

Aus dem
CharitéCentrum für Diagnostische präventive Labormedizin
Institut für Hygiene und Umweltmedizin
Direktorin: Prof. Dr. Petra Gastmeier

Habilitationsschrift

**Epidemiologie von Kolonisationen und Infektionen mit multiresistenten enteralen Erregern und
Präventionsstrategien im Krankenhaus**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Hygiene & Umweltmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Friederike Maechler

Eingereicht: Februar 2023

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Spranger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum, München
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Maria Vehreschild, Frankfurt am Main

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungen und Genderhinweis	3
1. Einleitung	4
1.1. Multiresistente gramnegative Enterobakterien.....	4
1.2. Vancomycin-resistente Enterokokken.....	6
1.3. Surveillance von Erregern mit Resistenzen.....	7
1.4. Verbreitung und Transmissionsanalysen im Krankenhaus	8
1.5. Präventionsmaßnahmen im Krankenhaus	10
1.6. Fragestellungen	11
2. Eigene Arbeiten.....	12
2.1. Vorkommen von MRGN und VRE bei intensivmedizinisch versorgten Patientinnen in Deutschland.....	12
2.2. Vorteile der Kontaktisolierung im Vergleich zu Standardmaßnahmen zur Prävention der Verbreitung von ESBL-bildenden Enterobakterien auf Normalstationen in der endemischen Situation	21
2.3. Quantifizierung des zeitlichen Verzugs zwischen Screeninguntersuchungen und folgender Kontaktisolierung bei Nachweis von ESBL-produzierenden Enterobacteriales	34
2.4. Einfluss von therapeutischen Substanzen auf den Neuerwerb von ESBL-produzierenden Enterobakterien in einem deutschen Universitätskrankenhaus	43
2.5. Zunahme bestimmter Stammtypen von VREfm an der Charité.....	53
2.6. Andere molekulargenetische Analysemethoden zur Detektion von Transmissionen bei VREfm	64
3. Diskussion	80
3.1. Vorkommen von Besiedlungen und Infektionen mit MRGN und VRE in deutschen Krankenhäusern.....	81
3.2. Prävention von Transmissionen multiresistenter enteraler Erreger.....	83
3.3. Prävention der Selektion multiresistenter enteraler Erreger.....	86
3.4. Transmissionsanalysen mittels Ganzgenomsequenzierung.....	88
4. Zusammenfassung.....	90
5. Literaturangaben.....	92
6. Danksagung	102
7. Erklärung.....	103

Abkürzungen und Genderhinweis

3GC	Cephalosporine der dritten Generation
ARS	Antibiotika Resistenz Surveillance
ATC	Anatomisch-therapeutisch-chemisches Klassifikationssystem
cgMLST	Core genome multilocus sequence typing
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ESBL	Betalaktamase mit erweitertem Spektrum
ESBL-E	ESBL-produzierende Enterobakterien
IfSG	Infektionsschutzgesetz
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KI	Konfidenzintervall
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MRGN	Multiresistente gramnegative Bakterien
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
OR	Odds Ratio
SKA	Split k-mer analysis
SNP	Single-nucleotide polymorphism
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VREfm	Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus faecium</i>
wgMLST	Whole genome multilocus sequence typing
WGS	Whole genome sequencing
WHO	World Health Organisation

Die verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich auf alle Geschlechter. Bei der ersten Erwähnung einer Personengruppe benutze ich die Doppelform. Anschließend wird abwechselnd sowohl die weibliche als auch die männliche Form verwendet, um anzuzeigen, dass weiterhin alle gemeint sind.

1. Einleitung

Enterale Erreger mit besonderen Resistenzen umfassen insbesondere gramnegative Enterobakterien mit Resistenz gegenüber Carbapenemen oder Drittgenerationscephalosporinen sowie Vancomycin-resistente grampositive *Enterococcus faecium* (VREfm). Ihre Zunahme wird als so bedeutsames Problem der weltweiten Gesundheitsversorgung bei Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern und in der Allgemeinbevölkerung angesehen, dass die World Health Organisation (WHO) sie in Bezug auf Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika als kritisch bzw. hoch prioritär eingestuft hat.¹ Mit den Fluorchinolonen wurde allerdings 1962 die bisher letzte neuartige Antibiotikaklasse mit Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien entdeckt. Unter 43 neuen Antibiotika, die seit Dezember 2020 neu für die intravenöse Verabreichung in der Entwicklungsphase waren, zeigten nur 16 eine mögliche Aktivität gegen gramnegative Enterobakterien, und nur 7 gegen *Enterococcus faecium* (*E. faecium*).²

Die intestinale Mikrobiota im humanmedizinischen Sinn umfasst die Gesamtheit der Mikroorganismen, die den menschlichen Darm vom Duodenum bis hin zum Rektum besiedeln und besteht aus 10^{13} bis 10^{14} Bakterien.³ Dabei sind die meisten Darmbewohner allerdings strikt anaerobe Bakterien, die nur selten als Pathogene auftreten. Die meisten oral aufgenommenen Erreger besiedeln den Patienten nicht für einen längeren Zeitraum, sondern passieren den Darm nur,⁴ weil die intestinale Mikrobiota bezogen auf die verfügbaren Nährstoffe und epithelialen Anhaftmöglichkeiten wenig Nischen übriglässt.⁵ Dieser Barriereeffekt wird auch als Kolonisationsresistenz bezeichnet.⁵ Antibiotika haben einen zweifachen Effekt auf die Darmmikrobiota, da sie zum einen die bakterielle Diversität reduzieren und andererseits ein Überwuchern der von sensiblen Bakterien bewohnten Nischen mit resistenten Bakterien ermöglichen.⁶ Die wichtigsten Gruppen von enteralen Erregern mit besonderen Resistenzen bzw. Multiresistenzen werden im Folgenden beschrieben.

1.1. Multiresistente gramnegative Enterobakterien

Multiresistente Enterobakterien sind eine Gruppe fakultativ anaerober gramnegativer Stäbchenbakterien, welche zur 2016 etablierten Ordnung der Enterobacterales gehören.⁷ Die meisten Vertreter der Enterobacterales können als opportunistische Pathogene zwar vornehmlich bei vulnerablen Personen Infektionskrankheiten verursachen, werden allerdings auch als Darmkommensalen bei gesunden Individuen nachgewiesen.⁸ Die häufigsten Vertreter *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) verursachen insbesondere Infektionen des Urogenital- und Gastrointestinaltrakts, bakterielle Septitiden und nosokomiale Pneumonien. Auch wenn Enterobakterien mit 0,0001% nur einen sehr kleinen Anteil der intestinalen Mikrobiota ausmachen, gelten sie gleichzeitig als wichtige Pathogene mit einem erheblichen Resistenzanteil gegenüber antimikrobiellen Substanzen.⁶

Gramnegative enterale Erreger verfügen über vielfältige biologische Determinanten der Verbreitung antimikrobieller Resistenz. Neben der klonalen Verbreitung haben Enterobacterales die Fähigkeit zum

horizontalen Transfer mobiler genetischer Elemente, welche z.B. die Integration konjugativer Transposons oder Plasmide und Phagen-vermittelte Transduktion umfasst und klonspezifisch, zwischen verschiedenen Klonen der gleichen Spezies sowie über Speziesgrenzen hinweg möglich ist.⁹ Über chromosomale Rekombination kann das Genmaterial stabil in das Wirtsgenom integriert werden. Das gleichzeitige Vorhandensein von Resistenzgenen gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln oder Schwermetallen wie Kupfer oder Zink auf denselben mobilen genetischen Elementen ermöglicht die Resistenzvermittlung über verschiedene Substanzen und wird als Koresistenz oder Koselektion bezeichnet.¹⁰ Die Anzahl und Stabilität resistenztragender Plasmide sind bei *K. pneumoniae* für die Ausprägung der phänotypischen Resistenz bedeutsam.¹¹ Für Bakterien scheint das Tragen von Plasmiden auch ohne relevanten Selektionsdruck mit unterschiedlichen Fitnesskosten einherzugehen,¹² wobei diese oft mit der Zeit ausgeglichen werden oder die Vorteile trotzdem überwiegen.^{13,14} Im Zusammenspiel mit unterschiedlichen Rekombinationsraten kann es dann zu stammspezifischen Ausprägungen von Virulenz- und Resistenzfaktoren kommen.^{9,15} Dadurch können manche Stämme mit einem resistenztragenden Plasmid zu Ausbrüchen führen, während andere Linien mit dem gleichen Plasmid nicht übertragen werden.⁹

Die Resistenztypen bei gramnegativen Bakterien werden international uneinheitlich klassifiziert, und kombinierte Resistenzen werden nur selten dargestellt. Im Jahr 2011 wurde die MRGN-Nomenklatur durch die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) für resistente Enterobakterien sowie *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* complex etabliert, welche ausschließlich in Deutschland verwendet wird. Sie klassifiziert die Erreger bezogen auf ihre Sensibilität gegenüber primär bakteriziden und üblicherweise als Monotherapie bei schweren systemischen Infektionen eingesetzten Antibiotika als 3MRGN bzw. 4MRGN. Für diese wurden anschließend Hygienemaßnahmen bezogen auf den jeweiligen Resistenzphänotyp veröffentlicht.¹⁶ Insbesondere bedeutsam ist die Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation (3GC), welche am häufigsten über die Produktion von Betalaktamasen mit einem erweiterten Spektrum (extended-spectrum beta-lactamases, ESBL) vermittelt und oft als Surrogat für den 3MRGN-Phänotyp der KRINKO genutzt wird. Allerdings zeigten vergleichende Arbeiten nur bei etwa der Hälfte der ESBL-Bildner eine zusätzliche Koresistenz gegenüber Fluorchinolonen und somit die für den 3MRGN-Phänotyp geforderte Resistenz gegenüber Acylureidopenillinen (Piperacillin/Tazobactam), Cephalosporinen der dritten und vierten Generation (Cefotaxim und/oder Ceftazidim), sowie den Fluorchinolonen (Ciprofloxacin).¹⁷ Als Erweiterung für neonatologische und pädiatrische Patientinnen wurde die Klassifikation der 2MRGN-NeoPäd entwickelt, weil bei diesen Fluorchinolone aufgrund der toxischen Wirkungen auf den Gelenkknorpel nur sehr eingeschränkt zugelassen und nicht zur empirischen Therapie geeignet sind. Die lange Liste der verschiedenen betalaktam-hydrolysierenden Enzyme wird kontinuierlich erweitert und erstreckte sich von den initial entdeckten chromosomalen Penicillinasen über die Varianten der *bla*_{TEM} und *bla*_{SHV} bis zu den Subtypen der inzwischen dominierenden *bla*_{CTX-M} und den verschiedenen Carbapenemasen bereits im Jahr 2017 auf über 2666 Enzyme.^{18,19}

Enterobakterien mit 3GC-Resistenz tragen weltweit erheblich zur Krankheitslast der durch antibiotikaresistente Erreger verursachten Infektionen bei,²⁰ obwohl beispielsweise Ceftazidim/Avibactam als neuere therapeutische Wirkstoffkombination Wirksamkeit zeigte und somit eine Alternative zu Carbapenemen darstellt.²¹ Entsprechend wurde anhand einer Modellierungsstudie von Murray et al. im Auftrag der Antimicrobial Resistance Collaborators auf Basis einer Zusammenführung von globalen Daten aus Surveillance-, Krankenhausinformationssystemen sowie Literaturübersichtsarbeiten für das Jahr 2019 geschätzt, dass weltweit mehr als 100.000 Todesfälle direkt auf die 3GC-Resistenz von *E. coli* (N=59.900) und *K. pneumoniae* (N=50.100) zurückzuführen waren.²²

In Bezug auf die oft stark limitierten therapeutischen Optionen noch bedeutsamer sind Erreger, welche zusätzlich eine Resistenz gegenüber Carbapenemen aufweisen (4MRGN). Obwohl die MRGN-Klassifikation weitgehend auf Resistenzkategorien anstatt auf Resistenzmechanismen basiert, werden aufgrund der hohen epidemiologischen Bedeutung Carbapenemase-produzierende Enterobacterales unabhängig vom restlichen Antibiogramm als 4MRGN klassifiziert. Murray et al. schätzten, dass 85.000 Todesfälle weltweit durch die Carbapenemresistenz von *E. coli* (N=29.500) und *K. pneumoniae* (N=55.700) begründet waren.

Als Risikofaktoren für den Neuerwerb von multiresistenten Enterobakterien gelten Aufenthalte in Pflegeeinrichtungen, die Einnahme von Antibiotika, sowie Reisen in Länder mit hoher Prävalenz.²³⁻²⁵

1.2. Vancomycin-resistente Enterokokken

Enterokokken mit *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) als den häufigsten Vertretern dieser Gattung gehören mit bis zu 1% der adulten Darmmikrobiota zu den häufigen opportunistisch pathogenen Kommensalen.²⁶⁻²⁹ Während *E. faecalis* in der Regel noch Sensibilität gegenüber Ampicillin zeigen, sind viele *E. faecium* resistent gegenüber Betalaktamantibiotika und bedürfen im Falle einer behandlungsbedürftigen Infektion der Therapie mit einem Glykopeptid (Vancomycin oder Teicoplanin). Leider gab es in den letzten Dekaden einen Anstieg von *E. faecium* mit Resistenz gegen Vancomycin (VREfm) in Deutschland³⁰ und anderen Ländern, wobei in manchen Regionen einschließlich der USA, Argentinien und im europäischen Raum Litauen sowie einiger Balkanländer sogar mehr als 50% aller Blutstrominfektionen mit *E. faecium* durch VREfm verursacht werden.^{31,32}

Die Resistenz gegenüber Vancomycin kann über eine Reihe verschiedener Varianten des van-Operons vermittelt werden. Am häufigsten und hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz jedoch am bedeutsamsten sind die VanA und VanB operons. Dabei handelt es sich um Gen-Cluster, welche eine veränderte, für die Vancomycin-Bindung notwendige Ligase kodieren, wodurch die Affinität zur Bindungsstelle herabgesetzt wird.³³ Wie die multiresistenten gramnegativen Erreger haben auch Enterokokken die Fähigkeit, genetische Elemente inklusive der Resistenzdeterminanten anzuhäufen und auszutauschen,³⁴ und auch hier wird die bakterielle Evolution über Plasmide, Bakteriophagen und durch Eingliederung soge-

nannter transponierbarer Elemente vorangetrieben.³⁵ Letztere unterstützen durch genetische Rekombinationen und Rearrangements die Plastizität und Adaptationsfähigkeit des Enterokokkengenoms.³⁶ Mobile genetische Elemente können bei multiresistenten Enterokokken bis zu 25% des bakteriellen Genoms ausmachen,^{37,38} und für klinisch relevante *E. faecium* wurden mehr als 40% der Gene auf Plasmiden identifiziert.³⁹ Es gibt auch Hinweise auf horizontalen Gentransfer nicht nur zwischen Spezies, sondern über Genera, womit nicht nur Antibiotikaresistenzen, sondern auch Virulenzfaktoren und Mechanismen zur Adaptation an die Umwelt verbreitet werden könnten.³⁸ So kommt z.B. das VanB operon auch in verschiedenen anaeroben Darmbakterien vor. Ob diese aber als Reservoir für die Aufnahme der Vancomycin-Resistenz durch *E. faecium* im Krankenhaus dienen können, ist weitgehend unbekannt.³⁰ Im klinischen Kontext relevante Stämme von *E. faecium* haben doppelt so viele Gene, die mit horizontalem Gentransfer assoziiert sind, wie nicht klinisch bedeutsame Stämme.⁴⁰

Der Einsatz von Antibiotika kann zur intestinalen Dominanz Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) führen, die invasive Infektionen sowie Transmissionen begünstigt.^{41,42} Übliche Infektionen umfassen Endokarditiden, Septitiden und intraabdominelle Infektionen, wobei vorher oft bereits eine Besiedlung des Gastrointestinaltraktes besteht.⁴³ Die deutlich höheren Kosten von nosokomialen Infektionen mit VRE im Vergleich zu sensiblen Phänotypen beruhen vor allem auf den notwendigen Anpassungen der Medikation und der Bereitstellung von zusätzlichem Pflegepersonal.⁴⁴ Da Enterokokken im Vergleich zu gramnegativen Enterobakterien weniger virulent sind, beschränken sich Infektionen mit Enterokokken meist auf besonders vulnerable Patientengruppen mit schweren Grunderkrankungen, wie beispielsweise Patientinnen mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen.

In Deutschland sind 2018 die Empfehlungen der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut zum Umgang mit Trägerinnen und Trägern von Enterokokken mit besonderen Resistenzen veröffentlicht worden.⁴⁵ Vorher standen noch keine KRINKO-Empfehlungen zur Verfügung, deshalb wurde zumeist Expertenempfehlungen gefolgt, die Kontaktisolierung von Patienten mit Besiedlung oder Infektion mit VRE forderten.⁴⁶ Trotz der umfassenden, in der Praxis allerdings unterschiedlich durchgeführten Umsetzung dieser Maßnahmen konnte sich VRE in Deutschland weiter ausbreiten.⁴⁶

1.3. Surveillance von Erregern mit Resistenzen

Das Infektionsschutzgesetz (IfSG) verpflichtet im §23 Absatz 3 Leiter von Krankenhäusern und anderen Gesundheitseinrichtungen dazu, dass „...die nach dem Stand der medizinischen Wissenschaft erforderlichen Maßnahmen getroffen werden, um nosokomiale Infektionen zu verhüten und die Weiterverbreitung von Krankheitserregern, insbesondere solcher mit Resistenzen, zu vermeiden.“ Dafür muss laut Absatz 4 sichergestellt werden, dass „... das Auftreten von Krankheitserregern mit speziellen Resistenzen und Multiresistenzen fortlaufend in einer gesonderten Niederschrift aufgezeichnet, bewertet und sachgerechte Schlussfolgerungen hinsichtlich erforderlicher Präventionsmaßnahmen gezogen werden...“.

Um die Häufigkeit multiresistenter enteraler Erreger im zeitlichen Verlauf und in strukturell ähnlichen Einrichtungen bzw. Organisationseinheiten vergleichen zu können, sind standardisierte Daten zu ihrem Vorkommen erforderlich. Zuverlässige und regelmäßig aktualisierte Daten zu ihrer Häufigkeit in deutschen Krankenhäusern sind neben den jeweils kürzlich publizierten klinischen Studien hauptsächlich über sogenannte Surveillance-Systeme verfügbar, über die klinische Routinedaten in standardisierter Form erfasst und dokumentiert werden. Dazu zählen in Deutschland vornehmlich das Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) am Nationalen Referenzzentrum für nosokomiale Infektionen und die Antibiotika Resistenz Surveillance (ARS) am Robert Koch-Institut. Das KISS fokussiert auf die Anzahl von Patientinnen mit Nachweis von multiresistenten Erregern bei Aufnahme oder während des Krankenhausaufenthalts bezogen auf alle Aufnahmen im jeweiligen Bereich,⁴⁷ wohingegen ARS den Resistenzanteil, also den Anteil der resistenten unter allen getesteten Erregern einer Spezies, erfasst.⁴⁸

1.4. Verbreitung und Transmissionsanalysen im Krankenhaus

Wie andere Infektionserreger auch können multiresistente enterale Pathogene auf trockenen, unbelebten Flächen unter bestimmten Bedingungen über Tage und Monate überdauern.⁴⁹ Dabei spielt neben dem Inokulum insbesondere die Umgebungstemperatur unabhängig vom Material eine entscheidende Rolle, die jedoch durch Feuchtigkeit sowie das Vorhandensein anderer Erreger beeinflusst wird.⁵⁰ Die Überlebenszeiten variieren trotzdem für verschiedene Materialien, wobei Plastik und rostfreier Stahl die Überlebenszeiten besonders zu begünstigen schienen.⁴⁹ Die Hände des Personals wie auch die persönliche Schutzausrüstung einschließlich keimarmer Schutzhandschuhe, Schutzkittel und Schürzen können als Vektoren für einen Erregertransfer im Krankenhaus dienen, sofern diese kontaminiert sind.⁵¹

Ein entscheidender Parameter für den Neuerwerb multiresistenter Erreger und damit mutmaßlicher Übertragungen zwischen Patienten ist, wieviele Personen in der Umgebung mit diesen besiedelt oder infiziert sind, also der sogenannte Kolonisationsdruck.⁵² So wurden im Vergleich zu einem hohen Kolonisationsdruck mit VREfm andere wichtige Faktoren wie der Antibiotikaverbrauch, die enterale Ernährung oder die Adhärenz des Krankenhauspersonals in Bezug auf infektionspräventive Maßnahmen irrelevant.⁵² Das wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Transmissionsraten ESBL-produzierender *E. coli* im Vergleich zu den deutlich selteneren ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* zwar einerseits weniger als halb so groß sind, andererseits ESBL-*E. coli* trotzdem die Mehrzahl der nachgewiesenen Transmissionen verursachen.⁵³ Für ESBL-produzierende Enterobakterien wurde der potentielle Anteil des Kolonisationsdrucks am Neuerwerb basierend auf den Daten aus zwei multizentrischen Studien^{54,55} in 13 niederländischen Krankenhäusern mittels Monte Carlo Markov Chain-Modellen auf 28,5% geschätzt, der verbleibende Anteil des insgesamt niedrigen Neuerwerbs wurde über andere Transmissionswege oder Selektionsmechanismen erklärt.⁵³

Das ist umso bedeutender, als antimikrobielle Resistenzen auch außerhalb des Krankenhauses weit verbreitet sind. Durch Reisen in Länder mit hoher Prävalenz,²³ Kontakt zu Nutztieren⁵⁶ und der Umwelt⁵⁷ werden die Erreger erworben, über enge Haushaltskontakte weiterverbreitet⁵⁸ und sind somit oft schon

bei Aufnahme ins Krankenhaus vorhanden.²⁵ Somit muss über Präventionsmaßnahmen erreicht werden, dass die oft schon bei vielen Personen vorhandenen Resistenzen nicht unter den besonders vulnerablen Gruppen im Krankenhaus übertragen werden.

Vermutete Übertragungen konnten in den letzten Jahren in nie dagewesener Geschwindigkeit und Tiefe analysiert werden, da mit dem Next Generation Sequencing ein neues Zeitalter für die Sequenzierungstechniken eingeläutet wurde, und die dafür erforderliche Zeit sowie die Kosten radikal gesenkt werden konnten.^{9,59,60} Molekulare Analysen bei Kontaktpatientinnen von Trägern multiresistenter gramnegativer Erreger ergaben bisher sehr geringe Transmissionsraten.^{61,62} Untersuchungen der molekularen Epidemiologie mittels Ganzgenomsequenzierung können dazu beitragen, die Ausbreitung und Persistenz von multiresistenten enteralen Erregern besser zu verstehen und Präventionsmaßnahmen gezielter einzusetzen. Einschränkend muss hierbei betont werden, dass es derzeit noch keinen Goldstandard für die Analyse der Sequenzierergebnisse zur Identifikation von klonalen Transmissionsereignissen gibt. Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Analysemethoden vorgestellt.

Die bakterielle Vielfalt wird evolutionär durch spontane Punktmutationen angetrieben, welche Abweichungen einzelner Nukleotide (single nucleotide polymorphisms, SNPs) sowie Insertionen und Deletionen einzelner Nukleotide umfassen. Die Mutationsraten der Erreger können in Abhängigkeit vom Zustand der Trägerin, Umgebungsfaktoren und der Erregerdichte angepasst werden und variieren zwischen verschiedenen Spezies sowie auch innerhalb einer einzigen Spezies.⁶³⁻⁶⁵ Bakterielle Genome der gleichen Spezies verfügen über einen gemeinsamen Satz an Genen, das gemeinhin als Kerngenom bezeichnet wird.⁶³ Das akzessorische Genom umfasst Insertionen, Deletionen und Neuarrangements⁶⁶ von Genen sowie extrachromosomale Elemente wie Plasmide und Phagen.⁶³ Das Pangenom umfasst alle Bereiche zusammen.

Ein traditioneller Ansatz der molekulargenetischen Verifikation möglicher genetischer Verwandtschaft beinhaltete die Bestimmung und den Vergleich sogenannter multilocus sequence types (MLST) auf Basis bis zu sieben sogenannter Haushaltsgene, welche unabhängig von Zelltyp oder äußeren Einflüssen exprimiert werden.⁶⁷ Dieser wurde in den letzten Jahren auf die Kerngenom-MLST (core genome MLST, cgMLST) oder Ganzgenom-MLST (whole genome MLST, wgMLST) erweitert. Für viele Spezies wurden bereits kuratierte Sammlungen der den Kerngenomen zugeordneten Gene veröffentlicht (sogenannte Schemata), mit denen die eigenen Sequenzen verglichen werden können. Die cgMLST ermöglicht eine übergeordnete Nomenklatur, Vergleiche zwischen Laboren und kann gleichermaßen für die Aufarbeitung von Krankenhausausbrüchen sowie sektorübergreifende Public Health Analysen genutzt werden, wodurch sie insbesondere für Routineuntersuchungen geeignet ist.⁶⁸ Eine weitere Methode ist der SNP-basierte Ansatz, der auf einem Vergleich der einzelnen Punktmutationen der Sequenzen zu einem vorher festgelegten, nahe verwandten Referenzgenom beruht, was auch als Referenzkartierung (reference mapping) bezeichnet wird.^{69,70} Allerdings ist die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen

Studien und Laboren meist eingeschränkt, da in der Regel unterschiedliche Referenzgenome herangezogen, über unterschiedlich lange Zeiträume zusammengestellte Isolatkollektionen und somit evolutionär unterschiedlich weit entfernte Isolate betrachtet, verschiedene Analyseschritte wie z.B. die Maskierung rekombinanter Regionen durchgeführt und verschiedene Analyseprogramme mit ihren jeweiligen Fehlerquellen und Unsicherheiten verwendet werden.^{71,72}

Sowohl bei der cgMLST als auch bei SNP-basierten Verfahren kommen gegebenenfalls unterschiedliche Schwellenwerte zur Feststellung von Transmissionen zur Anwendung. Beide Verfahren ziehen für die Vergleiche und die Transmissionsanalysen nur die Regionen heran, welche in allen Isolaten, die verglichen werden sollen, vorhanden sind. Dadurch steht das akzessorische Genom für die Analysen in der Regel nicht zur Verfügung, das bei manchen Spezies einen großen Anteil der genetischen Information beinhaltet. Gerade bei genetisch diversen Spezies mit einem hohen Anteil an Rekombinationen wie den multiresistenten Enterokokken haben diese Verfahren also erhebliche Limitationen. In der Konsequenz könnte sowohl ein höherer als auch ein niedrigerer Verwandtschaftsgrad angenommen werden, als tatsächlich vorliegt.⁷² Als Alternativen wurden Methoden entwickelt, die auf einer direkten Analyse der verschiedenen Teilsequenzen eines sequenzierten DNA-Stranges, der sogenannten „K-mere“ basieren und die weder ein Referenzgenom noch vordefinierte Gene benötigen. Diese wurden aber bislang kaum für Transmissionsanalysen herangezogen.

Bei Überlegungen zu Ausbruchsanalysen muss bedacht werden, dass nicht alle während des Krankenhausaufenthaltes neu identifizierten multiresistenten enteralen Bakterien auf Transmissionen zurückzuführen sind, sondern teilweise schon vorher unterhalb der Nachweisgrenze vorhanden waren und erst durch Antibiotikatherapien⁷³ und wahrscheinlich auch weitere Substanzen⁷⁴ selektioniert und damit nachweisbar wurden.

1.5. Präventionsmaßnahmen im Krankenhaus

Da die Behandlungsoptionen für Infektionen mit multiresistenten Erregern eingeschränkt sind und die verbleibenden antimikrobiellen Substanzen - oft Reserveantibiotika - teilweise nicht zugelassen sind und zudem unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringen, haben Präventionsmaßnahmen einen besonderen Stellenwert. Grundsätzlich kann zwischen zwei Ansätzen unterschieden werden, um die Verbreitung multiresistenter Erreger einzudämmen, sogenannte vertikale und horizontale Strategien.

Als vertikale Strategien werden Maßnahmen bezeichnet, die gezielt für Patienten ergriffen werden, die mit bestimmten Pathogenen besiedelt oder infiziert sind. Manche Kolonisationen und Infektionen mit multiresistenten Erregern sind bei Aufnahme ins Krankenhaus bereits bekannt. In Deutschland ist laut IfSG §23 Absatz 8, Satz 10 bei Verlegung, Überweisung und Entlassung eine sektorenübergreifende Weitergabe der Information über notwendige „...Maßnahmen, die zur Verhütung und Bekämpfung von nosokomialen Infektionen und von Krankheitserregern mit Resistenzen“ verpflichtend. In allen Bundesländern ist die Nichtbeachtung dieser Vorgaben mit einer Ordnungswidrigkeit bewährt.⁷⁵ Allerdings

werden viele Patientinnen mit multiresistenten enteralen Erregern erstmalig während ihres Aufenthaltes im Krankenhaus identifiziert, entweder im Rahmen von klinischen Routineuntersuchungen oder durch gezielte Screeninguntersuchungen. Häufige vertikale Präventionsstrategien sind Kontaktisierungsmaßnahmen, die wahlweise eine Isolierung im Einzelzimmer oder eine Kohortierung bei Nachweis von identischen Erregern oder Resistenztypen im Mehrbettzimmer, in der Regel aber zusätzliche Barrieremaßnahmen wie die Nutzung von Schutzkitteln und/oder keimarmen Handschuhen bei Kontakt zum Patienten bzw. seiner nahen Kontaktflächen umfassen.

Im Gegensatz dazu kommen horizontale Strategien unabhängig vom Vorhandensein bestimmter Infektionserreger zum Einsatz. Dazu zählen Standardmaßnahmen wie die Händehygiene, routinemäßige Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen der patientennahen Oberflächen, desinfizierende Körperwaschungen oder Antibiotic Stewardship-Maßnahmen. Die Einzelmaßnahmen oder Maßnahmenbündel werden dabei nicht immer in exakt der gleichen Art und Weise für alle Patientinnen, sondern meist abteilungs- oder bereichsbezogen ergriffen.

1.6. Fragestellungen

Die vorliegende Habilitationsschrift hat das Ziel, die Epidemiologie und Präventionsmöglichkeiten von Kolonisationen und Infektionen mit enteralen multiresistenten Erregern im Krankenhaus zu untersuchen und zusammenfassende Schlussfolgerungen abzuleiten. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Wie häufig sind MRGN und VRE bei intensivmedizinisch versorgten Patienten in Deutschland?
- Ist die Kontaktisolierung als vertikale Präventionsstrategie über den Einsatz von Standardmaßnahmen hinaus geeignet, um die Verbreitung multiresistenter gramnegativer Enterobakterien im Krankenhaus einzudämmen?
- Welchen Einfluss haben Verzögerungen bei der Identifikation von multiresistenten gramnegativen Enterobakterien auf die Anwendbarkeit von Kontaktisierungsmaßnahmen?
- Haben auch andere therapeutisch eingesetzte Substanzen neben Antibiotika hinsichtlich des Neuerwerbs von multiresistenten gramnegativen Enterobakterien einen potentiell selektionierenden Effekt?
- Hat sich die molekulare Epidemiologie der VREfm an der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Laufe der Zeit verändert?
- Mit welchen molekulargenetischen Analysemethoden können Übertragungen von VREfm in der Routine am besten identifiziert werden?

2. Eigene Arbeiten

2.1. Vorkommen von MRGN und VRE bei intensivmedizinisch versorgten Patientinnen in Deutschland

Maechler F, Pena Diaz LA, Schroder C, Geffers C, Behnke M, and Gastmeier P. Prevalence of carbapenem-resistant organisms and other gramnegative MDRO in German ICUs: first results from the national nosocomial infection surveillance system (KISS). *Infection* 2015. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0701-6>. Erratum unter <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0701-6>. IF 2,29

Die Erreger-Surveillance im Rahmen des deutschen Systems zur Überwachung nosokomialer Infektionen (KISS) wurde entwickelt, um stationsbezogene epidemiologische Surveillance-Daten zu Kolonisationen und Infektionen mit multiresistenten Erregern zu liefern, darunter die multiresistenten gramnegativen Erreger (MRGN) sowie die Vancomycin-resistenten Enterokokken. Dafür ist eine Überwachung aller auf die Station aufgenommenen Patienten und eine standardisierte Dokumentation mitgebrachter und auf der Station neu festgestellter Fälle erforderlich.

Es gab im KISS im Rahmen der Infektionssurveillance im ITS-KISS-Modul zwar schon länger die Möglichkeit, den Besiedlungsstatus mit methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und VRE zu erfassen.⁷⁶ Bisher gab es aber noch keine Möglichkeit, für alle relevanten resistenten Pathogene einschließlich der MRGN auf stationärer Ebene systematisch den Besiedlungsstatus von Krankenhauspatienten zu erfassen, um die Häufigkeit von mitgebrachten und während des stationären Aufenthaltes neu erworbenen multiresistenten Erregern im zeitlichen Verlauf beobachten und mit strukturell ähnlichen Gesundheitseinrichtungen vergleichen zu können. Eine stationsbezogene Erfassung ist im Vergleich zu Daten, die auf Krankensebene erfasst werden besonders sinnvoll, da infektionspräventive Maßnahmen auf Stationsebene leichter veranlasst und durchgesetzt werden können. Entsprechende Surveillance-Module existieren sowohl für Intensivstationen als auch für Normalstationen. Intensivmedizinisch versorgte Patientinnen haben als besonders vulnerable Risikopopulation mit häufigen antibiotischen Therapien und invasiven Devices im Vergleich zu peripher behandelten ein erhöhtes Risiko für das Vorhandensein von multiresistenten Erregern, wodurch sie einen guten Indikator für die nationale Entwicklung darstellen.

Bei den hier vorgelegten Daten handelte es sich um Routinedaten aus Screeningabstrichen und oder klinischen Materialien, die im ersten Jahr nach Implementierung des neuen KISS-Moduls vom 1. Januar 2013 bis zum 31. Dezember 2013 auf 341 Intensivstationen entsprechend den Anforderungen des IfSG erhoben wurden. Insgesamt wurden 5.171 Fälle von MRGN, davon 848 mit Resistenz gegenüber Carbapenemen (16%), und 1.234 Fälle von VRE übermittelt. Die Gesamtprävalenz der VRE lag im Jahr 2013 bei 0,43, und die der MRGN bei 1,78 besiedelten oder infizierten pro 100 aufgenommenen Patienten, im

Vergleich dazu die der MRSA bei 1,60 pro 100 Patientinnen. Dabei waren unter den Personen mit Nachweis von VRE 0,24 (56%), von MRGN 1,28 (72%) und von MRSA 1,39 (87%) von 100 Patienten bereits zu Beginn des stationären Aufenthaltes besiedelt.

Im Vergleich zu etwas später durchgeführten klinischen Studien mit systematischem Screening aller Patientinnen^{25,55} waren die hier erhobenen Daten zur Aufnahmeprävalenz und Inzidenz von MRGN und VRE vergleichsweise niedrig. Trotzdem lag die Gesamtprävalenz der MRGN als heterogener Gruppe verschiedener Erreger anteilmäßig bereits vor MRSA, und bezogen auf stationär erworbene Infektionen mit den jeweiligen multiresistenten Erregern war die Inzidenzdichte bei MRGN fast dreimal so hoch wie bei MRSA.

Grundsätzlich ist allerdings davon auszugehen, dass nicht alle asymptomatischen Kolonisationen mit multiresistenten enteralen Erregern in den Intensivstationen erkannt werden, wohingegen der Kolonisationsstatus für MRSA aufgrund des begrenzteren und besser zugänglicheren Habitats einfacher und sicherer feststellbar ist.

2.2. Vorteile der Kontaktisolierung im Vergleich zu Standardmaßnahmen zur Prävention der Verbreitung von ESBL-bildenden Enterobakterien auf Normalstationen in der endemischen Situation

Maechler F, Schwab F, Hansen S, et al. Contact isolation versus standard precautions to decrease acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales in non-critical care wards: a cluster-randomised crossover trial. *The Lancet Infectious diseases*, 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30626-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30626-7). IF 25,0

Die Frage, ob Barrierepflege überhaupt einen Mehrwert gegenüber Standardmaßnahmen bei der Prävention des Neuerwerbs von ESBL-bildenden Enterobakterien (ESBL-E) hat, untersuchten wir in einer cluster-randomisierten multizentrischen Studie mit Crossover-Design in vier europäischen Ländern mit unterschiedlichen Gesundheitssystemen. Dafür wurden in 20 chirurgischen und nicht-chirurgischen Stationen in Deutschland, Spanien, den Niederlanden und der Schweiz ein Jahr lang alle ESBL-E Träger mit Barrieremaßnahmen zusätzlich zu den Standardmaßnahmen kontaktisoliert und ein weiteres Jahr nur mit Standardmaßnahmen behandelt. Carbapenem-resistente Enterobakterien waren davon explizit ausgenommen.

Kontaktisolierung umfasste eine Unterbringung möglichst im Einzelzimmer bzw. in Mehrbettzimmern mit räumlicher Abgrenzung oder eine Kohortenisolierung bei ESBL-E-Nachweis. Eine Barrierepflege mit Kitteln und Handschuhen bei Berührung der Patienten oder deren unmittelbarer Umgebung zusätzlich zu den Standardmaßnahmen war immer erforderlich. Eine Gruppe von Stationen startete dabei mit Kontaktisolierung, die andere Gruppe startete mit Standardmaßnahmen, wobei die Gruppenzuteilung randomisiert mittels eines computerbasierten Blockverfahren erfolgte. Nach einem Jahr wechselten alle Stationen zur jeweils anderen Strategie (Crossover). Ein Crossover-Design ist ein sehr starkes Studiendesign, weil alle Stationen die beiden zu vergleichenden Interventionen anwenden und damit sehr viele Störfaktoren wegfallen, welche die Ergebnisse verzerren könnten. Zur Identifikation der ESBL-E-Trägerinnen wurden tiefe Rektalabstriche bei Aufnahme, wöchentlich während des stationären Aufenthaltes und bei Entlassung entnommen. Die mikrobiologische Diagnostik erfolgte lokal in den jeweiligen Laboren der beteiligten Universitätskliniken nach einem standardisierten Protokoll, um eine möglichst zeitnahe Ergebnismitteilung zu garantieren.

Zwischen Januar 2014 und August 2016 wurden 38.357 Patientinnen mit einer Aufenthaltsdauer von mehr als zwei Tagen aufgenommen. Für die Per-Protokoll-Analyse war das Vorhandensein von mindestens zwei Abstrichen und ein Aufenthalt von mindestens sieben Tagen auf der Station erforderlich, so dass eine Aussage über den stationären Neuerwerb von ESBL-Bildnern überhaupt möglich war. Unter den 15.184 Patienten mit einer Aufenthaltsdauer über einer Woche wurden 11.368 (75%) mindestens zweimal gescreent. Die Aufnahmeprävalenz lag in der Kontaktisierungsphase bei 12,0%, in der Standardmaßnahmenphase bei 12,4%. Auch die Compliance mit der Händehygiene (62,1% versus 61,3%)

und der systemische Antibiotikaverbrauch (nach dem ATC-Code J01: 635 versus 626 definierte Tagesdosen pro 1000 Belegungstage) unterschieden sich in den beiden Phasen nicht. ESBL-E galten nur bei einem Nachweis nach mehr als drei Tagen und bei mindestens einem vorherigen Abstrich als neu erworben. Die Inzidenzdichte neuerworbener ESBL-Bildner wurde bezogen auf die Tage unter Risiko dargestellt, also die „ESBL-freien“ Tage ab dem ersten negativen Abstrich bis zum letzten negativen bzw. bis zum ersten positiven Abstrich. Die Inzidenzdichten neu erworbener ESBL-Bildner waren in den Phasen mit und ohne Kontaktisolierung mit Inzidenzdichten von 6,0 versus 6,1 pro 1000 Risikotagen (entsprechend einer Inzidenz von 6,5 pro 100 Aufnahmen in beiden Phasen) nicht zu unterscheiden. Die multivariable Analyse schloss Risikofaktoren ein, die sich in den beiden Phasen unterschieden, adjustierte entsprechend nach der Gesamtliegezeit, der Aufnahmeprävalenz und dem prozentualen Screeninganteil aller Patientinnen und ergab keinerlei Assoziation zwischen Kontaktisierungsmaßnahmen und dem ESBL-Neuerwerb (Inzidenzratenverhältnis 0,99; 95% Konfidenzintervall 0,80-1,22).

Es gibt eine Reihe möglicher Erklärungen für die fehlende Wirksamkeit der Kontaktisolierung, welche in der Originalarbeit detailliert diskutiert werden. Kurz zusammengefasst könnte z.B. die Kontaktisolierung qualitativ und quantitativ nicht ausgereicht haben, um Transmissionen zu verhindern. Einerseits war ein zeitlicher Verzug zwischen der Abnahme des Screenings und dem Beginn der Kontaktisierungsmaßnahmen zu beobachten, der bei nicht bereits vorher bekannten ESBL-E Patienten im Median vier Tage betrug. Dadurch konnten nur zwei Drittel aller Belegungstage mit nachgewiesener ESBL-E-Trägerschaft isoliert werden, obwohl die Screeningfrequenz im Vergleich zur klinischen Routine deutlich erhöht war. Weiterhin hätte eine vollständige Compliance mit den Interventionsmaßnahmen möglicherweise Transmissionen verhindern können. Es gibt allerdings einen klaren Zusammenhang zwischen einem Anstieg isolationspflichtiger Patientinnen und einer Abnahme der Compliance mit den erforderlichen Hygienemaßnahmen.⁷⁷ Die Gesamtlast an ESBL-E-Patienten bzw. der Kolonisationsdruck in unserer Studienpopulation war hoch, und es existierte eine erhebliche Variabilität in Bezug auf die Aufnahmeprävalenz und den Neuerwerb von ESBL-E zwischen den verschiedenen Stationen. In Stationen mit Risikopopulationen und einer langen Aufenthaltsdauer könnte es vermehrt zu Transmissionen kommen, so dass diese verstärkt von Kontaktisierungsmaßnahmen profitieren könnten. Wir fanden allerdings weder bei der Berücksichtigung aller Patientinnen unabhängig von ihrer Liegezeit (Intention-to-treat-Analyse) noch bei der Per-Protokoll-Analyse (Population mit mehr als sieben Tagen Liegezeit) und Adjustierung nach der Liegezeit einen Hinweis für einen Interventionseffekt.

Die Ergebnisse dieser Studie haben einen hohen Stellenwert, da es vorher noch keine randomisierte kontrollierte Studie zu dem Thema gab, durch das cluster-randomisierte Crossover Design Störfaktoren weitgehend ausgeschlossen werden konnten und durch die Durchführung in vier verschiedenen Ländern mit verschiedenen Gesundheitssystemen eine hohe Übertragbarkeit gegeben ist.

2.3. Quantifizierung des zeitlichen Verzugs zwischen Screeninguntersuchungen und folgender Kontaktisolierung bei Nachweis von ESBL-produzierenden Enterobacterales

Maechler F, Schwab F, Hansen S, et al., Quantification of time delay between screening and subsequent initiation of contact isolation for carriers of ESBL-producing Enterobacterales: a subgroup analysis of the R-GNOSIS WP5 trial. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2022. <https://doi.org/10.1017/ice.2022.285>. IF 2021 6,52

Für die Primäranalyse der vorher unter 3.2 besprochenen Arbeit zur Fragestellung, ob sich die Neuerwerbsraten von ESBL-E zwischen den Studienzeiträumen mit Standardmaßnahmen und Kontaktisolierung unterscheiden, betrachteten wir durch die Bedingung von mindestens zwei Abstrichen nur eine Untergruppe der großen Studienpopulation mit mindestens einem Screeningabstrich, welche mehr als 30.000 Patienten umfasste.

Um die Ergebnisse zum nicht vorhandenen Nutzen der Kontaktisolierung zur Prävention der Weiterverbreitung von ESBL-E im Krankenhaus besser zu verstehen, führten wir eine Post-hoc-Analyse zum schon in der Hauptarbeit diskutierten zeitlichen Verzug zwischen der Abnahme des Screenings und dem Beginn der Kontaktisolierung durch. Dafür benutzten wir nun die Daten aller Patientinnen mit einer Aufenthaltsdauer von mindestens zwei Tagen und mindestens einem Screeningabstrich, die während der Kontaktisierungsphase in den 20 Nicht-Intensivstationen aufgenommen wurden. Dabei handelte es sich um 16.091 gescreente unter 19.122 Patienten mit der für ein Aufnahmescreening erlaubten Aufenthaltszeit von mehr als zwei Tagen, was einer Screening-Compliance von über 84% entsprach. Die Datenerfassung umfasste den Tag der Probenahme, den Tag, an dem die Stationen über das Ergebnis informiert wurden, sowie die folgenden ESBL-E-Isolationstage.

Im Median dauerte es nach der Aufnahme zwei Tage, bis die erste Probenentnahme durchgeführt wurde. Von den insgesamt 2.078 ESBL-E-Trägern wurden 1.478 durch Screeningabstriche auf den Studienstationen neu identifiziert (71%), 600 hatten bereits vor Aufnahme auf die Studienstationen einen ESBL-E-Nachweis in der Anamnese (29%). Während des stationären Aufenthaltes blieben 854 ESBL-E-Trägerinnen (41%) ohne Kontaktisolierung, wobei die Liegezeit der nicht isolierten mit im Median fünf Tagen im Gegensatz zu den isolierten Patientinnen mit einer Gesamtliegezeit von im Median zwölf Tagen sehr kurz war. Bezogen auf die Belegungstage, an denen die Besiedlung oder Infektion mit ESBL-bildenden Erregern bereits bekannt waren (ESBL-E-Tage), wurden die ESBL-E-Träger an 6.040 von insgesamt 18.698 ESBL-E-Tagen nicht isoliert (32%). Von den im Laufe der Studie neu identifizierten 1.478 Kolonisationen oder Infektionen mit ESBL-E ohne vorherigen ESBL-E-Nachweis in der Vorgeschichte (71% von 2.078 ESBL-E-Trägerinnen) wurden 697 (34%) mit einer Zeitverzögerung von vier Tagen in Kontaktisolation untergebracht, was 2.723 nicht isolierten ESBL-E-Tagen (15% der ESBL-E-Tage) entspricht.

Das umfassende Screeningprotokoll mit Screeningabstrichen bei Aufnahme, mit wöchentlichen Folgeabstrichen und bei Entlassung überstieg die üblichen Screeningmaßnahmen der klinischen Routine bei weitem. Trotzdem konnten aufgrund der Zeitverzögerung bei kulturbasierten Screening-Verfahren fast ein Drittel aller ESBL-E-Patienten an Tagen mit Kolonisation nicht isoliert werden. Da gezielte, auf identifizierte ESBL-E-Träger ausgerichtete Präventionsmaßnahmen wie die Kontaktisolierung aufgrund der Einschränkungen bei einer routinemäßigen ESBL-E-Erkennung unter real life-Bedingungen nicht rechtzeitig und umfassend umgesetzt werden können, sollten sich die Bemühungen zur Eindämmung der Ausbreitung von ESBL-E innerhalb des Krankenhauses auf horizontale Maßnahmen konzentrieren.

2.4. Einfluss von therapeutischen Substanzen auf den Neuerwerb von ESBL-produzierenden Enterobakterien in einem deutschen Universitätskrankenhaus

Klauke P, Schwab F, **Maechler F**, et al., The impact of non-antimicrobial drug agents on the acquisition of ESBL-producing Enterobacterales in non-critical care wards in a German university hospital: an exploratory, matched case-control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2022. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab373>. IF 5,76

Ob es sich bei während des Krankenhausaufenthaltes neu identifizierten Erregern um Transmissionen handelt oder ob sie möglicherweise mitgebracht und in einem Screening bei Aufnahme in einer Konzentration unterhalb der Nachweisschwelle vorhanden waren, ist mit einer rein zeitlichen Definition zur Diskriminierung zwischen mitgebracht und nosokomial nicht feststellbar. Antibiotika können, wie eingangs schon besprochen, mit massiven Veränderungen des Darmmikrobioms einhergehen⁷⁸ und multi-resistente Bakterien im Darm selektionieren.⁷⁹ Aber auch für andere häufig therapeutisch eingesetzte Substanzen wie Metformin, Protonenpumpenhemmer (PPI), nicht-steroidale Antiphlogistika und atypische Antipsychotika wurden bereits Veränderungen des Darmmikrobioms nachgewiesen.⁸⁰

Mit dieser Arbeit gingen wir erstmalig systematisch der Frage nach, inwieweit auch andere Substanzen als Antibiotika mit einem neuen Nachweis von ESBL-E assoziiert sind. Dafür untersuchten wir, ob Patientinnen mit neuem nosokomialen Nachweis von ESBL-E vorher häufiger mit bestimmten Medikamenten behandelt wurden, als wenn sie während des gesamten stationären Aufenthaltes negativ getestet wurden. Eine solche Untersuchung kann nur in einer Studienpopulation durchgeführt werden, für die bekannt ist, ob die ESBL-E bereits bei Aufnahme vorhanden sind und systematisch der Neuerwerb kontrolliert wird. Normalerweise werden Patienten weder bei Aufnahme noch während des stationären Aufenthaltes routinemäßig auf das Vorhandensein von ESBL-E untersucht. Die Studie 3.2. bot die Möglichkeit, diese Fragestellung für die Subgruppe in der Charité in einem Fall-Kontrollansatz zu adressieren.

In einer explorativen, gematchten, eingebetteten Fall-Kontroll-Studie griffen wir auf Daten zurück, die im Rahmen der unter 3.2. aufgeführten Studie an acht Nicht-Intensivstationen einer großen deutschen Universitätsklinik über zwei Jahre erhoben wurden und umfangreiche Screeninguntersuchungen auf ESBL-E bei Aufnahme, während des stationären Aufenthaltes und bei Entlassung enthielten. Dabei handelte es sich um fünf chirurgische und drei internistische Normalstationen. Die Fälle umfassten Patientinnen mit einem nosokomialen Nachweis von ESBL-*E. coli* und *K. pneumoniae*, welche im Verhältnis 1:1 Kontrollen mit negativen Abstrichen auf ESBL-E zugeordnet wurden. Beim Matching wurden die Station, die Anzahl der erfolgten Screeningabstriche, die Anzahl der Tage unter Risiko sowie der Charlson-Komorbiditätsindex berücksichtigt. Für alle Fälle und Kontrollen wurden tagesbezogen die Verordnungen und die Applikationsart zu allen verabreichten Medikamenten nach dem anatomisch-therapeutisch-chemischen Klassifikationssystem (ATC) erhoben. Potentielle Risikofaktoren für den ESBL-E Neuerwerb wurden mittels einer bedingten logistischen Regressionsanalyse identifiziert.

Insgesamt konnten 232 Fällen mit nosokomialen ESBL-*E. coli* oder ESBL-*K. pneumoniae* Erwerb Kontrollen gegenübergestellt werden und waren hinsichtlich ihres Alters, Geschlechts und Komorbiditätsindex, ihrer Screeninghäufigkeit und sowie der Liegezeit vergleichbar. Bei 189 Fällen (81,5%) wurde ESBL-*E. coli* nachgewiesen, bei 36 (15,5%) ESBL-*K. pneumoniae*, bei den restlichen Fällen wurden beide Erreger nachgewiesen. Am häufigsten wurden Arzneimittel gegen säurebedingte Erkrankungen, Analgetika und Antibiotika verordnet. Die Auswertung ergab, dass auch andere Medikamente als Antibiotika mit einem direkten Effekt auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota das Risiko für einen neuen ESBL-E-Nachweis erhöhten, z.B. Opioide (Odds Ratio, OR 1,06; 95% Konfidenzintervall, KI 1,007-1,12) oder Glukokortikoide (OR 1,07; 95% KI 1,001-1,13). Aber auch für Substanzen ohne einen solchen direkten Pathomechanismus konnte ein deutlicher Einfluss gezeigt werden, z.B. für β 2-Rezeptor-Agonisten (OR 1,31; 95% KI 1,105-1,55), was sich möglicherweise über beigefügte Konservierungsmittel und Koselektionsprozesse erklären lässt. Einige Arzneimittel kamen nur selten zum Einsatz, so dass in einer Sensitivitätsanalyse nur die Substanzen untersucht wurden, welche mindestens 50 Patienten verschrieben worden waren. In der Sensitivitätsanalyse verblieben nur noch die PPI als signifikante Risikofaktoren für den ESBL-E-Neuerwerb.

Diese retrospektive, explorative Beobachtungsstudie konnte natürlich keine Kausalzusammenhänge aufdecken, sondern nur Assoziationen zwischen der Verordnung bestimmter Arzneimittel und dem neuen Nachweis von ESBL-E. Wenn sich in anschließenden Arbeiten selektierende Eigenschaften bestimmter Substanzen bestätigen ließen, läge hier eine mögliche neue therapeutische bzw. prophylaktische Interventionsmöglichkeit, um Besiedlungen bzw. nachweisbaren Überwucherungen mit ESBL-E zu reduzieren.

2.5. Zunahme bestimmter Stammtypen von VREfm an der Charité

Weber A, Maechler F, Kola A et al., Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain type ST117 CT71 at Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2008 to 2018. Antimicrobial resistance and infection control, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00754-1>. IF 4,88

Neben ESBL-bildenden Enterobakterien sind in den letzten Jahren insbesondere Vancomycin-resistente Enterokokken in den Fokus gerückt, da diese seit 2012 zunehmend in deutschen Gesundheitseinrichtungen beobachtet wurden.⁸¹ Auch die Surveillance-Daten aus KISS zeigten diesen starken Anstieg. So stieg in der unter 2.1 vorgestellten Erregersurveillance in Intensivstationen die Gesamtprävalenz von Besiedlungen oder Infektionen mit VRE von 0,43 im Jahr 2013 auf 2,00 pro 100 Patienten im Jahr 2019. Andere KISS-Module zur Surveillance von postoperativen Wundinfektionen oder zu nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen konnten diese Entwicklung bestätigen.⁸² Die Ursachen für diesen Anstieg sind bisher nicht sicher geklärt. Möglicherweise ist der Anstieg dadurch bedingt, dass durch zufällige genetische Drift oder durch Selektionsprozesse in den letzten Jahren andere Genotypen aufgetreten sind, welche eine Verbreitung der Population begünstigten.⁸³

Am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin wurden im Zeitraum von 2017-2019 im Rahmen von verschiedenen Ausbruchsanalysen mittels Ganzgenomsequenzierung festgestellt, dass bestimmte Stammtypen von VREfm gehäuft identifiziert wurden. Da vor 2017 Ganzgenomsequenzierung noch nicht als Routinemethode etabliert war, konnten wir nicht abschätzen, seit wann diese Häufung bestand. Weiterhin war unbekannt, ob es sich um ein lokales Geschehen handelte, oder ob der Stammtyp regional bereits zirkulierte und die Patientinnen bereits bei Aufnahme damit besiedelt waren. Deshalb sollte in dieser Arbeit retrospektiv für einen Zeitraum von zehn Jahren von 2008 bis 2018 die molekulare Epidemiologie von VREfm-Stammtypen systematisch untersucht werden. Dafür wurden nur Isolate betrachtet, die unabhängig von Ausbruchssituationen und ohne erkennbaren epidemiologischen Zusammenhang entnommen wurden.

Für alle Isolate wurde nach einer Ganzgenomsequenzierung die für Routineuntersuchungen besonders geeignete allelbasierte Analyse des Kerngenoms (cgMLST-Analyse) auf Basis des publizierten Schemas mit 1423 Targets⁸⁴ und einem Schwellenwert von ≤ 20 Allelen für eine Clusterzuordnung durchgeführt und Sequenztypen und Complexotypen (ehemals Clustertypen) bestimmt (Illumina MiSeq Plattform, Ridom SeqSphere+ Software). Darüber hinaus wurden Resistenzgene und Virulenzgene gezielt untersucht sowie eine Pangenomanalyse durchgeführt, um das Auftreten von häufigen Genen bei den verschiedenen Stammtypen feststellen zu können. Potentielle Risikofaktoren auf Patientenseite für das Auftreten bestimmter Sequenz- und Complexotypen wie das Alter und Geschlecht, die Liegedauer, sowie der Entnahmeort, das Kalenderjahr und die Stationsart wurden mit multivariablen logistischen Regressionsmodellen untersucht.

Unter insgesamt 120 Isolaten aus den Jahren 2008, 2013, 2015 und 2018 konnten wir einen Anstieg der ST117-VREfm-Stämme von 17% im Jahr 2008 auf 57% im Jahr 2018 um mehr als das Dreifache nachweisen. Für die ST117-Stämme wurden über die Jahre verschiedene dominierende Complextypen festgestellt, deren Art und Anteil variierten. So waren in 2008 CT190 mit 10%, in 2013 CT24 mit 17% und in 2015 CT36 mit 33% und in 2018 CT71 mit 43% die jeweils häufigsten Complextypen. Bei 80% aller ST117-Isolate wurde im Jahr 2008 der VanA-Genotyp nachgewiesen, im Jahr 2018 lediglich bei 6%. Alle CT71-Isolate waren vanB-positiv.

Die Risikofaktorenanalyse erbrachte keine mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten von ST117-Isolaten. Allerdings konnten bestimmte Gene bei ST117 identifiziert werden, welche die Zellwandadhäsion sowie die Bildung von Biofilmen begünstigen. Spezifische Resistenzgene oder Virulenzfaktoren, welche charakteristisch für die CT71-VREfm-Stämme waren und somit einen Überlebensvorteil gegenüber anderen ST117 und somit die zunehmende Verbreitung hätten erklären können, konnten aber nicht identifiziert werden. Allerdings zeigte die Pangenomanalyse, dass durchaus Gene bzw. Gengruppen im akzessorischen Genom der ST117 CT71-Stämme Unterschiede im Vergleich zu anderen ST117 aufwiesen.

Die Dominanz der ST117-VREfm-Stämme und insbesondere der ST117 CT71-Stämme sowohl im Ausbruchs- als auch im Nichtausbruchs-Setting in den letzten Jahren konnte in dieser Arbeit nur beschrieben, nicht aber begründet werden. Möglicherweise sind nicht einzelne Gene dafür verantwortlich, sondern eine Kombination bestimmter Faktoren, möglicherweise insbesondere im akzessorischen Genom. In der Zwischenzeit wurde ebenfalls eine überregionale Verbreitung der ST117 CT71-Stämme aus dem Großraum Frankfurt,⁸⁵ aus Bayern,⁸⁶ aus Aufnahmeuntersuchungen sechs verschiedener deutscher Universitätskliniken⁸⁷ sowie vom Nationalen Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken aus elf der sechzehn Bundesländer berichtet.³⁰

Angesichts des endemischen Vorkommens von ST117 CT71 war die Schlussfolgerung, dass bei vermuteten ST117 CT71- VREfm Ausbrüchen im Krankenhaus auch die epidemiologischen Zusammenhänge berücksichtigt werden müssen, statt einzig die Ergebnisse der Molekulargenetik zu betrachten.

2.6. Andere molekulargenetische Analysemethoden zur Detektion von Transmissionen bei VREfm

Maechler F, Weber A, Schwengers O, et al., Split k-mer analysis compared to cgMLST and SNP-based core genome analysis for detecting transmission of vancomycin-resistant enterococci: Results from routine outbreak analyses across different hospitals and hospitals networks in Berlin, Germany. *Microbial Genomics*, 2023. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000937>. IF 2021 4,87

Aufgrund der unter 2.5 festgestellten Häufungen bestimmter VREfm-Stammtypen, untersuchten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen molekulargenetische Analysemethoden, ob es sich bei VREfm-Häufungen um Erregerübertragungen handelte. Dafür verwendeten wir die Ausbruchsdaten der klinischen Routine aus insgesamt sieben Krankenhäusern in Berlin. Damit konnten potentiell einrichtungsübergreifende Erregerhäufungen mit deutlich unterschiedlichen epidemiologischen Umgebungen abbilden.

Neben der cgMLST-Bestimmung, die über viele Jahre der Standard in den meisten Laboren war, welche in Deutschland Sequenzieruntersuchungen für VRE durchführen, wurde die weltweit verbreitete, aber vergleichsweise aufwendige Untersuchung einzelner Basenabweichungen im Kerngenom (Core-SNP-Analyse), sowie eine 2022 erstmalig für eine entsprechende Fragestellung verwendete und für die Routinediagnostik geeignete Methode, die sogenannte Split K-mer-Analyse (SKA), eingesetzt.^{88,89} Sowohl cgMLST als auch Core-SNP-Analysen sind relativ aufwendig, da die einzeln sequenzierten DNA-Abschnitte (reads) zunächst ausgerichtet und angeordnet werden müssen, woraufhin im Anschluss das Kerngenom identifiziert und verglichen werden kann. Im Gegensatz dazu sind K-mer-basierte Methoden bezogen auf die Rechnerleistung deutlich schneller, da die „reads“ der jeweiligen bakteriellen Genome direkt miteinander verglichen werden. Als Schwellenwerte für die Zuordnung zu Gruppen von molekulargenetisch nicht unterscheidbaren Isolaten (Cluster) nutzten wir publizierte Daten.⁸⁹ Weiterhin untersuchten wir anhand der Patientendaten, inwieweit die mit den verschiedenen molekulargenetischen Ansätzen identifizierten Transmissionen durch beobachtete epidemiologische Zusammenhänge im Krankenhaus erklärt werden konnten.

Von den 693 VREfm-Stämmen, die zwischen 2014 und 2021 im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen sequenziert worden waren, gehörten 475 zu sechs großen cgMLST-Gruppen (Clustern), die sich jeweils über mehrere Jahre und verschiedene Krankenhäuser verteilten. Die Untersuchung der 475 Isolate mit der Core-SNP-Analyse als auch mit SKA ergab, dass deutlich weniger Isolate mit diesen Methoden zu Clustern gruppiert wurden (N=278, 58,6% für die Core-SNP-Analyse und N=214, 45,1% für SKA). Weiterhin wurden mehr und kleinere Cluster als mit cgMLST identifiziert, und ein deutlich größerer Anteil der Transmissionen konnte durch zeitliche und räumliche Überschneidungen der stationären Aufenthalte epidemiologisch begründet werden.

Leider konnte bisher kein Goldstandard zur molekulargenetischen Analyse von Erregerhäufungen im Krankenhaus etabliert werden. Ein Ausschluss potentieller Transmissionsereignisse ist aber notwendig, um Maßnahmen gezielt einsetzen oder anpassen zu können. Bisher üblicherweise zur Routinediagnostik eingesetzte Verfahren (cgMLST) konnten in unserer Arbeit nicht mit epidemiologischen Beobachtungen in Einklang gebracht werden. Die im Vergleich höher auflösende Core-SNP-Analyse und insbesondere SKA korrelierten besser mit der Epidemiologie. Weil SKA darüber hinaus schnell und mit wenigen Kommandozeilen einfach anzuwenden ist, empfiehlt sich diese Methode für die zukünftige Routinediagnostik vermuteter VREfm-Ausbrüche im Krankenhaus.

3. Diskussion

Krankenhäuser haben zunehmend Schwierigkeiten, mit der Ausbreitung antimikrobieller Resistenz unter den Patienten umzugehen. Dabei ist die Situation im Krankenhaus allerdings aufgrund der vielfältigen Verbreitungswege zwischen Mensch, Tier und Umwelt nur ein Teilaspekt eines deutlich größeren weltweiten Problems.⁹⁰ So bringen die Patienten die multiresistenten Erreger zunehmend bereits bei Aufnahme mit,^{25,87} womit gleichzeitig auch das Reservoir für potentielle Transmissionen im Krankenhaus zunimmt. Um Antibiotikaresistenzen langfristig und nachhaltig einzudämmen, ist deshalb auch eine Reduktion der Antibiotikaresistenzen im ambulanten Sektor, eine globale Zusammenarbeit unter Einbindung von Hochprävalenzländern mit häufigem Vorkommen resistenter Erreger im Sinne des Global Health-Konzeptes sowie eine fächerübergreifende Zusammenarbeit der Humanmedizin, Veterinärmedizin und der Umweltwissenschaften im Sinne des sogenannten One Health-Ansatzes erforderlich.

Die in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten hatten zum Ziel, das Vorkommen und die Verbreitung von multiresistenten enteralen Erregern im Krankenhaus besser zu verstehen und Präventionsstrategien zu ihrer Eindämmung zu untersuchen. Mögliche Strategien wie Surveillance, Screening und Kontaktisolierung, Stewardship sowie die Aufklärung von Transmissionsereignissen über molekulargenetische Verfahren sind arbeitsaufwendige und kostenträchtige Verfahren, die zielgenau eingesetzt werden sollten. Um die Ressourcen möglichst effektiv einzusetzen sowie gezielte Präventionsmaßnahmen zu entwickeln und ihren Erfolg zu beurteilen, muss das Vorkommen der Erreger in den jeweiligen Bereichen bekannt sein und im zeitlichen Verlauf kontrolliert werden. Die Arbeit 2.1 untersuchte die Epidemiologie multiresistenter enteraler Erreger im Krankenhaus mittels longitudinaler Surveillance- und klinischer Routinedaten in einer Hochrisikopopulation als Surrogat für die Situation im Krankenhaus. In den Arbeiten 2.2 und 2.3 wurden mit Screeninguntersuchungen und anschließender Kontaktisolierung einerseits und alleinigen Basismaßnahmen andererseits die häufigsten gezielten und ungezielten Präventionsmaßnahmen analysiert, welche Transmissionen zwischen Patienten vermeiden sollen. Neben Transmissionen stellt auch der Selektionsdruck einen maßgeblichen Faktor für die Verbreitung antimikrobieller Resistenz im Krankenhaus dar, da hier vulnerable Risikopopulationen mit einer großen Anzahl verschiedener Substanzen in Kontakt kommen, welche die Komposition der Mikrobiota direkt und indirekt beeinflussen können. Der durch die Behandlung mit Antibiotika entstehende Selektionsdruck ist gut bekannt, und es gibt bereits vielfach Anstrengungen, diesen über Antibiotic Stewardship-Maßnahmen zu beeinflussen.⁹¹ Die unter 2.4 vorgestellte Arbeit hat erstmals einen potentiell durch andere Pharmaka als Antibiotika vermittelten Selektionsdruck systematisch in Bezug auf den Neuerwerb multiresistenter gramnegativer Enterobakterien analysiert. Da die zur Eindämmung von Selektionsprozessen und von Transmissionsketten notwendigen Präventionsansätze fundamental verschieden sind, müssen Erreger, die aufgrund solcher Selektionsprozesse erst nachweisbar wurden, aber vorher bereits vorhanden waren, sicher von Transmissionsketten im Krankenhaus unterschieden werden. Des-

halb kamen in den Arbeiten 2.5 und 2.6 neue molekulargenetische Methoden der Ganzgenomsequenzierung zur Anwendung, um Epidemiologie und Transmissionen multiresistenter enteraler Erreger besser zu verstehen.

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeiten vor den übergeordneten Zielen diskutiert, das Vorkommen multiresistenter enteraler Erreger im Krankenhaus zu überwachen, sowie Transmissionen und Selektionsprozesse zu erkennen und zu vermeiden.

3.1. Vorkommen von Besiedlungen und Infektionen mit MRGN und VRE in deutschen Krankenhäusern

In der unter 2.1 vorgestellten Publikation konnten wir erstmalig flächendeckend in standardisierter Weise die Häufigkeit multiresistenter enteraler Erreger bei intensivmedizinisch versorgten Patientinnen in Deutschland ermitteln. Wie oben erwähnt können die Surveillancedaten von Intensivpatienten bzgl. des Vorkommens antimikrobieller Resistenz als Indikator für die nationale Entwicklung in Krankenhäusern genutzt werden. Die für 2.1 entwickelte Methode wurde auch für periphere Stationen erweitert. Dabei zeigt sich eine ähnliche Situation hinsichtlich der relativen Häufigkeiten der verschiedenen Erreger- und Resistenztypen, aber im Vergleich zu intensivmedizinisch versorgten Patientinnen auf einem deutlich niedrigeren Niveau.⁹²

Surveillancedaten sind besonders relevant, um das Auftreten von Infektionen mit resistenten Erregern vor dem Hintergrund der vorhandenen Erregerlast beurteilen zu können. Ein wesentlicher Bestandteil dabei ist die Unterscheidung mitgebrachter und neu im Krankenhaus festgestellter Erreger aufgrund möglicher Implikationen für Präventivmaßnahmen. Auch wenn Surveillancedaten der klinischen Routine im Vergleich zu klinischen Studien mit einheitlichem Studienprotokoll insbesondere hinsichtlich der Art, der Indikation und des Umfangs der Diagnostik Limitationen haben, stellen sie dennoch wertvolle Bezugsgrößen zum Benchmarking und zur Beurteilung zeitlicher Trends dar und können zudem die Entwicklung in einer vergleichsweise großen Anzahl von Krankenhäusern widerspiegeln.

Der Vergleich der 2013 implementierten Surveillance aus 2.1 mit den Referenzdaten 2021 zeigt den Stellenwert einer prospektiven Surveillance nach standardisiertem Protokoll, da mittlerweile die Daten aus neun Erfassungsjahren und 585 Intensivstationen zur Verfügung stehen.⁹³ Die Referenzdaten werden für Fünfjahreszeiträume berechnet, um aussagekräftige Raten auch für die vielen Subgruppen der einzelnen Erregerspezies, Resistenztypen und Stationsarten zu erhalten. Daraus ist ersichtlich, dass die Häufigkeit multiresistenter enteraler Erreger in Intensivstationen seit der Implementierung des Surveillance-Moduls deutlich zugenommen hat. So hat sich die Gesamtprävalenz von Kolonisationen und Infektionen mit MRGN-*E. coli* und MRGN-*K. pneumoniae* laut den Referenzdaten für den Zeitraum 2017 bis 2021 im Vergleich zum Surveillancebeginn 2013 (2.1) mehr als verdoppelt.⁹³⁻⁹⁵ Bei gesonderter Betrachtung der besonders problematischen 4MRGN-*E. coli* und -*K. pneumoniae* zeigte sich ebenfalls

ein deutlicher Anstieg,⁹³⁻⁹⁵ obwohl möglicherweise nicht alle Fälle detektiert wurden, weil die Diagnostik auf Carbapenemasegene oft noch unvollständig ist.⁹⁶ Die Häufigkeit bekannter VRE-Träger hat sich seit 2013 (2.1) sogar mehr als vervierfacht.^{93,94} Den größten Zuwachs zeigten allerdings die schon bei Beginn des Aufenthalts bekannten und damit von außerhalb mitgebrachten Besiedlungen mit 3MRGN-*E. coli* und VREfm, welche damit zur Zeit zahlenmäßig das größte Reservoir für potentielle Transmissionen im Krankenhaus darstellen.

Besondere Relevanz haben Infektionen mit resistenten Erregern, da diese oft einer Therapie mit Reserveantibiotika bedürfen. Infektionen mit carbapenemresistenten Enterobakterien und VRE gehen im Vergleich zu Infektionen mit den sensiblen Phänotypen mit einer deutlich erhöhten Letalität einher.^{97,98} Die an der ITS-KISS-Erregersurveillance teilnehmenden Intensivstationen berichteten mit den Referenzdaten 2021 über Infektionen bei 11% der bekannten VRE-, bei 16% der MRGN-*E. coli*- und bei 22% der bekannten MRGN-*K. pneumoniae*- Trägerinnen,⁹³ womit der Anteil der Infektionen im Vergleich zu 2013 (2.1) rückläufig war. Der Anteil der Infektionen wurde dabei aber umso mehr überschätzt, je weniger asymptomatische Kolonisationen mit den betreffenden Erregern ohne ein systematisches Screening bekannt waren. Die Prävalenz der Infektionen bezogen auf Patienten unterliegt weniger einem diagnostischen Bias. Auch wenn Infektionen mit 4MRGN zwischen 2013 (2.1) und 2021 in deutschen Intensivstationen noch selten waren, zeigen die Referenzdaten seit Surveillancebeginn weder für 4MRGN-*E. coli* noch für 4MRGN-*K. pneumoniae* einen rückläufigen Trend.^{93,94} Für VRE konnte seit 2013 (2.1) sogar eine deutliche Zunahme von 0,14 auf 0,21 Infektionen pro 100 Aufnahmen beobachtet werden.^{93,94}

Die Bedeutung einer vorbestehenden Kolonisation auf nachfolgende Infektionen kann nur ermittelt werden, wenn weitgehend alle asymptomatischen Besiedlungen bekannt sind. Die Referenzdaten werden seit 2016 zusätzlich nach Screeningumfang stratifiziert ausgegeben werden, und die Anzahl der Stationen mit systematischem Screening hat seit 2013 zugenommen.⁹³ In der unter 2.2 vorgestellten Arbeit in peripheren Stationen mit systematischem Screening bei Aufnahme, im stationären Verlauf und bei Entlassung entwickelten knapp zwei Prozent (40/2101) der ESBL-E-Träger während des stationären Aufenthaltes eine Infektion.⁵⁵ Laut einer großen Kohortenstudie in hämato-onkologischen Stationen mit umfangreichen Screeningmaßnahmen erlitten ein Prozent der mit 3MRGN-*E. coli* kolonisierten (38/2968) sowie drei Prozent der VRE-kolonisierten (17/498) Patientinnen eine Blutstrominfektion mit dem jeweiligen Erreger.^{99,100} Allerdings gibt es deutliche speziesspezifische Unterschiede. Unsere Arbeitsgruppe konnte z.B. zeigen, dass die Kolonisation mit ESBL-*K. pneumoniae* einen unabhängigen Risikofaktor für eine nachfolgende Infektion darstellte,¹⁰¹ und dass *E. faecium* im Vergleich zu *E. faecalis* unabhängig von der Vancomycin-Resistenz die Dauer des Krankenhausaufenthaltes und die Letalität erhöhte.¹⁰² Dabei ist es möglich, dass einige Stammtypen neben Resistenzmechanismen auch über bestimmte Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren verfügen, welche ihnen hinsichtlich ihrer Verbreitung im Krankenhaus, aber auch bezüglich ihrer Fähigkeit, Infektionen zu verursachen, Vorteile verschaffen.¹⁰³ Voraussichtlich muss eine gezielte Surveillance zukünftig neben den Resistenzprofilen bzw. den

resistenzvermittelnden Genen auch solche besonderen Erregereigenschaften für die jeweiligen Spezies umfassen.

Aus den Surveillancedaten wird ersichtlich, dass schon die außerhalb von klinischen Studien aus der klinischen Routine bekannten MRGN und VRE in deutschen Krankenhäusern ein relevantes und seit 2013 zunehmendes Problem darstellen. Infektionen mit VRE und MRGN, insbesondere mit 4MRGN, haben eine hohe klinische Relevanz für vulnerable Populationen im Krankenhaus, da die Therapieoptionen bei schweren Infektionen beschränkt sind und oft den Einsatz von Reserveantibiotika erforderlich machen. Weiterhin ist zu befürchten, dass durch den breiten Einsatz von Reserveantibiotika problematische Resistenztypen zunehmen werden. Neben den carbapenem-resistenten Enterobakterien ist diese Entwicklung z.B. für Linezolid-resistente *E. faecium* bereits zu beobachten.³⁰

3.2. Prävention von Transmissionen multiresistenter enteraler Erreger

Screening und anschließende Kontaktisolierung haben sich in den unter 2.2 und 2.3 aufgeführten Arbeiten nicht als hilfreich erwiesen, um die Verbreitung von endemisch vorkommenden ESBL-E zu reduzieren. Die potentiell nachteiligen Effekte von Kontaktisolerungs- und Barrieremaßnahmen bezogen auf die Zufriedenheit¹⁰⁴ und die Sicherheit der Patienten,¹⁰⁵ den Kontakt zum medizinischen Personal,¹⁰⁶ Arbeitsumfang sowie Gesundheitskosten^{107,108} und nicht zuletzt die Umweltbelastung¹⁰⁹ wurden bereits vielfältig belegt, weshalb sie bei nachweislich fehlender Wirksamkeit in endemischen Situationen nicht zum Einsatz kommen sollten.

In der unter 2.2 in dieser Habilitationsschrift vorgestellten Arbeit konnten wir in einer multizentrischen cluster-randomisierten klinischen Studie nachweisen, dass Kontaktisolerungsmaßnahmen mit bevorzugter Unterbringung im Einzelzimmer und Barrierepflege in unterschiedlichen Gesundheitssystemen vier europäischer Länder keinen Mehrwert gegenüber Standardmaßnahmen erbrachte, um den Neuerwerb von ESBL-Bildnern in peripheren Stationen zu senken. Diese Ergebnisse werden durch andere Arbeitsgruppen gestützt und ergänzt, da auch die alleinige Isolierung im Einzelzimmer im Vergleich zur Barrierepflege in Mehrbettzimmern keine Reduktion der Transmissionen von ESBL-E erbrachte.⁵⁴ Sogar in Intensivstationen und damit in einer vulnerablen Risikopopulation konnte bezüglich der Verbreitung multiresistenter Enterobakterien durch Kontaktisolierung keine Verbesserung über optimierte Standardmaßnahmen hinaus erreicht werden, und zwar unabhängig davon, ob die Detektion mittels Schnelltest und entsprechend kurzer Latenz zwischen Abstrichentnahme und Ergebnismitteilung an die Station oder mittels eines konventionellen kulturbasierten Screening erfolgte.^{9,110} Eine große Studie in deutschen Intensivstationen zum Effekt eines Aussetzens der Barrieremaßnahmen für multiresistente gramnegative 3MRGN-Enterobakterien einschließlich 3MRGN *E. coli* und 3MRGN *K. pneumoniae*, für die derzeit noch Empfehlungen zur Isolierung durch die KRINKO gelten,¹⁶ läuft aktuell noch (<https://www.nrz-hygiene.de/projekte/simon-studie>).

Auch für Patientinnen mit Besiedlung oder Infektion mit VRE wird eine grundsätzliche Kontaktisolierung insbesondere nach Veröffentlichung der KRINKO-Empfehlungen 2018 kontrovers diskutiert.^{45,46,111} Studien zum Einfluss von Kontaktisierungsmaßnahmen in Risikopopulationen, bei denen VRE im Krankenhaus hauptsächlich nachgewiesen werden, zeigten größtenteils einheitliche Ergebnisse.^{99,112-114} Barrieremaßnahmen mit der Nutzung von Schutzkitteln und Handschuhen hatten keinen Einfluss auf die Häufigkeit von Kolonisationen und Infektionen mit VRE bei Intensivpatienten,¹¹³ und das Aussetzen der Maßnahmen führte in einer Metaanalyse in verschiedenen Gesundheitseinrichtungen nicht zu einem Anstieg der Infektionsraten.¹¹⁴ Auch in hämato-onkologischen Abteilungen hatte eine Kontaktisolierung im Einzelzimmer im Gegensatz zu Standardmaßnahmen keinen relevanten Einfluss auf die Häufigkeit der Blutstrominfektionen mit VRE.⁹⁹ In der Arbeit wurde zwar unter Standardmaßnahmen ein häufigerer Neuerwerb von VRE nachgewiesen, allerdings war der Unterschied mit 4,8% unterhalb der vorher definierten Nichtunterlegenheitsgrenze, in den Sensitivitätsanalysen mit Einschluss aller bzw. für die VRE-Selektion relevanter Antibiotika bestätigte sich der leichte Vorteil der Kontaktisolierung nicht, und die Exposition gegenüber Antibiotika stellte sich als weitaus größerer Risikofaktor für einen neuen VRE-Nachweis dar als das Isolierungskonzept.⁹⁹

Es gibt verschiedene Erklärungen für den fehlenden präventiven Effekt der Kontaktisierungsmaßnahmen. Es ist möglich, dass Standardmaßnahmen mit einer guten Händehygiene und Reinigung der häufigen Kontaktflächen für ein Vermeiden von Transmissionen zwischen Patienten ausreichend sind und zusätzliche Barrieremaßnahmen darüber hinaus keine weiteren Präventionseffekte erzielen können. Darüber hinaus ist für eine korrekte Durchführung der Kontaktisierungsmaßnahmen eine Serie aufeinanderfolgender Abläufe mit vielen potentiellen Fehlerquellen erforderlich.¹¹⁵ Dazu gehört z.B. die Reihenfolge beim An- oder Ablegen der verschiedenen Bestandteile der Schutzausrüstung. Vornehmlich das Ablegen der Schutzkleidung ist oft mit Fehlern behaftet,^{77,116} vor allem, wenn der Anteil zu isolierender Patienten hoch ist.⁷⁷ Es gibt die Vermutung, dass bei suboptimaler Händehygiene ein breiter Einsatz von Barrieremaßnahmen wie Kittel- und Handschuhpflege einen präventiven Effekt zeigen sollte.¹¹⁷ Allerdings kann durch eine fehlende oder mangelhafte Händehygiene vor dem Anlegen die Schutzausrüstung selbst kontaminiert werden und somit als Vektor dienen.^{77,116} So wird die Schutzausrüstung häufig über verschiedene Patientinnen und deren jeweilige direkte Umgebung hinaus genutzt, und der Gebrauch von Handschuhen behindert in der praktischen Umsetzung oft eine korrekte Durchführung der Händedesinfektion.¹¹⁸ Die unter 2.2 dargestellte Arbeit war bei einer mittleren Händehygiene-Compliance von knapp 62% durchgeführt worden, die sich zwischen den Interventionsphasen mit alleinigen Standardmaßnahmen und zusätzlichen Kontaktisierungsmaßnahmen nicht unterschied.

Zu weiteren möglichen Erklärungen für den fehlenden Effekt der Kontaktisolierung gehören die in den Publikationen 2.2 und 2.3 diskutierten Probleme einer möglichst schnellen und sensitiven Detektion multiresistenter enteraler Pathogene.

Die Sinnhaftigkeit von Screeningmaßnahmen muss hinterfragt werden, wenn die Identifikation mit mehr oder weniger aufwendigen Laboranalysen so lange dauert, dass die Maßnahmen, für deren Anwendung das Screening erfolgte, oft gar nicht mehr zum Einsatz kommen, weil die Patientinnen schon entlassen wurden. Bei den hier vorgestellten Screeninguntersuchungen dauerte es vier Tage zwischen Abnahme eines positiven Abstriches bis zum Beginn der Kontaktisolierung bei neu identifizierten ESBL-E-Trägern. Dieser zeitliche Verzug der kulturbasierten Nachweismethoden scheint derzeit unvermeidbar, da die Nachweise in den lokalen Laboratorien der beteiligten großen europäischen Universitätskliniken nach einem standardisierten Protokoll und entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft bearbeitet wurden. Folglich könnte ggf. mittels sogenannter Point of care-Tests die Latenz zwischen Screening und Beginn der Kontaktisierungsmaßnahmen verkürzt werden und möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen. Allerdings konnte für multiresistente Enterobakterien auch bei einer Identifikation mittels Schnelltest durch die Kontaktisolierung keine Verbesserung über optimierte Standardmaßnahmen hinaus erreicht werden.¹¹⁰ Für VRE konnte auch eine ungezielte prophylaktische Kontaktisolierung aller Patienten den Neuerwerb von VRE nicht reduzieren.¹¹⁹ Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass die oben aufgeführten Untersuchungen mit schnellerer Diagnostik anders verlaufen wären, stehen bisher zumindest für ESBL-Bildner keine verlässlichen Schnelltests für Screeninguntersuchungen zur Verfügung, da diese sich oft auf eine unvollständige Kollektion von Resistenzgenen beziehen.¹²⁰ Dazu sind PCR-Direktnachweise von ESBL-, Carbapenemase- oder Van-Genen aus dem Probenmaterial als Screening-Methode nur eingeschränkt aussagekräftig, weil sie auch nicht lebensfähige Organismen detektieren¹²⁰ und das vanB-Gen auch bei verschiedenen Anaerobiern vorhanden ist.¹²¹ Entsprechend sind mit der PCR von Rektalabstrichen oder Stuhl eine hohe Rate sowohl an falsch-positiven als auch, bezogen auf den Resistenztyp, an falsch-negativen Befunden zu erwarten.

Gleichzeitig ging der Umfang des Screening der unter 2.2 und 2.3 vorgestellten sowie einiger zitierter Arbeiten⁹⁹ weit über das in der klinischen Routine übliche Screening hinaus. Die meisten deutschen Intensivstationen geben an, sofern überhaupt Screeningmaßnahmen durchgeführt werden, nur Risikopatientinnen bei Aufnahme auf die jeweiligen multiresistenten Erreger zu screenen.⁹⁵ Mit risikobasierten Screeningansätzen blieben an einer niederländischen Universitätsklinik die Besiedlungen mit ESBL-E aber zu über 99%, mit Carbapenem-resistenten Enterobakterien zu über 98% und mit VRE zu über 99% bei Aufnahme unerkannt.¹²² Die Einschätzung des Risikos für das Vorhandensein von multiresistenten enteralen Erregern basierte dabei auf bekannten und auch in Deutschland zum gleichen Zweck üblicherweise herangezogenen Risikofaktoren wie z.B. einem früheren Nachweis eines resistenten Erregers oder dem Aufenthalt in einer Gesundheitseinrichtung im Ausland.¹²² Es muss davon ausgegangen werden, dass auch in Deutschland ein großer Anteil der asymptomatischen Kolonisationen mit multiresistenten enteralen Erregern im Krankenhaus nicht identifiziert wird, wobei diese mehrheitlich bereits bei Aufnahme ins Krankenhaus vorhanden sind und durch Maßnahmen im Krankenhaus nicht reduziert werden können. Somit ist zu erwarten, dass in der klinischen Routine gezielte Präventionsmaßnahmen auf Basis

von Screening und anschließender Kontaktisolierung im Vergleich zu Studienbedingungen eher noch weniger wirksam sind.

Sollten zukünftig verlässliche Tests entwickelt werden, müssten die oben aufgeführten Studien wiederholt und potentielle Transmissionsereignisse mittels molekularer Methoden von Selektionsprozessen abgegrenzt werden. Bis dahin sollten die von vielen Intensivstationen verfolgten breit angelegten Screeningstrategien zugunsten einer Verbesserung der Standardmaßnahmen, darunter insbesondere der Händehygiene, verlassen werden.¹²³

Für die wesentlich problematischeren Carbapenem-resistenten Enterobakterien wurden bisher keine vergleichbaren Studien im endemischen Setting durchgeführt, und für diese wird entsprechend die Kontaktisolierung weiterhin empfohlen.¹⁶ Auch wenn die Übertragungswege grundsätzlich übereinstimmen, sind diese sehr viel seltener, die Anzahl der Resistenzgene noch überschaubarer und in Deutschland bisher hauptsächlich in Risikopopulationen verbreitet, weshalb eine Identifikation und gezielte Kontaktisolierung erfolversprechender sind.

3.3. Prävention der Selektion multiresistenter enteraler Erreger

Die Darmmikrobiota wird mittlerweile als eigenständiges Organ angesehen, welches eine Schlüsselrolle bei der physiologischen Schutzfunktion gegenüber potentiell schädlichen Bakterien, Toxinen und Antigenen spielt.¹²⁴ Antibiotische Behandlungen führen durch den Überlebensvorteil resistenter Spezies und horizontalen Gentransfer zu einer veränderten mikrobiellen Populationsstruktur und einer dauerhaft erhöhten Anzahl von Resistenzgenen unter den kultivierbaren bakteriellen Spezies.¹²⁵ Disruptive Effekte auf das Mikrobiom in der frühen Kindheit scheinen bis weit ins Erwachsenenalter nachzuwirken, und eine vollständige Erholung ist möglicherweise nicht zu erreichen.¹²⁶ Die Auswirkung antibiotischer Therapien auf das menschliche Mikrobiom können als Analogie zu chirurgischen Maßnahmen mit nachfolgender Wundheilung und Narbenbildung begriffen werden. Trotz der zweifellos lebensrettenden Wirkung bei schweren bakteriellen Infektionen muss eine antibiotische Therapie also möglichst gezielt erfolgen und wie auch bei antineoplastischer Chemotherapie hinsichtlich der notwendigen Effektivität und potentiellen Toxizität ausbalanciert werden.¹²⁶

Antibiotic Stewardship kann dazu beitragen, durch verminderte und gezieltere Anwendung von antibiotischen Substanzen den Selektionsdruck in bestimmten Populationen zu reduzieren. Es gibt verschiedene Ansätze, um einen rationalen und verantwortungsvollen Einsatz von Antibiotika voranzutreiben, wie z.B. den zyklischen Wechsel verschiedener antimikrobieller Substanzen in einer Abteilung, die Auditierung der Verschreibungspraktiken oder Verschreibungsrestriktionen für bestimmte Substanzen. Wichtige Bestandteile wie der Zugang zu Leitlinien sind in vielen Ländern noch nicht flächendeckend implementiert.^{127,128} Auch in europäischen Ländern könnten die Maßnahmen angesichts nur langsam sinkender Verbrauchsdaten von 3GC und Fluorchinolonen in Krankenhäusern ausgeweitet werden.¹²⁹

Antibiotic Stewardship-Maßnahmen wurden äußerst erfolgreich eingesetzt, um die Inzidenz von Infektionen und Kolonisationen mit multiresistenten gramnegativen Bakterien einschließlich der ESBL-produzierenden Enterobakterien zu halbieren.⁹¹ Die Programme waren besonders in hämato-onkologischen Abteilungen effektiv, und wenn sie mit Verbesserungen von infektionspräventiven Maßnahmen wie der Händehygiene einhergingen.⁹¹ Die Einfluss von Antibiotic Stewardship-Programmen auf die Inzidenz von Infektionen und Kolonisationen mit VRE zeigte hingegen widersprüchliche Ergebnisse.^{91,130}

In der unter 2.4 vorgestellten Arbeit haben wir erstmalig systematisch viele therapeutisch eingesetzte Substanzen über Antibiotika hinaus auf ihr Selektionspotential für ESBL-E untersucht. Dabei konnten wir Hinweise finden, dass die Anwendung von Opioiden, Glukokortikoiden und β 2-Rezeptor-Agonisten mit potentiellen koselektiven Additivsubstanzen die Wahrscheinlichkeit für einen ESBL-E-Nachweis erhöhte. Neben direkten Effekten auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota¹³¹ und immunmodulierenden Effekten¹³² könnte bei den Opioiden auch die verminderte Darmperistaltik dafür verantwortlich sein, wodurch die Vermehrung von gramnegativen Erregern begünstigt¹³³ und damit das Risiko einer Überwucherung mit MRGN erhöht wird. Obwohl es sich um eine Fall-Kontroll-Studie mit relativ vielen eingeschlossenen Patienten handelte, wurden dennoch einige Arzneimittel nur selten eingesetzt. Entsprechend konnte in der Sensitivitätsanalyse mit Ausschluss aller selten verabreichten Substanzen nur für PPI ein selektionierender Effekt gezeigt werden. Als Hauptursache wird hierfür die Hemmung der Magensäure vermutet, wodurch mehr resistente enterale Bakterien den Magen passieren können und ein ohnehin bestehender Überlebensvorteil z.B. für ESBL-*E. coli* Sequenztyp 131 möglicherweise noch verstärkt wird.¹³⁴ Darüber hinaus wurden bereits für Meformin, nicht-steroidale Antiphlogistika, atypische Antipsychotika, Sedativa und Katecholamine sowie parenterale Ernährung Veränderungen des Darmmikrobioms berichtet, und *in vitro* hatten 24% aller im humanmedizinischen Bereich eingesetzten nicht-antibiotischen Substanzen inhibierende Effekte auf mindestens einen Darmkommensalen.^{80,135} Auch für Chemotherapeutika sind disruptive Effekte auf die Darmmikrobiota beschrieben, sowie eine erhöhte bakterielle Mutationsrate und in der Folge auch ein erhöhter horizontaler Gentransfer.¹³⁶ Klinisch entwickelt sich bei vielen Krebspatienten ein Teufelskreis mit rekurrenten Sepsisepisoden und jeweils resistenteren ursächlichen Pathogenen die wiederum einer breiteren antibiotischen Abdeckung bedürfen.¹³⁶ Angesichts der komplexen Interaktionen¹³⁶ mit der Darmmikrobiota, der Immunmodulation und der Koselektion verschiedenster Pharmaka oder ihrer Additiva scheint es unabdinglich, die hinweisenden Fall-Kontroll- und *in-vitro*-Ansätze pharmakokinetisch und in klinischen Interventionsstudien zu bestätigen und den Selektionseffekt durch nicht-antibiotische Pharmaka zu quantifizieren.

Auch für Schwermetalle und Biozide ist die Evidenz für die klinische Relevanz koselektiver Prozesse noch gering.¹³⁷ Trotzdem umfassen Überlegungen zum Selektionspotential im Krankenhaus genutzter Substanzen Antiseptika und Desinfektionsmittel¹³⁸ einschließlich quartärer Ammoniumverbindungen mit desinfizierenden und schmutzlösenden Eigenschaften.¹³⁹ Reinigungs- und Flächendesinfektionsmaßnahmen können prinzipiell wirksam zur Prävention der Weiterverbreitung von multiresistenten enteralen Erregern beitragen, da es vor allem für VRE Berichte zu Umgebungskontaminationen, auch in

Zimmern von Personen ohne VRE-Nachweis,¹⁴⁰ und zu Übertragungen auf nachfolgend am gleichen Bettplatz untergebrachten Patienten gibt.^{9,141,142} Entsprechend konnten verschiedene intensivierete Reinigungsprotokolle beeindruckende Ergebnisse bei der Reduktion von Neuerwerb¹⁴³ und Infektionen^{144,145} mit VRE erzielen. Allerdings können über Effluxpumpen und Koresistenzen gegen Desinfektionsmittel und oberflächenaktive Substanzen in Reinigungs- und Waschmitteln Resistenzen entstehen, sich verbreiten und damit zum Selektionspotential für antibiotische Resistenzen beitragen.^{139,146}

Folgerichtig bergen Probiotika als Alternativen zu Reinigungs- und Desinfektionslösungen für Krankenhausoberflächen großes Potential, da probiotische Reinigungsmittel die Zusammensetzung der mikrobiellen Populationen auf kritischen Oberflächen wie etwa Waschbecken verändern und die Artenvielfalt erhöhen konnten, während gleichzeitig die Gesamtzahl der identifizierten Resistenzgene sank.¹⁴⁷ Auch in vitro-Studien unterstützen die Artenvielfalt als wichtigen Treiber der Kolonisationsresistenz gegenüber bakteriellen Pathogenen, sogar bei Biofilmbildung.¹⁴⁸ Somit könnten auf diesem Weg sowohl die potentiellen Pathogene selbst als auch der Selektionsdruck durch Desinfektionsmittel und andere direkt oder indirekt selektionierende Substanzen reduziert werden.

3.4. Transmissionsanalysen mittels Ganzgenomsequenzierung

Routineuntersuchungen von Transmissionen in Krankenhäusern sollten Übertragungen zwischen Patienten identifizieren und gleichzeitig die molekulare Epidemiologie innerhalb und außerhalb des Krankenhauses berücksichtigen. Eine engere genetische Verwandtschaft bedeutet nicht unbedingt, dass ein klinischer Fall direkt mit einem anderen klinischen Fall in Zusammenhang steht.¹⁴⁹ In diesem Kontext sind eher kurz zurückliegende Übertragungen als die phylogenetische Verwandtschaft im Laufe der Zeit von Interesse, um rasche und gezielte Maßnahmen zur Ausbruchseindämmung zu veranlassen. Mit der unter 2.5 aufgeführten Arbeit konnten wir eine epidemiologisch unerklärliche Dominanz bestimmter VREfm-Stammtypen feststellen, die nahezu gleichzeitig in mehreren Regionen Deutschlands auftrifft.^{30,85-87} Die unter 2.6 vorgestellte Arbeit verglich den cgMLST-Ansatz sowohl anhand des für *E. faecium* veröffentlichten Schemas (dem Kerngenom zugeordnete Gensammlung)⁸⁴ als auch anhand ausbruchsbezogen *ad hoc* erstellter Schemata mit dem SNP-basierten und dem SKA-Verfahren für Ausbruchsanalysen von VREfm. SKA nutzt zwei K-mere (Basensequenzen einer definierten Länge) in einer DNA-Sequenz, die durch eine Base getrennt werden, so dass beim Vergleich von Genomen zwei exakt übereinstimmende flankierende Bereiche genutzt werden, um SNPs, Insertionen, Deletionen und andere strukturelle Variationen bestimmen zu können.⁸⁸ Vorteile der Methode sind die Effizienz hinsichtlich der Rechnerleistung, die Geschwindigkeit und die Unabhängigkeit von Referenzgenomen.

SKA war schneller und einfacher anwendbar als cgMLST- und SNP-basierte Ansätze und korrelierte besser mit der lokalen Epidemiologie der Ausbrüche. Für kurzfristige Untersuchungen wie routinemäßige Ausbruchsanalysen, scheint SKA als schneller Ganzgenomansatz daher die logische Wahl zu sein. Als relativ neue Analyseverfahren wurde das Referenz- und Zielgen- bzw. targetfreie K-mer-basierte

SKA-Verfahren bisher nur für *E. faecium* verwendet, und eine Erprobung für weitere relevante Pathogene liegt nahe. Insbesondere multiresistente *K. pneumoniae*-Stämme sind dafür interessant, da sie im Gegensatz zu *E. coli* besonders anfällig für die Aufnahme von mehreren Plasmiden zu sein scheinen,¹⁵ und bei denen der überwiegende Anteil der Resistenzmechanismen gegenüber klinisch relevanten Antibiotika mit horizontalem Gentransfer assoziiert ist.¹⁵⁰

Ein kritischer Aspekt, der noch für keine Methode abschließend geklärt werden konnte, betrifft die Standardisierbarkeit bezüglich der Schwellenwerte für die Entscheidung, ob Transmissionen angenommen werden. Eine allgemeingültige Festlegung eines Schwellenwertes für SNP- bzw. Allelabstände zur Definition eines Ausbruchsgeschehens ist schwierig, und jede für lokale Transmissionsanalysen festgelegte Grenze muss neben erregertypischen Aspekten wie Mutationsraten und Rekombinationshäufigkeiten auch epidemiologische Zusammenhänge berücksichtigen.^{63,71} So ist bei Übertragungen im Rahmen eines räumlich und zeitlich begrenzten Ausbruches eine geringe Abweichung der Genomsequenzen zu erwarten, wohingegen bei länger bestehenden Punktquellen persistierende Subpopulationen, gegebenenfalls erhöhte Mutationsraten und horizontaler Gentransfer und als Folge diversere Bakterienpopulationen entstehen können, für die auch größere Variabilität der Genome innerhalb eines Ausbruchs angenommen werden müssten. Grundsätzlich ist die Anzahl von SNP-Unterschieden zwischen Isolaten, die zu einem Ausbruch gezählt werden, oft größer als die Anzahl von cgMLST-Allelunterschieden, da bei der SNP-Analyse meist ein größerer Genomsequenzbereich als bei der cgMLST-Analyse berücksichtigt wird und einzelne Allelunterschiede mehrere SNPs enthalten können.¹⁵¹

Um sinnvolle Schwellenwerte zu bestimmen, kann näherungsweise die Annahme hinzugezogen werden, dass die Diversität zwischen zwei Individuen (between-host diversity) größer ist als die intraindividuelle Diversität (within-host diversity). Allerdings kann eine hohe Diversität einer Spezies in einem Individuum die Sensitivität eines solchen Ansatzes stark limitieren.^{152,153} Dafür sollte mitbedacht werden, wieviele Abstriche pro Individuum und pro Kolonisationsort in welchem Zeitraum entnommen wurden, sowie ob etwa Einzelzellkolonien oder Mischkolonien und ob Kolonien von Selektivnährböden sequenziert wurden.^{154,155}

Als Routineverfahren sollte eine bioinformatische Analyse potentieller Transmissionen aber darüber hinaus (i) im Laufe der Zeit stabil sein, wenn zusätzliche Isolate sukzessive zur Analyse hinzugefügt werden, (ii) standardisiert sein, um einen Vergleich zwischen verschiedenen Standorten oder Krankenhäusern zu ermöglichen, (iii) hinsichtlich der Rechenleistung effizient sein, und (iv) möglichst automatisiert erfolgen können, um nur minimale Anpassungen und Interpretationen zu erfordern.⁸⁹ Demzufolge sollten künftige molekulargenetische Untersuchungen die Standardisierbarkeit der cgMLST und das hohe Diskriminationsvermögen von SKA kombinieren. International gibt es Bemühungen, die Methoden zur Analyse von WGS-Daten zu harmonisieren und zu standardisieren. So führte die Initiative Global-Microbial-Identifier (GMI, <https://www.globalmicrobialidentifier.org>) eine Reihe von Ringversuchen durch, um die Vergleichbarkeit von Transmissionsanalysen zu überprüfen.¹⁵⁶

Oft sind für Transmissionsanalysen im Krankenhaus auch die Übertragungen bestimmter Gene außerhalb der klonalen Verbreitung von Interesse. So kann es z.B. durch häufige Konjugationen oder Transpositionen zu Übertragungen von Resistenzgenen über Plasmide kommen. Entsprechend wurden bereits Multispezies-Ausbrüche mit bestimmten Carbenamase-Genen beschrieben, die oft mit den wasserführenden Systemen im Krankenhaus assoziiert sind,¹⁵⁷⁻¹⁶² wo gute Bedingungen für die Entstehung von Biofilmen und Plasmidtransfer herrschen. Die kurzen DNA-Sequenzen der Hochdurchsatzsequenzierer mit Längen von üblicherweise bis zu 300 Basenpaaren reichen nicht aus, um die Grenzen der teilweise sehr großen Plasmide und ihre Wiederholungen korrekt zu bestimmen.¹⁶³ Durch Kombination von Sequenziermethoden, die lange DNA-Sequenzen generieren, mit den Vorteilen der Hochdurchsatzsequenzierung bei kurzen DNA-Sequenzen können auch größere oder häufiger vorkommende kleine Plasmide identifiziert werden, allerdings handelt es sich dabei noch nicht um Routinemethoden. Es wurden aber auch schon Analysetools entwickelt, um bekannte Plasmide und neue, anhand typischer genetischer Sequenzen als vermutlich plasmidär eingestufte Sequenzen auch aus kurzen DNA-Sequenzen schnell identifizieren zu können.¹⁶⁴ Die Zusammensetzung des Plasmidoms scheint bei *E. faecium* für die Nischenbesiedlung von Bedeutung zu sein und lässt unterschiedliche Transmissionwege innerhalb der Krankenhausumgebung vermuten.¹⁶⁵

Neben der Verbreitung der Resistenzgene über Speziesgrenzen hinweg sollten molekulargenetische Untersuchungen zu Transmissionen und klinischer Relevanz multiresistenter enteraler Erregern in Zukunft auch ökologische Faktoren wie Interaktionen zwischen unterschiedlichen bakteriellen Spezies einbeziehen, da bestimmte nosokomiale Infektionen leichter bei Ko-Besiedlung mancher resistenter Spezies, darunter *E. coli* und *E. faecium*, aufzutreten schienen.¹⁶⁶ Sobald Transmissionen auf genomischer Ebene besser differenziert und vom Neuerwerb durch Selektionsmechanismen abgegrenzt werden können, ist eine Neubewertung und Quantifizierung der jeweiligen Transmissionwege erforderlich, da die bisherige Evidenz hauptsächlich auf epidemiologischen Definitionen für Neuerwerb beruht.^{90,167}

4. Zusammenfassung

Multiresistente enterale Erreger sind in deutschen Intensivstationen weit verbreitet. Surveillance-Systeme wie die stationsbezogene Erregersurveillance im KISS erfassen die in der klinischen Routine entdeckten Fälle in standardisierter Form, können Aufschluss über das den jeweiligen Einrichtungen bekannte Vorkommen multiresistenter Erreger geben und ermöglichen Vergleiche. Allerdings muss angesichts der unter Studienbedingungen sehr viel höheren Prävalenz davon ausgegangen werden, dass den Einrichtungen nicht alle asymptomatischen Kolonisationen mit multiresistenten enteralen Erregern bekannt sind. Zu den möglichen Gründen gehören im Vergleich weniger umfangreiche Screeningprotokolle, aber auch Limitationen bei den verfügbaren Screeningmethoden.

Die Kontaktisolierung als vertikale, gezielte Präventionsstrategie hat sich nicht als vorteilhaft erwiesen, um die Verbreitung multiresistenter Gramnegativer Enterobakterien im Krankenhaus zu reduzieren. Neben den Limitationen bei der Identifikation der Träger und dem zeitlichen Verzug zwischen Screeningentnahme und Befundmitteilung an das klinische Behandlungsteam liegt das auch daran, die Verbreitung nicht nur exogen durch Transmissionen zwischen Patientinnen, sondern auch durch endogene Selektionsmechanismen erfolgt. Wir fanden erste Hinweise, dass als selektionierende Substanzen für multiresistente Enterobacteriales nicht nur Antibiotika oder Protonenpumpeninhibitoren in Frage kommen, sondern auch andere klinisch häufig genutzte Substanzen wie Glukokortikoide, Opiode oder β -Rezeptor-Agonisten.

Allerdings sind auch Transmissionen zwischen Krankenhauspatienten nicht immer eindeutig nachzuweisen und damit Präventivmaßnahmen prinzipiell zugänglich. Mit der Ganzgenomanalyse ist in den letzten Jahren eine neue Methode in die klinische Routinediagnostik aufgenommen worden, die es ermöglicht, die molekulare Epidemiologie der Erreger in nie dagewesener Tiefe zu untersuchen. Die Zunahme einer bestimmten Stammlinie von VREfm, mittels cgMLST als ST117 CT71 identifiziert, war epidemiologisch über räumliche, organisatorische und zeitliche Zusammenhänge aus klinischer Sicht nicht nachvollziehbar. Neue Analysemethoden unter Einbezug des bei dieser Spezies besonders relevanten akzessorischen Genoms konnten kürzer zurückliegende Transmissionsereignisse im Krankenhaus besser abbilden und sind damit für Ausbruchsuntersuchungen besser geeignet. Zunehmende Berichte über plasmidgetragene Ausbrüche legen nahe, dass auch bei gramnegativen Erregern das akzessorische Genom bei Transmissionsanalysen im Krankenhaus mitbetrachtet werden sollte.

Angesichts der Limitationen hinsichtlich der Detektion und derzeit mangelnder spezifischer Präventionskonzepte sollte die Prävention weniger problematischer endemischer Erreger wie z.B. der 3MRGN Enterobacteriales im Krankenhaus vor allem auf horizontale Maßnahmen fokussieren und diese optimieren. Gleichzeitig sollten Selektionsmechanismen und Transmissionshäufigkeiten für die jeweiligen Spezies, Resistenzphänotypen und mobilen genetischen Elemente sowie begünstigende Faktoren auf Erreger- und Wirtsseite untersucht werden, damit spezifische Maßnahmen für Hochrisiko-Klone und besondere vulnerable Personengruppen entwickelt werden können.

5. Literaturangaben

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet infectious diseases* 2018;18(3):318-327. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1473309917307533?via%3Dihub>).
2. The PEW Charitable Trusts. Antibiotics Currently in Global Clinical Development. The PEW charitable trusts. March 9, 2021 (<https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development>).
3. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95(12):6578-6583.
4. Buck A, Cooke EM. The fate of ingested *Pseudomonas aeruginosa* in normal persons. *Journal of Medical Microbiology* 1969;2(4):521-525.
5. Vollaard E, Clasener H. Colonization resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1994;38(3):409-414.
6. Ruppe E, Andremont A. Causes, consequences, and perspectives in the variations of intestinal density of colonization of multidrug-resistant enterobacteria. *Frontiers in microbiology* 2013;4:129. (In eng). DOI: 10.3389/fmicb.2013.00129.
7. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2016;66(12):5575-5599.
8. Amaretti A, Righini L, Candelieri F, et al. Antibiotic resistance, virulence factors, phenotyping, and genotyping of non-*Escherichia coli* Enterobacterales from the gut microbiota of healthy subjects. *International journal of molecular sciences* 2020;21(5):1847.
9. Maechler F. Multiresistente gramnegative *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*. *Krankenhaushygiene up2date* 2021;16(03):299-312.
10. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current opinion in pharmacology* 2011;11(5):477-485.
11. van Dorp L, Wang Q, Shaw LP, et al. Rapid phenotypic evolution in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* hospital outbreak strains. *Microbial genomics* 2019;5(4) (In eng). DOI: 10.1099/mgen.0.000263.
12. San Millan A, Maclean RC. Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. *Microbiology spectrum* 2017;5(5):5.5. 02.
13. Yano H, Wegrzyn K, Loftie - Eaton W, et al. Evolved plasmid - host interactions reduce plasmid interference cost. *Molecular microbiology* 2016;101(5):743-756.
14. Stalder T, Top E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. *NPJ biofilms and microbiomes* 2016;2(1):1-5.
15. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology* 2020;18(6):344-359. DOI: 10.1038/s41579-019-0315-1.
16. KRINKO. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. *Bundesgesundheitsbl* 2012;55:1311-1354.
17. Neumann N, Mischler D, Cuny C, Hogardt M, Kempf VA, Heudorf U. [Multidrug-resistant organisms (MDRO) in patients in outpatient care in the Rhine-Main region, Germany, in 2014: Prevalence and risk factors]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2016;59(2):292-300. (In ger). DOI: 10.1007/s00103-015-2290-7.
18. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, et al. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 2017;32(1):917-919.
19. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2018;62(10):e01076-18.

20. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet infectious diseases* 2019;19(1):56-66. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6300481/pdf/main.pdf>).
21. Isler B, Ezure Y, Romero JLG-F, Harris P, Stewart AG, Paterson DL. Is ceftazidime/avibactam an option for serious infections due to extended-spectrum- β -lactamase-and AmpC-producing Enterobacterales?: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2020;65(1):e01052-20.
22. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 2022.
23. Arcilla MS, van Hattem JM, Haverkate MR, et al. Import and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *The Lancet infectious diseases* 2017;17(1):78-85.
24. Hamprecht A, Rohde AM, Behnke M, et al. Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016;71(10):2957-63. (In eng). DOI: 10.1093/jac/dkw216.
25. Rohde AM, Zweigner J, Wiese-Posselt M, et al. Prevalence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacterales colonization on hospital admission and ESBL genotype-specific risk factors: a cross-sectional study in six German university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020;75(6):1631-1638. DOI: 10.1093/jac/dkaa052.
26. Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66(5):2263-2266.
27. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, NY)* 2005;308(5728):1635-1638.
28. Tendolkar P, Baghdayan A, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2003;60(12):2622-2636.
29. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. 2014.
30. Werner G, Neumann B, Weber R, et al. Thirty years of VRE in Germany—"expect the unexpected": The view from the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci. *Drug Resistance Updates* 2020:100732.
31. Gorrie C, Higgs C, Carter G, Stinear TP, Howden B. Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Microbial genomics* 2019;5(7) (In eng). DOI: 10.1099/mgen.0.000283.
32. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2022. Stockholm: ECDC: 2022.
33. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in microbiology* 1996;4(10):401-407.
34. Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio* 2010;1(4) (In eng). DOI: 10.1128/mBio.00227-10.
35. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2005;3(9):722-732.
36. Top J, Arredondo-Alonso S, Schürch AC, et al. Genomic rearrangements uncovered by genome-wide co-evolution analysis of a major nosocomial pathogen, *Enterococcus faecium*. *Microbial genomics* 2020;6(12) (In eng). DOI: 10.1099/mgen.0.000488.
37. Paulsen IT, Banerjee L, Myers G, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science (New York, NY)* 2003;299(5615):2071-2074.
38. Johnson CN, Sheriff EK, Duerkop BA, Chatterjee A. Let Me Upgrade You: Impact of Mobile Genetic Elements on Enterococcal Adaptation and Evolution. *Journal of bacteriology* 2021;203(21):e0017721. (In eng). DOI: 10.1128/jb.00177-21.
39. van Hal SJ, Willems RJ, Gouliouris T, et al. The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium*. *Genome medicine* 2021;13(1):1-12.

40. Kim EB, Marco ML. Nonclinical and clinical *Enterococcus faecium* strains, but not *Enterococcus faecalis* strains, have distinct structural and functional genomic features. *Applied and environmental microbiology* 2014;80(1):154-165.
41. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *The Journal of clinical investigation* 2010;120(12):4332-4341.
42. Jackson SS, Harris AD, Magder LS, et al. Bacterial burden is associated with increased transmission to health care workers from patients colonized with vancomycin-resistant *Enterococcus*. *American journal of infection control* 2019;47(1):13-17.
43. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012;55(7):905-14. (In eng). DOI: 10.1093/cid/cis580.
44. El Haddad L, Stibich M, Chemaly RF. The successful recovery of bacteriophages with activity against vancomycin-resistant enterococci (VRE) from stool samples of hematopoietic cell transplant (HCT) recipients. *Open Forum Infectious Diseases: Oxford University Press*; 2017:S288.
45. KRINKO beim Robert Koch-Institut. Hygienemaßnahmen zur Prävention der Infektion durch Enterokokken mit speziellen Antibiotikaresistenzen. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 2018;10:1310.
46. Caplunik-Pratsch A, Rath A, Fritsch J, Holzmann T, Schneider-Brachert W. Infektionsprävention und VRE: eine unendliche Geschichte. *Krankenhaushygiene up2date* 2020;15(04):355-371.
47. Maechler F. Surveillance von Infektionserregern am Beispiel der Erregersurveillance im KISS. *Krankenhaushygiene up2date* 2018;13(02):227-246.
48. Noll I, Eckmanns T, Sin MA. Antibiotikaresistenzen: Ein heterogenes Bild. *Dtsch Arztebl International* 2020;117(1-2):28-. (<https://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=211751>).
49. Wißmann JE, Kirchhoff L, Brüggemann Y, Todt D, Steinmann J, Steinmann E. Persistence of Pathogens on Inanimate Surfaces: A Narrative Review. *Microorganisms* 2021;9(2) (In eng). DOI: 10.3390/microorganisms9020343.
50. Shimoda T, Okubo T, Enoda Y, et al. Effect of thermal control of dry fomites on regulating the survival of human pathogenic bacteria responsible for nosocomial infections. *PLoS One* 2019;14(12):e0226952. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0226952.
51. Wolfensberger A, Clack L, Kuster SP, et al. Transfer of pathogens to and from patients, healthcare providers, and medical devices during care activity—a systematic review and meta-analysis. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2018;39(9):1093-1107.
52. Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, et al. The role of colonization pressure in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. *Archives of internal medicine* 1998;158(10):1127-1132.
53. Kluytmans-van den Bergh MFQ, van Mens SP, Haverkate MR, Bootsma MCJ, Kluytmans J, Bonten MJM. Quantifying Hospital-Acquired Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Among Patients in Dutch Hospitals. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2017:1-8. (In eng). DOI: 10.1017/ice.2017.241.
54. Kluytmans-van den Bergh MFQ, Buijning-Verhagen PCJ, Vandenbroucke-Grauls C, et al. Contact precautions in single-bed or multiple-bed rooms for patients with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Dutch hospitals: a cluster-randomised, crossover, non-inferiority study. *The Lancet infectious diseases* 2019 (In eng). DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30262-2.
55. Maechler F, Schwab F, Hansen S, et al. Contact isolation versus standard precautions to decrease acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales in non-critical care wards: a cluster-randomised crossover trial. *The Lancet infectious diseases* 2020;20(5):575-584. (In eng). DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30626-7.

56. Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014;69(10):2650-7. (In eng). DOI: 10.1093/jac/dku180.
57. Czatkowska M, Wolak I, Harnisz M, Korzeniewska E. Impact of Anthropogenic Activities on the Dissemination of ARGs in the Environment-A Review. *International journal of environmental research and public health* 2022;19(19) (In eng). DOI: 10.3390/ijerph191912853.
58. Riccio ME, Verschuuren T, Conzelmann N, et al. Household acquisition and transmission of ESBL-producing Enterobacteriaceae after hospital discharge of ESBL-positive index patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2021 (In eng). DOI: 10.1016/j.cmi.2020.12.024.
59. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical microbiology and infection* 2018;24(4):335-341.
60. Loman NJ, Pallen MJ. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology* 2015;13(12):787-794.
61. Tschudin-Sutter S, Frei R, Dangel M, Stranden A, Widmer AF. Rate of transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae without contact isolation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012;55(11):1505-11. (In eng). DOI: 10.1093/cid/cis770.
62. Souverein D, Euser SM, Herpers BL, et al. No nosocomial transmission under standard hygiene precautions in short term contact patients in case of an unexpected ESBL or Q&A *E. coli* positive patient: a one-year prospective cohort study within three regional hospitals. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2017;6(1):1-8.
63. Schürch A, Arredondo-Alonso S, Willems R, Goering R. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clinical Microbiology and Infection* 2018;24(4):350-354.
64. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature reviews Genetics* 2012;13(9):601-612. (In eng). DOI: 10.1038/nrg3226.
65. MacLean RC, Torres-Barceló C, Moxon R. Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Nature reviews Genetics* 2013;14(3):221-7. (In eng). DOI: 10.1038/nrg3415.
66. Noureen M, Tada I, Kawashima T, Arita M. Rearrangement analysis of multiple bacterial genomes. *BMC bioinformatics* 2019;20(Suppl 23):631. (In eng). DOI: 10.1186/s12859-019-3293-4.
67. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95(6):3140-3145.
68. Mellmann A, Bletz S, Böking T, et al. Real-time genome sequencing of resistant bacteria provides precision infection control in an institutional setting. *Journal of clinical microbiology* 2016;54(12):2874-2881.
69. Pérez-Losada M, Arenas M, Castro-Nallar E. Microbial sequence typing in the genomic era. *Infection, Genetics and Evolution* 2018;63:346-359.
70. Carrico JA, Rossi M, Moran-Gilad J, Van Domselaar G, Ramirez M. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2018;24(4):342-349. (In eng). DOI: 10.1016/j.cmi.2017.12.015.

71. Hazards EPoB, Koutsoumanis K, Allende A, et al. Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food - borne microorganisms. *EFSA Journal* 2019;17(12):e05898.
72. Gorrie CL, Da Silva AG, Ingle DJ, et al. Key parameters for genomics-based real-time detection and tracking of multidrug-resistant bacteria: a systematic analysis. *The Lancet Microbe* 2021;2(11):e575-e583.
73. Bhalla A, Pultz NJ, Ray AJ, Hoyen CK, Eckstein EC, Donskey CJ. Antianaerobic antibiotic therapy promotes overgrowth of antibiotic-resistant, gram-negative bacilli and vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2003;24(9):644-649.
74. Klauke P, Schwab F, Gastmeier P, Maechler F. The impact of non-antimicrobial drug agents on the acquisition of ESBL-producing Enterobacterales in non-critical care wards in a German university hospital: an exploratory, matched case-control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkab373>.
75. Heudorf U, Hausemann A, Exner M. Informationsweitergabe bei Patienten mit multiresistenten Erregern-Beitrag aus dem MRE-Netz Rhein-Main.
76. Geffers C, Maechler F, Behnke M, Gastmeier P. Multiresistente Erreger - Epidemiologie, Surveillance und Bedeutung. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2016;51(2):104-10; quiz 111. (In ger). DOI: 10.1055/s-0041-103348.
77. Dhar S, Marchaim D, Tansek R, et al. Contact precautions more is not necessarily better. *Infection control & hospital epidemiology* 2014;35(3):213-219.
78. Korpela K, Salonen A, Virta LJ, et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nature communications* 2016;7(1):1-8.
79. Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrobial resistance and infection control* 2012;1(1):1-7.
80. Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 2018;555(7698):623-628. (In eng). DOI: 10.1038/nature25979.
81. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. 2020. Stockholm: ECDC: 2019.
82. Remschmidt C, Schroder 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. *Antimicrobial resistance and infection control* 2018;7:54. (In eng). DOI: 10.1186/s13756-018-0353-x.
83. Didelot X, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Wilson DJ. Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 2016;14(3):150-162.
84. de Been M, Pinholt M, Top J, et al. Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for High- Resolution Typing of *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology* 2015;53(12):3788-97. (In eng). DOI: 10.1128/jcm.01946-15.
85. Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, et al. Near-ubiquitous presence of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST117/CT71/vanB -clone in the Rhine-Main metropolitan area of Germany. *Antimicrobial resistance and infection control* 2019;8:128. (In eng). DOI: 10.1186/s13756-019-0573-8.
86. Eisenberger D, Tuschak C, Werner M, et al. Whole-genome analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks suggests the occurrence of few endemic clonal lineages in Bavaria, Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020;75(6):1398-1404.
87. Xanthopoulou K, Peter S, Tobys D, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonizing patients on hospital admission in Germany: prevalence and molecular epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020;75(10):2743-2751.
88. Harris SR. SKA: Split Kmer Analysis Toolkit for Bacterial Genomic Epidemiology. *bioRxiv* 2018:453142. DOI: 10.1101/453142.

89. Higgs C, Sherry NL, Seemann T, et al. Optimising genomic approaches for identifying vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmission in healthcare settings. *Nature communications* 2022;13(1):509. (In eng). DOI: 10.1038/s41467-022-28156-4.
90. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 2016;387(10014):176-187.
91. Baur D, Gladstone BP, Burkert F, et al. Effect of antibiotic stewardship on the incidence of infection and colonisation with antibiotic-resistant bacteria and *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 2017;17(9):990-1001. (In eng). DOI: 10.1016/s1473-3099(17)30325-0.
92. Nationales Referenzzentrum für die Surveillance von nosokomialen Infektionen. STATIONS-KISS Erreger-Surveillance, Referenzdaten 2021. (https://www.nrz-hygiene.de/files/Referenzdaten/STATIONS/Erreger/201701_202112_STATION_ALL_MRECDADRef.pdf).
93. Nationales Referenzzentrum für die Surveillance von nosokomialen Infektionen. ITS-KISS Erreger-Surveillance Referenzdaten. Nationales Referenzzentrum für Nosokomiale Infektionen. (https://www.nrz-hygiene.de/files/Referenzdaten/ITS/Erreger/201701_202112_ITS_ALL_MRECDADRef.pdf).
94. Maechler F, Diaz LP, Schröder C, Geffers C, Behnke M, Gastmeier P. Prevalence of carbapenem-resistant organisms and other Gram-negative MDRO in German ICUs: first results from the national nosocomial infection surveillance system (KISS). *Infection* 2014;1-6.
95. Maechler F, Geffers C, Schwab F, Peña DL, Behnke M, Gastmeier P. Development of antimicrobial resistance in Germany: What is the current situation? *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2017;112(3):186-191. (<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00063-017-0272-2.pdf>).
96. Matsumura Y, Pitout JD. Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Expert review of molecular diagnostics* 2016;16(7):783-794.
97. Stewardson AJ, Marimuthu K, Sengupta S, et al. Effect of carbapenem resistance on outcomes of bloodstream infection caused by Enterobacteriaceae in low-income and middle-income countries (PANORAMA): a multinational prospective cohort study. *The Lancet infectious diseases* 2019;19(6):601-610.
98. Rottier WC, Pinholt M, van der Bij AK, et al. Attributable mortality of vancomycin resistance in ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in Denmark and the Netherlands: a matched cohort study. *medRxiv* 2020:2020.05.10.20049783. DOI: 10.1101/2020.05.10.20049783.
99. Biehl LM, Higgins PG, Stemler J, et al. Impact of single-room contact precautions on acquisition and transmission of vancomycin-resistant enterococci on haematological and oncological wards, multicentre cohort-study, Germany, January– December 2016. *Eurosurveillance* 2022;27(2):2001876.
100. Biehl L, Higgins P, Wille T, et al. Impact of single-room contact precautions on hospital-acquisition and transmission of multidrug-resistant *Escherichia coli*: a prospective multicentre cohort study in haematological and oncological wards. *Clinical Microbiology and Infection* 2019;25(8):1013-1020.
101. Denkelt L, Maechler F, Schwab F, et al. Infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriales after rectal colonization with ESBL-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection* 2020;26(8):1046-1051.
102. Kramer TS, Renschmidt C, Werner S, et al. The importance of adjusting for enterococcus species when assessing the burden of vancomycin resistance: a cohort study including over 1000 cases of enterococcal bloodstream infections. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2018;7(1):1-9.
103. Merino I, Hernandez-Garcia M, Turrientes MC, et al. Emergence of ESBL-producing *Escherichia coli* ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2018;73(11):2973-2980. (In eng). DOI: 10.1093/jac/dky296.

104. Mehrotra P, Croft L, Day HR, et al. Effects of contact precautions on patient perception of care and satisfaction: a prospective cohort study. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2013;34(10):1087-1093.
105. Stelfox H, Bates D, Redelmeier D. Safety of patients isolated for infection control. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2003;290:1899-05. (<http://jama.jamanetwork.com/data/Journals/JAMA/4899/JOC30882.pdf>).
106. Morgan DJ, Pineles L, Shardell M, et al. The effect of contact precautions on healthcare worker activity in acute care hospitals. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2013;34(1):69-73.
107. Roth JA, Hornung-Winter C, Radicke I, et al. Direct Costs of a Contact Isolation Day: A Prospective Cost Analysis at a Swiss University Hospital. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2018;39(1):101-103. (In eng). DOI: 10.1017/ice.2017.258.
108. VerLee K, Berriel-Cass D, Buck K, Nguyen C. Cost of isolation: daily cost of isolation determined and cost avoidance demonstrated from the overuse of personal protective equipment in an acute care facility. *American journal of infection control* 2014;42(4):448-449.
109. Uddin MA, Afroj S, Hasan T, Carr C, Novoselov KS, Karim N. Environmental impacts of personal protective clothing used to combat COVID - 19. *Advanced Sustainable Systems* 2022;6(1):2100176.
110. Derde LP, Cooper BS, Goossens H, et al. Interventions to reduce colonisation and transmission of antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: an interrupted time series study and cluster randomised trial. *The Lancet infectious diseases* 2014;14(1):31-9. (In eng). DOI: 10.1016/s1473-3099(13)70295-0.
111. Cornely OA, von Lilienfeld-Toal M. Positionspapier der Arbeitsgemeinschaft für Infektionen in der Hämatologie und Onkologie (AGIHO). 2020.
112. De Angelis G, Cataldo MA, De Waure C, et al. Infection control and prevention measures to reduce the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014;69(5):1185-92. (In eng). DOI: 10.1093/jac/dkt525.
113. Huskins W, Huckabee C, O'Grady N, et al. Intervention to reduce transmission of resistant bacteria in intensive care. *New Engl J Med* 2011;364:1407-18. (<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1000373>).
114. Marra AR, Edmond MB, Schweizer ML, Ryan GW, Diekema DJ. Discontinuing contact precautions for multidrug-resistant organisms: a systematic literature review and meta-analysis. *American journal of infection control* 2018;46(3):333-340.
115. Pryor R, Viola-Luqa C, Hess O, Bearman G. Barrier precautions in the era of multidrug pathogens. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* 2020;12(3):321-331.
116. Okamoto K, Rhee Y, Schoeny M, et al. Impact of doffing errors on healthcare worker self-contamination when caring for patients on contact precautions. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2019;40(5):559-565. (In eng). DOI: 10.1017/ice.2019.33.
117. Deboscker S, Séverac F, Gaudart J, Ménard C, Meyer N, Lavigne T. An agent-based model to simulate the transmission of vancomycin-resistant enterococci according different prevention and control measures. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2021;42(7):857-863.
118. Cusini A, Nydegger D, Kaspar T, Schweiger A, Kuhn R, Marschall J. Improved hand hygiene compliance after eliminating mandatory glove use from contact precautions—Is less more? *American journal of infection control* 2015;43(9):922-927. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196655315006070?via%3Dihub>).
119. Harris AD, Pineles L, Belton B, et al. Universal glove and gown use and acquisition of antibiotic-resistant bacteria in the ICU: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2013;310(15):1571-80. DOI: 10.1001/jama.2013.277815.

120. Decousser J-W, Poirel L, Nordmann P. Recent advances in biochemical and molecular diagnostics for the rapid detection of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae: a focus on β -lactam resistance. *Expert review of molecular diagnostics* 2017;17(4):327-350.
121. Stinear TP, Olden DC, Johnson PD, Davies JK, Grayson ML. Enterococcal vanB resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *The lancet* 2001;357(9259):855-856.
122. van Hout D, Bruijning-Verhagen PC, Blok H, Troelstra A, Bonten MJ. Universal risk assessment upon hospital admission for screening of carriage with multidrug-resistant micro-organisms in a Dutch tertiary care centre. *Journal of Hospital Infection* 2021;109:32-39.
123. Moralejo D, El Dib R, Prata RA, Barretti P, Correa I. Improving adherence to Standard Precautions for the control of health care - associated infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018(2).
124. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *The New England journal of medicine* 2016;375(24):2369-2379. (In eng). DOI: 10.1056/NEJMra1600266.
125. Sommer MO, Dantas G. Antibiotics and the resistant microbiome. *Curr Opin Microbiol* 2011;14(5):556-63. (In eng). DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.005.
126. Bhalodi AA, van Engelen TSR, Virk HS, Wiersinga WJ. Impact of antimicrobial therapy on the gut microbiome. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2019;74(Supplement_1):i6-i15. (In eng). DOI: 10.1093/jac/dky530.
127. Lanckohr C, Boeing C, De Waele JJ, et al. Antimicrobial stewardship, therapeutic drug monitoring and infection management in the ICU: results from the international A-TEAMICU survey. *Annals of intensive care* 2021;11(1):1-8.
128. Maechler F, Schwab F, Geffers C, Meyer E, Leistner R, Gastmeier P. Antibiotic stewardship in Germany: a cross-sectional questionnaire survey of 355 intensive care units. *Infection* 2013 (In Eng). DOI: 10.1007/s15010-013-0531-y.
129. Peñalva G, Högberg LD, Weist K, et al. Decreasing and stabilising trends of antimicrobial consumption and resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in segmented regression analysis, European Union/European Economic Area, 2001 to 2018. *Eurosurveillance* 2019;24(46):1900656.
130. Webb BJ, Majers J, Healy R, et al. Antimicrobial stewardship in a hematological malignancy unit: carbapenem reduction and decreased vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *Clinical Infectious Diseases* 2020;71(4):960-967.
131. Le Bastard Q, Al - Ghalith G, Grégoire M, et al. Systematic review: human gut dysbiosis induced by non - antibiotic prescription medications. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2018;47(3):332-345.
132. Brosnahan AJ, Jones BJ, Dvorak CM, Brown DR. Morphine attenuates apically-directed cytokine secretion from intestinal epithelial cells in response to enteric pathogens. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 2014;3(2):249-257.
133. Husebye E, Skar V, Høverstad T, Iversen T, Melby K. Abnormal intestinal motor patterns explain enteric colonization with gram-negative bacilli in late radiation enteropathy. *Gastroenterology* 1995;109(4):1078-1089.
134. Willems RP, Van Dijk K, Ket JC, Vandenbroucke-Grauls CM. Evaluation of the association between gastric acid suppression and risk of intestinal colonization with multidrug-resistant microorganisms: a systematic review and meta-analysis. *JAMA internal medicine* 2020;180(4):561-571.
135. Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis. *The lancet Gastroenterology & hepatology* 2017;2(2):135-143.
136. Papanicolas LE, Gordon DL, Wesselingh SL, Rogers GB. Not just antibiotics: is cancer chemotherapy driving antimicrobial resistance? *Trends in microbiology* 2018;26(5):393-400. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966842X17302366?via%3Dihub>).
137. Wales AD, Davies RH. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 2015;4(4):567-604. (In eng). DOI: 10.3390/antibiotics4040567.

138. Kampf G. Antibiotic Resistance Can Be Enhanced in Gram-Positive Species by Some Biocidal Agents Used for Disinfection. *Antibiotics* (Basel, Switzerland) 2019;8(1) (In eng). DOI: 10.3390/antibiotics8010013.
139. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial drug resistance* 2010;16(2):91-104.
140. Tanner WD, Leecaster MK, Zhang Y, et al. Environmental Contamination of Contact Precaution and Non-Contact Precaution Patient Rooms in Six Acute Care Facilities. *Clinical Infectious Diseases* 2021;72(Supplement_1):S8-S16.
141. Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2011;32(7):687-99. (In eng). DOI: 10.1086/660363.
142. Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, et al. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clinical infectious diseases* 2008;46(5):678-685.
143. Hayden MK, Bonten MJ, Blom DW, Lyle EA, van de Vijver DA, Weinstein RA. Reduction in acquisition of vancomycin-resistant enterococcus after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clinical Infectious Diseases* 2006;42(11):1552-1560.
144. Anderson DJ, Chen LF, Weber DJ, et al. Enhanced terminal room disinfection and acquisition and infection caused by multidrug-resistant organisms and *Clostridium difficile* (the Benefits of Enhanced Terminal Room Disinfection study): a cluster-randomised, multicentre, crossover study. *Lancet* 2017;389(10071):805-814. (In eng). DOI: 10.1016/s0140-6736(16)31588-4.
145. Mitchell BG, Hall L, White N, et al. An environmental cleaning bundle and health-care-associated infections in hospitals (REACH): a multicentre, randomised trial. *The Lancet infectious diseases* 2019;19(4):410-418.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S147330991830714X?via%3Dihub>).
146. Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *International journal of antimicrobial agents* 2012;39(5):381-389.
147. Klassert TE, Zubiria-Barrera C, Neubert R, et al. Comparative analysis of surface sanitization protocols on the bacterial community structures in the hospital environment. *Clinical Microbiology and Infection* 2022.
148. Stone W, Tolmay J, Tucker K, Wolfaardt GM. Disinfectant, soap or probiotic cleaning? Surface microbiome diversity and biofilm competitive exclusion. *Microorganisms* 2020;8(11):1726.
149. Weber A, Maechler F, Schwab F, Gastmeier P, Kola A. Increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain type ST117 CT71 at Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2008 to 2018. *Antimicrobial resistance and infection control* 2020;9(1):109. (In eng). DOI: 10.1186/s13756-020-00754-1.
150. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews* 2017;41(3):252-275. DOI: 10.1093/femsre/fux013.
151. Pearce ME, Alikhan N-F, Dallman TJ, Zhou Z, Grant K, Maiden MC. Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European *Salmonella* serovar Enteritidis outbreak. *International journal of food microbiology* 2018;274:1-11.
152. Hall MD, Holden MT, Srisomang P, et al. Improved characterisation of MRSA transmission using within-host bacterial sequence diversity. *eLife* 2019;8:e46402.
153. Moradigaravand D, Gouliouris T, Blane B, et al. Within-host evolution of *Enterococcus faecium* during longitudinal carriage and transition to bloodstream infection in immunocompromised patients. *Genome medicine* 2017;9(1):1-11.
154. Köser CU, Fraser LJ, Ioannou A, et al. Rapid single-colony whole-genome sequencing of bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014;69(5):1275-1281.

155. Stoesser N, Sheppard AE, Moore C, et al. Extensive within-host diversity in fecally carried extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: implications for transmission analyses. *Journal of clinical microbiology* 2015;53(7):2122-2131.
156. Moran-Gilad J, Sintchenko V, Pedersen SK, et al. Proficiency testing for bacterial whole genome sequencing: an end-user survey of current capabilities, requirements and priorities. *BMC infectious diseases* 2015;15:174. (In eng). DOI: 10.1186/s12879-015-0902-3.
157. León-Sampedro R, DelaFuente J, Díaz-Agero C, et al. Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nature microbiology* 2021;6(5):606-616.
158. Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae reveals Intergenous KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *mBio* 2011;2(6):e00204-11. (In eng). DOI: 10.1128/mBio.00204-11.
159. Decraene V, Phan HTT, George R, et al. A Large, Refractory Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Demonstrates Carbapenemase Gene Outbreaks Involving Sink Sites Require Novel Approaches to Infection Control. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2018;62(12) (In eng). DOI: 10.1128/aac.01689-18.
160. Wendel AF, Ressina S, Kolbe-Busch S, Pfeiffer K, MacKenzie CR. Species Diversity of Environmental GIM-1-Producing Bacteria Collected during a Long-Term Outbreak. *Appl Environ Microbiol* 2016;82(12):3605-3610. (In eng). DOI: 10.1128/aem.00424-16.
161. de Man TJB, Yaffee AQ, Zhu W, et al. Multispecies Outbreak of Verona Integron-Encoded Metallo- β -Lactamase-Producing Multidrug Resistant Bacteria Driven by a Promiscuous Incompatibility Group A/C2 Plasmid. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2021;72(3):414-420. (In eng). DOI: 10.1093/cid/ciaa049.
162. Weber RE, Pietsch M, Frühauf A, et al. IS26-Mediated Transfer of bla (NDM-1) as the Main Route of Resistance Transmission During a Polyclonal, Multispecies Outbreak in a German Hospital. *Frontiers in microbiology* 2019;10:2817. (In eng). DOI: 10.3389/fmicb.2019.02817.
163. Orlek A, Stoesser N, Anjum MF, et al. Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Frontiers in microbiology* 2017;8:182.
164. Schwengers O, Barth P, Falgenhauer L, Hain T, Chakraborty T, Goesmann A. Platon: identification and characterization of bacterial plasmid contigs in short-read draft assemblies exploiting protein sequence-based replicon distribution scores. *Microbial genomics* 2020;6(10).
165. Arredondo-Alonso S, Top J, McNally A, et al. Plasmids shaped the recent emergence of the major nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. *mBio* 2020;11(1).
166. Wang J, Foxman B, Mody L, Snitkin ES. Network of microbial and antibiotic interactions drive colonization and infection with multidrug-resistant organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017;114(39):10467-10472.
167. Godijk NG, Bootsma MC, Bonten MJ. Transmission routes of antibiotic resistant bacteria: a systematic review. *BMC infectious diseases* 2022;22(1):1-15.

6. Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. med. Petra Gastmeier danken, die mir stets unterstützend zur Seite stand und mich darin bestärkt hat, an mich und meine Arbeit zu glauben. Ihre Ideen, Expertise, konstruktive Kritik, ihr Pragmatismus, ihre Erreichbarkeit und Insistenz haben diese Arbeit möglich gemacht.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen am Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Charité vom Sekretariat über das Labor, das IT-Team, das Studienbüro, die Hygienefachkräfte bis zu den wissenschaftlichen Mitarbeitern für die großartige Arbeitsatmosphäre bedanken. Alle wollen bleiben, ich auch. Insbesondere gilt mein Dank Dr. rer. medic. Frank Schwab, der mit wenigen Worten das Wesentliche auf den Punkt bringt und rechnet, mich immer wieder methodisch nordet und auch mal eine Nacht durchhackert. Weiterhin möchte ich Dr. med Anna Weber danken, die mit ihrer Freude, ihrem unermüdlichen Fleiß, ihrer Respektlosigkeit gegenüber Linux und ihrer Hartnäckigkeit bei der Verwendung von YAT unsere kleine Sequenzier-Arbeitsgruppe zu einem Team gemacht hat. Besonderer Dank gilt dem Laborleiter PD Dr. med. Axel Kola, ohne dessen Unterstützung die meisten der hier vorgestellten und anderen Arbeiten nicht entstanden wären. Danke an Dr. rer. nat. Luisa Denkel für die rasche Auffassungsgabe und Energie in jedem Bereich, und für dieses Lachen. Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. med. Christine Geffers, die mit ihrem analytischen Sachverstand das ganze Institut bereichert.

Großer Dank auch an Dr. Oliver Schwengers für die geduldigen Erläuterungen bioinformatischer und molekularbiologischer Abgründe und die Analysen trotz so vieler anderer, wichtigerer Projekte. Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. med. Stephan Harbarth danken, der die Ausrichtung einiger Arbeiten maßgeblich beeinflusst hat und trotz der Entfernung immer für Fragen zur Verfügung stand.

Ich danke meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung. Großer Dank gilt meinen Kindern, die sich oft geduldig, verständnisvoll und meist sinnvoll anderweitig beschäftigt haben. Und ich danke meinem Mann, Dr. Ruben Serral Gracia, ohne den mir beruflich sehr viel weniger möglich wäre.

7. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden, - mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité –Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift