougka E, Fligou F, Kolonitsiou F, Liakopoulos A, Dodou V, Anastassiou ED, Petinaki E, Marangos M, Filos KS, Spiliopoulou I. Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients. *Infection*. 2014 Dec;**42**(6):1013-22. doi: 10.1007/s15010-014-0678-1. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25143193.
- Parte** AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020 Nov;**70**(11):5607-5612. doi: 10.1099/ijsem.0.004332. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32701423; PMCID: PMC7723251.
- Remschmidt** C, Behnke M, Kola A, Peña Diaz LA, Rohde AM, Gastmeier P, Schwab F. The effect of antibiotic use on prevalence of nosocomial vancomycin-resistant enterococci- an ecologic study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Sep 13;**6**:95. doi: 10.1186/s13756-017-0253-5. PMID: 28924472; PMCID: PMC5598045.
- Remschmidt** C, Schröder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Apr 24;**7**:54. doi: 10.1186/s13756-018-0353-x. PMID: 29760912; PMCID: PMC5937822.
- 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.
- Schleifer** KH, 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. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1984; **34**:31-34.
- The European Programme of Work**, 2020-2025: United Action for Better Health. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2021 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/339209>)
- Teixeira**, LM, Shewmaker PL, Carvalho MdGS, Facklam RR. Enterococcus, In: *Manual of Clinical Microbiology*, (Hg.), (10) 2011, American Society for Microbiology, 350–364.
- Ubeda** C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, Viale A, Succi ND, van den Brink MR, Kamboj M, Pamer EG. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*.

2010 Dec;**120**(12):4332-41. doi: 10.1172/JCI43918. Epub 2010 Nov 22. PMID: 21099116; PMCID: PMC2993598.

Vehreschild MJGT, Haverkamp M, Biehl LM, Lemmen S, Fätkenheuer G. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): a reason to isolate? *Infection*. 2019 Feb;**47**(1):7-11. doi: 10.1007/s15010-018-1202-9. Epub 2018 Sep 3. PMID: 30178076.

Werner G, Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Just HM, 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. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012 May 30;**1**(1):21. doi: 10.1186/2047-2994-1-21. PMID: 22958440; PMCID: PMC3533821.

Werner G, Neumann B, Weber RE, Kresken M, Wendt C, Bender JK; VRE study group. Thirty years of VRE in Germany - "expect the unexpected": The view from the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci. *Drug Resist Updat*. 2020 Dec;**53**:100732. doi: 10.1016/j.drug.2020.100732. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33189998.

WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.

Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*. 2017 Jun 8;**13**(6):e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595. PMID: 28594827; PMCID: PMC5481147.

Witte W, Wirth R, Klare I. Enterococci. *Chemotherapy*. 1999 Mar-Apr;**45**(2):135-45. doi: 10.1159/000007174. PMID: 10050060.

Zhou X, Chlebowicz MA, Bathoorn E, Rosema S, Couto N, Lokate M, Arends JP, Friedrich AW, Rossen JWA. Elucidating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks: the role of clonal spread and movement of mobile genetic elements. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Dec 1;**73**(12):3259-3267. doi: 10.1093/jac/dky349. PMID: 30219855.

9 Erklärung des Eigenanteils

Eigenanteil:

- Literaturrecherche und Auswertungen
- Probengewinnung der kardiologischen ITS Patienten
- Mikrobielle Analyse der Isolate
- Empfindlichkeitstestung - Epsilonometertest
- MALDI-TOF zur Speziesbestimmung
- Isolation der genomischen DNA
- Herstellung der Proben für das Illumina NGS
- Herstellung der Proben für das Nanopore NGS
- Mitarbeit am Manuskript

Anteil der Co-Autoren:

- Probengewinnung 2014 – 2015: Nadine Mirwald
- rtPCR *vanAB*: im Rahmen der Routinediagnostik
- Automatisierte Empfindlichkeitstestung: im Rahmen der Routinediagnostik
- Unterstützung bei der Genomanalyse von *VRE_{fm}*: Jan Hansen
- Statistische Analysen der ausgewerteten Sequenzierungsergebnisse: Anna Both, Jiabin Huang
- Phylogenetische Analyse: Anna Both, Jiabin Huang
- Analyse der *van*-Elemente: Anna Both, Jiabin Huang
- Erstellen des Manuskripts: Anna Both und Holger Rohde

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher bedanken in dessen Institut ich meine Doktorarbeit anfertigen durfte.

Mein größter Dank gebührt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Holger Rohde für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit und für das Überlassen eines äußerst interessanten Projektes.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Anna Both für die außerordentlich gute Anleitung beim Anfertigen dieser Arbeit und eine exzellente Einarbeitung in das Thema und die Methodik.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeiter:Innen des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene für die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft und für viele nette Kaffeepausen bedanken. Vielen herzlichen Dank an alle Kolleg:Innen der AG Rohde für die wahnsinnig nette Aufnahme und stets produktive Atmosphäre im Laboralltag. Danke Andi, Paul, Dr. Samira, Henning und Anna.

Mein Dank gilt allen Co-Autoren der Originalpublikation, die diese Dissertation so erst ermöglicht haben.

Ich danke dem Team der Routinediagnostik, ganz besonders Svenja Reucher für das unkomplizierte Durchführen der realtime PCRs.

Vielen Dank an Jens und Christopher für das Korrekturlesen dieser Dissertation.

Mein tief empfundener Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützen und mir immer Rückhalt geben. Ich danke ganz Besonders Dir Johanna.

11 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12 Publikationsliste

- 1) Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions.
Grüning C, Heiber A, **Kruse F**, Ungefehr J, Gilberger TW, Spielmann T.
Nat Commun. 2011
(Co-Autor)
- 2) Uncovering common principles in protein export of malaria parasites.
Grüning C, Heiber A, **Kruse F**, Flemming S, Franci G, Colombo SF, Fasana E, Schoeler H, Borgese N, Stunnenberg HG, Przyborski JM, Gilberger TW, Spielmann T.
Cell Host Microbe. 2012
(Co-Autor)
- 3) Identification of New PNEPs Indicates a Substantial Non-PEXEL Exportome and Underpins Common Features in *Plasmodium falciparum* Protein Export
Heiber A, **Kruse F**, Pick C, Grüning C, Flemming S, Oberli A, Schoeler H, Retzlaff S, Mesén Ramírez P, Hiss J A, Kadekoppala M, Hecht L, Holder AA, Gilberger TW, Spielmann T
Plos Pathogens. 2013
(Co-Autor)
- 4) Population dynamics in colonizing vancomycin-resistant *E. facium* isolated from immunosuppressed patients
Kruse F*, Both A*, Mirwald N, Franke G, Christner M, Huang J, Hansen JL, Kröger N, Berneking L, Lellek H, Aepfelbacher M, Rohde H
Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2022
(* geteilte Erstautorenschaft)

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende 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.

Hamburg im März 2022