

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrums für Diagnostische Medizin,
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Untersuchung zur Daptomycinresistenz bei *Enterococcus faecium*-Isolaten von Patienten nach Stammzelltransplantation

Dissertation

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

vorgelegt von:

Carolin Ruckert geb. Werner
aus Hannover

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.04.2015**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Hentschke

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Enterococcus</i>	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Eigenschaften	1
1.1.3	Vorkommen von Enterokokken	2
1.2	Enterokokken als Verursacher von Infektionen beim Menschen	3
1.2.1	Allgemeine Epidemiologie von Enterokokkeninfektionen	3
1.2.2	VRE-Infektionen bei Patienten nach Stammzelltransplantation	6
1.3	Molekulargenetik von Enterokokken	10
1.3.1	Molekulare Klassifizierung Vancomycin-resistenter Enterokokken	10
1.3.2	Klonale Struktur von VRE-Populationen	11
1.3.2.1	Zuordnung zu Sequenztypen	11
1.3.2.2	Typisierung bei Ausbruchsfragestellungen	14
1.4	Antibiotikaempfindlichkeit von Enterokokken	17
1.4.1	Natürliche Resistenzen bei Enterokokken	17
1.4.2	Erworbene Resistenzen bei Enterokokken	17
1.4.3	Therapie von Enterokokkeninfektionen	19
1.5	Daptomycin	20
1.5.1	Allgemeines	20
1.5.2	Daptomycin zur Behandlung von Enterokokkeninfektionen	20
1.5.3	Epidemiologie und Mechanismen von Sensibilitätsabnahmen gegenüber Daptomycin bei grampositiven Erregern	22
1.6	Ziel der Arbeit	27
2.	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Geräte	28
2.1.2	Chemikalien	29
2.1.3	Medien	30
2.1.4	Reagenzien und Enzyme	30
2.1.5	Lösungen	31
2.1.6	Primer	33
2.1.7	Isolate	33
2.2	Methoden	35
2.2.1	Allgemein mikrobiologische Methoden	35
2.2.1.1	Anzucht von Bakterien	35
2.2.1.2	Empfindlichkeitsprüfung	35
2.2.2	Molekulare Methoden	36
2.2.2.1	Pulsfeldgelelektrophorese	36
2.2.2.1.1	Anzucht der Kulturen	37
2.2.2.1.2	Herstellung von Agaroseblöcken	37
2.2.2.1.3	Lyse I	38
2.2.2.1.4	Lyse II	38
2.2.2.1.5	Waschen	38

2.2.2.1.6	DNA-Spaltung mittels <i>Sma</i> I	38
2.2.2.1.7	Elektrophorese	38
2.2.2.2	Extraktion chromosomaler DNA	39
2.2.2.3	Polymerasekettenreaktion	40
2.2.2.3.1	<i>vanA</i> -, <i>vanB</i> -PCR	41
2.2.2.3.2	PCR zum Nachweis der Gene <i>liaF</i> , <i>liaR</i> , <i>liaS</i>	42
2.2.2.4	Agarosegelelektrophorese	42
3.	Ergebnisse	44
3.1	Allgemeine Beschreibung der analysierten <i>E. faecium</i> -Population	44
3.2	Analyse der Populationsstruktur der <i>E. faecium</i> -Stammsammlung	45
3.2.1	Prävalenz von <i>vanA</i> und <i>vanB</i> bei Vancomycin-resistenten <i>E. faecium</i> von KMT-Patienten	45
3.2.2	Beschreibung der PFGE-Muster der Erstisolate von unterschiedlichen Patienten	46
3.2.3	Beschreibung der Daptomycin-MHK-Verteilung bei VRE-Erstisolaten	47
3.2.4	Darstellung von <i>van</i> -Genotyp und Daptomycin-MHK	48
3.3	Analyse von VRE-Folgeisolaten	51
3.3.1	Beschreibung der Klonalität von Verlaufsisolaten bei Vorliegen von n=2 Isolaten des Patienten	51
3.3.2	Beschreibung der Klonalität von Verlaufsisolaten bei Vorliegen von n>2 Isolaten des Patienten	53
3.3.3	Beschreibung der Daptomycin-MHK im Verlauf	54
3.4	Nachweis der Gene <i>liaF</i> , <i>liaS</i> und <i>liaR</i>	59
3.5	Sequenzanalyse von <i>liaSFR</i> und <i>cls</i>	60
4.	Diskussion	62
5.	Zusammenfassung	76
6.	Abkürzungsverzeichnis	77
7.	Literaturverzeichnis	80
8.	Anhang	98
8.1	<i>E. faecium</i> -Isolate	98
8.2	Übersicht der Ergebnisse	101
8.3	Zusammenfassende Darstellung von Verläufen	103
8.4	Tabellenverzeichnis	113
8.5	Abbildungsverzeichnis	115
9.	Danksagung	116
10.	Lebenslauf	117
11.	Eidesstattliche Erklärung	118

1. Einleitung

1.1 Die Gattung *Enterococcus*

1.1.1 Taxonomie

Die Gattungen *Enterococcus* wird der Familie der *Enterococcaceae* zugeordnet, der auch die Gattungen *Melissococcus*, *Tetragenococcus* und *Vagococcus* angehören (Ludwig *et al.* 2009). Enterokokken wurden bereits 1899 durch Thiercelin beschrieben (Thiercelin 1899). 1903 erhielten zwar die Gattung *Enterococcus* und die zugehörige Spezies *Enterococcus proteiformis* ihren Namen, sie zählte aber vorerst noch zu den Gruppe D Streptokokken (Thiercelin und Jouhaud 1903, Teixeira *et al.* 2007). 1906 erfolgte anhand morphologischer Eigenschaften die Einteilung und Namengebung einiger Streptokokkenpezies, darunter *Streptococcus faecalis* (Andrewes und Horder 1906). Vergleiche der 16S rRNA zeigten später, dass es sich bei diesen vermeintlichen Streptokokken aber um eine eigenständige Gattung handelte, die näher verwandt mit *Vagococcus*, *Tetragenococcus* und *Carnobacterium* als mit dem Genus *Streptococcus* war (Teixeira *et al.* 2007). 1984 forderten Schleifer und Kilpper-Bälz daher die Zuordnung von *Streptococcus faecalis* und *faecium* zum Genus *Enterococcus* und die Umbenennung in *Enterococcus faecalis* beziehungsweise *faecium* (Schleifer und Kilpper-Bälz 1984). Die Gattung *Enterococcus* wurde infolgedessen neu definiert. Die heutige Gattung *Enterococcus* besteht aus der damaligen Gattung *Enterococcus* und den später umbenannten sogenannten Fäkalstreptokokken (Teixeira *et al.* 2007). Ihr gehören derzeit 46 Spezies an, mit den bekanntesten Vertretern *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* und *E. gallinarum* (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 2013).

1.1.2 Eigenschaften

Enterokokken sind grampositive Kokken, die sich Katalase negativ verhalten und sich entweder als einzelne, pärchenförmige oder als kurze Ketten anordnen. Nach vierundzwanzigstündiger Bebrütung auf Blutagarmedium haben die Kolonien in der Regel einen Durchmesser von ein bis zwei Millimetern. Die zugehörigen Spezies zeigen auf Blutagarplatten eine α -, β - oder

keine Hämolyse. Ungefähr ein Drittel der *Enterococcus faecalis* erzeugen eine β -Hämolyse (Teixeira *et al.* 2007). Enterokokken sind fakultativ anaerob. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 35-37 °C. Vermehrung kann aber auch noch bei 10 °C oder 45 °C möglich sein (Ludwig *et al.* 2009). Enterokokken wandeln, ohne Gasproduktion, Glukose in Milchsäure um. Die meisten Spezies weisen Resistenzen gegenüber hohen NaCl-Konzentrationen bis 6,5 % auf, sind Cytochromoxydase negativ, hydrolysieren Aesculin in der Gegenwart von Gallensalzen, produzieren Leucin Aminopeptidase bei der Hydrolyse von Leucin- β -Naphthylamid und bilden Pyrrolidonyl Arylamidase bei der Hydrolyse von L-Pyrrolidonyl- β -Naphthylamid. In der Regel sind Enterokokken unbeweglich. Einige Spezies, wie *E. casseliflavus* und *E. gallinarum* sind hingegen motil. Eine Fähigkeit zur Pigmentbildung besitzen *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens* und *E. sulfureus* (Teixeira *et al.* 2007).

1.1.3 Vorkommen von Enterokokken

Enterokokken sind in der Natur weit verbreitet und kommen unter anderem auf Pflanzen, in der Nahrung, im Wasser, bei Tieren und bei Menschen vor. Im Säugerorganismus sind sie bevorzugt im Gastrointestinaltrakt aufzufinden und bilden hier die überwiegende Anzahl der vorhandenen grampositiven Kokken. Daher zählen sie auch zu den Indikatorerregern bei der Qualitätskontrolle von Lebensmitteln und von Trinkwasser (Teixeira *et al.* 2007). Beim Menschen gehören Enterokokken zur physiologischen Darmflora. Sie können auch transient im oropharyngealen oder vaginalen Bereich und auch auf der Haut nachgewiesen werden (Reinert und Lütticken 2004). *E. faecalis* und *E. faecium* sind die beim Menschen am häufigsten vorkommenden Enterokokken (Maiwald 2012). Andere Spezies, wie zum Beispiel *E. casseliflavus*, *E. durans* oder *E. gallinarum*, werden seltener nachgewiesen (Teixeira *et al.* 2007). Einige Enterokokken kommen bevorzugt bei bestimmten Wirten vor, zum Beispiel *E. gallinarum* bei Hühnern (Maiwald 2012).

1.2 Enterokokken als Verursacher von Infektionen beim Menschen

1.2.1 Allgemeine Epidemiologie von Enterokokkeninfektionen

Enterokokken zählen zu den opportunistischen Erregern. Infektionen betreffen vorwiegend ältere, immunsupprimierte oder lange hospitalisierte, antimikrobiell vorbehandelte Patienten (Teixeira *et al.* 2007, Song *et al.* 2009). Enterokokken zählen mittlerweile zu den dritt- bis vierthäufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen in Deutschland (Klare *et al.* 2011). Auch in anderen Ländern, unter anderem den USA, spielen Enterokokken eine zunehmende Rolle im nosokomialen Bereich (Ramaswamy *et al.* 2013). 1998 betrug der Anteil der *E. faecium*-Isolate bezogen auf alle untersuchten Enterokokkenisolate in Krankenhäusern Mitteleuropas 9,3 %. Dieser Wert stieg im Jahr 2001 auf 15,7 %, 2004 betrug der Anteil bereits 24,4 %, stieg 2007 auf 33,9 % und erreichte 41,4 % im Jahr 2010 (Klare *et al.* 2012b). Die größte klinische Relevanz unter den Enterokokken besitzen *E. faecalis*, verantwortlich für 70-90 %, und *E. faecium*, verantwortlich für 5-30 % der Enterokokkeninfektionen, wobei dieses Verhältnis regionale Unterschiede zeigen kann und in einigen Kliniken der Anteil der *E. faecium* bis zu 40 % beträgt (Klare *et al.* 2011, Robert Koch-Institut 2013). Andere Enterokokkenspezies werden in entsprechend geringerer Häufigkeit nachgewiesen (Maiwald 2012). Aufgrund ihres verbreiteten Vorkommens, vor allem im Gastrointestinaltrakt, können endogene Infektionen begünstigt werden. Im Rahmen von Schmier- oder Kontaktinfektionen kann der Erreger von Mensch zu Mensch übertragen werden. Dies hat besondere Relevanz bei Enterokokken mit Antibiotikaresistenzen, da durch eine Übertragung das Risiko der Verbreitung von Resistenzen besteht (Tacconelli und Cataldo 2008, Maiwald 2012).

Unter den antibiotikaresistenten Enterokokken spielen Stämme mit Unempfindlichkeit gegenüber den Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin bisher die größte klinische Rolle. Das Vorkommen von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) wurde 1988 erstmals in Europa und 1989 in den USA beschrieben. In Europa vermutete man die Gabe von Avoparcin an lebensmittelliefernde Tiere als Ursache für die Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken in der Bevölkerung. Insbesondere der

Kontakt zu tierischen Exkrementen und Lebensmitteln tierischen Ursprungs schien dies zu begünstigen. Durch das Reservoir an VRE-Trägern, die durch Kontakt zu anderen Personen den Erreger verbreiteten, konnten VRE vermutlich in den hospitalen Bereich gelangen (Leclercq *et al.* 1988, Uttley *et al.* 1988, McDonald *et al.* 1997, Muto *et al.* 2003, Yu *et al.* 2003). In Europa erhärtete sich der Verdacht, dass der Einsatz von Avoparcin Einfluss auf die Verbreitung von VRE gehabt hatte (McDonald *et al.* 1997). 1996 wurde dem Antibiotikum die Zulassung als Leistungsförderer für Tiere entzogen, da man durch die Förderung von Glykopeptidresistenzen eine Einschränkung in den Therapiemöglichkeiten in der Humanmedizin befürchtete (Bundesinstitut für Risikobewertung 1996, Willems *et al.* 1999, Lebreton *et al.* 2013, Rice 2013). In den USA dokumentierte man im Jahr 1989 erstmals das Vorkommen von VRE. Von Januar 1989 bis März 1993 nahm die Zahl der Enterokokken, die mit nosokomialen Infektionen in Verbindung gebracht wurden und sich resistent gegenüber Vancomycin zeigten, zu (Centers for Disease Control and Prevention 1993, McDonald *et al.* 1997). Die nosokomiale Prävalenz stieg in den USA von 0,3 % im Jahr 1989 auf 7,9 % im Jahr 1993 (Coque *et al.* 1996). Eine Untersuchung an 304 Personen außerhalb des Krankenhaussettings zeigte hingegen keine Besiedlung mit VRE. Dies legte die Vermutung nahe, dass in der gesunden Bevölkerung der USA, anders als in Europa, keine VRE verbreitet waren. Als Grund hierfür vermutete man das Verbot von Avoparcin für den Gebrauch beim Tier in den USA. Als Ursache für die Verbreitung von VRE im hospitalen Bereich machte man in den USA die orale Gabe von Vancomycin zur Therapie einer *Clostridium difficile* Diarrhoe verantwortlich, da VRE hierdurch einen Selektionsvorteil erhielten und sich so vermehren konnten. Auch andere Antibiotika, insbesondere Metronidazol oder Cephalosporine standen im Verdacht, eine Selektion von VRE zu fördern (McDonald *et al.* 1997, Willems *et al.* 1999, Rice 2013).

In Europa nahm die Prävalenz von VRE trotz des Verbots von Avoparcin im Laufe der Jahre zu. In einer europäischen Studie aus dem Jahr 1997 wiesen 2,9 % der klinischen *E. faecium*-Isolate eine Resistenz gegenüber Vancomycin auf (Schouten *et al.* 1999). In Deutschland bestätigten Studien die Relevanz von VRE im klinischen Bereich. Von 78 im Jahr 1998 im Rahmen einer

multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft „Resistenz“ der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. untersuchten *E. faecium*-Isolaten zeigten 5,1 % eine Resistenz gegenüber Vancomycin (Kresken *et al.* 2000). Eine 1999 in Berlin durchgeführte Studie analysierte die Prävalenz einer VRE-Besiedlung in verschiedenen Personengruppen. Es zeigte sich, dass die Prävalenz einer VRE-Kolonisierung bei Studenten mit 0,9 %, über ambulante Patienten mit 4,2 % und hospitalisierte Patienten mit 1,8 % bis zu intensivpflichtigen Patienten mit 16,3 % anstieg. Als begünstigende Faktoren für eine VRE-Besiedlung stellten sich Faktoren wie Unterbringung in einer Universitätsklinik oder ein Alter über 60 Jahre heraus (Wendt *et al.* 1999). Eine in der Zeit von Januar 2000 bis Dezember 2002 erhobene Studie wies bei 4,8 % von 628 analysierte *E. faecium*-Isolaten aus deutschen Intensivstationen eine Resistenz gegenüber Vancomycin nach (Jones *et al.* 2004). 2012 betrug in Deutschland der Anteil der invasiven *E. faecium*-Isolate, die eine Resistenz gegenüber Vancomycin besaßen 10 % oder mehr (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network 2012).

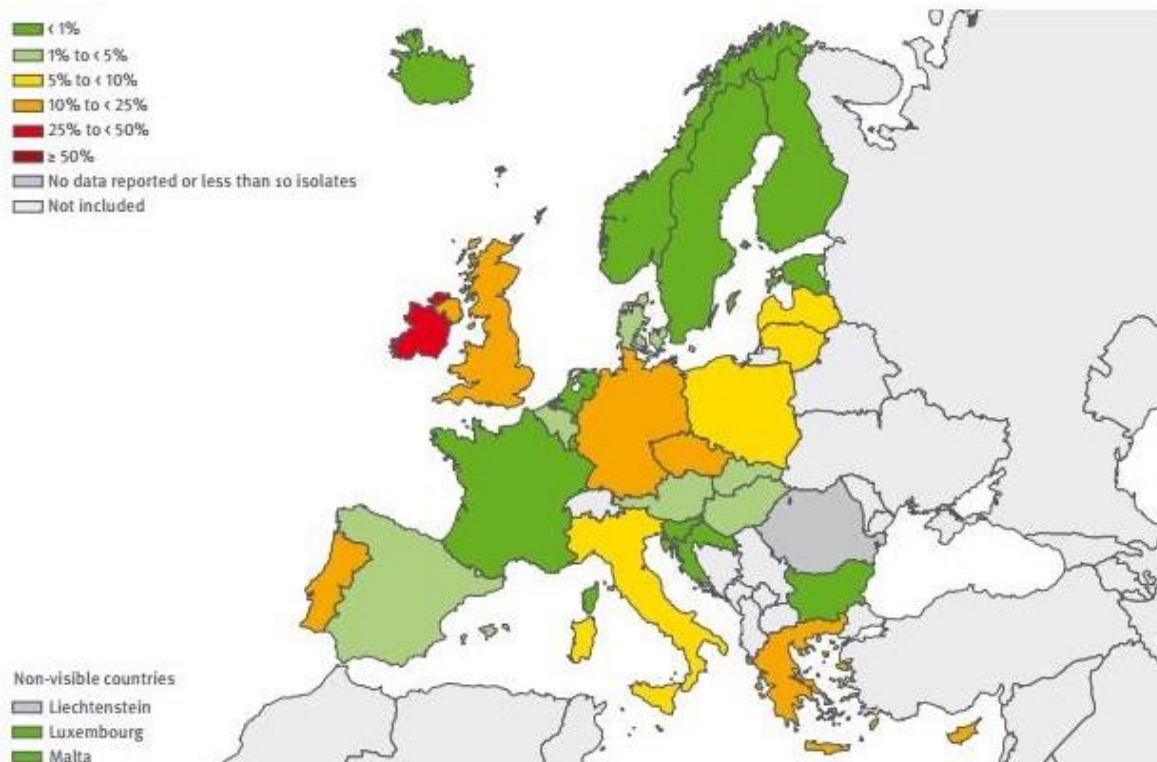


Abb. 1: Anzahl (in Prozent) der invasiven *Enterococcus faecium* Isolate mit Resistenz gegenüber Vancomycin in verschiedenen Europäischen Ländern im Jahr 2012 (EARS-Net 2012)

Die Prävalenz der Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten in Deutschland wurde im Jahr 2013 mit 8-11 % angegeben. Meistens handelte es sich hierbei um Kolonisationen ohne Infektion (Mutters *et al.* 2013). Auch wenn eine Kolonisation weitaus häufiger auftritt als eine Infektion, sind VRE unter den Erregern, die nosokomiale Infektionen auslösen, an zweit- bis dritthäufigster Stelle. Vor allem bei Katheter-assoziierten Harnwegsinfektionen oder Bakteriämien spielen sie eine Rolle. Bei Harnwegsinfektionen werden in ca. 4 % der Blasenpunktionen Enterokokken (unabhängig von ihrer Vancomycinempfindlichkeit) nachgewiesen (Reinert und Lütticken 2004). Als Endokarditiserreger sind Enterokokken in etwa 5-15 % der Fälle beteiligt (Maiwald 2012). Analysen des Referenzzentrums in Wernigerode aus den Jahren 2010 und 2011 zeigten die Häufigkeit, mit der VRE-Isolate in einzelnen klinischen Settings nachgewiesen werden. 2010 wurden 144 *vanA*-Isolate bzw. 146 *vanB*-Isolate und 2011 398 *vanA*-Isolate bzw. 302 *vanB*-Isolate eingesendet. Bezogen auf alle VRE-Isolate aus dem Jahr 2011 wurden auf Intensivstationen der Allgemeinchirurgie 16,83 % der *vanA*- und 26,16 % der *vanB*-, auf internistischen Intensivstationen 14,32 % der *vanA*- und 9,93 % der *vanB*-, auf internistischen Stationen 14,07 % der *vanA*- und 14,24 % der *vanB*- und in der Hämatologie und Onkologie 6,03 % der *vanA*- und 8,28 % der *vanB*-VRE nachgewiesen. Bezogen auf die Herkunft aller VRE-Isolate fanden sich 2011 bei Proben aus Mittelstrahlurin 22,11 % der *vanA*- und 19,87 % der *vanB*-, aus Katheterurin 9,05 % der *vanA*- und 6,95 % der *vanB*-, aus Wundabstrichen 11,81 % der *vanA*- und 12,25 % der *vanB*-, aus Blutkulturen 5,03 % der *vanA*- und 5,96 % der *vanB*- und aus Stuhl oder Rektalabstrichen 29,90 % der *vanA*- und 22,84 % der *vanB*-VRE (Klare *et al.* 2012b).

1.2.2 VRE-Infektionen bei Patienten nach Stammzelltransplantation

Die Häufigkeit des Auftretens von Enterokokkenbesiedlungen sind von der Art des Krankenhauses, seinen klinischen Disziplinen, dem jeweiligen Patientengut und dem in den Klinikabteilungen herrschenden Antibiotikadruck abhängig (Klare *et al.* 2012b). Der Nachweis einer Kolonisation mit VRE gilt als prädisponierender Faktor für eine Infektion durch diese Erreger. Bei bestimmten Patientenkollektiven, insbesondere mit Erkrankungen mit begleitender

Immunsuppression, ist das Risiko, an einer VRE-Infektion zu erkranken, signifikant erhöht. Als Hauptrisikokollektiv zählen Patienten von Hämatologisch-Onkologischen-, Lebertransplantations-, Dialyse- und Intensivstationen (Zaas *et al.* 2002, Matar *et al.* 2006, Zirakzadeh und Patel 2006, Bossaer *et al.* 2010, Meyer *et al.* 2013, Mutters *et al.* 2013, Gastmeier *et al.* 2014). Als hochvulnerable Patienten gelten solche nach Stammzelltransplantation, bei denen es auch zu septischen Verläufen kommen kann (Ubeda *et al.* 2010, Liss *et al.* 2012). Die Hauptursache für den Tod nach Knochenmarktransplantation ist bei autologer HSCT (*hematopoietic stem cell transplantation*) zu 73 % und bei allogener HSCT zu 33-42 % ein Rezidiv der Grunderkrankung. Neben Abstoßungsreaktionen, unerwünschten Medikamentenwirkungen und Transplantationsversagen werden Infektionen zu 16-19 % nach allogener und zu 6 % nach autologer Transplantation als Todesursache angenommen. Es besteht darüber hinaus der Verdacht, dass Fieberepisoden in diesem Kollektiv zu 50-60 % durch bakteriell bedingte Infektionen bedingt sind. In einer Studie mit 30 neutropenischen Patienten mit Fieber wurden 6,7 % der Bakteriämien auf VRE zurückgeführt. Eine weitere Studie zeigte, dass es bei ungefähr einem Drittel der immunsupprimierten Patienten, die mit VRE besiedelt waren, im Verlauf zu einer Sepsis kommt. Bei stammzelltransplantierten Patienten steigern Infektionen mit bakteriellen Erregern somit in erheblichem Maße die Mortalität. Die erhöhte Infektionsgefahr resultiert vor allem aus der immunsuppressiven Therapie. Eine Neutropenie stellt in diesem Zusammenhang einen signifikanten Risikofaktor für eine Infektion mit VRE dar. Die permanente sowie die transiente gastrointestinale und orale Flora wird hierdurch zu einer potentiellen Infektionsquelle. Es wird auch angenommen, dass durch einen zunehmenden Einsatz von Antibiotika, insbesondere solcher mit Enterokokkenlücke, eine selektive Anreicherung von Enterokokken gefördert wird. Auch eine Veränderung der Darmflora kann möglicherweise zu einer steigenden bakteriellen Last mit diesen Erregern im Organismus des Patienten führen. Der Nachweis einer Resistenz gegenüber Vancomycin bedeutet einen weiteren unabhängigen Risikofaktor. Letzteres verdeutlichen Studien, die nachwiesen, dass die Resistenz von Enterokokken gegenüber Vancomycin mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist (Frère *et al.* 2002,

Sepkowitz 2002, DiazGranados und Jernigan 2005a, DiazGranados *et al.* 2005b, Worth *et al.* 2007, Magauran und Salgado 2011, Klare *et al.* 2012b, Gedik *et al.* 2013, Robert Koch-Institut 2013, Zhang *et al.* 2013).

Bei mit VRE kolonisierten Patienten von Stationen der Hämatologie-Onkologie sollten daher strenge hygienische Maßnahmen beachtet werden und eine entsprechende organisatorische oder räumliche Isolierung erfolgen, um das Übertragungs- und Ausbruchsrisiko von resistenten Erregern zu minimieren. Der Nutzen eines generellen Screenings auf VRE von Hochrisikokollektiven hängt dabei von der lokalen Prävalenz des jeweiligen Krankenhauses ab. Ein VRE-Screening und Identifikation von VRE-kolonisierten Patienten gilt als eine Möglichkeit, schwere Verläufe von VRE-Infektionen, durch frühzeitigen Einsatz VRE-aktiver Substanzen in der Eskalationstherapie bei Fieber in der Neutropenie, zu verhindern. Die Centers for Disease Control and Prevention sprachen sich für ein Screening auf eine mögliche VRE-Kolonisation von Stammzelltransplantationsempfänger und möglichen Kandidaten aus. Da der Intestinaltrakt Hauptreservoir von Vancomycin-resistenten Enterokokken ist, eignen sich rektale Abstrichtupfer als Probe. Blutkulturen oder andere Materialien kommen je nach klinischer Situation ebenfalls in Frage. (Centers for Disease Control and Prevention 2000, Tacconelli *et al.* 2004, Mutters *et al.* 2013).

Präventive Antibiotikastrategien können die Mortalität von Patienten der Hämatologie-Onkologie verringern. Dieses Vorgehen birgt aber das Risiko, dass sich im Rahmen einer ungezielten prophylaktischen Antibiotikagabe resistente Erreger wie VRE gegenüber der empfindlichen kommensalen Flora durchsetzen und expandieren. In der Folge dieser Dynamik kann es dann zu endogenen Infektionen mit diesen Erregern kommen (Sepkowitz 2002). Bei Nachweis von VRE kann eine Antibiotikaphylaxe nicht mehr mit Vancomycin erfolgen. Darüber hinaus wird es nicht für die empirische Antibiotikatherapie bei Fieber und Neutropenie empfohlen. Es wurden kontroverse Diskussionen über den Einsatz möglicher Antibiotikaregime zur Prophylaxe von Infektionen bei HSCT-Patienten geführt. Letztendlich sollten Prophylaxe und Therapie der individuellen Situation angepasst werden. Für spezielle empirische Antibiotikagaben bei Patienten mit hohem Infektionsrisiko durch VRE, wie

neutropenische Personen entsprechender Krankenhauseinheiten, werden Regime mit Linezolid oder Daptomycin eingesetzt. Synergistische Effekte konnten bei Kombinationen von Daptomycin mit Rifampicin beobachtet werden. Hierbei erleichtert Daptomycin das Eindringen von Rifampicin durch die Bakterienzellwand. Derzeit zählt das Lipopeptidantibiotikum Daptomycin alleine oder in Kombination verabreicht zu einem Mittel der Wahl in Antibiotikaregimen gegen VRE bei stammzelltransplantierten Patienten Hämatologisch-Onkologischer Stationen (Frère *et al.* 2002, Freifeld *et al.* 2011, Chitnis *et al.* 2013, Pankey und Ashcraft 2013, Wu *et al.* 2013).

1.3 Molekulargenetik von Enterokokken

1.3.1 Molekulare Klassifizierung Vancomycin-resistenter Enterokokken

Vancomycin-resistenten Enterokokken zeigen verschiedene phänotypische und genotypische Eigenschaften. Die einzelnen Enterokokkenspezies lassen sich anhand ihrer nachweisbaren Gene verschiedenen *van*-Typen zuordnen, die wiederum phänotypische Besonderheiten aufweisen. So zeigt der *vanA*-Typ in der Regel hohe Resistenzlevel gegenüber Vancomycin und Teicoplanin (Teixeira *et al.* 2007). *VanA*-Typen kommen unter anderem bei *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* und *E. gallinarum* vor. *VanB*-Typen zeigen sich für gewöhnlich sensibel bis resistent gegenüber Vancomycin und sensibel gegenüber Teicoplanin. Sie kommen bei *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* und *E. gallinarum* vor. Die *vanC*-, *vanD*-, *vanE*- und *vanG*-Typen weisen geringe bis hohe Resistenzen gegenüber Vancomycin auf. Bei dem *vanD*-Typ zeigt sich auch Resistenz gegenüber Teicoplanin. *vanC*-Typen finden sich bei *E. gallinarum* und *E. casseliflavus*, *vanD*-Typen bei *E. faecium*, *E. faecalis* und *E. raffinosus*. *VanE*- und *vanG*- kommen bei *E. faecalis* vor. Medizinisch relevant sind zurzeit die Typen *vanA* und *vanB*, deren Unempfindlichkeit durch die Gabe von Vancomycin und bei *vanA* auch durch Teicoplanin induziert wird. Die *in vitro* gemessenen minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für Vancomycin liegen bei *vanA*-Stämmen in der Regel höher (MHK_{Vancomycin}: 16-1000 µg/ml) als bei *vanB*-Stämmen (MHK_{Vancomycin}: 4-32 µg/ml, selten bis 1000 µg/ml) (Werner *et al.* 2008b). Resistenzen gegenüber Glykopeptiden wie dem Vancomycin resultieren bei Enterokokken durch Veränderungen in der Zellwand und einer hiermit einhergehenden verminderten Bindungsaffinität gegenüber dem Antibiotikum. Es kommt zu einem Austausch von Peptidoglykanvorstufen. Anstelle von D-Alanyl-D-Alanin am Ende einer Vorstufe, weisen die resistenten Stämme D-Alanyl-D-Lactat oder D-Alanyl-D-Serin auf. Dem Antibiotikum fehlt dann eine geeignete Bindungsstelle, so dass es seine Funktion nicht mehr ausüben kann (Murray und Nannini 2007). Dieser Resistenzmechanismus ist je nach *van*-Typ chromosomal oder auf Plasmiden kodiert. Da sich die plasmidkodierten Resistenzmechanismen auf sogenannten mobilen Elementen befinden, können sie zwischen verschiedenen Isolaten übertragen werden, was die Verbreitung von Resistenzeigenschaften fördert. Das *vanA*-Gen kann zwar

chromosomal kodiert sein, befindet sich aber in den meisten Fällen auf Plasmiden auf dem mobilen Element Tn1546. Das *vanB*-Gen ist häufiger chromosomal und seltener plasmidkodiert auf dem Transposon Tn154, Tn1549 oder Tn5382 nachzuweisen. Die Gene *vanC*, *vanD*, *vanE* und *vanG* sind chromosomal kodiert (Yu *et al.* 2003, Werner *et al.* 2008b).

Tabelle 1: Übersicht der Eigenschaften von *van*-Typen bei Enterokokken in Anlehnung an Werner *et al.* 2008b

Phänotyp	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>
Resistenz	Erworben	Erworben	Natürlich	Erworben	Erworben	Erworben
MHK _{Vancomycin} (µg/ml)	16-1000	4-32	2-32	64-128	8-32	16
MHK _{Teicoplanin} (µg/ml)	4-512	0,5-1	0,5-1	0,25-64	0,5	0,5
Lokalisation	Plasmid/ Chromosom	Plasmid/ Chromosom	Chromosom	Chromosom	Chromosom	Chromosom
Mobiles Element	Tn1546	Tn1547, Tn1549, Tn5382	(?)	(?)	(?)	(?)
Ligase-Gen	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>
Ligase- Produkt	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Enterokok- kenspezies	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseli- flavus</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseli- flavus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>

1.3.2 Klonale Struktur von VRE-Populationen

1.3.2.1 Zuordnung zu Sequenztypen

Je nach Fragestellung bedarf die Diagnostik auch molekularer Testverfahren mit unterschiedlicher Diskriminierungsfähigkeit. Besteht der Verdacht auf eine Ausbruchssituation mit VRE, so werden Methoden mit hoher Diskriminierung benötigt, um den Verwandtschaftsgrad der einzelnen Isolate miteinander zu vergleichen. Bei überregionalen epidemiologischen Fragestellungen werden hingegen Methoden mit niedriger Diskriminierung bevorzugt. Verschiedene Techniken wurden für diese epidemiologischen Fragestellungen etabliert. Als Methode der Wahl für Populationsanalysen hat sich die Multilocus-

Sequenztypisierung (MLST) beweht. Hiermit gelingt die Zuordnung zu klonalen Linien, wie beispielsweise dem CC17 Typ (Werner *et al.* 2008b). Die MLST basiert auf der Identifizierung von Allelen von Desoxyribonukleinsäure-Sequenzen (DNA-Sequenzen) sogenannter Housekeepinggene, von denen eine definierte Anzahl mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) amplifiziert wird. Dann werden Unterschiede in den PCR-Produkten durch Sequenzierung analysiert und können in entsprechenden Datenbanken verglichen werden (Maiden *et al.* 1998, Homan *et al.* 2002, Ziesing *et al.* 2012). Bei *E. faecium* werden die Housekeepinggene *gdh*, *purK*, *pstS*, *atpA*, *gyd*, *adk* und *ddl* sequenziert und aus dem Nachweis spezifischer *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) den entsprechenden Allelen zugeordnet. Aus dem Nachweis spezifischer Allelkombinationen kann dann ein Isolat einem sogenannten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden (Homan *et al.* 2002, Werner *et al.* 2008b, Galloway-Peña *et al.* 2012, Lebreton *et al.* 2013).

Es ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Bedeutung einzelnen Sequenztypen bei Infektionen durch Enterokokken zukommt. Bei nosokomial assoziierten VRE werden häufig zeitgleich unterschiedliche Sequenztypen nachgewiesen, was für einen polyklonalen Ursprung der Isolate spricht (Werner *et al.* 2008b, Freitas *et al.* 2013). Im Rahmen eines Europäischen Forschungsprojektes erfolgte eine Typisierung verschiedener *E. faecalis*-Stämme klinischer Herkunft aus Dänemark, Deutschland, Norwegen, Polen, den Niederlanden und Spanien. Unter den untersuchten Isolaten wurden bis zu 105 verschiedene Sequenztypen identifiziert (Robert Koch Institut 2013). Epidemiologische Studien zeigten aber auch, dass in verschiedenen Krankenhäusern unterschiedlicher Regionen bestimmte Sequenztypen vermehrt auftreten können (Werner *et al.* 2008b, Freitas *et al.* 2013). Der Sequenztyp ST117 wird mit Enterokokken assoziierten Infektionen in Verbindung gebracht und ist nicht selten bei Enterokokkenausbrüchen im hospitalen Bereich nachzuweisen. ST117 kann allerdings auch bei *van*-negativen Isolaten vorkommen. Auch im Tierreich wurde das Vorkommen von ST117 beschrieben (Werner *et al.* 2012, Lebreton *et al.* 2013). Eine Analyse von Enterokokken aus Blutkulturen am Nationalen Referenzzentrum zeigte, dass bei 69 mittels MLST ausgewerteten *E. faecium*-Isolaten drei Sequenztypen am häufigsten auftraten. ST117 konnte

23 Mal nachgewiesen werden, ST192 15 Mal und ST203 neun Mal. Isolate einer Stammvariante von ST117, die in den Jahren 1996 bis 2000 gehäuft dokumentiert wurden, zeigten ein identisches Makrorestriktionsmuster in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Nachweis des *vanA*-Gens, das Vorhandensein des Gens *esp* und Abwesenheit des Gens *hyl_{Efm}*. Isolate des ST117 können sich aber auch diverser in ihren Eigenschaften zeigen, wie Isolate ohne *vanA*- oder *vanB*-Nachweis. Das Vorhandensein der Gene *esp* und *hyl_{Efm}* kann beim ST117 ebenfalls differieren. Auch der ST203 zeigt sich variabel bezüglich des Vorhandenseins einzelner Gene. ST192 tritt hingegen fast nur bei *vanB*-Isolaten und bei Vancomycin-empfindlichen Isolaten auf (Robert Koch Institut 2013).

Sequenztypen lassen sich bestimmten klonalen Komplexen zuordnen. Häufige klonale Komplexe bei *E. faecium* sind der CC17 und der CC5. Bei *E. faecalis* findet man häufig CC2, CC21 oder CC87. Es handelt sich nicht selten um human adaptierte klonale Komplexe, deren epidemiologischer Ursprung im Tierreich vermutet wird (Freitas *et al.* 2009, Freitas *et al.* 2011). Nahezu alle Hospital-adaptierten *E. faecium* Isolate gehören dem CC17 an (Werner *et al.* 2008b). Als „primäre Gründer“ des klonalen Komplex CC17 gilt der Sequenztyp ST17 (Werner *et al.* 2008b, Donabedian *et al.* 2010). Kennzeichnend für den klonalen Komplex CC17 ist ein charakteristisches MLST-Profil, das Auftreten einer Ampicillin-Resistenz, Flourchinolon-Hochresistenz und das Vorkommen von Virulenzmarkern wie den Genen *esp* und *hyl_{Efm}* (Werner *et al.* 2008b, Galloway-Peña *et al.* 2012, Lebreton *et al.* 2013, Robert Koch Institut 2013). Untersuchungen zeigten, dass das Gen *hyl_{Efm}*, welches sich auf sogenannten Megaplasmiden befindet, vermutlich für eine Hyaluronidase kodiert (Freitag *et al.* 2010). Durch Konjugation mit einem anderen Stamm lässt sich das *hyl_{Efm}* horizontal übertragen und so verbreiten (Laverde Gomez *et al.* 2011). Das Virulenzgen *esp*, welches für ein Enterokokkenoberflächenprotein kodiert, konnte bei Isolaten des CC17 in epidemiologischen Studien aus den USA und Europa vermehrt nachgewiesen werden. Auch hier wird eine horizontale Übertragung angenommen. Durch das Vorkommen der Gene *hyl_{Efm}* und *esp* wird Isolaten des CC17 ein Vorteil für die Ausbreitung und Anpassung im hospitalen Bereich zugeschrieben. Auch Eigenschaften wie Bindungsfähigkeit,

Biofilmbildung und die Invasivität des Erregers spielen bezüglich der Virulenz von Enterokokken eine Rolle (Muto *et al.* 2003, Kwon *et al.* 2012). Weitere Studien zeigten, dass Hospital-assoziierte Isolate häufig ein bestimmtes Insertionselement, das IS16, tragen. In anderen Isolaten, wie humanen Kommensalen, lebensmittelassoziierten Isolaten oder *E. faecium* von landwirtschaftlichen Tieren liess es sich nicht nachweisen. Weitere Determinanten des CC17, die bisher noch nicht eindeutig aufgedeckt sind, scheinen ebenfalls die Tenazität, die Kolonisation und gegebenenfalls Infektionen zu begünstigen. Stämme des klonalen Komplexes CC17 stellen somit einen Risikofaktor für nosokomiale Infektionen mit VRE dar (Werner *et al.* 2008b, Werner *et al.* 2011a, Lee *et al.* 2012, Mutters *et al.* 2013, Robert Koch Institut 2013). Dies bestätigten auch Untersuchungen des Nationalen Referenzzentrums für Enterokokken in Wernigerode, bei denen Vancomycin resistente *E. faecium* vom *vanA*- oder *vanB*-Genotyp, die im Rahmen von Ausbrüchen, Infektionen oder Screeninguntersuchungen im hospitalen Bereich eingesendet wurden, in der Regel dem klonalen Komplex CC17 angehörten (Klare *et al.* 2012b). Die Aufklärung der Bedeutung der einzelnen klonalen Komplexe und der Sequenztypen von Enterokokken stellen Inhalt aktueller Forschung dar.

1.3.2.2 Typisierung bei Ausbruchsfragestellungen

Zum Nachweis und für die Bewertung von Enterokokken in Ausbruchssituationen kommen verschiedene molekulare Typisierungsmethoden zum Einsatz. Die MLST ist ein Verfahren mit niedriger Diskriminierung und bei Fragen bezüglich Ausbruchssituationen in Krankenhäusern nicht ausreichend. Hier eignet sich, trotz des hohen apparativen und zeitlichen Aufwands, die Anwendung der Pulsfeldgelelektrophorese. Diese Methode gilt als Goldstandard für diese Fragestellung (Turabelidze *et al.* 2000, Werner *et al.* 2007, Werner *et al.* 2008b, Chuang *et al.* 2010). Die PFGE ist ein Verfahren, durch das mittels Auftrennung der Bakterien-DNA und nachfolgender Darstellung der hierdurch entstandenen Fragmente in einer Agarosegelelektrophorese, Bandenmuster der einzelnen Isolate gegenübergestellt werden. Durch den Vergleich der Bandenmuster

einzelner Isolate gelingt die Klärung der klonalen Verwandtschaft. Hierfür wird das Bewertungsschema nach Tenover zugrunde gelegt. Hiernach werden die Anzahl identischer und unterschiedlicher Banden der Isolate bewertet. Vergleicht man die Bandenmuster von zwei Isolaten miteinander und zeigen sich hierbei Unterschiede in nur zwei bis drei Banden (auch Fragmente genannt), dann wird davon ausgegangen, dass die beiden Isolate eng miteinander verwandt sind. Bei Unterschieden in vier oder mehr Banden wird eine klonale Zugehörigkeit immer unwahrscheinlicher und es liegen zwei klonal unterschiedliche Stämme vor. Die Schlussfolgerung, dass Isolate, die sich in zwei bis drei Banden unterscheiden, noch eng miteinander verwandt sind, beruht darauf, dass auch bei zwei klonal identischen Isolaten vereinzelt Unterschiede im Genom vorliegen können. Fällt beispielsweise im Vergleich zum Bandenmuster eines Isolats bei dem Vergleichsisolat ein Verlust einer einzelnen Bande auf und sind hier stattdessen zwei neue und schmalere Banden aufgetreten, liefert dies einen Hinweis auf eine Punktmutation im Vergleichsisolat. Durch diese Mutation entsteht eine neue Restriktionsstelle, woraus das veränderte Bandenmuster resultiert. Kommt es bei dem Vergleichsisolat hingegen zu einem Zugewinn einer Bande und zu einem Verlust von zwei schmalen Banden, die bei dem anderen Isolat vorhanden sind, kann hierfür eine Insertion der DNA an einer Restriktionsstelle verantwortlich sein. Die neugebildete DNA kann dann ihre Restriktionsstelle verlieren. Bei Isolaten, bei denen eine neue schmale Bande hinzu kommt und ein Verlust eines größeren Fragmentes auftritt, liegen in der Regel Deletionen von DNA-Fragmenten vor. Hier kommt es ebenfalls zu einem Verlust einer Restriktionsstelle. Auch mit dieser einzelnen Veränderung gehören beide Isolate noch dem gleichen Stamm an. Das Bewertungsschema nach Tenover liefert die Möglichkeit der klonalen Gegenüberstellung einzelner VRE-Isolate sowie eine Analyse von Bandenmustern, die Rückschlüsse bezüglich Veränderungen im Genom der VRE zulassen. Je mehr Veränderungen im Genom vorliegen, desto unterschiedlicher sind die Bandenmuster und eine klonale Verwandtschaft zweier Isolate wird unwahrscheinlicher. Die PFGE ermöglicht so eine Bewertung des Verwandtschaftsgrads von potentiellen Ausbruchsisolaten (Tenover *et al.* 1995).

Tabelle 2: Bewertung von Ausgangs- und Folgeisolaten in Anlehnung an das Bewertungsschema von Tenover (Tenover et al. 1995)

Anzahl Bandenunterschiede in der PFGE im Vergleich zum Ausgangsisolat	Veränderung im PFGE-Muster	Mögliche molekulargenetische Ursache	Bewertung der klonalen Verwandtschaft
0	keine	Keine molekulargenetischen Veränderungen durch das Bandenmuster ersichtlich	Klonale Verwandtschaft gesichert
2	Eine im Ausgangsisolat vorhandene größere Bande fehlt im Folgeisolat und ist durch eine schmalere Bande ersetzt	Deletion, die zu einem Verlust einer Restriktionsstelle führt	Enge klonale Verwandtschaft
3	Im Ausgangsisolat fehlt eine größere Bande und im Folgeisolat treten an dieser Stelle zwei kleinere neue Banden auf	Punktmutation, durch die eine neue Restriktionsstelle entsteht	Enge klonale Verwandtschaft
3	Im Ausgangsisolat sind zwei kleine Banden vorhanden, die im Folgeisolat durch eine größere Einzelbande ersetzt sind	Punktmutation, durch die eine Restriktionsstelle verloren geht	Enge klonale Verwandtschaft
> 4	Mehr als vier Bandenunterschiede zwischen Ausgangs- und Folgeisolat	Keine eindeutige Bewertung mehr möglich	Klonale Verwandtschaft wird unwahrscheinlicher

1.4 Antibiotikaempfindlichkeit von Enterokokken

1.4.1 Natürliche Resistenzen bei Enterokokken

Enterokokken besitzen angeborene Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika. Diese intrinsischen, chromosomal kodierten Resistenzen betreffen entweder alle Enterokokken oder nur bestimmte Spezies. Eine natürlich vorkommende Resistenz besteht bei Enterokokken im Allgemeinen gegenüber allen Cephalosporinen, semisynthetischen Penicillinen wie Oxacillin oder Flucloxacillin und Monobactamen (Aztreonam). Ursächlich ist im Fall der β -Laktamunempfindlichkeit ein nur niedrig affines Penicillin-Bindeprotein. Darüber hinaus sind Enterokokken natürlich resistent gegenüber Fusidinsäure, Polymyxinen und Flourchinolonen. Gegenüber Aminoglycosiden besitzen Enterokokken eine *Low-level*-Resistenz. *In vitro* sind Enterokokken empfindlich gegenüber einer Kombination von Trimethoprim und Sulfamethoxazol, zeigen sich aber gegenüber Sulfamethoxazol alleine unempfindlich. Daher wird eine Therapie mit diesem Kombinationspräparat kontrovers diskutiert. Daneben zeigen sich speziesspezifische Unterschiede gegenüber bestimmten Antibiotika. So besitzen Isolate von *E. faecalis* im Gegensatz zu *E. faecium* eine Resistenz gegenüber Lincosaminen, Streptograminen wie Quinupristin oder Dalfopristin und gegenüber Mupirocin. Eine intrinsische *Low-level*-Resistenz gegenüber Vancomycin kommt bei *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* vor (Murray 1990, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2008, Bodmann *et al.* 2010, Klare *et al.* 2012b).

1.4.2 Erworbene Resistenzen bei Enterokokken

Erworbene Resistenzen bei Enterokokken resultieren aus Veränderungen der Erbinformation der Erreger, die durch spontane DNA-Mutationen oder durch die Übertragung von plasmidkodierten Resistenzen entstehen können (Teixeira *et al.* 2007, Howden *et al.* 2013). Die Verbreitung von potentiell resistenten Eigenschaften von einem Enterokokken-Isolat auf ein anderes kann durch horizontalen Gentransfer erfolgen. Plasmidtransfer findet hierbei vorrangig durch Konjugation statt (Leclercq *et al.* 1988, Murray 1990, Novais *et al.* 2008, Starikova *et al.* 2013, Werner *et al.* 2013b). Die erste übertragbare Resistenz bei Enterokokken wurde 1964 für Chloramphenicol beschrieben. Verantwortlich

hierfür war die erworbene Fähigkeit zur Bildung einer Chloramphenicol-Acetyltransferase (Murray 1990). Heutzutage spielt insbesondere die Übertragung des *vanA*- oder *vanB*-Gens auf andere Isolate eine Rolle bei der Übertragung von Resistenzeigenschaften (Uttley *et al.* 1993, Dunne und Wang 1997, Suppola *et al.* 1999, Lee *et al.* 2012). In Krankenhäusern kommt der horizontalen Weitergabe von mobilen Elementen mit Vancomycinresistenz, beispielsweise durch das mobile Element Tn1546 der *vanA*-Stämme, eine hohe Relevanz zu (Freitas *et al.* 2009, Werner *et al.* 2011b, Howden *et al.* 2013). Auch eine speziesübergreifende Übertragung ist möglich. So sieht man ein mögliches Risiko für den Erwerb einer Vancomycinresistenz in der Übertragung des Tn1546 Elements von Enterokokken landwirtschaftlich genutzter Tiere auf menschliche Stämme (van den Braak *et al.* 1998, Willems *et al.* 1999, Yu *et al.* 2003).

Zahlreiche erworbene Antibiotikaresistenzen sind für Enterokokken beschrieben, wobei einige hiervon gehäuft bei einzelnen Spezies auftreten. So zeigen 80 bis 90 % der *E. faecium*-Isolate eine erworbene Ampicillin-Resistenz. Bei *E. faecalis* sind es hingegen nur ungefähr 2 % der Isolate. Bei 30 bis 40 % der *E. faecium* und *E. faecalis*-Isolate ist eine hochgradige Gentamicin-Resistenz nachweisbar. Imipenem zeigt sich gegenüber Ampicillin-sensiblen Enterokokken wirksam. Bei *E. faecium* ist Imipenem hingegen fast immer unwirksam. Darüber hinaus können Resistenzen gegenüber Makroliden, Chloramphenicol, Flurorchinolonen (Hochresistenz bei Hospital-assoziierten *E. faecium*-Isolaten), Tetracyclinen und Oxazolidinonen (Linezolid) erworben werden. *E. faecium* können sich auch gegenüber Streptograminen wie Quinupristin oder Dalfopristin unempfindlich zeigen. Vereinzelt konnten bei Enterokokken auch Unempfindlichkeiten gegenüber Linezolid nachgewiesen werden. Die genauen Resistenzmechanismen gegenüber einzelnen Antibiotika sind zum Teil noch ungeklärt (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2008, Saager *et al.* 2008, Bodmann *et al.* 2010, Flamm *et al.* 2013).

1.4.3 Therapie von Enterokokkeninfektionen

Die gezielte Therapie von Enterokokken richtet sich zum einen nach den Eigenschaften des isolierten Stammes, zum anderen nach der jeweiligen Indikation durch den erkrankten Patienten. Mittel der Wahl bei unkomplizierten Enterokokkeninfektionen ist bei sensiblen Stämmen Ampicillin (5 g drei Mal täglich über sechs Wochen). Zur Endokardistherapie kommt dieses β -Laktamantibiotikum gemeinsam mit einem Aminoglykosid zum Einsatz. Eine Kombination mit Gentamicin (160-240 mg beziehungsweise drei Mal 1 mg/kg täglich) wird zur Durchbrechung eines Eagle-Effekts (Verschlechterung der *in vitro*-Bakterizidie durch höhere Ampicillingabe) und für eine ausreichende bakterizide Wirkung empfohlen. Trotz der „Enterokokkenlücke“ der Aminoglykoside wirkt diese Kombination synergistisch bakterizid, da das Aminoglykosid mit Hilfe des β -Laktams in das Bakterium gelangt. Wenn sich diese Therapie als unwirksam erweist, beispielsweise bei einer High-level-Gentamicin-Resistenz, kann auch eine Kombination mit empfindlich getestetem Ceftriaxon, Ofloxacin oder Rifampicin erfolgen. Zur Therapie einer durch Enterokokken bedingten Endokarditis können Antibiotika wie Imipenem (vier Mal täglich 500 mg), Vancomycin (zwei Mal täglich 15 mg/kg intravenös) oder eine Kombination von Teicoplanin und Gentamicin über vier bis sechs Wochen erwogen werden. Bei einer Vancomycin-Resistenz können Streptogramin-Kombinationen mit Quinupristin und Dalfopristin, die in Deutschland allerdings nicht mehr zugelassen sind, oder Linezolid, Tigecyclin oder Daptomycin zum Einsatz kommen. Daptomycin (6 mg/kg täglich) lässt sich gegebenenfalls mit Rifampicin oder einem Aminoglykosid kombinieren. Der Einsatz von Antibiotika zur Therapie von durch Enterokokken bedingten Infektionen sollte möglichst der jeweiligen Resistenzsituation und dem Krankheitsbild des Patienten angepasst werden, insbesondere aufgrund der nicht selten vorkommenden Resistenzen gegenüber mehreren Antibiotika bei diesen Erregern (Werner *et al.* 2008b, Gatermann und Miksits 2009, Balaei Gajan *et al.* 2013, Brodt und Smollich 2013).

1.5 Daptomycin

1.5.1 Allgemeines

Daptomycin ist der erste Vertreter eines zyklischen Lipopeptids, welches sich durch *Streptomyces roseosporus* gewinnen lässt (Arbeit *et al.* 2004, Baltz 2010). 2003 erfolgte in den USA die Zulassung für die Therapie komplizierter Haut- und Weichteilinfektionen, da Daptomycin sich insbesondere gegenüber Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) wirksam erwies (Raja *et al.* 2003, Rybak 2006, Hoen und Duval 2013). Das Lipopeptid zeigt eine gute Gewebepenetration, eignet sich hingegen durch seine Interaktion mit dem Alveolarsurfactant nicht für die Behandlung respiratorischer Infekte. Es wirkt bakterizid, wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht exakt ergründet ist. Bekannt ist, dass es in einem Calcium-abhängigen Prozess an die Zytoplasmamembran grampositiver Bakterien bindet und Poren in der Zellwand erzeugt. Mit einer lipophilen Seitenkette bildet das Lipopeptid Ionenkanäle, wodurch ein Kaliumausstrom aus der Zelle resultiert. Dies verändert das Membranpotential der Zellwand und führt so zum Zelltod. Es erfolgt allerdings keine vollständige Zersetzung der Membran. Dies wird als Vorteil bei der Behandlung toxinbildender Bakterien gesehen, da diese in Folge der Therapie weniger Toxin freisetzen als nach vollständiger Zellmembranzerstörung. Eine Therapie mit Daptomycin muss immer intravenös erfolgen, dass es keine orale Bioverfügbarkeit besitzt (Freissmuth 2012, Brodt und Smollich 2013).

1.5.2 Daptomycin zur Behandlung von Enterokokkeninfektionen

Die Zulassung von Daptomycin beschränkt sich zurzeit auf die Behandlung komplizierter Haut- und Weichteilinfektionen (*complicated skin and soft-tissue infections* = cSSTI) und rechtsseitiger infektiöser Endokarditis (RIE) durch *Staphylococcus aureus*. Für Enterokokken besteht derzeit, aufgrund der unzureichenden Datenlage, eine Anwendungsbeschränkung (Rote Liste 2014). Im klinischen Gebrauch und in Studien wurde der Einsatz von Daptomycin bei Infektionen durch VRE, bei denen sich Resistenzen gegenüber anderen Reserveantibiotika gezeigt hatten, bereits beschrieben (Linden 2007, Grim *et al.* 2009). Gegenüber Daptomycin ließen sich auch bereits Sensibilitätsabnahmen beobachten. Es wird angenommen, dass derzeit etwa 0,3 % der VRE eine

Unempfindlichkeit gegenüber Daptomycin aufweisen, wobei eine steigende Inzidenz beobachtet wird. Als Risikokollektiv zählen Patienten der Hämatologie-Onkologie. Sensibilitätsabnahmen zeigten sich in der Regel unter einer Therapie mit Daptomycin. Vereinzelt scheint eine Unempfindlichkeit aber auch ohne vorherige Exposition mit diesem Antibiotikum nachzuweisen zu sein. Ursachen hierfür sind derzeit noch unklar. Horizontaler Gentransfer und der Kontakt zu landwirtschaftlichen Nutztieren oder Lebensmitteln tierischer Herkunft wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Lesho *et al.* 2006, Fraher *et al.* 2007, Kamboj *et al.* 2011, Kelesidis *et al.* 2012a, Kelesidis *et al.* 2012b, Kelesidis 2013a, Kelesidis und Chow 2014, Wudhikarn *et al.* 2013). Besonderheiten zeigen sich bei der *in vitro*-Bewertung der Empfindlichkeit von Enterokokken gegenüber Daptomycin, da zu beachten ist, dass der Wirkmechanismus von der Calciumkonzentration abhängt. Eine fehlende Calciumzugabe in das Testmedium kann zu erhöhten MHK-Werten führen. Darüber hinaus fallen unterschiedliche Merkmale im Vergleich der *in vitro*-Empfindlichkeitstestungen von Enterokokken und Staphylokokken auf. Bei Staphylokokken zeigt sich Daptomycin bereits in geringer Konzentration wirksam. Hier wird eine MHK_{90} von 0,06-1 $\mu\text{g/ml}$ angegeben, während für Enterokokken eine MHK_{90} von 1-2 $\mu\text{g/ml}$ für *E. faecalis* und von 4 $\mu\text{g/ml}$ für *E. faecium* beschrieben ist (Brodt und Smollich 2013). Anhaltswerte für die Bewertung der Empfindlichkeit von Enterokokken gegenüber Daptomycin liefert die EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Bisher legte man hier jedoch noch keine klinischen *breakpoints* für die Resistenzbestimmung bei der Behandlung von Enterokokken mit Daptomycin fest. Der epidemiologische *cut-off*-Wert für Wildtyp Enterokokken definierte sich durch eine MHK von kleiner oder gleich 4 $\mu\text{g/ml}$. Die Durchschnittswerte der Sensibilitätsmessung von Wildtyp *E. faecium* wurden folgendermaßen angegeben. Von insgesamt 12331 untersuchten Isolaten zeigte die überwiegende Mehrheit eine MHK von 2 $\mu\text{g/ml}$ (10353 Isolate, 84 %), gefolgt von Isolaten mit einer MHK von 4 $\mu\text{g/ml}$ (1006 Isolate, 8,2 %) und Isolaten mit einer MHK von 8 $\mu\text{g/ml}$ (23 Isolate, 0,19 %) (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2014).

Tabelle 3: Daptomycin MHK-Verteilung bei Wildtyp *E. faecium* (n=12331) (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2014)

MHK (µg/ml)	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	S ≤	R >	ECO- FF* ≤
<i>E. faecium</i>	0	5	38	58	159	689	10353	1006	23	0	0	0	ND	ND	4,0

*ECOFF, Epidemiologischer cut-off

Nach den Angaben des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sind Enterokokken ab einer MHK kleiner oder gleich 4 µg/ml als sensibel zu bewerten. Werte für den intermediären oder resistenten Bereich sind in den aktuellen CLSI Empfehlungen noch nicht definiert (Clinical and Laboratory Standards Institute 2014). In einer klinischen Studie erachtete man VRE-Isolate mit einer MHK von 0,5-2 µg/ml als sensibel gegenüber Daptomycin (Grim *et al.* 2009). In einer anderen Studie nahm man eine verringerte Sensibilität gegenüber dem Antibiotikum durch eine MHK von > 4 µg/ml an (Kelesidis *et al.* 2011). Zu beachten ist, dass sich in der Literatur nur vereinzelt Hinweise bezüglich einer Bewertung der Daptomycinsensibilität bei VRE finden lassen. Welche Empfindlichkeitsbereiche sich in den nächsten Jahren etablieren werden, bleibt abzuwarten.

1.5.3 Epidemiologie und Mechanismen von Sensibilitätsabnahmen gegenüber Daptomycin bei grampositiven Erregern

Daptomycin zeigt sich wirksam gegen ein breites Spektrum grampositiver Erreger, darunter MRSA und Enterokokken. Aufgrund des Wirkmechanismus des zyklischen Lipopeptids, welches sich von der Wirkungsweise anderer Antibiotika unterscheidet, sollen Kreuzresistenzen gegenüber anderen Antibiotika vermieden werden. Bei Staphylokokken wird zum Teil vermutet, dass es eine Korrelation zwischen der MHK von Vancomycin und Daptomycin geben kann. So können einige Vancomycin-intermediäre und -resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme eine erhöhte Daptomycin-MHK in Abhängigkeit von der Vancomycin-Resistenz aufweisen. Auch Resistenzentwicklungen gegenüber Daptomycin unter Therapie sind bei Staphylokokken beschrieben und resultieren vermutlich aus Veränderungen der

Durchlässigkeit, der Polarisierung und der Oberflächenbindung der Zellmembran, was zu einem verminderten Ansprechen gegenüber dem Antibiotikum führt. Für Staphylokokken sind potentiell für diese Mechanismen verantwortliche Mutationen in den Genen *mprF*, *yyG*, *rpoB* und *rpoC* beschrieben. Bezüglich der Interpretation der Daptomycin-Empfindlichkeitsmessung und der Mechanismen, die zu einem Versagen einer Therapie mit dem Lipopeptid bei Enterokokkeninfektionen führen, ist hingegen wenig bekannt (Rybak 2006, Kelley *et al.* 2011, Palmer *et al.* 2011, Brodt und Smollich 2013). Darüber hinaus fehlen für Enterokokken definierte Grenzwerte, um Isolate als resistent gegenüber Daptomycin zu bezeichnen. Gegenüber der MHK-Verteilung bei Wildtyp-Enterokokken erhöhte Werte und MHK-Zunahmen unter Therapie deuten auf eine Unempfindlichkeit der Erreger hin. Hinweise auf mögliche Interpretationen lassen auch einzelne Publikationen zu. In einer Amerikanischen Studie wurden in den Jahren 2008 bis 2009 aus acht Krankenhäusern 56 VRE-Isolate aus Urin-, Wund- und Blutkulturproben detektiert, die jeweils eine Daptomycin-MHK größer als 4 µg/ml aufwiesen. Die Isolate stufte man aufgrund ihrer MHK-Messung als potentiell resistent ein. Die exakten Werte gaben die Autoren allerdings nicht an (Judge *et al.* 2012). Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Resistenzbildung gegenüber Daptomycin bei Enterokokken lieferte ein klinischer Fallbericht. Man entnahm einer Patientin mit einer Bakteriämie durch *E. faecalis* im Verlauf eines stationären Aufenthaltes vier Enterokokken-Isolate. Initial zeigten die drei vor der Therapie entnommenen Isolate eine MHK von 1 µg/ml. Nach Beginn der Daptomycingabe wies das vierte Isolat eine Daptomycin-MHK von 16 µg/ml auf, was die Vermutung einer Resistenz erhärtete. Die Patientin verstarb später, ohne dass die Sepsis erfolgreich therapiert werden konnte (Munoz-Price *et al.* 2005).

Aufgrund der ernstzunehmenden Bedrohung, die sich aus einer Daptomycinunempfindlichkeit ergeben kann, fanden in einzelnen Studien nähere Untersuchungen bezüglich möglicher Resistenzmechanismen statt. Insbesondere Veränderungen der Zellmembran der Enterokokken scheinen die Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin zu beeinflussen (Mishra *et al.* 2012). Es wird vermuteten, dass hierfür spontane Mutationen im Genom der

Enterokokken verantwortlich sein können. In Experimenten zeigten Isolate eines multiresistenten, krankenhausessoziierten, aber für gewöhnlich Daptomycin sensiblen *E. faecalis* V583-Stamm nach *in vitro*-Exposition von Daptomycin eine 256-fache MHK-Erhöhung von initial 2 µg/ml auf bis zu 512 µg/ml. Hierfür waren mehrere Passagen des Isolates mit jeweils erhöhter Daptomycinkonzentration nötig. Mittels Genomsequenzierung ermittelte man eine für diese Entwicklung möglicherweise verantwortliche Veränderung im EF0631 *c/s* Allel. Diese Mutation hatte vermutlich Einfluss auf die Cardiolipinsynthese, die am Aufbau der Bakterienzellwand beteiligt ist. Interessanterweise war das Wachstumsverhalten der untersuchten Stämme mit erhöhter Daptomycin-MHK hierdurch nicht beeinträchtigt. Dies wertet man als Hinweis darauf, dass Enterokokken hierdurch keinen Fitnessverlust erleiden (Palmer *et al.* 2011).

Da Veränderungen der Zellmembran das Ansprechen von Enterokokken gegenüber Daptomycin zu beeinflussen scheinen, analysierte man weitere die Oberfläche der Erreger beeinflussende Mechanismen. Der Erhalt der Zellmembran ist lebensnotwendig für grampositive Bakterien. Daher besitzen sie zahlreiche Regulationsmechanismen, um im Falle einer Schädigung der Zellwand reagieren zu können. Zu den Proteinen, die solche Stressoren wahrnehmen, zählen Lia S und Lia R. Ein weiteres Protein, das Lia F, übernimmt ebenfalls eine Funktion in der Signalwahrnehmung. Gemeinsam werden die für diese Proteine kodierenden Gene *liaF*, *liaS* und *liaR* auch als regulatorisches Drei-Komponenten-System bezeichnet (*three-component regulatory system liaFSR*). Diesbezügliche Untersuchungen betrafen zunächst *Bacillus subtilis* und *Streptococcus mutans*. Die Signale, die durch das Regulationssystem wahrgenommen werden, blieben dabei noch weitgehend unklar. Im Allgemeinen nahm man an, dass stressauslösende Faktoren, wie eine Antibiotikatherapie, dieses System aktivieren, wodurch sich die Zelloberfläche des Bakteriums verändert (Eldholm *et al.* 2010, Arias und Murray 2012, Tran *et al.* 2013a, Tran *et al.* 2013b). Ob dieser Mechanismus auch bei Enterokokken unter Daptomycintherapie eine Rolle spielt, wird derzeit eingehend untersucht. So erfolgte in einer Fallstudie eine Analyse von zwei *E. faecalis*-Isolaten eines Patienten. Eines wurde vor und eines nach

Daptomycintherapie entnommen. Die Empfindlichkeitstestung ergab MHK-Werte bezüglich Daptomycin von 1 µg/ml vor und von 12 µg/ml nach der Therapie. Nähere Analysen mittels Sequenzierung zeigten Mutationen in den an der Zellwandsynthese beteiligten Genen *gdpD* und *cls*. *GdpD* kodiert für eine Glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase. Eine weitere Mutation betraf das Gen *liaF*. Ein *in vitro*-Allelaustausch in den Genen *liaF* und *gdpD* des sensiblen Isolats führte bei diesem zu einer MHK-Erhöhung auf 12 µg/ml. Der alleinige Allelaustausch im Gen *liaF* führte nur zu einer vierfachen MHK-Erhöhung. Der Allelaustausch allein im Gen *gdpD* erzeugte keine MHK-Zunahme. Allelveränderungen in beiden Genen scheinen demnach synergistisch zu wirken. Ein Austausch von Allelen im Gen *cls* erfolgte nicht. Nachfolgende elektronenmikroskopische Betrachtungen der Zelloberflächenstruktur zeigten, dass die Isolate mit erhöhten MHK-Werten ihre Zelloberfläche veränderten und es auch zu einer Änderung des Membranpotentials und der Membranpermeabilität kam. Dann erfolgten Analysen weiterer klinisch entnommener *E. faecalis*-Isolate mit verminderter Daptomycinsensibilität. Hierbei zeigten sich Mutationen im Gen *cls*, nicht aber in den Genen *liaF* oder *gdpD*. Die klinische Bedeutung der Genveränderungen blieb unklar (Arias *et al.* 2011). Eine weitere Studie stellte die Analyse von zwei *Enterococcus faecalis*-Isolaten aus Blutkulturen eines Patienten vor. Das vor der Antibiotikatherapie entnommene Isolat wies eine Daptomycin-MHK von 1 µg/ml auf. Nach der Therapie hatte sich die MHK auf 12 µg/ml erhöht. Bei dem weniger empfindlichen Isolat konnten Mutationen im Gen *liaF* sowie in den Genen *gdpD* und *cls* nachgewiesen werden (Munita *et al.* 2013). Untersuchungen von anderen klinischen Isolaten mit erhöhten Daptomycin-MHK-Werten zeigten variable Mutationen der Gene *cls*, *liaF*, *liaS* und *liaR*. Weitere Analysen ergaben, dass bei *E. faecium*-Isolaten mit einer Daptomycin-MHK von 3 oder 4 µg/ml Mutationen in mindestens einem der Gene des *liaFSR*-Systems vorkamen. Isolate mit einer MHK kleiner oder gleich 2 µg/ml wiesen keine vergleichbaren Mutationen auf. Es wurde daher angenommen, dass Isolate mit einer Mutation in einem der Gene des Drei-Komponenten-Systems eine höhere Bereitschaft zu einer Sensibilitätsabnahme gegenüber Daptomycin aufweisen. Derzeit nimmt man an, dass eine Kombination verschiedener Mechanismen für

das verminderte Ansprechen gegenüber Daptomycin verantwortlich ist. Vermutet wird, dass es durch eine Stresssituation zu einer Aktivierung des *liaFSR*-Systems kommt. Dies kann zum Beispiel durch eine Antibiotikatherapie induziert sein. Nach dieser Theorie resultiert eine Veränderung der Zellmembran durch eine nachfolgende Aktivierung von Genen wie *gdpD* oder *c/s* (Arias *et al.* 2011, Munita *et al.* 2013). Ob sich die Vermutungen bezüglich der genannten Genveränderungen bestätigen und ob weiteren Genen eine Bedeutung zukommt, ist Inhalt aktueller Forschung.

1.6 Ziel der Arbeit

Vancomycin-resistente Enterokokken spielen eine signifikante Rolle als Verursacher schwerer Infektionen bei stammzelltransplantierten Patienten. Nach Identifikation kolonisierter und damit gefährdeter Patienten werden aus diesem Grund im Rahmen standardisierter Eskalationsstrategien bei Fieber in der Neutropenie Substanzen mit VRE-Aktivität eingesetzt. Hierzu zählt neben Linezolid und Tigecyclin insbesondere auch Daptomycin. Wenig ist allerdings über die tatsächliche Empfindlichkeit von VRE in dem speziellen Patientenkollektiv bekannt. Auch ist unklar, welchen Einfluss ein breiter Einsatz von Daptomycin auf intestinal kolonisierende VRE nimmt. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, die Populationsstruktur von Vancomycin-resistenten *E. faecium* und ihre Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin bei Patienten der Knochenmarkstranplantationsstation (KMT-Station) des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf zu ermitteln. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob es im Rahmen des Einsatzes dieses Antibiotikums in der Eskalationstherapie zu einer Abnahme der Empfindlichkeit der VRE-Stämme kommt. In diesem Fall sollten die potentiellen molekularen Ursachen für die Sensibilitätsabnahme gegenüber Daptomycin dargestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 4: Für diese Arbeit verwendete Geräte

Laborgerät	Hersteller
37° C Brutschrank, Hygienelabor, Universitätsklinikum Eppendorf	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Cycler peqSTAR, 96 Universal Gradient	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Eppendorfreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer, horizontal	MWG biotech AG (Ebersberg, Deutschland)
Gießvorrichtung für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Gießvorrichtung für Agaroseblöcke, Plug Mold	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Feinwaage Mettler PC 440, DeltaRange	Mettler Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühlpumpe, Cooling Module	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Kühlschrank, Liebherr Premium	Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland)
Laborschüttler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Deutschland)
Magnetrührer RCT basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, Deutschland)
MC-Farland Messgerät	bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen, Deutschland)
Photodokumentationssystem:	Bio-Rad Laboratories GmbH

ChemiDoc™ XRS	(München, Deutschland)
Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen (für 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Pipetten)	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)
Pulsfeldgelelektrophoresekammer, Electrophoresis cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Elektrophorese-Netzgerät (Consort E425)	Consort bvba (Turnhout, Belgien)
Vortexer	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5: Für diese Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Borsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na-EDTA	Merck (Darmstadt, Deutschland)
LMP-Agarose (INCERT)	FMC Corporation (Philadelphia, USA)
Na-Desoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Na-Lauroyl-Sarkosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
NaOH Plättchen	Merck (Darmstadt, Deutschland)
SeaKem® LE Agarose	Lonza (Basel, Schweiz)
Trihydroxyaminomethane (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

2.1.3 Medien

Für die Anzucht der Bakterien wurden Blutagarplatten (Columbia Agar with sheep blood plus, Hersteller: Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, Deutschland)), Müller-Hinton Agarplatten (Müller-Hinton Agar, Hersteller: Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, Deutschland)) sowie eine flüssige Nährbouillon (Trypticase Soja Bouillon, Hersteller: Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, Deutschland), Zubereitung: Nährbodenküche, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Eppendorf) genutzt.

2.1.4 Reagenzien und Enzyme

Tabelle 6: Für diese Arbeit verwendete Reagenzien und Enzyme

Reagenz, Enzym beziehungsweise Kit	Hersteller
E-Teste, MIC test Strip, Daptomycin DAP 0,016-256 µg/ml (Ca ²⁺ enthalten), REF 921450	Liofilchem (Italien)
Größenstandard F-303 SD	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
Insta Gene Matrix	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Lysostaphin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
PCR-Kid Finnzyme: - DyNAzyme DNA-Polymerase - dNTP Mix - 10x DyNAzyme Buffer (Mg ²⁺ haltig)	Finnzymes (Finnland)
Proteinase K-Lösung P 4850-1	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Red Safe™, Nuclid Acid Staining	iNt RON Biotechnology

Solution (20,000x) Cat. No. 21141, 1ml	(Sangdaewon-Dong, Joongwon-Ku, Sungnam, Kyungki-Do, Korea)
Restriktionsenzym <i>Sma</i> I	Roche Diagnostic (Mannheim, Deutschland)
Restriktionspuffer SuRe/Cut Buffer A	Roche Diagnostic (Mannheim, Deutschland)

2.1.5 Lösungen

Basislösung zur Herstellung der Lysis-Lösung I (ohne Lysozym): 200 ml

40 ml 5 M NaCl

40 ml 0,5 M Na-EDTA (pH 7,5)

600 µl 2 M Tris-HCl (pH 7,6)

400 mg Na-Desoxycholat

2 g Na-Lauryl-Sarkosin

A. bidest. ad 200 ml

DNA-Ladepuffer (für PCR-Gele)

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylen Cyanol FF

15 % Ficoll

ES-Lösung zur Herstellung der Lysis-Lösung II: 1000 ml, pH 9,0

10 g Laurylsarkosin

1000 ml 0,5 M EDTA

pH-Einstellung mit NaOH

LMP-Agarose: 5 ml, 1,6 %

80 mg LMP-Agarose (= Low melting point Agarose)

5 ml SE-Puffer

In 60° C Wasserbad erhitzen bis sich die Agarose mit dem SE-Puffer homogen vermischt

Lysis-Lösung I

6 mM Tris-HCl (pH 7,6)

1 M NaCl

100 mM EDTA (pH 7,5)

0,2 % Na-Desoxycholat

1 % Na-Lauryl-Sarkosin

1 mg Lysozym (erst direkt vor der Benutzung hinzufügen)

NaCl: 500 ml, 5 M

146,1 g NaCl

A. bidest. ad 500 ml

Na-EDTA-Lösung: 500 ml, 0,5 M, pH 7,5

93,06 g Na-EDTA

A. bidest. ad 500 ml

SE-Puffer: 1000 ml, pH 7,5

15 ml 5 M NaCl

50 ml 0,5 M Na-EDTA (pH 7,5)

A. bidest. ad 1000 ml

TBE-Puffer: 1000 ml, 10 x konzentriert

109 g 0,9 M Tris

55,6 g 0,9 M Borsäure

7,4 g 20 mM Na-EDTA (pH 8,0)

A. bidest. ad 1000 ml

TE-Puffer: 1000 ml

5 ml 2 M Tris-HCl (pH 7,5)

20 ml 0,5 M Na-EDTA (pH 7,5)

A. bidest. ad 1000 ml

Tris-HCl-Lösung: 100 ml, 2 M, pH 7,5

24,24 g Tris

pH-Einstellung auf pH 7,5 mit HCl

A. bidest. ad 100 ml

2.1.6 Primer**Tabelle 7: Für diese Arbeit verwendete Primer**

Primer	Sequenz
<i>vanA_for</i>	5'-GGGAAAACGACAATTGC-3'
<i>vanA_rev</i>	5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3'
<i>vanB_for</i>	5'-ACGGAATGGGAAGCCGA-3'
<i>vanB_rev</i>	5'-TGCACCCGATTTCGTTC-3'
<i>liaF_for</i>	5'-CATCTAAAGTCCTATAGCCAAC-3'
<i>liaF_rev</i>	5'-CAGCTAGCATCGCTCTGGAT-3'
<i>liaR_for</i>	5'-CCAGTCTGAGATGCGTGCGC-3'
<i>liaR_rev</i>	5'-GCCACAACAGCATGAGTGGCT-3'
<i>liaS_for</i>	5'-TACCTTTGGGCGTAGCCATCCGA-3'
<i>liaS_rev</i>	5'-CCGGTCGAAGTGTCATCGCC-3'

2.1.7 Isolate

Die für diese Arbeit untersuchten 109 VRE-Isolate aus rektalen Abstrichen stammten aus dem Kollektiv der Patienten der KMT-Station des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf des Zeitraums 2009 bis 2011. Alle Isolate wurden bei -80 °C in der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene aufbewahrt. Zusätzlich wurden 24 Wildtyp *E. feacium* anderer Kliniken des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf im

Rahmen der Routinediagnostik im Jahr 2012 isoliert, auf Blutagarplatten bei 37 °C für 24 h angezüchtet und dann zunächst bei –4 °C aufbewahrt. Alle für diese Arbeit untersuchten Isolate sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 15 und 16).

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemein mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Nach dem Auftauen der Stammsammlungsisolate wurden die Träger der gefrorenen Bakterienisolate, in diesem Fall die in dem Stammhaltungsbehälter befindlichen Plastikpellets, mit sterilen Plastikösen auf Blutagarplatten nach dem Drei-Ösen-Ausstrich aufgetragen. Dann erfolgte die Anzucht bei 37 °C für 24 h in einem Brutschrank. Die weitere Aufbewahrung der Stammisolate erfolgte auf Blutagarplatten in einem Kühlschrank bei -4 °C.

Zur Nutzung für die verschiedenen Methoden wurden die Stammisolate erneut auf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h subkultiviert. Diese Subkultur stand dann unter anderem für die Empfindlichkeitsprüfung oder die Extraktion chromosomaler DNA zur Verfügung.

Vor Durchführung einer Pulsfeldgelelektrophorese erfolgte das Einbringen einer Kolonie einer frischen Subkultur in 10 ml TSB Bouillon und eine Bebrütung zur Vermehrung der Bakterien bei 37 °C für 24 h.

2.2.1.2 Empfindlichkeitsprüfung

Der Epsilometertest beziehungsweise E-Test ist ein Verfahren für die Empfindlichkeitstestung von Bakterien auf spezifische Antibiotika. Das jeweilige Antibiotikum ist in verschiedenen Konzentrationen, die den Gradienten einer Skala der Teststreifenoberseite entsprechen, an dessen Unterseite aufgetragen. Es erfolgt das mittige Auflegen des Teststreifens auf eine zuvor mit einer standardisierten Konzentration von Bakteriensuspension inokulierte Agarplatte. Während einer Übernachtinkubation vermehren sich die Bakterien. Gleichzeitig diffundiert das Antibiotikum, entsprechend dem Konzentrationsgradienten, aus dem Streifen in das Medium. Die Bakterienkolonien können nur dort wachsen, wo der Konzentrationsgradient unter ihrer Empfindlichkeit liegt. So entsteht eine Bakterien-Ellipse, deren Berührungspunkt mit dem Teststreifen sich auf der Skala abgelesen lässt. Dies ermöglicht die Empfindlichkeitsbestimmung des Bakteriums gegenüber dem Antibiotikum (Lee 2009).

Für die Versuche mit den Patientenisolaten erfolgte zunächst die Subkultivierung entsprechender Bakterienkolonien über Nacht (siehe 2.2.1.1). Dann wurde eine Bakteriensuspension mit autoklaviertem NaCl und der jeweiligen Subkulturen des *E. faecium*-Isolats angefertigt bis sich ein McFarland von 0,5 einstellte und diese gleichmäßige auf einer Müller-Hinton Agarplatte ausgestrichen. Der E-Test-Streifen für die Daptomycinempfindlichkeitstestung wurde mittig platziert. Es folgte die Übernachtbebrütung bei 37 °C und die Auswertung am nächsten Tag.

2.2.2 Molekulare Methoden

2.2.2.1 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophorese ist ein Verfahren, mit dem einzelne Fragmente der DNA von Bakterienisolaten nach Ihrer Größe aufgetrennt und dargestellt werden können. Das Trennen der Fragmente erfolgt mittels einer Agarosegelelektrophorese. Das Agarosegel enthält eine Gelmatrix, deren Porengröße je nach Konzentration des Gels variiert. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld zum Pluspol. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt hierbei bei zunehmender Fragmentgröße ab. Standardgele trennen Fragmente mit bis zu 20 kb auf (Fuchs und Schlegel 2007). Durch die Pulsfeldgelelektrophorese gelingt es, größere DNA-Moleküle zu fragmentieren, da hier das elektrische Feld nicht mehr statisch in eine Richtung, sondern durch mit wechselnder Spannung und abwechselnd in verschiedenen Richtungen angelegt wird. Bei jeder Änderung des elektrischen Feldes richtet sich die DNA erneut aus. Große Moleküle werden dadurch stärker zurückgehalten als kleine. Mit der PFGE lassen sich so die Moleküle nach Ihrer Molmasse und nach ihrer Gestalt und topographischen Lage entsprechend aufgetrennen (Watson *et al.* 2011).

Für die Pulsfeldgelelektrophorese vorbereiteten Lösungen:

- 200 ml Basislösung zur Herstellung der Lysis-Lösung I (ohne Lysozym)
- 1000 ml ES-Lösung (pH 9,0) zur Herstellung der Lysis-Lösung II
- 500 ml 5 M NaCl
- 500 ml 0,5 M Na-EDTA-Lösung (pH 7,5)

- 5 ml 1,6 % LMP-Agarose
- Lysis-Lösung I
- 100 ml 2 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,5)
- 1000 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA/pH 7,5)
- 1000 ml 10 x konzentrierter TBE-Puffer
- 1000 ml TE-Puffer

2.2.2.1.1 Anzucht der Kulturen

Es erfolgte eine Anreicherung frisch subkultivierter Bakterienisolate in TSB Bouillon (siehe 2.2.1.1).

2.2.2.1.2 Herstellung von Agaroseblöcken

Damit die DNA für die nachfolgenden Reaktionen stabil blieb und keinen ungewollten Reaktionen ausgesetzt war, erfolgte die Fixierung der bakteriellen DNA in Agaroseblöcken. Diese schützte unter anderem vor Scherkräften beim Pipettieren. Die in Agarose gebetteten Bakterien waren aber weiterhin zugänglich für Schritte wie Lyse und Restriktion. Vor der Überführung der Bakterien in die Agarose fand eine Reinigung von der Bouillon statt. Dies erfolgte durch Vortexen, Überführen von je 1000 µl der Flüssigkeit in Eppendorfreaktionsgefäße und Zentrifugierung für 2 min bei 12000 rpm. Das hierdurch entstandene Bakterienpellet wurde dann in 1 ml SE-Puffer resuspendiert und wieder 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert (= Waschvorgang). Nach dem zweiten Waschvorgang erfolgte die Resuspension in 500 µl SE-Puffer. Zur Herstellung der Agarose fand zunächst die Herstellung von bei 60 °C flüssig gehaltener 1,6 % LMP-Agarose statt. Kurz vor dem Hinzufügen der Bakteriensuspension erfolgte die Zugabe von einer Spatelspitze Lysozym und anschließendes Vortexen. Dann konnten jeweils 70 µl Bakteriensuspension mit 70 µl 1,6 % LMP-Agarose in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und erneut gevortext werden. Durch die Überführung der Mischung (ca. 100 µl) in Gießblöcke und anschließender Aushärtung im Kühlschrank für 20 min verfestigte sich die bakterienhaltige Agarose zu Blöcken.

2.2.2.1.3 Lyse I

Die Agaroseblöcke ließen sich nach der Aushärtung in mit je 1 ml Lysislösung I befüllte Eppendorfreagenzgefäße leiten (kurz vorher Hinzugabe von 5 mg Lysozym/1 ml). Es folgte die Übernachtinkubation bei 36 °C, in der die erste Lysisreaktion ablief.

2.2.2.1.4 Lyse II

Durch das Ersetzen der Lysislösung I durch die Lysislösung II (1 ml ESP-Lösung mit 2 µl Proteinase K-Lösung) und Übernachtinkubation bei 56 °C fand die Lysisreaktion II statt.

2.2.2.1.5 Waschen

Dann wurden die Agaroseblöcke gereinigt, indem die Blöcke in jeweils 10 ml TE-Puffer überführt und 1 h auf dem Schüttler gewaschen wurden. Es folgte der Austausch des TE-Puffers durch frischen TE-Puffer und ein erneutes Schwenken der Blöcke für 1 h auf dem Schüttler. Dieser Waschvorgang erfolgte viermal hintereinander. Dann konnten die Blöcke entweder bei 4 °C aufbewahrt oder direkt für die Restriktion genutzt werden.

2.2.2.1.6 DNA-Spaltung mittels *Sma*I

Der nächste Schritt war der Restriktionsverdau. Vorerst wurde eine 1:10 Verdünnung eines 10x konzentrierten Restriktionspuffers A durch Hinzugabe von destilliertem Wasser hergestellt. Nach der Entnahme der Blöcke aus dem TE-Puffer wurden sie 1 h in je 600 µl des 1:10 verdünnten Restriktionspuffer A gegeben. Nach der Entfernung des Puffers erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl 1:10 verdünnten Restriktionspuffer A und 4 µl *Sma*I (erst kurz vorher dem Puffer hinzugefügt). Die Inkubation fand bei 25 °C über Nacht statt.

2.2.2.1.7 Elektrophorese

Dann erfolgte die Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA. Dazu wurde zuerst in einer separaten Gelkammer, die mit einem Plastikkamm versehen war, ein 1 % Gel angefertigt. Durch Erhitzung von 1,4 g Sigma-Agarose in 140 ml 0,5 x konzentriertem TBE-Puffer (für 2 L wurden 100 ml 10 x konzentrierter TBE-

Puffer mit 1,9 L Aqua dest. gemischt) entstand ein flüssiges Gel. Diesem wurde 7 µl Red Safe™ Farbstoff hinzugefügt. Nach erfolgter Abkühlung in der Gelkammer erhielt es seine gewünschte Form und Festigkeit. Nach Entfernung des Kamms entstanden Taschen im Gel, in die sich die Bakterien-DNA-enthaltenden Gelblöcke platzieren ließen. Eine Abdichtung der Taschen ermöglichte das Übergießen mit restlicher Agarose. Es folgte die Überführung des mit DNA-Blöcken befüllten Gels in die Kammer des Pulsfeldgelelektrophoresegeräts. Das Gel wurde in die Mitte der PFGE-Kammer auf eine dünne Plastikplatte gelegt. Nach Befüllen der PFGE-Kammer mit 2 L 0,5 x TBE-Puffer umgab dieser das Gel vollständig. Die Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese mit der *E. faecium*-DNA erfolgte mit den in Tabelle 8 aufgeführten Einstellungen.

Tabelle 8: PFGE-Einstellungen für *E. faecium*-DNA

Funktion	Einstellung
Block 1	5-35 s für 20 h
Block 2	-
Spannung	6,0 V/cm
Winkel	120 °C
Umwälzrate der Pumpe	100 %
Kühltemperatur	14 °C

Nach 20 h Laufzeit wurde das Gel aus der PFGE-Kammer entfernt, unter UV-Licht mit dem Photodokumentationssystem ChemiDoc™ XRS dargestellt und dokumentiert. Die Auswertung der PFGE-Muster erfolgte nach dem von Tenover ausgearbeiteten Bewertungsschema (Tenover *et al.* 1995).

2.2.2.2 Extraktion chromosomaler DNA

Die Extraktion der DNA der Bakterienisolate diente der Bereitstellung geeigneten Bakterienmaterials für die Polymerasekettenreaktion. Zu Beginn wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß Bakterienkolonien einer Subkultur in sterilem Wasser gelöst, bis sich die Flüssigkeit trübte. Das Gemisch wurde 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dann erfolgte das

Lösen des entstandenen Pellets in 200 µl InstaGene Matrix und eine Inkubation für 20 min bei 56 °C. Nach dem Vortexen des Gemisches für 10 sec bei Hochgeschwindigkeit, darauf folgender Inkubation für 8 min bei 100 °C, anschließendem Vortexen für 10 sec und Zentrifugieren bei 12000 rpm für 3 min konnte die im Überstand der Flüssigkeit befindliche DNA vorsichtig abpipettiert und für weitere Methoden genutzt werden. Nicht benötigte DNA ließ sich in der verbliebenden Flüssigkeit bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahren.

2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Vermehrung von spezifischen DNA-Molekülen. Eine DNA-Sequenz, die den zu vermehrenden DNA-Abschnitt (*template*) enthält, wird zusammen mit Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten (dNTP) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase zusammengebracht. Es folgt der Zusatz von Startersequenzen, den sogenannten Primern, die komplementär zu den Enden der zu vermehrenden Zielsequenz auf der Ursprungs-DNA sind. Durch anschließendes Erhitzen auf 96 °C wird die doppelsträngige DNA denaturiert und durch nachfolgendes Einstellen der für die komplementären Primer optimalen Temperaturen können diese an die aufgetrennte DNA binden. Durch Einstellen der Temperatur auf 60-70 °C kann dann die Polymerase, beginnend an den Primern, mit der Vervielfältigung der DNA-Abschnitte beginnen, so dass neue Tochter-DNA entstehen. Diese Vorgänge werden mehrmals durchlaufen, was zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Produkte führt (Buddecke 2002, Cypionka 2010).

Für die nachfolgenden Versuche wurde zuerst ein Mix aus den in Tabelle 9 aufgeführten Medien hergestellt, deren Menge zusammen ein Endvolumen von 50 µg ergab.

Tabelle 9: Mengenangaben für PCR-Medien

Inhaltsstoff	Menge
steriles Wasser	35,5 µl
Mg ²⁺ haltiger Puffer	5 µl
dNTP (Nukleotide)	1 µl
<i>for</i> _Primer	1,5 µl

<i>rev_Primer</i>	1,5 µl
Danazyme-DNA (Polymerase)	0,5 µl
DNA Extrakt (siehe 2.2.2.2)	5 µl

Bei mehreren Proben ließ sich die Mengen entsprechend multiplizieren. Alle Medien, bis auf die bakterielle DNA, wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Der Mg^{2+} haltige Puffer war zunächst zehnfach konzentriert. Durch das Hinzugeben der anderen Flüssigkeiten entstand schließlich eine einfache Konzentration des Puffers. Je nach Fragestellung erfolgte die Zugabe der jeweiligen Primer. Nach Zugabe der Reagenzien in das Eppendorfreaktionsgefäß erfolgte das Vortexen für 10 sec bei Höchstgeschwindigkeit. Danach wurden jeweils 45 µl des Mixes auf Eppendorfreaktionsgefäße (0,5ml Gefäße) verteilt, anschließend in die Gefäße jeweils 5 µl Bakterien-DNA eingefügt und erneut 10 sec gevortext. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem peqSTAR Cyclyer.

2.2.2.3.1 *vanA*-, *vanB*-PCR

Für die *vanA*-PCR kam der *vanA-forward* Primer und der *vanA-reverse* Primer zur Verwendung. Für die *vanB*-PCR erfolgte die Zugabe des *vanB-forward* Primers und des *vanB-reverse* Primers. Die Reaktionsvorgänge des Cyclers für die *vanA*- beziehungsweise *vanB*-PCR verliefen nach den in Tabelle 10 angegebenen Temperaturen und Zeiten.

Tabelle 10: *vanA*- und *vanB*-PCR

Reaktion	Temperatur	Dauer
1. Lösen der Primer (von gebundenen Antikörpern)	95 °C	2 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	1 min
5. Cyclen (Wiederholung Schritt 2.-4.)		35 x
6. Synthese (Bindung aller Einzelstränge vervollständigen)	72 °C	5 min

7. Kühlung (Aufbewahrung)	4 °C	endlos
---------------------------	------	--------

2.2.2.3.2 PCR zum Nachweis der Gene *liaF*, *liaR*, *liaS*

Vor der Durchführung der PCR zum Nachweis der Gene *liaF*, *liaR*, *liaS* mussten die geeigneten Annealingtemperaturen der entsprechenden Primer ermittelt werden. Dies gelang, indem die Proben auf dem Thermoblock eines PCR-Cyclers verteilt wurden, auf dem sich für jede Reihe eine gewünschte Annealingtemperaturen einstellen ließ (Mülhardt 2009). Zur Ermittlung der geeigneten Temperaturen für die Bindung der jeweiligen Primer wurde diese Gradienten-PCR jeweils mit den zwei Primern (*forward* und *reverse*) von *liaF*, *liaR* und *liaS* durchgeführt. Nach Auftrennung und farblicher Darstellung der DNA-Fragmente in der Agarosegelelektrophorese, erfolgte die Wahl der Annealingtemperaturen für die Reaktionsversuche, bei der sich die Banden im Gel am deutlichsten darstellten.

Für die nachfolgenden Reaktionen mit den Primern der Gene *liaF*, *liaR* und *liaS* kamen die benötigten Medien entsprechend der Tabelle 9 zur Anwendung. Die jeweilige PCR fand mit der hierfür mittels Gradienten-PCR ermittelten und in Tabelle 11 aufgeführten Annealingtemperatur statt. Die Zeiten der einzelnen Reaktionen entsprachen denen der *vanA*- beziehungsweise *vanB*-PCR. Anschließend folgte eine Agarosegelelektrophorese.

Tabelle 11: Bindungstemperaturen der Primer

Primer	Annealingtemperatur
<i>liaF_for</i> , <i>liaF_rev</i>	55 °C
<i>liaR_for</i> , <i>liaR_rev</i>	60 °C
<i>liaS_for</i> , <i>liaS_rev</i>	60 °C

2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese im Agarosegel lassen sich DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 10 Basenpaaren (bp) bis 1000 Kilobasen (kb) auftrennen. Um die DNA-Fragmente einer PCR sichtbar zu machen, kann eine horizontale Gelelektrophorese zur Anwendung kommen. Die Zugabe von Farbstoffen macht die PCR-Produkte im Gel sichtbar (vom Stein 2009).

Zunächst erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarose-Gel. Hierfür wurde 1,5 g Agarose mit 100 ml 0,5 x konzentriertem TBE-Puffer vermischt, in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und dann bei Zimmertemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 5 µl Farbstoff Red Safe™ wurde die Flüssigkeit in einen Gelträger mit einem Kamm zur Bildung von Taschen gegossen und abgekühlt. Nach Aushärtung des Gels wurde die Kammer mit 0,5 x konzentriertem TBE-Puffer, bis zur vollständigen Benetzung des Gels, aufgefüllt und der Kamm entfernt. Vor dem Einbringen der Proben in eine Geltasche erfolgte das Mischen von je 5 µl eines PCR-Produktes mit je 2 µl Ladepuffer. Zusätzlich wurde in die erste Geltasche 3,5 µl Größenstandard F-303 SD eingebracht, was einen Vergleich der Größe der Fragmente ermöglichte. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 130 V für eine Stunde. Anschließend wurden die Gelläufe mit dem Photodokumentationssystem ChemiDoc™ XRS sichtbar gemacht und dokumentiert.

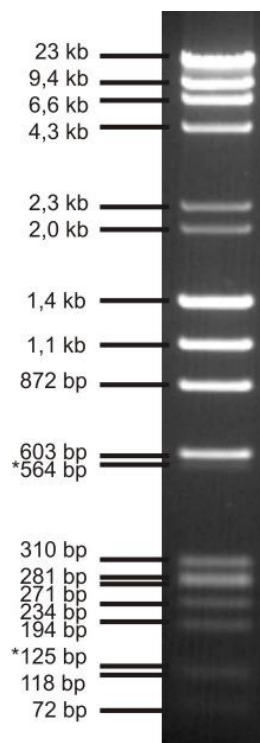


Abb. 2: Der Größenstandard F-303 SD. Dieser Marker für Gelelektrophoresen, enthält einen Mix aus: *Hind*III-gespaltener DNA des λ-Phagens und *Hae*III-gespaltener DNA des Phagens φX174. Die Banden sind ihrer nach Größe aufgetrennt und beschriftet. Mit * markierte Banden sind häufig aufgrund unzureichender DNA Mengen nicht sichtbar.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Beschreibung der analysierten *E. faecium*- Population

Es erfolgte zunächst eine Anzucht und Subkultivierung der Bakterien aus der Stammsammlung. Von insgesamt 133 *E. faecium*-Isolaten stammten 109 Isolate aus dem Kollektiv der Patienten der Klinik für Stammzelltransplantation und waren im Rahmen der Screeninguntersuchungen als gegenüber Vancomycin resistent identifiziert worden. 24 Isolate stammten von Patienten, die in anderen Kliniken des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf behandelt worden waren. Bei diesen Isolaten handelte es sich um Vancomycin-sensible Stämme.

Die Isolate der Knochenmarkstransplantationsstation stammten von 58 Patienten und wurden im Zeitraum 21.09.2009 bis 27.09.2011 entnommen. Bei 27 (46,6 %) dieser Patienten lag ein Isolat vor. Bei den übrigen 31 Patienten (53,4 %) lagen zusätzlich Folgeisolate, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf des Klinikaufenthaltes im Kontext wöchentlicher VRE-Screeninguntersuchungen angezüchtet worden waren, vor. Bei 22 Patienten lagen zwei Isolate, bei vier Patienten drei Isolate, bei einem Patienten vier Isolate, bei zwei Patienten fünf Isolate und bei zwei Patienten sechs Isolate vor. Ein Abstand von mindestens drei Wochen zwischen der Entnahme des Erst- und eines Folgeisolats lag bei 20 Patienten vor.

3.2 Analyse der Populationsstruktur der *E. faecium*- Stammsammlung

3.2.1 Prävalenz von *vanA* und *vanB* bei Vancomycin-resistenten *E. faecium* von KMT-Patienten

Für die Bestimmung des *van*-Typs der VRE-Isolate wurden die jeweils zeitlich ersten Probe der Patienten ausgewählt und einer *vanA*- und *vanB*-PCR unterzogen.

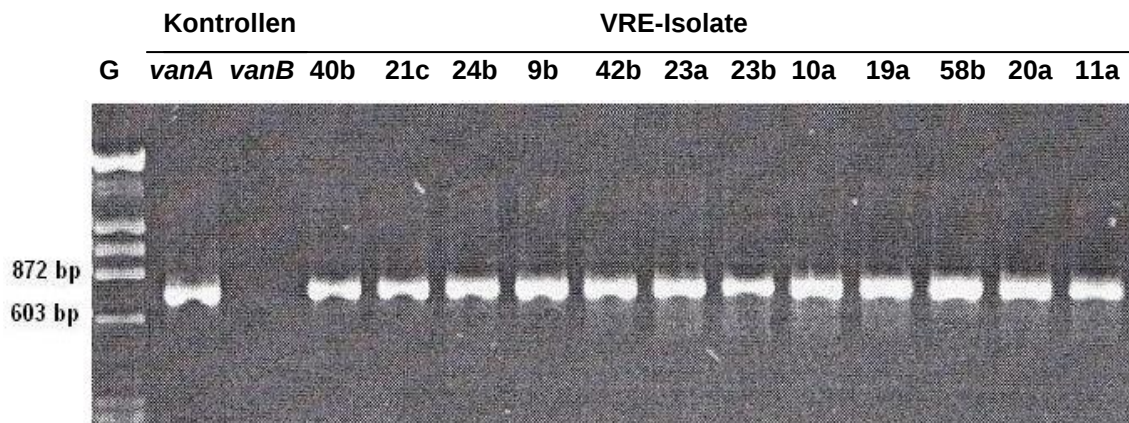


Abb. 3: Typisierung des *vanA/B*-Genotyps mittels PCR. Chromosomale DNA der VRE-Isolate wurde als *template* in einer PCR-Reaktion unter Verwendung *vanA*- und *vanB*-spezifischen Primern eingesetzt. Die resultierenden Amplifikate wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Die Bandendarstellung erfolgte durch Red Safe™. Eine Positiv- und Negativkontrolle erfolgte durch die Typisierung von bereits bekannten *vanA*- und *vanB*-Stämmen. Die Patientenproben sind nach Patientennummer und alphabetisch nach deren jeweiligen Isolaten zugeordnet (hier Darstellung von verschiedenen Erst- und Folgeisolaten). G: Größenstandard (Phage λ, *Hind*III-gespalten, Phage φX174, *Hae*III gespalten)

Von den insgesamt 58 Isolaten waren 48 (82,76 %) *vanA* positiv und zehn (17,24 %) *vanB* positiv.

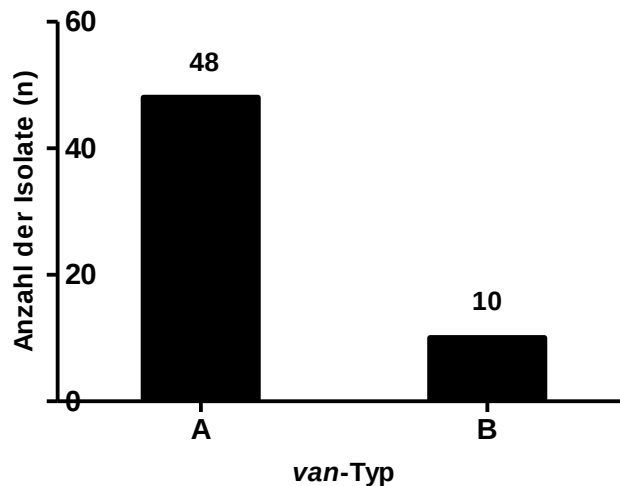


Abb. 4: Darstellung der Verteilung von *vanA*- und *vanB*-Typen im Kollektiv der 58 VRE Erstisolate.
vanA-Typ: 48 Isolate; *vanB*-Typ: 10 Isolate

3.2.2 Beschreibung der PFGE-Muster der Erstisolate von unterschiedlichen Patienten

Alle Erstisolate der 58 KMT-Patienten wurden einer PFGE unterzogen, um eine Aussage bezüglich einer möglichen Ausbruchssituation auf der KMT-Station zu ermöglichen. Zum Nachweis, ob es sich bei den 58 Patientenerstisolaten um jeweils identische oder unterschiedliche VRE Stämme handelte, wurde die klonale Verwandtschaft dieser Isolate anhand der Bandenmuster in der PFGE verglichen. Es stellte sich heraus, dass sich die Erstisolate der einzelnen Patienten in allen Fällen in mehr als vier Banden voneinander unterschieden. Nach der Bewertungsgrundlage von Tenover handelte es sich somit um klonal unterschiedliche Stämme (Tenover *et al.* 1995). Es lag demnach keine Ausbruchssituation auf der KMT-Station vor. Vielmehr schienen die KMT-Patienten von unabhängigen VRE-Klonen besiedelt zu sein.

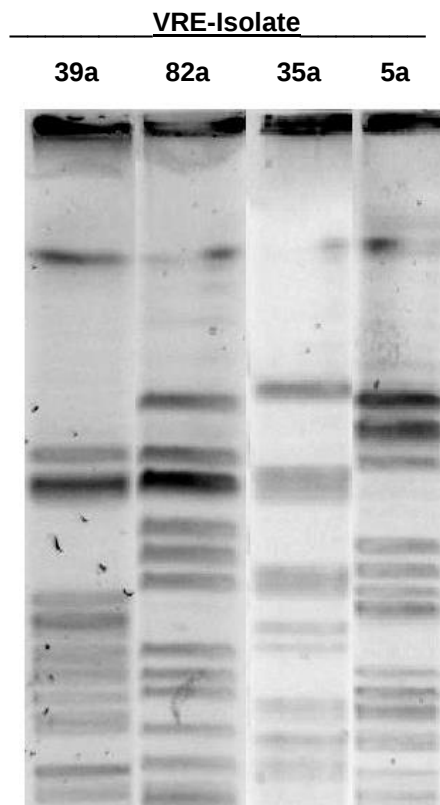


Abb. 5: Analyse der klonalen Verwandtschaft von VRE-Isolaten mittels PFGE. Am Beispiel der jeweils ersten Proben (erste Probe = a) von Patient Nr. 39, 82, 35 und 5 wird deutlich, dass die Bandenmuster der Patientenisolat voneinander differieren und es sich um klonal unterschiedliche Stämme handelt.

3.2.3 Beschreibung der Daptomycin-MHK-Verteilung bei VRE-Erstisolaten

Die zum frühesten Zeitpunkt des Klinikaufenthaltes isolierten VRE-Stämme (sogenannte Erstisolate) der 58 Patienten wurden mittels E-Test auf Ihre Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin geprüft. Von diesen 58 Isolaten hatten 17 (29,3 %) eine Daptomycin-MHK von 4 µg/ml. Bei 38 Proben (65,5 %) wurde eine MHK von 8 µg/ml gemessen. Mit jeweils einem Stamm konnten bei Erstisolaten MHK-Werte von 16 µg/ml (Isolat 25a), 32 µg/ml (Isolat 6a) beziehungsweise 64 µg/ml (Isolat 52a) nachgewiesen werden. Die durchschnittliche MHK betrug 8,34 µg/ml, der Median lag bei 8 µg/ml.

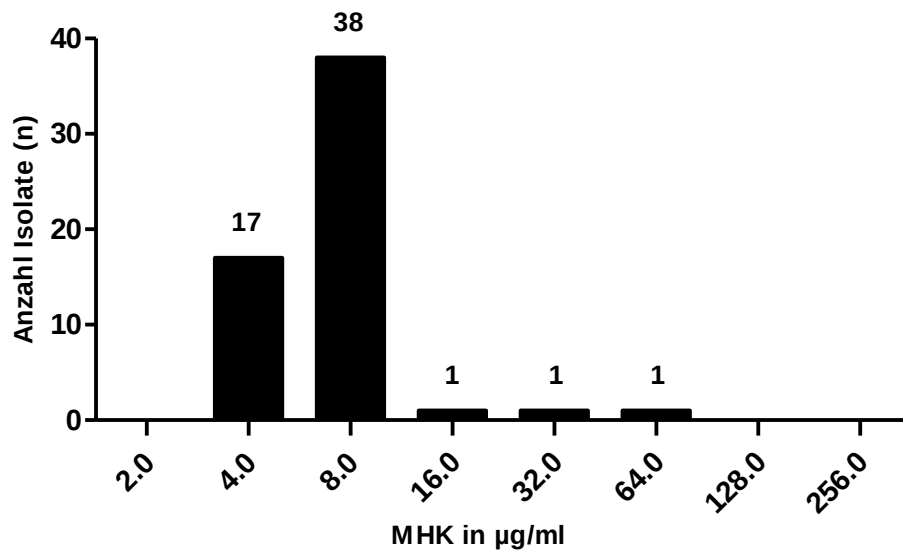


Abb. 6: Verteilung der Daptomycin-MHK der Erstisolate der 58 Patienten der KMT-Station. Mittelwert: 8,34 µg/ml; Median: 8 µg/ml.

Patient 25, dessen Erstisolat (25a) am 17.03.2011 entnommen worden war, wies eine Daptomycin-MHK von 16 µg/ml auf. Bei diesem Patienten hatte zum Zeitpunkt der Isolierung des Stamms noch keine Therapie mit dem Lipopeptid stattgefunden. Eine Daptomycintherapie erfolgte erst ab dem 04.04.2011 bis einschließlich 07.04.2011. Demnach besaß dieses Isolat primär eine verminderte Daptomycinsensibilität, die unabhängig von der Therapie evident wurde. Bei diesem Patienten lagen keine Folgeisolate mehr vor. Das Erstisolat (6a) von Patient 6 wies eine Daptomycin-MHK von 32 µg/ml auf. Es lagen keine Informationen mehr bezüglich einer möglichen Daptomycintherapie im Zeitraum vor der Stammanzucht vor. Auch hier gab es keine Folgeisolate des Patienten. Bei Patient 52 wies das Erstisolat (52a) eine Daptomycin-MHK von 64 µg/ml auf. Hier gab es ebenfalls keine Folgeisolate und es lagen keine Angaben bezüglich einer Daptomycintherapie vor.

3.2.4 Darstellung von *van*-Genotyp und Daptomycin-MHK

Es folgte eine Gegenüberstellung der Erstisolate mit einer gleichzeitigen Darstellung der *van*-Genotypen und der MHK-Werte.

Es stellte sich zunächst die Frage, wie die MHK-Werte einzuteilen waren. Da keine Daten bezüglich der Definition einer Daptomycinresistenz bei Enterokokken, insbesondere bei VRE, vorlagen, wurde eine Einordnung in

Anlehnung an die bei den Erstisolaten gemessenen Daptomycin-MHK-Werte vorgenommen. Da die durchschnittliche MHK der Erstisolate 8,34 $\mu\text{g/ml}$ betrug und der Median bei 8 $\mu\text{g/ml}$ lag, wurde angenommen, dass Isolate mit einer MHK > 8 $\mu\text{g/ml}$ vermutlich Eigenschaften besitzen, die eine Resistenzentwicklung begünstigen. Bei diesen Isolaten erfolgten später bei Vorliegen weiterer Kriterien genauere Analysen. Die MHK-Werte von ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ bei den anderen Isolaten ließen aufgrund der fehlenden Datenlage keine valide Interpretation bezüglich möglicher Resistenzeigenschaften zu.

Zunächst erfolgte die Analyse der *vanA*- und *vanB*-Gene der 58 Erstisolate. 48 Isolate besaßen das *vanA*-Gen, 10 Isolate das *vanB*-Gen. Es folgte dann die Gegenüberstellung der MHK-Werte bezogen auf den *van*-Typen. 45 der 48 *vanA*-positiven Isolate (93,75 % aller *vanA*-Isolate) wiesen eine MHK kleiner oder gleich 8 $\mu\text{g/ml}$ auf. Drei *vanA*-Isolate (6,25 % aller *vanA*-Isolate) hatten eine MHK, die größer als 8 $\mu\text{g/ml}$ war. Bei den zehn *vanB*-positiven Isolaten besaßen alle (100 % der *vanB*-Isolate) eine MHK kleiner oder gleich 8 $\mu\text{g/ml}$.

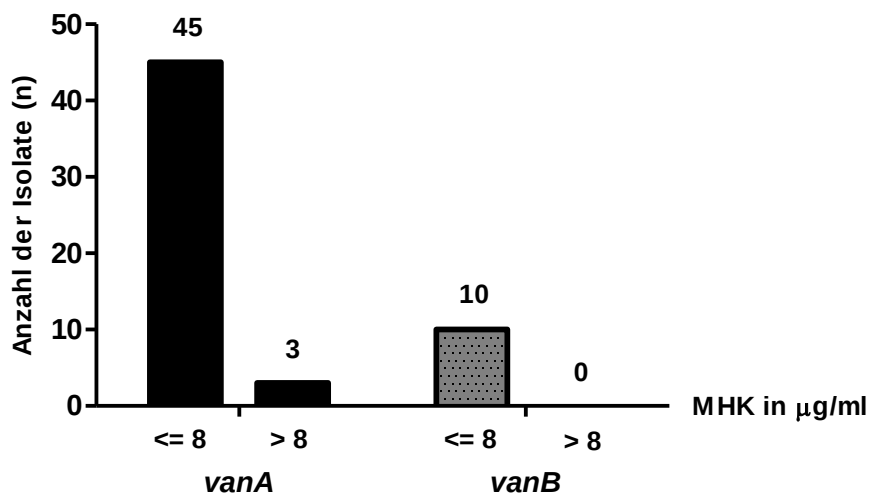


Abb. 7: Darstellung der Verteilung der MHK-Werte im Kollektiv der 58 VRE-Erstisolate bezogen auf den *van*-Typ. Bei den *vanA*-Typen wiesen 45 Isolate eine MHK kleiner oder gleich 8 $\mu\text{g/ml}$ und drei Isolate eine MHK größer als 8 $\mu\text{g/ml}$ auf. Von den *vanB*-Stämmen zeigten alle Isolate eine MHK kleiner oder gleich 8 $\mu\text{g/ml}$.

Dann erfolgte zum Vergleich dieselbe Analyse und Gegenüberstellung mit den aus anderen Kliniken des UKE stammenden *E. faecium*-Isolaten. Von diesen 24 Wildtyp-Stämmen wiesen zwei (8,33 %) eine Daptomycin-MHK von 2 µg/ml auf. Fünf (20,83 %) Isolate hatten eine MHK von 4 µg/ml und bei 17 (70,83 %) Isolaten wurden eine MHK von 8 µg/ml ermittelt. Kein Isolate zeigte eine MHK > 8 µg/ml. Es ergab sich ein Mittelwert von 6,66 µg/ml und ein Median von 8 µg/ml.

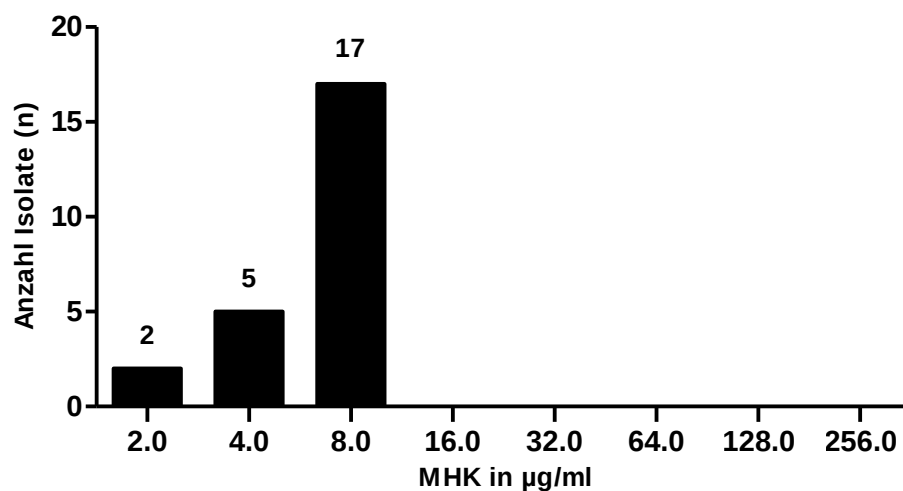


Abb. 8: Darstellung der Verteilung der MHK-Werte bei Vancomycin-empfindlichen *E. faecium*-Isolaten. Der errechnete Mittelwert lag bei 6,66 µg/ml und der Median bei 8 µg/ml.

3.3 Analyse von VRE-Folgeisolaten

3.3.1 Beschreibung der Klonalität von Verlaufsisolaten bei Vorliegen von n=2 Isolaten des Patienten

Im Folgenden wurde die Klonalität von Isolaten der KMT-Patienten analysiert, bei denen zwei oder mehr Isolate in einem Abstand von mindestens drei Wochen entnommen worden waren. Bei 20 Patienten trafen die Kriterien zu. Diese Isolate wurden mittels PFGE analysiert und die resultierenden Bandenmuster miteinander verglichen. Die Beurteilung der klonalen Verwandtschaft erfolgte anhand der Kriterien von Tenover (Tenover *et al.* 1995).

VRE-Isolat (Datum der Isolierung)

10a	10c
(24.03.2011)	(19.04.2011)

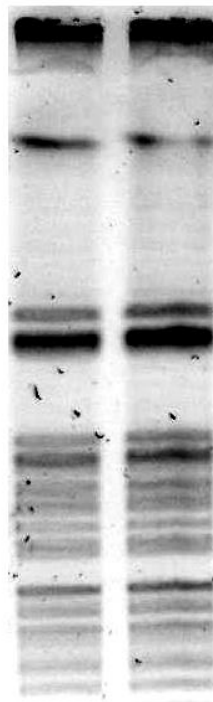


Abb. 9: Darstellung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *Sma*I-gespaltener chromosomaler DNA. Beispielhafte Darstellung der Klonalität von Folgeisolaten eines Patienten (Patient 10). Erstisolat (a) am 24.03.2011 (links) und Folgeisolat (c) am 19.04.2011 (rechts) entnommen.

VRE-Isolat (Datum der Isolierung)

51a	51b
(30.11.2010)	(08.03.2011)

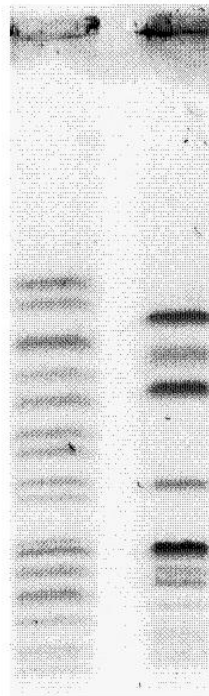


Abb. 10: Untersuchung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *Sma*I-gespaltener chromosomaler DNA. Beispielhafte Darstellung der Klonalität von Folgeisolaten eines Patienten (Patient 51). Erstisolat (a) am 30.11.2010 (links) und Folgeisolat (b) am 08.03.2011 (rechts) entnommen.

Zunächst erfolgte die nähere Betrachtung von Isolaten der Patienten, bei denen exakt zwei Isolate vorlagen. Dieses Kriterium lag bei elf Patienten vor. Der Vergleich der Bandenmuster in der PFGE zeigte, dass bei sieben Patienten beide Isolate ein identisches Bandenmuster aufwiesen und somit eine klonale Identität vorlag. Bei vier Patienten unterschieden sich die Bandenmuster des Erst- und Folgeisolates in mehreren Banden, so dass nach dem Bewertungsschema von Tenover von klonal unterschiedlichen Isolaten ausgegangen werden musste. Die Analyse verdeutlichte, dass die Patienten der KMT-Station im Verlauf ihres stationären Aufenthaltes sowohl mit klonal identischen als auch mit klonal unterschiedlichen Isolaten besiedelt sein konnten.

3.3.2 Beschreibung der Klonalität von Verlaufsisolaten bei Vorliegen von $n > 2$ Isolaten des Patienten

Im weiteren Verlauf wurden Isolate von den Patienten in der PFGE gegenübergestellt, bei denen mehr als zwei Isolate vorlagen und unter denen sich solche fanden, die mindestens einen dreiwöchigen Abstand zum Erstisolat aufwiesen. Bei neun Patienten lagen diese Kriterien vor. Dann wurden die Bandenmuster aller Isolate des jeweiligen Patienten chronologisch gegliedert und nach dem Schema von Tenover bewertet (Tenover *et al.* 1995). Hierbei ließen sich klonal unterschiedliche VRE-Stämme nachweisen, von denen wiederum im zeitlichen Verlauf klonal identische Folgeisolate vorlagen. Bei einem Patienten waren alle Isolate klonal identisch und gehörten somit zum selben Stamm. Bei sieben Patienten ließen sich insgesamt zwei verschiedene VRE-Stämme nachweisen. Ein Patient war im Verlauf mit drei unterschiedlichen VRE-Stämmen besiedelt.

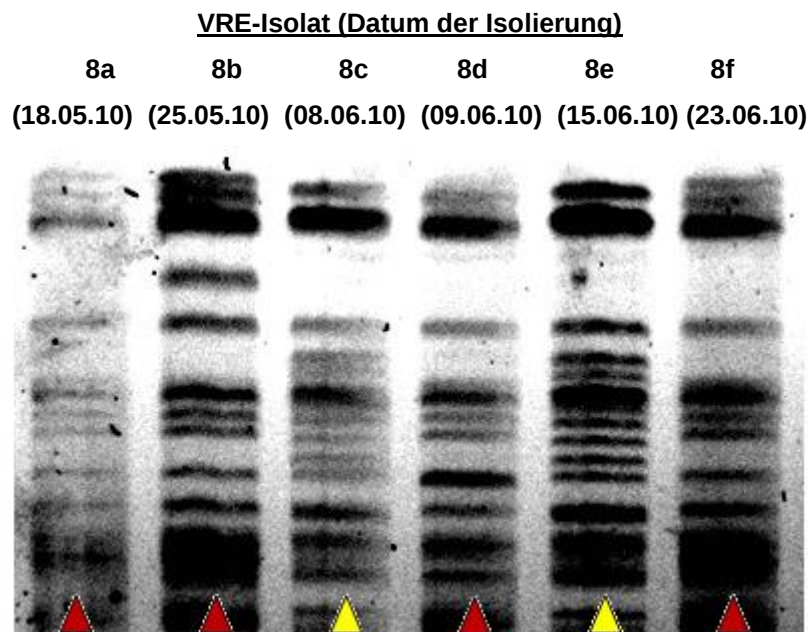


Abb. 11: Darstellung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *SmaI*-gespaltener chromosomaler DNA. Beispielhafte Darstellung der Klonalität von Folgeisolaten eines Patienten (Patient 8). Erstisolat (a) am 18.05.2010 (links) und Folgeisolate (b-f) bis 23.06.2010 (rechts) entnommen. Die Isolate 8a, 8b, 8d und 8f sind nach dem Bewertungsschema von Tenover als klonal identisch definiert (rote Dreiecke). Ein von diesen Isolaten abweichendes Bandenmuster weisen die Isolate 8c und 8e auf, die sich wiederum zueinander klonal identisch zeigen und somit einen zweiten VRE-Stamm darstellen (gelbe Markierung). Patient 8 ist folglich gleichzeitig mit mindestens zwei klonal unterschiedlichen Stämmen besiedelt, deren Isolate sich wiederum untereinander klonal identisch zeigen.

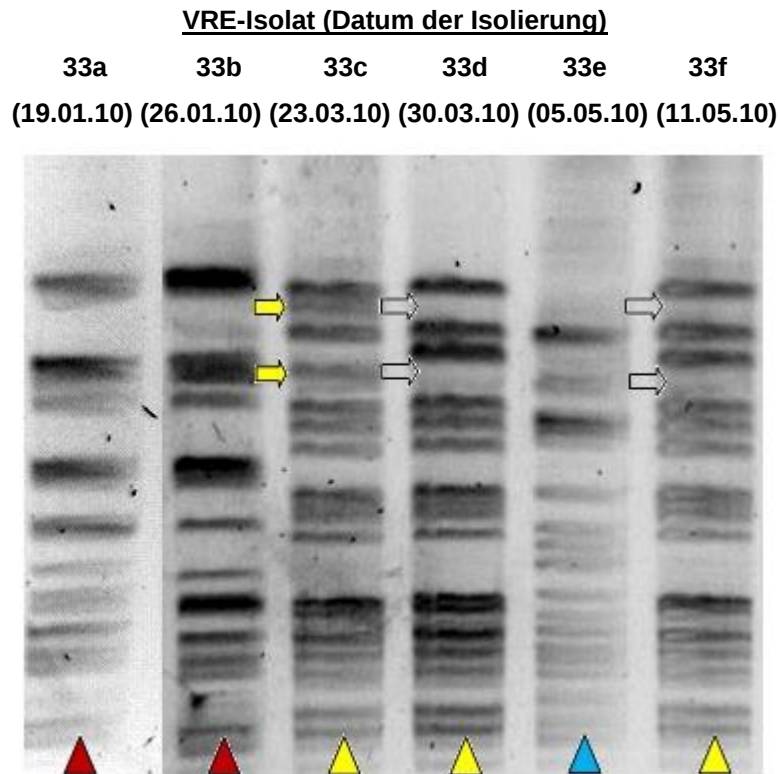


Abb. 12: Darstellung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *Sma*I-gespaltener chromosomaler DNA. Beispielhafte Darstellung der Klonalität von Folgeisolaten eines Patienten (Patient 33). Erstisolat (a) am 19.01.2010 (links) und Folgeisolate (b-f) bis 11.05.2010 (rechts) entnommen. Farblich sind die gleichen beziehungsweise ähnlichen PFGE-Muster markiert (rote, gelbe und blaue Dreiecke). Die horizontalen gelben Pfeile zeigen zwei Banden des Isolats 33c, welche in den Isolaten 33d und 33f fehlen (durch horizontale graue Pfeile markiert). Nach dem Bewertungsschema von Tenover sind die Isolate 33c, 33d und 33f als klonal identisch zu bewerten, da ihre Bandenmuster sich nur in zwei Banden unterscheiden.

Anhand des Vergleichs der PFGE-Bandenmuster konnte gezeigt werden, dass Patienten zeitgleich und über einen längeren Zeitraum mit mehreren VRE-Stämmen besiedelt sein können.

3.3.3 Beschreibung der Daptomycin-MHK im Verlauf

Es stellte sich die Frage, ob die einzelnen Stammpaare der Patienten Unterschiede bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin aufwiesen und wie sich diese über einen längeren Zeitraum entwickelte. Daher erfolgte die parallele Betrachtung der MHK-Werte einzelner Isolate von klonal identischen Stämmen. Hierfür erfolgte die Gegenüberstellung von Patientenisolaten, bei

denen der zeitliche Abstand von zwei klonal identischen Isolaten mindestens drei Wochen betrug. Dieses Kriterium lag bei 13 Patienten vor. Dann wurden die Isolate miteinander hinsichtlich ihres *van*-Typs, der Daptomycin-Therapie und der Daptomycin-MHK verglichen.

Bei acht Patienten war es im Verlauf bei den klonal identischen Isolaten zu keinem Anstieg der Daptomycin-MHK gekommen. Hiervon hatten fünf Patienten (Nr. 10, Nr. 17, Nr. 24, Nr. 32 und 42) nachweislich eine Daptomycintherapie erhalten. Bei Patient Nr. 10 wurde das Erstisolat vor und das Folgeisolat nach der Therapie entnommen. Die Daptomycingabe erfolgte an zwei Tagen. Ob es unter längerer Exposition zu einer Zunahme der MHK gekommen wäre, kann nicht beurteilt werden. Bei Patient Nr. 17 wurde das Folgeisolat nach Beginn der Daptomycintherapie entnommen. Hier blieb die MHK konstant. Auch das Folgeisolat von Patient 24 zeigte trotz Daptomycinexposition keine Veränderung der Sensibilität gegenüber dem Antibiotikum. Mögliche Ursachen für die konstante MHK könnten weitere molekulare Analysen möglicherweise aufdecken. Bei den Patienten Nr. 32 und Nr. 42 begann die Daptomycintherapie erst nach der Entnahme der Isolate. Eine Beurteilung, ob es unter der Daptomycintherapie zu einer Zunahme der MHK kam, ist nicht möglich, da keine weitere Probenentnahme mehr erfolgte. Bei Patient Nr. 39 lagen bezüglich der Antibiotikatherapie keine Informationen mehr vor. Die übrigen Patienten, bei denen die Isolate eine konstante Daptomycin-MHK aufwiesen, hatten keine Daptomycintherapie erhalten.

Tabelle 12: Eigenschaften der Erst- und Folgeisolate mit gleichem PFGE-Muster und mindestens drei Wochen Abstand, bei denen es zu keinem MHK-Anstieg gekommen war

Patienten-Code	van-Typ Erst- und Folge-isolat	Erstisolat Datum	Erstisolat MHK in µg/ml	Folge-isolat Datum	Folge-isolat MHK in µg/ml	Distanz (Tage) zwischen Isolaten	Dapto-mycin-therapie (Dauer in Tagen)	Exposition (Tage) zwischen Erst- und Folge-isolat
Nr. 4	A	12.01.11	8	15.02.11	8	35	nein	0
Nr. 10	A	24.03.11	8	19.04.11	8	27	28.03.11 - 29.03.11 (2 Tage)	2
Nr. 17	A	21.02.11	8	03.05.11	8	72	01.05.11 - 08.05.11 (8 Tage)	3
Nr. 24	A	18.05.10	4	08.06.10	4	22	26.05.10 - 05.06.10 (11 Tage)	11
Nr. 32	A	07.02.11	8	05.04.11	8	58	09.04.11 - 24.04.11 (16 Tage)	0
Nr. 39	A	18.05.10	8	28.06.10	8	42	nicht bekannt	0
Nr. 42	A	03.12.10	8	25.01.11	8	54	29.01.11 - 12.02.11 (15 Tage)	0
Nr. 50	A	01.02.11	8	22.03.11	8	50	nein	0

Bei fünf Patienten konnte im Verlauf bei den klonal identischen Isolaten ein Anstieg der Daptomycin-MHK nachgewiesen werden. Alle Patienten hatten eine Daptomycintherapie erhalten und das Folgeisolat war unter oder nach der Therapie entnommen worden. Bei Patient Nr. 7 war das Erstisolat vor und das letzte Folgeisolat nach einer Daptomycintherapie entnommen worden. Hier kam es unter der Antibiotikagabe zu einem Anstieg der MHK von initial 4 µg/ml auf 16 µg/ml. Bei Patient Nr. 8 lag das Erstisolat zeitlich vor der

Daptomycintherapie und das Folgeisolat nach der Therapie. Hier kam es unter der Daptomycinexposition zu einer MHK Zunahme von initial 8 µg/ml auf 64 µg/ml. Bei Patient Nr. 37 zeigte das vor der Therapie entnommene Erstisolat eine MHK von 4 µg/ml. Bei dem am letzten Tag der Lipopeptidgabe entnommenen Folgeisolat ließ sich ein MHK-Anstieg auf 16 µg/ml nachweisen. Patient Nr. 40 erhielt ebenfalls eine Daptomycintherapie, die im Zeitraum zwischen dem Erst- und dem Folgeisolat lag. Das Erstisolat wies eine MHK von 8 µg/ml auf. Bei dem Folgeisolat war es zu einer MHK-Zunahme auf 32 µg/ml gekommen. Bei Patient Nr. 45 wies das Erstisolat eine MHK von 8 µg/ml auf, das Folgeisolat eine MHK von 32 µg/ml. Hier war ebenfalls eine Daptomycintherapie im Zeitraum zwischen der Entnahme der Isolate erfolgt.

Tabelle 13: Eigenschaften der Erst- und Folgeisolate mit gleichem PFGE-Muster und mindestens drei Wochen Abstand, bei denen es zu einem MHK-Anstieg gekommen war

Patienten-Code	van-Typ Erst- und Folge-isolat	Erstisolat Datum	Erstisolat MHK in µg/ml	Folge-isolat Datum	Folge-isolat MHK in µg/ml	Distanz (Tage) zwischen Isolaten	Dapto-mycin-therapie (Dauer in Tagen)	Exposition (Tage) zwischen Erst- und Folge-isolat
Nr. 7	A	04.08.10	4	27.10.10	16	58	11.08.10 - 30.08.10 (20 Tage)	20
Nr. 8	A	18.05.10	8	23.06.10	64	37	27.05.10 - 15.06.10 (20 Tage)	20
Nr. 37	B	17.11.10	4	07.12.10	16	21	20.11.10 - 07.12.10 (18 Tage)	18
Nr. 40	A	15.06.10	8	13.07.10	32	29	20.06.10 - 27.06.10 (8 Tage)	8
Nr. 45	A	11.05.10	8	06.07.10	32	57	11.05.10 - 24.05.10 (14 Tage)	14

Zusammenfassend kam es bei allen fünf Patienten unter Daptomycintherapie zu einer Zunahme der MHK. Diese Isolate wurden nachfolgend weiter analysiert, um mögliche Voraussetzungen für das verminderte Ansprechen im Verlauf der Therapie zu eruieren.

3.4 Nachweis der Gene *liaF*, *liaS* und *liaR*

Isolate der fünf Patienten (Patient Nr. 7, 8, 37, 40 und 45), bei denen das Erst- und ein Folgeisolat mindestens drei Wochen auseinander lagen, welche ein identisches PFGE-Musters aufwiesen und bei denen sich eine MHK-Zunahme nachweisen ließ, wurden auf potentiell mit einer Daptomycin-Unempfindlichkeit assoziierte Genorte mittels PCR analysiert. Die Fokussierung lag hierbei auf den Genorten *liaF*, *liaR* und *liaS*, bei denen Mutationen mit der Entstehung einer Daptomycinresistenz diskutiert wurden (Eldholm *et al.* 2010, Arias *et al.* 2011, Arias und Murray 2012, Munita *et al.* 2013, Tran *et al.* 2013a, Tran *et al.* 2013b).

Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass bei allen analysierten Isolaten der fünf Patienten die Gene *liaF*, *liaR* und *liaS* nachzuweisen waren. Durch den Besitz dieser Gene erfüllten die Isolate, basierend auf den bisherigen Erkenntnissen der Literatur, die Voraussetzungen für eine Resistenzentwicklung.

Tabelle 14: Darstellung der Analyse der Gene *liaF*, *liaR* und *liaS* von selektierten Patientenisolaten, bei denen zwei Isolate klonal identisch waren, die mindestens drei Wochen auseinander lagen und bei denen es im Verlauf zu einem Anstieg der Daptomycin-MHK gekommen war. Bei allen Isolaten konnten die Gene *liaF*, *liaR* und *liaS* nachgewiesen werden.

Pat.-Code	Labor-Eingangs-Datum (LabEinDat)	MHK Daptomycin (µg/ml)	van-Typ	<i>liaF</i>	<i>liaR</i>	<i>liaS</i>
7a	04.08.10	4	A	pos	pos	pos
7b	27.10.10	16	A	pos	pos	pos
8a	18.05.10	8	A	pos	pos	pos
8f	23.06.10	64	A	pos	pos	pos
37a	17.11.10	4	B	pos	pos	pos
37b	07.12.10	16	B	pos	pos	pos
40a	15.06.10	8	A	pos	pos	pos
40b	13.07.10	32	A	pos	pos	pos
45b	11.05.10	8	A	pos	pos	pos
45d	06.07.10	32	A	pos	pos	pos

Zusätzlich zu den in den bisherigen Kapiteln des Ergebnisteils dargestellten Tabellen und Abbildungen findet sich eine ergänzende Übersicht der epidemiologischen und molekulargenetischen Analysen in Abb. 15, 16 und 17 im Anhang.

3.5 Sequenzanalyse von *liaFSR* und *cIs*

Um mögliche Ursachen für die veränderten Daptomycin-MHK zu detektieren, wurden weiterführende genetische Analysen von fünf VRE Isolaten mit einer veränderten MHK (VRE 7b, 8f, 37b, 40b und 45d) sowie von korrespondierenden, klonal identischen, Daptomycin-empfindlichen Ausgangsstämmen (VRE 7a, 8a, 37a, 40a und 45b) durchgeführt. Im Vordergrund des Interesses stand hierbei die Sequenzanalyse von Genen, in denen unabhängige Studien typische Mutationen bei der Entwicklung eines Daptomycin-unempfindlichen Phänotyps detektieren konnten. Bei den Genen handelte es sich um das *liaFSR*-Operon und das für die Cardiolipinsynthese kodierende *cIs*. *LiaFSR* und *cIs* wurde aus Präparationen chromosomaler DNA mittels PCR amplifiziert. Hierfür kamen spezifische Primer zur Verwendung (Arias *et al.* 2011, Humphries *et al.* 2012). Es folgte die Sequenzierung des jeweiligen Amplifikats. Bei der Sequenzanalyse konnten in *liaFSR* der VRE-Isolate mit veränderten Daptomycin-MHK keine Mutationen im Vergleich zu den empfindlichen Ausgangsstämmen dargestellt werden. In *cIs* hingegen konnten im paarweisen Vergleich bei vier von fünf Isolaten mit einer angehobenen Daptomycin-MHK (Folgeisolate Nr. 8f, 37b, 40b und 45d) nicht-synonyme Punktmutationen gefunden werden. Bei den Folgeisolaten der Patienten 8 und 45 (Isolat Nr. 8f und 45d) führten diese Mutationen zu Aminosäureaustauschen in einer Region, die zwischen zwei N-terminalen Transmembrandomänen liegt (VRE_8f: A20E; VRE_45d: D27N). Bei dem Isolat 8f kam es zu einem Austausch von Alanin zu Glutaminsäure an der Position 20 (Ala20→Glu), bei dem Folgeisolat 45d zu einem Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin an der Position 27 (Asp27→Asn). Bei dem Folgeisolat des Patienten 37 (Isolat Nr. 37b) führte eine Mutation in *cIs* zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin in einer enzymatisch aktiven PLDc Domäne an Position 218 (VRE_37b: R218Q; Arg218→Gln). Bei dem Folgeisolat des Patienten 40 (Isolat Nr. 40b) konnte eine Mutation in *cIs* detektiert werden, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 267 führte (VRE_40b: R267H; Arg267→His). Das Folgeisolat des Patienten 7 (Isolat Nr. 7b) zeigte in *cIs* keine neu entstandene Mutation im Vergleich zum Ausgangsisolat. Allerdings ergab die *cIs*-Sequenzanalyse der beiden Isolate, dass diese im

Vergleich zu dem in der Genbank angegebenen für die Cardiolipinsynthase kodierenden Gen *M7W_1574* eine 10 bp Deletion (Nukleotide 1300 – 1309) aufwiesen. Diese führte zu einem Frameshift, in dessen Folge es 9 Nukleotide stromabwärts des deletierten Bereichs zu einem neuen Stopcodon kam. Dementsprechend muss davon ausgegangen werden, dass beide Isolate nur zur Synthese eines verkürzten Cls in der Lage sind ($\text{Cls}\Delta_{437-483}$). Hierdurch fehlt vermutlich in beiden Isolaten ein Teil der zweiten PLDc Domäne von Cls, was zu einer Fehlfunktion der Cardiolipinsynthase führen könnte.

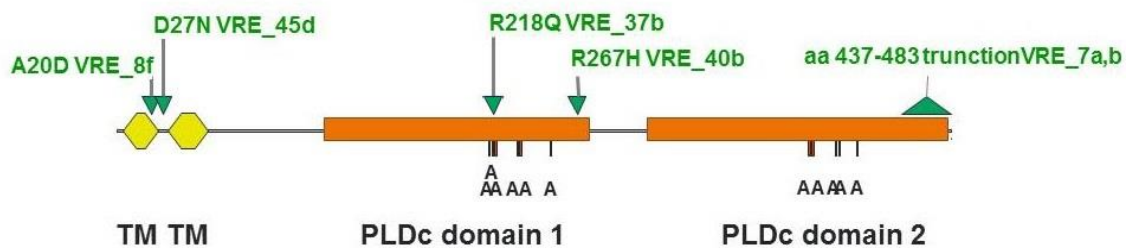


Abb. 13: Darstellung der Cardiolipinsynthase. Gekennzeichnet sind die Transmembrandomänen (TM), die PLDc Domänen (PLDc Domäne 1 und 2) und die katalytischen Zentren (A = aktives Zentrum). Mit grünen Pfeilen markiert sind die Regionen im Enzym, an denen es durch nicht-synonyme Punktmutationen zu einem Aminosäureaustausch bei den jeweiligen Isolaten (Isolat Nr. 8f, 37b, 40b und 45d) kam. Daneben ist die Region angezeigt, in der die Isolate des Patienten 7 (Isolate Nr. 7a und 7b) eine Deletion aufwiesen. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

Die *cls*-Sequenzanalyse von 5 weiteren VRE-Stammpaaren (Isolate der Patienten 4, 10, 17, 42, 50), bei denen das Erst- und ein Folgeisolat mindestens drei Wochen auseinander lagen, welche ein identisches PFGE-Musters aufwiesen und bei welchen es zu keiner Zunahme der Daptomycin-MHK gekommen war, zeigte keine synonymen Mutationen.

4. Diskussion

Die Therapie von Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken bei stammzelltransplantierten Patienten stellt eine Herausforderung dar. VRE zeigen Resistenzen gegenüber zahlreichen Antibiotika. Gleichwohl nicht offiziell für die Behandlung von VRE zugelassen, so stellt, vor dem Hintergrund der nur begrenzten therapeutischen Optionen, Daptomycin vor allem für die Behandlung von Vancomycin-resistenten *E. faecium* eine wichtige Substanz dar. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Empfindlichkeit von Vancomycin-resistenten *E. faecium* gegenüber Daptomycin im speziellen Patientenkollektiv der Hämatologie-Onkologie darzustellen. Da bisher unklar war, welchen Einfluss ein breiter Einsatz von Daptomycin auf intestinal kolonisierende VRE nimmt, wurden die Populationsstruktur und die Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin bei Vancomycin-resistenten *E. faecium* von Patienten der KMT-Station des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf ermittelt. Im Setting der KMT werden Antibiotikatherapien bei klinischen Zeichen einer Infektion regelhaft empirisch, also ohne Kenntnis des kausalen Agens, initiiert. Hierbei kommen Standardkombinationen zum Einsatz, die die wichtigsten zu erwartenden Pathogene erfassen. Gleichzeitig ermöglicht das Screening auf multiresistente Erreger in der enteralen Besiedlungsflora bereits frühzeitig eine gegen diese Erreger wirksame Antibiotikatherapie. Im Falle einer Kolonisation mit VRE kommt in der Klinik für Stammzelltransplantation regelhaft Daptomycin zum Einsatz. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der hier durchgeführten Analysen geprüft werden, ob es im Verlauf einer empirischen Therapie mit diesem Antibiotikum zu einer Veränderung der Daptomycinempfindlichkeit bei enteralen VRE-Stämmen kommen kann.

Die analysierten Isolate gehörten in der überwiegenden Zahl dem *vanA*-Typ an. Die übrigen Isolate waren *vanB*-Stämme. *VanA*- und *vanB*-Stämme besitzen unter den VRE die größte klinische Bedeutung. Dies zeigten Studien aus Deutschland sowie Auswertungen aus Europa, Asien, den USA und Lateinamerika. Am häufigsten trat bisher die *vanA*-vermittelte Vancomycin-Resistenz auf (Werner *et al.* 2008a). Nach aktuellen Studien nimmt die Prävalenz der *vanB*-Stämme, zumindest in Deutschland, zu. So kam es in

einigen Krankenhäusern in Südwestdeutschland in den letzten Jahren zu einem gehäuftem Nachweis von *vanB*-Stämmen (Klare *et al.* 2012a, Werner *et al.* 2012). Im Patientenkollektiv der KMT-Station trugen die Isolate in über 80 % die *vanA*-vermittelte Vancomycin-Resistenz. Wie sich die Verteilung in den nächsten Jahren verhalten wird, könnten weiterführende Studien zeigen. Eine Aussage, ob sich *vanA*- und *vanB*-Stämme bezüglich ihrer Resistenzeigenschaften gegenüber Daptomycin unterscheiden, lässt sich aufgrund der unzureichenden Datenlage derzeit noch nicht ableiten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte mittels PFGE-Analysen die klonale Verwandtschaft einzelner Patientenisolate verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass Patienten lange Zeit mit einem VRE-Klon besiedelt sein können. Das Vorkommen von einer Langzeitbesiedlung mit VRE wird auch in anderen Studien beschrieben. So konnte bei ambulant behandelten Patienten, unter anderem bei Kindern mit onkologischer Grunderkrankung, die mit VRE besiedelt waren und nicht mit Antibiotika behandelt wurden, VRE bis zu zwölf Wochen im Stuhl nachgewiesen werden. Vorrübergehend negative Stuhl- oder Analabstrichbefunde konnten unter erneuter, nicht gegen Enterokokken gerichteter Antibiotikatherapie wieder positiv werden, vermutlich durch die Abnahme der physiologischen Darmflora und dem hiermit einhergehenden Selektionsvorteil für VRE (Simon *et al.* 2004). Da präventive Antibiotikaregime die Mortalität von Patienten der Hämatologie-Onkologie verringern können, zählen sie zum unverzichtbaren Bestandteil eines Eindämmungs- beziehungsweise Präventivkonzeptes. Durch einen zunehmenden Einsatz von Antibiotika, insbesondere solcher mit Enterokokkenlücke, wird jedoch eine selektive Anreicherung von Enterokokken gefördert. Der Nachweis von Enterokokken mit Resistenz gegenüber Vancomycin bedeutet einen weiteren unabhängigen Risikofaktor. Präventive Antibiotikastrategien sollten, insbesondere vor dem Hintergrund, dass Patienten lange Zeit mit VRE besiedelt sein können, auch diese miteinbeziehen (DiazGranados *et al.* 2005a, DiazGranados *et al.* 2005b, Worth *et al.* 2007).

Neben der Beobachtung, dass Patienten lange Zeit mit einem VRE-Klon besiedelt sein können, wurde auch ersichtlich, dass eine parallele Besiedlung

zwei verschiedener Klone möglich ist. Dieses Erkenntnis ist von großer Bedeutung für die Diagnostik, insbesondere wenn einzelne VRE-Isolate auf ihre Resistenzeigenschaften hin untersucht werden. Ist ein Patient mit verschiedenen VRE-Klonen besiedelt, von denen einer eine hohe, der andere hingegen eine niedrige Sensibilität gegenüber dem getesteten Antibiotikum besitzt, besteht möglicherweise das Risiko, den weniger sensiblen Stamm bei einer einmaligen Diagnostik nicht zu erfassen. Durch eine wiederholte Probenentnahme, zum Beispiel bei längeren stationären Aufenthalten des Patienten, erhöht sich aber die Wahrscheinlichkeit, einen möglicherweise weniger sensiblen Stamm zu detektieren beziehungsweise Resistenz Tendenzen frühzeitig zu erkennen. Ein Screening sollte dabei immer der aktuellen Fragestellung und dem jeweiligen Patientenkollektiv individuell angepasst werden (Werner *et al.* 2008b).

Neben der Analyse klonaler Zusammenhänge, erfolgte bei den Isolaten der KMT-Patienten und bei Wildtyp-Vergleichsisolaten eine Auswertung der Daptomycin-MHK mittels E-Test. Es stellte sich hierbei die Frage, wie die Ergebnisse bei derzeit noch unsicherer Datenlage einzuordnen waren. Bisher wurden von der EUCAST keine klinischen *breakpoints* für die Resistenzbestimmung bei der Behandlung von Enterokokken mit Daptomycin festgelegt. Als epidemiologischer *cut-off*-Wert wird eine MHK von kleiner oder gleich 4 µg/ml angegeben. Dieser Wert basiert auf Wildtyp *E. faecium* ohne eine besondere Betrachtung von VRE (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2014). Die CLSI definiert Enterokokken im Allgemeinen als sensibel ab einer MHK kleiner oder gleich 4 µg/ml, legt aber in ihren Empfehlungen keine Werte für den intermediären oder resistenten Bereich fest (Clinical and Laboratory Standards Institute 2014). Eine Daptomycin-MHK von kleiner oder gleich 4 µg/ml kann auch nach empirischen Angaben aus der Literatur als sensibel bewertet werden (Schwartz *et al.* 2008, Werner *et al.* 2012, Bryant *et al.* 2013, Palavecino und Burnell 2013). Es bleibt jedoch offen, ab welchem MHK-Wert ein Isolat als resistent zu bezeichnen ist. Diesbezüglich liefern verschiedene Arbeiten lediglich Hinweise. So wurden in einer Studie 126 *E. faecium*-Isolate, von denen 109 dem *vanA*-Typ und 17 dem *vanB*-Typ

angehörten, untersuchten. 50 % der Isolate ließen sich ab einer MHK von 4 µg/ml hemmen. 90 % der Isolate wurden bei einer MHK von 8 µg/ml gehemmt (Jorgensen *et al.* 2003). In einer anderen Studie wurden MHK-Werte größer als 8 µg/ml als resistent bewertet (Munoz-Price *et al.* 2005). Nach diesen Angaben kann ab einer MHK von über 8 µg/ml mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Unempfindlichkeit gegenüber Daptomycin ausgegangen werden und man muss mit einem schlechteren Ansprechen oder einem Therapieversagen rechnen.

Bei der Betrachtung der Daptomycinempfindlichkeit im Rahmen dieser Arbeit fiel auf, dass sowohl die Isolate der Patienten der KMT-Station als auch die untersuchten Wildtyp *E. faecium* eine Tendenz zu höheren MHK-Werten aufwiesen als die von der EUCAST dokumentierten Wildtyp *E. faecium*. Beachtet werden muss, dass in der EUCAST nur Daten der Wildtyp *E. faecium* angegeben wurden und speziell für klinische Isolate, insbesondere für VRE keine Grenzwerte existieren (Klare *et al.* 2012b). Eine Interpretation der Messwerte der vorliegenden Arbeit ist demnach nur in Anlehnung an die bisher vorhandenen epidemiologischen Daten, den Ergebnissen anderer Studien sowie durch den Vergleich der für diese Arbeit erhobenen Werte möglich. Tendenzen bezüglich der Empfindlichkeitseigenschaften lassen sich hierdurch ableiten, insbesondere bei initial stark erhöhten MHK-Werten oder bei einem Anstieg der Daptomycin-MHK im Verlauf.

Eine Ursache für eine Verteilung der MHK-Werte am oberen Ende der Wildtypverteilung könnte auf einer größeren Potenz zur Ausprägung höherer MHK-Werte bei den untersuchten Isolaten liegen. Die Art der Krankenhausabteilung, das Patientengut, insbesondere ältere oder immunsupprimierte Menschen, sowie der vorherrschende Antibiotikadruck beeinflussen die Häufigkeit des Auftretens von resistenten Enterokokken (Klare *et al.* 2011, Judge *et al.* 2012). Demzufolge könnte der gehäufte Antibiotikaeinsatz, der bei stammzelltransplantierten Patienten, aber auch bei anderen Patienten in einem großen Universitätsklinikum, zu tragen kommt, eine Selektion von zu Resistenzen neigenden Enterokokken erklären.

Ein besonderes Setting besteht im Patientenkollektiv der KMT-Station. Hier isolierte VRE können infolge einer Antibiotikatherapie und der Immunsuppression einen Selektionsvorteil gegenüber anderen

darmkolonisierenden Keimen erhalten, was wiederum die Ausbildung von zu Resistenzen neigenden Isolaten begünstigt. Im Kollektiv der stammzelltransplantierten Patienten konnten drei Isolate mit primär deutlich erhöhter Daptomycin-MHK detektiert werden. Das Vorkommen einer primären Antibiotikaresistenz von Enterokokken wurde bereits beschrieben. So wurde von einer Unempfindlichkeit gegenüber Linezolid berichtet, obwohl zuvor keine Therapie mit diesem Antibiotikum erfolgte. Eine nosokomiale Übertragung Linezolid-resistenter Stämme oder die Entstehung von spontanen Mutationen des Erregers wurden als mögliche Ursachen in Erwägung gezogen (Simon *et al.* 2004, Schulte *et al.* 2008, Rice 2013). Demzufolge könnte es auch bei den analysierten VRE zu spontanen Mutationen gekommen sein, die zu einem verminderten Absprechen gegenüber Daptomycin führten. Einer weiteren Theorie zufolge können durch gehäufte Antibiotikagaben solche Erreger selektiert werden, die mehrfache Resistenzmechanismen besitzen und so einen Vorteil gegenüber anderen darmbesiedelnden Bakterien unter einer Antibiotikatherapie besitzen. Diese Erreger sind Teil der Darmflora, könnten aber nur bei einem Selektionsvorteil gegenüber den anderen Darmbakterien dominieren. Beispielsweise konnten sich *E. faecium*-Isolate des klonalen Komplex CC17 bei immunsupprimierten Patienten bei intakter Darmflora und fehlendem Selektionsdruck nicht gegenüber der normalen Darmflora durchsetzen. Eine Selektion dieser VRE kann aber durch die Anwendung von gegen Anaerobier gerichtete Substanzen wie Metronidazol oder Breitspektrumantibiotika mit Enterokokkenlücke wie Cephalosporine erfolgen, da sich hierunter die intestinale Flora zugunsten der Enterokokken verschieben kann (Klare *et al.* 2011). Das Vorkommen von VRE-Stämmen mit erhöhter MHK gegenüber Daptomycin bei Patienten der KMT-Station könnte somit aus einem erhöhten Antibiotikaselektionsdruck, der bei immunsupprimierten Patienten bei längeren Klinikaufenthalten häufig vorliegt, resultieren.

Weitere mögliche Ursachen für die Tendenz zu höheren MHK-Werten bei den beschriebenen Isolaten im Vergleich zu den von der EUCAST angegebenen Werten wurden in Erwägung gezogen. In einer Studie konnte über mehrere Jahre eine Zunahme der Daptomycin-MHK bei *E. faecium* nachgewiesen werden. Daraufhin wurde das Diagnoseverfahren kritisch hinterfragt und

mehrere Testverfahren, unter anderem die Microdillution und der E-Test, miteinander verglichen. Das Mikrodillutionsverfahren gilt als Goldstandard für die Sensibilitätsbestimmung bezüglich Daptomycin. Im Vergleich hierzu stellte sich heraus, dass mit dem E-Test bis zu 22 % höhere MHK-Werte gemessen wurden. Insgesamt ist das Mikrodillutionsverfahren aber aufgrund des Zeit- und Kostenaufwands für die Routinediagnostik nicht praktikabel und der E-Test wird hier weiterhin als eine geeignete Methode zur Empfindlichkeitsmessung eingestuft (Bryant *et al.* 2013). Es stellt sich die Frage, welche technischen Parameter die Messmethode mittels E-Test beeinflussen könnten. Es ist bekannt, dass sich die MHK durch die Wahl der Methode und der Medien beeinflussen lässt und sich bereits minimale Abweichungen auf die Resistenzlage bei Enterokokken bei der *in vitro*-Messung auswirken können. Für die Daptomycinsensibilitätsmessung mittels E-Test ist ein Calcium-haltiger Daptomycin-Teststreifen zu wählen (Palavecino und Burnell 2013). Auch bei Nutzung eines Müller-Hinton Agars ist die Calciumkonzentration im Nährmedium zu berücksichtigen, da diese einen Einfluss auf die Daptomycin-MHK hat. Es zeigte sich, dass bei einer Calciumkonzentration von 20,4 mg/l im Nährboden die Daptomycin-MHK höher gemessen wurden als bei 45,2 mg/l. Bei 52,0 mg/l lagen die Werte der Messung hingegen niedriger (Nakashima *et al.* 2012). Laut CLSI wird für die Bouillondilutionsmethode eine Calciumkonzentration von 50 mg/l für die Empfindlichkeitstestung von Daptomycin empfohlen. Für die Agardiffusionsmethode auf Müller-Hinton Agar existiert keine entsprechende Empfehlung, da diese Methode nicht CLSI validiert ist. Auf die E-Test-Messmethode wird dementsprechend in den CLSI-Empfehlungen nicht eingegangen (Clinical and Laboratory Standards Institute 2014). In Anlehnung an die Bouillondilutionsmethode werden für die *in vitro*-Daptomycinaktivitätsmessung auf Müller-Hinton Agar ebenfalls Calciumkonzentration von 50 mg/l als geeignet angesehen. Eine allgemein gültige Empfehlung bezüglich der Konzentration im Müller-Hinton Agar für die E-Test-Messung existiert derzeit noch nicht. Der Hersteller der für die vorliegende Arbeit genutzten Müller-Hinton Agarplatten nennt zwar nicht die genaue Konzentration an Calcium im Nährboden, gibt aber an, dass dieser die empfohlene Menge enthalte. Da die Aktivität von Daptomycin mit der

Konzentration des Calciums im Medium korreliert, könnten auch Varianzen im Calciumgehalt von Müller-Hinton Agarplatten die Empfindlichkeitsmessung beeinflussen (Fuchs *et al.* 2001, Silverman *et al.* 2001, Wise *et al.* 2001, Richter *et al.* 2003, Nakashima *et al.* 2012, Oxoid 2013, Clinical and Laboratory Standards Institute 2014). Weitere Forschung ist nötig, um die Ergebnisse der MHK-Messung bei der Verwendung der E-Test-Methode auf Müller-Hinton Agar besser bewerten zu können. Trotz der ungeklärten Ursache für die erhöhte MHK-Verteilung, ist nicht von der Hand zu weisen, dass die in der vorliegenden Arbeit mittels E-Test ermittelten Werte eine Unempfindlichkeit oder Tendenz zur Resistenzbildung gegenüber Daptomycin bei einigen Isolaten annehmen lässt. Es konnten Enterokokkenstämme detektiert werden, bei denen sich initial deutlich erhöhte MHK-Werte nachweisen ließen. Darüber hinaus zeigten einige Enterokokkenstämme im Verlauf eine deutliche Zunahme der Daptomycin-MHK.

Im weiteren Verlauf wurde der Frage nachgegangen, ob es insbesondere unter einer empirischen Therapie mit Daptomycin zu einer Veränderung der Daptomycinempfindlichkeit bei exponierten Isolaten kam. Hierfür wurden Stammpaare einzelner Patienten ausgewählt, die sich als klonal identisch erwiesen und die zeitlich drei Wochen oder länger auseinander lagen. In der weiteren Untersuchung der Isolate fiel auf, dass alle fünf Patienten, deren klonal identische Isolate im Verlauf eine MHK-Erhöhung vorwiesen, mit Daptomycin therapiert worden waren. Es ist anzunehmen, dass es durch das Lipopeptid zur Aktivierung von Resistenzmechanismen gekommen war. Es stellte sich die Frage, ob bei den Isolaten, die eine MHK-Erhöhung im Verlauf zeigten, molekulare Determinanten vorlagen, die eine Veränderung der Daptomycinempfindlichkeit vermitteln konnten. In diesem Zusammenhang wäre anzunehmen, dass die Antibiotikumexposition eine Heraufregulierung von Genen induzierte, die spezifische Resistenzmechanismen determinierten. Hierbei könnte es sich um Enzymsysteme, die zu Zielstrukturveränderungen führten oder die das jeweilige Antibiotikum degradierten, handeln. Andererseits könnte die Gabe von Antibiotika auch eine Stresssituation für die bakteriellen Erreger induziert haben, die zur Selektion von spontan entstandenen Mutanten

fürte, bei welchen es durch chromosomale Veränderungen (Deletion, Insertion, Einzelbasenaustausche) zur Expression veränderter Genprodukte und so zu einer Empfindlichkeitsverminderung kam (Tran *et al.* 2013a, Tran *et al.* 2013b). Tatsächlich sind die molekularen Vorgänge, die eine Veränderung der Daptomycinempfindlichkeit bei Enterokokken verursachen, bislang nur unvollständig verstanden.

Hinweise bezüglich solcher molekularer Resistenzmechanismen lieferten einzelne Arbeiten über Enterokokken mit erhöhten Daptomycin-MHK-Werten. So wurde eine Assoziation zwischen Mutationen im Gen *gdpD*, welches für eine Glycerophosphodiesterphosphodiesterase kodiert, und im Gen *cls*, welches für eine Cardiolipinsynthase kodiert, angenommen. Diese genetischen Veränderungen könnten durch Beeinflussung der Bakterienzellmembran zu einer Anhebung der Daptomycin-MHK führen (Arias und Murray 2012). Eine wichtige Bedeutung wurde bisher auch den Genen *liaF*, *liaS* und *liaR* zugeschrieben, die das regulatorische System der bakteriellen Zelloberfläche bei Stress regulieren (Suntharalingam *et al.* 2009, Eldholm *et al.* 2010, Munita *et al.* 2013). In einer Studie fand man bei Isolat mit erhöhter Daptomycin-MHK (bis zu 16 µg/ml) Mutationen im *liaFSR*-System (Munita *et al.* 2012). Eine weitere Studie verdeutlichte, dass insbesondere das Einbringen eines mutierten *liaF*-Allels zu einer Abnahme der Daptomycinsensibilität führen kann. Hierbei wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Mutation im *liaF*-Gen und einer Toleranzzunahme gegenüber Daptomycin postuliert (Munita *et al.* 2013). Durch die Sequenzierung Daptomycin-empfindlicher und -resistenter Isolate, an denen experimentell Allele ausgetauscht wurden, konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass es durch Deletionen in den Genen *gdpD* und *liaF* zu einer Unempfindlichkeit gegenüber Daptomycin kommen kann. Isolate, die in beiden Genen eine Deletion aufwiesen, zeigten MHK-Werte von 12 µg/ml. Das experimentelle Einbringen einer Deletion in das *liaF*-Gen eines vorher sensiblen Isolats (MHK 1 µg/ml) resultierte mit einer Zunahme der MHK auf 4 µg/ml, wohingegen eine Deletion allein im *gdpD* keine MHK-Erhöhung hervorrief. Das Einbringen beider veränderter Gene führte hingegen zu einer MHK-Zunahme auf 12 µg/ml. Ein Allelaustausch im Gen *cls* fand bei diesen Untersuchungen nicht statt. Nachgewiesene Mutationen im Gen *cls* bei Isolat

mit erhöhten MHK-Werten legten aber die Vermutung nahe, dass auch dieses Gen am Resistenzmechanismus beteiligt ist. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass die analysierten Genmutationen zu einer Änderung des Membranpotentials und so zu Veränderungen der Zelloberfläche der Enterokokken führten. Hierdurch verringert sich vermutlich das Ansprechen gegenüber Daptomycin (Arias *et al.* 2011). Möglicherweise sind noch weitere Gene an Resistenzmechanismen gegenüber Daptomycin beteiligt. So wird auch dem Gen *esp* eine Bedeutung bei Resistenzmechanismen zugeschrieben. In einer Studie wurde bei *vanA*- und *vanB*-VRE nach einer Exposition mit Antibiotika eine vermehrte Expression des potentiellen Virulenzgens *esp* beobachtet (Simon *et al.* 2004). Aktuell stehen auch Veränderungen im YycFGHIJ-System, welches in Regulationsprozesse der Zellmembran involviert ist, im Verdacht, das Ansprechen gegenüber Daptomycin beeinflussen zu können (Diaz *et al.* 2014).

Insbesondere eine These wird im Zusammenhang mit der Entwicklung von Sensibilitätsabnahmen gegenüber Daptomycin vertreten. Eine Antibiotikatherapie mit dem Lipopeptid erzeugt Stress bei den Enterokokken. Dieser induziert Mutationen im sogenannten Drei-Komponenten-System. Es wird postuliert, dass Veränderungen in den Genen *liaFSR* dieses Systems wiederum Mutationen in den Genen *gdpD* oder *cls* induzieren. Infolge dessen kommt es zu Veränderungen in der Zellmembran, woraus das verminderte Ansprechen auf das Daptomycin resultiert. Es wird angenommen, dass eine initiale Mutation in einem Gen des Drei-Komponenten-Systems für die Entwicklung der Resistenzentwicklung nötig ist, um weitere Veränderungen zu induzieren (Eldholm *et al.* 2010, Arias *et al.* 2011, Palmer *et al.* 2011, Arias und Murray 2012, Munita *et al.* 2013, Tran *et al.* 2013a, Tran *et al.* 2013b, Diaz *et al.* 2014). Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit bei allen klonal identischen Erst- und Folgeisolaten, bei denen es innerhalb von drei Wochen oder mehr zu einer Erhöhung der Daptomycin-MHK gekommen war, eine PCR auf das Vorhandensein der Gene *liaF*-, *liaS*- und *liaR*. Bei allen Isolaten konnten diese Gene nachgewiesen werden. Sie trugen somit, beruhend auf der bisherigen Datenlage, die Voraussetzung für eine Resistenzentwicklung. Hinweise darauf, ob diese potentielle molekulargenetische Disposition bei den

Isolaten tatsächlich ursächlich für die erhöhte Resistenzbereitschaft war, lieferte eine weitere Analysen durch Genomsequenzierung. Diesbezügliche Ergebnisse könnten in Zukunft auch diagnostisch relevant sein, um VRE und weitere zur raschen Ausprägung von Resistenzen befähigte Erreger zu identifizieren und um ihre Virulenzmechanismen besser zu verstehen (Rohde *et al.* 2011, Goering *et al.* 2013, Werner 2013a). Darüber hinaus könnten molekulare Analysen dazu beitragen, eine Antibiotikatherapie optimal anzupassen (Roemer und Boone 2013).

Vor diesem Hintergrund fanden weiterführende molekulargenetische Analysen des *liaFSR*-Operons und des Gens *c/s* mittels Sequenzierung statt. Hierbei zeigten sich keine molekulargenetischen Veränderungen in *liaFSR* der VRE-Isolate. In *c/s* hingegen ließen sich Punktmutationen, die bei den Folgeisolaten zu Aminosäureaustauschen führten, sowie in einem Fall eine Deletion, die zu einem Frameshift führte, nachweisen. Das Gen *c/s* kodiert für die Cardiolipinsynthase, die ein Membran-assoziiertes Protein ist, welches Cardiolipin aus zwei Phosphatidylglycerolen herstellt. Die Cardiolipinsynthase enthält zwei N-terminalen Transmembrandomänen und zwei Phospholipase D Domänen. Mutationen im Gen *c/s* wurden bereits in Zusammenhang mit einer Daptomycinunempfindlichkeit gebracht. Vermutlich führen sie zu Veränderungen der Zellmembran von Enterokokken und so zu einem verminderten Ansprechen gegenüber dem Lipopeptid (Davlieva *et al.* 2013, Humphries *et al.* 2013, Kelesidis *et al.* 2013b). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die MHK-Erhöhen der analysierten Isolate aus Mutationen im *c/s* resultierten. Hinweise hierauf zeigten auch molekulargenetische Analysen anderer Arbeiten, die ähnliche wie die bei den Patientenisolaten gefundenen Veränderungen nachwiesen (Abb. 14). So stimmte die im Isolat 37b gefundene Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 218 führte (VRE_37b: R218Q), mit den Ergebnissen einer Publikation überein, bei der bei einem Isolat Erhöhungen der Daptomycin-MHK (48 µg/ml) und der Vancomycin-MHK (256 µg/ml) vorlagen. Ein Vergleichsisolat mit derselben Mutation im *c/s* zeigte eine Daptomycin-MHK von 32 µg/ml und eine Vancomycin-MHK von 16 µg/ml. Das Isolat 37b dieser Arbeit wies eine erhöhte Daptomycin-MHK von 16 µg/ml auf. Ein Zusammenhang mit der

nachgewiesenen Mutation im *c/s* ist demnach anzunehmen (Arias *et al.* 2011). In einer weiteren Publikation fand man die gleiche Veränderung im *c/s*. Hier vermutete man, dass durch die Mutation der Phospholipidmetabolismus der Cardiolipinsynthese verhindert ist. Ein *in vitro*-Allelaustausch dieser Mutation führte jedoch nicht zu einer verminderten Daptomycinresistenz. Es stellt sich daher die Frage, ob zusätzlich weitere Ereignisse notwendig sind, um eine Sensibilitätsabnahme gegenüber dem Lipopeptid herbeizuführen (Tran *et al.* 2013a). In einer Arbeit fand man eine Mutation, die eine Phospholipase D Domäne betraf. Diese führte zu einem Austausch von Histidin zu Arginin an der Position 215. Hier korrelierte eine erhöhte Daptomycin-MHK von 48 µg/ml mit einer erhöhten Vancomycin-MHK von 256 µg/ml (Arias *et al.* 2011). Das Folgeisolat des Patienten 40 (Isolat Nr. 40b) wies ebenfalls eine die Phospholipase D Domäne betreffende Mutation in *c/s* auf. Diese führte zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 267. Die Daptomycin-MHK zeigte sich mit 32 µg/ml ebenfalls stark erhöht. Mutationen, die diesen Bereich betreffen, scheinen einen Zusammenhang mit der Daptomycinsensibilität zu besitzen. Es bleibt jedoch offen, ob weitere Veränderungen nötig sind, um Zunahmen in der MHK von Daptomycin herbeizuführen.

Die Isolate 8f und 45d wiesen Mutationen auf, die zu Veränderungen in einer Region zwischen zwei N-terminalen Transmembrandomänen führten. Ähnliche Mutationen in *c/s*, die an anderer Position zu Aminosäureaustauschen führen, wurden bisher beschrieben und ein Zusammenhang mit einem verminderten Ansprechen auf Daptomycin aufgrund dieser Veränderungen angenommen. Aminosäureaustausche von Asparagin zu Isoleucin in der Region 13 (N13→I), von Asparagin zu Serin in der Region 12 (N12→S) und von Asparagin zu Threonin in der Region 12 (N12→T) wurden in diesem Zusammenhang beschrieben (Arias *et al.* 2011, Humphries *et al.* 2012, Kelesides *et al.* 2013b). Die Isolate 7a und b wiesen eine bisher nicht beschriebene Deletion auf, die die Kodierung eines Stopcodons zur Folge hatte, wodurch es vermutlich zu einer Synthese einer verkürzten Cardiolipinsynthese kam. Da eine derartige Mutation bisher nicht bekannt war, kann nur vermutet werden, dass dies die Ursache für

das verminderte Ansprechen gegenüber Daptomycin war (Isolat 7a MHK 4 µg/ml, Isolat 7b 16 µg/ml).

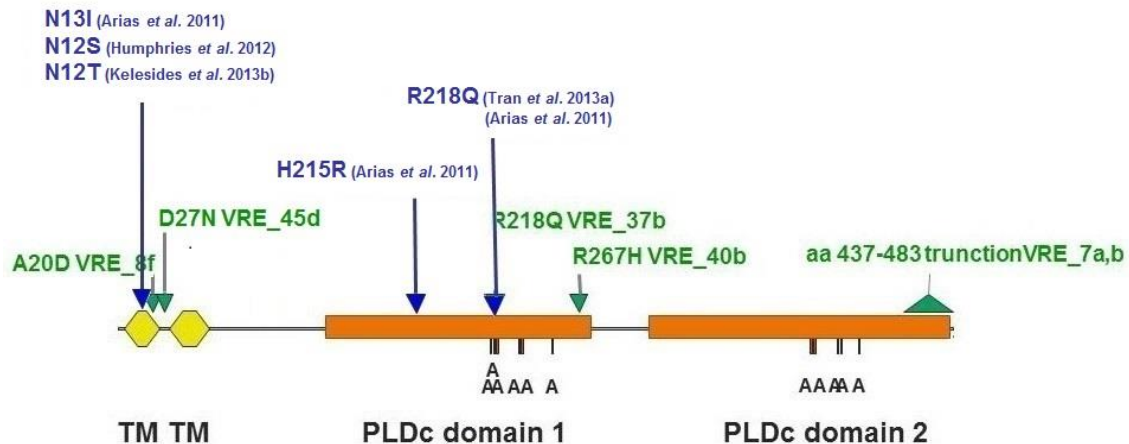


Abb. 14: Darstellung der Cardiolipinsynthase mit bekannten und neuen Mutationen. Gekennzeichnet sind die Transmembrandomänen (TM), die PLDc Domänen (PLDc Domäne 1 und 2) und die katalytischen Zentren (A = aktives Zentrum). Mit grünen Pfeilen markiert sind die Regionen im Enzym, an denen es durch nicht-synonyme Punktmutationen zu einem Aminosäureaustausch bei den jeweiligen Isolaten (Isolat Nr. 8f, 37b, 40b und 45d) kam. Daneben ist die Region angezeigt, in der die Isolate des Patienten 7 (Isolate Nr. 7a und 7b) eine Deletion aufwiesen. Zusätzlich sind mit blaue Pfeilen Mutationen im *c/s* aus anderen Publikationen eingefügt. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

Veränderungen im *c/s* alleine oder möglicherweise in Kombination mit anderen Mutationen führen vermutlich zu einem verminderten Ansprechen von VRE gegenüber Daptomycin. Dabei bleibt offen, wieso es bei den analysierten Isolaten nicht zu Auffälligkeiten in *liaFSR* kam, da Veränderungen in einem dieser Gene als ursächlich für eine Verminderung der Daptomycinsensibilität beschrieben wurden. Weitere molekulare Analysen auffälliger Isolate wären für eine abschließende Klärung dieser Fragestellung nötig.

Daptomycin gilt trotz der bisher beschriebenen MHK-Erhöhungen im Allgemeinen als ein effektives Antibiotikum gegenüber VRE (Tran *et al.* 2012, Rolston *et al.* 2014). Daher stellte sich abschließend noch die Frage, wie eine Antibiotikatherapie mit Daptomycin erfolgen sollte, um eine hohe Wirksamkeit zu erzielen und eine Sensibilitätsabnahme zu vermeiden. Zu Beginn der Arbeit waren nur vereinzelte Studien über mögliche Empfindlichkeitsabnahmen veröffentlicht worden. Seit Beginn des Jahres 2012 wurden jedoch vermehrt Publikationen über verminderte Daptomycinsensibilitäten bei VRE bekannt.

Dies spiegelt die zunehmende klinische Relevanz der Thematik wieder. Um das Therapieregime zu verbessern, wird derzeit die optimale Dosis von Daptomycin bei Infektionen mit VRE diskutiert. Zum Teil wird eine Daptomycintherapie mit 10 mg/kg/Tag bei schweren Infektionen durch Enterokokken empfohlen (Werth *et al.* 2014). Bei Konzentrationen von 6, 8 oder 10 mg/kg/Tag konnten aber bereits reduzierte Sensibilitäten beobachtet werden. Eine Dosis von 12 mg/kg/Tag kann daher gegebenenfalls als alternative Therapie im Fall von endovaskulären Infektionen diskutiert werden (Arias *et al.* 2010, Hall *et al.* 2012). Neben einer Dosiserhöhung können auch Kombinationstherapien das Ansprechen von Enterokokken verbessern. Ein Synergismus mit Rifampicin für die Therapie von *E. faecium*-Infektionen wird beschrieben. Die Wirkung des Daptomycins auf die Bakterienzellwand erleichtert hierbei das Eindringen von Rifampicin in den Erreger (Pankey *et al.* 2005, Arias *et al.* 2010). Auch die Kombination mit einem Aminoglykosid wird empfohlen (Brodt und Smollich 2013). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich bei therapieresistenten Enterokokken eine Erhöhung des Daptomycins auf 12 mg/kg/Tag in Kombination mit Ampicillin als sinnvoll erweisen kann. In einer Arbeit zeigte sich bei einem Daptomycin-empfindlichen, aber als Ampicillin-resistent getesteten VRE-Isolat in einem pharmakodynamischen *in vitro*-Modell die Gabe von niedrig dosiertem Daptomycin (4 mg/kg/Tag) und Ampicillin (2 g intravenös alle vier Stunden) wirksamer als eine Monotherapie mit hochdosiertem Daptomycin (10 mg/kg/Tag). Ampicillin verbesserte hierbei die Bindungsfähigkeit des Daptomycins, wodurch die bakterizide Potenz anstieg (Sakoulas *et al.* 2012). Eine andere Arbeit bestätigte, dass *E. faecium*-Isolate, die gegenüber Daptomycin unempfindlich waren, auf eine Kombination von Daptomycin mit Ampicillin ansprachen. Dieses Phänomen trat allerdings nur bei Isolaten mit Veränderungen in den Genen *liaFSR* auf (Diaz *et al.* 2014). Zusammenfassend kann die Wirkung von Daptomycin durch eine Anpassung der Dosis oder durch eine Kombination mit synergistisch wirkenden Antibiotika verstärkt werden. Die Therapie sollte dabei immer individuell und in Abhängigkeit an die klinische Situation des Patienten erfolgen. Unbekannt ist derzeit noch die Bedeutung der Serumcalciumkonzentration des Patienten unter Therapie mit Daptomycin, da

das Lipopeptid seine Wirkung in Abhängigkeit von Calcium entfaltet (Kelesidis *et al.* 2013b).

5. Zusammenfassung

Stammzelltransplantierte Patienten stellen ein Risikokollektiv für Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken dar. Bisher liegen kaum Daten über die Empfindlichkeit von VRE von stammzelltransplantierten Patienten gegenüber dem in der Eskalationstherapie eingesetzten Antibiotikum Daptomycin vor. In der vorliegenden Arbeit galt es zu klären, welche Auswirkungen der Einsatz von Daptomycin auf intestinal kolonisierte VRE hat. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten sowohl mit klonal identischen als auch mit klonal unterschiedlichen Isolaten über längere Zeit besiedelt sein können. Diese können unabhängig voneinander ihre Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin ändern. Es konnte verdeutlicht werden, dass VRE das Potential zur Daptomycinresistenz tragen. Eine verminderte Empfindlichkeit war zum einem mit einer Daptomycinexposition assoziiert, zum anderen ist auch das Vorliegen einer primären Daptomycinunempfindlichkeit möglich. Mehrere Ursachen für eine Sensibilitätsabnahme gegenüber Daptomycin wurden diskutiert. Neben einem erhöhten Selektionsdruck scheinen vor allem Mutationen in potentiellen Resistenzgenen der Enterokokken eine Rolle zu spielen. Mittels PFGE als klonal identisch identifizierte Stammpaare, die einen zeitlichen Abstand von mindestens drei Wochen aufwiesen und eine Zunahme der Daptomycin-MHK zeigten, trugen alle die Gene *liaF*, *liaS* und *liaR*. Mutationen in diesen Genen werden derzeit im Zusammenhang mit Unempfindlichkeiten gegenüber Daptomycin diskutiert. Bei den Patientenisolaten ließen sich im Laufe der Daptomycintherapie aber keine Mutation in den Genen *liaF*, *liaS* und *liaR* nachweisen. Stattdessen zeigten sich Mutationen im Gen *cIs*. Vermutlich führten diese zu Veränderungen der Bakterienzellmembran und so zu einem verminderten Ansprechen gegenüber Daptomycin. Insbesondere bei Risikopatienten, wie dem Kollektiv immunsupprimierter Patienten der KMT-Station, kann eine Abnahme der Sensibilität gegenüber Reserveantibiotika verheerende Folgen haben. Zusammenfassend konnte die zunehmende klinische Relevanz von Mechanismen, die bei VRE zu einem geringeren Ansprechen auf Daptomycin führen können, verdeutlicht werden. Weitere Forschung ist nötig, um molekulare Resistenzmechanismen weiter aufzudecken.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>a. bidest</i>	<i>aqua bidest</i> (zweifach destilliertes Wasser)
<i>ad</i>	bis zu
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
Ca ²⁺	Calcium
Cat. No.	<i>catalog number</i>
CC	<i>clonal complex</i>
<i>cls</i>	vermeintliches Resistenzgen
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cSSTI	<i>complicated skin and soft-tissue infections</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidyl-Triphosphat
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
ECOFF	<i>epidemiological cutoff value</i> = der niedrigste Wert für einen klinischen breakpoint
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
ES-Lösung	Lösung aus Laurylsarkosin, EDTA und NaOH
<i>esp</i>	vermeintliches Resistenzgen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = und andere
E-Test	Epsilometertest
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F-303SD	Name eines Größenstandards
<i>fms</i>	vermeintliches Resistenzgen
<i>for</i>	forward
g	Gramm
<i>gdpD</i>	vermeintliches Resistenzgen
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
<i>hlyEfm</i>	vermeintliches Resistenzgen
i.v.	intravenös

kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KMT	Knochenmarktransplantation
IS	Insertionselement
l	Liter
LabEinDat	Labor-Eingangs-Datum
<i>liaF</i>	vermeintliches Resistenzgen
<i>liaR</i>	vermeintliches Resistenzgen
<i>liaS</i>	vermeintliches Resistenzgen
LMP	<i>low melting point</i>
μ	Mikro
M	Mol
McFarland	ein Trübungsmesswert
Mg ²⁺	Magnesium
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
min	Minute
ml	Mililiter
MLST	Multilocus-Sequenztypisierung (<i>multilocus sequence typing</i>)
mm	Milimeter
MRSA	Methycillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
Na	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
nd	nicht durchgeführt
neg	negativ
Nr.	Nummer
OD	<i>Odds Ratio</i>
Pat.	Patient
PBP	Penicillin Bindeprotein
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , ein Säure-Basen Maß

pLG1	ein Megaplasmid
pos	positiv
R	resistent
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RIE	rechtsseitige infektiöse Endokarditis
rpm	<i>rotation per minute</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	sensibel
S.	<i>Staphylococcus</i>
SE-Puffer	Saline-EDTA-Puffer
sec	Sekunde
<i>Sma</i> I	aus <i>Serratia marcescens</i> isoliertes Restriktionsenzym
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
ST	Sequenztyp
SuRe/Cut Buffer A	Puffer für Restriktionsenzyme
TBE	Tris Bor EDTA
Tn	Transposon
Tris	Trihydroxyaminomethane
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
UV	Ultraviolett
V	Volt
<i>van</i>	Glykopeptidresistenzgen
VE	vollentionisiert
VRE	Vancomycinresistente Enterokokken
x	Mal
YycFGHIJ-System	System mit vermutlichem Einfluss auf die Bakterienzellmembran
z.B.	zum Beispiel
Z.n.Th.	Zustand nach Therapie

7. Literaturverzeichnis

Andrewes F W, Horder T J (1903) A study of the streptococci pathogenic for man. *The Lancet*. 168(4335):852-855.

Arbeit R D, Maki D, Tally F P, Campanaro E, Eisenstein B I, Daptomycin 98-01 and 99-01 Investigators (2004) The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. *Clin Infect Dis*. 38(12):1673-1681.

Arias C A, Torres H A, Singh K V, Panesso D, Moore J, Wanger A, Murray B E (2007) Failure of daptomycin monotherapy for endocarditis caused by an *Enterococcus faecium* strain with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible subpopulations and evidence of *in vivo* loss of the *vanA* gene cluster. *Clin Infect Dis*. 45(10):1343-1346.

Arias C A, Contreras G A, Murray B E (2010) Management of multidrug-resistant enterococcal infection. *Clin Microbiol Infect*. 16:555-562.

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 (2011) Genetic basis for *in vivo* daptomycin resistance in enterococci. *N Engl J Med*. 365(10):892-900.

Arias C A, Murray B E (2012) The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 10(4):266-278.

Balaei Gajan E, Shirmohammadi A, Aghazadeh M, Alizadeh M, Sighari Deljavan A, Ahmadpour F (2013) Antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* isolated from hospitalized patients. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 7(2):102-104.

Baltz R H (2010) Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster. *J Antibiot (Tokyo)*. 63(8):506-511.

Bodmann, K-F, Grabein B, Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (2010) Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2010. *Chemother J*. 19:179-255.

Bossaer J B, Hall P D, Garrett-Mayer E (2010) Incidence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) infection in high-risk febrile neutropenic patients colonized with VRE. *Support Care Cancer*. 19(2):231-237.

Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet J M, Maugat S, Coignard B, Leclercq R, Cattoir V (2011) Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother*. 66(4):713-721.

Brodt H-R, Smollich M (2013) Antibiotika-Therapie, Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung. 12. Aufl., Stuttgart, Schattauer, 709-710.

Brown D (2005) Plasmid profiling and PFGE profiling for Salmonella: subtyping and interpretation.

[Online im Internet] URL:

http://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2005_9th_Annual_PulseNet_Update_Meeting/Brown_Plas_Prof.pdf [Stand: 24.08.2012, 18:11].

Bryant K A, Roberts A L, Rupp M E, Anderson J R, Lyden E R, Fey P D, Van Schooneveld T C (2013) Susceptibility of enterococci to daptomycin is dependent upon testing methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 76(4):497-501.

Buddecke E (2002) Molekulare Medizin, eine systemische Einführung. Landsberg, ecomed, 42-44.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (1996) Avoparcin als Futterzusatzstoff in der Tierernährung vorläufig verboten, Presseinformation 1996.

[Online im Internet] URL:

http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/1996/01/avoparcin_als_futterzusatzstoff_in_der_tierernaehrung_vorlaeufig_verboten-780.html [Stand: 04.12.2013, 20:28].

Centers for Disease Control and Prevention (1993) Nosocomial enterococci resistant to vancomycin—United States, 1989–1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 42:597–599.

[Online im Internet] URL:

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021331.htm> [Stand: 11.12.2013, 18:33].

Centers for Disease Control and Prevention (2000) Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 49:1-128.

[Online im Internet] URL:

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr4910a1.htm> [Stand: 19.02.2013, 22:06].

Chitnis S, Katara G, Hemvani N, Pareek S, Chitnis D S (2013) In vitro activity of daptomycin & linezolid against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* & vancomycin resistant enterococci isolated from hospitalized cases in Central India. *Indian J Med Res*. 137(1):191-196.

Chuang Y C, Wang J T, Chen M L, Chen Y C (2010) Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 48(8):2897-2901.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014) M100-S24; Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement. Wayne, USA, *CLSI* 34(1):76-79.

Coque T M, Tomayko J F, Ricke S C, Okhyusen P C, Murray B E (1996) Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(11):2605-2609.

Cypionka H (2010) Grundlagen der Mikrobiologie. 4. Aufl., Berlin, Heidelberg, Springer, 94-95.

Davlieva M, Zhang W, Arias C A, Shamoo Y (2013) Biochemical characterization of cardiolipin synthase mutations associated with daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1):289-296.

Diaz L, Tran T T, Munita J M, Miller W R, Rincon S, Carvajal L P, Wollam A, Reyes J, Panesso D, Rojas N L, Shamoo Y, Murray B E, Weinstock G M, Arias C A (2014) Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(8):4527-4534.

DiazGranados C A, Jernigan J A (2005a) Impact of vancomycin resistance on mortality among patients with neutropenia and enterococcal bloodstream infection. *J Infect Dis.* 191(4):588-595.

DiazGranados C A, Zimmer S M, Klein M, Jernigan J A (2005b) Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 41(3):327-333.

Donabedian S M, Perri M B, Abdujamilova N, Gordoncillo M J, Naqvi A, Reyes K C, Zervos M J, Bartlett P (2010) Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from swine in three Michigan countries. *J Clin Microbiol.* 48(11):4156-4160.

Dunne W M Jr, Wang W (1997) Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in metropolitan Detroit, Michigan. *J Clin Microbiol.* 35(2):388-392.

Eldholm V, Gutt B, Johnsborg O, Brückner R, Maurer P, Hakenbeck R, Mascher T, Håvarstein L S (2010) The pneumococcal cell envelope stress-sensing system *liaFSR* is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *J Bacteriol.* 192(7):1761-1773.

Ellerbroek L, Wichmann-Schauer H, Mac K N (2004) Methoden zur Identifizierung und Isolierung von Enterokokken und deren Resistenzbestimmung : Teilprojekt "Enterokokken" im Forschungsvorhaben des Fachbereiches 3 "Hygiene der Lebensmittel und Bedarfsgegenstände" des BfR. Berlin, BfR Pressestelle.

European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) (2012) Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012.

[Online im Internet] URL:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf> [Stand: 14.12.2013, 17:20].

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2008) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1, April 2008.

[Online im Internet] URL:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Other_Documents/EUCAST_Expert_rules_final_April_20080407.pdf [Stand: 01.01.2014, 18:59].

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2014) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.

[Online im Internet] URL:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf [Stand: 24.08.2014, 15:51].

Flamm R K, Mendes R E, Ross J E, Sader H S, Jones R N (2013) An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS program results for 2011. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 76(2):206-213.

Fraher M H, Corcoran G D, Creagh S, Feeney E (2007) Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with no prior exposure to daptomycin. *J Hosp Infect.* 65(4):376-378.

Freifeld A G, Bow E J, Sepkowitz K A, Boeckh M J, Ito J I, Mullen C A, Raad I I, Rolston K V, Young J A, Wingard J R, Infectious Diseases Society of America (2011) Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis.* 52(4):e56-93.

Freissmuth M (2012) Lipopeptidantibiotika: Daptomycin. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2012) *Pharmakologie & Toxikologie*. Heidelberg, Springer Verlag, 654.

Freitas A R, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque T M, Peixe L (2009) Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 63(6):1104-1111.

Freitas A R, Tedim A P, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Werner G, Laverde-Gomez J A, Cantón R, Peixe L, Baquero F, Coque T M (2010) global spread of the *hyl_{Efm}* colonization-virulence gene in megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(6):2660-2665.

Freitas A R, Coque T M, Novais C, Hammerum A M, Lester C H, Zervos M J, Donabedian S, Jensen L B, Francia M V, Baquero F, Peixe L (2011) Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J Clin Microbiol.* 49(3):925-931.

Freitas A R, Novais C, Tedim A P, Francia M V, Baquero F, Peixe L, Coque T M (2013) Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations. *PLoS One* 8(3):e60589.

Frère P, Hermanne J P, Debouge M H, Fillet G, Beguin Y (2002) Changing pattern of bacterial susceptibility to antibiotics in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 29(7):589-594.

Fuchs G, Schlegel H G (2007) Allgemeine Mikrobiologie. 8. Aufl., Stuttgart, Thieme, 478.

Fuchs P C, Barry A L, Brown S D (2001) Evaluation of daptomycin susceptibility testing by Etest and the effect of different batches of media. *J Antimicrob Chemother.* 48(4):557-561.

Galloway-Peña J, Roh J H, Latorre M, Qin X, Murray B E (2012) Genomic and SNP analyses demonstrates a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS One.* 7(1):e30187.

Gastmeier P, Schröder C, Behnke M, Meyer E, Geffers C (2014) Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 69(6):1660-1664.

Gatermann S, Miksits K (2009) Enterokokken und weitere katalasenegative gram-positive Kokken. In: Hahn H, Kaufmann S H E, Schulz F, Suerbaum S (2009) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6. Aufl., Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 224.

Gedik H, Yildirmak T, Simsek F, Kanturk A, Ayдын D, Anca D, Yokus O, Demirel N (2013) The outcome of non-carbapenem-based empirical antibacterial therapy and VRE colonisation in patients with hematological malignancies. *Afr Health Sci.* 13(2):362-368.

Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Abdul Aziz S (2013) Genetic variability of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from humans, chickens, and pigs in Malaysia. *Appl Environ Microbiol.* 79(15):4528-4533.

Ghosh A, Dowd S E, Zurek L (2011) Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS One.* 6(7):e22451.

Goering R V, Köck R, Grundmann H, Werner G, Friedrich A W; ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM) (2013) From theory to practice: molecular strain typing for the clinical and public health setting. *Euro Surveill.* 18(4):pii=20383.

Grim S A, Hong I, Freeman J, Edwards C, Clark N M (2009) Daptomycin for the treatment of vancomycin-resistant enterococcal infections. *J Antimicrob Chemother.* 63(2):414-416.

Hall A D, Steed M E, Arias C A, Murray B E, Rybak M J (2012) Evaluation of standard- and high-dose daptomycin versus linezolid against vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(3):3174-3180.

Hegstad K, Mikalsen T, Coque T M, Werner G, Sundsfjord A (2010) Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 16(6):541-554.

Hoen B, Duval X (2013) Clinical practice. Infective endocarditis. *N Engl J Med.* 368(15):1425-1433.

Homan W L, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, van Embden J D A, Willems R J L (2002) Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 40(6):1963–1971.

Howden B P, Holt K E, Lam M M, Seemann T, Ballard S, Coombs G W, Tong S Y, Grayson M L, Johnson P D, Stinear T P (2013) Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant enterococci. *MBio.* 4(4):pii=e00412-13.

Hughes W T, Armstrong D, Bodey G P, Bow E J, Brown A E, Calandra T, Feld R, Pizzo P A, Rolston K V, Shenep J L, Young L S (2002) 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 34(6):730-751.

Humphries R M, Kelesidis T, Tewhey R, Rose W E, Schork N, Nizet V, Sakoulas G (2012) Genotypic and phenotypic evaluation of the evolution of high-level daptomycin nonsusceptibility in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(11):6051-6053.

Humphries R M, Pollett S, Sakoulas G (2013) A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Rev.* 26(4):759-780.

Huycke M M, Sahm D F, Gilmore M S (1998) Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis.* 4(2):239-249.

Jones M E, Draghi D C, Thornsberry C, Karlowsky J A, Sahm D F, Wenzel R P (2004) Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American Surveillance study (2000–2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 3:14.

Jorgensen J H, Crawford S A, Kelly C C, Patterson J E (2003) *In vitro* activity against vancomycin-resistant enterococci of various *van* types and comparison of susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(12):3760-3763.

Judge T, Pogue J M, Marchaim D, Ho K, Kamatam S, Parveen S, Tiwari N, Nanjireddy P, Bheemreddy S, Biedron C, Reddy S M, Khammam V, Chalana I K, Tumma R S, Collins V, Yousuf A, Lephart P R, Martin E T, Rybak M J, Kaye K S, Hayakawa K (2012) Epidemiologie of vancomycin-resistant enterococci with reduced susceptibility to daptomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 33(12):1250-1254.

Kamboj M, Cohen N, Gilhuley K, Babady N E, Seo S K, Sepkowitz K A (2011) Emergence of daptomycin-resistant VRE: experience of a single institution. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 32(4):391-394.

Kawalec M, Gniadkowski M, Hryniewicz W (2000) Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdask, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol.* 38(9):3317-3322.

Kelesidis T, Humphries R, Uslan D Z, Pegues D A (2011) Daptomycin nonsusceptible enterococci: an emerging challenge for clinicians. *Clin Infect Dis.* 52(2):228-234.

Kelesidis T, Chow A L, Humphries R, Uslan D Z, Pegues D (2012a) Case-control study comparing de novo and daptomycin-exposed daptomycin-nonsusceptible *Enterococcus* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(4):2150-2152.

Kelesidis T, Humphries R, Uslan D Z, Pegues D (2012b) De novo daptomycin-nonsusceptible enterococcal infection. *Emerg Infect Dis.* 18(4):674-676.

Kelesidis T (2013a) Transport of daptomycin resistance genes between animals and humans as a possible mechanism for development of de novo daptomycin resistance in enterococci. *Epidemiol Infect.* 141(10):2185-2186.

Kelesidis T, Tewhey R, Humphries R M (2013b) Evolution of high-level daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy is associated with limited mutations in the bacterial genome. *J Antimicrob Chemother.* 68(8):1926-1928.

Kelesidis T und Chow A L (2014) Proximity to animal or crop operations may be associated with de novo daptomycin-non-susceptible *Enterococcus* infection. *Epidemiol Infect.* 142(1):221-224.

Kelley P G, Gao W, Ward P B, Howden B P (2011) Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): implications for therapy after vancomycin treatment failure. *J Antimicrob Chemother.* 66(5):1057-1060.

Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, Borgmann S, Schulte B, Jonas D, Serr A, Fahr A M, Eigner U, Witte W (2005) Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 24(12):815-825.

Klare I, Witte W, Werner G, Fahr A-M, Oberdorfer K (2011) *Enterococcus* spp. In: GERMAP 2010 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch: Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und Infektiologie Freiburg (Hrg.), Rheinbach, 40-49.

Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G (2012a) 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. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74(2):171-176.

Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G (2012b) Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 55(11-12):1387-1400.

Kresken M, Hafner D, Studiengruppe (2000) Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Resistenz in der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 1998. *Chemotherapie J.* 9:51-86.

Kwon K H, Hwang S Y, Moon B Y, Park Y K, Shin S, Hwang C Y, Park Y H (2012) Occurrence of antimicrobial resistance and virulence genes, and distribution of enterococcal clonal complex 17 from animals and human beings in Korea. *J Vet Diagn Invest.* 24(5):924-931.

Laverde Gomez J A, van Schaik W, Freitas A R, Coque T M, Weaver K E, Francia M V, Witte W, Werner G (2011) A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hyl*_{Efm} genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *Int J Med Microbiol.* 301:165-175.

Lebreton F, van Schaik W, Manson McGuire A, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, Corander J, Cheng L, Saif S, Young S, Zeng Q, Wortman J, Birren B, Willems R J, Earl A M, Gilmore M S (2013) Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio.* 4(4):e00534-13.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988) Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*. 319(3):157-61.

Lee M (2009) Basic skills in interpreting laboratory data. 4. Aufl., American Society of Health-System Pharmacists, 403-404.

Lee W G, Ahn S H, Jung M K, Jin H Y, Park I J (2012) Characterization of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak caused by 2 genetically different clones at a neonatal intensive care unit. *Ann Lab Med*. 32(1):82-86.

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Bacterial Nomenclature Up-to-Date, *Enterococcus*.
[Online im Internet] URL:
old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Enterococcus&show_all_details=1 [Stand: 17.02.2013, 17:20].

Lemcke R (2003) Isolierung und Feintypisierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) aus Geflügel- und Schweinefleisch. Diss. med. vet. Uni Gießen.

Lesho E P, Wortmann G W, Craft D, Moran K A (2006) De novo daptomycin nonsusceptibility in a clinical isolate. *J Clin Microbiol*. 44(2):673.

Lewis J S 2nd, Owens A, Cadena J, Sabol K, Patterson J E, Jorgensen J H (2005) Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(4):1664-1665.

Linden P K (2007) Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Semin Respir Crit Care Med*. 28(6):632-645.

Liss B J, Vehreschild J J, Cornely O A, Hallek M, Fätkenheuer G, Wisplinghoff H, Seifert H, Vehreschild M J (2012) Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection*. 40(6):613-619.

Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman W B (2009) Family IV. *Enterococcaceae* fam. nov. In: Whitman W B (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 3: The firmicutes. 2. Aufl., Heidelberg, London und New York, Springer-Verlag, 594.

Magauran C E, Salgado C D (2011) Challenges and advances in infection control of hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect Disord Drug Targets*. 11(1):18-26.

Maiden M C, Bygraves J A, Feil E, Morelli G, Russell J E, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant D A, Feavers I M, Achtman M, Spratt B G (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(6):3140-3145.

Maiwald M (2012) Enterokokken. In: Darai G, Handermann M, Sonntag H-G, Zöller L (2012) Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. 4. Aufl., Berlin, Heidelberg und New York, Springer-Verlag, 277-281.

Matar M J, Safdar A, Rolston K V (2006) Relationship of colonization with vancomycin-resistant enterococci and risk of systemic infection in patients with cancer. *Clin Infect Dis*. 42(10):1506-1507.

McDonald L C, Kuehnert M J, Tenover F C, Jarvis W R (1997) Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerg Infect Dis*. 3(3): 311–317.

Menteş O, Balci I (2007) *Enterococcus* spp. colonized in the gastrointestinal tract of patients in hemato-oncology and intensive care units and their resistance profiles to vancomycin. *Mikrobiyol Bul*. 41(4):585-589.

Meyer E, Gastmeier P, Deja M, Schwab F (2013) Antibiotic consumption and resistance: data from Europe and Germany. *Int J Med Microbiol*. 303(6-7):388-395.

Miller C, Kong J, Tran T T, Arias C A, Saxer G, Shamoo Y (2013) Adaptation of *Enterococcus faecalis* to daptomycin reveals an ordered progression to resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 57(11):5373-5383.

Mishra N N, Bayer A S, Tran T T, Shamoo Y, Mileykovskaya E, Dowhan W, Guan Z, Arias C A (2012) Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. *PLoS One*. 7(8):e43958.

Mülhardt C (2009) Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. 6. Aufl., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 87.

Munita J M, Panesso D, Diaz L, Tran T T, Reyes J, Wanger A, Murray B E, Arias C A (2012) Correlation between mutations in *liaFSR* of *Enterococcus faecium* and MIC of daptomycin: revisiting daptomycin breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(8):4354-4359.

Munita J M, Tran T T, Diaz L, Panesso D, Reyes J, Murray B E, Arias C A (2013) A *liaF* codon deletion abolishes daptomycin bactericidal activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 57(6):2831-2833.

Munoz-Price L S, Lolans K, Quinn J P (2005) Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection. *Clin Infect Dis*. 41(4):565-566.

Murray B E (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*. 3(1):46-65.

Murray B E (2000) Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med*. 342:710-721.

Murray B E, Nannini E C (2007) *Enterococcus*. In: Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Landry M L, Pfaller M A (2007) Manual of Clinical Microbiology. 9. Aufl., Washington, DC, American Society for Microbiology, 540-542.

Muto C A, Jernigan J A, Ostrowsky B E, Richet H M, Jarvis W R, Boyce J M, Farr B M (2003) SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 24(5):362-386.

Mutters N T, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U (2013) Kontrolle von Vancomycin-resistenten Enterokokken im Krankenhaus: Epidemiologischer Hintergrund und klinische Relevanz. *Dtsch Arztebl*. 110(43):725-731.

Nakashima H, Takahashi H, Kameko M, Saito H (2012) Daptomycin Etest MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vary among different media. *J Infect Chemother*. 18(6):970-972.

Novais C, Freitas AR, Sousa J C, Baquero F, Coque T M, Peixe L V (2008) Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(3):1001-1008.

Novais C, Freitas A R, Silveira E, Antunes P, Silva R, Coque T M, Peixe L (2013) Spread of multidrug-resistant enterococcus to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. *J Antimicrob Chemother*. 68(12):2746-2754.

Oskoui M, Farrokh P (2010) Distribution of insertion sequences associated with Tn1546 and clonal diversity of vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in Teheran, Iran. *Iran J Microbiol*. 2(1):14-21.

Oxoid (2013) Mueller-Hinton Agar.

[Online im Internet] URL:

http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=Cm0337 [Stand: 28.08.2013, 18:56].

Palavecino E L, Burnell J M (2013) False daptomycin-nonsusceptible MIC results by Microscan panel PC 29 relative to Etest results for *Staphylococcus aureus* and enterococci. *J Clin Microbiol*. 51(1):281-283.

- Palmer K L, Daniel A, Hardy C, Silverman J, Gilmore M S (2011) Genetic basis for daptomycin resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(7):3345-3356.
- Pankey G, Ashcraft D, Patel N (2005) *In vitro* synergy of daptomycin plus rifampin against *Enterococcus faecium* resistant to both linezolid and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(12):5166-5168.
- Pankey G A, Ashcraft D S (2013) *In vitro* synergy of telavancin and rifampin against *Enterococcus faecium* resistant to both linezolid and vancomycin. *Ochsner J.* 13(1):61-65.
- Patterson J E, Wanger A, Zscheck K K, Zervos M J, Murray B E (1990) Molecular epidemiology of β -lactamase-producing enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(2):302-305.
- Raja A, LaBonte J, Lebbos J, Kirkpatrick P (2003) Daptomycin. *Nat Rev Drug Discov.* 2:943-944.
- Ramaswamy D P, Amodio-Groton M, Scholand S J (2013) Use of daptomycin in the treatment of vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections: a short case series. *BMC Urol.* 13(1):33.
- Reinert R R, Lütticken R (2004) Enterokokken, *Streptococcus bovis* und *Leuconostoc*. In: Adam D et al. (2004) Die Infektiologie. Berlin, Heidelberg und New York, Springer-Verlag, 932.
- RESET Verbund (2012) Beschreibung der Projekte.
[Online im Internet] URL:
<http://www.reset-verbund.de/partner/fli.htm> [Stand: 24.08.2012, 18:23].
- Rice L B (2013) The complex dynamics of antimicrobial activity in the human gastrointestinal tract. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 124:123-132.
- Richter S S, Kealey D E, Murray C T, Heilmann K P, Coffman S L, Doern G V (2003) The *in vitro* activity of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J Antimicrob Chemother.* 52(1):123-127.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2013) Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung aus dem NRZ für Staphylokokken und Enterokokken, 2011-2012. *Epid Bull.* 33:303-312.
- Roemer T, Boone C (2013) Systems-level antimicrobial drug and drug synergy discovery. *Nat Chem Biol.* 9(4):222-231.

Rohde H, Qin J, Cui Y, Li D, Loman N J, Hentschke M, Chen W, Pu F, Peng Y, Li J, Xi F, Li S, Li Y, Zhang Z, Yang X, Zhao M, Wang P, Guan Y, Cen Z, Zhao X, Christner M, Kobbe R, Loos S, Oh J, Yang L, Danchin A, Gao G F, Song Y, Li Y, Yang H, Wang J, Xu J, Pallen M J, Wang J, Aepfelbacher M, Yang R; E. coli O104:H4 Genome Analysis Crowd-Sourcing Consortium (2011) Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med.* 365(8):718-724.

Rolston K V, Besece D, Lamp K C, Yoon M, McConnell S A, White P (2014) Daptomycin use in neutropenic patients with documented gram-positive infections. *Support Care Cancer.* 22(1):7-14.

Rote Liste (2014) Cubicin® 350 mg/-500 mg Pulver zur Herstellung einer Injektions- bzw. Infusionslösung.
[Online im Internet] URL:
<http://www.fachinfo.de/suche/fi/009597> [Stand: 24.08.2014, 15:46].

Rybak M J (2006) The efficacy and safety of daptomycin: first in a new class of antibiotics for gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 12(1):24-32.

Saager B, Rohde H, Timmerbeil B S, Franke G, Pothmann W, Dahlke J, Scherpe S, Sobottka I, Heisig P, Horstkotte M A (2008) Molecular characterisation of linezolid resistance in two vancomycin-resistant (*vanB*) *Enterococcus faecium* isolates using pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(9):873-878.

Sakoulas G, Bayer A S, Pogliano J, Tsuji B T, Yang S J, Mishra N N, Nizet V, Yeaman M R, Moise P A (2012) Ampicillin enhances daptomycin- a cationic host defence peptide- mediated killing of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(2):838-844.

Sava I G, Heikens E, Huebner J (2010) Pathogenesis and immunity in enterococcal infection. *Clin Microbiol Infect.* 16(6):533-540.

Schleifer K H, Kilpper-Bälz R (1984) 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.* 34(1):31-34.

Schmidt-Hieber M, Blau I W, Schwartz S, Uharek L, Weist K, Eckmanns T, Jonas D, Rüden H, Thiel E, Brandt C (2007) Intensified strategies to control vancomycin-resistant enterococci in immunocompromised patients. *Int J Hematol.* 86(2):158-162.

Schouten M A, Voss A, Hoogkamp-Korstanje J A A, Studiengruppe (1999) Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(10):2542-2546.

Schulte B, Heininger A, Autenrieth I B, Wolz C (2008) Emergence of increasing linezolid-resistance in enterococci in a post-outbreak situation with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Epidemiol Infect.* 136(8):1131-1133.

Schwartz B S, Ngo P D, Guglielmo B J (2008) Daptomycin treatment failure for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infective endocarditis: impact of protein binding? *Ann Pharmacother.* 42(2):289-290.

Sepkowitz K A (2002) Antibiotic prophylaxis in patients receiving hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 29(5):367-371.

Silverman J A, Oliver N, Andrew T, Li T (2001) Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(6):1799-1802.

Simon A, Gröger N, Engelhart S, Molitor G, Exner M, Bode U, Fleischhack G (2004) Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) – Übersicht zu Bedeutung, Prävention und Management in der Pädiatrie. *Hyg Med.* 29(7-8):259-275.

Song J Y, Cheong H J, Jo Y M, Choi W S, Noh J Y, Heo J Y, Kim W J (2009) Vancomycin-resistant enterococcus colonization before admission to the intensive care unit: a clinico-epidemiologic analysis. *Am J Infect Control.* 37(9):734-740.

Starikova I, Al-Haroni M, Werner G, Roberts A P, Sørum V, Nielsen K M, Johnsen P J (2013) Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 68(12):2755-2765.

Suntharalingam P, Senadheera M D, Mair R W, Lévesque C M, Cvitkovitch D G (2009) The *liaFSR* system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 191(9):2973-2984.

Suppola J P, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M (1999) *VanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. *J Clin Microbiol.* 37(12):3934-3939.

Tacconelli E, Karchmer A W, Yokoe D, D'Agata E M (2004) Preventing the influx of vancomycin-resistant enterococci into health care institutions, by use of a simple validated prediction rule. *Clin Infect Dis.* 39(7):964-970.

Tacconelli E und Cataldo M A (2008) Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Int J Antimicrob Agents.* 31(2):99-106.

Teixeira L M, Da Glória Siqueira Carvalho M, Facklam R R (2007) *Enterococcus*. In: Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Landry M L, Pfaller M A (2007) Manual of Clinical Microbiology. 9. Aufl., Washington, DC, American Society for Microbiology, 430-438.

Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, Mickelsen P A, Murray B E, Persing D H, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33(9):2233-2239.

Thiercelin M E (1899) Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogen. *C R Soc Biol.* 51, 269-271.

Thiercelin M E, Jouhaud L (1903) Reproduction de l'entérocoque: Taches centrales; granulations périphériques et microblastes. *C R Seances Soc Biol.* 55:686–688.

Tran T T, Palmer H R, Weston J, Hirsch E B, Shah D N, Cottreau J, Tam V H, Garey K W (2012) Evaluation of a daptomycin dose-optimization protocol. *Am J Health Syst Pharm.* 69(11):979-984.

Tran T T, Panesso D, Gao H, Roh J H, Munita J M, Reyes J, Diaz L, Lobos E A, Shamoo Y, Mishra N N, Bayer A S, Murray B E, Weinstock G M, Arias C A (2013a) Whole-genome analysis of a daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* strain and its daptomycin-resistant variant arising during therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1):261-268.

Tran T T, Panesso D, Mishra N N, Mileykovskaya E, Guan Z, Munita J M, Reyes J, Diaz L, Weinstock G M, Murray B E, Shamoo Y, Dowhan W, Bayer A S, Arias C A (2013b) Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids. *MBio.* 4(4). pii:e00281-13.

Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris J G Jr, Sulakvelidze A (2000) Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 38(11):4242-4245.

Ubeda C, Taur Y, Jenq R R, Equinda M J, Son T, Samstein M, Viale A, Socci N D, van den Brink M R, Kamboj M, Pamer E G (2010) Vancomycin-resistant enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest.* 120(12):4332-4341.

Uttley A H C, Collins C H, Naidoo J, George R C (1988) Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet.* 331(8575-8576):57-58.

Uttley A H C, Woodford N, Johnson A P, Cookson B, George R C, Wilcox M H, Spencer R C, Weeks G R, Frieden T R, Munsiff S S, Low D E, Kreiswirth B, Manson E, De Sio G, Biavasco F, Veraldo P E, Sambo G, Maffei C (1993) Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet.* 342(8871):615-617.

Vagnerova I, Sauer P, Kolar M, Slepickova S, Hubacek J, Faber E, Raida L, Papajik T (2006) Sources and pathways of spread of vancomycin-resistant enterococci in hemato-oncological patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 150(1):117-120.

van den Braak N, van Belkum A, van Keulen M, Vliegenthart J, Verbrugh H A, Endtz H P (1998) Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 36(7):1927-1932.

vom Stein J (2009) Automatische Genetische Analytik. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 39-40.

Watson J D, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R (2011) Watson Molekularbiologie. 6. Aufl., München, Pearson Studium, 21.

Wendt C, Krause C, Xander L U, Löffler D, Floss H (1999) Prevalence of colonization with vancomycin-resistant enterococci in various population groups in Berlin, Germany. *J Hosp Infect.* 42(3):193-200.

Werner G, Klare I, Witte W (2007) The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol.* 7:28.

Werner G, Coque T M, Hammerum A M, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson K G, Leclercq R, Lester C H, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe L V, Sadowy E, Simonsen G S, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems R J, Witte W, Woodford N (2008a) Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 13(47):pii=19046.

Werner G, Klare I, Hübner J, Kern W V, Witte W (2008b) Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemother J.* 17(5):183-193.

Werner G, Fleige C, Geringer U, van Schaik W, Klare I, Witte W (2011a) IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infectious Diseases.* 11(80):1-8.

Werner G, Freitas A R, Coque T M, Sollid J E, Lester C, Hammerum A M, Garcia-Migura L, Jensen L B, Francia M V, Witte W, Willems R J, Sundsfjord A (2011b) Host range enterococcal *vanA* plasmids among gram-positive intestinal bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 66:273-282.

Werner G, Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Just H M, Ziegler R (2012) 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.* 1(1):21.

Werner G (2013a) Molecular typing of enterococci/VRE. *J Bacteriol Parasitol.* S.5-001.

[Online im Internet] URL:

<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.S5-001> [Stand: 22.08.2013, 21:30].

Werner G, Coque T M, Franz C M, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, van Schaik W, Weaver K (2013b) Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol.* 303(6-7):360-79.

Werth B J, Steed M E, Ireland C E, Tran T T, Nonejuie P, Murray B E, Rose W E, Sakoulas G, Pogliano J, Arias C A, Rybak M J (2014) Defining daptomycin resistance prevention exposures in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(9):5253-5261.

Willems R J, Top J, van den Braak N, van Belkum A, Mevius D J, Hendriks G, van Santen-Verheuve M, van Embden J D (1999) Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-Like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(3):483-491.

Willems R J, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sirén J, Hanage W P, Corander J (2012) Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio.* 3(4):e00151-12.

Wise R, Andrews J M, Ashby J P (2001) Activity of daptomycin against gram-positive pathogens: a comparison with other agents and the determination of a tentative breakpoint. *J Antimicrob Chemother.* 48(4):563-567.

Worth L J, Thursky K A, Seymour J F, Slavin M A (2007) Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients with hematologic malignancy: patients with acute myeloid leukemia are at high-risk. *Eur J Haematol.* 79(3):226-233.

Wu J, Jiang T T, Su J R, Li L (2013) Antimicrobial activity of linezolid combined with minocycline against vancomycin-resistant Enterococci. *Chin Med J (Engl).* 126(14):2670-2675.

Wudhikarn K, Gingrich R D, de Magalhaes Silverman M (2013) Daptomycin nonsusceptible enterococci in hematologic malignancy and hematopoietic stem cell transplant patients: an emerging threat. *Ann Hematol.* 92(1):129-131.

Yu H S, Seol S Y, Cho D T (2003) Diversity of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci isolated from humans and poultry in Korea. *J Clin Microbiol.* 41(6):2641-2643.

Zaas A K, Song X, Tucker P, Perl T M (2002) Risk factors for development of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in patients with cancer who are colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* 35(10):1139-1146.

Zhang J, Wall S K, Xu L, Ebner P D (2010) Contamination rates and antimicrobial resistance in bacteria isolated from "grass-fed" labeled beef products. *Foodborne Pathog Dis.* 7(11):1331-1336.

Zhang X, Top J, de Been M, Bierschenk D, Rogers M, Leendertse M, Bonten M J, van der Poll T, Willems R J, van Schaik W (2013) Identification of a genetic determinant in clinical *Enterococcus faecium* strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. *J Infect Dis.* 207(11):1780-1786.

Zheng B, Tomita H, Xiao Y H, Wang S, Li Y, Ike Y (2007) Molecular characterisation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from mainland China. *J Clin Microbiol.* 45(9):2813-2818.

Ziesing S, Heim A, Vonberg RP (2012) Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST). In: Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann S H E, Schulz T (2012) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Berlin und Heidelberg, Springer-Verlag, 144.

Zirakzadeh A und Patel R (2006) Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 81(4):529-536.

8. Anhang

8.1 *E. faecium*-Isolate

Tabelle 15: Isolate der Patienten

Pat.-Code	LabEinDat	MHK Daptomycin in µg/ml	van- Typ
1a	29.04.2011	8	A
2a	30.11.2010	4	A
3a	05.04.2011	4	A
3b	19.04.2011	8	A
4a	12.01.2011	8	A
4b	15.02.2011	8	A
5a	30.11.2010	8	A
5b	22.01.2011	4	A
6a	10.05.2011	32	A
7a	04.08.2010	4	A
7b	27.10.2010	16	A
8a	18.05.2010	8	A
8b	25.05.2010	8	A
8c	08.06.2010	8	A
8d	09.06.2010	8	A
8e	15.06.2010	16	A
8f	23.06.2010	64	A
9a	09.02.2011	8	A
9b	29.04.2011	8	A
10a	24.03.2011	8	A
10b	30.03.2011	8	A
10c	19.04.2011	8	A
11a	27.07.2010	8	A
12a	29.06.2010	8	A
13a	25.01.2011	8	A
14a	23.03.2010	8	A
15a	30.11.2010	4	B
15b	07.12.2010	4	B
16a	02.12.2010	4	A
17a	21.02.2011	8	A
17b	03.05.2011	8	A
18a	20.01.2011	8	A
19a	23.03.2010	8	A
19b	30.03.2010	8	A
20a	27.07.2010	8	A
21a	22.03.2011	8	A
21b	05.04.2011	8	A
21c	02.05.2011	16	A
22a	09.11.2010	4	B
23a	27.01.2011	8	A
23b	10.03.2011	8	A
24a	18.05.2010	4	A
24b	25.05.2010	4	A
24c	08.06.2010	4	A
24d	09.07.2010	8	A
24e	16.07.2010	8	A

25a	17.03.2011	16	A
26a	08.02.2011	8	A
26b	18.02.2011	8	A
27a	07.04.2010	4	A
28a	18.03.2011	8	A
28b	05.04.2011	8	A
29a	13.04.2011	8	A
30a	25.01.2011	8	A
31a	15.09.2010	4	A
32a	07.02.2011	8	A
32b	05.04.2011	8	A
32c	27.04.2011	64	A
33a	19.01.2010	8	A
33b	26.01.2010	8	A
33c	23.03.2010	32	A
33d	30.03.2010	32	A
33e	05.05.2010	32	A
33f	11.05.2010	32	A
34a	24.01.2011	8	A
35a	31.03.2010	8	A
36a	21.02.2011	4	A
36b	22.03.2011	8	A
37a	17.11.2010	4	B
37b	07.12.2010	16	B
38a	28.12.2010	4	B
39a	18.05.2010	8	A
39b	22.05.2010	8	A
39c	23.05.2010	nd	A
39d	24.05.2010	8	A
39e	28.06.2010	8	A
40a	15.06.2010	8	A
40b	13.07.2010	32	A
41a	17.02.2011	8	A
42a	03.12.2010	8	A
42b	25.01.2011	8	A
43a	07.12.2010	8	A
44a	22.12.2010	4	B
45a	04.05.2010	8	A
45b	11.05.2010	8	A
45c	08.06.2010	8	A
45d	06.07.2010	32	A
46a	10.04.2011	8	A
47a	28.09.2010	8	B
48a	18.01.2011	8	A
48b	08.02.2011	4	A
49a	05.04.2011	8	A
50a	01.02.2011	8	A
50b	22.03.2011	8	A
51a	30.11.2010	8	A
51b	08.03.2011	128	A
52a	03.05.2011	64	A
53a	01.04.2010	8	B
54a	19.10.2010	4	B
54b	09.11.2010	nd	B
54c	16.11.2010	4	B
55a	26.09.2011	4	A

56a	22.12.2010	8	B
56b	28.12.2010	8	B
57a	02.11.2010	4	B
57b	09.11.2010	8	B
58a	15.02.2011	4	A
58b	02.03.2011	8	A

Tabelle 16: MHK der Wildtypen

Wildtypcode	MHK Daptomycin in µg/ml
W1	4
W2	8
W3	8
W4	8
W5	4
W6	4
W7	8
W8	8
W9	8
W10	4
W11	2
W12	8
W13	8
W14	8
W15	8
W16	8
W17	8
W18	8
W19	8
W20	4
W21	8
W22	8
W23	8
W24	2

8.2 Übersicht der Ergebnisse

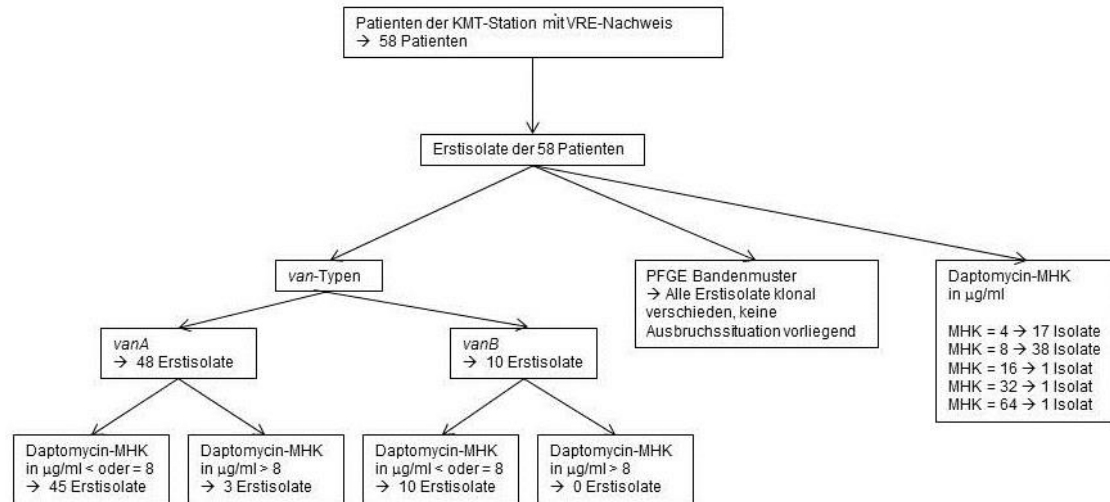


Abb. 15: Erstisolate

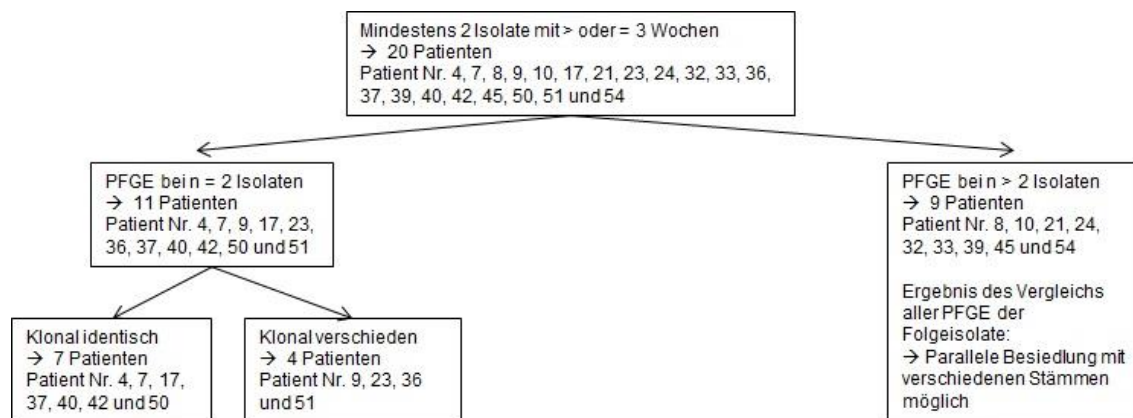


Abb. 16: Verläufe

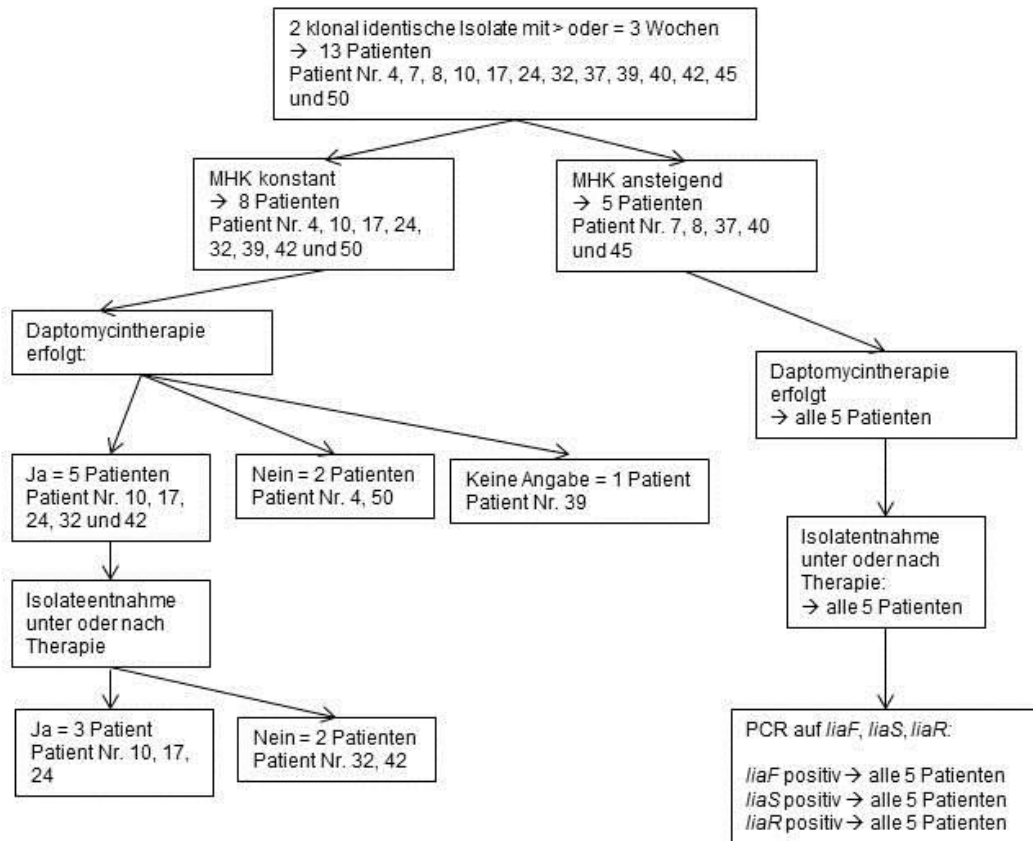


Abb. 17: Analyse ausgewählter Isolate

8.3 Zusammenfassende Darstellung von Verläufen

Tabelle 17: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 4. Es erfolgte keine Daptomycintherapie. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ und die Daptomycin-MHK dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 4		
Probe	4a	4b
Datum Probeneingang	12.01.11	15.02.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8
PFGE-Muster		

Tabelle 18: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 7. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 11.08.2010 bis zum 30.08.2010. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ, die Daptomycin-MHK und die Ergebnisse der *liaFSR*-PCR dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 7		
Probe	7a	7b
Datum Probeneingang	04.08.10	27.10.10
<i>van</i> -Typ	A	A
<i>liaF</i>	pos	pos
<i>liaR</i>	pos	pos
<i>liaS</i>	pos	pos
Daptomycin-MHK in µg/ml	4	16
PFGE-Muster		

Tabelle 19: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 8. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 27.05.2010 bis zum 15.06.2010. Die Patientenisolat sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ, die Daptomycin-MHK und die Ergebnisse der *liaFSR*-PCR dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 8						
Probe	8a	8b	8c	8d	8e	8f
Datum Probeneingang	18.05.10	25.05.10	08.06.10	09.06.10	15.06.10	23.06.10
<i>van</i> -Typ	A	A	A	A	A	A
<i>liaF</i>	pos	nd	pos	nd	pos	pos
<i>liaR</i>	pos	nd	pos	nd	pos	pos
<i>liaS</i>	pos	nd	pos	nd	pos	pos
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8	8	8	16	64
PFGE-Muster						

Tabelle 20: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 9. Es lagen keine Informationen bezüglich einer Daptomycintherapie vor. Die Patientenisolat sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Der *van*-Typ und die MHK werden dargestellt. Isolate eines Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert. Das Erst- und Folgeisolat waren nicht klonal identisch.

Patient 9		
Probe	9a	9b
Datum Probeneingang	09.02.11	29.04.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8
PFGE-Muster		

Tabelle 21: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 10. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 28.03.2011 bis zum 29.03.2011. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ, die Daptomycin-MHK und die Ergebnisse der *liaFSR*-PCR dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 10			
Probe	10a	10b	10c
Datum Probeneingang	24.03.11	30.03.11	19.04.11
<i>van</i> -Typ	A	A	A
<i>liaF</i>	pos	nd	pos
<i>liaR</i>	pos	nd	pos
<i>liaS</i>	pos	nd	pos
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8	8
PFGE-Muster			

Tabelle 22: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 17. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 01.05.2011 bis zum 08.05.2011. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ und die Daptomycin-MHK dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 17		
Probe	17a	17b
Datum Probeneingang	21.02.11	03.05.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8
PFGE-Muster		

Tabelle 23: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 21. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 27.03.2011 bis zum 01.04.2011. Die Patientenisolat sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ und die Daptomycin-MHK dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert. Das zuletzt entnommene Folgeisolat wies eine erhöhte Daptomycin-MHK von 16 µg/ml auf. Es lagen keine weiteren Isolate dieses klonalen Stamms vor, so dass keine Aussage möglich war, ob es sich um eine MHK-Zunahme oder um eine primäre Unempfindlichkeit handelte.

Patient 21			
Probe	21a	21b	21c
Datum Probeneingang	22.03.11	05.04.11	02.05.11
<i>van</i> -Typ	A	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8	16
PFGE-Muster			

Tabelle 24: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 23. Es erfolgte keine Daptomycintherapie. Die Patientenisolat sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Der Van Typ und die MHK werden dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 23		
Probe	23a	23b
Datum Probeneingang	27.01.11	10.03.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8
PFGE-Muster		

Tabelle 25: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 24. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 26.05.2010 bis zum 05.06.2010. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Der *van*-Typ und die MHK werden dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 24					
Probe	24a	24b	24c	24d	24e
Datum Probeneingang	18.05.10	25.05.10	08.06.10	09.07.10	16.07.10
<i>van</i> -Typ	A	A	A	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	4	4	4	8	8
PFGE-Muster					

Tabelle 26: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 32. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 09.04.2011 bis zum 24.04.2011. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Der *van*-Typ und die MHK werden dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert. Das zuletzt entnommene Folgeisolat wies eine erhöhte Daptomycin-MHK von 64 µg/ml auf. Es lagen keine weiteren Isolate dieses klonalen Stamms vor, so dass keine Aussage möglich war, ob es sich um eine MHK-Zunahme oder um eine primäre Unempfindlichkeit handelte.

Patient 32			
Probe	32a	32b	32c
Datum Probeneingang	07.02.11	05.04.11	24.04.11
<i>van</i> -Typ	A	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8	64
PFGE-Muster			

Tabelle 27: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 33. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 27.01.2010 bis zum 03.02.2010. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ und die Daptomycin-MHK dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 33						
Probe	33a	33b	33c	33d	33e	33f
Datum Probeneingang	19.01.10	26.01.10	23.03.10	30.03.10	05.05.10	11.05.10
<i>van</i> -Typ	A	A	A	A	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8	32	32	32	32
PFGE-Muster						

Tabelle 28: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 36. Es erfolgte keine Daptomycintherapie. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Der *van*-Typ und die MHK werden dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 36		
Probe	36a	36b
Datum Probeneingang	21.02.11	22.03.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	4	8
PFGE-Muster		

Tabelle 29: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 37. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 20.11.2010 bis zum 07.12.2010. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ, die Daptomycin-MHK und die Ergebnisse der *liaFSR*-PCR dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 37		
Probe	37a	37b
Datum Probeneingang	17.11.10	07.12.10
<i>van</i> -Typ	B	B
<i>liaF</i>	pos	pos
<i>liaR</i>	pos	pos
<i>liaS</i>	pos	pos
Daptomycin-MHK in µg/ml	4	16
PFGE-Muster		

Tabelle 30: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 39. Es lagen keine Informationen bezüglich einer Daptomycintherapie vor. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ und die Daptomycin-MHK dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 39					
Probe	39a	39b	39c	39d	39e
Datum Probeneingang	18.05.10	22.05.10	23.05.10	24.05.10	28.06.10
<i>van</i> -Typ	A	A	A	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8	8	8	8
PFGE-Muster					

Tabelle 31: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 40. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 20.06 bis zum 17.06.2010. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ, die Daptomycin-MHK und die Ergebnisse der *liaFSR*-PCR dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 40		
Probe	40a	40b
Datum Probeneingang	15.06.10	13.07.10
<i>van</i> -Typ	A	A
<i>liaF</i>	pos	pos
<i>liaR</i>	pos	pos
<i>liaS</i>	pos	pos
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	32
PFGE-Muster		

Tabelle 32: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 42. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 29.01.2011 bis zum 12.02.2011. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ und die Daptomycin-MHK dargestellt. Isolate eines gleichen Klons sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 42		
Probe	42a	42b
Datum Probeneingang	03.12.10	25.01.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8
PFGE-Muster		

Tabelle 33: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 45. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 11.05.2010 bis zum 24.05.2010. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ, die Daptomycin-MHK und die Ergebnisse der *liaFSR*-PCR dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 45				
Probe	45a	45b	45c	45d
Datum Probeneingang	04.05.10	11.05.10	08.06.10	06.07.10
<i>van</i> -Typ	A	A	A	A
<i>liaF</i>	nd	pos	nd	pos
<i>liaR</i>	nd	pos	nd	pos
<i>liaS</i>	nd	pos	nd	pos
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8	8	32
PFGE-Muster				

Tabelle 34: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 50. Es erfolgte keine Daptomycintherapie. Die Patienten isolate sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Es werden der *van*-Typ und die Daptomycin-MHK dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 50		
Probe	50a	50b
Datum Probeneingang	01.02.11	22.03.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	8
PFGE-Muster		

Tabelle 35: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 51. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 05.12.2011 bis zum 04.01.2011 sowie vom 01.03.2011 bis zum 08.03.2011. Die Patientenisolat sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Der *van*-Typ und die MHK werden dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert. Das Folgeisolat wies eine erhöhte Daptomycin-MHK von 128 µg/ml auf. Es lagen keine weiteren Isolate dieses klonalen Stamms vor, so dass keine Aussage möglich war, ob es sich um eine MHK-Zunahme oder um eine primäre Unempfindlichkeit handelte.

Patient 51		
Probe	51a	51b
Datum Probeneingang	30.11.10	08.03.11
<i>van</i> -Typ	A	A
Daptomycin-MHK in µg/ml	8	128
PFGE-Muster		

Tabelle 36: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 54. Eine Daptomycintherapie erfolgte vom 10.11.2010 bis zum 22.11.2010. Die Patientenisolat sind chronologisch nach dem Datum des Probeneingangs geordnet. Der *van*-Typ und die MHK werden dargestellt. Isolate eines gleichen Klon sind durch farbliche Markierungen in der Spalte PFGE-Muster markiert.

Patient 54		
Probe	54a	54b
Datum Probeneingang	19.10.10	16.11.10
<i>van</i> -Typ	B	B
Daptomycin-MHK	4	4
PFGE-Muster		

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Eigenschaften von *van*-Typen bei Enterokokken in Anlehnung an Werner *et al.* 2008b

Tabelle 2: Bewertung von Ausgangs- und Folgeisolaten in Anlehnung an das Bewertungsschema von Tenover (Tenover *et al.* 1995)

Tabelle 3: Daptomycin MHK-Verteilung bei Wildtyp *E. faecium* (n=12331) (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2014)

Tabelle 4: Für diese Arbeit verwendete Geräte

Tabelle 5: Für diese Arbeit verwendete Chemikalien

Tabelle 6: Für diese Arbeit verwendete Reagenzien und Enzyme

Tabelle 7: Für diese Arbeit verwendete Primer

Tabelle 8: PFGE-Einstellungen für *E. faecium*-DNA

Tabelle 9: Mengenangaben für PCR-Medien

Tabelle 10: *vanA*- und *vanB*-PCR

Tabelle 11: Bindungstemperaturen der Primer

Tabelle 12: Eigenschaften der Erst- und Folgeisolate mit gleichem PFGE-Muster und mindestens drei Wochen Abstand, bei denen es zu keinem MHK-Anstieg gekommen war

Tabelle 13: Eigenschaften der Erst- und Folgeisolate mit gleichem PFGE-Muster und mindestens drei Wochen Abstand, bei denen es zu einem MHK-Anstieg gekommen war

Tabelle 14: Darstellung der Analyse der Gene *liaF*, *liaR* und *liaS* von selektierten Patientenisolaten, bei denen zwei Isolate klonal identisch waren, die mindestens drei Wochen auseinander lagen und bei denen es im Verlauf zu einem Anstieg der Daptomycin-MHK gekommen war

Tabelle 15: Isolate der Patienten

Tabelle 16: MHK der Wildtypen

Tabelle 17: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 4

Tabelle 18: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 7

Tabelle 19: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 8

Tabelle 20: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 9

Tabelle 21: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 10

Tabelle 22: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 17

Tabelle 23: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 21

Tabelle 24: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 23

Tabelle 25: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 24

Tabelle 26: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 32

Tabelle 27: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 33

Tabelle 28: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 36

Tabelle 29: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 37

Tabelle 30: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 39

Tabelle 31: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 40

Tabelle 32: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 42

Tabelle 33: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 45

Tabelle 34: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 50

Tabelle 35: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 51

Tabelle 36: Vergleichende Analyse aller Isolate von Patient 54

8.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anzahl (in Prozent) der invasiven *Enterococcus faecium*-Isolate mit Resistenz gegenüber Vancomycin in verschiedenen Europäischen Ländern im Jahr 2012 (EARS-Net 2012)

Abb. 2: Der Größenstandard F-303 SD

Abb. 3: Typisierung des *vanA/B*-Genotyps mittels PCR

Abb. 4: Darstellung der Verteilung von *vanA*- und *vanB*-Typen im Kollektiv der 58 VRE-Erstisolate

Abb. 5: Analyse der klonalen Verwandtschaft von VRE-Isolaten mittels PFGE

Abb. 6: Verteilung der Daptomycin-MHK der Erstisolate der 58 Patienten der KMT-Station

Abb. 7: Darstellung der Verteilung der MHK-Werte im Kollektiv der 58 VRE-Erstisolate bezogen auf den *van*-Typ

Abb. 8: Darstellung der Verteilung der MHK-Werte bei Vancomycinempfindlichen *E. faecium* Isolaten

Abb. 9: Darstellung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *SmaI*-gespaltener chromosomaler DNA

Abb. 10: Untersuchung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *SmaI*-gespaltener chromosomaler DNA

Abb. 11: Darstellung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *SmaI*-gespaltener chromosomaler DNA

Abb. 12: Darstellung der klonalen Identität von VRE-Folgeisolaten anhand der PFGE-Muster *SmaI*-gespaltener chromosomaler DNA

Abb. 13: Darstellung der Cardiolipinsynthese

Abb. 14: Darstellung der Cardiolipinsynthese mit bekannten und neuen Mutationen

Abb. 15: Erstisolate

Abb. 16: Verläufe

Abb. 17: Analyse ausgewählter Isolate

9. Danksagung

Ich bedanke mich bei dem Institutsdirektor Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die Zurverfügungstellung von Räumlichkeiten und Geräten im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Holger Rohde, Oberarzt am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema arbeiten zu dürfen. Für die unermüdliche Bereitschaft zum Ideenaustausch und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge möchte ich mich bedanken. Ohne die Möglichkeiten, die er mir eröffnete, wäre diese Arbeit nicht entstanden. Ich möchte mich daher herzlich für die überragende wissenschaftliche und menschliche Betreuung bedanken!

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für die Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und das sehr angenehme Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. med. Gefion Franke, PD Dr. med. Moritz Hentschke, Dr. med. Martin Christner, Dr. med. M. Lütgehetmann, Dr. med. M. Wolters und Prof. Dr. rer. nat. P. M. Kaulfers für die Unterstützung und den Ideenaustausch. Petra Schillemeit und Silke Meyer danke ich für die Hilfsbereitschaft und große Herzlichkeit sowie für die schöne Zeit im Institut. Frau Gesche Kroll danke ich für die Durchführung der Amplifikation von *c/s* sowie *liaFSR* und die Durchführung der Sequenzierung entsprechender Amplifikate sowie für Ihre große Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft. Danken möchte ich auch Dr. med. Heinrich Lellek für seine Unterstützung, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre!

Ich danke meiner Familie, die an mich glaubt und mich unterstützt. Für die Liebe und den Rückhalt möchte ich insbesondere meiner Mutter unendlich danken! Ebenso danke ich allen Freunden, insbesondere Johanna Seib, Michelle und Edgar Sattinger, für alles! Mein besonderer Dank geht an meinen Mann Jérémie Ruckert. Ich danke Dir für alles, für Deine Geduld, Deinen wundervollen Humor, Deinen Glauben an mich und für die wundervolle Zeit mit Dir! Mit Dir zusammen zu sein bedeutet unbeschreibliches Glück!

10. Lebenslauf

08/2013-heute	Assistenzärztin für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie, MVZ für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie Koblenz-Mittelrhein
06/2012-06/2013	Assistenzärztin für Humangenetik, Pränatalzentrum Hamburg und Humangenetik im Gynaekologicum
04/2003 – 04/2012	Studium Humanmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz und Universität Hamburg, Abschluss: Staatsexamen
10/2004 – 03/2011	Studium Tiermedizin, Universität Giessen, Abschluss: Staatsexamen
1989 – 2002	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Bremen)

11. 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:
(Carolin Ruckert)