

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

MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE VON VANCOMYCIN-RESISTENTEN  
ENTEROKOKKEN AM UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG  
IM ERSTEN HALBJAHR DES JAHRES 2012

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eva Elisabeth Roßkopf

JAHR 2022



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

MOLEKULARE EPIDEMIOLOGIE VON VANCOMYCIN-RESISTENTEN  
ENTEROKOKKEN AM UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG  
IM 1. HALBJAHR DES JAHRES 2012

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eva Elisabeth Roßkopf

JAHR 2022

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wulf Schneider
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Glück
Tag der mündlichen Prüfung:	07.11.2022

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
1.1	Medizinische Bedeutung der Enterokokken.....	10
1.2	Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken.....	11
1.2.1	Glykopeptid-Resistenz.....	12
1.2.2	Entstehung und Entwicklung der Glykopeptid-Resistenz.....	15
1.3	Klinische Relevanz von Vancomycin-resistenten <i>E. faecium</i> -Isolaten (VREfm).....	17
1.4	Virulenzfaktoren.....	18
1.4.1	Enterococcal surface protein ( <i>esp</i> ).....	19
1.4.2	Putative Hyaluronidase ( <i>hyl</i> ).....	21
1.4.3	Adhesin of collagen from <i>E. faecium</i> ( <i>acm</i> ).....	22
1.5	Entwicklung nosokomialer <i>E. faecium</i> -Linien: klonaler Komplex 17 (CC17) bzw. Klade A1.....	23
1.6	Infektionsprävention und Surveillance von VRE.....	25
1.7	Surveillance mit Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST).....	26
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Chemikalien (alphabetische Reihenfolge).....	28
2.1.2	Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge).....	29
2.1.3	Oligonukleotide.....	30
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.5	Geräte.....	32
2.1.6	Gefäße.....	33
2.1.7	Software.....	34
2.1.8	Labor.....	34

2.1.9	Benutzte Internetportale .....	34
2.2	VRE-Diagnostik im Jahr 2012 aus klinischen Proben .....	35
2.2.1	VRE-Nachweis durch Screeningabstriche .....	35
2.2.2	VRE-Nachweis bei klinischen Infektionen .....	37
2.3	Laboranalyse im Jahr 2018/2019 zur Untersuchung von VRE- <i>E.-faecium</i> -Isolaten	38
2.3.1	Kulturverfahren .....	38
2.3.2	MALDI-TOF-Untersuchung .....	39
2.3.3	DNA-Isolierung.....	39
2.3.4	Genetische Untersuchung mittels PCR-Analysen .....	40
2.3.5	Gelelektrophorese.....	43
2.3.6	Aufreinigung und Sequenzieren der Amplifikate für die MLSTypisierung .....	49
2.3.7	Auswerten der Sequenzen mittels der MLSTypisierung.....	50
2.4	Analyse der Patientendaten.....	51
2.5	Ethikvotum .....	52
3	Ergebnisse .....	53
3.1	Übersicht über alle VRE-Isolate der Stammsammlung im ersten Halbjahr 2012 .....	53
3.2	Enterokokken-Spezies .....	55
3.3	Halbjahresverlauf im Jahr 2012.....	55
3.4	Alter und Geschlecht .....	56
3.5	Glykopeptid-Resistenzgene .....	58
3.6	Virulenzfaktoren.....	59
3.7	MLSTypisierung.....	61
3.7.1	Allelevarianten .....	61
3.7.2	Nicht vollständig durchführbare MLST .....	62
3.8	MLST-Sequenztypen.....	63
3.8.1	Verteilung der ST .....	63
3.8.2	Verteilung der Virulenzfaktoren und Resistenzgene auf ST .....	64

3.8.3	Zeitlicher Verlauf der Nachweise von ST 117 und ST 192 .....	66
3.9	Verteilung der VREfm-Erstisolate innerhalb des UKR.....	67
3.9.1	Verteilung auf Stationsarten.....	67
3.9.2	Verteilung auf Stationen des UKRs .....	69
3.10	Klinisches Material.....	71
3.10.1	Materialgruppen .....	71
3.10.2	Besiedlungsstatus .....	72
3.11	VREfm-Mehrfachisolate von VRE-Trägern.....	74
3.12	VRE-Isolate aus den externen Krankenhäusern .....	78
4	Diskussion.....	80
4.1	Allgemeiner Hintergrund.....	80
4.2	Vergleich erstes Halbjahr 2012 mit Gesamtdaten aus 2012.....	83
4.3	Entwicklung der VRE-Fälle .....	90
4.4	Enterokokkenspezies .....	91
4.5	Alter und Geschlecht .....	92
4.6	Resistenzgene .....	93
4.7	Virulenzfaktoren.....	93
4.8	Epidemiologische Verteilung von MLST.....	96
4.8.1	MLST-Sequenztypen .....	96
4.8.2	Ausbruchsgeschehen auf Stationen des UKR .....	98
4.8.3	MLST- Verteilung am UKR .....	100
4.8.4	MLST-Materialanalyse .....	101
4.9	Methodik MLSTypisierung .....	102
4.10	Präventionsmaßnahmen bei VRE.....	104
4.11	Ausblick.....	105
5	Zusammenfassung.....	107
6	Literaturverzeichnis .....	109

6.1	Literatur .....	109
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	120
7.1	Tabellen .....	120
7.2	Abbildungen .....	121
8	Danksagung.....	126

## Abkürzungsverzeichnis:

ABS	<i>Antibiotic Stewardship</i>
<i>acm</i>	<i>adhäsin of collagen from E. faecium</i>
Ala	Alanin
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ARS	Antibiotika-Resistenz-Surveillance
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
Bp	Basenpaare
CC17	klonaler Komplex 17 ( <i>clonal complex</i> )
cgMLST	Kerngenom-MLST ( <i>core genome MLST</i> )
CT	Komplextypen ( <i>complex types</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EARS-Net	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>esp</i>	<i>Enterococcal surface protein</i>
<i>espA</i>	Wiederholung der Untereinheit A des Gens <i>esp</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
fwd.	<i>forward</i>
HA	Hospital-assoziiert
<i>hyl</i>	putative Hyaluronidase
IfSG	Infektionsschutzgesetz

IMHR	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg
ITS	Intensivstation
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KH	Krankenhaus
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KMT	Knochenmarktransplantation
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
Lac	Lactat
MHK	minimale Hemmkonzentration
mM	Millimolar ( $10^{-3}$ mol/l)
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i> -Massenspektrometrie
MLST	Multi-Locus-Sequenz-Typisierung
MRSA	Methilin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MRE	multiresistente Erreger
Mya.	<i>Million Years ago</i>
NK	Negativkontrolle
NRZ	Nationales Referenzzentrum
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PK	Positivkontrolle
rev.	<i>reverse</i>
RKI	Robert-Koch-Institut

rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismen
ST	Sequenztyp
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tn	Transposon
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VREfm	Vancomycin-resistente <i>Enterococcus faecium</i>
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VSE	Vancomycin-sensible Enterokokken
WGS	<i>Whole-Genom-Sequencing</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )

# 1 Einleitung

## 1.1 Medizinische Bedeutung der Enterokokken

Enterokokken, ehemals Gruppe-D-Streptokokken, wurden 1984 zu einer eigenen Bakterien-Gattung zusammengefasst (1). Es sind derzeit über 59 Spezies von Enterokokken bekannt (2). Davon besitzen aber nur *Enterococcus (E.) faecalis* und *E. faecium* eine größere medizinische Bedeutung. Sehr selten sind andere Spezies, wie *E. avium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* für eine Infektion verantwortlich. Von Natur aus kommen *E. faecalis* und *E. faecium* im Gastrointestinaltrakt vor und sind dort bei ca. 80 % der Bevölkerung nachweisbar. Sie können aber auch den Genitaltrakt, den Oropharynx, die Haut und Wunden besiedeln (3). Enterokokken haben sich zu wichtigen multiresistenten Erregern (MRE) entwickelt, welche nosokomiale Infektionen verursachen können (4).

Der Ursprung der Enterokokken datiert sich auf vor 425 Millionen Jahren, etwa zeitgleich mit der Anpassung der Lebewesen an eine terrestrische Lebensweise. Die Enterokokken entwickelten sich gemeinsam mit ihren Wirten. Dabei entstand ihre besonders harte Zellwand, welche die Enterokokken heute so widerstandsfähig gegen Antibiotika und Umwelteinflüsse (Austrocknung und Hitze) macht (5). Ihr Vorkommen beschränkt sich nicht nur auf den Gastrointestinaltrakt des Menschen, sondern sie lassen sich auch in Gewässern, Abwasser, Boden, Pflanzen und Lebensmitteln nachweisen (6).

Enterokokken sind fakultativ anaerobe, Katalase-negative, grampositive, sehr umweltbeständige Kokken. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei 35 °C. Sie wachsen bei Temperaturen von 10 - 45 °C. Selbst bei einem pH-Wert von 9,6 sowie in einer 6,5%igen Kochsalzkonzentration können sie sich vermehren. Einer thermischen Behandlung von 60 °C können sie über 30 Minuten standhalten (1). Außerdem sind sie gegen eine 40%ige Gallensalzkonzentration unempfindlich (7). Hinzu kommt ihre hohe Resistenz gegen Austrocknung. Sie können länger als 3 Monate auf Baumwolle oder Kunststoff überleben. Außerdem sind sie leicht übertragbar, da sie über ein gutes Anheftungsvermögen verfügen (8).

## 1.2 Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken

Enterokokken besitzen eine große Vielfalt an natürlichen und erworbenen Antibiotikaresistenzen (Tabelle 1). Diese sind von großer Bedeutung, da sie die Therapiemöglichkeiten bei Infektionen mit Enterokokken deutlich verringern und so die Behandlung erschweren (9).

Tabelle 1: Natürliche und erworbene Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken (3, 9)

natürliche (intrinsische) Resistenzen	erworbene (extrinsische) Resistenzen
Cephalosporine (1. - 4. Generation)	Ampicillin (besonders <i>E. faecium</i> , selten <i>E. faecalis</i> )
Semisynthetische Penicilline	Makrolide
Monobactame	Aminoglycoside (High-level-Resistenz)
Polymyxine	Chloramphenicol
Lincosamide (zumeist)	Fluorchionolone
Streptogramine ( <i>E. faecalis</i> )	Streptogramine ( <i>E. faecium</i> )
Mupirocin ( <i>E. faecalis</i> )	Tetracycline
Aminoglycoside (Low-level-Resistenz)	Glykopeptide (besonders <i>E. faecium</i> , selten <i>E. faecalis</i> )
Vancomycin (Low-level-Resistenz in <i>E. gallinarum</i> und <i>E. casseliflavus</i> )	Oxazolidione (Linezolid)
	Glycylcycline (Tigecyclin)
	Lipopeptide (Daptomycin)

Als Therapie erster Wahl werden bei unkomplizierten Enterokokken-Infektionen durch *E. faecalis* Beta-Lactame wie z.B. Ampicillin verwendet. Zur Endokarditis-Therapie werden diese mit bestimmten Aminoglykosiden (nur Gentamicin und Streptomycin) kombiniert. Diese Aminoglykoside - Enterokokken besitzen intrinsische low-level Resistenz gegen Aminoglykoside - erzielen nur in Verbindung mit einem Zellwand-wirksamen Antibiotikum (Penicillin, Glykopeptid) ihre synergistische Wirkung. *E. faecalis*-Stämme sind nahezu alle Ampicillin-sensibel und somit gut therapierbar. Bei nosokomialen *E. faecium*-Isolaten sind jedoch über 90 % Ampicillin-resistent, was eine Therapie mit Glykopeptiden (Vancomycin oder Teicoplanin) bei *E. faecium*-Infektionen erforderlich macht (3, 10).

Eine zusätzliche Resistenz gegen Glykopeptide schränkt die therapeutischen Möglichkeiten weiter stark ein. Zur Therapie werden in Deutschland Tigecyclin (v. a. abdominaler Fokus), Linezolid und Daptomycin eingesetzt. Doch auch gegen diese Reserveantibiotika wurden schon Resistenzen, die bei vermehrter Verwendung häufiger wurden, beobachtet. Als neue Substanzen, mit noch unklarem therapeutischem Stellenwert, wurden Tedizolid und neue Lipoglykopeptide (Telavancin, Dalbavancin, Oritavancin) eingeführt, welche ebenfalls eine Wirkung gegen Enterokokken zeigen (3, 10–14).

Infektionen mit *E. faecalis* sind gut mittels Ampicillin therapierbar. Die Therapie von *E. faecium*-Infektionen erfolgt jedoch mit Vancomycin. Aus diesem Grund kommt der Surveillance der Vancomycin-resistenten *E. faecium* (VREfm)-Isolate eine wichtige Rolle zu. Auch in dieser Arbeit ist der Focus auf die *E. faecium*-Isolate gelegt (3).

### 1.2.1 Glykopeptid-Resistenz

Es existieren neun verschiedene molekulare Mechanismen der Glykopeptid-Resistenz: *vanA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, *L*, *M* und *N* (15). *VanC* ist eine natürliche (intrinsische) Resistenz, welche nur bei *E. gallinarum* (16) und *E. casseliflavus* (17) auftritt. Medizinische Bedeutung haben nur *vanA* und *vanB*, sodass in dieser Arbeit nur diese beiden genauer betrachtet werden (15).

Vancomycin ist ein Glykopeptid und hemmt die Zellwandbiosynthese von Enterokokken. Das Grundgerüst der Zellwand besteht aus Peptidoglykan, welches lange Polysaccharidketten aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin formt, die durch Quervernetzung ihrer Pentapeptidseitenketten zu einem stabilen Netz (Sacculus) verbunden sind. Wenn die Zellwand zerstört wird, lysiert das Bakterium durch seinen eigenen Überdruck und stirbt ab (18). Glykopeptide wirken, indem sie am C-terminalen D-Alanin-D-Alanin des Pentapeptidvorläufers binden. Dies bewirkt, dass das N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid nicht in das entstehende Peptidoglykan durch Transglykolisierung quervernetzt werden kann. Daraus ergibt sich ein fehlerhafter Mureinsacculus und das Bakterium wird abgetötet (Abbildung 1) (19).

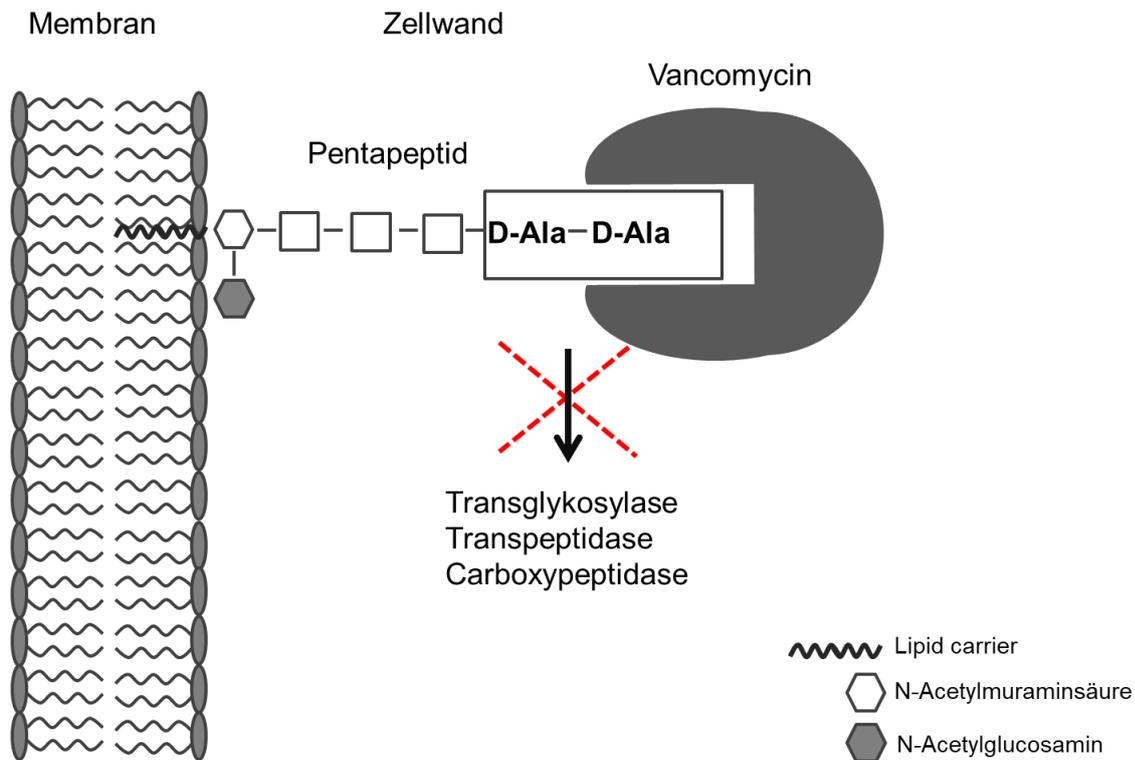


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Wirkmechanismus von Vancomycin: Verhinderung der Zellwandbiosynthese durch die Bindung von Vancomycin an das D-Alanin-D-Alanin (D-Ala-D-Ala) des Pentapeptids und Hemmung der Enzyme Transglykosylase, Transpeptidase und Carboxypeptidase in Anlehnung an Courvalin (20)

Bei Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) wird mit Hilfe der Resistenzgene *vanA* oder *vanB* das terminale D-Alanin-D-Alanin durch ein D-Alanin-D-Lactat ersetzt, was zu einer niedrigeren Bindungsfähigkeit von Glykopeptiden und somit zu einer Antibiotikaresistenz führt (Abbildung 2). Beim Resistenzgen *vanC* ist das C-Terminale Ende durch D-Alanin-D-Serin ersetzt (20).

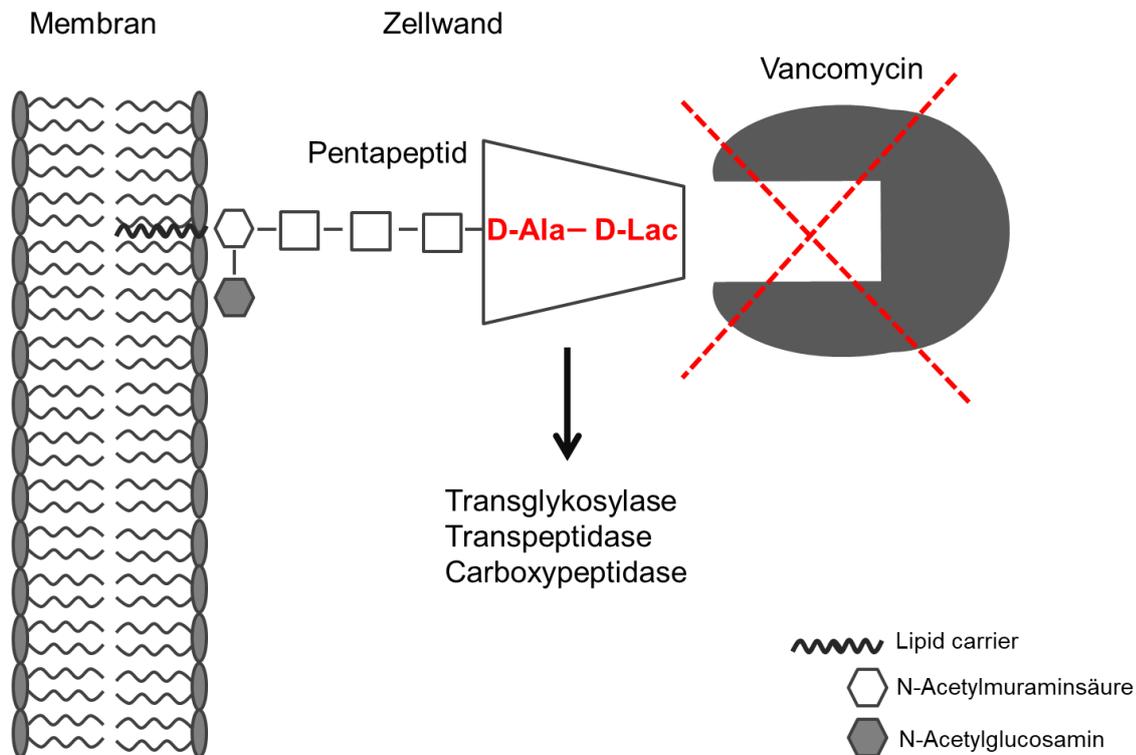


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Resistenzmechanismus von VRE: Änderung der Vancomycinbindestelle in D-Alanin-D-Lactat (D-Ala-D-Lac) in Anlehnung an Courvalin (20)

Die Gene für *vanA* und *vanB* sind auf Chromosomen und Plasmiden lokalisiert, was bedeutet, dass diese klonal, aber auch horizontal durch Plasmide oder durch Konjugation in Form von großen Elementen von Bakterium zu Bakterium weitergegeben werden können (21–24). Die Glykopeptid-Resistenz durch *vanA* ist eine high-level Resistenz für Vancomycin und Teicoplanin. Diese ist auf dem 11 kb großem Transposon (Tn) 1546 lokalisiert (20). Die Resistenz führt zu einer 1000-fach niedrigeren Bindungsfähigkeit von Vancomycin, was hohe Mindesthemmkonzentrations (MHK)-Werte (8-1000 mg/l) mit sich bringt (6). Das Operon von *vanA* teilt sich in sieben Abschnitte auf. Fünf sind für die Resistenz verantwortlich und 2 für die Regulation (20).

Das Resistenzgen *vanB* ist auch unter anaeroben Bakterien im Gastrointestinaltrakt verbreitet. Dieses ist vor allem auf Tn 1549 oder Tn 5382 lokalisiert (25). Es ist ähnlich wie *vanA* aufgebaut, unterscheidet sich jedoch in seiner Regulation (20). Bei diesem Gen liegt nur eine Resistenz gegen Vancomycin und nicht gegen Teicoplanin vor. Die Resistenz ist unterschiedlich stark ausgebildet, sodass sehr variable MHK-Werte ( $\leq 4 - 1000$  mg/l) bekannt sind, was diagnostisch zu Nachweisproblemen führen kann (6). *VanA* und *vanB* können anhand ihrer phänotypischen Eigenschaften mit akzeptabler Sicherheit unterschieden werden, da diese

meist mit dem Genotyp übereinstimmen. So besitzen Vancomycin- und Teicoplanin-resistente Isolate das *vanA*-Gen und isoliert Vancomycin-resistente, aber Teicoplanin-sensible Isolate das *vanB*-Gen. Weltweit ist *vanA* am weitesten verbreitet (3). Anfangs war auch in Deutschland das *vanA*-Gen vorherrschend. Seit dem Jahr 2017 wurden jedoch erstmals deutlich mehr *vanB*- als *vanA*-positive Isolate registriert (11).

### 1.2.2 Entstehung und Entwicklung der Glykopeptid-Resistenz

Die ersten Vancomycin-resistenten Enterokokken der Spezies *E. faecium* (VRE<sub>fm</sub>) wurden im Jahre 1986 in Frankreich und England nachgewiesen (21, 26). Ein Jahr später entdeckte man in den Vereinigten Staaten einen Vancomycin-resistenten *E. faecalis*-Stamm (27). Das Auftreten von VRE-Stämmen unterschied sich in Amerika und Europa anfangs sehr. In Europa wurde die Antibiotikaresistenz durch die Verwendung des Glykopeptids Avoparcin, das seit 1970 in der tierischen Lebensmittelproduktion als Wachstumsförderer eingesetzt wurde, induziert. Diese Resistenzen wurden über die Nahrungskette oder durch den direkten Kontakt auf den Menschen übertragen. So entwickelte sich ein weit verbreitetes Reservoir von VRE-Stämmen innerhalb der Bevölkerung. Dies stellte eine Bedrohung für eine Ausbreitung in Krankenhäusern über klonale oder horizontale Verbreitung dar. Als Folge dessen verbot die Europäische Union die Benutzung von Avoparcin im Jahre 1997. Daraufhin verringerte sich die VRE-Kolonisation bei Nutztieren und in der Bevölkerung. In den USA gab es kein allgemeines Reservoir an VRE-Stämmen in der gesunden Bevölkerung. Avoparcin wurde dort nicht in der Tiermast genutzt. Im Gegensatz dazu gab es aber ein großes Reservoir innerhalb der Krankenhäuser. Durch häufigen Einsatz von Antibiotika entstand ein allgemeiner Selektionsdruck auf die Enterokokken, was zu einer Selektion von Ampicillin-resistenten Enterokokken führte. Infolgedessen wurde vermehrt Vancomycin – deutlich mehr als in Europa – eingesetzt, wodurch ein Anstieg der VRE-Stämme in Krankenhäusern in Amerika entstand (28).

Ursprünglich soll die Glykopeptid-Resistenz jedoch von Glykopeptid-produzierenden Bakterien, wie *Amycolatopsis orientalis* oder *Streptomyces toyocaenis* stammen. Diese müssen sich selbst vor ihren eigenen Glykopeptiden schützen. Es wird vermutet, dass die Glykopeptid-Resistenzen codierenden Gene über horizontalen Transfer an die Enterokokken übertragen wurden (28, 29).

In den USA kam es zu einer schnellen Verbreitung von VRE ab 1990, in Europa ab 2000 (30). Diesen ausbruchsähnlichen Verbreitungen war immer eine Zunahme von Ampicillin-resistenten Enterokokken vorausgegangen (31). Anfangs war *E. faecalis* für die meisten Infektionen verantwortlich. Mittlerweile ist *E. faecium* für 40 % aller Infektionen mit Enterokokken verantwortlich (25).

Auch in der Resistenzstudie der Paul Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie wurde dieser Anstieg beobachtet. So sah man, dass der Anteil an *E. faecium*-Isolaten von allen Enterokokken-Isolaten zunahm (1998: 9,3 % auf 2004: 24,4 %) und die Vancomycin-Resistenzraten unter den *E. faecium*-Isolaten stieg (1998: 3,8 %, 2004: 13,5 %, 2013: 16,6 %, 2016: 24,0 %). Unter den *E. faecalis*-Isolaten ließen sich jedoch nahezu keine Vancomycin-Resistenzen nachweisen. Auch am *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (Ears-Net) konnten steigende Vancomycin-Resistenzraten für *E. faecium*-Isolate nachgewiesen werden, während die Rate für *E. faecalis* auch hier unter 1 % blieben. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass es sich bei dem Anstieg der VRE-Isolate um einen Anstieg von VREfm-Isolaten handelt (9, 32, 33).

### 1.3 Klinische Relevanz von Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten (VREfm)

Enterokokken sind - meist als nicht-pathogene Bakterien - ein Teil des menschlichen Darmmikrobioms. In den häufigsten Fällen eines mikrobiologischen Nachweises von VRE aus Patientenproben handelt es sich auch nur um eine Kolonisation und keine Infektion. Bei einem bestimmten Patientenkollektiv ist ein Infektionsrisiko jedoch sehr hoch und somit klinisch relevant. Meistens liegt vor einer Infektion eine Kolonisation vor (34).

Risikofaktor für eine Besiedlung/Infektion mit VRE ist eine schwere Komorbidität. Patienten mit einem chronischen Grundleiden wie Niereninsuffizienz (Dialyse), Onkologie-Patienten und Patienten mit Immunsuppression, weisen ein erhöhtes Risiko für eine VRE-Infektion auf. Auch Neugeborene oder Patienten mit einem Alter ab 60 besitzen ein höheres Risiko für eine VRE-Infektion. Das Risikokollektiv lässt sich in Transplantierte, hämatologisch-onkologisch Erkrankte und Patienten von Intensivstationen zusammenfassen. Diese Patienten haben außerdem oft lange Krankenhausaufenthalte oder vorausgegangene Antibiotikatherapien hinter sich, was das Risiko auf eine VRE-Besiedlung erhöht (3, 10).

Enterokokken verursachen als leichte Infektionen vor allem Harnwegsinfektionen. Schwere Infektionen stellen die Enterokokken-Endokarditis, postoperative Spondylodiszitis, Abdominal- (meist polymikrobiell) oder fremdkörperassoziierte Infektionen dar (10).

Gegenüber anderen MRE, wie z.B. MRSA, verursachen VRE eine deutlich geringere Krankheitslast. Allerdings steigen die Fallzahlen an VRE-Nachweisen. Besonders als Verursacher von Blutstrominfektionen stellen sie ein großes Problem dar (35). Enterokokken-Bakteriämien haben eine Letalitätsrate von 30 % (3). Infektionen mit VRE-Stämmen führen zu längeren Krankenhausaufenthalten sowie einer erhöhten Sterblichkeit im Krankenhaus. Sie sind eine zunehmende Bedrohung für die öffentliche Gesundheit (4).

Eine besondere Bedeutung kommt auch dem horizontalen Gentransfer der Vancomycin-Resistenz an Methicillin-resistente *Staphylococcus (S). aureus* (MRSA) zu, gegen welche Vancomycin das Mittel der Wahl ist. Dieser wurde das erste Mal im Jahr 2002 in Michigan (USA) entdeckt (31, 36).

## 1.4 Virulenzfaktoren

Genetische Untersuchungen zeigen, dass hospital-assoziierte *E. faecium*-Stämme (s. 1.5 Entwicklung nosokomialer *E. faecium*- Linien: klonaler Komplex 17 (CC17) bzw. Klade A1) zusätzliche Gene erworben haben, welche im normalen Kommensal oder in natürlichen Stämmen nicht zu finden sind. Diese Gene ermöglichen wahrscheinlich den Enterokokken unter den besonderen Bedingungen im Krankenhaus zu überleben. Sie codieren so genannte Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren. Diese Virulenzfaktoren, welche sich oft an der Zelloberfläche befinden, unterstützen das Bakterium z.B. bei der Kolonisation eines Wirtes, indem sie zur Bildung des Biofilms beitragen oder die Adhäsion an Oberflächen ändern. Somit erhöhen sie die Pathogenität bzw. Virulenz eines Bakteriums, da eine Kolonisation oft die erste Vorstufe zur Infektion ist. Diese Virulenzfaktoren sind jedoch bis heute noch wenig verstanden und weitere Untersuchungen sind nötig (25).

### 1.4.1 Enterococcal surface protein (*esp*)

Das *Enterococcal surface protein (esp)* ist ein Oberflächenprotein, welches zum ersten Mal bei infektions-bezogenen *E. faecalis* beschrieben wurde (37). Nachfolgend wurde es auch in *E. faecium* gefunden. Dabei erkannte man einen Zusammenhang von *esp* mit klinischen und ausbruchsbezogenen Isolaten (38). Die *esp*-codierenden Gene von *E. faecalis* und *E. faecium* gleichen sich zu 89 %. *Esp* befindet sich bei *E. faecium* nur in infektionsbezogenen Isolaten (39). Das Gen *esp* in *E. faecalis* ist ausführlicher beschrieben. Es codiert ein großes Oberflächenprotein mit einer Masse von ca. 202 kDa (37). Die Erhöhung der Virulenz von Enterokokken durch das Oberflächenprotein *esp* wurde bei einer Harntrakt-Infektion in einem Maus-Versuch durch eine stärkere Kolonisation von Enterokokken und längere Persistenz der Infektion bei *E. faecalis* (40) und bei *E. faecium* bestätigt. Im Versuch mit *E. faecium* konnte auch gezeigt werden, dass *esp* in die Bindung an Blasen- und Nieren-Zellen involviert ist (41). Außerdem konnte der Beitrag von *esp* an der Bildung von Biofilmen bestätigt werden. *Esp* fördert die initiale Zellanlagerung und Biofilm-Bildung auf abiotischen Oberflächen sowie Polystrol (Kunststoff). Diese Fähigkeit ist in klinischen Isolaten weit verbreitet. Bei 65 % der nosokomialen Infektionen spielen Biofilme eine Rolle (42, 43). Auch bei der Endokarditis sind diese beteiligt. Der Beitrag von *esp* zur Kolonisation von Herzklappen konnte ebenso experimentell bestätigt werden (44).

*Esp* ist der am meisten verbreitete Virulenzfaktor in klinischen *E. faecium*-Linien (25). Das *esp*-Gen lässt sich über Konjugation zwischen Enterokokken horizontal übertragen (45). Der Anteil an *esp*-positiven *E. faecium* stieg mit den Jahren, wie eine Studie aus den Niederlanden zeigt. Keines der Ampicillin-sensitiven Isolate wurde dabei auf *esp* positiv getestet. Das *esp*-Gen wird mit nosokomialer Ausbreitung von Enterokokken assoziiert (46).

In *E. faecium* ist *esp* Teil einer Pathogenitätsinsel. Dies bedeutet, dass *esp* umgeben von 6 bestimmten Genen ist, welche mit Antibiotikaresistenzen und Virulenz assoziiert werden. Diese Insel ist nur in epidemischen und klinischen Isolaten vorhanden. Wahrscheinlich lassen sich auch diese Inseln durch horizontalen Gentransfer übertragen. Pathogenitätsinseln tragen somit zur Virulenz von *E. faecium* bei (47).

Anhand des Aufbaus des Gens *esp*, konnte gezeigt werden, dass es zu einer Familie von Oberflächenproteinen-codierenden Genen gehört, welche alle mit Virulenz assoziiert werden (39). Das *esp*-Gen von *E. faecium* ist aufgeteilt in eine N-terminale und eine C-terminale Region

ohne Wiederholungen und eine zentrale Repeat-Region mit Wiederholungen der Gene (Abbildung 3). Die N- und C-terminalen Regionen sind durch eine große Sequenzheterogenität geprägt. In der Repeat-Region gibt es die Untereinheiten A, B und C. Die einzelnen Sequenzen dieser Untereinheiten werden verschieden oft wiederholt (Genduplikaturen) oder sind in manchen Fällen nicht vorhanden. Es wurde beobachtet, dass Isolate eines Ausbruchs dieselben Genduplikaturen in den Repeat-Regionen haben. Somit lassen sich über die Repeat-Regionen Enterokokken eines Ausbruches identifizieren (47). In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen von *esp* sowie die Wiederholungen der Untereinheit A genauer betrachtet.

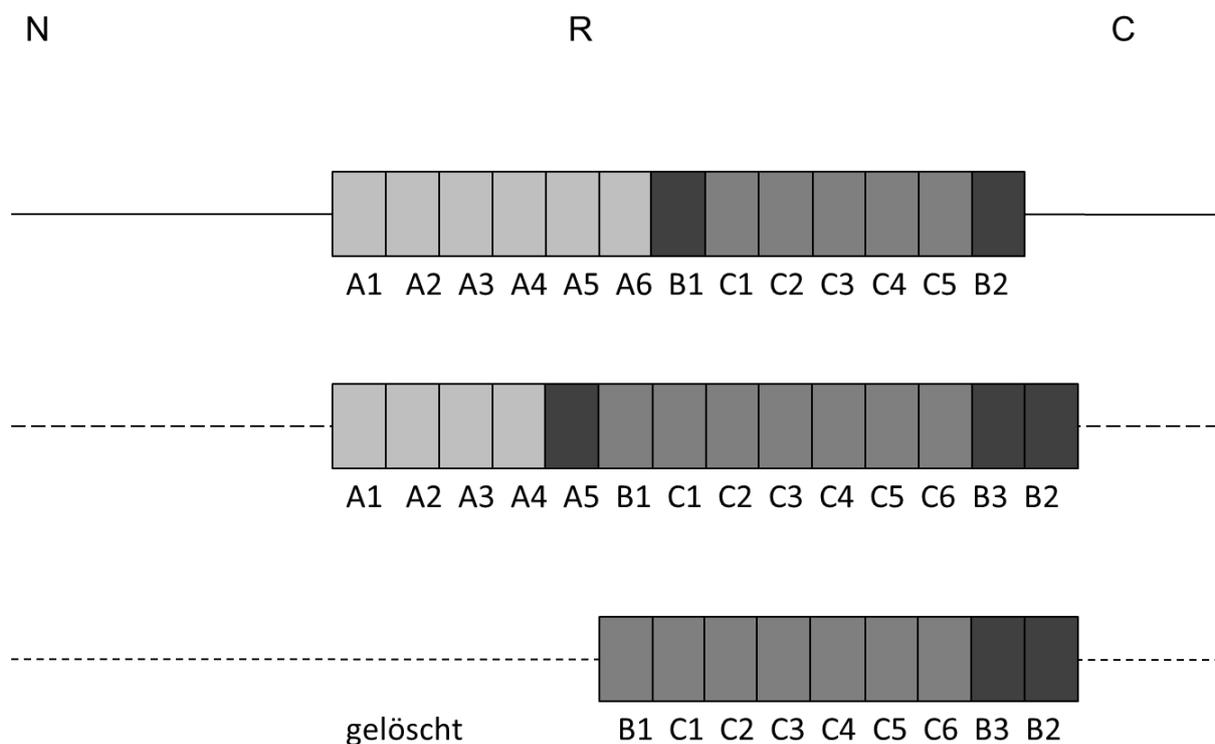


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung unterschiedlicher *esp*-Genvarianten: mit N-(N) und C- Terminus (C), sowie einer Repeat-Region (R) mit verschiedenen Wiederholungen der Abschnitte A, B und C in Anlehnung an Leavis et al. (47)

### 1.4.2 Putative Hyaluronidase (*hyl*)

Ein weiterer Virulenzfaktor, die vermeintliche Hyaluronidase (*hyl*), wurde 2003 entdeckt. Dieses chromosomale Gen *hyl* wurde mit früher beschriebenen Hyaluronidasen von anderen grampositiven Bakterien wie *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* und *Streptococcus pneumoniae* assoziiert (48). Dieses Gen wurde jedoch fälschlicherweise als Hyaluronidase bezeichnet. In Wirklichkeit codiert es eine Familie-84-Glycosyl-Hydrolase, welche keine Hyaluronidase Aktivität ausweist (49). *Hyl* wurde fast ausschließlich in Krankenhaus-assoziierten Proben von multiresistenten Enterokokken diagnostiziert. Diese waren meist Vancomycin-resistent und besaßen außerdem das *esp*-Gen (48). *Hyl* ist Teil eines großen Plasmids, auf welchem auch die Resistenzgene für *vanA* sitzen und welches durch Konjugation übertragen werden kann. *E. faecium* mit diesem Plasmid besitzen eine höhere Pathogenität (50). Ein anderer Versuch zeigte, dass sich die Kolonisation des Gastrointestinaltrakts von Mäusen durch Enterokokken erhöht, wenn das *hyl*-Plasmid vorhanden ist (51). 2011 wurde jedoch von Panesso et al. in einem experimentellen Peritonitis-Modell festgestellt, dass *hyl* selbst keine Auswirkungen auf die Virulenz von *E. faecium* hat (49).

*Hyl* hat somit keinen direkten Einfluss auf die Kolonisation von *E. faecium*. Jedoch besitzen Bakterien, wie oben beschrieben, welche auf *hyl* positiv getestet werden eine höhere Pathogenität. Man vermutet, dass auf denselben Plasmiden, auf welchen *hyl* sitzt, auch die Gene der Virulenzfaktoren, welche die Kolonisation beeinflussen, lokalisiert sind. Somit ist *hyl* ein Marker für das Vorhandensein von Virulenzfaktoren (25).

Der Einfachheit halber und in Analogie zur Literatur wird auch in dieser Arbeit *hyl* weiterhin als Hyaluronidase und Virulenzfaktor bezeichnet. In der Laboranalyse in dieser Arbeit wurden die Proben auf die Existenz der *hyl*-codierenden Gene untersucht.

### 1.4.3 Adhesin of collagen from E. faecium (*acm*)

Der Virulenzfaktor namens adhesin of collagen from E. faecium (*acm*) ist ein Oberflächenprotein, welches an die extrazelluläre Matrix, in diesem Fall Kollagen, des Wirts bindet und so zur Kolonisation und Virulenz eines Bakteriums beiträgt. Solche Adhäsine sind auch in weiteren grampositiven Bakterien, wie *S. aureus* und *E. faecalis* bekannt. Das ca. 2.000 bp lange *acm*-Gen codiert eine 501 Aminosäuren lange A-Domäne, welche die Fähigkeit Kollagen I zu binden codiert (52). Es gibt auch Pseudogene von *acm*, welche nicht die Fähigkeit besitzen Kollagen zu binden. In einer Studie von Nallapareddy et al. wurden diese in einem Viertel der Isolate von Tieren und der Allgemeinbevölkerung gefunden. Isolate, welche mit einer Endokarditis in Verbindung standen, hatten jedoch alle funktionsfähige *acm*-Gene (53).

Enterokokken sind mittlerweile die dritthäufigste Ursache für eine Endokarditis. Dabei spielt die Fähigkeit, von *acm* an Kollagen und somit an das Gewebe von Aorta und Herzklappen zu binden, eine große Rolle. Der Beitrag von *acm* zur Pathogenität von *E. faecium* konnte in einem experimentellen Endokarditis-Versuch von Nallapareddy, Singh und Murray (2008) gezeigt werden. In klinischen Endokarditis-Isolaten wurden nur funktionierende *acm* gefunden. Auch wurde gezeigt, dass *acm* die Pathogenität während der Besiedlung, aber nicht die Mortalität von *E. faecium* erhöht. Es gibt Unterschiede in der Genexpression von *acm* und auch eine mögliche Maskierung des Antigens durch z.B. Polysaccharide, sodass sie *in vitro* manchmal nur schwer nachzuweisen sind (54). Mit einem anti-*acm*-Antikörper konnte die Kollagenbindungsfähigkeit von *acm* und somit von *E. faecium* deutlich herabgesetzt werden. Das wäre ein möglicher therapeutischer Ansatz, um die Kolonisation von *E. faecium* zu erschweren und somit ihre Pathogenität herabzusetzen (55). In dieser Arbeit wurden die Enterokokken auch auf das Vorhandensein von *acm* untersucht.

## 1.5 Entwicklung nosokomialer *E. faecium*-Linien: klonaler Komplex 17 (CC17) bzw. Klade A1

Der Anstieg von VRE ist ein Anstieg von VREfm. Für die steigenden nosokomialen Häufungen, Ausbrüche und Infektionen ist eine bestimmte klonale Linie von VRE-*E. faecium*-Isolaten verantwortlich. Diese Krankenhaus-adaptierten Enterokokken unterscheiden sich von jenen außerhalb des Krankenhauses. Die Selektion dieser *E. faecium*-Hospitalstämme entsteht durch den Einsatz von Antibiotika und dem allgemeinen Selektionsdruck im Krankenhaus. So war der Verbreitung von VRE-Stämmen immer eine Zunahme von Ampicillin-resistenten Enterokokken vorausgegangen (31).

Mit der Einführung der Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) (s. 1.7 Surveillance mit Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)), konnte gezeigt werden, dass diese klonale Linie sich aus dem Sequenztypen (ST) 17 im Krankenhaus entwickelt hat. Diese dabei entstandenen Sequenztypen werden daher im klonalen Komplex 17 (CC17) zusammengefasst. Sie sind charakterisiert durch eine Ampicillin- und eine Chinolon-Resistenz sowie der Anwesenheit von bestimmten Virulenzfaktoren (56).

Mit der Einführung von *Whole-Genom-Sequencing* (WGS) (s. 4.9 Methodik MLSTypisierung) wurde ein neues Modell für die Entwicklung der pathogenen nosokomialen *E. faecium*-Isolate eingeführt, welches weiter zurück reicht und den die letzten 15 Jahre beschriebenen CC17 miteinschließt. Genetische Analysen zeigen, dass die *E. faecium*-Population sich mit der Urbanisation und der beginnenden Domestizierung von Tieren vor 3.000 Jahren in eine Klade B und eine Klade A aufteilte. Die Klade B wird heute in den nicht-hospitalisierten Menschen gefunden und verursacht nahezu keine Infektionen. Mit der Einführung von Antibiotika beim Menschen sowie in der Tiermast teilte sich die Klade A in eine epidemische Krankenhaus Klade A1 und eine tierische Klade A2 auf. Die Klade A2 veranlasst nur selten spontane Infektionen beim Menschen. Die Klade A1 umfaßt alle nosokomialen *E. faecium*-Isolate unter anderem *E. faecium*-Isolate, die zum klonalen Komplex 17 (CC17) gezählt werden (57, 58).

CC17/A1 ist eine weltweit verbreitete Krankenhaus-adaptierte Linie. Sie besitzt ein größeres Genom als andere Enterokokken-Stämme. Dieses Genom enthält mobile Elemente und Pathogenitätsinseln, welche z. B. Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenzen, Membranproteine oder regulatorische Gene codieren. Außerdem findet man bei Enterokokken des CC17/A1 eine höhere Frequenz an spontanen Mutationen, sodass häufig neue Klone entstehen, welche

teilweise alte ersetzen. Die Selektion dieser Hospitalstämme von *E. faecium* geschieht durch den Einsatz von Antibiotika und durch den allgemeinen Selektionsdruck im Krankenhaus. Diese nosokomialen Stämme besitzen einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Enterokokken, was auch als „genetischer Kapitalismus“ bezeichnet wird. Ihre Umweltbeständigkeit, ihre intrinsischen und extrinsischen Antibiotikaresistenzen, ihre Virulenzfaktoren und die Eigenschaft, schnell neue Gene zu erwerben, erschweren die Therapie und die Infektionskontrolle (25, 31, 59).

Der Selektionsdruck durch Antibiotika entsteht vermutlich nicht durch eine direkte Anwendung von Vancomycin, sondern durch eine Unterdrückung der anaeroben Darmflora mittels anderer Antibiotika. Metronidazol, Breitspektrum-Cephalosporine, Penicilline und weitere wirken nicht gegen Enterokokken, verändern aber das Darmmikrobiom, was die Vermehrung von Enterokokken begünstigt (6, 60). In einer Studie wurde gezeigt, dass vor einer Blutstrominfektion immer eine Kolonisation des Gastrointestinaltraktes vorlag (61).

Weit verbreitete Stämme des CC17-Komplexes sind ST117, ST17 und ST18. Diese Stämme sind bei vielen Krankenhauspatienten nachweisbar. Die Stammvarianten können die Glykopeptid-Resistenz in Form des *vanA* oder *vanB*-Gens haben. Es gibt allerdings auch bestimmte Typen die vermehrt die *vanA*- (ST203) oder *vanB*- (ST192) Variante besitzen (3).

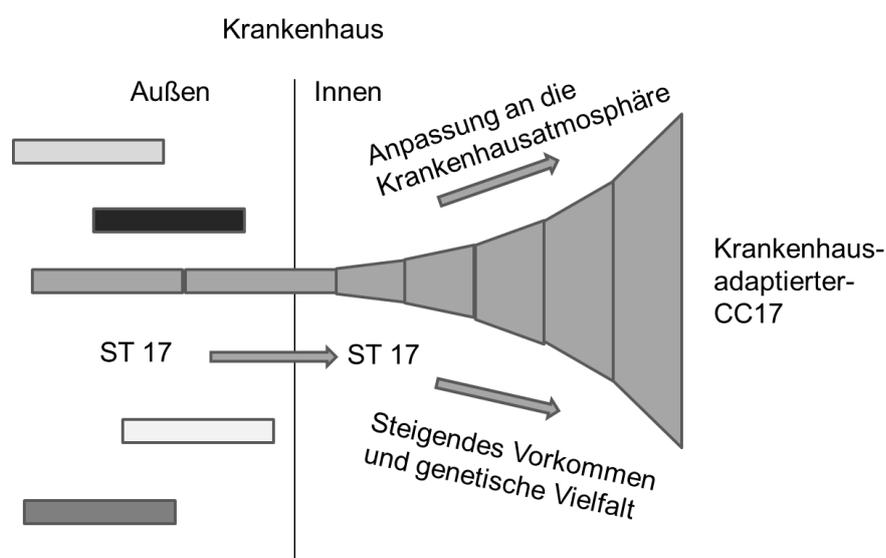


Abbildung 4: Selektion der CC17 Linie im Krankenhaus: in Anlehnung an Leavis et al. (56)

## 1.6 Infektionsprävention und Surveillance von VRE

Surveillance von Erregern bedeutet die Erfassung, Analyse und Interpretation von Infektions- und Erregerhäufigkeiten. Sie beinhaltet auch die Weitergaben der ermittelten Daten an dafür verantwortliche Personen, um Abläufe entsprechend anzupassen. Das Ziel ist die Reduktion der Erreger- und Infektionshäufigkeiten. Da es sich bei VRE um Erreger mit speziellen Resistenzen und Multiresistenzen handelt, müssen diese überwacht werden. Dies geschieht gemäß § 23 Abs. 4 Infektionsschutzgesetz (IfSG) und den Ausführungen des Robert-Koch-Instituts (RKI). Dabei wird eine Auflistung der Anzahl von betroffenen Patienten pro Bereich und Monat in Krankenhäusern mit hämatologisch-onkologischer Abteilung gefordert. Um die erfassten Daten zu analysieren sind jedoch immer Referenzdaten nötig (62). Als Referenzdaten eignen sich in Deutschland die Daten der Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS) oder des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS), welche eine Bewertung der eigenen epidemiologischen Lage zulassen (63). So wurden auch am ARS am RKI steigende Zahlen der VREfm-Isolate von 11,2 % (2014) auf 26,1 % (2017) beobachtet (64).

## 1.7 Surveillance mit Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Für eine klassische Surveillance werden folgende Parameter genutzt, um eine epidemiologische Situation zu beschreiben: Zeit, Ort, Person, Erregerspezies und Subtyp. Der Goldstandard für die Ermittlung des Subtyps war lange Zeit die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Dabei wird die genomische DNA durch Restriktionsenzyme geschnitten, anschließend werden die unterschiedlich großen chromosomalen Fragmente durch Elektrophorese aufgetrennt und das entstehende Bandenmuster analysiert (65). Allerdings wurde die Reproduzierbarkeit dieser Bandenmuster bei Enterokokken diskutiert. Auch die Standardisierung über mehrere Labore hinweg wurde bemängelt. PFGE ist sehr gut für die Analyse von Ausbrüchen in einer bestimmten Zeit und einem bestimmten Ort, aber nicht für epidemiologische Langzeitanalysen, weil es durch Mutationen zum Verlust oder der zusätzlichen Entstehung von weiteren Restriktionsstellen kommen kann. Für einen großen Datenaustausch, sowie die Beobachtung der globalen Epidemiologie von *E. faecium* hat sich die Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) als besser geeignet erwiesen (31). Diese epidemiologische Untersuchungsmethode wurde auch in der vorliegenden Arbeit genutzt. Dabei werden 7 verschiedene Gensegmente der bakteriellen DNA untersucht. Diese sind so genannte *Housekeeping*-Gene, welche am zentralen Stoffwechsel beteiligt sind und nur geringe Sequenzvariabilitäten aufweisen. Sie werden jeweils mittels PCR vervielfältigt und anschließend ihre Nukleinsäuresequenzen durch DNA-Sequenzierung ermittelt. Eine Sequenz wird mit den bereits in einer kuratierten Onlinedatenbank ([www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)) bekannten Allelen zu diesem Gensegment abgeglichen und jeweils einer Kennzahl zugeordnet. Aus der Untersuchung dieser sieben Gensegmente ergibt sich ein siebenstelliger Zahlencode (Allelprofil). Mit einem erneuten Abgleich des Zahlencodes in der Onlinedatenbank wird ein Sequenztyp (ST) ermittelt. Haben zwei Patienten einen unterschiedlichen ST, kann eine Übertragung von Patient zu Patient eher ausgeschlossen werden. Haben sie denselben ST ist dies jedoch kein Beweis für eine Übertragung, kann aber darauf hindeuten (18, 66). Zwar ist die MLSTypisierung nicht ausreichend diskriminativ für Ausbruchssituationen, sie ist jedoch für Populations-genetische Analysen geeignet. Sie liefert als sequenzbasiertes Verfahren schnell eindeutige Ergebnisse, die mit einer großen Vergleichsdatenbank sicher zugeordnet werden können (65).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Am Uniklinikum Regensburg (UKR) wurden seit dem Jahr 2004 vermehrt VRE-Isolate nachgewiesen. Um die VRE-Ausbreitung einzudämmen ist ein Wissen über die genaue molekularepidemiologische Dynamik nötig.

Das Ziel dieser Arbeit ist die molekularepidemiologische Analyse von VRE<sub>fm</sub>-Isolaten in der ersten Hälfte des Jahres 2012 (01.01.2012 – 30.06.2012) im Raum Regensburg mit Schwerpunkt UKR. Sie ist ein Teil einer Reihe von Dissertationen, welche VRE<sub>fm</sub>-Isolate seit dem Jahr 2004 in und um Regensburg retrospektiv analysieren. Das Besondere ist, dass bei dieser Studie alle Erstdiagnosen seit dem ersten Auftreten von VRE im Raum Regensburg in der Stammsammlung eingefroren wurden. Dies macht eine Analyse der Verbreitung über einen langen Zeitraum möglich. Die molekularbiologische Analyse erfolgt durch eine Bestimmung von Virulenzfaktoren und Resistenzgenen, sowie einer ergänzenden MLSTypisierung. Eine zusätzliche Auswertung der Patientendaten: Krankenhaus, Stationsart, klinische Fachrichtung sowie Art der VRE-Besiedlung, lässt Rückschlüsse auf Ausbreitung und Häufigkeit von VRE zu diesem Zeitraum am UKR im Raum Regensburg zu. Die durch diese Untersuchungen entstandenen Kenntnisse über das Risikoprofil im UKR bezüglich VRE-Besiedlungen/-Infektionen machen eine genaue Abstimmung der Präventionsmaßnahmen im Krankenhaus möglich, um eine weitere Ausbreitung sowie Infektionen zu verhindern. Dieses Wissen kann auch auf größere Krankenhäuser in Bayern übertragen werden.

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil einer großen Surveillancestudie am UKR von 2004 bis heute. Durch die Auswertung der Ergebnisse erlangt das UKR Kenntnisse über sein Risikoprofil bestehend aus der epidemiologischen Situation sowie des eigenen Risikokollektivs. Dieses Wissen trägt zu einer besseren Anpassung der Maßnahmen zur Prävention von VRE und somit auch zu einer möglichen Verhinderung von Infektionen bei.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Nachfolgend werden die in den Laboranalysen 2018/2019 verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen, Oligonukleotide, Verbrauchsmaterialien, Gefäße, Geräte und Software aufgeführt (Tabelle 2 - 7).

#### 2.1.1 Chemikalien (alphabetische Reihenfolge)

Tabelle 2: Chemikalien (alphabetische Reihenfolge)

Chemikalien (alphabetische Reihenfolge)	Hersteller
AmpliAq Gold DNA Polymerase with Buffer II & MgCl <sub>2</sub>	Life Technologies, Austin, USA
BBL-Enterococcosel-Bouillon	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Columbia-Agarbase 10455	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
dNTP Set (100 mM)	Life Technologies, Austin, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Primer (50 µM)	Metabion International AG, Planegg, Deutschland
Schafblut, defibriniert	Acila Dr. Weidner GmbH, Weiterstadt, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Universalagarose	Bio&SELL GmbH, Feucht, Deutschland

## 2.1.2 Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge)

Tabelle 3: Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge)

Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge)	Zusammensetzung
Columbia-Frischblut-Agar	40 g Columbia-Agarbase 1 l H <sub>2</sub> O 8 % Schafblut
O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x Loading Dye	250 mg Bromphenolblau 33 ml 150 mM Tris 60 ml Glycerol 7 ml H <sub>2</sub> O
1x Puffer	Buffer II des AmpliTaq Gold DNA Polymerase-Kits (10x Puffer) 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnt
1x TBE-Puffer	10,8 g Tris 5,5 g Borsäure 4 ml (0,5 M) Na <sub>2</sub> EDTA ad 1 l H <sub>2</sub> O
VRE-Bouillon	43 g BBL-Enterococcosel-Bouillon 8 µg/ml Vancomycin 1000 ml H <sub>2</sub> O

### 2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 4: Oligonukleotide

Primer		Nukleotidsequenz 5' → 3'	Sequenzlänge in bp	Quelle
<i>vanA</i>	fwd	GGA GTA GCT ATC CCA GCA TT	377	Klare et al. (67)
	rev	TCT GCA ATA GAG ATA GCC GC		
<i>vanB</i>	fwd	GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT	298	
	rev	CAT CGC CGT CCC CGA ATT TCA AA		
<i>acm</i>	fwd	GGC CAG AAA CGT AAC CGA TA	120	Nallapareddy et al. (54)
	rev	AAC CAG AAG CTG GCT TTG TC		
<i>esp</i>	fwd	AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G	510	Vankerck- hoven et al. (68)
	rev	AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG		
<i>espA</i>	fwd	CGA CCG ATT TAG CAG TAA C	s. Tabelle 9	Leavis et al. (47)
	rev	CAG CTG CGC TAA CAT CTA C		
<i>hyl</i>	fwd	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG	276 bp	Vankerck- hoven et al. (68)
	rev	GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA		
<i>atpA</i>	fwd	TTC AAA TGG CTC ATA CGG	556	In Anlehnung an Homan et al. (66)
	rev	AGT TCA CGA TAA GCA ACA GC		
<i>ddl</i>	fwd	GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G	456–465	
	rev	AAA AAG AAA TCG CAC CG		
<i>gdh</i>	fwd	GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT	530	
	rev	CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA		
<i>purK</i>	fwd	CAG ATT GGC ACA TTG AAA G	492	
	rev	TTC ATT CAC ATA TAG CCC G		
<i>gyd</i>	fwd	CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C	395–398	
	rev	CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC		
<i>pstS</i>	fwd	TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G	583	
	rev	CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC		
<i>adk</i>	fwd	GAA CCT CAT TTT AAT GGG G	437	
	rev	TGA TGT TGA TAG CCA GAC G		

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
MIRCROFLEX NeoTouch	Ansell Healthcare Europe, Brüssel, BEL
Einmal-Impfösen	VWR International, Radnor, USA
Pipettenspitzen	
CLEARLine Filtertips (0,1-10 µl, 2-20 µl, 2-200µl, 100-1000µl)	Biosigma, Venice, Italien
BioClean Universal Tips (10 µl)	RAININ Instrument LLC, Oakland, USA
Combitips advanced (1 ml - 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cups	
Protein LoBind Tube (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR SingleCaps 8er SoftStrips, farblos (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Falcon Tubes (50 ml)	Corning Science, Mexiko
Microbank	Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada
NucleoFast 96 PCR Plates	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH Germany, Hilden, Deutschland

## 2.1.5 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Hersteller
Pipetten	
Pipetman (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HandyStep	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Repetman	Gilson, Middleton, USA
Research Pro (0,5–10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf 200 (8-Kanal)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpette-12 (20–200 µl)	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipet-Lite LTS (2–20 µl)	RAININ, Oakland, USA
MS 1 Minishaker	IKA Works, Inc., Wilmington, USA
MS 3 basic	IKA Works, Inc., Wilmington, USA
Zentrifugen	
SU1550	SUNLAB, Aschaffenburg, Deutschland
Tischzentrifuge	POLY-LABO, Straßburg, Frankreich
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc., St. Bruno, Kanada
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Agarose-Gelelektrophoresekammern	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
AlphaImager HP	ProteinSimple, San Jose, USA
Digital Graphic Printer	Sony, Tokio, Japan
Microflex LT MALDI-TOF	Bruker Daltonik GmbH, Billerica, USA
Phoenix 100	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, USA

Mikrowelle Moulinex Compact Y50	Krups GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Waage 444-45	KERN & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kühlschrank MediLine (−4 °C)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank MediLine (−20 °C)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank Comfort (−20 °C)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank Hera Freeze (−80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.1.6 Gefäße

Tabelle 7: Gefäße

Gefäß	Hersteller
Erlenmeyerkolben (300 ml)	VWR International, Radnor, USA
Messzylinder (100 ml, 250 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Laborflasche mit Schraubverschluss (100 ml, 500 ml, 1000 ml)	VWR International, Radnor, USA
Laborglasflasche pressure plus	Schott Duran GmbH, Wertheim/Main, Deutschland

## 2.1.7 Software

Tabelle 8: Software

Software	Hersteller
AlphaImager HP (3.4.0)	ProteinSimple, San Jose, USA
Chromas (2.6.6)	Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australien
SeqMan	DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA
Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA

## 2.1.8 Labor

Microsynth SEQLAB, Göttingen, Deutschland

## 2.1.9 Benutzte Internetportale

[www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org) (Stand: 08.01.2020)

## 2.2 VRE-Diagnostik im Jahr 2012 aus klinischen Proben

Im Jahr 2012 gab es zwei mögliche Wege, welche zu einem positiven VRE-Nachweis führen konnten: Eine Möglichkeit war der VRE-Nachweis durch direktes Screening auf VRE. Die zweite Möglichkeit war ein klinischer Befund bei einem Patienten mit einem VRE, bei welchem die Keimidentifizierung Enterokokken und das Antibiotogramm eine Vancomycin-Resistenz diagnostizierte. Die untersuchten Proben stammten entweder von Patienten des UKRs oder von externen Krankenhäusern aus dem Raum Regensburg. Jedes ermittelte VRE-positive Erstisolat eines Patienten wurden in die Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg (IMHR) am UKR überführt und im Rahmen dieser Arbeit im Jahr 2018/19 erneut untersucht.

### 2.2.1 VRE-Nachweis durch Screeningabstriche

VRE sind multiresistente Erreger mit speziellen Resistenzen, somit sind diese laut § 23, Abs. 4 IfSG zu überwachen. So wurden auch am UKR und in externen Krankenhäusern Screening-Maßnahmen durchgeführt. Kriterien für ein Screening am UKR waren: Kontakt zu einem Patienten, welcher auf VRE positiv getestet wurde oder ein aktuelles Ausbruchsgeschehen. Außerdem konnten Stationen mit einer hohen Zahl an VRE-Fällen und/oder Risiko-Gruppen Patienten direkt bei stationärer Aufnahme screenen. Die Kriterien für ein Screening in den externen Krankenhäusern sind nicht bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass diese jenen des UKRs ähnlich waren.

Die Durchführung des Screenings erfolgte standardmäßig durch einen Rektal-/ Perianalabstrich mit einem sterilen Tupfer. Dieser wurde im Labor in einer VRE-Bouillon eingerührt und 24 Stunden bei 35 °C bebrütet. Die VRE-Bouillon enthält Äskulin und 8 µg/ml Vancomycin. Äskulin wird von Enterokokken in Äskuletin und Dextrose hydrolysiert. Äskuletin reagiert mit dem auch in der Bouillon enthaltenen Ammoniumeisen(III)-Citrat, zu dunkelbraunen oder schwarzen Komplexen. Das Vancomycin sorgt dafür, dass nur Vancomycin-resistente Bakterien wachsen können. Somit färbt sich die Bouillon nur schwarz, wenn VRE-Isolate in einer Probe enthalten sind.

Bei einer dunkel gefärbten Bouillon wurde anschließend eine PCR-Diagnostik durchgeführt. Dabei wurden die Proben auf das Vorhandensein einer Enterokokken-Spezies und die Resistenzgene *vanA* und *vanB* untersucht. Zeigten diese PCR-Analysen ebenfalls positive Ergebnisse, wurde ein VRE-positiver Endbefund erstellt.

Färbte sich die Bouillon nicht dunkel, wurde diese erneut über Nacht inkubiert. War diese am nächsten Tag immer noch hell, wurde ein VRE-negativer Endbefund erstellt.

Ergab sich ein VRE-positiver Endbefund, welcher der erste Nachweis eines Patienten war, wurde die jeweilige Probe der Stammsammlung zugeführt und bei -80 °C in einer Microbank eingelagert. Der Ablauf des Verfahrens ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

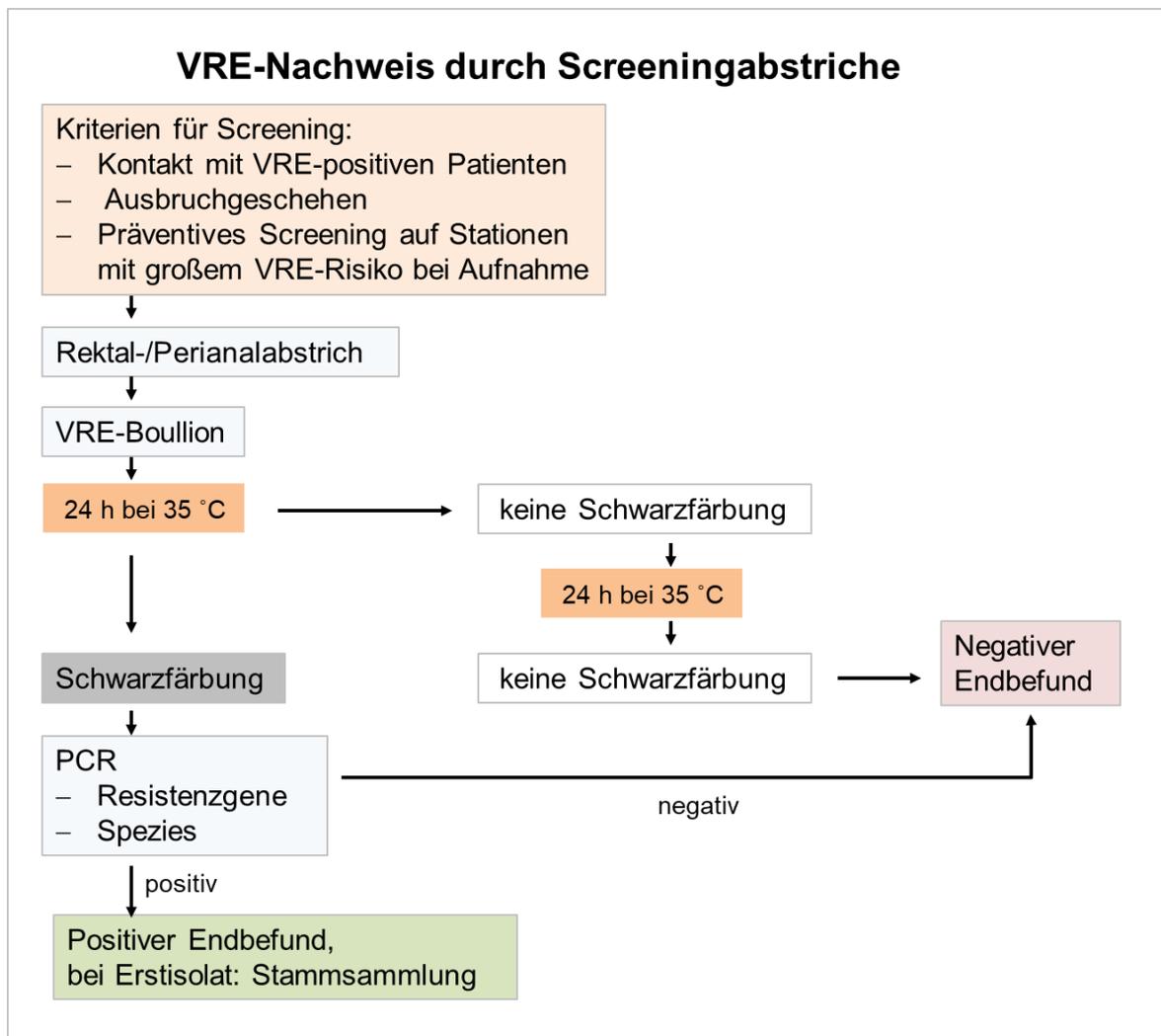


Abbildung 5: Schema zum Ablauf des VRE-Nachweises durch Screening am UKR im Jahr 2012

## 2.2.2 VRE-Nachweis bei klinischen Infektionen

Von einer Probe eines Patienten mit einer Infektion wurde eine Bakterienkultur angelegt. Wenn sich Enterokokken zeigten, wurden ein Antibiotogramm mit Testung auf Antibiotikaresistenzen durchgeführt. Bei vorhandener Vancomycin-Resistenz wurde wie beim Screening eine PCR-Diagnostik zur Resistenzgen-Bestimmung durchgeführt. War diese PCR positiv wurde eine VRE-positiver Endbefund erstellt.

Zeigte das Antibiotogramm keine Vancomycin-Resistenz auf oder die PCR war negativ, wurde die Probe als VRE-negativer Endbefund gewertet.

Ergab sich ein VRE-positiver Endbefund, welcher der erste Nachweis eines Patienten war, wurde die jeweilige Probe der Stammsammlung zugeführt und bei  $-80\text{ °C}$  in einer Microbank eingelagert. Abbildung 6 stellt auch diese Nachweismethode schematisch dar.

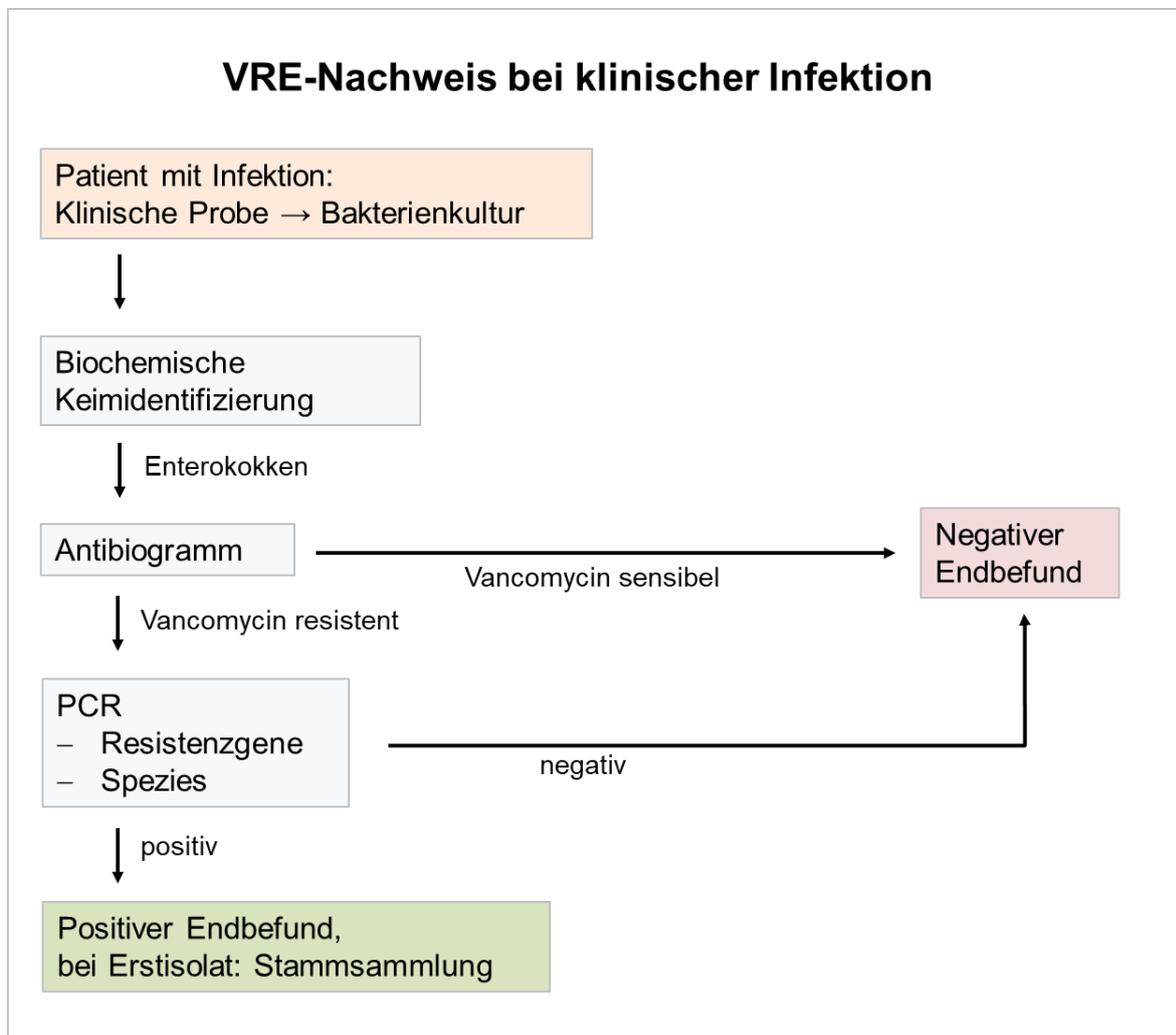


Abbildung 6: Schema zum Ablauf des VRE-Nachweises bei einer klinischen Infektion am UKR im Jahr 2012

## 2.3 Laboranalyse im Jahr 2018/2019 zur Untersuchung von VRE-*E.-faecium*-Isolaten

Das Ziel dieser Dissertation ist das Erfassen der Ausbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken-Stämmen im Raum Regensburg im Jahre 2012. Dies wurde gemeinschaftlich mit einer weiteren Doktorandin, Michelle Reimann, durchgeführt. Im Jahr 2018/2019 wurden die Proben der Stammsammlung aus dem Jahr 2012 erneut mikrobiologisch untersucht. Die genauere Untersuchung konzentrierte sich nur auf die Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolate (VREfm). Es wurden die *vanA*- und *vanB*-Vancomycin-Resistenzgene, sowie ein Vorkommen der Virulenzfaktoren *esp*, *espA*, *acm* und *hyl* untersucht. Außerdem wurde eine MLST-Bestimmung durchgeführt.

### 2.3.1 Kulturverfahren

Für die genaue mikrobiologische Untersuchung wurden Einzelkolonien von den in der Stammsammlung eingefrorenen VRE-Proben des Jahres 2012 benötigt.

Die Isolate wurden aus der Microbank aufgetaut und auf Columbia-Frischblut-Agar ausgestrichen, sowie in eine VRE-Bouillon gegeben. Beides wurde über Nacht im Brutschrank bei 35 °C inkubiert. Die Bouillon galt, wie in der Diagnostik im Jahr 2012, durch ihre Dunkelfärbung als erster Hinweis, ob es sich bei der eingefrorenen Probe tatsächlich um eine Vancomycin-resistente Probe handelte. Wenn auf der Blutplatte selbst kein Wachstum zu sehen war, die Bouillon jedoch positiv war, wurde diese zur Überprüfung ausgestrichen.

Bei erfolgreichem Wachstum von Enterokokken auf der Blutplatte wurde am nächsten Tag eine Einzelkolonie von jeder Blutplatte isoliert und in ein 0,2 ml Cup, welches 50 µl 1x Puffer enthielt, eingerührt. Außerdem wurde die Einzelkolonie auf einer neuen Blutplatte mit einer Einmal-Impföse ausgestrichen. Die Blutplatten der Einzelkolonien wurden bei 35 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Einzelkolonien in der Pufferlösung wurden mittels PCR (Programm 1, s. Tabelle 9) erhitzt, sodass die DNA der Bakterien freigesetzt wurde und für die weiteren Analysen genutzt werden konnte.

Tabelle 9: Programm 1 zum freisetzen der Bakterien-DNA: Darstellung des Verlaufes von Zeit und Temperatur

Programm 1	Temperatur	Zeit
1	96 °C	15 min
2	4 °C	forever

Zunächst wurde mittels einer Multiplex-PCR (s. Abschnitt 2.3.4.1) die Probe auf eine vorhandene Antibiotika-Resistenz des *vanA*- bzw. *vanB*-Gens geprüft. War diese positiv und die MALDI-TOF-Untersuchung (s. Abschnitt 2.3.2) ergab die Bakterienspezies *E. faecium*, wurde die DNA der Einzelprobe isoliert. Die Einzelkolonie selbst wurde in eine Microbank eingerührt und nach Absaugen der Flüssigkeit bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.2 MALDI-TOF-Untersuchung

Zur Identifizierung der genauen Enterokokken Spezies wurde die Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) nach Herstellerangaben genutzt. Dabei kommt es zu einer Unterscheidung zwischen den Spezies aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der ribosomalen Proteine. Die Bakterien wurden mit einer Matrix vermischt und damit zerstört, sodass ihre Einzelteile freigesetzt wurden. Danach wurden diese mit dem Laserstrahl verstäubt und ionisiert (Matrix-assisted laser desorption/ionization), in einem elektrostatischen Feld beschleunigt und ihre Fluggeschwindigkeit mit einem Ionendetektor aufgezeichnet (time-of-flight). Je nach Masse war die Geschwindigkeit der einzelnen Teile unterschiedlich. Daraus ergab sich dann ein erregerspezifisches Spektrum, welches mit einer hinterlegten Datenbank abgeglichen wurde (18). War das Ergebnis der Untersuchung *E. faecium*, wurde die zugehörige Probe genauer untersucht.

### 2.3.3 DNA-Isolierung

Für die anschließenden PCR-Untersuchungen wurde die DNA der Einzelkolonien isoliert. Dies wurde mit dem QIAamp DNA Mini-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA jeder Probe wurde in ein 1,5 ml Cup gegeben und im Kühlschrank bei 4,5 °C aufbewahrt.

### 2.3.4 Genetische Untersuchung mittels PCR-Analysen

Für jede Probe wurden jeweils 11 verschiedene PCR-Analysen zur genaueren genetischen Untersuchung durchgeführt. Dabei untersuchte man die Proben auf das Vorhandensein der Glykopeptid-Resistenzgene *vanA/B*, sowie die Virulenzfaktoren *esp*, *espA*, *hyl* und *acm*. Außerdem wurden die 7 Genloci für die MLST-Bestimmung mittels PCR amplifiziert. Die dazugehörigen Primer sind in Abschnitt 2.1.3 aufgeführt.

#### 2.3.4.1 Nachweis der Glykopeptid-Resistenzgene *vanA* und *vanB*

Nach dem Isolieren einer Einzelkolonie wurden die Proben auf eine vorhandene Glykopeptid-Resistenz getestet, um sicher zu gehen, dass es sich bei den 2012 eingefrorenen Proben wirklich um VRE handelte. Dies geschah mit einer Multiplex-PCR mit den Primern von Klare et al. (67), in welcher beide *van*-Gene in einem Ansatz getestet werden konnten. Wenn diese auf *vanA* und/oder *vanB* positiv war und es sich um Enterokokken der Spezies *E. faecium* handelte, wurde die DNA isoliert.

#### 2.3.4.2 Nachweis der Virulenzfaktoren

Zum Nachweis der Virulenzfaktoren *esp*, *espA*, *hyl* und *acm* wurden ebenfalls die jeweiligen Gensegmente amplifiziert. Bei *esp* und *hyl* wurden die Primer nach Vankerckhoven et al. (68) verwendet. Um die Häufigkeit der Wiederholungen der Untereinheit A des *esp*-Gens zu ermitteln (repeats), wurde der Primer von Leavis et al. (47) benutzt. Für *acm* kam der Primer von Nallapareddy et al. (54) zum Einsatz.

#### 2.3.4.3 MLST-Bestimmung

Zur MLST- Bestimmung wurden insgesamt 7 PCR-Analysen zur Bestimmung der 7 verschiedenen Allele der *Housekeeping*-Gene durchgeführt. In Anlehnung an Homan et al. (66) wurden folgende Primer für die DNA-Fragmente eingesetzt: *atpA* (ATP synthase, alpha subunit), *ddl* (D-alanine:D-alanine ligase), *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *purK* (phosphoribosylaminoimidazol carboxylase ATPase subunit), *pstS* (phosphate ATP-binding cassette transporter) und *adk* (adenylate kinase). Dabei wurden die amplifizierten Sequenzlängen etwas größer gewählt, da Anfang und Ende einer Sequenz oft schlecht lesbar sind. Dies führt zu genaueren Ergebnissen. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und anschließend sequenziert. Mit den Sequenzen der 7 Allele wurde dann der MLST-Sequenztyp bestimmt (s. 2.3.7 Auswertung der Sequenzen).

### 2.3.4.4 Durchführung der PCR

Für die *vanA/B*- und Virulenzfaktoren-PCR wurde ein Ansatz aus 14 µl Mastermix und 1 µl DNA hergestellt (Tabelle 10). Die Primer wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O zu einer 10 µM-Lösung verdünnt. Die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase wurde mit dem Buffer II und MgCl<sub>2</sub>, genauso wie das dNTP Set, nach Herstellerangaben verwendet. In der Virulenzfaktoren-PCR wurden nur zwei anstatt vier Primern benötigt. Das Volumen der zwei anderen Primer wurde durch dieselbe Menge an Wasser ersetzt.

Für die PCR der MLST-Bestimmung wurden ein Gesamtvolumen von insgesamt 25 µl, das heißt 24 µl Mastermix und 1 µl DNA pro PCR benötigt. Dazu wurde dieselbe Zusammensetzung, wie oben beschrieben, für den PCR-Ansatz genutzt. Jedoch wurden die einzelnen Volumina von 14 µl auf 24 µl hochgerechnet.

Tabelle 10: Ansatz für eine PCR mit 15 µl

Bestandteile	Volumen in µl
DNA	1
dNTPs (10 mM)	0,3
Primer 1 forward (10 mM)	0,3
Primer 1 reverse (10 mM)	0,3
Primer 2 forward (10 mM)	0,3
Primer 2 reverse (10 mM)	0,3
MgCl <sub>2</sub>	1,2
10 x Puffer	1,5
Goldtag	0,12
H <sub>2</sub> O	9,7
Gesamtvolumen	15

Der Mastermix wurde anschließend zentrifugiert, mittels Vortexmischer geschüttelt und zentrifugiert. Nun wurden auf 0,2 ml Cups jeweils 14 µl bzw. 24 µl Mastermix und jeweils 1 µl DNA verteilt. Für eine Negativkontrolle, welche mögliche Verunreinigungen während des Arbeitens aufdecken sollte, wurde bei einem Cup pro PCR-Ansatz anstatt DNA dasselbe Volumen an H<sub>2</sub>O zugegeben. Für eine Positivkontrolle bei *vanA* und *vanB* wurde in ein Cup DNA bereits bekannter *vanA*- und *vanB*-positiver Proben gegeben. Alle 0,2 ml Cups wurden danach zentrifugiert.

Die PCR wurde mit dem Programm 2 (Tabelle 11) für *vanA/B*, MLST, *esp*, *acm*, *hyl* und mit dem Programm 3 (Tabelle 12) für *espA* durchgeführt. Die Proben wurden zuerst erhitzt, damit die so genannte Denaturierung, die Trennung der beiden DNA-Stränge erfolgen konnte. Anschließend folgte die Hybridisierung, bei welcher die Primer an die zugehörigen Sequenzen binden. Der letzte Schritt ist die Elongation bei 72 °C. Bei dieser Temperatur arbeitet die Polymerase optimal und baut vom 3'-Ende der Primer den gewünschten DNA-Molekülstrang auf. Dieser Prozess wurde 36-mal bzw. 35-mal wiederholt. War die PCR beendet wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C gehalten.

Tabelle 11: Programm 2 für die PCR der Gene: *vanA/B*, *esp*, *acm*, *hyl* und MLST; Darstellung des Verlaufes von Zeit und Temperatur

Programm 2	Temperatur in °C	Zeit
Stufe 1 (1x)	95	5 min
Stufe 2(36x)	94	30 s
	55	30 s
	72	30 s
Stufe 3(1x)	72	5 min
Stufe 4	4	∞

Tabelle 12: Programm 3 für die PCR der Sequenz für *espA*; Darstellung des Verlaufes von Zeit und Temperatur

Programm 3	Temperatur in °C	Zeit
Stufe 1 (1x)	95	9 min
Stufe 2 (35x)	94	50 s
	52	50 s
	72	60 s
Stufe 3 (1x)	72	5 min
Stufe 4	4	∞

### 2.3.5 Gelelektrophorese

Die in der PCR amplifizierten Gensegmente wurden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und fotografisch dokumentiert. Bei der Gelelektrophorese wandern die negativen DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel von Minus nach Plus in Richtung Anode. Die kürzesten DNA-Fragmente legen die größten Strecken zurück. Bei einem Vergleich von festgelegten Standards mit bekannter Größe und Laufstrecke mit der Laufstrecke der Proben können diese einer bestimmten Größe zugeordnet werden. Zur fotografischen Dokumentation wurde Ethidiumbromid genutzt. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basenpaare ein und verändert dabei sein Absorptionsspektrum. Bei Anregung mit einer UV-Lampe tritt Fluoreszenz auf. Dies bewirkt, dass die Nukleinsäuresequenzen im AlphaManager HP proportional zu ihrer Menge stark leuchten und das mit Ethidiumbromid versetzte Gel dunkel bleibt (69).

Zur Herstellung der Gele wurde ein 1x Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer benötigt. Dafür wurden 10,8 g Tris, 5,5 g Borsäure und 4 ml Na<sub>2</sub>EDTA (0,5 M) mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 1 l aufgefüllt.

Für die Gelelektrophorese wurden Agarose-Gele hergestellt. Für ein 1%iges, 1,5%iges oder 2%iges Gel wurden 60 ml 1x TBE mit 6 g, 9 g oder 12 g Universal Agarose in einer Mikrowelle unter Erwärmung vermischt. Die geforderte Agarosekonzentration des Gels für den zu analysierenden PCR-Ansatz ist der Tabelle 13 zu entnehmen. Anschließend wurde dem Gel 2 ml des Farbstoffes Ethidiumbromid zugefügt. Die flüssige Agarose wurde in die Elektrophoresekammer, welche die Form des Gels und den Ort der Taschen vorgab, gegossen. Nach Erkalten des Gels wurden die Kammern mit 1x TBE aufgefüllt.

In die PCR Cups wurden jeweils 2 µl Loading Dye hinzugefügt. Dieser bewirkt ein gleichmäßiges Absinken der Probe auf den Grund des Gels in der Tasche und macht die Proben beim Auftragen und während sie durch das Gel wandern sichtbar. Danach wurden jeweils 13 µl pro Probe aus dem PCR Cup in die jeweilige Tasche gegeben. Für die MLST-Proben wurde nur 1 µl Loading Dye mit je 5 µl der Probe vermischt und dann in die Tasche gegeben. Der Loading Dye wurde aus 250 mg Bromphenolblau, 33 ml Tris (150 mM), 60 ml Glycerol und 7 ml H<sub>2</sub>O hergestellt.

Bei jeder Gelelektrophorese wurde in eine Tasche die Negativkontrolle der PCR pipettiert, um diese auf Verunreinigungen zu kontrollieren. Bei *vanA/B* wurde außerdem die Positivkontrolle aufgetragen. Bei *esp*, *espA*, *hyl* und für alle MLST-PCR wurde zur genauen Identifizierung der Banden der Standard O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, bei *acm* der Standard O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder pipettiert.

Tabelle 13: Übersicht über die Konzentration der Gele, Größe des Standards und des DNA-Fragments für die jeweilige PCR

PCR	Gel	Standard	Größe
<i>vanA+B</i>	1,5 %	1 kb Plus	A: 377 B: 298
<i>acm</i>	2,0 %	100 bp	120
<i>esp</i>	1,0 %	1 kb Plus	510
<i>espA</i>	1,0 %	1 kb Plus	(s. Tabelle 14)
<i>hyl</i>	1,0 %	1 kb Plus	276
<i>atpA</i>	1,5 %	100 bp	556
<i>ddl</i>	1,5 %	100 bp	456-465
<i>gdh</i>	1,5 %	100 bp	530
<i>purK</i>	1,5 %	100 bp	492
<i>gyd</i>	1,5 %	100 bp	395–398
<i>pstS</i>	1,5 %	100 bp	583
<i>adK</i>	1,5 %	100 bp	437

Die Gelelektrophorese erfolgte mit 100 V und 400 mA 40 Minuten lang von Minus nach Plus mit dem Spannungsgerät PowerPac 300. Nach Verstreichen der Zeit wurden die Gele von der Spannung genommen und der TBE-Puffer abgegossen. Im AlphaImager HP wurden durch UV-Licht die DNA-Banden sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten. Die PCR wurde als positiv gewertet, wenn die Negativkontrolle (NK) kein PCR-Produkt aufwies und die Positivkontrolle (PK) positiv war. Ein negatives Ergebnis wurde erst nach einem wiederholt-negativem Ergebnis als negativ gewertet. Bei den Genen *vanA/B*, *esp*, *espA*, *hyl* und *acm* konnte man aus der Gelelektrophorese das endgültige Ergebnis ablesen. Für die sieben Allele der MLST war die Gelelektrophorese nur eine Kontrolle über den korrekten Ablauf der PCR. Diese wurden anschließend mittels MLST-Bestimmung (s. 2.3.6 Aufreinigung und Sequenzieren der Amplifikate für die MLSTypisierung) analysiert.

Die Amplifikate von *vanA* waren bei einer Sequenzlänge von 377 bp und von *vanB* bei 298 bp zu finden (Abbildung 7) (67). Wurden PCR-Produkte für *vanA* und *vanB* bei einem Isolat nachgewiesen, wurde immer das Amplifikat mit der höheren Konzentration als Ergebnis der Multiplex-PCR gewertet. Die jeweiligen Isolate, wurden jedoch erneut mittels einer getrennten PCR-Analyse auf nur ein Glykopeptid-Resistenzgen (*vanA* oder *vanB*) untersucht.

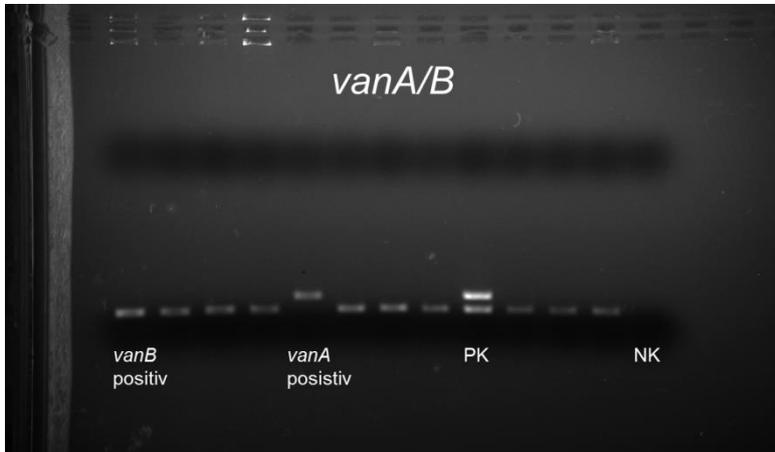


Abbildung 7: Beispiel eines Gels der *vanA/B*-PCR: mit Positivkontrolle (PK) und Negativkontrolle (NK) sowie positiven Ergebnissen für *vanA* oder *vanB*

Zum Nachweis der Virulenzfaktoren *esp*, *espA*, *hyl* und *acm* wurden ebenfalls die jeweiligen Gensegmente amplifiziert. Die Amplifikate von *esp* konnten bei einer Sequenzlänge von 510 bp nachgewiesen werden (Abbildung 8) (68).

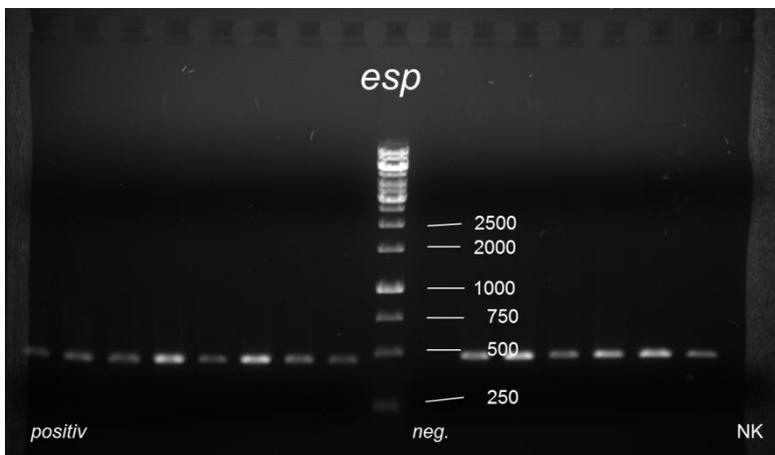


Abbildung 8: Beispiel Gel einer *esp*-PCR: mit dem Standard 1 kb Plus, einer Negativkontrolle (NK) und *esp*-positiven sowie -negativen Ergebnissen (Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren)

Um die Wiederholungen der Untereinheit A innerhalb der Repeat-Region des *esp*-Gens zu ermitteln wurde der Primer vom Leavis et al. (47) benutzt. Durch die Varianz der Wiederholungen der 252 bp großen Untereinheit A ergaben sich unterschiedlich große Amplifikate (Tabelle 14) je Probe. Die Amplifikate waren umso größer je öfter die Untereinheit A in der DNA der Probe vorhanden war.

Tabelle 14: Wiederholungen der Untereinheit A innerhalb der Repeat-Region des *esp*-Gens: *espA*: Darstellung der Größe in bp

<i>espA</i>	
Größe in bp	Wiederholungen
185	0
437	1
689	2
941	3
1193	4
1445	5
1697	6
1949	7
2201	8
2453	9
2705	10

Anhand des Standards konnten die Größen der Amplifikate ermittelt werden. In Abbildung 9 ist ein Beispiel, in welchem Wiederholungen von 2- bis 5-mal zu sehen sind. Eine Probe ist negativ.

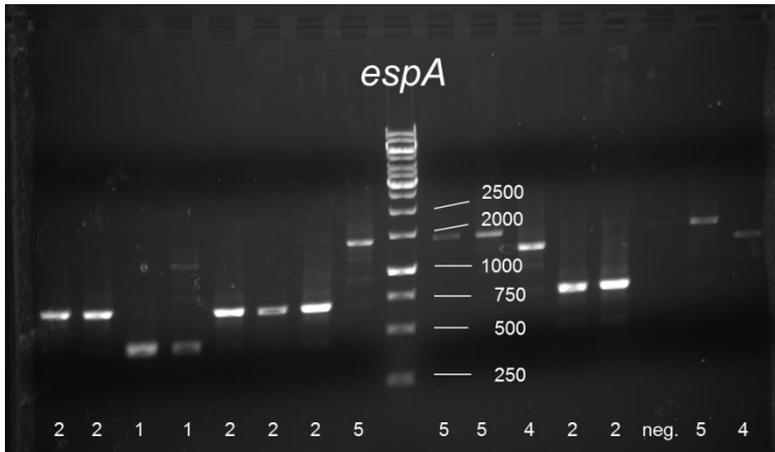


Abbildung 9: Beispiel eines Gels der *espA*-PCR: mit dem Standard 1 kb Plus (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren) und 1-, 2-, 4- und 5-fache Wiederholung der Untereinheit A. Sowie einer *espA*-negative (neg.) Probe

Die Produkte der PCR konnten beim Virulenzfaktor *hyl* bei einer Sequenzlänge von 276 bp nachgewiesen werden (Abbildung 10) (68).

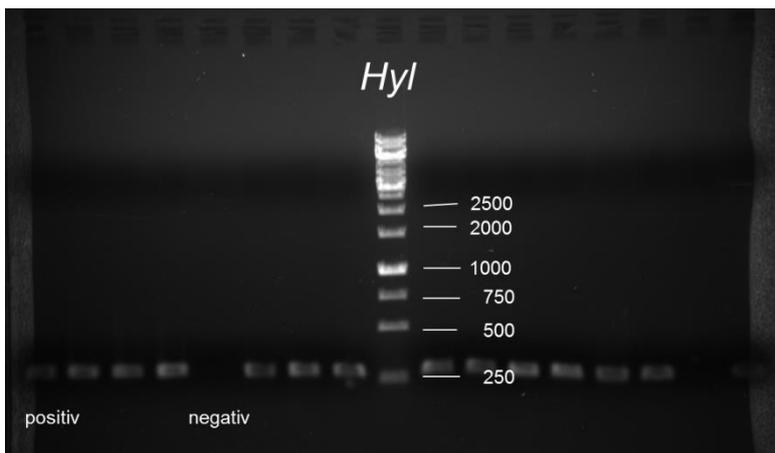


Abbildung 10: Beispiel eines Gels der *hyl*-PCR: mit dem Standard 1 kb plus (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren) und *hyl*-negativen, sowie *hyl*-positiven Ergebnissen

Die Amplifikate des Virulenzfaktors *acm* wurden bei einer Sequenzlänge von 120 bp nachgewiesen (Abbildung 11) (54).

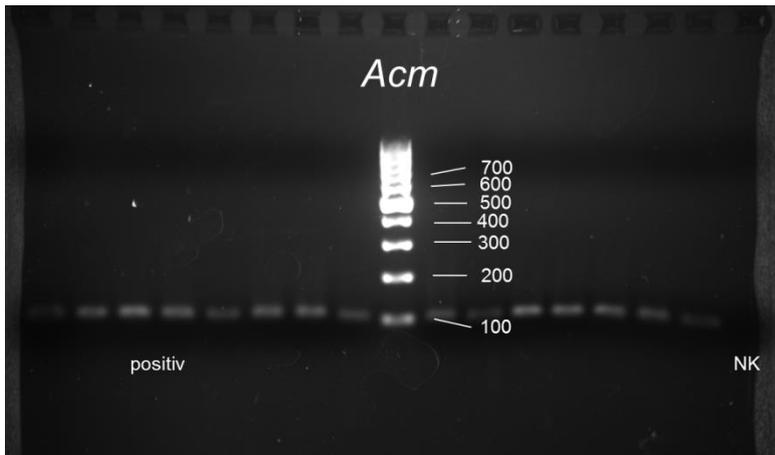


Abbildung 11: Beispiel eines Gels der *acm*-PCR: mit dem Standard 100 bp (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren), einer Negativkontrolle (NK) und *acm*-positiven Ergebnissen

Die sieben Amplifikate für MLST wurden auch zur Kontrolle einer erfolgreichen PCR und zum Ausschluss von Verunreinigungen in einer Gelelektrophorese aufgetragen. Die Amplifikate von *atpA* waren 556 bp, *ddl* 456-465 bp, *gdh* 530, *gyd* 395-398 bp, *pstS* 583 bp, *purK* 492 bp und *adk* 437 bp lang. Abbildung 12 zeigt ein Beispiel aus der Versuchsreihe, in welcher einige Allele zu sehen sind. War das PCR-Ergebnis positiv und die Negativkontrolle nicht verunreinigt wurden die Proben für die MLST-Analyse weiter aufbereitet.



Abbildung 12: Beispiel eines Gels der MLST-PCR: mit dem Standard 100 bp (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren). Darstellung der Banden von *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *pstS* und *adk*

### **2.3.6 Aufreinigung und Sequenzieren der Amplifikate für die MLSTypisierung**

Für die MLSTypisierung wurden die Amplifikate der PCR aufgereinigt, bevor sie an das Labor zur Sequenzierung geschickt wurden. Dabei wurden alle Salze, dNTPs und Primer entfernt, welche sich noch in den Proben befanden.

Die Aufreinigung geschah mittels der Nucleo Fast 96 PCR-Platte, welche eine spezielle Ultrafiltrationsmembran enthält. Erst wurde in jedes 0,2 ml Cup nach durchgeführter PCR 80 µl Wasser hinzugefügt. Danach wurde der gesamte Inhalt des Cups in ein Well der Nucleo Fast 96 PCR-Platte gegeben. Unter Vakuum wurden die Salze, dNTPs und Primer herausgefiltert und nur die sauberen DNA-Fragmente blieben zurück. Mit der Zugabe von je 50 µl Wasser, nur bei *gyd* 40 µl Wasser, und leichtem Schütteln der Platte mit dem Vortexmischer wurde die DNA wieder aus der Membran gewonnen. Die aufgereinigten Amplifikationsprodukte wurden in neue 0,2 µl Cups gegeben und im Kühlschrank bei 4,5 °C aufbewahrt oder direkt der Firma Microsynth SEQLAB in Göttingen zugeschickt, welche die DNA-Sequenzierung durchführte und Sequenzfiles zurück übermittelte.

### 2.3.7 Auswerten der Sequenzen mittels der MLSTypisierung

Die Ergebnisse der Firma Microsynth SEQLAB wurden mit Chromas (Abbildung 13) analysiert. Diese Sequenzen wurden über die kuratierte Onlinedatenbank [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org), welche Keith Jolley der Oxford Universität entwickelt hat (70), einem bereits bekannten Allel für das jeweilige *Housekeeping*-Gen zugeordnet. Die 7 verschiedenen Allele ergaben dann einen ST, welcher auch durch die Onlinedatenbank ermittelt wurde (Tabelle 15). Derzeit sind 1702 verschiedene Sequenztypen bekannt. Die Sequenztypen wurden in Tabellen erfasst und den jeweiligen Patientendaten zugeordnet.

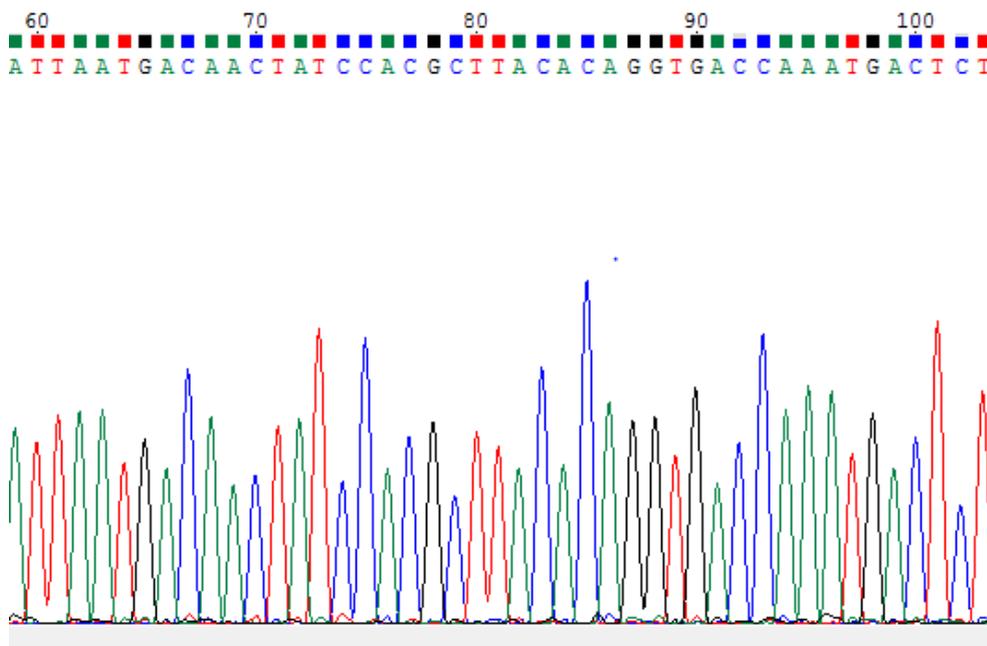


Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse einer Sequenz im Chromas (Probe 47: *gyd1*)

Die Gene wurden bei der Firma Microsynth SEQLAP standardmäßig mit dem zugehörigen reverse Primer analysiert. Falls dabei jedoch ein ungenaues Ergebnis entstand, gab es die Möglichkeit, die jeweilige Probe erneut mit einem forward Primer analysieren zu lassen. Dafür wurden die PCR-Amplifikate bis zum Ende der Laborarbeit im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Auswertung des *pstS*-Gens wurde jede Probe immer mit einem forward und einem reverse Primer analysiert. Die beiden Sequenzen wurden dann mit Hilfe des Programms SeqMan zusammengesetzt. Diese Möglichkeit stand einem auch bei anderen komplizierten Allelen zur Verfügung.

Tabelle 15: Zusammenfassung der 7 Genloci für MLST, mit Anzahl der Möglichkeiten pro Allele; Werte der Datenbank [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org) entnommen (70)

Gen	Name	Anzahl möglicher Allele	Sequenzlänge in bp
<i>atpA</i>	ATP-Synthase, $\alpha$ -Untereinheit	124	556
<i>ddl</i>	D-Alanin-D-Alanin-Ligase	112	456 - 465
<i>gdh</i>	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	93	530
<i>purK</i>	Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase ATPase-Untereinheit	117	492
<i>gyd</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	69	395 - 398
<i>pstS</i>	Phosphat ATP-binding cassette Transporter	153	583
<i>adk</i>	Adenylatkinase	65	437

## 2.4 Analyse der Patientendaten

Alle Ergebnisse der Untersuchungen wurden in einer Tabelle (Excel 2010) zusammengefasst. Den Proben wurden interne Nummern innerhalb des Jahres 2012 vergeben und ihrem Patienten zugeordnet. Es wurde von jedem Patienten Pseudonym, Geburtsdatum (Tag, Monat, Jahr), Geschlecht und Eingang des ersten VRE-Nachweises erfasst.

Die Herkunft der Isolate wurde in die Parameter Krankenhaus, Abteilung, Station sowie Stationsart (Intensivstation (ITS)/ normal/ ambulant) erfasst. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jede Probe einer klinischen Disziplin nach dem Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 (71) zugeordnet. Auch das klinische Material der Proben wurde Materialgruppen des Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 zugeordnet.

Außerdem wurden die Proben in Screening- und Infektion-Proben unterteilt, um rückzuschließen, ob es sich bei der jeweiligen Probe um eine Kolonisation oder Infektion des Patienten mit VRE handelte.

Auch Resistenzbefunde aus der Laboranalyse im Jahr 2012 wurden eingetragen, um diese mit den Ergebnissen der Laboranalysen 2018/19 zu vergleichen.

Anschließend wurden alle Ergebnisse der Laboranalysen aus dem Jahr 2018/2019 eingefügt. Die durch MALDI-TOF identifizierten Bakterienstämme, den Nachweis der Resistenzgene und der Virulenzfaktoren sowie die Ergebnisse der MLST-Bestimmungen wurden in einer Excel-Tabelle erfasst.

Die Grafiken wurden mit Excel durch Filterauswahl erstellt.

Der Großteil der VRE-Nachweise im Jahre 2012 kamen aus dem Universitätsklinikum Regensburg. Dort wurden alle VRE-Erstnachweise in der Stammsammlung erfasst. Bei den externen Krankenhäusern handelte es sich um keine standartmäßige Erfassung, sondern nur um Stichproben, was diese Daten epidemiologisch nur bedingt aussagekräftig macht. Aus diesem Grund wurden die Daten aus dem UKR bei den Auswertungen separat bearbeitet und genauer untersucht.

## **2.5 Ethikvotum**

Die Ethikkommission der Universität Regensburg erhebt keine Einwände gegen das Forschungsvorhaben „Molekulare Epidemiologie Vancomycin-resistenter Enterokokken am Universitätsklinikum Regensburg – eine retrospektive Auswertung“, zu welchem auch diese Arbeit zählt. Dieses Votum mit dem Geschäftszeichen 16-104-0057 wurde am 17.02.2016 bestätigt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Übersicht über alle VRE-Isolate der Stammsammlung im ersten Halbjahr 2012

Die VRE-Stammsammlung aus dem Jahre 2012 bildete die Grundlage für die Laboranalysen dieser Studie in den Jahren 2018 und 2019. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 127 Proben aus dem ersten Halbjahr 2012 analysiert. Am UKR wurde jeder VRE-Erstnachweis im Rahmen der Diagnostik am Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene konsequent erfasst. Bei den externen Krankenhäusern im Raum Regensburg handelte es sich eher um Einzelnachweise. Somit geben die Isolate aus dem UKR ein besseres Bild der VRE-Erstnachweise wieder. Aus diesem Grund werden in den Ergebnissen nur die Proben des „UKR“ (n = 104) genauer betrachtet (Abbildung 14). Die Ergebnisse der externen Proben werden in Abschnitt „3.12 VRE-Isolate aus den externen Krankenhäusern“ dargestellt (n = 23).

Bei einer der 104 aufgetauten Proben zeigte sich kein Wachstum und sie konnte nicht weiter analysiert werden. Mit den übrigen Proben wurde zur Spezies-Bestimmung eine MALDI-TOF-Analyse durchgeführt. Es ergaben sich insgesamt 100 *E. faecium*-Isolate. Von diesen *E. faecium*-Isolaten konnte bei 3 Proben die MLST-Bestimmung nicht vollständig durchgeführt werden. So waren bei 97 Proben alle Analysen durchführbar („vollständige Analyse“). Obwohl es das Ziel war, immer nur das Erstisolat eines Patienten zu registrieren, wurden vereinzelt zufällige Folgeisolate von Patienten asserviert. Diese werden in Abschnitt „3.11 Mehrfachisolate von VRE-Trägern“ genauer ausgeführt. Insgesamt standen 80 VREfm-Erstisolate (n = 80) (Abbildung 15) zur vollständigen Analyse zur Verfügung. In den nachfolgenden Ergebnissen, außer im Kapitel Enterokokken-Spezies, wird nur die Teilmenge „VREfm-Erstisolate“ (n = 80) genauer dargestellt. Mit dieser Teilmenge „VREfm-Erstisolate“, konnten alle Untersuchungen durchgeführt werden. Davon sind alle Ergebnisse der PCR-Analysen, sowie der Befunde dargestellt.

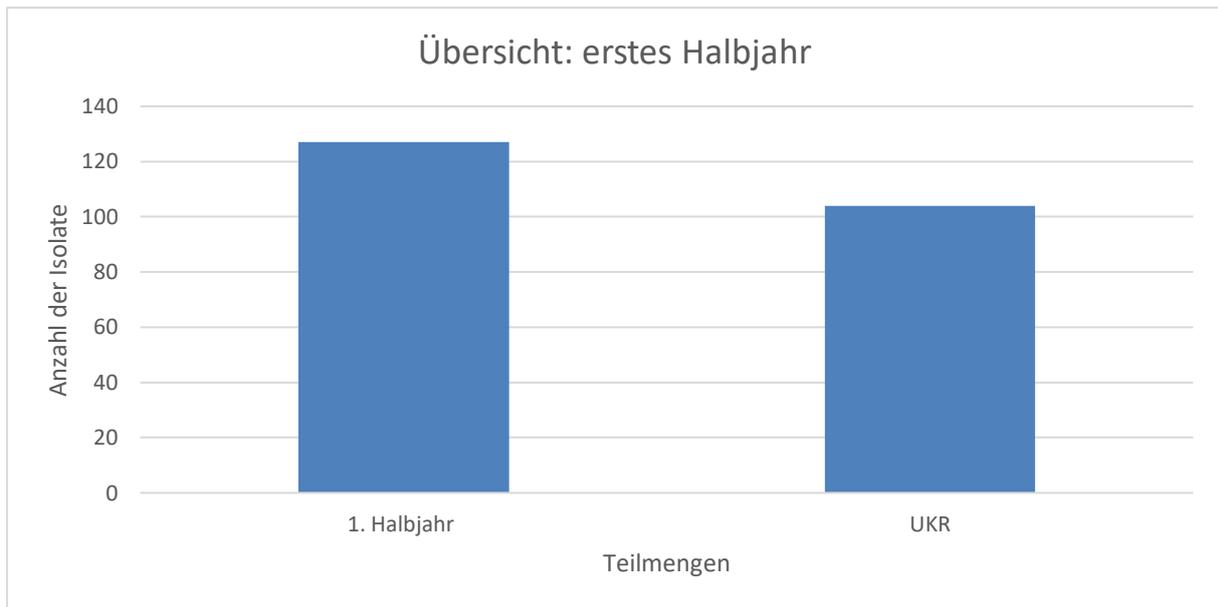


Abbildung 14: Übersicht über alle VRE-Isolate aus der Stammsammlung des ersten Halbjahres 2012 (n = 127) mit Darstellung der Teilmenge UKR des ersten Halbjahres (n = 104)

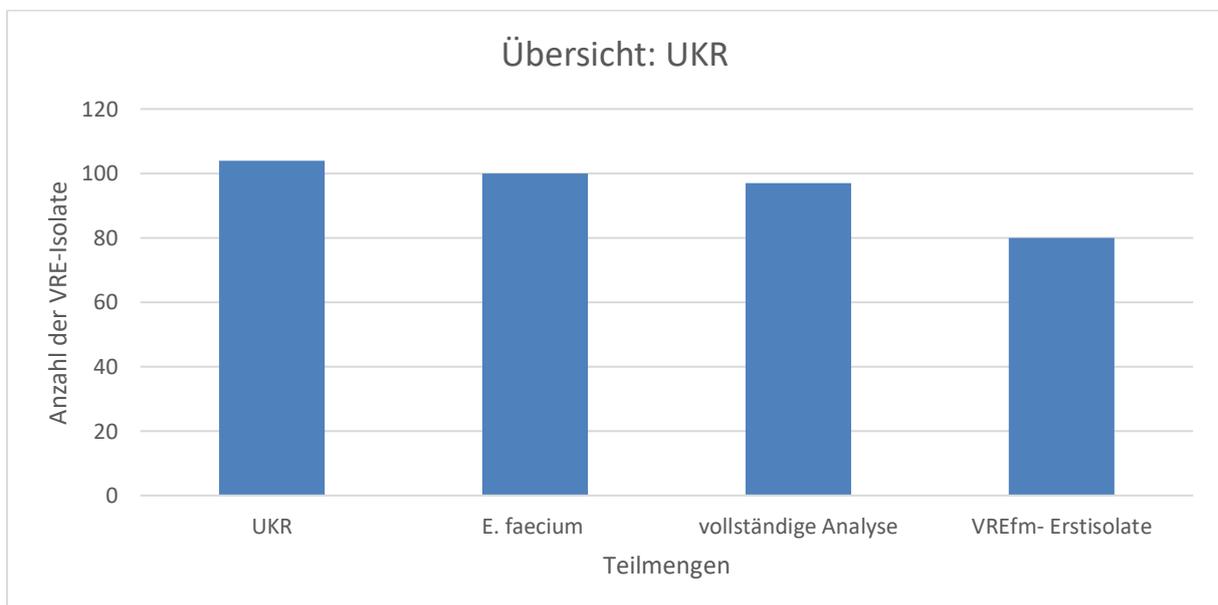


Abbildung 15: Übersicht über alle VRE-Isolate des UKR: Gesamtzahl am UKR (n = 104), *E. faecium*-Isolate, vollständig funktionierende Analyse und VREfm-Erstnachweise (n = 80)

### 3.2 Enterokokken-Spezies

Abzüglich einer Probe ohne Wachstum konnten insgesamt 103 Proben untersucht werden. Bei diesen wurde zur Differenzierung der Bakterien-Spezies die MALDI-TOF-Analyse durchgeführt. Es waren 97 % der Proben *E. faecium*-Isolate. Insgesamt ergaben sich 100 *E. faecium*-, 1 *E. faecalis*- und 2 *E. gallinarum*-Isolate (Abbildung 16).

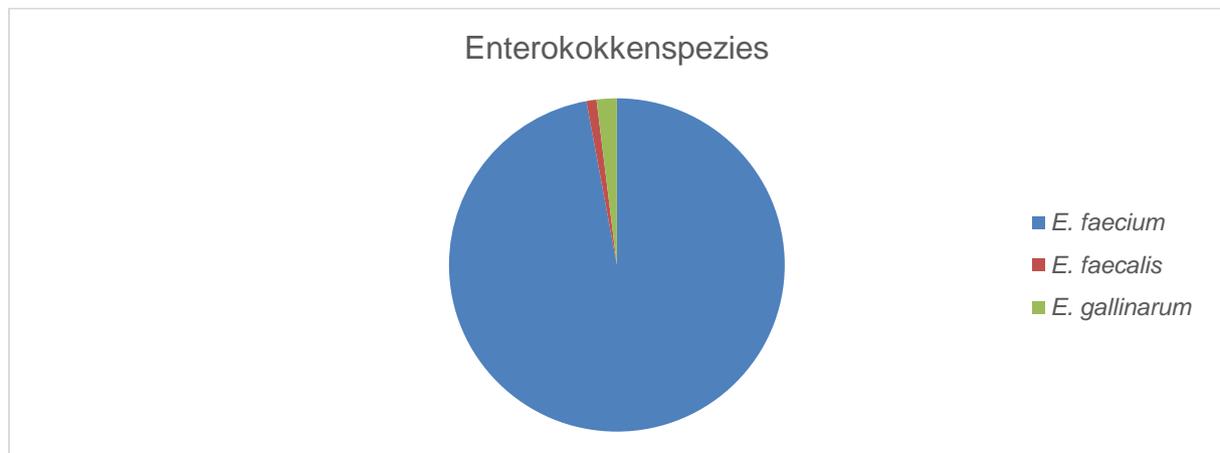


Abbildung 16: Enterokokkenspezies der VRE-Isolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR, abzüglich einer Probe ohne erfolgreiche Analyse (n = 103)

### 3.3 Halbjahresverlauf im Jahr 2012

Für den zeitlichen Verlauf wurden alle VREfm-Erstisolate der Patienten (n = 80) den Monaten, in welchen die Proben im Labor eingegangen sind, zugeordnet. Es zeigte sich eine Häufung im Monat April. In den Monaten Januar, Februar und März wurden am wenigsten Isolate nachgewiesen (Abbildung 17)

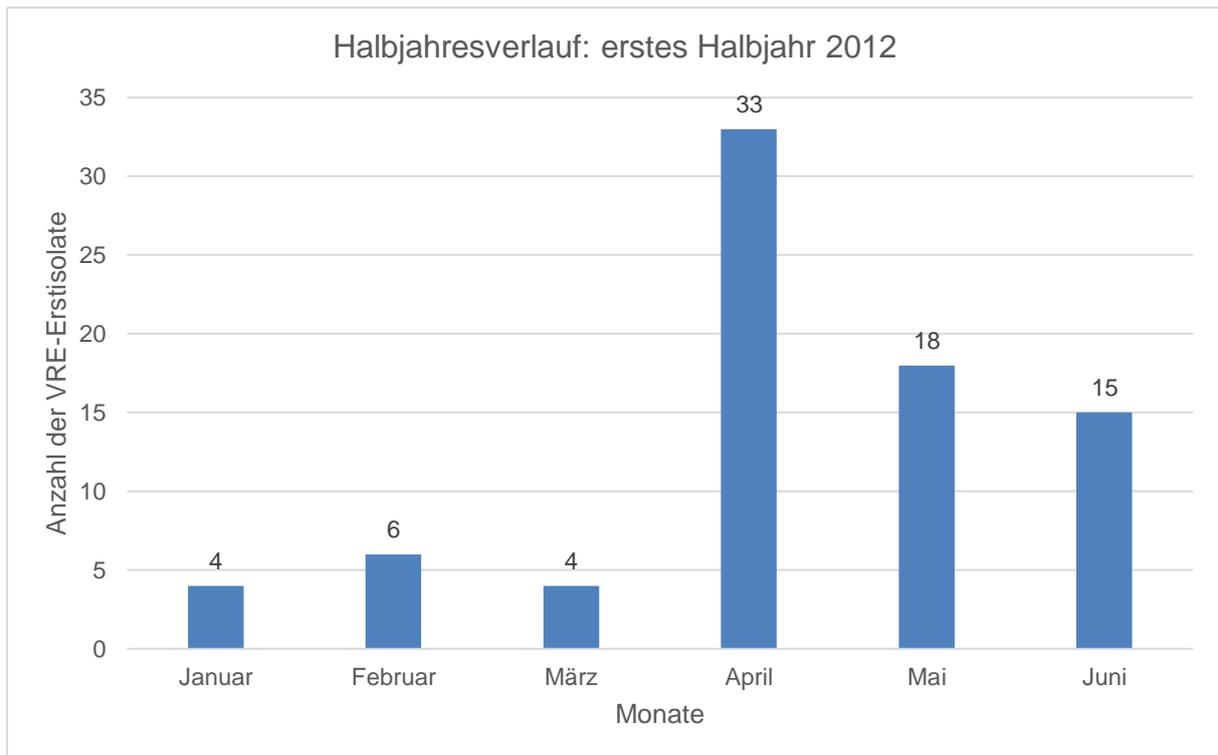


Abbildung 17: Darstellung des Halbjahresverlaufs der VREfm-Erstisolate auf Monate verteilt im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

### 3.4 Alter und Geschlecht

Die Erfassung der Befunde zeigte deutlich mehr VRE-positive Männer als Frauen. Es waren 51 Männer (64 %) und 29 Frauen (36 %) VRE-positiv (Abbildung 18).

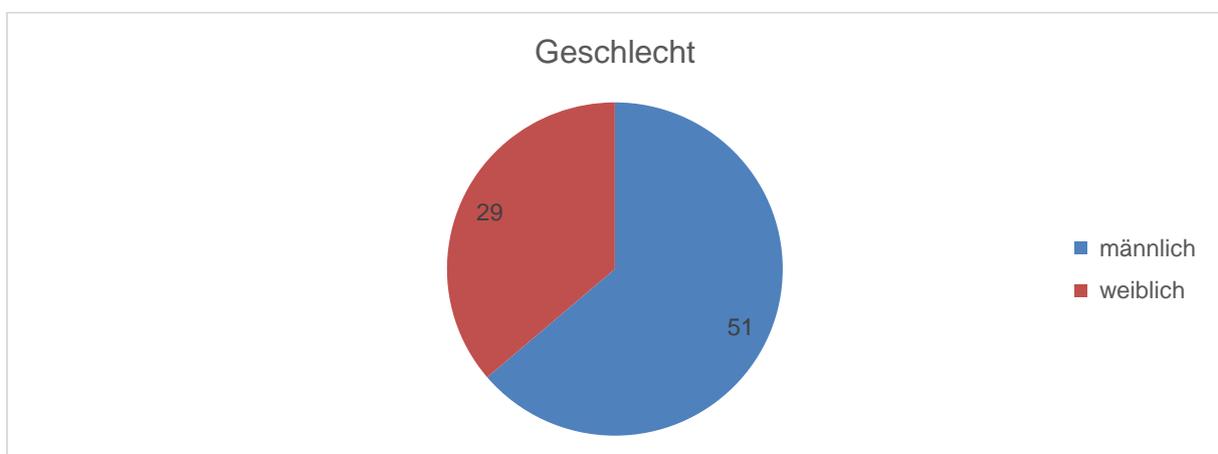


Abbildung 18: Geschlechterverteilung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Auch das Alter der Patienten im Jahr 2012 zum Zeitpunkt des VRE-Nachweises wurde erfasst. Ab einem Alter von 40 Jahren wurden deutlich mehr VRE-positive Patienten nachgewiesen. Die Patienten wurden in 5 Altersgruppen unterteilt: < 20 Jahre, 20 - < 40 Jahre, 40 - < 60 Jahre, 60 - < 80 Jahre und  $\geq 80$  Jahre. Es zeigten sich deutlich mehr VRE-Nachweise mit steigendem Alter, denn 47 % aller Patienten waren 60 Jahre alt oder älter. Bei den Frauen handelte es sich um einen kontinuierlichen Anstieg. Bei den Männern wurden ab einem Alter von 40 Jahren deutlich mehr Isolate nachgewiesen. Generell wurden ab einem Alter von 40 Jahren deutlich mehr Isolate nachgewiesen (Abbildung 19).

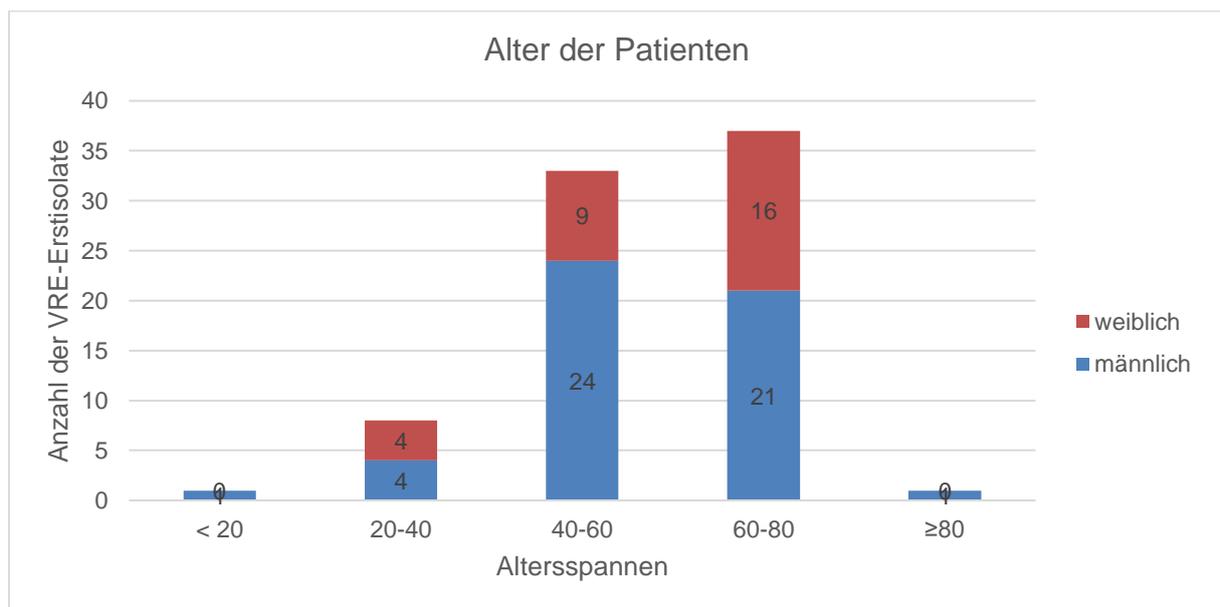


Abbildung 19: Darstellung des Alters der Patienten der VRE<sub>fm</sub>-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80); unterteilt in männlich und weiblich

### 3.5 Glykopeptid-Resistenzgene

Mit einer Multiplex-PCR wurden die Isolate auf die Anwesenheit der Gene *vanA/B*, welche die Glykopeptid-Resistenz codieren, getestet. Es ergab sich eine größere Verbreitung des *vanB*-Gens von ca. 73 %. Insgesamt waren es 58 *vanB*-positive und 22 *vanA*-positive Isolate (Abbildung 20).

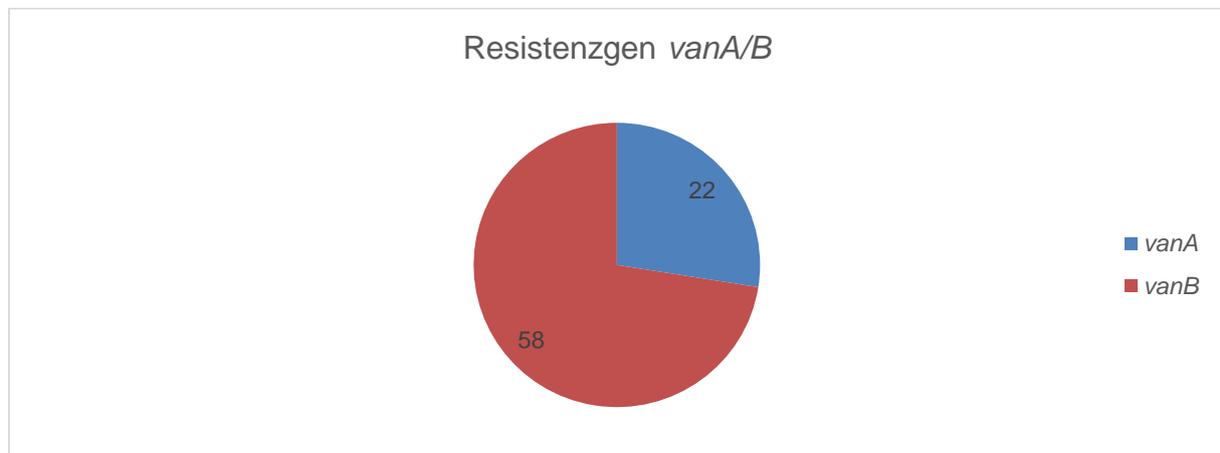


Abbildung 20: Glykopeptid-Resistenzgenverteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Die Ergebnisse für den *van*-Genotyp stimmten mit jenen aus den Laboranalysen im Jahr 2012 größtenteils überein. Eine Ausnahme machten 9 Proben, für welche im Befund aus dem Jahr 2012 eine Resistenz für *vanA* und *vanB* detektiert wurde. Die jeweiligen Isolate, wurden erneut mittels einer getrennten PCR-Analyse auf nur ein Glykopeptid-Resistenzgen (*vanA* oder *vanB*) untersucht. Bei 5 Proben bestätigte sich, dass beide Gene vorhanden waren. In den folgenden Ergebnissen dieser Arbeit und der oben dargestellten Glykopeptid-Resistenzgenverteilung, wurde jedem Isolat jedoch nur ein Resistenzgen *vanA* oder *vanB* zugeordnet. Dabei wurde immer das Amplifikat als Resistenzgen gewertet, welches in der Multiplex-PCR die höhere Konzentration aufwies.

### 3.6 Virulenzfaktoren

Anhand von 4 weiteren PCR-Analysen wurden die Isolate auf die Anwesenheit von Virulenzfaktoren untersucht. Der Großteil aller Isolate war *esp*-positiv (81 %). Es ergaben sich 65 *esp*-positive und 15 *esp*-negative Isolate (Abbildung 21). Wenn man die Verteilung von *esp*-positiven Isolate auf die *vanA*- oder *vanB*-positiven Isolate vergleicht ist auffällig, dass nur 45 % der *vanA*-positiven, aber 95 % der *vanB*-positiven Isolate *esp*-positiv sind.

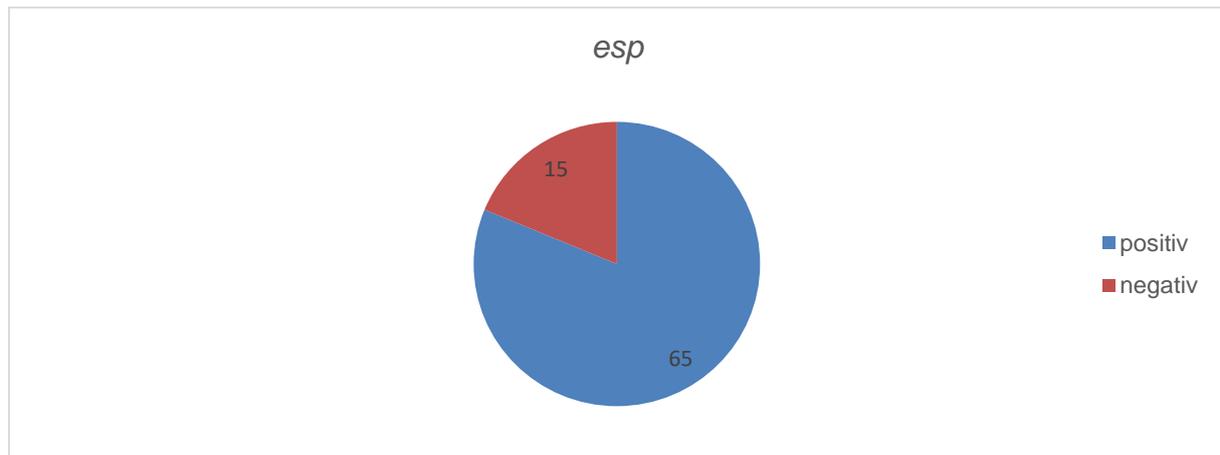


Abbildung 21: Verteilung von *esp*-positiven und *esp*-negativen VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Die Isolate wurden auch auf die Wiederholung der Untereinheit A, des Gens *esp* untersucht. Die Untereinheit A war entweder nicht vorhanden (neg.), einmal vorhanden oder zeigte 2-6-Wiederholungen. Am häufigsten waren 4- und 5-Wiederholungen (Abbildung 22).

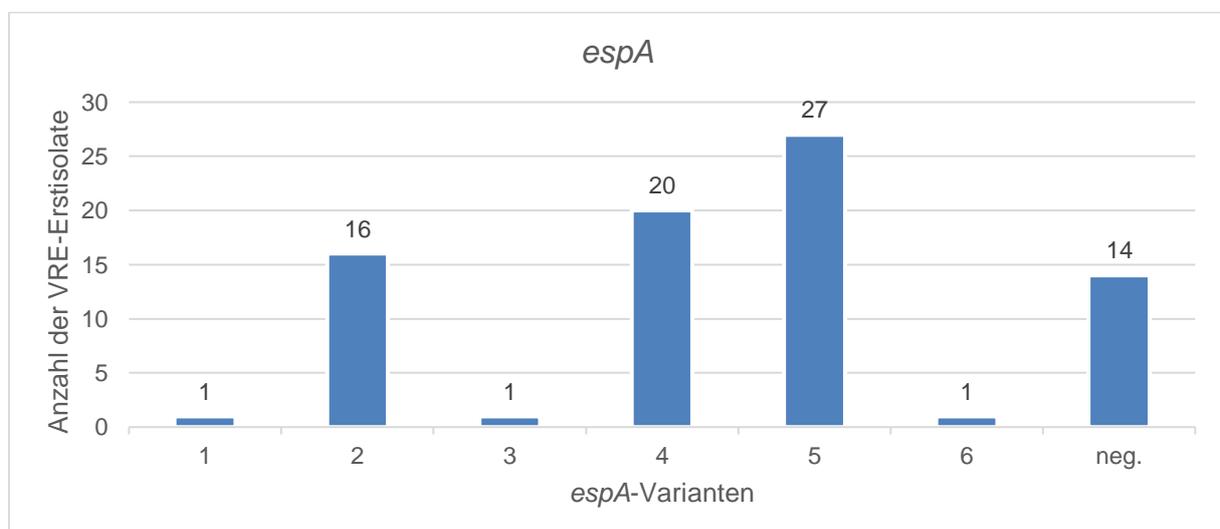


Abbildung 22: Verteilung der *espA*-Varianten (1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- Wiederholungen oder neg.) auf alle VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Der Nachweis des *hyl*-Gens fiel bei dem Großteil der Proben (81 %) positiv aus. Bei 65 Isolaten konnte das *hyl*-Gen nachgewiesen werden. 15 Isolate waren *hyl*-negativ (Abbildung 23). Alle *vanA*-positiven Isolate und 74 % der *vanB*-positiven Isolate waren *hyl*-positiv.

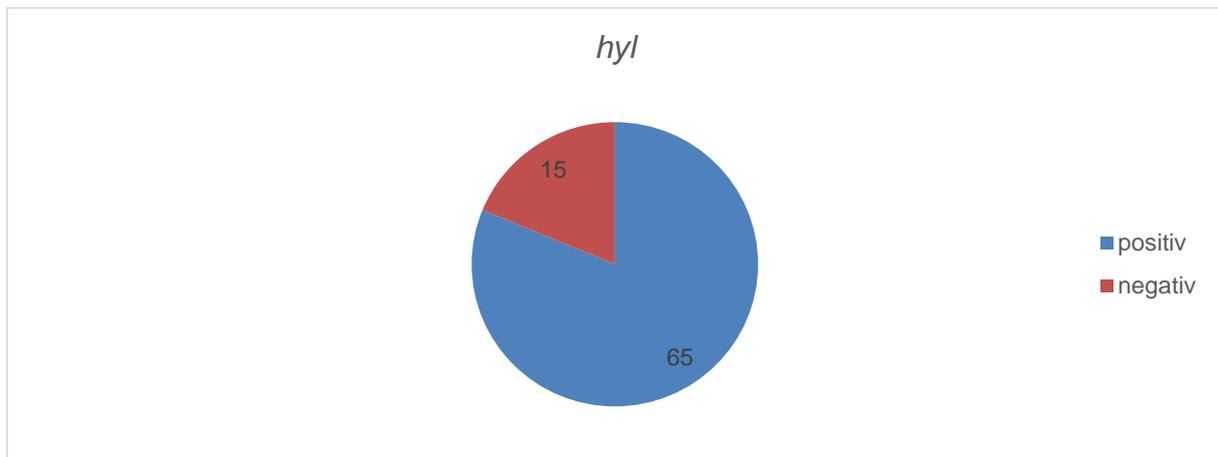


Abbildung 23: Verteilung von *hyl*-positiven und *hyl*-negativen VREfm-Erstisolaten im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Der Nachweis für das Gen *acm* war für alle VREfm-Erstisolate positiv.

## 3.7 MLSTypisierung

### 3.7.1 Allelevarianten

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war die genetische Analyse mit dem MLST-Verfahren. Es wurden 7 PCR-Analysen durchgeführt, um 7 *Housekeeping*-Gene genauer zu bestimmen. Daraus ließ sich dann der Sequenztyp (ST) ableiten. Bei 3 Proben der 100 *E. faecium*-Isolate aus dem UKR ließ sich die MLSTypisierung nicht komplett durchführen (s. 3.7.2 nicht vollständig durchführbare MLST). Abzüglich der Mehrfachisolate sind im Folgenden die 80 VREfm-Erstisolate am UKR genauer dargestellt.

Für die *Housekeeping*-Gene *ddl*, *gdh*, *purK* und *adk* konnte jeweils nur eine Variante, die Allelvariante 1, nachgewiesen werden.

Das *atpA*-Gen zeigte die Allelevarianten 1, 7, 9 und 15, wobei 9 am häufigsten auftrat (Abbildung 24).

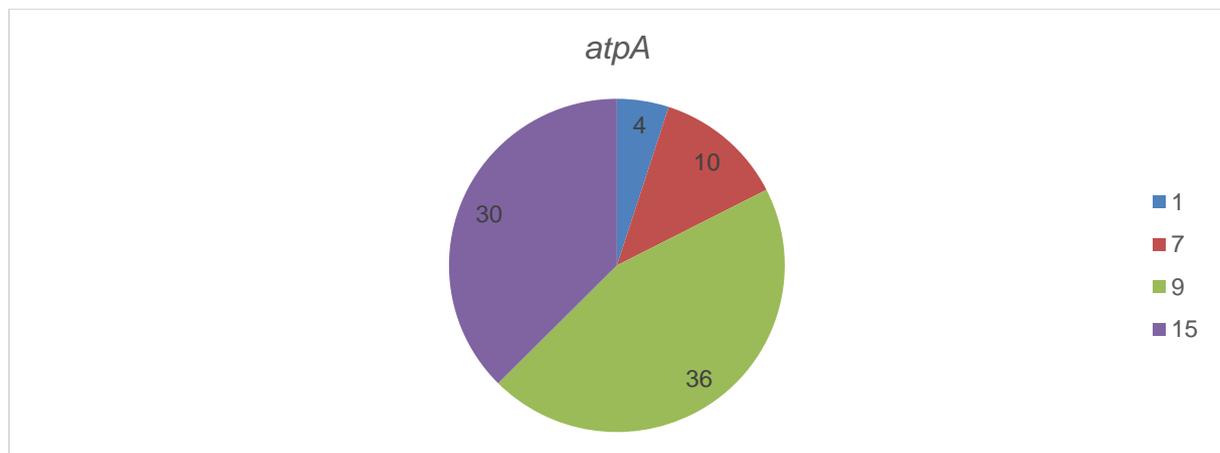


Abbildung 24: Anzahl der Allelevarianten von *atpA* aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Für das Gen *gyd* waren zwei Varianten nachweisbar. Es konnten die Varianten 1 und 5 bestimmt werden. Die Allel 1 war deutlich öfters vorhanden (Abbildung 25).

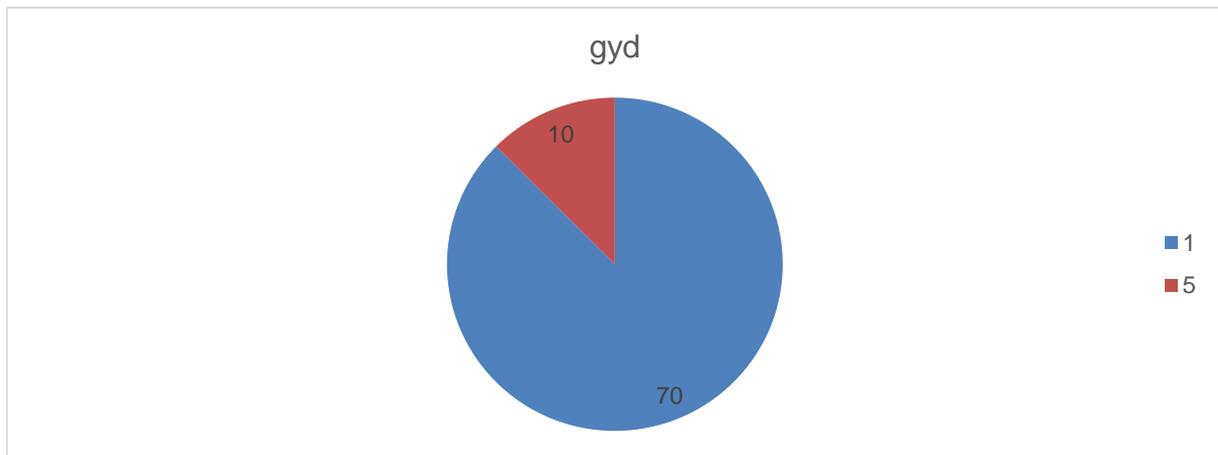


Abbildung 25: Anzahl der Allelvarianten von *gyd* aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80)

Für *pstS* wurden drei Varianten gefunden. Die Variante 1, 7 und 20. Am häufigsten war hier die Variante 1 vertreten (Abbildung 26).

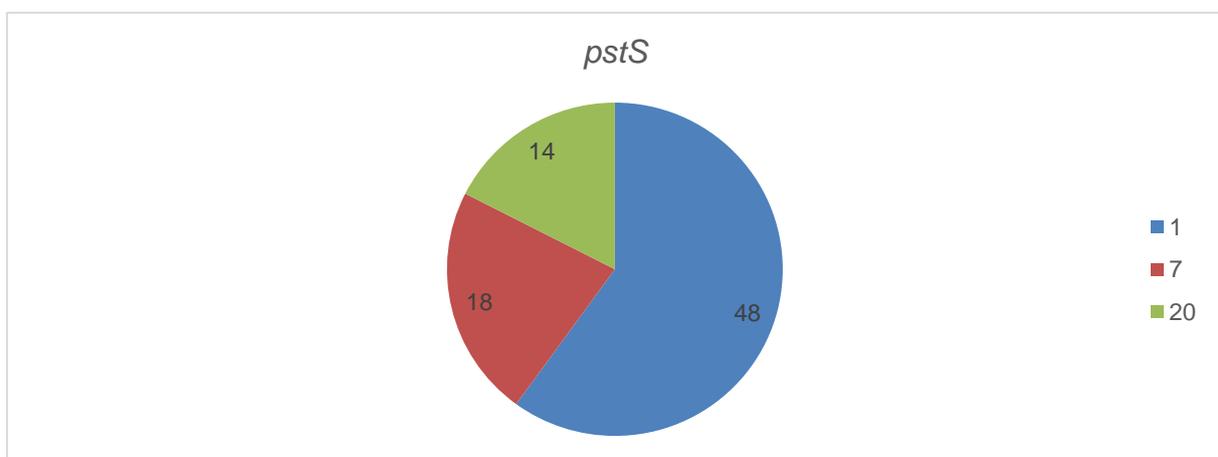


Abbildung 26: Anzahl der Allelvarianten von *pstS* aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80)

### 3.7.2 Nicht vollständig durchführbare MLST

Es ließen sich 3 Proben keinem ST zuordnen. Bei einer Probe ließ sich *atpA* und *gyd*, bei einer anderen nur *gyd* und bei der dritten nur *gdh* nicht bestimmen. Außer bei *atpA* ließen sich die fehlenden Allele nicht mittels PCR amplifizieren. *AtpA* ließ sich zwar amplifizieren, konnte jedoch keinem bekannten Allel auf der kuratierten Typisierungshomepage ([www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)) zugeordnet werden.

## 3.8 MLST-Sequenztypen

### 3.8.1 Verteilung der ST

Aus den oben dargestellten Allelenvarianten wurden die Sequenztypen (ST) abgeleitet. Im UKR wurden 7 verschiedene nachgewiesen. Am häufigsten war der ST 117 vertreten (s. Tabelle 16 und für eine prozentuale Darstellung Abbildung 27).

Tabelle 16: Allelprofile und Anzahl der Nachweise aller bestimmten ST der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR

ST	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	Anzahl am UKR
17	1	1	1	1	1	1	1	1
18	7	1	1	1	5	1	1	10
78	15	1	1	1	1	1	1	1
117	9	1	1	1	1	1	1	36
192	15	1	1	1	1	7	1	18
203	15	1	1	1	1	20	1	11
233	1	1	1	1	1	20	1	3
gesamt								80

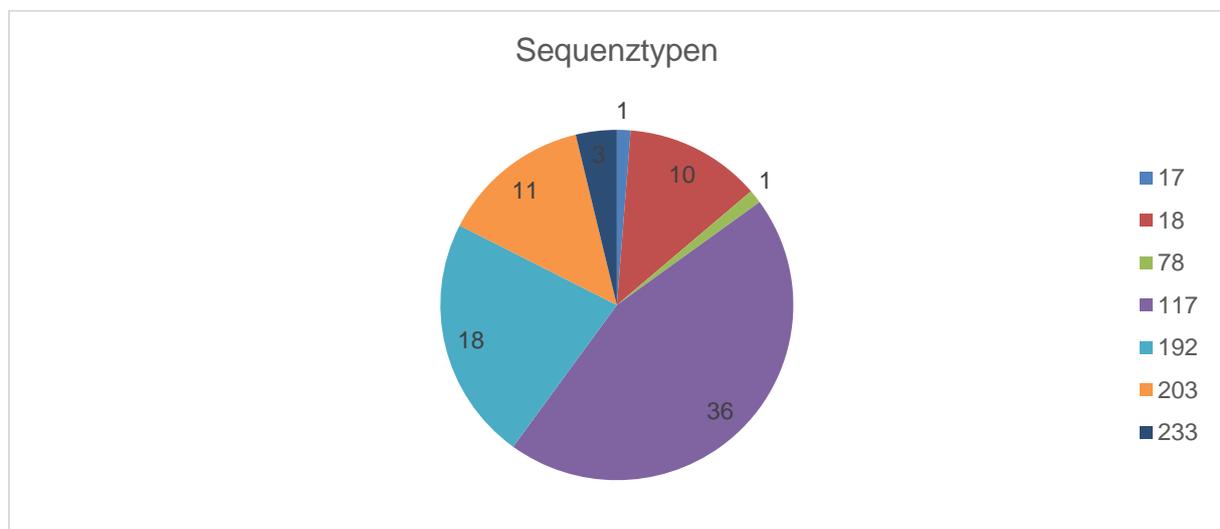


Abbildung 27: Anzahl der verschiedenen Sequenztypen aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

### 3.8.2 Verteilung der Virulenzfaktoren und Resistenzgene auf ST

Die Abbildung 28 zeigt die Verteilung der Resistenzgene *vanA/B* und die Gene der Virulenzfaktoren *esp*, *hyl*, *acm* und *espA*-Varianten auf die einzelnen Sequenztypen. Der am häufigsten vertretene ST 117 (45 %) zeigte dabei die größte Variabilität mit *vanA*- sowie *vanB*-positiven Stämmen. ST 117 war meistens (17 von 36) *vanB*-, *esp*-, *hyl*- und *acm*-positiv und hatte 4-Repeats der Untereinheit *espA*. Der zweithäufigen MLSTyp ST 192 war immer *vanB*-positiv.

ST	<i>vanA/B</i>	<i>esp</i>	<i>hyl</i>	<i>acm</i>	<i>espA</i>	Anzahl
17	A	+	+	+	4	1
18	A	-	+	+	neg.	8
			+	+	2	1
	B	-	-	+	neg.	1
78	B	+	+	+	2	1

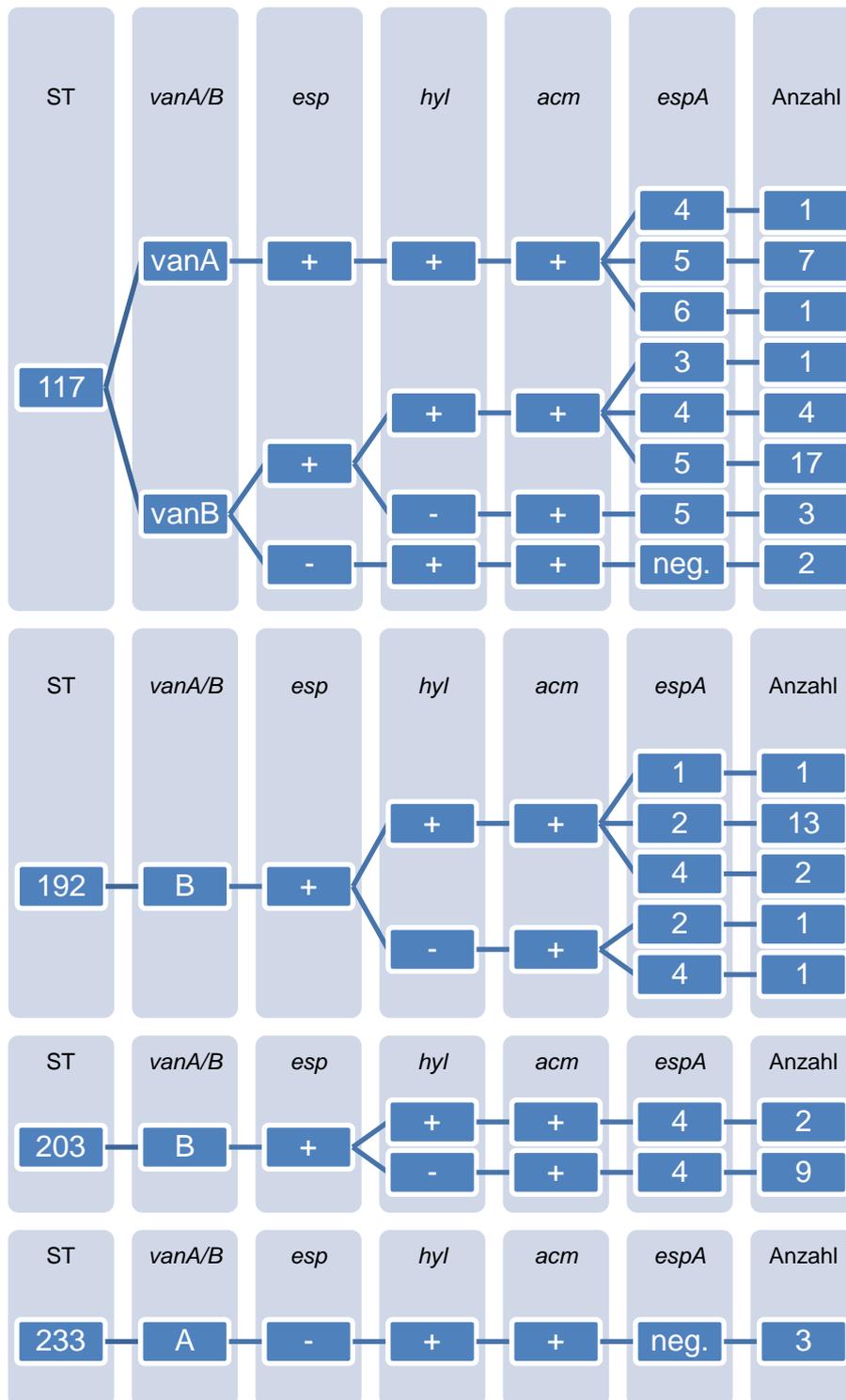


Abbildung 28: Verteilung der Resistenzgene *vanA/B* und der Virulenzfaktoren *esp*, *hyl*, *acm* und Wiederholung der Untereinheit A des *esp*-Gens auf die ST der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

### 3.8.3 Zeitlicher Verlauf der Nachweise von ST 117 und ST 192

Die zwei häufigsten ST 117 und 192 waren für 68 % der VREfm-Erstnachweise verantwortlich. Der zeitliche Verlauf dieser ST ist in Abbildung 29 dargestellt. Für den ST 117 zeigte sich eine starke Häufung im April. Die Anzahl des ST 192 stieg über das 1. Halbjahr an.

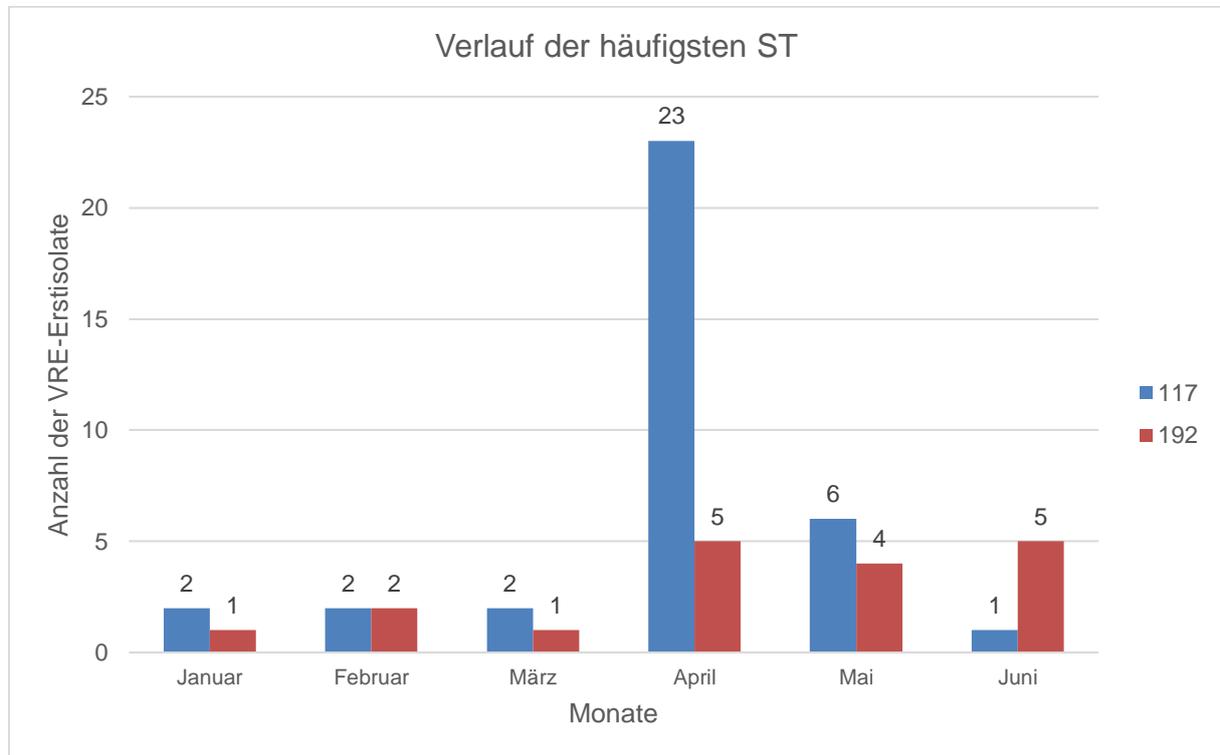


Abbildung 29: Darstellung der Jahresverläufe der häufigsten ST 117 und 192 der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR auf Monate verteilt

## 3.9 Verteilung der VREfm-Erstisolate innerhalb des UKR

### 3.9.1 Verteilung auf Stationsarten

Im UKR wurden alle VREfm-Erstisolate systematisch über das ganze Jahr erfasst. Somit spiegeln die Ergebnisse des UKR ein genaues Bild der Erstdnachweise wider. Außerdem liegen die Befunde mit genauer Herkunft der Isolate vor. Im Folgenden wird die Herkunft der VREfm-Erstisolate bis auf Stationsebene dargestellt.

Abbildung 30 zeigt eine Verteilung der Isolate nach klinischen Disziplinen. Dabei wurden zur besseren Vergleichbarkeit die Kategorien des Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 verwendet. (71) Die meisten Isolate stammten aus der Kategorie „Hämatologie/Onkologie“ mit 49 %. Darauf folgte die „Innere Medizin“ mit 39 %. Die restlichen Isolate verteilten sich auf die Kategorien „Chirurgie“ und „Nephrologie/Urologie“ (Abbildung 30).

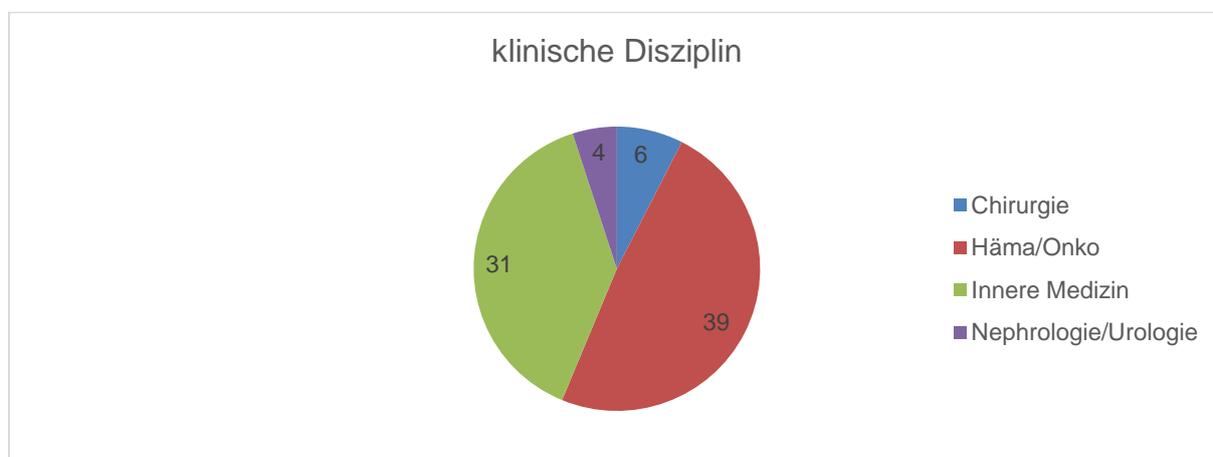


Abbildung 30: Zuordnung der klinischen Disziplin zum Nachweis der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Die Verteilung der Isolate auf Stationsarten zeigt, dass die meisten VRE-Nachweise von Normalstationen kamen (64 %). 32 % der Proben waren aus Intensivstationen (ITS) und 4 % stammten von ambulanten Patienten (Abbildung 31).

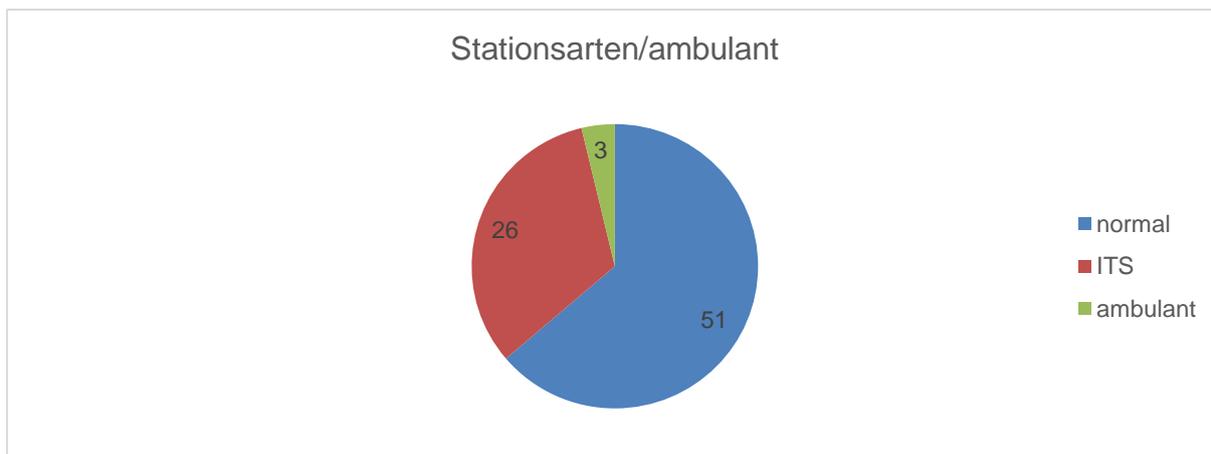


Abbildung 31: Verteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR auf die Stationsarten, sowie ambulant (n = 80)

Die Abbildung 32 zeigt eine Verteilung der zwei häufigsten ST 117 und 192 auf die Stationsarten „normal“ und „ITS“, sowie auf den ambulanten Bereich. Innerhalb der normalen Stationen hatte der ST 117 den größten Anteil. Bei den Intensivstationen war jedoch der ST 192 am stärksten vertreten. In den ambulanten Bereichen war das Vorkommen beider ST gleich hoch.

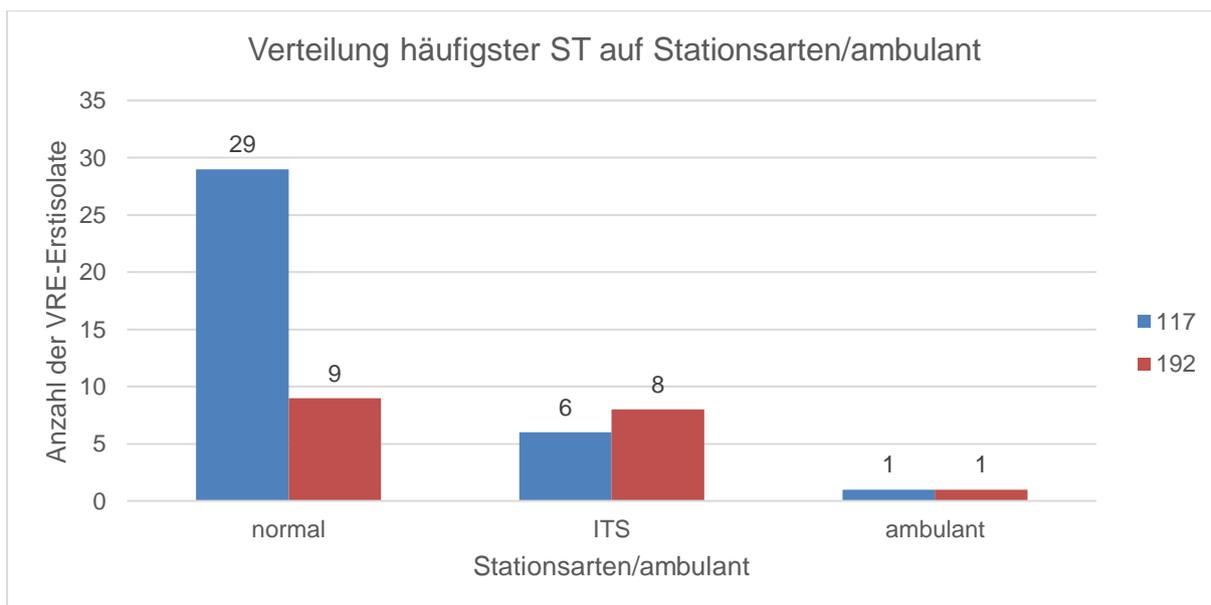


Abbildung 32: Verteilung der häufigsten ST aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR auf die Stationsarten sowie ambulanten Bereiche (n = 54)

### 3.9.2 Verteilung auf Stationen des UKRs

Eine Übersicht über alle Stationen, sowie ambulanten Abteilungen am UKR mit VREfm-Erstnachweis zeigt die Tabelle 17.

Tabelle 17: Übersicht über Stationsart, Station und Fachrichtung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Stationsart	Station	Fachrichtung	Anzahl
Normalstation	14	Innere	1
	15	Innere	6
	17	Nephrologie	2
	18	Innere	1
	20	Häma/Onko	13
	21 KMT	Häma/Onko	25
	56	Chirurgie	1
	58	Neurochirurgie	1
	60	HTG-Chirurgie	1
ITS	90a	Chirurgie	2
	90b	Chirurgie	1
	92	Innere	13
	93	Innere	10
ambulant	ambulant	Nephrologie	2
	ambulant	Häma/Onko	1

Die meisten VREfm-Erstisolate wurden auf der Station 21 KMT (Knochenmarktransplantation) mit der Fachrichtung Hämatologie/Onkologie nachgewiesen (31 %). Eine weitere Station mit einer Häufung von Nachweisen war die Station 20, welche ebenfalls zur Fachrichtung Hämatologie/Onkologie gehört (16 %). Die übrigen Isolate waren Großteils auf die Intensivstationen der Inneren Medizin 92 und 93 verteilt (29 %). Die Station 15, ebenfalls Innere Medizin, hatte 6 VRE-Nachweise. Ansonsten handelte es sich bei den Stationen 14, 17, 18, 56, 58, 60, 90a und 90b um ein- oder zweifache Nachweise. Es wurden 3 ambulante Isolate registriert.

In der Station 21 KMT zeigte sich eine deutliche Häufung des ST 117 (21 von 25). In den anderen Stationen konnte man eher eine ST-Heterogenität erkennen (Abbildung 33).

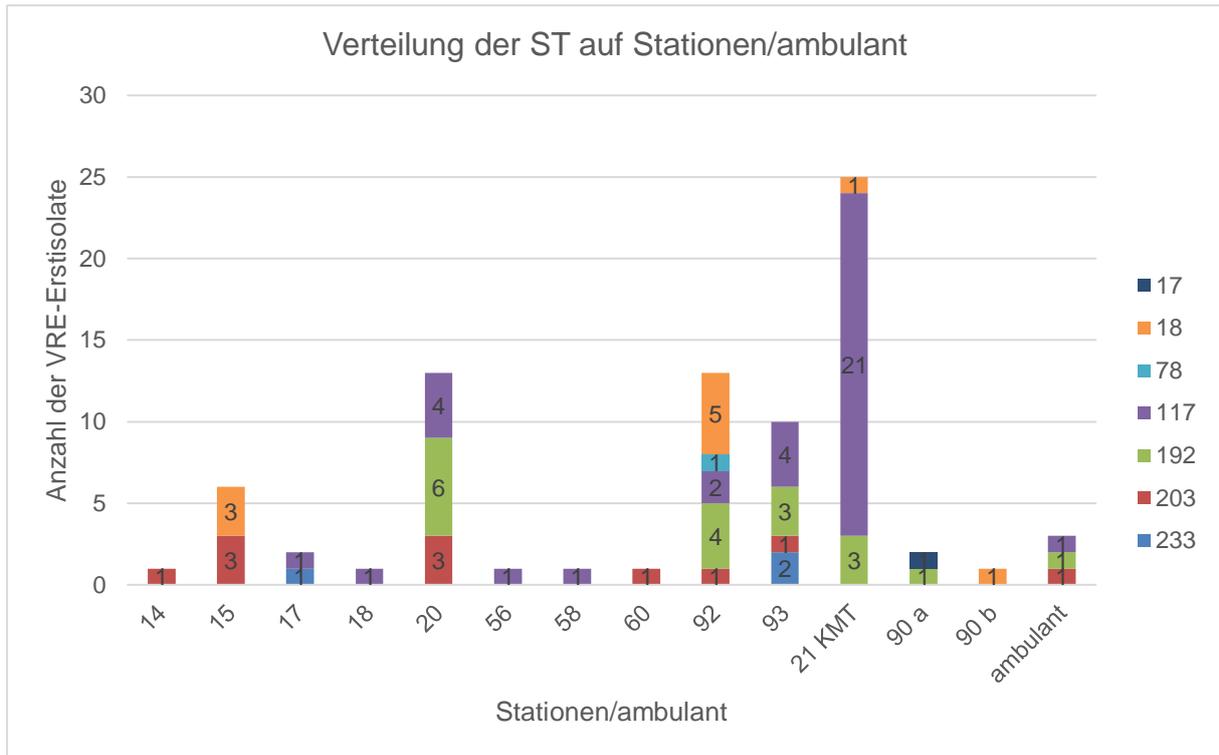


Abbildung 33: Verteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR, auf die Stationen und ambulant mit Einbeziehung der ST (gesamt: 80)

## 3.10 Klinisches Material

### 3.10.1 Materialgruppen

Die Zuordnung der VREfm-Erstisolate zu einzelnen Materialgruppen erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit nach den Kategorien des Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 (71). Abstriche der Haut, Aszites oder unbekanntem Herkunftsort wurden unter „Abstriche“ zusammengefasst.

Die meisten Nachweise gehörten zur Kategorie „Rektal-/ Perianalabstrich/ Stuhl“ (80 %). Die Materialgruppe „Abstriche“ stellte 13 % der VREfm-Erstnachweise da. Den Kategorien „Bronchoalveoläre Lavage (BAL)/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich“, „Blutkultur“, „Urin“ und „Wundabstrich“ wurden nur einzelne Isolate zugeordnet (Abbildung 34).

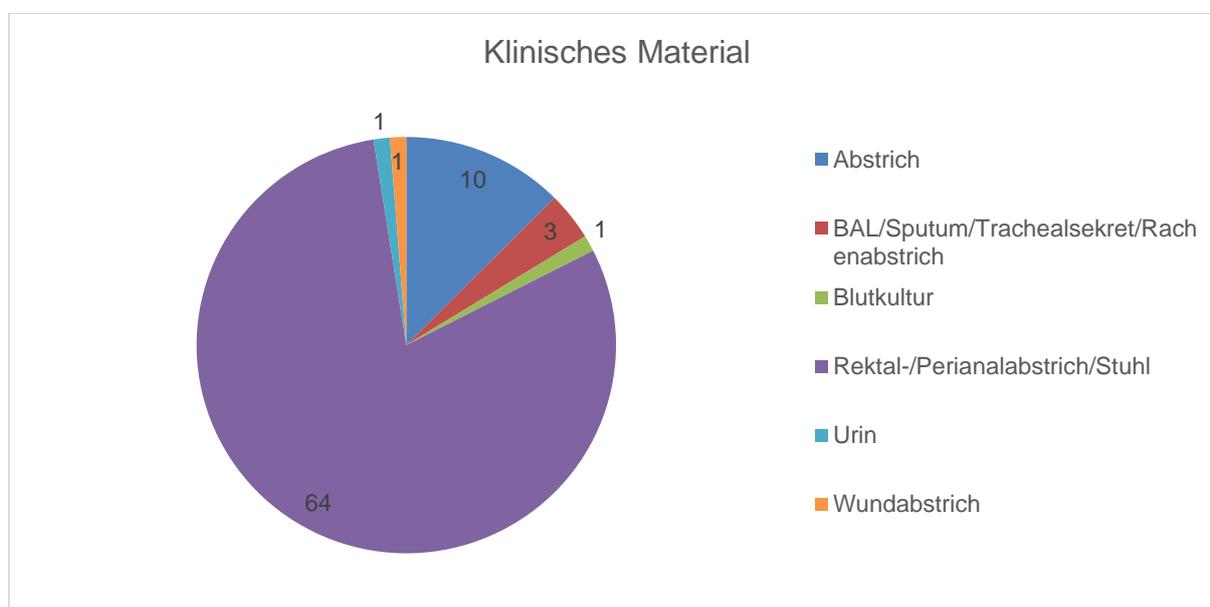


Abbildung 34: Klinisches Material der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80); BAL= Bronchoalveoläre Lavage

### 3.10.2 Besiedlungsstatus

Bei den VREfm-Erstisolaten handelte es sich entweder um einen Nachweis einer Kolonisation oder einer bakteriellen Infektion eines Patienten: den sogenannten Besiedlungsstatus. Die Kolonisation wurde in Form von Screeningabstrichen mittels einer VRE-Boullion und PCR nachgewiesen. Die Infektion wurde anhand einer klinischen Probe durch eine Routinekultur mit Antibiogramm untersucht. Die Art des Nachweises und der Untersuchung lässt also mögliche Rückschlüsse zu, ob es sich bei der jeweiligen Probe um eine Kolonisation oder Infektion des Patienten mit VRE handelt.

Das Standardmaterial für ein Screening ist die Kategorie „Rektal-/ Perianalabstrich/ Stuhl“. Weitere Screening-Nachweise waren die Kategorien „Abstriche“ der Haut, „Abstriche“ unbekannter Herkunft und ein Abstrich des Tacheostomas der Kategorie „BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich“. Der Nachweis einer Infektion durch eine Routinekultur mittels einer klinischen Probe erfolgte bei den Materialgruppen „Abstrich“ von Aszites, „Blutkultur“, „Urin“ und „Wundabstrich“ sowie mit Sekret und Spülflüssigkeit der Kategorie „BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich“.

Aus diesen Zuordnungen ergibt sich für 93 % der Patienten eine Kolonisation mit VRE. Bei den restlichen 7 % handelt es sich möglicherweise um eine bakterielle Infektion des Patienten durch VRE (Abbildung 35).

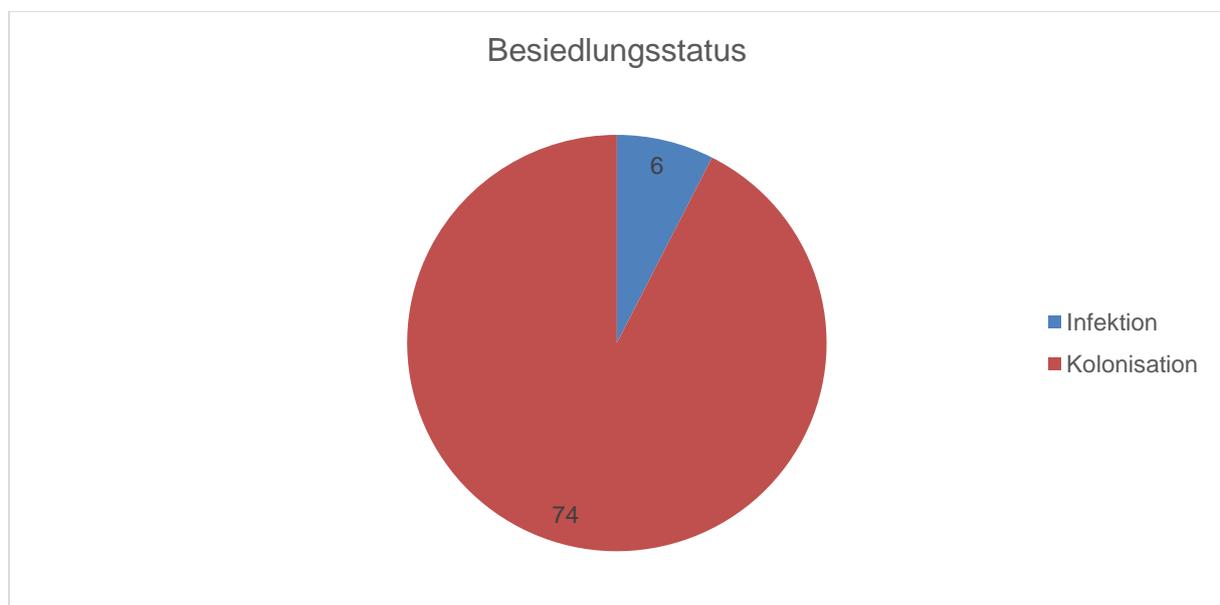


Abbildung 35: Übersicht über die Art des VRE-Nachweises aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80)

Für die Verteilung der ST auf den Besiedlungsstatus ließ sich erkennen, dass sieben ST an einer Kolonisation, jedoch nur vier von ihnen an einer Infektion beteiligt waren. Bei der Kolonisation ist mit großem Abstand der häufigste ST der ST 117. Bei einer Infektion war der ST 192 am häufigsten vertreten (Abbildung 36).

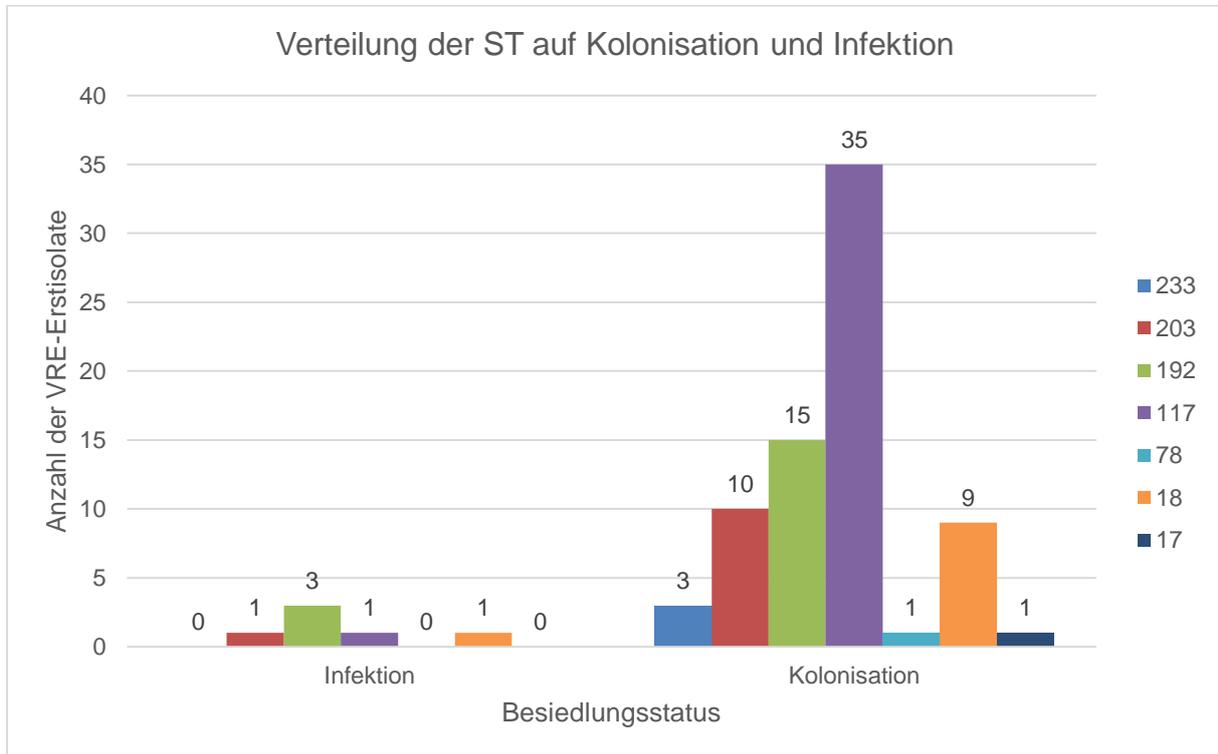


Abbildung 36: Darstellung des Besiedlungsstatus pro ST aller VREfm-Erstisolatate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80)

### 3.11 VREfm-Mehrfachisolate von VRE-Trägern

Insgesamt gab es 17 Patienten mit Mehrfachnachweisen von VRE. Davon erfolgte bei 16 Proben der Mehrfachnachweis noch innerhalb des ersten Halbjahrs. Ein weiterer Patient hatte einen Mehrfachnachweis aus dem zweiten Halbjahr. Die Proben wurden in einem Abstand von wenigen Tagen oder bis zu ca. zwei Monaten genommen. Bei der Probe, welche ihren zweiten Nachweis im zweiten Halbjahr hatte, lagen knapp vier Monate dazwischen. Bei drei der Patienten kam es nach einem Erstnachweis im UKR zu einem Mehrfachnachweis in einem externen Krankenhaus. Von allen Mehrfachnachweisen blieben bei zehn Patienten alle Faktoren wie ST, Resistenzgen und Virulenzfaktoren über alle Nachweise hin konstant. Bei vier Patienten blieben der ST gleich, aber es änderte sich etwas bei den Virulenzfaktoren. Bei drei Patienten änderte sich die Wiederholung der Untereinheit *espA*. Bei einem Patienten änderte sich der *hyl*-Nachweis. Bei drei Patienten kam es tatsächlich zu einer Änderung der Sequenztypen. Bei nur einer dieser Proben änderte sich zusätzlich noch das Resistenzgen. Bei einem Patienten trat bei einem Mehrfachisolat der ST 25 auf, welcher im Jahr 2012 noch nicht vorgekommen war. Diese Verläufe sind jeweils in einer Tabelle pro Patienten dargestellt (Tabelle 18 - 24).

Tabelle 18: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von *espA*

Patient 1 mit Mehrfachnachweis			
Datum	12.01.2012	16.01.2012	02.02.2012
ST	117	117	117
<i>vanA/B</i>	A	A	A
<i>esp</i>	+	+	+
<i>hyl</i>	+	+	+
<i>acm</i>	+	+	+
<i>espA</i>	4	4	6
Klinikum	UKR	UKR	UKR
Fachrichtung	Nephrologie	Nephrologie	Nephrologie
Station	ambulant	ambulant	ambulant
Probe	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl

Tabelle 19: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von *espA*

Patient 2 mit Mehrfachnachweis		
Datum	05.04.2012	21.04.2012
ST	117	117
<i>vanA/B</i>	B	B
<i>esp</i>	+	+
<i>hyl</i>	+	+
<i>acm</i>	+	+
<i>espA</i>	4	5
Klinikum	UKR	UKR
Fachrichtung	Häma/Onko	Häma/Onko
Station	21 KMT	21 KMT
Probe	Rektal-/Perianalabstrich/Stuhl	Rektal-/Perianalabstrich/Stuhl

Tabelle 20: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von *espA*

Patient 3 mit Mehrfachnachweis		
Datum	31.03.2012	17.07.2012
ST	192	192
<i>vanA/B</i>	B	B (AB)
<i>esp</i>	+	+
<i>hyl</i>	+	+
<i>acm</i>	+	+
<i>espA</i>	2	3
Klinikum	UKR	UKR
Fachrichtung	Innere	Chirurgie
Station	93, ITS	46
Probe	Abstrich	Rektal-/Perianalabstrich/Stuhl

Tabelle 21: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von *hyl*

Patient 4 mit Mehrfachnachweis				
Datum	31.01.2012	01.02.2012	25.02.2012	26.02.2012
ST	192	192	192	192
<i>vanA/B</i>	B	B	B	B
<i>esp</i>	+	+	+	+
<i>hyl</i>	+	+	+	-
<i>acm</i>	+	+	+	+
<i>espA</i>	1	1	1	1
Klinikum	UKR	UKR	ASKLEPIOS K.Bad Abbach	ASKLEPIOS K.Bad Abbach
Fachrichtung	Häma/Onko	Innere	Häma/Onko	Häma/Onko
Station	ambulant	92, ITS	43	43
Probe	Rektal- /Perianalabstrich/ Stuhl	Rektal- /Perianalabstrich/ Stuhl	Rektal- /Perianalabstrich/ Stuhl	Rektal- /Perianalabstrich/ Stuhl

Tabelle 22: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung des ST

Patient 5 mit Mehrfachnachweis		
Datum	04.04.2012	04.05.2012
ST	117	78
<i>vanA/B</i>	B	B
<i>esp</i>	+	+
<i>hyl</i>	+	+
<i>acm</i>	+	+
<i>espA</i>	5	5
Klinikum	UKR	UKR
Fachrichtung	Häma/Onko	Häma/Onko
Station	21 KMT	ambulant
Probe	Rektal-/Perianalabstrich/Stuhl	Rektal-/Perianalabstrich/Stuhl

Tabelle 23: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung des ST

Patient 6 mit Mehrfachnachweis		
Datum	03.04.2012	04.04.2012
ST	117	25
<i>vanA/B</i>	B	B
<i>esp</i>	-	-
<i>hyl</i>	+	+
<i>acm</i>	+	+
<i>espA</i>	-	-
Klinikum	UKR	UKR
Fachrichtung	Häma/Onko	Häma/Onko
Station	21 KMT	21 KMT
Probe	Blutkultur	Rektal-/Perianalabstrich/Stuhl

Tabelle 24: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung des ST und des Resistenzgens

Patient 7 mit Mehrfachnachweis			
Datum	05.04.2012	29.05.2012	01.06.2012
ST	117	18	18
<i>vanA/B</i>	B	A (AB)	A (AB)
<i>esp</i>	-	-	-
<i>hyl</i>	+	+	+
<i>acm</i>	+	+	+
<i>espA</i>	-	-	-
Klinikum	UKR	UKR	UKR
Fachrichtung	Häma/Onko	Häma/Onko	Häma/Onko
Station	21 KMT	ambulant	ambulant
Probe	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl

### 3.12 VRE-Isolate aus den externen Krankenhäusern

Insgesamt 23 Isolate stammten aus den externen Krankenhäusern: Klinik AKLEPIOS Bad Abbach, Krankenhaus Barmherzige Brüder, Krankenhaus St. Josef und der Krankenhaus-Gesellschaft des Landkreis Schwandorf im Raum Regensburg. Abzüglich der Mehrfachisolate wurden 15 VREfm-Erstisolate registriert. Nur diese werden nachfolgend genauer dargestellt. Die Klinik AKLEPIOS Bad Abbach hat unter den Externen die meisten VREfm-Erstnachweise. Diese ließen sich, außer mit einer Ausnahme (ST 721), alle dem MLSTyp ST 117 zuordnen. Bei den anderen Krankenhäusern war eine größere ST-Heterogenität vorhanden. Im Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg wurde einmal der ST 117 und zweimal der ST 192 nachgewiesen. Das Krankenhaus St. Josef wies Isolate der ST 18, 192 und 203 auf. Die Krankenhaus-Gesellschaft des Landkreis Schwandorf hatte ein Isolat des ST 203 (Abbildung 37). Bei den Resistenzgenen und Virulenzfaktoren zeigte sich eine ähnliche Verteilung wie am UKR.

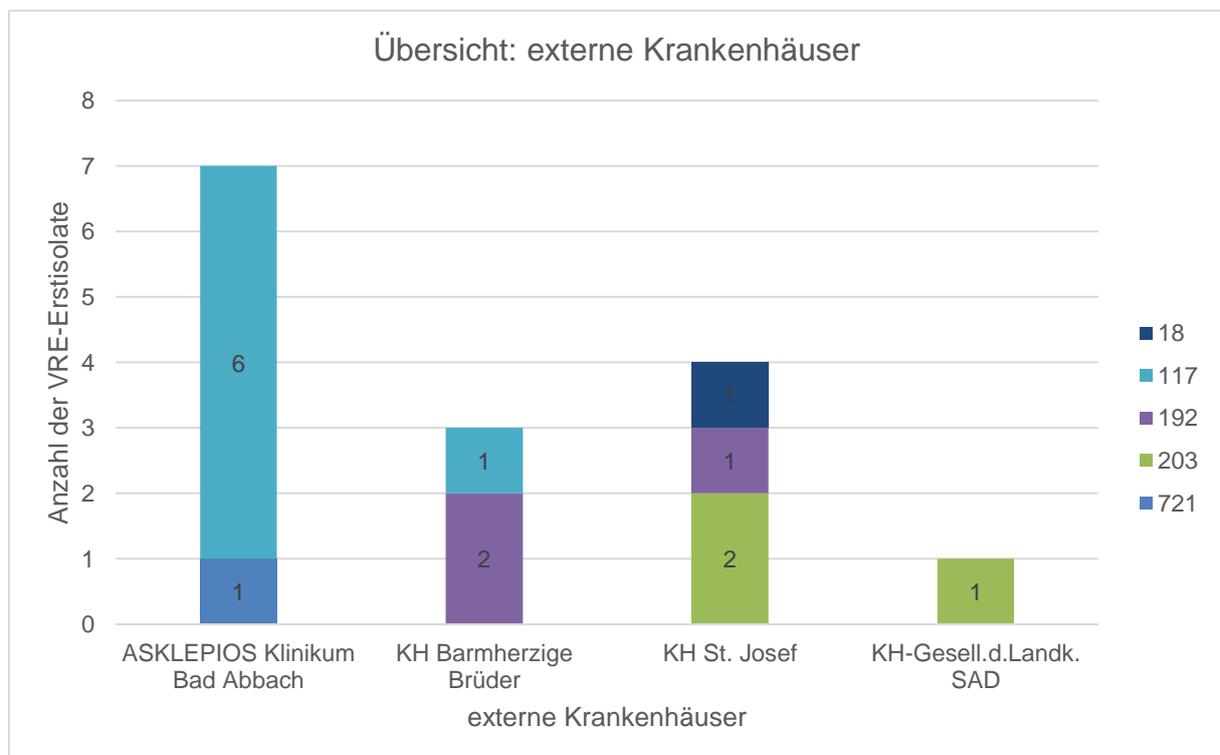


Abbildung 37: Verteilung der verschiedenen Sequenztypen aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 auf die externen Krankenhäuser ASKLEPIOS Klinikum Bad Abbach, KH Barmherzige Brüder, KH St. Josef und KH-Gesell. D. Landk. SAD; KH=Krankenhaus (gesamt: 15)

Wenn man die Mehrfachisolate in den externen Krankenhäusern betrachtet, ist ein Patient (Tabelle 25) hervorzuheben. Es zeigte sich dreimal ein ST-Wechsel, wobei der ST 721 nicht am UKR vorkam.

Tabelle 25: Mehrfachnachweise des externen Patienten mit Änderung der ST und *espA*

Patient 8 mit Mehrfachnachweis			
Datum	25.01.2012	25.01.2012	26.01.2012
ST	721	203	117
<i>vanA/B</i>	B	B	B
<i>esp</i>	+	+	+
<i>hyl</i>	+	+	+
<i>acm</i>	+	+	+
<i>espA</i>	4	4	5
Klinikum	ASKLEPIOS Klinikum Bad Abbach	ASKLEPIOS Klinikum Bad Abbach	ASKLEPIOS Klinikum Bad Abbach
Fachrichtung	Häma/Onko	Häma/Onko	Häma/Onko
Station	43	43	43
Probe	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl	Abstrich, Vaginal	Rektal- /Perianalabstrich/Stuhl

## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeiner Hintergrund

Enterokokken, welche beim Menschen und Tieren meist als Teil des normalen Darmmikrobioms vorkommen, sind auch in der Umwelt weit verbreitete Bakterien. Lange Zeit galten sie nur als bedingt pathogen, jedoch erhöhte sich die Zahl der durch sie verursachten Infektionen und somit ihre Bedeutung als nosokomialer Erreger. Die beiden klinisch relevanten Enterokokkenstämme *E. faecalis* und *E. faecium* weisen viele intrinsische und extrinsische Antibiotikaresistenzen auf, was die Therapie von Infektionen deutlich erschwert. Außerdem sind Enterokokken sehr umweltbeständig, diese besondere Eigenschaft macht ihre Prävention komplizierter. *E. faecalis* sind meist Ampicillin-sensibel und lassen sich gut therapieren. *E. faecium* hingegen sind großteils Ampicillin-resistent, sodass sie standardmäßig mit Vancomycin therapiert werden müssen. Aus diesem Grund ist besonders die Glykopeptid-Resistenz von *E. faecium* von Bedeutung (6).

In Deutschland und Europa breiten sich VRE zunehmend aus, wofür nahezu ausschließlich *E. faecium*-Isolate verantwortlich sind. Im Jahre 2012 wurde eine Häufigkeit von 16,2 % für die Vancomycin-Resistenz bei *E. faecium*-Blutkulturisolaten in Deutschland vom EARS-Net erfasst. Im Vergleich zu anderen europäischen Ländern, auch seinen Nachbarländern (alle unter 5 %, außer Polen: 8,3 % und Tschechien: 11,5 %), hatte Deutschland somit deutlich höhere VRE-Inzidenzen. Nur Irland, Portugal und Griechenland zeigten höhere Werte mit bis zu 44 % (Abbildung 38) (72, 73). Vergleicht man diese Werte mit der erfassten Resistenzwerten aus dem Jahr 2019 (Abbildung 39) ist ein Anstieg der VRE-Verbreitung mit 18,3 % der *E. faecium*-Isolate im Jahr 2019 in Europa zu erkennen (74).

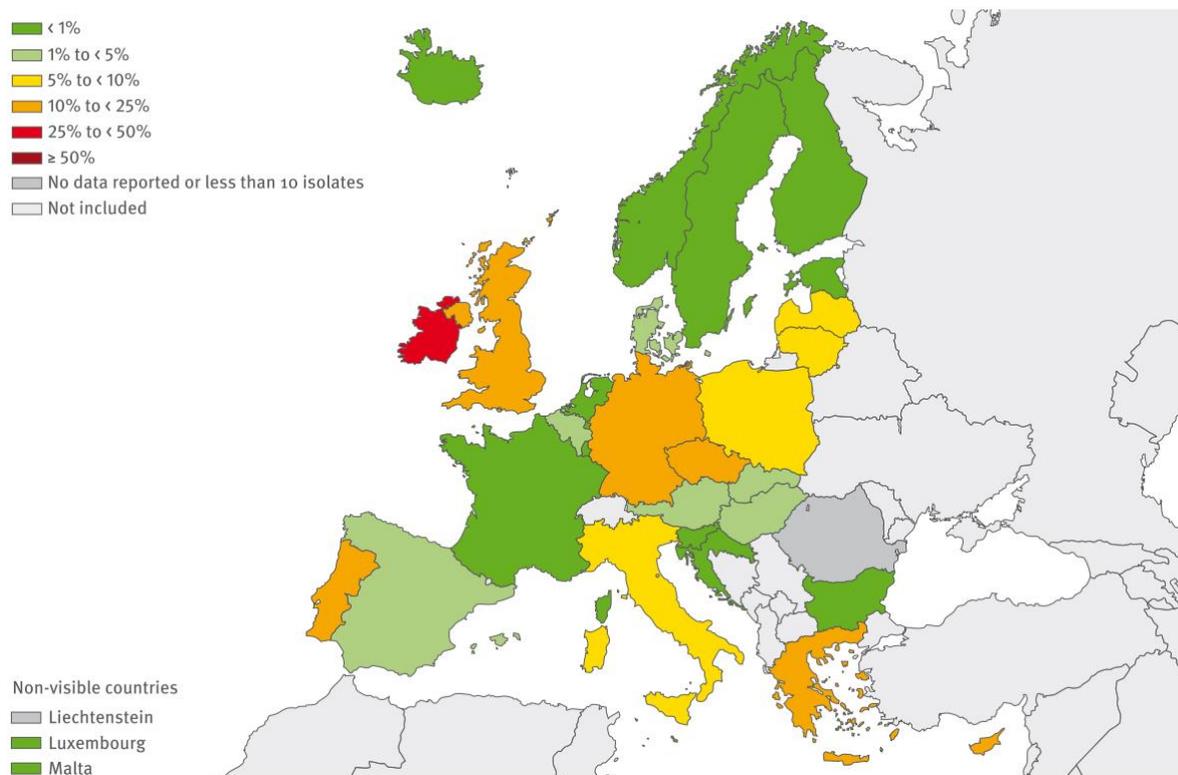


Abbildung 38: Prozentuale Darstellung der Vancomycin-resistenten invasiven *E. faecium*-Isolate im Jahr 2012 in Europa (72)

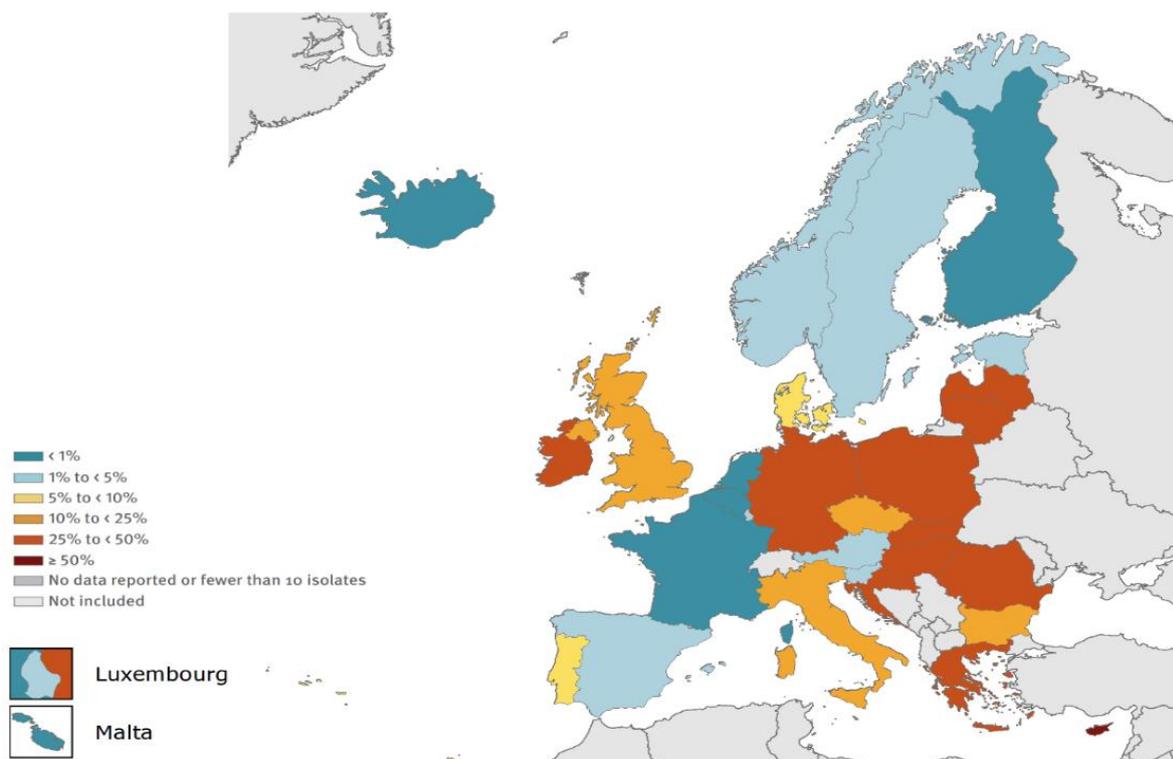


Abbildung 39: Prozentuale Darstellung der Vancomycin-resistenten invasiven *E. faecium*-Isolate im Jahr 2019 in Europa (74)

Für die Verbreitung von VRE sind vor allem Stämme des klonalen Komplexes 17 (CC17, s. 1.5 Entwicklung nosokomialer *E. faecium*-Linien: klonaler Komplex 17 (CC17) bzw. Klade A1) verantwortlich, welche besonders gut an des Krankenhausmilieu angepasst sind (63). Auch am UKR wurden zunehmend VRE-positive Patienten beobachtet. So entstand eine Studie, in welcher seit dem Jahr 2004 alle Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Erstisolate im Raum Regensburg asserviert und retrospektiv analysiert werden. Dies hilft das Risikoprofil des UKRs bezüglich VRE besser kennenzulernen und Präventionsmaßnahmen anzupassen. In dieser Arbeit wurde das erste Halbjahr des Jahres 2012 untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien werden im Folgenden die Daten des ersten Halbjahres mit denen des zweiten Halbjahres verglichen. Anschließend werden die Daten des gesamten Jahres 2012 für die weitere Diskussion genutzt.

## 4.2 Vergleich erstes Halbjahr 2012 mit Gesamtdaten aus 2012

Das zweite Halbjahr 2012 ist in einer weiteren Doktorarbeit (Reimann) beschrieben (75). Deren Ergebnisse und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden dazu herangezogen, das ganze Jahr 2012 abzubilden. Dies ermöglicht den Vergleich mit anderen Studien. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse des ersten Halbjahres mit den Gesamtdaten aus 2012 verglichen. Auch bei den Ergebnissen des gesamten Jahres beschränkt man sich auf die Isolate des UKRs ( $n = 238$ ), da nur dort alle VRE-Erstisolate in die Stammsammlung aufgenommen wurden.

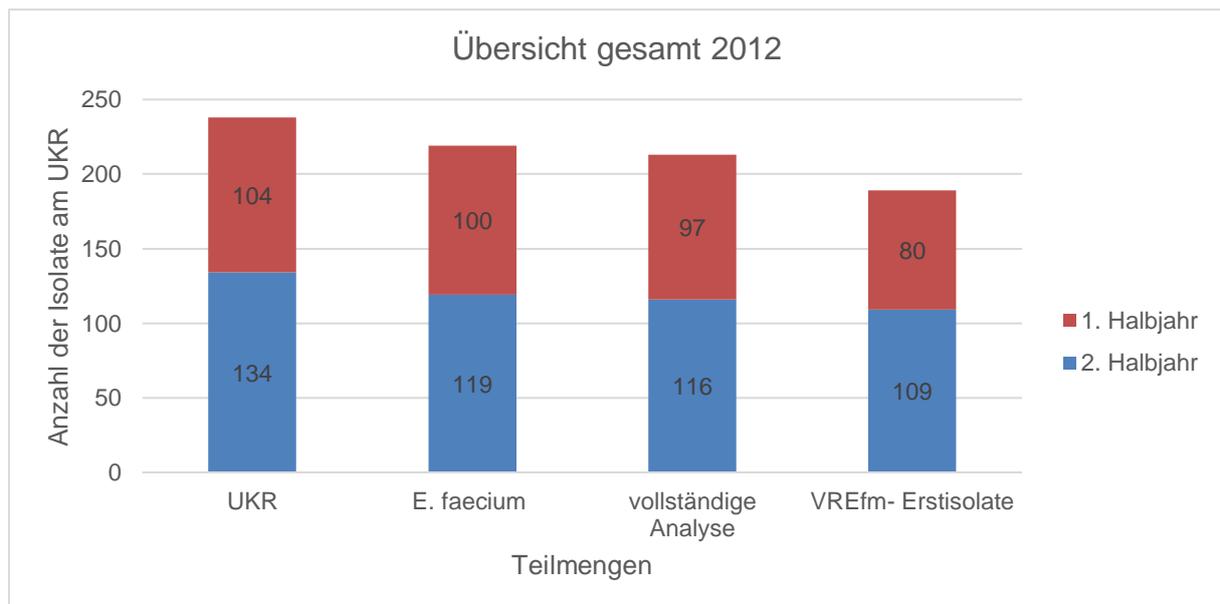


Abbildung 40: Übersicht über alle Isolate am UKR im gesamten Jahr 2012 ( $n = 238$ )

Im Jahr 2012 waren 219 der VRE-Isolate *E. faecium*. Von diesen war bei 213 Isolaten eine vollständige Analyse möglich. Bei 189 Isolaten handelte es sich um Erstnachweise, welche im Folgenden mit den Ergebnissen des ersten Halbjahres 2012 verglichen werden (Abbildung 40).

Nur bei der Bestimmung der Enterokokkenspezies wurden alle Isolate des UKRs ( $n = 238$ ) betrachtet. Für das gesamte Jahr ergab sich mit 94 % *E. faecium*-Isolaten eine ähnliche Verteilung wie in der ersten Jahreshälfte (97 %).

Im Jahresverlauf zeigten sich Häufungen im April und November. Im ersten Halbjahr ( $n = 80$ ) wurden deutlich weniger Isolate als im zweiten Halbjahr ( $n = 109$ ) registriert (Abbildung 41).

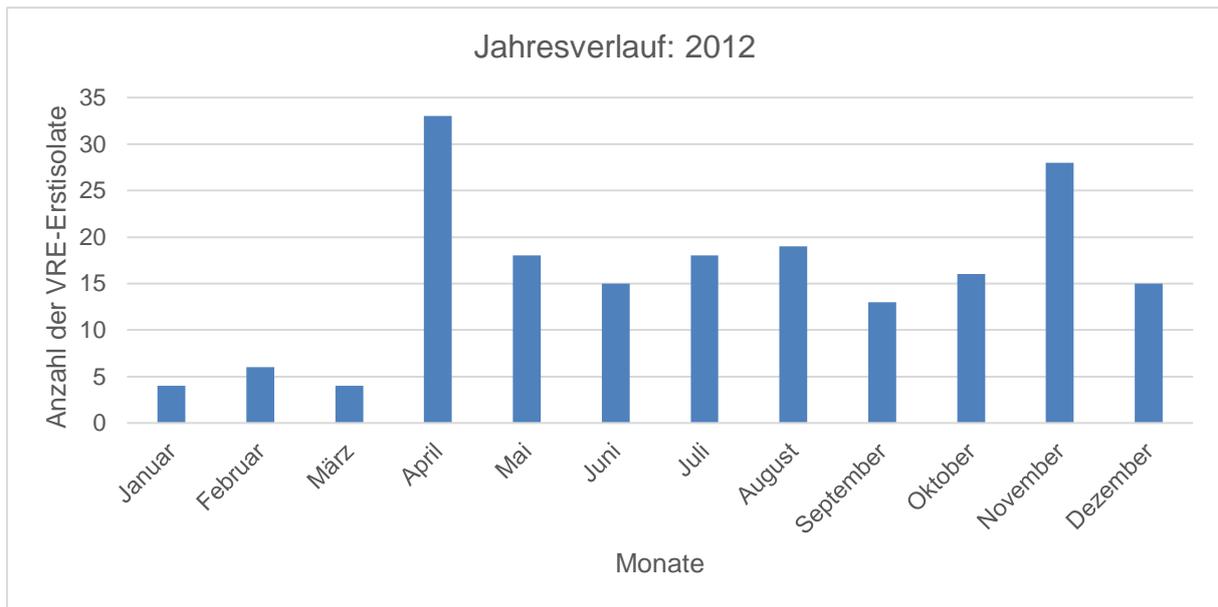


Abbildung 41: Jahresverlauf 2012 der VREfm-Erstisolate im Jahr 2012 am UKR (n = 189)

Im Jahr 2012 verteilten sich die Isolate auf 64 % männliche und 36 % weibliche Patienten. Ab einem Alter von 40 Jahren wurden deutlich mehr VREfm-Erstisolate nachgewiesen. Es waren 56 % der Patienten 60 Jahre alt oder älter (Abbildung 42). Die Alters- und Geschlechterverteilung sind im ersten Halbjahr ähnlich, jedoch wurden im gesamten Jahr 2012 deutlich mehr Patienten über 60 registriert.

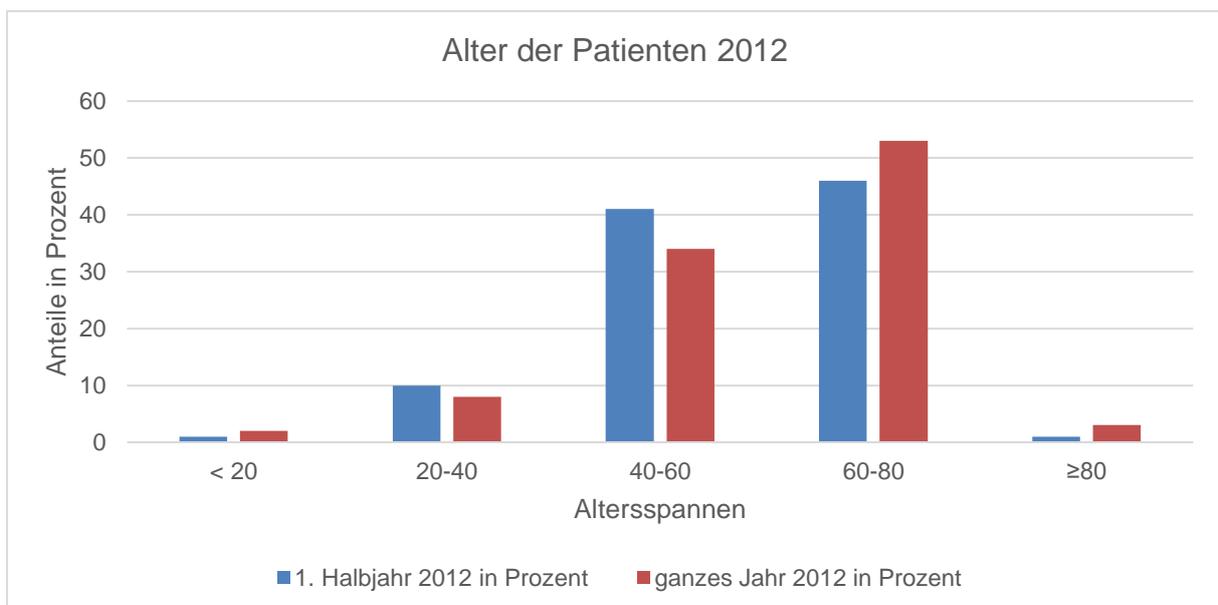


Abbildung 42: Darstellung der Prozentualen Altersverteilung aller VREfm-Erstisolate am UKR; erstes Halbjahr und ganzes Jahr 2012 im Vergleich

Die Verteilung der Resistenzgene *vanA/B* war über das ganze Jahr 2012 etwas ausgeglichener als in der ersten Hälfte des Jahres. Es waren 65 % aller VREfm-Erstisolate *vanB*-positiv und 35 % *vanA*-positiv. Im ersten Halbjahr waren 73 % des Isolate *vanB*-positiv. So blieb *vanB* das vorherrschende Resistenzgen über das ganze Jahr. Bei 10 Isolaten konnte ein *vanA*- und ein *vanB*-Gen nachgewiesen werde.

Auch die Häufigkeiten der Virulenzfaktoren im ganzen Jahr 2012 war vergleichbar mit der ersten Hälfte der Jahres 2012. Von allen Erstisolaten im ganzen Jahr 2012 waren 85 % *esp*-positiv, 85 % *hyl*-positiv und 100 % *acm*-positiv. Auch die Verteilung von *esp* auf *vanA/B* konnte sich bestätigen. Es waren 97 % der *vanB*-positiven Isolate und nur 63 % der *vanA*-positiven Isolate *esp*-positiv. Die Verteilung von *hyl* auf *vanA/B* war relativ ausgeglichen, wobei wie im ersten Halbjahr auch prozentual mehr *vanA*-positive Isolate *hyl*-positiv waren (96 %). Bei der Betrachtung der Wiederholungen der Untereinheit A wurde im Jahr 2012 die Untereinheit A nicht oder 1 - 6-mal pro Isolat nachgewiesen. Die Häufigsten Wiederholungen waren 2 und 5. Im Gegensatz dazu waren im ersten Halbjahr vor allem 4 und 5 vertreten.

Die Verteilung auf unterschiedliche Sequenztypen zeigte im gesamten Jahr 2012 eine größere Variabilität. Insgesamt wurden 10 verschieden ST, im Gegensatz zu 7 ST im ersten Halbjahr, nachgewiesen. Der ST 117 machte 39 % aller Isolate aus. Der ST 192 war für 31 % und ST 203 für 12 % der Isolate verantwortlich. Der ST 18 stellte 10 % aller Isolate dar. Diese Ergebnisse unterschieden sich von den Ergebnissen für das erste Halbjahr. Der ST 117 machte im ersten Halbjahr einen größeren Anteil der Isolate aus (45 %). Dafür war der ST 192 weniger häufig vertreten (23 %). Der Anteile des ST 203 (14 %) blieb genauso wie für den ST 18 (13 %) annähernd gleich (Abbildung 43 und 44).

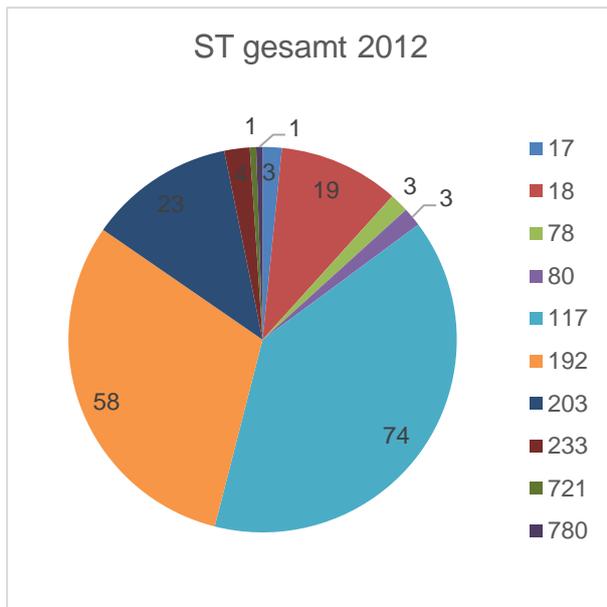


Abbildung 43: Übersicht aller ST der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189)

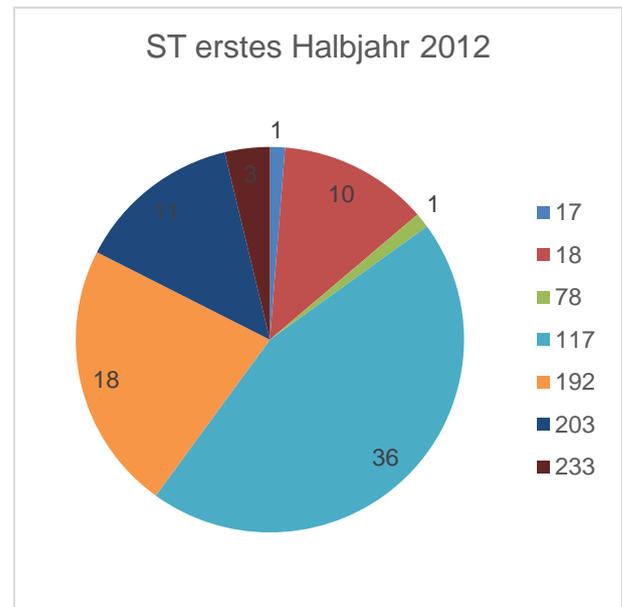


Abbildung 44: Übersicht aller ST der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich gut erklären, wenn man den Verlauf der zwei häufigsten ST 117 und 192 betrachtet. Die Nachweise für den ST 192 stiegen erst zum Ende des Jahres stark an (Abbildung 45).

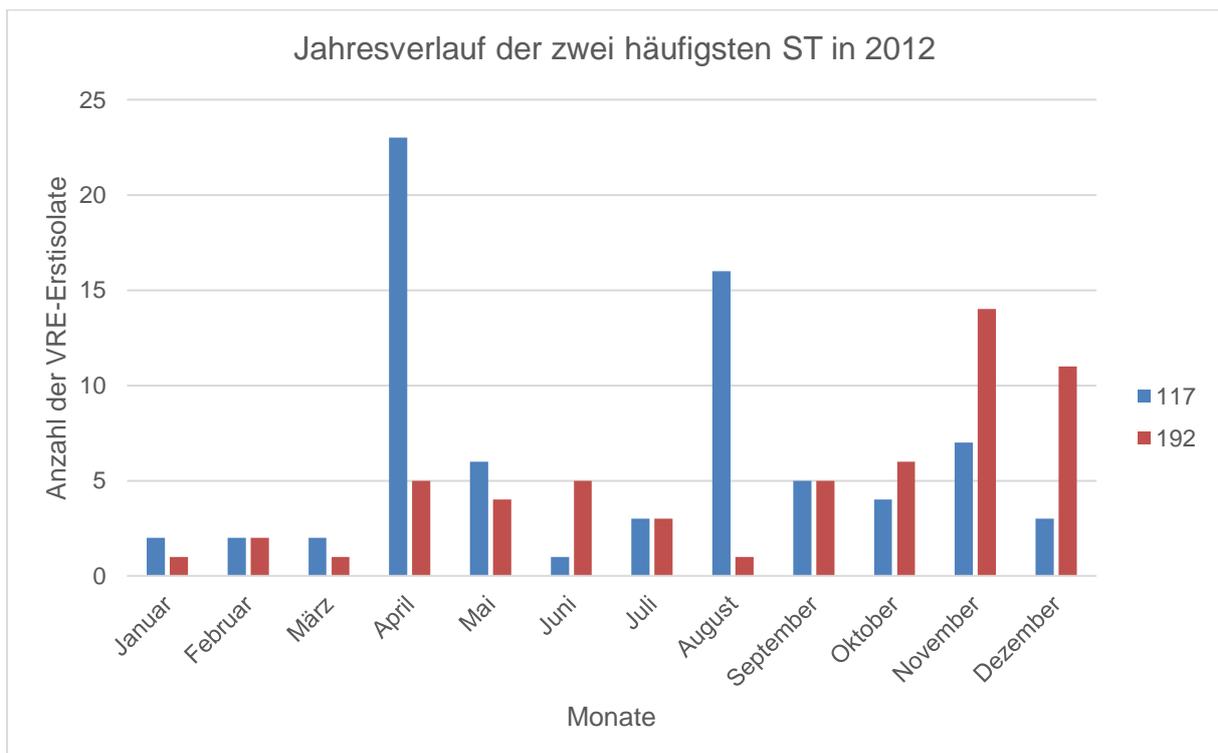


Abbildung 45: Darstellung der beiden häufigsten ST im Jahr 2012 am UKR im zeitlichen Verlauf (n = 132)

Die Verteilung der Proben im UKR im gesamten Jahr 2012 nach den klinischen Disziplinen des Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 (71) ist in Abbildung 46 dargestellt. Die meisten Isolate waren aus der Kategorie „Inneren Medizin“ (50 %). Die Isolate der „Hämatologie/Onkologie“ waren am zweithäufigsten (32 %) und die der „Chirurgie“ am dritthäufigsten (10 %) vertreten. Die übrigen Isolate waren auf die Kategorien „Nephrologie/Urologie“, „Neonatalogie/Pädiatrie“, „andere“ und „ambulant“ in absteigender Häufigkeit verteilt.

Dies ist ein Unterschied zur ersten Hälfte des Jahres. Dort wurden die meisten Isolate der „Hämatologie/Onkologie“ (49 %) zugeordnet. Am zweithäufigsten war die „Innere Medizin“ (39 %). Dies spricht für eine deutliche Zunahme der Isolate der Disziplin „Innere Medizin“ im zweiten Halbjahr 2012 (Abbildung 47).

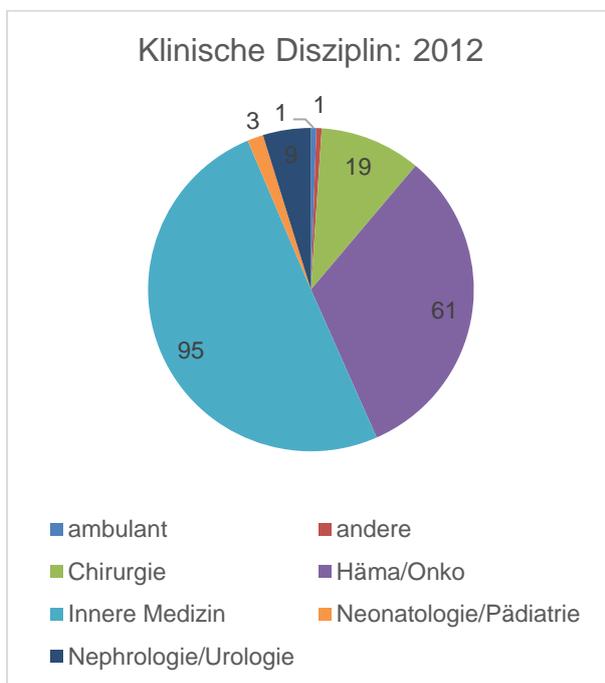


Abbildung 46: Klinische Disziplin der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189)

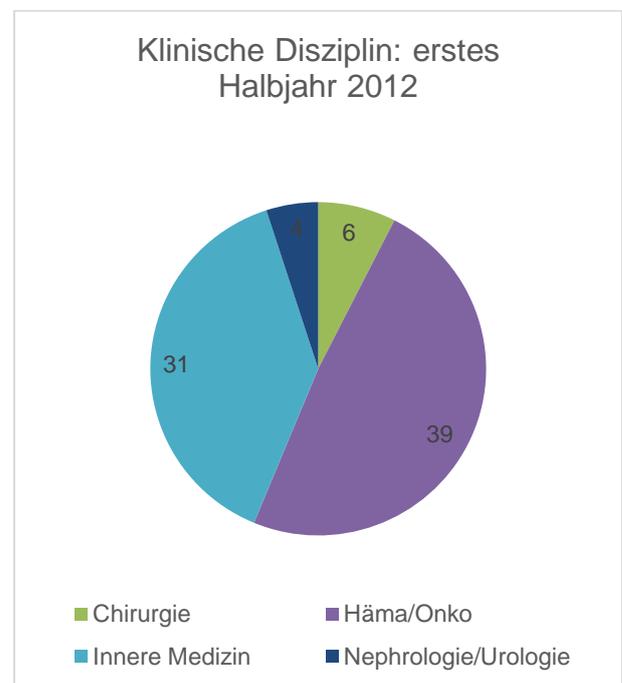


Abbildung 47: Klinische Disziplin der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)

Betrachtet man die Verteilung der VREfm-Erstisolate auf einzelne Stationen am UKR, sieht man deutliche Häufungen in den Stationen 20, 21 KMT, 92 und 93, wie auch im ersten Halbjahr. Im ersten Halbjahr hatte die Station 21 KMT die meisten Nachweise. Betrachtet man das ganze Jahr 2012, konnten jedoch auf der Station 92 die meisten Isolate registriert werden (Abbildung 48 und 49).

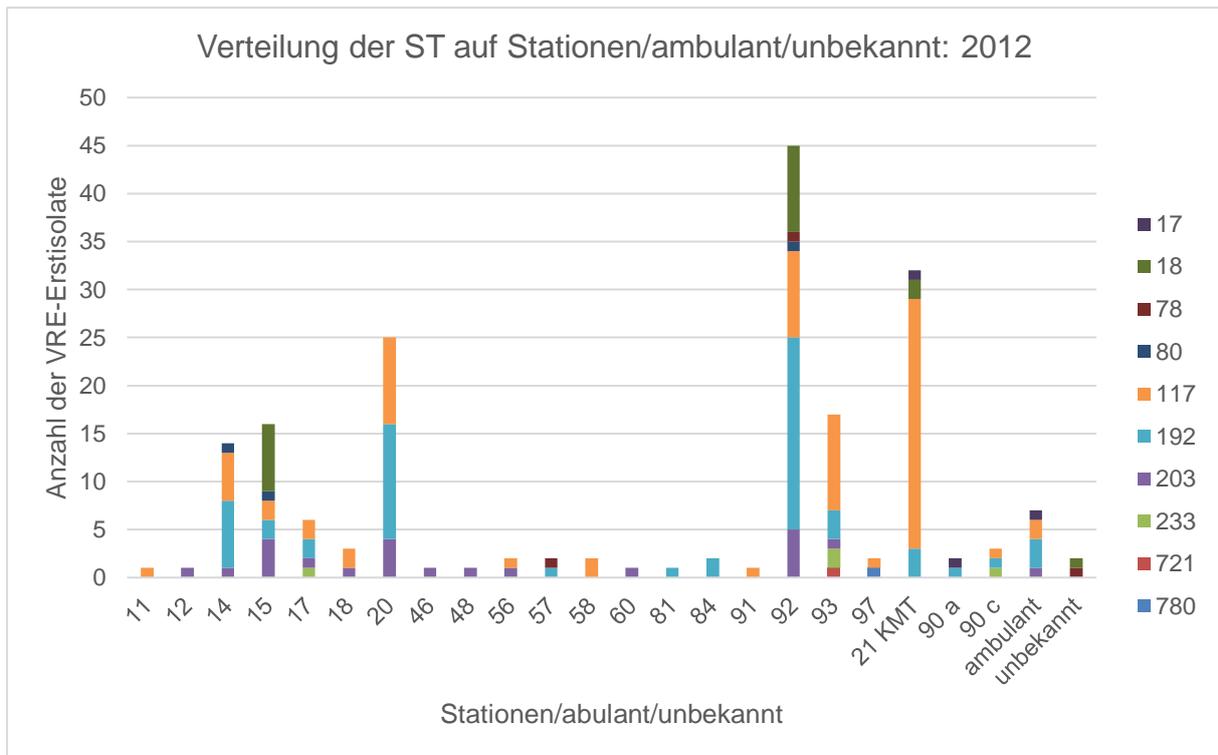


Abbildung 48: Verteilung der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189) auf Stationen, ambulant und unbekannt; mit Einbeziehung der ST

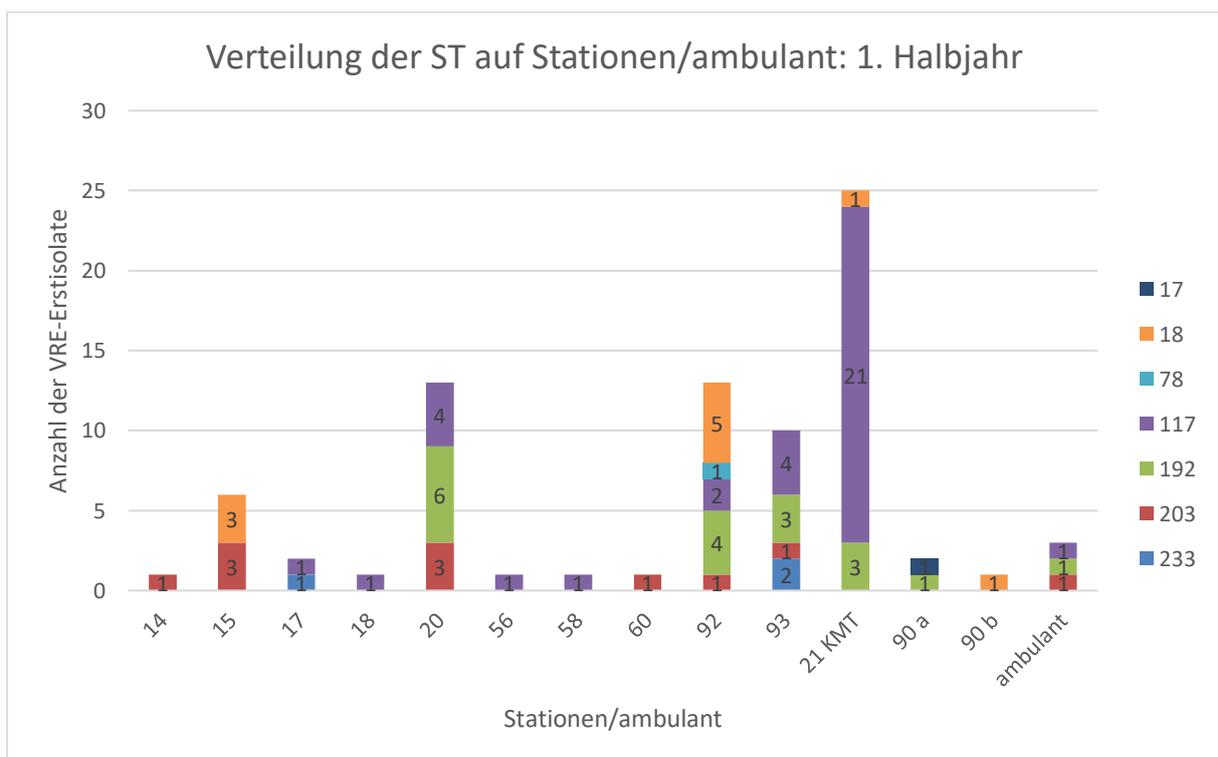


Abbildung 49: Verteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (gesamt: 80) auf Stationen und ambulant; mit Einbeziehung der ST

Das klinische Material der Proben wurde auch Kategorien des Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 (71) zugeordnet. Die Nachweise konnten größtenteils der Kategorie „Rektal-/Perianalabstrich/Stuhl“ (74 %) zugeordnet werden. 11 % der Isolate waren „Abstriche“. Die Herkunft der anderen Isolate ließen sich in die Kategorien „Bronchoalveoläre Lavage (BAL)/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich“, „Blutkultur“, „Drainage/Sekret“, „Katheterspitze“, „Punktat“, „Urin“ und „Wundabstrich“ unterteilen. Diese Verteilung ist ähnlich zu der ersten Jahreshälfte von 2012 (Abbildung 50 und 51).

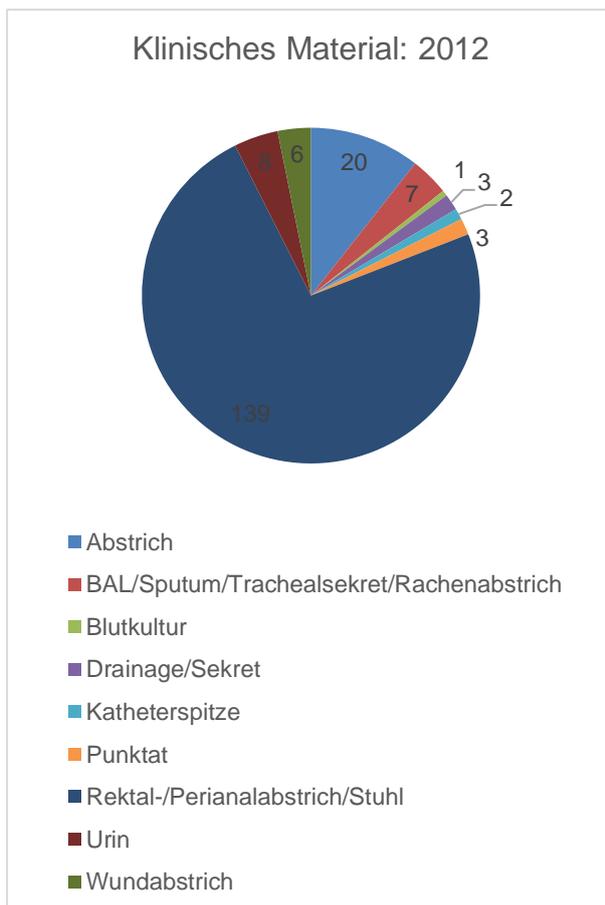


Abbildung 50: Klinisches Material der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189); BAL= Bronchoalveoläre Lavage

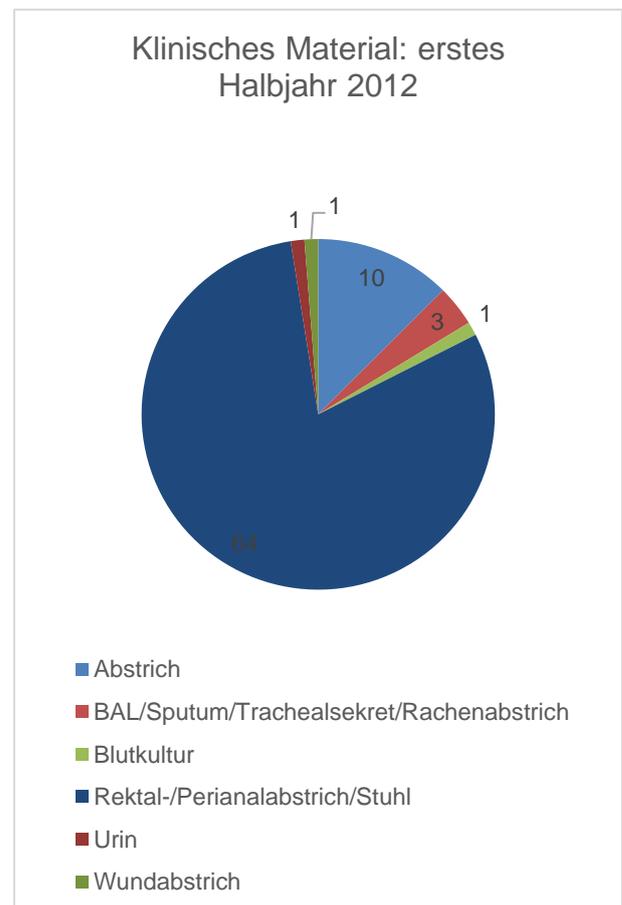


Abbildung 51: Klinisches Material der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80); BAL= Bronchoalveoläre Lavage

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse des gesamten Jahres 2012 diskutiert.

### 4.3 Entwicklung der VRE-Fälle

Betrachtet man die Entwicklung der VRE-Fälle am UKR vom Jahr 2004 bis zum Jahr 2017 sieht man einen 2-gipfligen Verlauf. Der erste Gipfel war im Jahr 2008 ( $n = 126$ ). Nach einem Rückgang im Jahr 2010, stieg die Anzahl der Fälle wieder an. So wurden bereits im Jahr 2012 deutlich mehr Fälle, als beim ersten Gipfel registriert. Dieser Anstieg hatte seinen Höhepunkt im Jahr 2013 ( $n = 557$ ). Seitdem blieben die Zahlen anhaltend hoch. Auffällig ist, dass seit 2013 die Anzahl der mitgebrachten VRE-Fälle deutlich höher ist als die Anzahl der nosokomialen-Fälle (Abbildung 52).

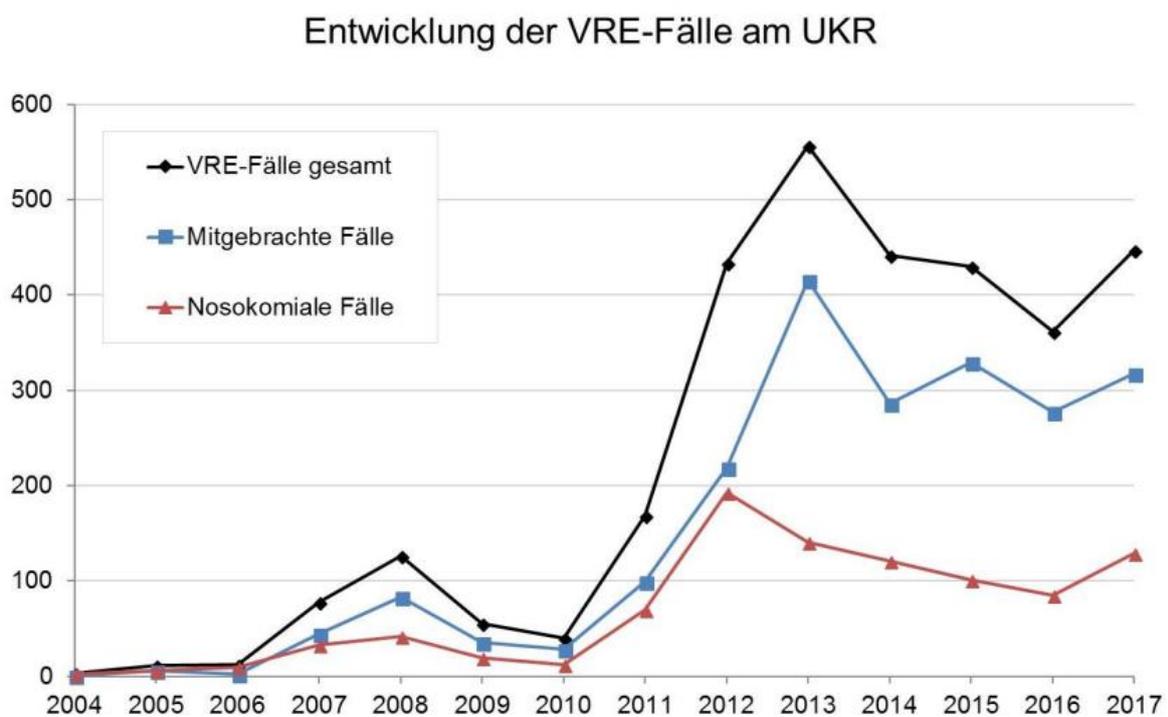


Abbildung 52: Entwicklung der VRE-Fälle am UKR vom Jahr 2004 bis 2017; unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie des UKR

Der Verlauf der VRE-Fälle am UKR ähnelt jenen in ganz Deutschland. Die Analysen am Nationale Referenzzentrum (NRZ) teilen die letzten drei Jahrzehnte mit VRE in Deutschland in drei Abschnitte auf. Im ersten Jahrzehnt 1990-2000, in welchem die ersten VRE-Fälle in Deutschland bekannt wurden, wurden am UKR noch keine VRE-Fälle registriert. Im zweiten Jahrzehnt, welches sich eher durch regionale Ausbrüche auszeichnete, kam es auch am UKR zu den ersten VRE-Fällen ab dem Jahr 2004. Seit dem letzten Jahrzehnt ab 2010 kann bis heute

deutschlandweit, wie auch am UKR, ein starker Anstieg von VRE-Isolaten beobachtet werden (58). So zeigen die Daten der Routine-Diagnostik-Isolate der *Antibiotic Resistance Surveillance* (ARS) einen Anstieg des VREfm-Anteils von 11,2 % (2014) auf 26,1 % (2017) (64). Auch am NRZ gehen seit 2015 deutlich mehr VRE-Proben ein und es besteht ein größerer Bedarf an Typisierungen (60 % der Einsendungen am NRZ). Die Typisierungen der Isolate sind mit einem Verdacht auf Ausbrüche nahezu gleichzusetzen (11).

Der Anstieg von VRE ist multifaktoriell. Ein wichtiger Faktor ist der Selektionsdruck im Krankenhaus. Durch die Nutzung von Breitbandantibiotika mit „Enterokokkenlücke“ kommt es in der intestinalen Bakterienpopulationen zu einer Verschiebung zugunsten der Enterokokken. Ein weiterer Faktor ist der zunehmende Anteil an älteren und multimorbiden Patienten. Auch die Zahl der immunsuprimierten Patienten steigt. Hinzu kommt die Zunahme an invasiven Behandlungstechniken. All dies erhöht den Anteil der intensivmedizinisch betreuten Patienten. So entsteht eine vergrößerte Risikopopulation für Enterokokken-/VRE-Besiedlungen, welche dann zu Infektionen führen können. Ein weiterer Grund für die Zunahme von VRE-Fällen ist die Verbreitung des CC17, der oft für Ausbrüche verantwortlich ist (71, 76).

Jedoch kann für den beobachteten Anstieg an VRE-Fällen auch ein vermehrtes Screening, wie es bei einem Ausbruchsgeschehen oder hohen VRE-Fallzahlen der Fall ist, verantwortlich sein.

#### 4.4 Enterokokkenspezies

Die Proben der Stammsammlung aus dem Jahre 2012 wurden zuerst auf ihre Enterokokken-Spezies untersucht. Es erwiesen sich 94 % als *E. faecium*-Isolate. Nur die *E. faecium*-Isolate wurden genauer auf Resistenz, Virulenzfaktoren, sowie ihren Sequenztyp (ST) untersucht. Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit den Einsendungen an das NRZ überein. Dort konnten in den Jahren 2011/2012 93 % der Isolate *E. faecium* zugeordnet werden. Eine Erklärung für mehr *E. faecium*-Isolate als andere Enterokokken-Spezies, auch *E. faecalis*, ist, dass *vanA*-Plasmide einen sehr engen Wirtsbereich haben, der sich meist auf *E. faecium* beschränkt. Außerdem geben *E. faecalis* effizienter Plasmide, welche die Resistenzgene enthalten, an *E. faecium* weiter als umgekehrt (71).

Als Zweithäufigste Spezies wurde im Jahr 2012 *E. gallinarum* (sieben Isolate) am UKR registriert. *E. gallinarum*- und *E. casseliflavus*-Isolate besitzen eine *vanC*-Resistenz, welche nicht übertragbar ist und eine geringere Mortalität wie *E. faecium*/*E. faecalis* mit *vanA/B*-Resistenzen aufweisen. Somit sollte man bei einer Vancomycin-Resistenz stets die Bakterienspezies bestimmen, denn *vanC*-positive Patienten müssen nicht isoliert werden (6, 77–79). Selten werden *E. gallinarum*-/ *E. casseliflavus*-Isolate mit einer *vanC* und einer *vanA/B*-Resistenz registriert. Meistens handelt es sich hierbei jedoch um ein *E. faecium*-Isolat, welches falsch diagnostiziert wurde (6).

Die Laboanalysen aus den Jahren 2018/19, in welchen großteils Screeningabstriche untersucht wurden, zeigen, dass das Boullionverfahren mit Äskulin und Vancomycin (s. 2.21 VRE-Nachweis durch Screeningabstrich) ein sehr verlässliches Screeningverfahren ist. In diesem wurde die Patientenprobe, keine Einzelkolonie, nach Dunkelfärbung und somit positivem Ergebnis auf ein Bakterienwachstum weiter untersucht. Dabei wurden die Proben unabhängig voneinander auf Resistenzgen und Spezies geprüft. Das trotzdem 94 % der Isolate die Spezies *E. faecium* und außer einer Probe alle *E. faecium*-Isolate eine Vancomycin-Resistenz aufwiesen zeigt somit deutlich die Aussagekraft dieses Screeningverfahrens auf VRE.

## 4.5 Alter und Geschlecht

Die untersuchten Patienten waren zu 64 % männlich. Ab einem Alter von 40 Jahren wurden deutlich mehr VRE-Isolate erfasst. 56 % der Patienten waren 60 Jahre oder älter. Man beobachtet, dass eher ältere Menschen von VRE betroffen sind. Dies ist nicht verwunderlich, da sie bevorzugt die Risikopopulation für eine VRE-Besiedlung/-Infektion darstellen. Patienten mit schwerer Komorbidität, Immunsuppression, hämatologischen Krankheiten, vorrausgegangener Antibiotikatherapie sowie längerer Hospitalisierung zählen ebenso wie Menschen mit schweren Grunderkrankungen, wie Niereninsuffizienz, Karzinomen oder Transplantationen zur Risikopopulation. Diese Risikofaktoren nehmen auch mit steigendem Alter der Patienten zu, was die Gefahr für eine VRE-Besiedlung und/oder -Infektion erhöht (3). Auch am ARS beobachtete man bei Patienten zwischen 40 und 59 Jahren mehr VRE-positive Isolate als bei den jüngeren Patienten (64).

## 4.6 Resistenzgene

Die Proben aus dem Jahr 2012 wurden auf ihre Glykopeptid-Resistenzgene getestet. Im UKR war *vanB* mit 65 % die vorherrschende Resistenz. 35 % der Isolate waren *vanA*-positiv. Zehn Isolate waren für *vanA*- und *vanB*-positiv, diese wurden jedoch in den folgenden Ergebnissen und der oben dargestellten Resistenzgenverteilung immer einem Resistenzgen *vanA* oder *vanB* zugeteilt (s. 2.3.5 Gelelektrophorese). Im Gegensatz dazu war im Jahr 2012 in ganz Deutschland *vanA* die vorherrschende Resistenz mit 49,9 %. *VanB* zeigte eine Anwesenheit von 40,0 %. Auch in ganz Deutschland waren 0,4 % der Isolate *vanA*- und *vanB*-positiv. Nachdem früher in Deutschland fast kein *vanB* vertreten war, wurden seit 2008 immer mehr *vanB*-positive Isolate registriert (71). Seit dem Jahr 2017 wurden nun auch in gesamt Deutschland erstmals deutlich mehr *vanB*- als *vanA*-positive Isolate registriert (11). Seitdem vermehrt *vanB*-positive Isolate identifiziert werden, zeigen sich auch mehr Häufungen und Ausbrüche von Enterokokken. Es ist möglich, dass dies und die steigende Prävalenz von *vanB*-Isolaten durch bestimmte Sequenztypen verursacht ist (71).

Ein Problem in der Diagnostik von *vanB* ist die im Vergleich zu *vanA* sehr niedrige Expression der Glykopeptid-Resistenz und somit niedrige Vancomycin-MHK-Werte. Am 01.01.2012 wurden jedoch neue niedrigere MHK-Werte (resistent > 4 mg/l) für Vancomycin vom *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) eingeführt, was zu einer besseren Erfassung der *vanB*-Resistenz führte. Dies kann deutschlandweit für steigende *vanB*-Zahlen verantwortlich sein. Dennoch bleiben vermutlich weiterhin viele *vanB*-positive Isolate unerkant, da diese immer noch unter dem festgesetzten MHK-Werten sind. Diese Isolate werden nicht erfasst und können sich weiter ausbreiten, was ein weiterer Grund für steigende Zahlen von *vanB*-positiven Isolaten sein kann (6, 80).

## 4.7 Virulenzfaktoren

Die VREfm-Erstisolate im Jahr 2012 wurden auch auf zusätzliche erworbene Gene, welche Virulenzfaktoren codieren, untersucht. Diese sind besonders oft auf nosokomialen Stämmen vorhanden. Sie unterstützen die Enterokokken, zum Beispiel bei der Adhäsion an Oberflächen oder die Bildung von Biofilmen. Der Faktor *hyl* ist selbst kein Virulenzfaktor, weist aber auf vorhandene Virulenzfaktoren hin (s. 1.4 Virulenzfaktoren). Diese zuvor erwähnten

nosokomialen Stämme sind meistens Isolate des CC17 (bzw. Klade A1), welcher durch eine Ampicillin- und eine Chinolon-Resistenz sowie die Anwesenheit von Virulenzfaktoren charakterisiert wird (s. 1.5 Entwicklung nosokomialer *E. faecium*-Linien: klonaler Komplex 17 (CC17) bzw. Klade A1). Am UKR wies der Großteil der VREfm-Erstisolate Virulenzfaktoren auf. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der MLSTypisierung, welche alle VREfm-Erstisolaten dem CC17 zuordnet.

Am UKR waren 85 % der VRE-Isolate *esp*-positiv. Auch bei Rice et al. konnte man bei der Untersuchung von *E. faecium*-Isolaten aus der USA, Europa und Saudi-Arabien, einen Zusammenhang zwischen der Glykopeptid-Resistenz und *esp* sehen. So waren 81 % der *esp*-positiven Isolate Vancomycin-resistent (48). Bei den Analysen von Vankerckhoven et al. von Isolaten aus Europa waren 65 % der *E. faecium*-Isolate *esp*-positiv. Sie teilen sich in 77 % VRE- und 53 % VSE (Vancomycin-sensible Enterokokken) -*esp*-positiv Isolate auf. Bei den VRE-Isolaten mit Ampicillin-Resistenz, was auch ein Charakteristikum für den CC17 ist, waren 85 % der Isolate *esp*-positiv (68).

Für das Gen *hyl*, welches die Anwesenheit von Virulenzfaktoren anzeigt, waren 85 % der Isolate am UKR positiv. Die Analysen von Rice et al zeigten, dass 83 % der *hyl*-Isolate Vancomycin-positiv waren (48). Bei Vankerckhoven et al. waren 17 % der Isolate *hyl*-positiv. Darunter waren sowohl VRE und VSE. Es zeigte sich auch bei *hyl*, dass dies eindeutig häufiger unter Ampicillin-resistenten-Isolaten war. Außerdem war ein Großteil der Isolate *esp*- und *hyl*-positiv (76 %) (68). Auch im UKR waren 71 % der Isolate *esp*- und *hyl*-positiv.

Betrachtet man die Isolate am UKR genauer, waren unter den *vanB*-positiven Isolaten 97 % *esp*-positiv. Bei den *vanA*-positiven Isolaten war der Anteil mit 63 % *esp*-positiven Isolaten geringer. Dies konnte man auch in den Jahren 2006/2007 am RKI sehen. Dort waren 73 % der *vanB*-positiven Isolate und nur 17 % der *vanA*-positiven Isolate *esp*- und *hyl*-positiv. Schon damals war ein Anstieg der *vanB*-Isolaten zu beobachten, was einen über die Rolle von *esp* und *hyl* nachdenken ließ. Am RKI wurden auch *esp* und *hyl*-positive VSE-Isolate registriert. Da Enterokokken des CC17 nicht Vancomycin-resistent sein müssen, sollte man auch diese Isolate beobachten. Denn auch VSE können die Resistenzgene erwerben und dann als VRE auftreten (76).

Die VRE-Isolate wurden auch auf die Wiederholungen der Untereinheit A des Gens *esp* untersucht. Die unterschiedlichen Wiederholungen können genutzt werden, um Verwandtschaftsbeziehungen in einem Ausbruch darzustellen (Abschnitt 1.4.1 *Enterococcal*

*surface protein (esp)*). Beim *esp*-Nachweis waren 2 Proben *esp*-negativ, welche beim *espA*-Nachweis ein positives Ergebnis zeigten. Dies lässt sich durch einen nicht mehr exakt passenden Primer für *esp* erklären. Der Genabschnitt *espA* wurde entweder nicht und in den Varianten 1-, 2-, 3-, 4-, 5- oder 6-mal nachgewiesen. Die häufigsten Varianten von *espA* waren 2- und 5-maliges Auftreten der Untereinheit A. Bei der Analyse des *esp*-Gens fanden Eaton et al. die Wiederholungen der Untereinheit A von 2 bis 6 mit der Wiederholung 5 als Häufigste (39). Wenn man *espA* beim registrierten Ausbruch auf der Station 21 KMT im April (Abschnitt 4.8.2 Ausbruchsgeschehen auf Stationen des UKR) betrachtet, wurden dort nur Isolate mit 4- oder 5-Wiederholungen oder kein Nachweis der Untereinheit A registriert.

Alle VRE-Isolate am UKR wurden positiv auf *acm* getestet, was die weite Verbreitung dieses Virulenzfaktors zeigt. Ähnlich waren die Ergebnisse von Nallapareddy et al. mit 99 % *acm*-positiven *E. faecium*-Isolaten. Sie zeigten außerdem den Zusammenhang von *acm* mit der Adhäsion an Kollagen I von *E. faecium*-Isolaten. Der Großteil der Isolate mit einer Adhäsion an Kollagen konnte, wie in den Untersuchungen am UKR, dem CC17 zugeschrieben werden. All dies spiegelt den Beitrag von *acm* zur Pathogenität von CC17 wider (53). Insgesamt zeigte sich somit am UKR eine hohe Prävalenz der Virulenzfaktoren im CC17, was auf die Pathogenität dieses Komplexes hinweist.

Die Untersuchung auf *hyl* und *esp* wurde lange zum Nachweis von hospital-assoziierten VRE-Stämmen genutzt. Die Arbeit von Werner et al. zeigte jedoch, dass der Nachweis eines IS16-Elements, welches mit Resistenzen oder genomischen Inseln verknüpft ist, sich besser zum Nachweis von Hospital-assoziierten Isolaten eignet (81). Dennoch können über den Nachweis von Virulenzfaktoren gegebenenfalls verwandte Isolate erkannt werden. Man sollte jedoch beachten, dass sich Virulenzfaktoren, genauso wie die Resistenzgene, auch horizontal übertragen lassen.

Meistens werden die Virulenzfaktoren erst bei VRE-Isolaten entdeckt. Diese können aber auch bei VSE-Isolaten, welche auch ein Teil des CC17 sind, vorhanden sein. Erst durch zusätzliche Untersuchungen von VSE-Isolaten würde man die eigentliche Verbreitung von CC17 erfahren. Dies wäre auch für die Prävention der VRE-Verbreitung von Bedeutung, denn aus VSE können sich VRE entwickeln. So lang dies jedoch nicht genauer untersucht ist, zeigt die Verbreitung von Virulenzfaktoren unter VRE- und VSE-Stämmen die Notwendigkeit von Basishygiene als Präventionsmaßnahme, auch wenn kein VRE-Nachweis bei einem Patienten vorliegt (82).

## 4.8 Epidemiologische Verteilung von MLST

### 4.8.1 MLST-Sequenztypen

Die Verbreitung von *E. faecium* im Raum Regensburg war eine Verbreitung des CC17 mit polyklonaler und horizontaler Übertragung. Insgesamt wurden 10, mit Isolaten der externen Krankenhäuser und Mehrfachisolaten 14, verschiedene ST nachgewiesen. Alle Isolate waren Teil des CC17. Die am meisten vertretenen ST waren ST 117 (39 %) und ST 192 (31 %). Somit waren nur diese für 70 % aller Isolate verantwortlich.

Da diese Arbeit ein Teil einer großen Studie seit 2004 ist, lassen sich die Ergebnisse aus dem Jahr 2012 mit denen früherer Jahre am UKR (2004 - 2011) vergleichen. Der im Jahr 2012 meist vertretene ST 117 war schon im Jahr 2011 am häufigsten zu finden. Im Jahr 2008 trat er das erste Mal auf und war bis zum Jahr 2010 nur gering vertreten. Der ST 192 dagegen war in den Jahren 2007/2008 weit verbreitet. Er erlebte dann einen Rückgang, bis es im Jahr 2012 wieder zu einem starken Anstieg kam. Der dritthäufigste ST 203 (12 %) trat seit dem Jahr 2006 auf und wurde bereits im Jahr 2011 zahlreich nachgewiesen. Der vierthäufigste ST 18 (10 %) trat im Jahr 2011 das erste Mal auf. Auffällig ist auch, dass der ST17, welcher im Jahr 2008 sehr verbreitet war, 2012 nur noch eine geringe Rolle spielte (2 %). Der ST 80 wurde im Jahr 2012 das erste Mal am UKR registriert. (Abbildung 53).

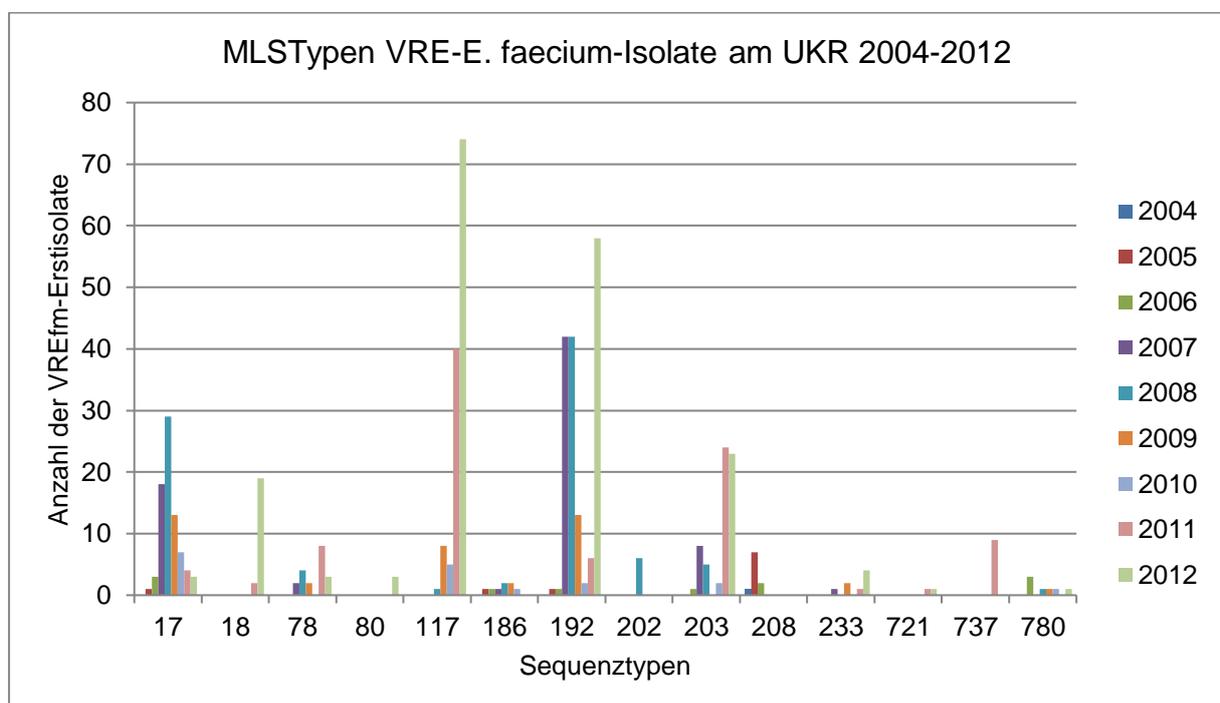


Abbildung 53: Darstellung der MLSTypen der VREfm-Erstisolate am UKR 2004-2012

Vergleicht man die Verteilung auf ST mit den Ergebnissen der MLSTypisierung von Blutkulturisolaten am NRZ in den Jahren 2011-2012 ergeben sich ähnliche Ergebnisse. Auch dort waren die ST 117 (26 %), ST 192 (17 %) und ST 203 (10 %) die häufigsten ST. Der ST117 war deutschlandweit bereits 1996-2000 vorhanden. Damals war er *esp*-positiv, *hyl*-negativ und *vanA*. 2011-2012 zeigte er verschiedene Genotypen. Im Raum Regensburg war der ST 117 *vanA*- und nur etwas seltener *vanB*-positiv, zu 95 % *esp*-positiv und zu 93 % *hyl*-positiv. Somit unterscheidet sich der ST 117 von 2012 von jenem in den Jahren vor 2000. ST 192 konnte bisher fast nur als *vanB*-positives Isolat nachgewiesen werden. Dies bestätigten auch die Isolate am UKR, alle waren *vanB*-positiv. Der ST 203 war 2004/2005 als *vanA*-Typ in Südwestdeutschland vertreten. Im Raum Regensburg war er jedoch nur *vanB*-positiv (71).

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der ST, welche im Jahre 2012 am UKR registriert wurden, in ganz Deutschland in den folgenden Jahren, sieht man, dass sich nicht alle langfristig durchgesetzt haben. Dies wurde auch bei früher nachgewiesenen ST beobachtet. MLST-Untersuchungen von Blutstrom-Isolaten der letzten 10 Jahre am NRZ zeigen, dass der 2012 häufigste Sequenztyp ST 117 (am UKR und am NRZ) weiter anstieg. Die zweit- und dritthäufigsten ST (ST 192 und ST 203) spielen 2019 nahezu keine Rolle mehr. Im Gegensatz dazu ist jedoch der am UKR im Jahr 2012 das erste Mal nachgewiesene ST 80 im Jahr 2019 der zweithäufigste ST (Abbildung 54). Eine Analyse von 169 VREfm-Blutstrom-Isolaten im Jahr 2019 am NRZ zeigte den ST 117 mit 44 % und den ST 80 mit 8 % an (58).

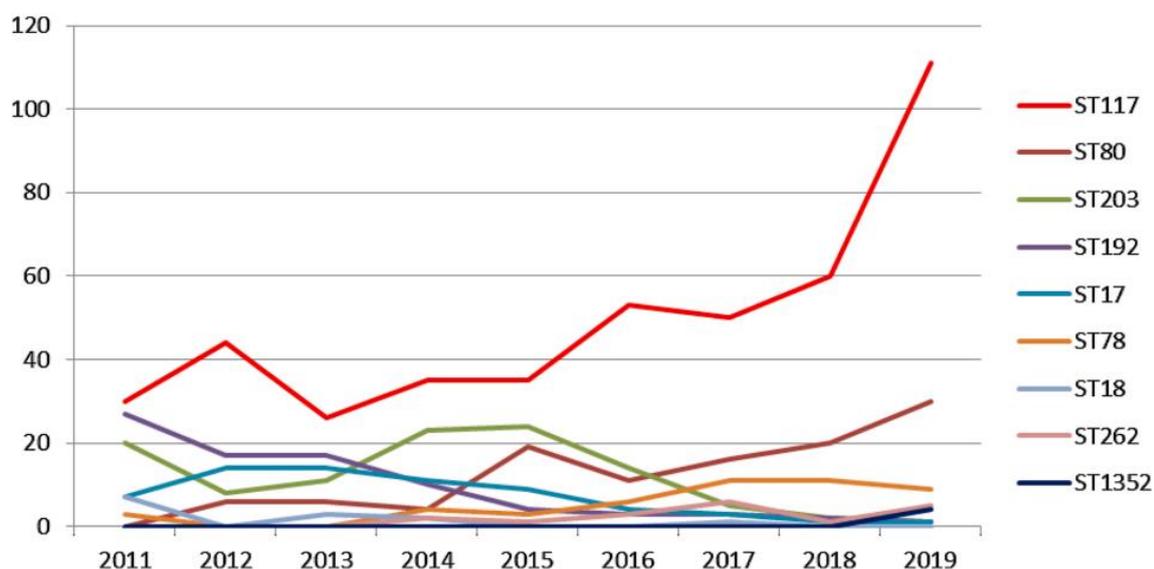


Abbildung 54: Häufigste MLSTypen der invasiven VREfm-Isolate zwischen 2011 und 2019 (n = 757) am NRZ, x-Achse: Jahreszahl, y-Achse: Anzahl der Isolate (58)

Zusätzlich zu den Isolaten des UKRs wurden auch Isolate aus externen Krankenhäusern im Raum Regensburg archiviert. Dabei ließen sich gewisse Unterschiede zwischen den Einrichtungen feststellen. Drei ST kamen nur in externen Krankenhäusern (ST 323, 926 und 992) und fünf nur im UKR (ST 17, 78, 80, 233 und 780) vor. ST 117 war am UKR der meistvertretere ST mit 39 %, in den externen Krankenhäusern sank seine Bedeutung auf 29 % ab. Im Klinikum AKLEPIOS Bad Abbach kamen fast nur Isolate des ST 117 vor. In den anderen externen Krankenhäusern war dieser jedoch selten vertreten. Das Krankenhaus Asklepios arbeitet eng mit dem UKR zusammen, wodurch sich eine ähnliche Verteilung leicht erklären lässt. Bei den übrigen ST handelte es sich in den externen Krankenhäusern eher um vereinzelte Nachweise.

Obwohl es das Ziel dieser Stammsammlung war, die Erstisolate aller VRE-positiven Patienten am UKR zu sammeln, gab es auch Mehrfachisolate. Betrachtet man diese, zeigten sich unter den Patienten sehr unterschiedliche Entwicklungen. Manche Patienten wiesen über Monate dieselben ST, Resistenzgene und Virulenzfaktoren auf. Bei anderen blieb der ST konstant, aber einzelne Virulenzfaktoren änderten sich. In einigen Fällen zeigte sich ein Wechsel des ST. Manchmal ist es leicht zu erklären, da die Isolate von unterschiedlichen Körperteilen stammten und eine gleichzeitige Besiedlung des Patienten mit unterschiedlichen VRE-Stämmen an verschiedenen Körperregionen wahrscheinlich ist. Bei bestimmten Patienten änderte sich aber auch der ST oder die Virulenzfaktoren, obwohl die Herkunft des Materials konstant blieb. In diesen Fällen kann sich der ST geändert haben oder es wurde ein Transposon mit Resistenzen und Virulenzfaktoren erworben. Genetische Rekombinationen verschiedener ST kommen ebenfalls als mögliche Erklärung für die Unterschiede in Betracht.

#### **4.8.2 Ausbruchsgeschehen auf Stationen des UKR**

Wenn man die Verteilung von einzelnen ST auf den Stationen betrachtet, sieht man gewisse Häufungen. Diese traten besonders auf den Stationen 20, 21 KMT, 92 und 93 auf. Betrachtet man die ST genauer, sieht man, dass besonders die ST 117 und 192 für diese Verteilung verantwortlich sind. Auch im Jahresverlauf dieser beiden ST sieht man, dass diese Häufigkeitsspitzen aufweisen. Der ST 117 hatte seine Maxima im April und August, der ST 192 im November und Dezember. Für das in dieser Arbeit genauer bearbeitete erste Halbjahr 2012 war auf den Stationen 21 KMT und 93 ein Ausbruchsgeschehen von VRE bekannt. In

kurzer Zeit wurden sehr viele VRE-positive Patienten diagnostiziert. Wenn man die VREfm-Erstnachweise der Station 21 KMT im zeitlichen Verlauf betrachtet, sieht man eine deutliche Häufung im April. Dieser Anstieg wird vor allem durch des ST 117 verursacht (Abbildung 55). Auch auf der Station 93 kam es zu einem Anstieg der VRE-Erstnachweise im April durch den ST 117. Dieser war jedoch zahlenmäßig geringer als auf der Station 21 KMT (Abbildung 56). Wenn man die Fallzahlen der ST im zweiten Halbjahr betrachtet, kann man davon ausgehen, dass im zweiten Halbjahr im August ein weiteres mögliches Ausbruchsgeschehen mit ST 117 vorlag. Die hohen Zahlen des ST 192 in November und Dezember lassen ebenfalls ein Ausbruchsgeschehen vermuten. Man muss jedoch einschränkend berücksichtigen, dass im Falle eines vermuteten Ausbruchsgeschehens auch vermehrt Screeningabstriche durchgeführt und somit natürlich mehr VRE-positive Patienten entdeckt werden. Dies kann auch zu einer Zunahme der Gesamtzahl der VRE-Isolate geführt haben und damit eine Verzerrung gegenüber den sonst diagnostizierten VRE-Fallzahlen darstellen.

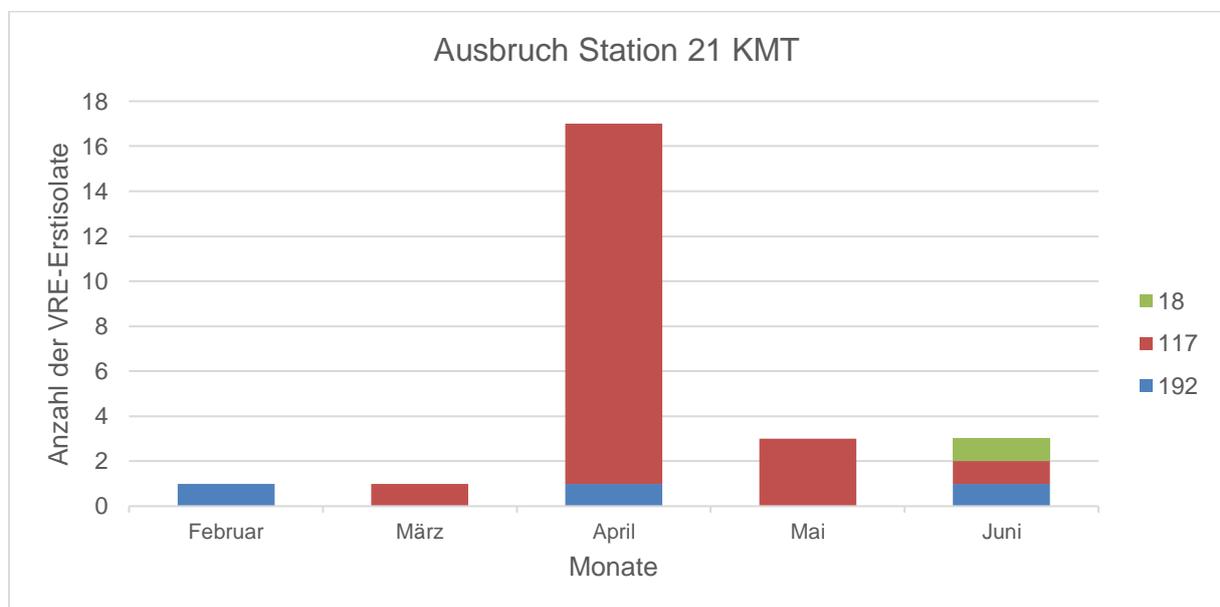


Abbildung 55: Monatliche Verteilung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 auf der Station 21 KMT (gesamt: 25) unter Einbeziehung der ST

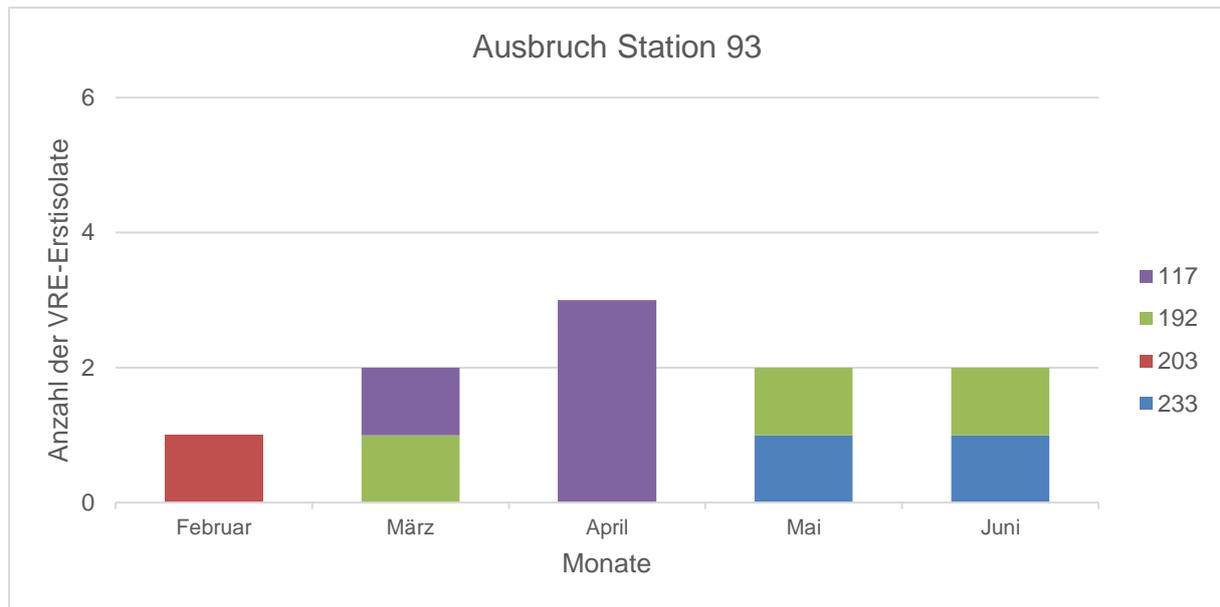


Abbildung 56: Monatliche Verteilung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 auf der Station 93 (gesamt: 20) unter Einbeziehung der ST

#### 4.8.3 MLST- Verteilung am UKR

Die Einteilung der Isolate nach klinischen Disziplinen am Uniklinikum Regensburg im Jahr 2012 erfolgte nach den veröffentlichten Kategorien des NRZ im Epidemiologischen Bulletin 33 von 2012 (71). Der Großteil der Isolate stammte aus der Kategorie „Innere Medizin“ mit 50 % am zweithäufigsten waren Isolate der „Hämatologie/Onkologie“ (32 %). Die restlichen Isolate verteilen sich auf die Kategorien „Chirurgie“ (10 %), „Neonatalogie/Pädiatrie“, „Nephrologie/Urologie“, „andere“ und „ambulant“.

Am NRZ spiegelte sich eine etwas andere Verteilung für die Jahre 2011/2012 wider. Die häufigste klinische Disziplin war die „Chirurgie“ mit 26 %, darauf folgte die „Innere Medizin“ mit 21 %, „Hämatologie/Onkologie“ mit 6 % und die „Intensivtherapie“ mit 7 % (71). Für eine etwas andere Verteilung am UKR könnten die Ausbruchsgeschehen in den Stationen 21 KMT und 93 verantwortlich sein (Abschnitt 4.8.2 Ausbruchsgeschehen auf Stationen des UKR). Diese bewirkten vermutlich eine gehäufte Entdeckung von VRE-Isolaten, da selektiv in diesen Bereichen vermehrt gescreent wurde und sich somit die Verteilung deutlich verändert haben könnte. Außerdem wurden die Isolate um UKR aus Intensivstationen ihrer jeweiligen Fachrichtung zugeordnet.

Vergleicht man die klinischen Disziplinen der registrierten Isolate am UKR jedoch mit den definierten Risikogruppen für ein VRE-Infektion/-Besiedlung können dies auch am UKR bestätigt werden (s. 1.3 Klinische Relevanz von Vancomycin-resistenten *E. faecium*-Isolaten (VREfm)).

#### 4.8.4 MLST-Materialanalyse

Das klinische Material der Proben wurde entsprechend dem Epidemiologischen Bulletin 33 von 2013 kategorisiert (71). Im Jahr 2012 waren am UKR 74 % der Isolate von „Rektal-/Perianalabstrichen/Stuhl“. „Abstriche“ waren mit 11 % vertreten. Zusätzlich waren in den Kategorien „BAL/Sputum/Trachealsekret/Rachenabstrich“, „Blutkultur“, „Drainage/Sekret“, „Katheterspitze“, „Punktat“, „Urin“ und „Wundabstrich“ Materialien VRE-positiv getestet worden.

Die Einsendungen am NRZ zeigten für die Jahre 2011/2012 folgende Verteilung: Rektalabstrich/Stuhlprobe (27 %), Urin (25 %), unbekannt (15 %), Abstrich (9 %), Wundabstrich (5 %), Blutkultur (5 %) (71). Screeningabstriche, also „Rektal-/Perianalabstriche/Stuhl“ stellen demnach die häufigsten Nachweise von VRE dar. Diese sind von großer Bedeutung, denn die intestinale Besiedlung ist der erste Schritt zur Kolonisation. Auch bei Ausbruchsgeschehen, wie sie im Jahre 2012 am UKR aufgetreten war, werden mehr Screeningabstriche genommen. Dies erklärt mit unter den hohen Anteil an „Rektal/Perianalabstrichen/Stuhl“ am UKR.

## 4.9 Methodik MLSTypisierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die VRE-Isolate mittels MLST analysiert. Diese molekulare Analyse besteht aus einer Sequenzierung von 7 *Housekeeping*-Genen (Abschnitt 1.7 Surveillance mit Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST)). Bezogen auf das gesamte Bakteriengenom, stellt dieses Verfahren jedoch nur eine sehr grobe molekulare Charakterisierung dar. Genetisch eng verwandte Stämme weisen nicht immer ein identisches MLST-Profil auf (63). Die Möglichkeit der Sequenzierung des gesamten Genoms durch *Whole-Genom-Sequencing* (WGS) hat die molekularen Untersuchungen von Mikroorganismen revolutioniert. In Australien wurde erstmals ein Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) basiertes Verfahren genutzt, in welchem das sequenzierte Genom des Ausbruch-bezogenen Isolats mit einem Referenzgenom verglichen wurde (83). Es entstanden sehr viel umfangreichere genetische Profile. Ein Problem bei dieser Untersuchung war jedoch die Vergleichbarkeit der Sequenzdaten von verschiedenen Studien, da unterschiedliche Referenzgenome zur Auswertung genutzt wurden. Dieses Problem wurde durch die Einführung des Kerngenom-MLST-Schema (*core genome* MLST; cgMLST) gelöst, in dem, genauso wie bei MLST, Varianten zahlreicher Gene miteinander verglichen werden. Für *E. faecium* werden die Sequenzen von 1.423 Genloci des gesamten Genoms miteinander verglichen und somit Komplextypen (*complex types*; CT) definiert, welche sich nur in weniger als 15 Genen unterscheiden. Mit dieser einheitlichen Nomenklatur sind VRE-Stämme auf der ganzen Welt, genauso wie bei MLST, über eine Online-Datenbank vergleichbar. Es werden auch die ST im cgMLST-Schema ausgewertet, sodass die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Vorjahre (ohne WGS) bestehen bleibt. Mit cgMLST können bereits bekannte MLSTypen in mehrere CT differenziert werden (84).

Bei der Analyse mittels cgMLST werden jedoch nicht alle Gene des bakteriellen Genoms erfasst. Somit sind die Differenzierungsmöglichkeiten innerhalb der dominanten CT noch unzureichend. Um diese zu ermöglichen wäre eine SNP-Analyse der einzelnen cgMLST-Gene oder aller sequenzierten bakteriellen Gene nötig. Mit dieser erweiterten bioinformatischen Analyse könnte man bestimmen, ob es sich bei Isolaten tatsächlich um identische oder sehr nah verwandte Klone handelt (63).

Ein weiteres Problem der genetischen Verwandtschaftsanalyse stellt zusätzliches Genmaterial der VRE in Form von Transposons oder Plasmiden dar, auf welchen häufig weitere Resistenzgene- oder Virulenzgene codiert werden. Diese Gene können unter VRE-Stämmen

nicht nur vertikal, sondern auch horizontal ausgetauscht werden. Somit können Isolate mit unterschiedlichem CT, aber denselben Transposons, aber auch unterschiedlichen Transposons und selbem CT für ein Ausbruchsgeschehen verantwortlich sein. Durch zusätzliche Analyse der Transposons zusätzlich zu den CT würde die Aussagekraft der cgMLST-Analyse stark zunehmen. Die Einbeziehung dieser erweiterten genetischen Typisierungsmöglichkeit wird gerade intensiv erforscht (63, 85).

Seit 2015 werden im NRZ von *E.-faecium*-Einsendungen aus invasiven Infektionen Ganzgenomsequenzierungen und anschließend eine cgMLSTypisierungen durchgeführt (35). Auch wenn die Bestimmung der cgMLST eine sehr gut Typisierbarkeit bietet, kann aufgrund der begrenzten Ressourcen nur ein bestimmter Teil von Isolaten im NRZ durch cgMLST typisiert werden, was z. B. Besiedlungsausbrüche ausschließt (11). Somit wird für epidemiologische überregionale Untersuchungen über Kolonisation und Infektionen von Patienten durch VRE, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die für solche Fälle ausreichend diskriminative MLSTypisierung weiterhin verwendet.

## 4.10 Präventionsmaßnahmen bei VRE

Bei der Prävention von VRE wurde in Deutschland lange Zeit auf vertikale Hygienemaßnahmen gesetzt. Dennoch konnte sich VRE in Deutschland weiter ausbreiten. Erst mit der Empfehlung „Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen“ (Bundesgesundheitsblatt 10/2018) der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) wurde auf die Einhaltung der Basishygiene und zusätzlich den verstärkten Einsatz von horizontalen Invektionspräventionsmaßnahmen gesetzt (3, 63).

Die vorliegende Empfehlung erlaubt auf die Einrichtung, je nach Risikoprofil, zugeschnittene Maßnahmen, um nosokomiale Transmissionen und Infektionen durch VRE zu verhindern. Dabei ist die Basishygiene, insbesondere Händehygiene, die Grundvoraussetzung für jede Infektionsprävention. Die Auswahl der Maßnahmen setzt die Kenntnisse über die epidemiologische Situation und die eigenen Risikokollektive im jeweiligen Haus voraus. Zur VRE-Prävention werden immer Bündel von Präventionsmaßnahmen verwendet. Als mögliche Teile des Maßnahmenbündels empfiehlt die KRINKO Screening, Isolierung in Einzel- oder Kohortenzimmern sowie die Verwendung von Barrieremaßnahmen wie Schutzkitteln und Handschuhen bei jedem Patientenkontakt, antiseptisches Waschen, intensive Reinigung und Desinfektion der Umgebung des Patienten und Ausrichtung der *Antibiotic Stewardship*-Programme (ABS) auf die Prävention von VRE-Infektionen. Die wichtigste Präventionsmaßnahme ist jedoch das Einhalten der Basishygiene, besonders der Händehygiene. Durch intensive Schulungen des Personals und des jeweiligen Patienten konnte eine Reduktion von VRE-Fällen erreicht werden. Dabei ist es wichtig, die Effizienz und Durchführung der Maßnahmen zu überwachen, und falls nötig (z.B. bei Ausbrüchen), weitere Maßnahmen in das jeweilige Bündel einzubeziehen. Bei einer Verminderung von VRE-Fällen können die Präventionsmaßnahmen wieder reduziert werden (3).

Das UKR hat nach Betrachtung der Studienlage eigene Empfehlung zu Infektionsprävention im Umgang mit VRE entwickelt. Das Ziel ist es, etwas stärkere Maßnahmen als die KRINKO (3) aber schwächere Maßnahmen als in der Schweiz (86) anzuwenden, sodass die Ressourcen des Krankenhauses sinnvoll und risikoadaptiert eingesetzt werden. Der Fokus liegt im UKR besonders auf horizontalen Maßnahmen und molekularepidemiologischen Untersuchungen. Als Grundlage zur Prävention von VRE werden am UKR folgende Maßnahmen angewendet: Verbesserung der Händehygiene-Compliance, Einbeziehung der Patienten in die

Händehygiene, Verbesserung der Reinigungs- und Desinfektionsleistung und Ausbau und Verbesserung von ABS-Programmen sowie molekulare Surveillance mittels WGS. Die horizontale Herangehensweise minimiert nicht nur die VRE-Transmission, sondern dient auch der Prävention MRE-Infektionen allgemein. Außerdem werden alle Erstisolate von VRE-Patienten, besonders bei unklaren VRE-Häufungen in bestimmten klinischen Bereichen, zeitnah sequenziert (Genom-orientierte Infektionsprävention) und mittels cgMLST analysiert. Mit dieser Herangehensweise kann man unterscheiden, ob neue VRE-Stämme von außen in das Krankenhaus getragen wurden oder eine Verbreitung von VRE-Stämmen innerhalb des Krankenhauses vorliegt. Diese Unterscheidung ist sehr wichtig, um die richtigen Maßnahmen zur Prävention gezielt einsetzen zu können. Dies geschieht aktuell durch Gesamtgenomsequenzierung. Diese Sequenzierungen von VRE-Isolaten und die Zusammenarbeit von MRE-Netzwerken sind wichtige Bausteine im Übergang von der Basishygiene zu weiteren regionalen Maßnahmen gegen VRE-Verbreitung (63).

#### **4.11 Ausblick**

In den Ergebnissen dieser Arbeit sowie auch in den Zahlen des NRZ spiegeln sich steigende Zahlen der VRE-Verbreitung wider. Hinzu kommt eine steigende Resistenzrate gegen Reserveantibiotika. So wurden für Linezolid am NRZ steigende Resistenzraten von 3 % (2012) auf 10,4 % (2018) unter den VREfm-Einsendungen beobachtet (11). Es ist somit anzunehmen, dass VRE auch in Zukunft noch eine große Rolle in der klinischen Medizin spielen und diese vor immer neue Herausforderung stellen werden. So wurden VRE Im Jahr 2017 von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) als resistente Bakterien mit einer hohen Wichtigkeit identifiziert, für welche die Notwendigkeit einer neuen Behandlung besteht (87). Eine besondere Bedeutung obliegt auch dem horizontalen Gentransfer der Vancomycin-Resistenz an MRSA. Im Jahr 2013 wurde erstmals ein Vancomycin-resistenter *S. aureus* (VRSA) in Europa, in Portugal, nachgewiesen (88). Auch wenn solche Übertragungen noch selten sind, sollten Koinfektionen von MRSA und VRE verhindert werden, um den möglichen Gentransfer zu unterbinden (3). Einen weiteren Grund zur Sorge bereitet auch der Nachweis von VRE mit einer variablen Expression der Resistenz in Skandinavien (89). Diese Tatsache erschwert den Nachweis und somit auch Behandlung von

VRE-Infektionen. Bisher wurden variable VRE jedoch noch nicht in Deutschland nachgewiesen (58).

Anlässlich der Tatsache, dass VRE-Isolate mittlerweile seit 30 Jahren in Deutschland nachgewiesen werden, wagt das NRZ einen Rück- und auch Ausblick. Dabei wird deutlich, dass die Entwicklungen von VRE-Stämmen sowie ihr Reservoir und somit die Zunahme an VRE-Isolaten bis heute immer noch wenig verstanden sind, was weitere Untersuchungen notwendig macht. Außerdem weist das NRZ, aufgrund steigender Resistenzen, auch gegen die Reserveantibiotika, auf die Dringlichkeit neuer Behandlungsmethoden und einen verantwortungsvollen Einsatz von Antibiotika hin. Wichtig ist auch eine anhaltende Surveillance von VRE, um Entwicklungen und Transmissionen von VRE-Stämmen rechtzeitig zu erkennen. Damit in Zukunft die besorgniserregenden Resistenzraten von Linezolid-resistenten Enterokokken beobachtet werden können, wurden nun auch gegen diese Screeningverfahren entwickelt, welche sich jedoch klinisch noch beweisen müssen (58). Um jedoch die weitere Ausbreitung von VRE, weiterer MRE-Keime und nosokomialer Infektionen allgemein zu verhindern und somit die uns derzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden noch langfristig nutzen zu können, muss auch in Zukunft eine gute Basishygiene durchgeführt werden. Besonders die Anwendung von horizontalen Hygienemaßnahmen stellt die wichtigste Barrierefunktion zur Transmissionskontrolle im Gesundheitswesen dar. Durch eine gute Surveillance soll die Wirksamkeit der Maßnahmen kontrolliert und neu auftretende Stämme registriert und zeitnah typisiert werden. In Deutschland sind VRE bei einem größer werdenden Teil der Patienten verbreitet, sodass sie uns noch viele Jahre vor große Herausforderungen stellen werden (63).

## 5 Zusammenfassung

In Deutschland und Europa breiten sich seit 2000 zunehmend Vancomycin-resistente *E. faecium*-Isolate (VREfm) aus. Die Verbreitung von VRE ist vor allem durch eine Verbreitung bestimmter hospital-adaptierter Linien wie den klonalen Komplex 17 (CC17) bzw. Klade A1 verursacht. Um die aktuelle Empfehlung wie die „Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen“ (Bundesgesundheitsblatt 10/2018) der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) zur Prävention von VRE umsetzen zu können, ist ein Wissen über die Verbreitung von VRE im eigenen Krankenhaus unumgänglich. Die vorliegende Arbeit ist ein Teil einer VRE-Surveillance am UKR.

Seit 2004 werden alle VRE-Erstisolate, die am Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg (IMHR) des Universitätsklinikum diagnostiziert wurden, in einer Stammsammlung asserviert. In dieser Arbeit wurden 127 Isolate aus dem ersten Halbjahr 2012 molekulargenetisch untersucht und typisiert. Aus dem UKR stammten 104 Isolate. Bei 80 Isolaten handelte es sich um VRE-*E. faecium*-Erstisolate (VREfm). Diese VREfm-Erstisolate wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf vorhandene Resistenz- und die Virulenzgene *esp*-, *hyl*- *acm*- und repetitive Genabschnitte der Untereinheit A des Gens *esp* untersucht. Es waren 73 % der Isolate *vanB*- und 27 % *vanA*-positiv. Dies unterschied sich von den Ergebnissen in ganz Deutschland im Jahr 2012. Dort war 2012 noch *vanA* das vorherrschende Resistenzgen. Das *esp*-Gen konnte auf 81 % der Isolate und das *hyl*-Gen auf 81 % der Isolate nachgewiesen werden. Alle VREfm-Isolate waren *acm*-positiv. Für die Untereinheit A des Gens *esp* konnten 1 - 6-Genduplikaturen oder keine nachgewiesen werden, am häufigsten waren 5 Wiederholungen.

Ein zentraler Teil dieser Arbeit war auch die Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) mit Bestimmung der Sequenztypen (ST). Der häufigste ST war der ST 117 (45 %), gefolgt vom ST 192 (23 %). Diese beiden ST waren allein für 68 % der Isolate verantwortlich. Außerdem wurden die ST 17, 18, 78, 203 und 233 identifiziert. Alle Isolate waren Teil des klonalen Komplex 17 (CC17).

Zusätzlich zur molekularen Typisierung wurden die Patientendaten über das Krankenhaus, die Stationsart, die klinische Fachrichtung sowie Art der VRE-Besiedlung erfasst und ausgewertet. Dies ließ Rückschlüsse auf Ausbreitung und Häufigkeit von VRE im Raum Regensburg, insbesondere am UKR, zu. Die meisten Isolate konnten im UKR der „Hämatologie/ Onkologie“

(49 %) gefolgt von der „Inneren Medizin“ (39 %) zugeordnet werden. Bei 80 % der VREfm-Erstisolate handelte es sich um den Standard-Screening-Nachweis „Rektal-/Perianalabstrichen/Stuhl“. Bei 93 % der Patienten handelte es sich um eine Kolonisation, nur bei den restlichen 7 % um eine bakterielle Infektion mit VRE.

Zusätzlich zu den Erstisolaten, wurden von 17 Patienten Mehrfachisolate pro Patienten (ein Isolat im zweiten Halbjahr 2012) asserviert. Bei 10 Patienten blieben alle Untersuchungsparameter über den betrachteten Zeitraum konstant. Bei vier Patienten blieb der ST konstant, jedoch ein Virulenzfaktor änderte sich. Bei den übrigen 3 Patienten konnten ST-Änderungen nachgewiesen werden.

Es wurden außerdem 23 Isolate, von welchen 15 VREfm-Erstisolate darstellten, aus weiteren Krankenhäusern im Raum Regensburg untersucht. Auch dort war ST 117 der häufigste ST. Außerdem wurden die ST 18, 192, 203 und 721 nachgewiesen. Die Verteilung der Resistenzgene und Virulenzfaktoren war der am UKR ähnlich.

Am UKR kann, genauso wie in ganz Deutschland, eine Zunahme der VRE-Isolate seit dem Jahr 2004 beobachtet werden. Dabei sieht man, dass oft einzelne ST für einen Anstieg der VRE-Fälle verantwortlich sind. Der meistvertretene ST ändert sich jedoch über die Jahre oft. So werden stark prävalente ST wieder durch neue ersetzt.

Diese Untersuchungen der VREfm-Erstisolate tragen zu besserem Verständnis der VRE-Verbreitung am UKR bei und machen eine genaue Abstimmung der Präventionsmaßnahmen im Krankenhaus möglich, um eine weitere Ausbreitung, sowie Infektionen zu verhindern. Dieses Wissen kann auch für größere Krankenhäuser in Bayern von Bedeutung sein.

## 6 Literaturverzeichnis

### 6.1 Literatur

1. Schleifer KH, Klipper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1984; 34(1):31–4.
2. Parte AC. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; 68(6):1825–9. doi: 10.1099/ijsem.0.002786.
3. KRINKO. Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2018; 61(10):1310–61.
4. Remschmidt C, Schröder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018; 7:54. doi: 10.1186/s13756-018-0353-x.
5. Lebreton F, Manson AL, Saavedra JT, Straub TJ, Earl AM, Gilmore MS. Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell* 2017; 169(5):849-861.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.027.
6. Klare I, Witte W, Wendt C, Werner G. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2012; 55(11-12):1387–400. doi: 10.1007/s00103-012-1564-6.
7. Facklam RR, Carvalho MdGS, Teixeira LM. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: Gilmore MS, Hrsg. *The enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, D.C: ASM Press; 2002. S. 1–54.

8. Vonberg R-P, Chaberny IF, Kola A, Mattner F, Borgmann S, Dettenkofer M et al. Prävention und Kontrolle der Ausbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken: Ergebnisse eines Workshops der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. *Anaesthesist* 2007; 56(2):151–7. doi: 10.1007/s00101-006-1123-3.
9. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Hrsg. GERMAP 2015: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence; 2016 [Stand: 06.01.2022]. Verfügbar unter: <https://www.p-e-g.org/files/content/Ueber%20uns/GERMAP/GERMAP-2015deutsch.pdf>.
10. Mischnik A, Werner G, Bender J, Mutters N. Enterokokken mit speziellen Resistenzen – Epidemiologie, Hygiene und Therapie. *Dtsch med Wochenschr* 2019; 144(08):553–60. doi: 10.1055/a-0655-6454.
11. Robert Koch-Institut. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycinresistenten Enterokokken in Deutschland: Update 2017/2018. *Epidemiologisches Bulletin* 2019; 23(35):365–76.
12. Halle E, Padberg J, Rosseau S, Klare I, Werner G, Witte W. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from a septic patient: report of first isolates in Germany. *Infection* 2004; 32(3):182–3. doi: 10.1007/s15010-004-3009-0.
13. Werner G, Gfrörer S, Fleige C, Witte W, Klare I. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(5):1182–3. doi: 10.1093/jac/dkn065.
14. Lewis JS, Owens A, Cadena J, Sabol K, Patterson JE, Jorgensen JH. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(4):1664–5. doi: 10.1128/AAC.49.4.1664-1665.2005.
15. Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(4):731–42. doi: 10.1093/jac/dks469.
16. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(9):2005–8. doi: 10.1128/aac.36.9.2005.

17. Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(8):1788–93. doi: 10.1128/aac.38.8.1788.
18. Hof H, Schlüter D, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie*. 7. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019. (Duale Reihe).
19. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(8):1563–71. doi: 10.1128/aac.37.8.1563.
20. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006; 42 Suppl 1:S25-34. doi: 10.1086/491711.
21. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; 319(3):157–61. doi: 10.1056/NEJM198807213190307.
22. Handwerger S, Skoble J. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(11):2446–53. doi: 10.1128/aac.39.11.2446.
23. Quintiliani R, Courvalin P. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant vanB between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 119(3):359–63. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06913.x.
24. Rice LB, Carias LL, Donskey CL, Rudin SD. Transferable, plasmid-mediated vanB-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(4):963–4.
25. Gao W, Howden BP, Stinear TP. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr Opin Microbiol* 2018; 41:76–82. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.030.
26. Uttley AH, Woodford N, Johnson AP, Cookson B, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1993; 342(8871):615; author reply 616.
27. Sahn DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(9):1588–91. doi: 10.1128/aac.33.9.1588.

28. Bonten MJM, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *The Lancet Infectious Diseases* 2001; 1(5):314–25. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00145-1.
29. Marshall CG, Broadhead G, Leskiw BK, Wright GD. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(12):6480–3. doi: 10.1073/pnas.94.12.6480.
30. O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist* 2015; 8:217–30. doi: 10.2147/IDR.S54125.
31. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52(3):297–308. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x.
32. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Hrsg. GERMAP 2008: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH; 2008 [Stand: 06.01.2022]. Verfügbar unter: <https://www.p-e-g.org/files/content/Ueber%20uns/GERMAP/GERMAP-2008.pdf>.
33. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. Resistenzdaten: Interaktive Datenbank; 2022 [Stand: 08.01.2022]. Verfügbar unter: <https://www.p-e-g.org/resistenz/database/auswertung.php?antibiotika%5B%5D=VAN&x=60&y=10&study=2016&erreger=820&material=1&age=1&area=1&field=1>.
34. Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U. Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(43):725–31. doi: 10.3238/arztebl.2013.0725.
35. Robert Koch-Institut. Verbreitung, Krankheitslast, Therapieoptionen und Prävention von Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken: Bericht zum 6. Treffen der Moderatoren der MRE-Netzwerke am RKI. *Epidemiologisches Bulletin* 2019; (27):237–50.

36. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 2003; 348(14):1342–7. doi: 10.1056/NEJMoa025025.
37. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun* 1999; 67(1):193–200.
38. Willems RJL, Homan W, Top J, van Santen-Verheuvél M, Tribe D, Manziros X et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet* 2001; 357(9259):853–5. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04205-7.
39. Eaton TJ, Gasson MJ. A variant enterococcal surface protein *Esp(fm)* in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 216(2):269–75. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11446.x.
40. Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001; 69(7):4366–72. doi: 10.1128/IAI.69.7.4366-4372.2001.
41. Leendertse M, Heikens E, Wijnands LM, van Luit-Asbroek M, Teske GJD, Roelofs JJTH et al. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. *J Infect Dis* 2009; 200(7):1162–5. doi: 10.1086/605609.
42. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M et al. The enterococcal surface protein, *Esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10):4538–45. doi: 10.1128/aem.67.10.4538-4545.2001.
43. Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein *Esp* is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 2007; 189(22):8233–40. doi: 10.1128/JB.01205-07.
44. Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, van Luit-Asbroek M, Oostdijk EAN, Bonten MJM et al. Contribution of the enterococcal surface protein *Esp* to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect* 2011; 13(14-15):1185–90. doi: 10.1016/j.micinf.2011.08.006.

45. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(1):232–5. doi: 10.1093/jac/dkh249.
46. Top J, Willems R, van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):214–9. doi: 10.1128/JCM.01351-07.
47. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 2004; 186(3):672–82. doi: 10.1128/jb.186.3.672-682.2004.
48. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C et al. A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis* 2003; 187(3):508–12. doi: 10.1086/367711.
49. Panesso D, Montealegre MC, Rincón S, Mojica MF, Rice LB, Singh KV et al. The hylEfm gene in pHylEfm of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. *BMC Microbiol* 2011; 11(1):20. doi: 10.1186/1471-2180-11-20.
50. Arias CA, Panesso D, Singh KV, Rice LB, Murray BE. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(10):4240–6. doi: 10.1128/AAC.00242-09.
51. Rice LB, Lakticová V, Carias LL, Rudin S, Hutton R, Marshall SH. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *J Infect Dis* 2009; 199(3):342–9. doi: 10.1086/595986.
52. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 2003; 47(6):1733–47. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03417.x.
53. Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun* 2008; 76(9):4110–9. doi: 10.1128/IAI.00375-08.

54. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect Immun* 2008; 76(9):4120–8. doi: 10.1128/IAI.00376-08.
55. Nallapareddy SR, Sillanpää J, Ganesh VK, Höök M, Murray BE. Inhibition of *Enterococcus faecium* adherence to collagen by antibodies against high-affinity binding subdomains of Acm. *Infect Immun* 2007; 75(6):3192–6. doi: 10.1128/IAI.02016-06.
56. Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(5):454–60. doi: 10.1016/j.mib.2006.07.001.
57. Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *mBio* 2013; 4(4). doi: 10.1128/mBio.00534-13.
58. Werner G, Neumann B, Weber RE, Kresken M, Wendt C, Bender JK. Thirty years of VRE in Germany - "expect the unexpected": The view from the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci. *Drug Resist Updat* 2020; (53). doi: 10.1016/j.drug.2020.100732.
59. van Hal SJ, Willems RJL, Gouliouris T, Ballard SA, Coque TM, Hammerum AM et al. The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium*. *Genome Med* 2021; 13. doi: 10.1186/s13073-021-00868-0.
60. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Høyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 2000; 343(26):1925–32. doi: 10.1056/NEJM200012283432604.
61. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* 2010; 120(12):4332–41. doi: 10.1172/JCI43918.
62. Geffers C, Maechler F, Behnke M, Gastmeier P. Multiresistente Erreger - Epidemiologie, Surveillance und Bedeutung. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2016; 51(2):104-110. doi: 10.1055/s-0041-103348.

63. Caplunik-Pratsch A, Rath A, Fritsch J, Holzmann T, Schneider-Brachert W. Infektionsprävention und VRE: eine unendliche Geschichte. *Krankenh.yg. up2date* 2020; 15(04):355–71. doi: 10.1055/s-0043-118566.
64. Markwart R, Willrich N, Haller S, Noll I, Koppe U, Werner G et al. The rise in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Germany: data from the German Antimicrobial Resistance Surveillance (ARS). *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; 8. doi: 10.1186/s13756-019-0594-3.
65. Friedrich A, Witte W. Typisierung von multiresistenten Erregern (MRE) – praktische Anwendung im krankenhaushygienischen Alltag. *Krankenh.yg. up2date* 2009; 4(01):49–65. doi: 10.1055/s-0028-1119620.
66. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6):1963–71. doi: 10.1128/JCM.40.6.1963–1971.2002.
67. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(12):815–25. doi: 10.1007/s10096-005-0056-0.
68. Vankerckhoven V, van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4473–9. doi: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004.
69. Joppien S, Maier Sarah Lena, Endling DS. Basics experimentelle doktorarbeit. 1. Auflage. Munich, Germany: Urban & Fischer; 2011.
70. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 2018; 3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
71. Robert Koch-Institut. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE): Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung aus dem NRZ für Staphylokokken und Enterokokken, 2011-2012. *Epidemiologisches Bulletin* 2013; (33).

72. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm; 2013.
73. Robert Koch-Institut. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in Deutschland – Update 2013/2014. Epidemiologisches Bulletin 2015; (40). doi: 10.17886/EpiBull-2015-010.
74. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - AER for 2019. Stockholm; 2020 [Stand: 01.02.2021]. Verfügbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>.
75. Reimann M. Molekulare Epidemiologie von Vancomycin-Resistenten Enterokokken am Universitätsklinikum Regensburg im zweiten Halbjahr des Jahres 2012 [unveröffentlichte Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg.
76. Robert Koch-Institut. Vancomycin-resistente Enterokokken in deutschen Krankenhäusern 2006/2007: Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. Epidemiologisches Bulletin 2008; (23).
77. Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). J Clin Microbiol 1997; 35(12):3166–70. doi: 10.1128/JCM.35.12.3166-3170.1997.
78. Choi S-H, Lee S-O, Kim TH, Chung J-W, Choo EJ, Kwak YG et al. Clinical features and outcomes of bacteremia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: analysis of 56 cases. Clin Infect Dis 2004; 38(1):53–61. doi: 10.1086/380452.
79. Tschudin Sutter S, Frei R, Dangel M, Gratwohl A, Bonten M, Widmer AF. Not all patients with vancomycin-resistant enterococci need to be isolated. Clin Infect Dis 2010; 51(6):678–83. doi: 10.1086/655824.
80. Guido Werner, Ingo Klare, Carola Fleige, Uta Geringer, Wolfgang Witte, Heinz-Michael Just et al. Vancomycin-resistant vanB-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. Antimicrob Resist Infect Control 2012; (1). doi: 10.1186/2047-2994-1-21.

81. Werner G, Fleige C, Geringer U, van Schaik W, Klare I, Witte W. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect Dis* 2011; 11(80):8. doi: 10.1186/1471-2334-11-80.
82. Robert Koch-Institut. Enterokokken mit Vancomycin-Resistenz in deutschen Krankenhäusern 2008/2009: Situationsbericht zur Verbreitung und Resistenzentwicklung. *Epidemiologisches Bulletin* 2010; (44).
83. Howden BP, Holt KE, Lam MMC, Seemann T, Ballard S, Coombs GW et al. Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant enterococci. *mBio* 2013; 4(4). doi: 10.1128/mBio.00412-13.
84. Been M de, Pinholt M, Top J, Bletz S, Mellmann A, van Schaik W et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for High- Resolution Typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2015; 53(12):3788–97. doi: 10.1128/JCM.01946-15.
85. Zhou X, Chlebowicz MA, Bathoorn E, Rosema S, Couto N, Lokate M et al. Elucidating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks: the role of clonal spread and movement of mobile genetic elements. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(12):3259–67. doi: 10.1093/jac/dky349.
86. Swissnoso. Eindämmung der Verbreitung von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) in der Schweiz: Aktualisierung der nationalen Empfehlungen: Version 2.0 (Dezember 2019); 17.12.2019 [Stand: 29.01.2021]. Verfügbar unter: [https://www.swissnoso.ch/fileadmin/swissnoso/Dokumente/5\\_Forschung\\_und\\_Entwicklung/6\\_Aktuelle\\_Ereignisse/191220\\_Aktualisierte\\_VRE\\_Management\\_Guideline\\_final\\_rev.pdf](https://www.swissnoso.ch/fileadmin/swissnoso/Dokumente/5_Forschung_und_Entwicklung/6_Aktuelle_Ereignisse/191220_Aktualisierte_VRE_Management_Guideline_final_rev.pdf).
87. World Health Organisation. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics; 2017 [Stand: 16.03.2020]. Verfügbar unter: [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1).
88. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet* 2013; 382(9888):205. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61219-2.
89. Hammerum AM, Justesen US, Pinholt M, Roer L, Kaya H, Worning P et al. Surveillance of vancomycin-resistant enterococci reveals shift in dominating clones and national

spread of a vancomycin-variable vanA *Enterococcus faecium* ST1421-CT1134 clone, Denmark, 2015 to March 2019. *Euro Surveill* 2019; 24(34). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.34.1900503.

## 7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 7.1 Tabellen

Tabelle 1: Natürliche und erworbene Antibiotikaresistenzen bei Enterokokken (3, 9) .....	11
Tabelle 2: Chemikalien (alphabetische Reihenfolge).....	28
Tabelle 3: Puffer und Lösungen (alphabetische Reihenfolge) .....	29
Tabelle 4: Oligonukleotide .....	30
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 6: Geräte .....	32
Tabelle 7: Gefäße.....	33
Tabelle 8: Software.....	34
Tabelle 9: Programm 1 zum freisetzen der Bakterien-DNA: Darstellung des Verlaufes von Zeit und Temperatur .....	39
Tabelle 10: Ansatz für eine PCR mit 15 µl .....	41
Tabelle 11: Programm 2 für die PCR der Gene: <i>vanA/B</i> , <i>esp</i> , <i>acm</i> , <i>hyl</i> und MLST; Darstellung des Verlaufes von Zeit und Temperatur .....	42
Tabelle 12: Programm 3 für die PCR der Sequenz für <i>espA</i> ; Darstellung des Verlaufes von Zeit und Temperatur .....	42
Tabelle 13: Übersicht über die Konzentration der Gele, Größe des Standards und des DNA- Fragments für die jeweilige PCR .....	44
Tabelle 14: Wiederholungen der Untereinheit A innerhalb der Repeat-Region des <i>esp</i> -Gens: <i>espA</i> : Darstellung der Größe in bp .....	46
Tabelle 15: Zusammenfassung der 7 Genloci für MLST, mit Anzahl der Möglichkeiten pro Allele; Werte der Datenbank <a href="http://www.pubmlst.org">www.pubmlst.org</a> entnommen (70).....	51
Tabelle 16: Alleleprofile und Anzahl der Nachweise aller bestimmten ST der VREfm- Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR .....	63
Tabelle 17: Übersicht über Stationsart, Station und Fachrichtung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80) .....	69
Tabelle 18: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von <i>espA</i> .....	74
Tabelle 19: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von <i>espA</i> .....	75
Tabelle 20: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von <i>espA</i> .....	75

Tabelle 21: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung von <i>hyl</i> .....	76
Tabelle 22: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung des ST .....	76
Tabelle 23: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung des ST .....	77
Tabelle 24: Mehrfachnachweise eines Patienten mit Änderung des ST und des Resistenzgens .....	77
Tabelle 25: Mehrfachnachweise des externen Patienten mit Änderung der ST und <i>espA</i> .....	79

## 7.2 Abbildungen

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Wirkmechanismus von Vancomycin: Verhinderung der Zellwandbiosynthese durch die Bindung von Vancomycin an das D-Alanin-D-Alanin (D-Ala-D-Ala) des Pentapeptids und Hemmung der Enzyme Transglykosylase, Transpeptidase und Carboxypeptidase in Anlehnung an Courvalin (20).....	13
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Resistenzmechanismus von VRE: Änderung der Vancomycinbindestelle in D-Alanin-D-Lactat (D-Ala-D-Lac) in Anlehnung an Courvalin (20).....	14
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung unterschiedlicher <i>esp</i> -Genvarianten: mit N-(N) und C- Terminus (C), sowie einer Repeat-Region (R) mit verschiedenen Wiederholungen der Abschnitte A, B und C in Anlehnung an Leavis et al. (47).....	20
Abbildung 4: Selektion der CC17 Linie im Krankenhaus: in Anlehnung an Leavis et al. (56) .....	24
Abbildung 5: Schema zum Ablauf des VRE-Nachweises durch Screening am UKR im Jahr 2012 .....	36
Abbildung 6: Schema zum Ablauf des VRE-Nachweises bei einer klinischen Infektion am UKR im Jahr 2012 .....	37
Abbildung 7: Beispiel eines Gels der <i>vanA/B</i> -PCR: mit Positivkontrolle (PK) und Negativkontrolle (NK) sowie positiven Ergebnissen für <i>vanA</i> oder <i>vanB</i> .....	45
Abbildung 8: Beispiel Gel einer <i>esp</i> -PCR: mit dem Standard 1 kb Plus, einer Negativkontrolle (NK) und <i>esp</i> -positiven sowie -negativen Ergebnissen (Zahlenangabe des Standards in Basenpaaren) .....	45

Abbildung 9:	Beispiel eines Gels der <i>espA</i> -PCR: mit dem Standard 1 kb Plus (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren) und 1-, 2-, 4- und 5-fache Wiederholung der Untereinheit A. Sowie einer <i>espA</i> -negative (neg.) Probe.	47
Abbildung 10:	Beispiel eines Gels der <i>hyl</i> -PCR: mit dem Standard 1 kb plus (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren) und <i>hyl</i> -negativen, sowie <i>hyl</i> -positiven Ergebnissen	47
Abbildung 11:	Beispiel eines Gels der <i>acm</i> -PCR: mit dem Standard 100 bp (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren), einer Negativkontrolle (NK) und <i>acm</i> -positiven Ergebnissen	48
Abbildung 12:	Beispiel eines Gels der MLST-PCR: mit dem Standard 100 bp (Zahlenangaben des Standards in Basenpaaren). Darstellung der Banden von <i>atpA</i> , <i>ddl</i> , <i>gdh</i> , <i>purK</i> , <i>pstS</i> und <i>adk</i>	48
Abbildung 13:	Darstellung der Ergebnisse einer Sequenz im Chromas (Probe 47: <i>gyd1</i> )	50
Abbildung 14:	Übersicht über alle VRE-Isolate aus der Stammsammlung des ersten Halbjahres 2012 (n = 127) mit Darstellung der Teilmenge UKR des ersten Halbjahres (n = 104)	54
Abbildung 15:	Übersicht über alle VRE-Isolate des UKR: Gesamtzahl am UKR (n = 104), <i>E. faecium</i> -Isolate, vollständig funktionierende Analyse und VREfm-Erstnachweise (n = 80)	54
Abbildung 16:	Enterokokkenspezies der VRE-Isolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR, abzüglich einer Probe ohne erfolgreiche Analyse (n = 103)	55
Abbildung 17:	Darstellung des Halbjahresverlaufs der VREfm-Erstisolate auf Monate verteilt im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)	56
Abbildung 18:	Geschlechterverteilung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)	56
Abbildung 19:	Darstellung des Alters der Patienten der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80); unterteilt in männlich und weiblich	57
Abbildung 20:	Glykopeptid-Resistenzgenverteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)	58
Abbildung 21:	Verteilung von <i>esp</i> -positiven und <i>esp</i> -negativen VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)	59
Abbildung 22:	Verteilung der <i>espA</i> -Varianten (1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- Wiederholungen oder neg.) auf alle VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80)	59

Abbildung 23: Verteilung von <i>hyl</i> -positiven und <i>hyl</i> -negativen VREfm-Erstisolaten im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80) .....	60
Abbildung 24: Anzahl der Allelvarianten von <i>atpA</i> aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80).....	61
Abbildung 25: Anzahl der Allelvarianten von <i>gyd</i> aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80).....	62
Abbildung 26: Anzahl der Allelvarianten von <i>pstS</i> aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80).....	62
Abbildung 27: Anzahl der verschiedenen Sequenztypen aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80).....	63
Abbildung 28: Verteilung der Resistenzgene <i>vanA/B</i> und der Virulenzfaktoren <i>esp</i> , <i>hyl</i> , <i>acm</i> und Wiederholung der Untereinheit A des <i>esp</i> -Gens auf die ST der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80) .....	65
Abbildung 29: Darstellung der Jahresverläufe der häufigsten ST 117 und 192 der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR auf Monate verteilt .....	66
Abbildung 30: Zuordnung der klinischen Disziplin zum Nachweis der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80) .....	67
Abbildung 31: Verteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR auf die Stationsarten, sowie ambulant (n = 80).....	68
Abbildung 32: Verteilung der häufigsten ST aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR auf die Stationsarten sowie ambulanten Bereiche (n = 54)....	68
Abbildung 33: Verteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR, auf die Stationen und ambulant mit Einbeziehung der ST (gesamt: 80).....	70
Abbildung 34: Klinisches Material der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80); BAL= Bronchoalveoläre Lavage .....	71
Abbildung 35: Übersicht über die Art des VRE-Nachweises aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80) .....	72
Abbildung 36: Darstellung des Besiedlungsstatus pro ST aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr am UKR (n = 80).....	73
Abbildung 37: Verteilung der verschiedenen Sequenztypen aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 auf die externen Krankenhäuser ASKLEPIOS Klinikum Bad Abbach, KH Barmherzige Brüder, KH St. Josef und KH-Gesell. D. Landk. SAD; KH=Krankenhaus (gesamt: 15) .....	78

Abbildung 38: Prozentuale Darstellung der Vancomycin-resistenten invasiven <i>E. faecium</i> -Isolate im Jahr 2012 in Europa (72).....	81
Abbildung 39: Prozentuale Darstellung der Vancomycin-resistenten invasiven <i>E. faecium</i> -Isolate im Jahr 2019 in Europa (74).....	81
Abbildung 40: Übersicht über alle Isolate am UKR im gesamten Jahr 2012 (n = 238).....	83
Abbildung 41: Jahresverlauf 2012 der VREfm-Erstisolate im Jahr 2012 am UKR (n = 189).....	84
Abbildung 42: Darstellung der Prozentualen Altersverteilung aller VREfm-Erstisolate am UKR; erstes Halbjahr und ganzes Jahr 2012 im Vergleich.....	84
Abbildung 43: Übersicht aller ST der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189).....	86
Abbildung 44: Übersicht aller ST der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80).....	86
Abbildung 45: Darstellung der beiden häufigsten ST im Jahr 2012 am UKR im zeitlichen Verlauf (n = 132).....	86
Abbildung 46: Klinische Disziplin der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189).....	87
Abbildung 47: Klinische Disziplin der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80).....	87
Abbildung 48: Verteilung der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189) auf Stationen, ambulant und unbekannt; mit Einbeziehung der ST.....	88
Abbildung 49: Verteilung aller VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (gesamt: 80) auf Stationen und ambulant; mit Einbeziehung der ST.....	88
Abbildung 50: Klinisches Material der VREfm-Erstisolate im gesamten Jahr 2012 am UKR (n = 189); BAL= Bronchoalveoläre Lavage.....	89
Abbildung 51: Klinisches Material der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 am UKR (n = 80); BAL= Bronchoalveoläre Lavage.....	89
Abbildung 52: Entwicklung der VRE-Fälle am UKR vom Jahr 2004 bis 2017; unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wulf Schneider der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie des UKR.....	90
Abbildung 53: Darstellung der MLSTypen der VREfm-Erstisolate am UKR 2004-2012 ....	96
Abbildung 54: Häufigste MLSTypen der invasiven VREfm-Isolate zwischen 2011 und 2019 (n = 757) am NRZ, x-Achse: Jahreszahl, y-Achse: Anzahl der Isolate (58)..	97

Abbildung 55: Monatliche Verteilung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 auf  
der Station 21 KMT (gesamt: 25) unter Einbeziehung der ST..... 99

Abbildung 56: Monatliche Verteilung der VREfm-Erstisolate im ersten Halbjahr 2012 auf  
der Station 93 (gesamt: 20) unter Einbeziehung der ST ..... 100

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Wulf Schneider für das Überlassen des interessanten Themas sowie die Betreuung dieser Doktorarbeit. Für die immer freundliche und engagierte Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Thomas Glück für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Durchsicht meiner Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Frau Maria Kurz für die geduldige und tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken. Außerdem danke ich allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung für Krankenhaushygiene und Infektiologie, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen. Insbesondere möchte ich dabei Frau Doreen Möbius für ihre immer freundliche Art und das Meistern der Organisation danken. Meiner Promotionskollegin Frau Michelle Reimann danke ich für die schöne Zusammenarbeit im Labor und den fachlichen Austausch.

Abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern, und bei meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation die ganze Zeit unterstützt und motiviert haben.